



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114010775 A

(43) 申请公布日 2022. 02. 08

(21) 申请号 202111336096.5

(22) 申请日 2016.04.29

(30) 优先权数据

62/156,500 2015.05.04 US

62/237,813 2015.10.06 US

62/237,820 2015.10.06 US

62/319,539 2016.04.07 US

(62) 分案原申请数据

201680025709.4 2016.04.29

(71) 申请人 辉瑞大药厂

地址 美国纽约州

(72) 发明人 A·S·安德森

A·S·布彭德尔 巴拉

R·G·K·唐纳德 顾建新

K·U·詹森 R·K·凯因坦

L·康德克 金进焕

P·利伯拉托尔 A·K·普拉萨德

M·E·鲁彭 I·L·斯卡利

S·辛格 C·X·杨

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 刘晓东

(51) Int. Cl.

A61K 39/116 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

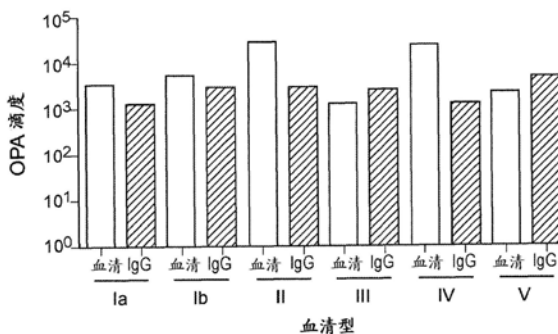
权利要求书1页 说明书95页 附图24页

(54) 发明名称

B族链球菌多糖-蛋白质缀合物、制造缀合物的方法、含缀合物的免疫原性组合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及包含来自无乳链球菌(通常称为B族链球菌(GBS))的荚膜多糖(CP)和载体蛋白的免疫原性多糖-蛋白质缀合物,其中,CP选自由下列所组成的群组:血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及IX,以及其中,CP的唾液酸水平高于约60%。本发明还涉及制造该缀合物以及包含该缀合物的免疫原性组合物的方法。本发明还涉及包含多糖-蛋白质缀合物的免疫原性组合物,其中,该缀合物包含来自GBS血清型IV及至少一种另外的血清型的CP。本发明进一步涉及使用本文公开的组合物来诱发受试者对GBS的免疫反应和/或减少或预防受试者的侵袭性GBS疾病的方法。所产生的抗体可通过被动免疫疗法而用于治疗或预防GBS感染。



1. 一种免疫原性多糖-蛋白质缀合物,其包含B族链球菌(GBS)荚膜多糖和载体蛋白,其中,该荚膜多糖的唾液酸水平高于约60%、高于约95%、或为约100%。

2. 如权利要求1的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖选自由下列所组成的群组:血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及IX。

3. 一种分离荚膜多糖的方法,其包括使有机试剂与包含产荚膜多糖的细菌的细胞培养液反应。

4. 一种制造如权利要求1或2的免疫原性多糖-蛋白质缀合物的方法,其中,该荚膜多糖根据如权利要求3的方法分离。

5. 一种免疫原性多糖-蛋白质缀合物,其包含通过如权利要求3的方法制造的荚膜多糖。

6. 一种免疫原性组合物,其包含如权利要求1至2或5中任一项的免疫原性多糖-蛋白质缀合物。

7. 一种免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自B族链球菌(GBS)血清型IV及至少一种另外的血清型的荚膜多糖,该另外的血清型选自由下列所组成的群组:Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。

8. 一种免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自GBS血清型Ia、Ib、II、III及IV的荚膜多糖。

9. 一种包括多糖-蛋白质缀合物的免疫原性组合物,该多糖-蛋白质缀合物包含至少四种选自由下列所组成的群组的GBS荚膜多糖血清型:Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及IX。

10. 一种抗体,其结合如权利要求1至2或5中任一项的免疫原性缀合物中的荚膜多糖。

11. 一种组合物,其包含如权利要求10的抗体。

12. 一种产生抗体的方法,包括向受试者施用如权利要求6至9中任一项的免疫原性组合物。

13. 一种通过如权利要求12的方法而产生的抗体。

14. 如权利要求6至9中任一项的免疫原性组合物在制备用于赋予受试者被动免疫力的药物中的用途。

15. 一种制造如权利要求1至2或5中任一项的免疫原性多糖-蛋白质缀合物的方法,其包括下列步骤:

(a) 使GBS荚膜多糖与氧化剂反应以产生经活化的多糖;以及

(b) 使该经活化的多糖与载体蛋白反应以产生多糖-蛋白质缀合物。

16. 一种制造多糖-蛋白质缀合物的方法,其包括下列步骤:

(a) 使经分离的GBS荚膜多糖与氧化剂反应;

(b) 通过加入淬灭剂来淬灭步骤(a)的氧化反应以产生经活化的GBS荚膜多糖;

(c) 混合该经活化的GBS荚膜多糖与载体蛋白,

(d) 使该经混合的经活化的GBS荚膜多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成GBS荚膜多糖-载体蛋白缀合物,以及

(e) 通过加入硼氢化钠(NaBH_4)来将未反应的醛封端,

其中,步骤(c)和(d)在DMSO中进行。

B族链球菌多糖-蛋白质缀合物、制造缀合物的方法、含缀合物的免疫原性组合物及其用途

[0001] 本申请是申请日为2016年4月29日、发明名称为“B族链球菌多糖-蛋白质缀合物、制造缀合物的方法、含缀合物的免疫原性组合物及其用途”的中国发明专利申请201680025709.4的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及包含来自无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) (通常称为B族链球菌 (GBS)) 的荚膜多糖 (CP) 和载体蛋白的免疫原性多糖-蛋白质缀合物, 其中, CP选自自由下列所组成的群组: 血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII和IX, 以及其中, CP的唾液酸 (sialic acid) 量高于约60%。本发明还涉及制造该缀合物的方法以及包含该缀合物的免疫原性组合物。本发明还涉及包含多糖-蛋白质缀合物的免疫原性组合物, 其中, 该缀合物包含来自GBS血清型IV及至少一种另外的血清型的CP。本发明进一步涉及使用本文公开的组合物来诱发受试者对GBS的免疫反应和/或减少或预防受试者的侵袭性GBS疾病的方法。所产生的抗体可通过被动免疫疗法而用于治疗或预防GBS感染。

[0003] 发明背景

[0004] 无乳链球菌为革兰氏阳性多糖包封的生物体, 还称为B族链球菌 (GBS)。它们为人类胃肠道和生殖道常见的共生体 (commensal) 且还为婴儿和老年人的严重疾病的原因 (Baker, C.J., *Vaccine*, 31 (Suppl. 4) :D3-D6 (2013))。婴儿的GBS感染的主要风险因素为母体定殖 (maternal colonization) (Dillon, H.C., 等人., *J. Pediatr.*, 110 (1) :31-36 (1987))。多达四分之一的女性的直肠阴道中带有GBS, 此GBS可在分娩之前或分娩期间感染羊水或婴儿而引起败血症、肺炎及脑膜炎 (Baker 2013; Heath, P.T., 等人., *BMJ Clin. Evid. (Online)*, pii:0323 (2014))。从GBS脑膜炎存活下来的婴儿中有25%患有神经损伤, 其中19%经历认知迟缓 (cognitive delay)、脑性麻痹、失明和听力丧失 (Libster, R., 等人., *Pediatrics*, 130 (1) :e8-152012 (2012))。GBS还可引起流产和早产, 且与死产有关 (McDonald, H.M., 等人., *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 8 (5-6) :220-227 (2000); Randis, T.M., 等人., *The Journal of Infectious Diseases*, 210 (2) :265-273 (2014); Kessous, R., 等人., *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 25 (10) :1983-1986 (2012))。极低出生体重婴儿的感染风险更高出许多, 感染率高达3%且死亡率高达30% (即使立即以抗生素治疗) (Heath 2014)。

[0005] 美国在1990年代后期引进的GBS筛选及于生产时抗生素预防 (intrapartum antibiotic prophylaxis) (IAP) 证明可降低出生第一周内发生新生儿疾病 (早发性疾病 [EOD]) 的比率, 但对之后在出生的前3个月内出现的迟发性疾病 (late onset disease) (LOD) 的比率则没有可测量的影响。目前美国的EOD和LOD病例的比率分别为每1000个出生儿0.25和0.27 (疾病管制和预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention) (CDC), 活菌核心 (ABC) 监督报告 (Active Bacterial Core Surveillance Report) (2013), 其可在<http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs13.pdf>获得)。在

引入用于预防侵袭性肺炎球菌疾病(包括菌血症和脑膜炎)的肺炎球菌缀合物疫苗后,尽管IAP可用于预防GBS疾病,GBS已成为美国新生儿败血症(EOD)和脑膜炎(<2mo)最常见的单一原因(Verani, J.R., 等人, MMWR, 59 (RR10) :1-32 (2010); Thigpen, M.C., 等人, New England Journal of Medicine, 364 (21) :2016-2025 (2011))。不像在美国,引入用于侵袭性GBS疾病的防治准则及IAP并未降低荷兰或英国的EOD发生率(Bekker, V., 等人, The Lancet Infectious Diseases, 14 (11) :1083-1089 (2014); Lamagni, T.L., 等人, Clin. Infect. Dis., 57 (5) :682-688 (2013))。此缺乏效果的情况可能是由于缺乏全面筛检且IAP仅限于最高风险族群(例如发烧、延迟破膜)的母亲。未使用IAP的国家中的EOD比例明显较高,报导的平均发生率为每1000个活产儿的0.75 (95%CI 0.58-0.89) (Edmond, K.M., 等人, Lancet, 379 (9815) :547-556 (2012))。

[0006] 处于GBS疾病的风险中的另一群体为老年人。风险因素包括慢性医学问题,例如糖尿病、癌症、心脏衰竭、神经和泌尿系统状况。根据CDC ABC监督数据,美国2013年的侵袭性GBS的年发生率为0.28/1,000名成年人或在 ≥ 65 岁的成人中为每年12,400个病例。此比率接近老年人的侵袭性肺炎球菌疾病的发生率(相对于 >65 的0.30/1,000)。预计这些比率在美国和欧洲将持续增加(CDC 2013; Lamagni 2013)。

[0007] 一种预防婴儿和老年人的GBS疾病的方法是使用多糖基疫苗。在美国,施用母体GBS预防性疫苗具有预防婴儿的GBS疾病的潜力,无论是否使用IAP。虽然多糖本身可为免疫原性,多糖与蛋白质载体的缀合已被用来改善免疫原性,尤其是用于婴儿和老年人。多糖-蛋白质缀合物疫苗使用与蛋白质载体连接的多糖(通常来自细菌的表层)制造。多糖与蛋白质载体的化学键合可诱发针对其表面显示出该包含在疫苗中的多糖的细菌的免疫反应,从而预防疾病。因此,使用来自病原菌的多糖的疫苗接种是加强宿主免疫的可能策略。

[0008] 覆盖细菌的多糖的变化很大,即使是在单一菌种中。例如,由于细菌多糖荚膜的变异,GBS中有十种不同的血清型。因此,希望多糖基疫苗由一组多糖所组成,以确保对不同流行株的覆盖广度。

[0009] 载体蛋白可为来自目标病原体的相关蛋白抗原,加强对该病原体的特异性免疫反应,或者可为还作为佐剂或一般免疫反应刺激剂的一般免疫原性蛋白。

[0010] GBS血清型Ia、Ib、II、III及V的个体单价多糖-蛋白质缀合物已在非怀孕成人的第1期和第2期临床试验中进行评估(Brigtsen, A.K., 等人, Journal of Infectious Diseases, 185 (9) :1277-1284 (2002); Baker, C.J., 等人, J. Infect. Dis., 188 (1) :66-73 (2003); Baker, C.J., 等人, J. Infect. Dis., 189 (6) :1103-1112 (2004); Baker, C.J., 等人, Vaccine, 25 (1) :55-63 (2007))。二价II-TT和III-TT糖缀合物疫苗(glycoconjugate vaccine)以及包括Ia-CRM₁₉₇、Ib-CRM₁₉₇和III-CRM₁₉₇糖缀合物的三价疫苗也被研究(Baker JID 2003; Clinicaltrials.gov NCT01193920, NCT01412801, 和NCT01446289)。然而,尚无GBS疫苗被核准。

[0011] 此外,虽然该三价疫苗覆盖 $>90\%$ 的引起南非新生儿疾病的侵袭性菌株(Madzivhandila, M., 等人, PloS One, 6 (3) :e17861 (2011)),根据最近对2004至2013从替加环素评估和监控试验(Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial) (T.E.S.T., <http://www.testsurveillance.com/>)收集的全球901个收集样本的新生儿分离株的监控,这些相同血清型仅分别代表北美和欧洲地区62%及66%的侵袭性分离株。

[0012] 从T.E.S.T.样本获得的菌株的分析显示出所收集的菌株中95%属于五种有记录的主要血清型之一(Ia、Ib、II、III及V),而另外3%为血清型IV。一系列出版物还已确认过去十年美洲和欧洲出现血清型IV(Diedrick,M.J.,等人,J.Clin.Microbiol.,48(9):3100-3104(2010);Teatero(2014);Meehan,M.等人,European Journal of Clinical Microbiology&Infectious Diseases,33(7):1155-1162(2014);Florindo,C.,等人,Euro Surveillance:Bulletin European sur les Maladies Transmissibles(European Communicable Disease Bulletin),19(23)(2014);Palmiero,J.K.,等人,Journal of Clinical Microbiology,48(12):4397-4403(2010))。调查成人直肠/阴道带菌者(carriage)(其为将GBS传给婴儿的危险因素)的研究还发现97%的分离株属于这六种血清型之一,而血清型IV代表~4%的频率。这项研究设计用来监测美国健康成人的 β -溶血性链球菌(beta-hemolytic streptococci)(其包括GBS)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)和金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)带菌者(参见Matson,M.A.,等人,ICAAC, Abstract I-306(Washington,DC, Sep.5-9,2014))。

[0013] 类似地,T.E.S.T.样本的分析显示出来自 ≥ 65 岁的年长美国成人的血液分离株中有98%属于相同六种主要血清群。老年人分离株与其他群体之间最明显的差别为血清群分布。在来自老年患者的分离株方面,血清型V菌株构成最大群组(34%,相对于新生儿带菌株的18%、或成人带菌株的18%)。

[0014] 其他研究已发现血清型流行率存在有地区变异。例如,血清型VI和VIII分离株已证实为日本健康孕妇的主要定殖者(colonizer)(Lachenauer,C.S.,等人,JID 179(4):1030-1033(1999))。

[0015] 因此,需要多糖-蛋白质缀合物疫苗或单克隆抗体以赋予被动免疫力作为用来预防或治疗全世界广大人群中的GBS疾病(包括那些由新出现的血清型IV所引起者)的手段。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明涉及新颖的免疫原性GBS多糖-蛋白质缀合物、制造该缀合物的方法及包含该缀合物的免疫原性组合物,且包括2015年5月4日申请的美国临时申请号62/156,500、2015年5月4日申请的美国临时申请号62/237,813、和2015年10月6日申请的美国临时申请号62/237,820中所公开的发明,其全部内容以引用方式并入本文。下列各项描述本发明的某些方面和实施方案。

[0018] 于一方面中,本发明涉及免疫原性多糖-蛋白质缀合物,其包含来自B族链球菌(GBS)的荚膜多糖和载体蛋白,其中,该荚膜多糖的唾液酸水平高于约60%、高于约95%、或为约100%。于另一实施方案中,该荚膜多糖可被去唾液酸化至高达约40%(唾液酸化程度(sialylation level)高于约60%)。于另一实施方案中,该荚膜多糖选自由下列所组成的群组:血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及IX。

[0019] 于另外的方面中,免疫原性多糖-蛋白质缀合物包含荚膜多糖,该荚膜多糖于每mM多糖中具有约1.0mM的唾液酸,诸如每mM多糖中具有至少约0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、或0.95mM的唾液酸。

[0020] 于本发明的另一方面中,免疫原性缀合物包含其分子量为约5kDa至约1,000kDa、约25kDa至约750kDa、约25kDa至约400kDa、约25kDa至约200kDa、或约100kDa至约400kDa的荚膜多糖。

[0021] 于另外的实施方案中,本发明的免疫原性缀合物的分子量为约300kDa至约20,000kDa,诸如约1,000kDa至约15,000kDa、或约1,000kDa至约10,000kDa。

[0022] 于一实施方案中,免疫原性缀合物包含荚膜多糖,该荚膜多糖被约0%至约40% O-乙酰化,诸如少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%、或少于约1% O-乙酰化。

[0023] 于一实施方案中,免疫原性缀合物包含荚膜多糖,该荚膜多糖于每mM糖重复单元中具有至少约0.1、0.2、0.3、0.35、或约0.4mM O-乙酸酯。于另一实施方案中,免疫原性缀合物包含荚膜多糖,该荚膜多糖于每mM糖重复单元中具有少于约0.01、0.02、0.03、0.04、或0.05mM O-乙酸酯。

[0024] 于一实施方案中,免疫原性缀合物包含CRM₁₉₇或破伤风类毒素作为载体蛋白。于特定的实施方案中,该载体蛋白为CRM₁₉₇。

[0025] 本发明的另外的方面涉及分离荚膜多糖的方法,其包括使有机试剂与包含产荚膜多糖的细菌的细胞培养液 (cell broth) 反应。于一实施方案中,该方法进一步包括离心步骤。于另一实施方案中,该方法进一步包括过滤步骤。于特定的实施方案中,该产荚膜多糖的细菌选自由下列所组成的群组:无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、伤寒沙门杆菌 (*Salmonella typhi*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、克雷白氏肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 及粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)。于一实施方案中,羟胺选自由表2中所列的胺所组成的群组。于另外的实施方案中,羟胺选自由下列所组成的群组:二苄基羟胺 (dibenzyl hydroxylamine); 二乙基羟胺 (diethyl hydroxylamine); 羟胺 (hydroxylamine); 乙二胺 (ethylenediamine); 三乙四胺 (triethylenetetramine); 1,1,4,7,10,10六甲基三乙四胺 (1,1,4,7,10,10hexamethyl triethylene tetramine); 及2,6,10,三甲基2,6,10三氮杂十一烷 (2,6,10,Trimethyl 2,6,10triazoundecane)。于另一实施方案中,羟胺的浓度为约5mM至约200mM。于另一实施方案中,反应的pH为约5.5至约9.5。于另外的实施方案中,反应在约20°C至约85°C的温度进行。于另一实施方案中,反应时间为约10小时至约90小时。

[0026] 于一方面中,本发明涉及包含多糖-蛋白质缀合物的免疫原性组合物,其中,该缀合物包含来自B族链球菌 (GBS) 血清型IV及至少一种选自由下列所组成的群组的另外的血清型的荚膜多糖:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于另一实施方案中,该缀合物包含GBS血清型IV及至少两种选自由下列所组成的群组的另外的血清型:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于另一实施方案中,该缀合物包含GBS血清型IV及至少三种选自由下列所组成的群组的另外的血清型:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于另一实施方案中,该缀合物包含GBS血清型IV及至少四种选自由下列所组成的群组的另外的血清型:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于特定的实施方案中,该缀合物包含来自血清型Ia、Ib、II、III及IV的荚膜多糖。于另一实施方案中,该组合物包含GBS血清型V。于特定的实施方案中,该缀合物包含来自血清型Ia、Ib、II、III、和V的荚膜多糖。于另一实施方案中,该免疫原性组合物包含六种多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自B族链球菌血清型Ia、Ib、II、III、IV及V的荚膜多糖。本发明的一方面涉及不具有免疫干扰的免疫原性组合物。

[0027] 于一实施方案中,免疫原性组合物进一步包含药学上可接受的赋形剂、缓冲剂、稳定剂、佐剂、冷冻保护剂、盐、二价阳离子、非离子性洗涤剂、自由基氧化抑制剂、载体、或其混合物。于另外的实施方案中,包括缓冲剂。该缓冲剂可为HEPES、PIPES、MES、Tris(氨基丁三醇(trimethamine))、磷酸盐、乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸、或琥珀酸盐。于一优选的实施方案中,该缓冲剂为组氨酸。

[0028] 于另一实施方案中,免疫原性组合物进一步包含表面活性剂。该表面活性剂可为聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯、聚山梨醇酯-80、聚山梨醇酯-60、聚山梨醇酯-40、聚山梨醇酯-20、或聚氧乙烯烷基醚(polyoxyethylene alkyl ether)。于一优选的实施方案中,该表面活性剂为聚山梨醇酯-80。

[0029] 于另一实施方案中,免疫原性组合物进一步包含赋形剂。该赋形剂选自自由下列所组成的群组:淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、海藻糖(trehalose)、棉子糖(raffinose)、水苏糖(stachyose)、松三糖(melezitose)、葡聚糖(dextran)、甘露糖醇、乳糖醇(lactitol)、巴糖醇(palatinin)、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩(chalk)、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、氯化钠(NaCl)、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水及乙醇。于一优选的实施方案中,该赋形剂为氯化钠。

[0030] 于另一实施方案中,免疫原性组合物进一步包含佐剂。于一这样的实施方案中,该佐剂为基于铝的佐剂或QS-21。于一优选的实施方案中,该佐剂选自自由下列所组成的群组:磷酸铝、羟基磷酸铝及氢氧化铝。于更优选的实施方案中,该佐剂为磷酸铝。

[0031] 于本发明的一方面中,该免疫原性组合物包含缓冲剂、表面活性剂、赋形剂及任选佐剂,其中,该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0。于另一方面中,免疫原性组合物包含组氨酸、聚山梨醇酯-80、氯化钠及任选磷酸铝,其中,该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0。于一优选的实施方案中,免疫原性组合物包含约10mM至约25mM的组氨酸、约0.01%至约0.03% (v/w)的聚山梨醇酯-80、约10mM至约250mM的氯化钠(NaCl)及任选约0.25mg/ml至约0.75mg/ml的作为磷酸铝的铝。于本发明的另一方面中,免疫原性组合物包含约5mcg/ml至约50mcg/ml的剂量。

[0032] 于本发明的另一方面中,免疫原性组合物,任选地在至少一种赋形剂的存在下,经冷冻干燥。于一实施方案中,该至少一种赋形剂选自自由下列所组成的群组:淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇、巴糖醇、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、氯化钠(NaCl)、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水及乙醇。于一优选的实施方案中,该至少一种赋形剂选自自由下列所组成的群组:蔗糖、甘露糖醇及甘氨酸。于特定的实施方案中,该至少一种赋形剂为蔗糖。于一方面中,该冷冻干燥的组合物包含约1% (w/v)至约10% (w/v)的至少一种赋形剂,优选为多于约5.5% (w/v)。于另一实施方案中,该冷冻干燥的组合物包含另外的赋形剂。于一这样的实施方案中,该另外的赋形剂为甘露糖醇或甘氨酸。于一优选的实施方案中,该冷冻干燥的组合物包含约1% (w/v)至约10% (w/v)的另外的赋形剂。于另一实施方案中,该冷冻干燥的组合物用水、注射用水(WFI)、佐剂悬浮液、或盐水重构。于特定的实施方案中,稀释剂为本文所描述的任何佐剂的悬浮液,诸如基于铝的佐剂悬浮液,优选为磷酸铝悬浮液。

[0033] 本发明的另一方面涉及诱发对GBS的免疫反应的方法,其包括给受试者施用有效

量的如本文所描述的免疫原性组合物。于一实施方案中,本发明涉及预防或减轻受试者的与GBS相关的疾病或状况的方法,其包括给受试者施用有效量的如本文所描述的免疫原性组合物。于特定的实施方案中,该受试者为计划怀孕的女性或怀孕的女性。于一这样的实施方案中,怀孕的女性为在其怀孕后半期(second half of pregnancy),诸如至少在妊娠20周或至少在妊娠27周。于一优选的实施方案中,怀孕的女性在妊娠27周至36周。于另一实施方案中,该受试者为较年长的成人,诸如50岁或更年长的成人、65岁或更年长的成人及85岁或更年长的成人。于另一实施方案中,该受试者是免疫功能受损的(immunocompromised)。于一方面中,受试者可具有选自由下列所组成的群组的医学状况:肥胖、糖尿病、HIV感染、癌症、心血管疾病、或肝脏疾病。于一优选的实施方案中,B族链球菌为无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)。

[0034] 本发明的另外的方面涉及结合本发明的免疫原性组合物中的荚膜多糖的抗体。于一些实施方案中,该抗体在免疫原性组合物施用至受试者时产生。于另一方面中涉及包含本发明的抗体的组合物。

[0035] 本发明的另一方面涉及赋予受试者被动免疫力(passive immunity)的方法,其包括下列步骤:(a)使用本文所描述的免疫原性组合物产生抗体制剂;及(b)给受试者施用该抗体制剂以赋予被动免疫力。

[0036] 本发明的一方面涉及制造本发明的免疫原性多糖-蛋白质缀合物的方法,其包括下列步骤:(a)使GBS荚膜多糖与氧化剂反应以产生经活化的多糖;以及(b)使经活化的多糖与载体蛋白反应以产生多糖-蛋白质缀合物,其中,步骤(b)在极性非质子性溶剂中进行。该溶剂可为二甲亚砜(DMSO)、环丁砜、二甲基甲酰胺(DMF)及六甲基磷酰胺(HMPA)。于一优选的实施方案中,该溶剂为二甲亚砜(DMSO)。

[0037] 于一实施方案中,多糖与0.01至10.0摩尔当量的氧化剂反应。于一特定实施方案中,氧化剂为高碘酸盐。于一这样的实施方案中,高碘酸盐为高碘酸钠。

[0038] 于另一实施方案中,氧化反应为1小时至50小时。于另一实施方案中,氧化反应的温度保持在约2°C至约25°C。于另一实施方案中,氧化反应在选自由下列所组成的群组的缓冲剂中进行:磷酸钠、磷酸钾、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)及Bis-Tris。于一这样的实施方案中,缓冲剂的浓度为约1mM至约500mM。于特定的实施方案中,氧化反应在pH为约4.0至约8.0进行。

[0039] 于本发明的另一方面中,氧化剂为2,2,6,6-四甲基-1-哌啶基氧(2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy)(TEMPO)。于一这样的实施方案中,N-氯琥珀酰亚胺(NCS)为共氧化剂。

[0040] 于一实施方案中,本发明的制造免疫原性多糖-蛋白质缀合物的步骤(a)进一步包括通过加入淬灭剂来淬灭氧化反应。

[0041] 于另一实施方案中,多糖的浓度为约0.1mg/mL至约10.0mg/mL。

[0042] 于另外的实施方案中,经活化的多糖的氧化程度(DO)为5至25。

[0043] 于本发明的另一方面中,该方法进一步包括冷冻干燥该经活化的多糖的步骤。于一实施方案中,该经活化的多糖在选自由下列所组成的群组的糖的存在下被冷冻干燥:蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇和巴糖醇。

[0044] 于本发明的另一方面中,本发明的制造免疫原性多糖-蛋白质缀合物的步骤(b)包

括：(1) 混合该经活化的多糖与载体蛋白，以及(2) 使经混合的经活化的多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成GBS荚膜多糖-载体蛋白缀合物。于一实施方案中，步骤(2)中的经活化的多糖的浓度为约0.1mg/mL至约10.0mg/mL。于另外的实施方案中，经活化的多糖对载体蛋白的初始比率(重量/重量)为5:1至0.1:1。于另一实施方案中，还原剂选自由下列所组成的群组：氰基硼氢化钠(NaBH_3CN)、三乙酰氧基硼氢化钠、布朗斯台德酸(Bronsted acid)或路易斯酸(Lewis acid)存在下的硼氢化钠和硼氢化锌、胺硼烷诸如吡啶硼烷、2-甲吡啶硼烷、2,6-二硼烷-甲醇、二甲胺-硼烷、 $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$ 、苜胺- BH_3 或5-乙基-2-甲吡啶硼烷(PEMB)。于一优选的实施方案中，还原剂为(NaBH_3CN)。于另一实施方案中，还原剂的量为约0.1至约10.0摩尔当量。于另一实施方案中，步骤(2)的还原反应的持续时间为1小时至60小时。于另一实施方案中，还原反应的温度保持在 10°C 至 40°C 。

[0045] 于本发明的另外的方面中，制造免疫原性多糖-蛋白质缀合物的方法进一步包括通过加入硼氢化物来将未反应的醛封端(capping)的步骤(步骤(c))。于一实施方案中，硼氢化物的量为约0.1至约10.0摩尔当量。于另一实施方案中，硼氢化物选自由下列所组成的群组：硼氢化钠(NaBH_4)、氰基硼氢化钠、硼氢化锂、硼氢化钾、四丁基硼氢化铵、硼氢化钙及硼氢化镁。于一优选的实施方案中，硼氢化物为硼氢化钠(NaBH_4)。于另一实施方案中，封端步骤的持续时间为0.1小时至10小时。于另一实施方案中，封端步骤的温度保持在约 15°C 至约 45°C 。

[0046] 于本发明的另一方面中，该方法进一步包括纯化该多糖-蛋白质缀合物的步骤。于一实施方案中，多糖-蛋白质缀合物包含与多糖的总量相较下为少于约40%的游离多糖。于另一实施方案中，缀合物中的多糖对载体蛋白的比率(重量/重量)为约0.5至约3.0。于另一实施方案中，缀合物的缀合程度为2至15。

[0047] 于本发明的另一方面中涉及制造本发明的免疫原性多糖-蛋白质缀合物的方法，其包括下列步骤：(a) 使经分离的GBS荚膜多糖与氧化剂反应；(b) 通过加入淬灭剂来淬灭步骤(a)的氧化反应以产生经活化的GBS荚膜多糖；(c) 混合该经活化的GBS荚膜多糖与载体蛋白，(d) 使经混合的经活化的GBS荚膜多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成GBS荚膜多糖-载体蛋白缀合物，以及(e) 通过加入硼氢化钠(NaBH_4)来将未反应的醛封端，其中，步骤(c)、(d)和(e)在DMSO中进行。

[0048] 附图简述

[0049] 图1比较来自以GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇单价疫苗免疫化的小鼠的血清和经分离的IgG(isolated IgG)的调理素活性。

[0050] 图2GBS Ia-CRM₁₉₇在 50°C 加速储存(accelerated storage)(4周)后的稳定性(如分子量的%变化所示，使用SEC MALLS)。

[0051] 图3GBS Ib-CRM₁₉₇在 50°C 加速储存(4周)后的稳定性(如分子量的%变化所示，使用SEC MALLS)。

[0052] 图4GBS II-CRM₁₉₇在 50°C 加速储存(4周)后的稳定性(如分子量的%变化所示，使用SEC MALLS)。

[0053] 图5GBS III-CRM₁₉₇在 50°C 加速储存(4周)后的稳定性(如分子量的%变化所示，使用SEC MALLS)。

[0054] 图6GBS IV-CRM₁₉₇在50℃加速储存(4周)后的稳定性(如分子量的%变化所示,使用SEC MALLS)。

[0055] 图7GBS V-CRM₁₉₇在50℃加速储存(4周)后的稳定性(如分子量的%变化所示,使用SEC MALLS)。

[0056] 图8GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇及GBS IV-CRM₁₉₇在37℃储存后的稳定性(如通过游离唾液酸所示)。

[0057] 图9使用琥珀酸盐作为缓冲剂的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)的pH的稳定性。

[0058] 图10使用组氨酸作为缓冲剂的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)的pH的稳定性。

[0059] 图11六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的组氨酸缓冲剂浓度对GBS缀合物与铝结合的影响(剂量为10mcg/ml)。

[0060] 图12六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的组氨酸缓冲剂浓度对GBS缀合物与铝结合的影响(剂量为40mcg/ml)。

[0061] 图13六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的聚山梨醇酯-80浓度对在搅拌压力下的总抗原性(total antigenicity)的损失%的影响。

[0062] 图14六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的铝浓度对GBS缀合物与铝结合的影响。

[0063] 图15 10mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的5.5% (w/v) 蔗糖对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0064] 图16 10mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的7.0% (w/v) 蔗糖对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0065] 图17 10mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的8.5% (w/v) 蔗糖对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0066] 图18 50mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的5.5% (w/v) 蔗糖对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0067] 图19 50mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的7.0% (w/v) 蔗糖对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0068] 图20 50mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的8.5% (w/v) 蔗糖对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0069] 图21 40mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的7.0% (w/v)蔗糖对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0070] 图22 40mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的2.0% (w/v)蔗糖和4.0% (w/v)甘露糖醇对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0071] 图23 40mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的3.0% (w/v)蔗糖和3.0% (w/v)甘露糖醇对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0072] 图24 40mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的2.0% (w/v)蔗糖和4.0% (w/v)甘氨酸对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0073] 图25 40mcg/ml剂量的冷冻干燥的六价GBS疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)中的3.0% (w/v)蔗糖和3.0% (w/v)甘氨酸对各血清型的抗原性恢复的影响。

[0074] 发明详述

[0075] 应理解的是,本发明并不限于所描述的特定方法和实验条件,因为这些方法和条件可有变化。还需理解的是,本文所使用的术语仅为了描述特定的实施方案,并不意图成为限制。

[0076] 虽然可使用任何类似或等同于本文所描述者的方法和材料来实行或测试本发明,现在描述优选的方法和材料。本文提及的所有出版物的全部内容以引用方式并入本文。

[0077] 本文所使用的术语具有本领域技术人员所了解和知道的含义,然而,为了方便和完整性,特定术语及其含义阐述于下文和说明书全文中。

[0078] 除非上下文另有明确说明,本说明书及所附的申请专利范围中所使用的单数形式“一(a、an)”及“该(the)”包括复数指称。因此,例如,对“该方法”的指称包括一或多个本文所描述的类型的方法和/或步骤、和/或本领域技术人员在阅读本公开内容时将能清楚明白的那些等等。

[0079] 术语“约”或“大约”意指在数值的统计学上有意义的范围内。这样的范围可在给定数值或范围的一数量级内,通常在20%以内,更常为在10%以内,甚至更常为在5%以内。术语“约”或“大约”所包含的可允许的变化取决于所研究的特定系统,且可被本领域技术人员容易地理解。每当本申请中记载一范围时,该范围内的每个整数还被考虑为是本发明的一个实施方案。

[0080] 需注意的是,本公开内容中,术语诸如“包括/包含(comprises、comprised、comprising)”、“含有(contains、containing)”等等可具有美国专利法中赋予它们的意义;例如,其可意指“包含(includes、included、including)”等等。这样的术语指含括特定的成分或成分组,但不排除任何其他成分。术语诸如“基本上由...组成”具有美国专利法中赋予它们的含义,例如其允许包括不会减损本发明的新颖性或基本特征的另外的成分或步骤,即,其排除会减损本发明的新颖性或基本特征的另外的未记载的成分或步骤,且其排除现有技术(诸如本文中列举或通过引用并入本文中的文献)的成分或步骤,尤其是本文献

的目标为定义可专利性(例如相较于现有技术(例如相较于本文中列举或以引用方式并入本文中的文献)为新颖的、非显而易见的、创造性的)的实施方案。并且,术语“由……组成”具有美国专利法中赋予它们的意义;即,这些术语是封闭式的。因此,这些术语指包括特定的成分或成分组,且排除所有其他成分。

[0081] 术语“抗原”一般指含有至少一个同源抗体可选择性地与其结合的表位的生物分子,通常为蛋白质、肽、多糖、脂质或缀合物;或于某些情况中,“抗原”指可刺激动物产生抗体或T细胞反应、或此二者的免疫原性物质,包括被注射入或吸收入动物中的组合物。免疫反应可对整个分子产生、或对该分子的一或多个不同部分(例如表位或半抗原)产生。该术语可以用于指个体分子、或抗原分子的同质或异质群体。抗原可被抗体、T细胞受体、或其他特异性体液和/或细胞免疫的组件识别。术语“抗原”包括所有相关的抗原性表位。给定抗原的表位可使用本领域所熟知的任何数量的表位定位技术鉴别(参见,例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol.66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, NJ)。例如,线性表位可通过例如下述方法测定:在固体支持物上同时合成大量的肽(这样的肽对应于该蛋白质分子的部分),以及在这样的肽仍连接支持物时使这样的肽与抗体反应。这样的技术为本领域所已知,且描述于,例如美国专利号4,708,871; Geysen, H.M., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998-4002 (1984); Geysen, H.M., 等人, Molec. Immunol., 23 (7):709-715 (1986) 中,其全部内容以引用方式并入本文。类似地,构型表位可通过测定氨基酸的空间构型鉴定,诸如通过例如x-射线晶体学及2-维核磁共振(参见,例如Epitope Mapping Protocols, 同上)。此外,在本发明的目的方面,“抗原”还可用于指包括对天然序列所进行的修饰(诸如删除、插入及取代(性质上通常为保守性,但其可为非保守性))的蛋白质,只要该蛋白质保持诱发免疫反应的能力。这些修饰可为故意造成的,如通过定点突变、或通过特定的合成程序、或通过遗传工程方法,或可为偶然的,诸如通过产生该抗原的宿主的突变。此外,抗原可自微生物(例如细菌)衍生、获得、或分离,或可为整个生物体。类似地,表达抗原的寡核苷酸或多核苷酸(诸如在核酸免疫应用中)也包括在该定义中。还包括合成的抗原,例如多表位(polyepitope)、侧翼表位及其他重组或合成衍生的抗原(Bergmann, C., 等人, Eur. J. Immunol., 23 (11):2777-2781 (1993); Bergmann, C.C., 等人, J. Immunol., 157 (8):3242-3249 (1996); Suhrbier, A., Immunol. and Cell Biol., 75 (4):402-408 (1997))。

[0082] 术语“疫苗”或“疫苗组合物”(其可互换使用)指包括至少一种可诱发动物的免疫反应的免疫原性组合物的药物组合物。

[0083] 荚膜多糖

[0084] 如本文所使用的术语“糖”指单糖部分或单糖单元、以及两个或更多个单糖部分或单糖单元共价连接以形成双糖、寡糖及多糖的组合。术语“糖”可与术语“碳水化合物”互换使用。多糖可为直链型或支链型。

[0085] 如本文所使用的“单糖”指寡糖中的单糖残基。如本文所使用的术语“双糖”指由二个通过糖苷键连接在一起的单糖单元或部分所组成的多糖。

[0086] 于一实施方案中,多糖为寡糖(OS)。如本文所用的“寡糖”指含有两个或更多个单糖单元或部分的化合物。在寡糖的背景下,个体单体单元或部分为单糖,其为(或可为)通过羟基结合另一单糖单元或部分。寡糖可从受保护的单一残基糖通过化学合成来制备或通过

生物制造的多糖的化学降解来制备。或者,寡糖可通过体外酶法制造。

[0087] 于一优选的实施方案中,多糖为多糖(PS),此指具有至少5个单糖单元或部分的直链型或支链型聚合物。为了清楚起见,较大的重复单元(其中n大于约5,诸如大于约10)在本文中将被称为多糖。

[0088] 于一实施方案中,多糖为细胞表面多糖。细胞表面多糖指其至少有部分位于最外面的细菌细胞膜或细菌细胞表面(包括肽聚糖层、细胞壁及荚膜)的多糖。通常,细胞表面多糖与体内诱发免疫反应相关。细胞表面多糖可为“细胞壁多糖”或“荚膜多糖”。细胞壁多糖通常在细菌表面形成不连续层。

[0089] 于一实施方案中,多糖为荚膜多糖。荚膜多糖指包括一或多个通过糖苷键联接连接的单糖重复单元的糖聚合物。荚膜多糖通常在细菌细胞周围形成荚膜状层。“荚膜多糖”指在大多数链球菌分离株的细胞壁外部的多糖荚膜。例如,所有GBS荚膜多糖具有支链型重复结构,带有细菌毒力所需要的终端 α 2-3连接的唾液酸。来自体外培养的T.E.S.T.的侵袭性新生儿分离株中有>94%被检测到荚膜相关的唾液酸(通过HPLC分析量化)。

[0090] 本申请发明人已发现GBS荚膜多糖的唾液酸水平为产生免疫反应的重要特征。现有技术仅提供关于血清型V的唾液酸水平的冲突信息,发现去唾液酸化的血清型V为优选的(国际专利申请公开号W0 2012/035519)且可使用唾液酸含量>50%的血清型V(国际专利申请公开号W0 2014/053612)。然而,这些参考文献中均没有描述唾液酸水平对至少大部分GBS多糖的免疫原性的重要性。本申请发明人意外发现GBS荚膜多糖在缀合前需要约60%或更多的唾液酸以提供与具有天然唾液酸水平(即,100%或多于约95%)的那些多糖相当的免疫反应。即使是58%的唾液酸水平(此在先前公开的血清型V的范围内)仍然负面地影响免疫原性。

[0091] 因此,于本发明的一实施方案中,荚膜多糖包含其天然唾液酸水平(诸如约100%或多于约95%)。于另一实施方案中,荚膜多糖可经去唾液酸化高达约40%(唾液酸化程度高于约60%),诸如高达约35%(唾液酸化程度高于约65%)、高达约30%(唾液酸化程度高于约70%)、高达约25%(唾液酸化程度高于约75%)、高达约20%(唾液酸化程度高于约80%)、高达约15%(唾液酸化程度高于约85%)、高达约10%(唾液酸化程度高于约90%)及高达约5%(唾液酸化程度高于约95%)。

[0092] 应注意的是,100%的唾液酸水平相当于每mM的多糖中有约1.0mM的唾液酸。因此,荚膜多糖于每mM的多糖中可具有约1.0mM的唾液酸,诸如每mM的多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。于另一实施方案中,荚膜多糖于每mM多糖中可具有至少约0.6mM的唾液酸,诸如每mM的多糖中具有至少约0.65mM的唾液酸、每mM的多糖中具有至少约0.7mM的唾液酸、每mM的多糖中具有至少约0.75mM的唾液酸、每mM的多糖中具有至少约0.8mM的唾液酸、每mM的多糖中具有至少约0.85mM的唾液酸、每mM的多糖中具有至少约0.9mM的唾液酸、或每mM的多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。

[0093] 某些荚膜多糖(CP)血清型的末端唾液酸残基被部分O-乙酰化(OAc)(Lewis,A.L.,等人,Proceedings of the National Academy of Sciences USA,101(30):11123-8(2004))。血清型Ib、III、IV、V、VI及IX被部分O-乙酰化(高达~40%),而血清型Ia、II及VII仅有很少或没有O-乙酰化(少于约5%)(Lewis 2004)。于本发明的一实施方案中,荚膜多糖包含其天然O-乙酰化水平(约0%至约40%)。于另一实施方案中,荚膜多糖可为脱-O-乙酰

化的(少于约5%)。多糖或寡糖的O-乙酰化的程度可通过本领域已知的任何方法测定,例如通过质子NMR(Lemercinier, X., 等人, Carbohydrate Research, 296:83-96 (1996); Jones, C., 等人, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30:1233-1247 (2002); 国际专利申请公开号W0 2005/033148和W0 00/56357)。另一种常用的方法为由Hestrin, S., J. Biol. Chem., 180:249-261 (1949) 所描述的。

[0094] 还应注意的是,100%O-乙酸酯相当于每mM的糖重复单元中有约1.0mM O-乙酸酯。因此,部分O-乙酰化的多糖于每mM糖重复单元中包括至少约0.1、0.2、0.3、0.35、或约0.4mM的O-乙酸酯。脱-O-乙酰化的多糖于每mM糖重复单元中包括少于约0.01、0.02、0.03、0.04、或0.05mM O-乙酸酯。

[0095] 能够引起侵袭性疾病的链球菌微生物通常还能产生包覆该细菌并增强其对被宿主先天免疫系统清除的抗性的CP。CP用来掩护细菌细胞在保护性荚膜中,该保护性荚膜使细菌可抵抗吞噬作用及细胞内杀死作用。缺乏荚膜的细菌更易受吞噬。荚膜多糖常为许多细菌病原体(包括流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)及金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*))的重要毒力因子(virulence factor)。

[0096] 荚膜多糖可用于将特定菌种血清分型。分型通常通过与针对该荚膜多糖的特定结构或独特的表位特征产生的特异性抗血清或单克隆抗体反应来完成。GBS血清型有十种:Ia、Ib及II至IX(Ferrieri, P., 等人, Emerg. Infect. Dis. [Internet], 19(4) (2013), 其可在http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/4/12-1572_article获得)。

[0097] 于本发明的一实施方案中,多糖从无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)分离出。多糖可从无乳链球菌(*S. agalactiae*)的任何包覆株(encapsulated strain)分离出,诸如090、A909(ATCC登录号BAA-1138)、515(ATCC登录号BAA-1177)、B523、CJB524、MB 4052(ATCC登录号31574)、H36B(ATCC登录号12401)、S40、S42、MB 4053(ATCC登录号31575)、M709、133、7357、PFEGBST0267、MB 4055(ATCC登录号31576)、18RS21(ATCC登录号BAA-1175)、S16、S20、V8(ATCC登录号12973)、DK21、DK23、UAB、5401、PFEGBST0708、MB 4082(ATCC登录号31577)、M132、110、M781(ATCC登录号:BAA-22)、D136C(3)(ATCC登录号12403)、M782、S23、120、MB 4316(M-732;ATCC登录号31475)、M132、K79、COH1(ATCC登录号BAA-1176)、PFEGBST0563、3139(ATCC登录号49446)、CZ-NI-016、PFEGBST0961、1169-NT1、CJB111(ATCC登录号BAA-23)、CJB112、2603V/R(ATCC登录号BAA-611)、NCTC 10/81、CJ11、PFEGBST0837、118754、114852、114862、114866、118775、B 4589、B 4645、SS1214、CZ-PW-119、7271、CZ-PW-045、JM9130013、JM9130672、IT-NI-016、IT-PW-62和IT-PW-64。

[0098] 本文所描述的多糖可通过本领域已知的方法(包括,例如本文所描述的方法)分离。如本文所使用的“经分离的”指从特定来源获得及从特定来源分离。术语“经分离的”进一步指并非在其各自的天然存在形式、状态和/或环境中。例如“从链球菌分离的”指从链球菌细胞获得及从链球菌细胞分离的物质。经分离的多糖并非是天然存在的。术语“经分离的”指该物质从其原始环境(例如若其为天然存在的则从天然环境,或者若其为重组实体则从其宿主生物体,或者从一个环境移至不同的环境)移出。例如“经分离的”荚膜多糖、蛋白质、或肽基本上不含细胞物质或其他污染蛋白质(来自衍生该蛋白质的细胞或组织来源),或当其是经由化学合成时,其基本上不含化学前体或其他化学物,或以其它方式作为化学

反应的一部分存在于混合物中。本发明中,蛋白质或多糖可从细菌细胞或从细胞碎片中分离出,从而使其以可用于制造免疫原性组合物的形式提供。术语“经分离的”或“分离”可包括纯化,包括本领域已知的用于纯化经分离的多糖的方法和/或本文中所描述的方法。“基本上不含细胞物质”包括其中多肽/蛋白质与分离出其或重组制造其的细胞的细胞组分分开的多肽/蛋白质制备物。因此,基本上不含细胞物质的荚膜多糖、蛋白质或肽包括具有少于约30%、20%、10%、5%、2.5%、或1% (按干燥重量计) 的污染蛋白质或多糖或其他细胞物质的荚膜多糖、蛋白质、或肽的制备物。当多肽/蛋白质是经重组制造时,还优选为基本上不含培养基,即,蛋白质制备物包括少于约20%、10%、或5% 体积的培养基。当多肽/蛋白质或多糖通过化学合成制造时,优选地,其基本上不含化学前体或其他化学物,即,其与涉及合成蛋白质或多糖的化学前体或其他化学物分开。因此,这样的多肽/蛋白质或多糖的制备物具有少于约30%、20%、10%、5% (按干燥重量计) 的非目标多肽/蛋白质或多糖片段的化学前体或化合物。

[0099] 于本发明的一实施方案中,多糖从细菌分离出。于本发明的另一实施方案中,多糖通过重组产生。于另一实施方案中,多糖根据常规方法合成或化学合成。于本发明的另一实施方案中,多糖通过克隆和表达产生多糖的生物合成途径后在替代宿主中表达来制造。于一实施方案中,多糖为免疫原性的。例如,本申请发明人发现本文所描述的各多糖能够诱发或引起免疫反应。术语“免疫原性”指起始、触发、引起、增强、改善、和/或扩大哺乳动物的体液和/或细胞介导的免疫反应的能力。于一实施方案中,哺乳动物为人,灵长类动物、兔、猪、小鼠等等。

[0100] 荚膜多糖的分子量为用于免疫原性组合物的一个考虑因素。高分子量荚膜多糖由于存在于抗原表面的表位的较高效率而能够诱发某些抗体免疫反应。高分子量荚膜多糖的分离及纯化被考虑用于本发明的缀合物、组合物和方法。

[0101] 然而,于一实施方案中,多糖的尺寸可被改变成小于天然荚膜多糖的分子量的分子量(MW) 范围(在与载体蛋白缀合之前)。经纯化的荚膜多糖的尺寸被减小以产生具有有利的过滤性特性和/或产率的缀合物。

[0102] 于一这样的实施方案中,经纯化的荚膜多糖的尺寸通过高压均质化缩小。高压均质化通过将加工流泵送通过具有足够小的大小的流动路径来实现高剪切速率。剪切速率通过使用较大的施加的均质压力来增加,而曝露时间可通过将进料流再循环通过均质器来增加。

[0103] 于一实施方案中,本文所描述的多糖能够诱发调理素活性。于另一实施方案中,本文所描述的多糖能够诱发调理素活性及吞噬活性(例如调理吞噬活性)。

[0104] 调理素活性或调理作用指调理素(例如抗体或补体因子)结合抗原(例如本文所描述的经分离的多糖)的过程,此促进抗原连接吞噬细胞或吞噬性细胞(例如巨噬细胞、树突细胞及多形核白细胞(PMNL))。某些细菌(诸如,例如由于存在荚膜而通常不会被吞噬的经包覆细菌)在以调理素抗体涂覆时可变成更容易被吞噬细胞识别。于一实施方案中,多糖诱发免疫反应,诸如,例如抗体,其是调理素的。于一实施方案中,调理素活性针对革兰氏阳性球菌,优选为针对链球菌物种,更优选为针对至少一种无乳链球菌的菌株。

[0105] 于另一实施方案中,本文所描述的多糖能够诱发杀菌免疫反应。于一实施方案中,杀菌活性针对革兰氏阳性球菌,优选为针对链球菌物种,更优选为针对至少一种无乳链球

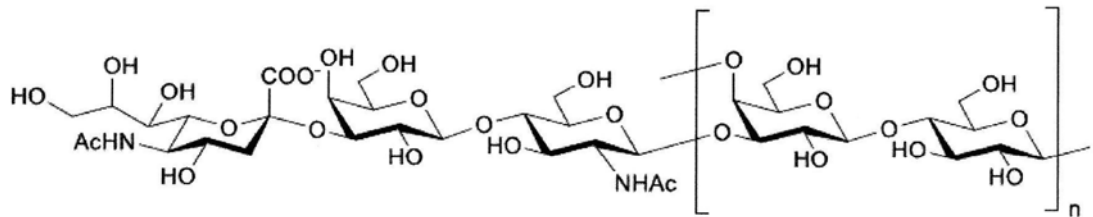
菌的菌株。

[0106] 用于测量调理作用、吞噬作用和/或杀菌活性的方法为本领域所已知,诸如,例如通过测量体内细菌荷载的减少(例如通过测量以链球菌物种攻击的哺乳动物的菌血症水平)和/或通过测量体外细菌细胞杀死(例如体外调理吞噬测定)来进行。于一实施方案中,与适当的对照组相比较(诸如,例如与针对经热杀死的革兰氏阳性球菌产生的抗血清相比较),多糖能够诱发调理素、吞噬、和/或杀菌活性。

[0107] 血清型Ia

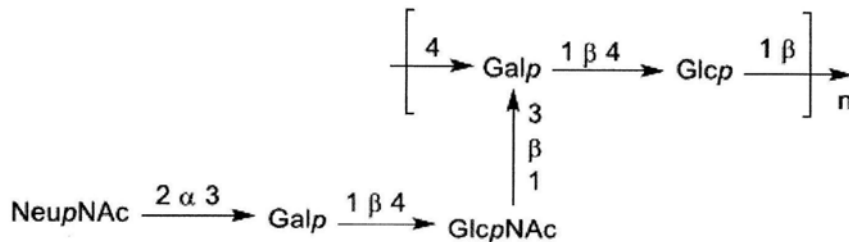
[0108] 一实施方案包括血清型Ia GBS荚膜多糖。血清型Ia的结构可描述如下:

a)



[0109] 或

b)



[0110] 血清型Ia荚膜多糖在缀合之前的分子量为约5kDa至约1,000kDa,诸如约25kDa至约750kDa、约25kDa至约500kDa、约25kDa至约450kDa、约25kDa至约400kDa、约25kDa至约350kDa、约25kDa至约300kDa、约25kDa至约250kDa、约25kDa至约200kDa、约50kDa至约750kDa、约50kDa至约500kDa、约50kDa至约450kDa、约50kDa至约400kDa、约50kDa至约350kDa、约50kDa至约300kDa、约50kDa至约250kDa、约50kDa至约200kDa、约75kDa至750kDa、约75kDa至约500kDa、约75kDa至约450kDa、约75kDa至约400kDa、约75kDa至约350kDa、约75kDa至约300kDa、约75kDa至约250kDa、约75kDa至约200kDa、约100kDa至约750kDa、约100kDa至约700kDa、约100kDa至约650kDa、约100kDa至约600kDa、约100kDa至约550kDa、约100kDa至约500kDa、约100kDa至约450kDa、约100kDa至约400kDa、约100kDa至约350kDa、约100kDa至约300kDa、约200kDa至约750kDa、约200kDa至约700kDa、约200kDa至约650kDa、约200kDa至约600kDa、约200kDa至约550kDa、约200kDa至约500kDa、约200kDa至约450kDa、约200kDa至约400kDa、约250kDa至约750kDa、约250kDa至约700kDa、约250kDa至约650kDa、约250kDa至约600kDa、约250kDa至约550kDa、约250kDa至约500kDa、约250kDa至约450kDa、约250kDa至约400kDa、约300kDa至约750kDa、约300kDa至约700kDa、约300kDa至约650kDa、约300kDa至约600kDa、约300kDa至约550kDa、或约300kDa至约500kDa。于一优选的实施方案中,荚膜多糖在缀合之前的分子量为约25kDa至约200kDa。于另一优选的实施方案中,荚膜多糖在缀合之前的分子量为约100kDa至约400kDa。在任何上述范围内的任何整数均被考虑

作为本公开内容的实施方案。

[0111] 于特定的实施方案中,使用高压均质化过程将天然GBS荚膜多糖血清型Ia的尺寸缩小,但保留多糖的结构特征,诸如唾液酸。

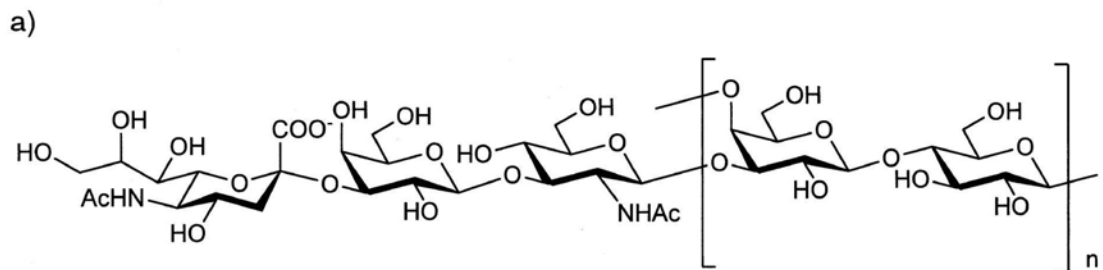
[0112] 于本发明的一实施方案中,血清型Ia荚膜多糖包含其天然唾液酸水平,诸如约100%或高于约95%。于另一实施方案中,荚膜多糖在缀合前可去唾液酸化高达约40%(唾液酸化程度高于约60%),诸如高达约35%(唾液酸化程度高于约65%)、高达约30%(唾液酸化程度高于约70%)、高达约25%(唾液酸化程度高于约75%)、高达约20%(唾液酸化程度高于约80%)、高达约15%(唾液酸化程度高于约85%)、高达约10%(唾液酸化程度高于约90%)、或高达约5%(唾液酸化程度高于约95%)。

[0113] 于另一实施方案中,血清型Ia荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中具有约1.0mM的唾液酸,诸如每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。于另一实施方案中,荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中可具有至少约0.6mM的唾液酸,诸如每mM多糖中具有至少约0.65mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.7mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.75mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.8mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.85mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.9mM的唾液酸、或每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。

[0114] 血清型Ia荚膜多糖的O-乙酰化为少于约5%。本发明的血清型Ia荚膜多糖的一些例示性菌株包括090、A909(ATCC登录号BAA-1138)、515(ATCC登录号BAA-1177)、B523、CJB524及MB 4052(ATCC登录号31574)。

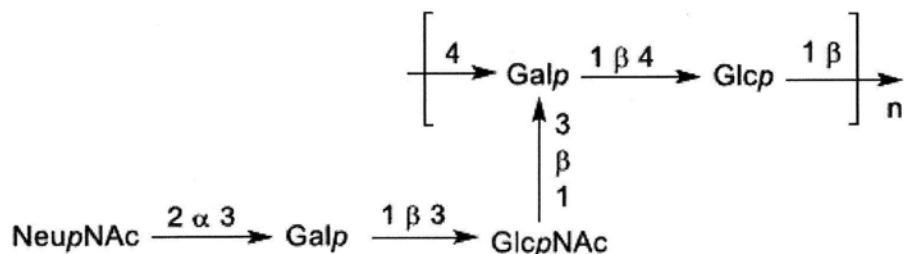
[0115] 血清型Ib

[0116] 一实施方案包括血清型Ib GBS荚膜多糖。血清型Ib的结构可描述如下:



[0117]

或
b)



[0118] 血清型Ib荚膜多糖在缀合之前的分子量为约5kDa至约1,000kDa,诸如约25kDa至约750kDa、约25kDa至约500kDa、约25kDa至约450kDa、约25kDa至约400kDa、约25kDa至约350kDa、约25kDa至约300kDa、约25kDa至约250kDa、约25kDa至约200kDa、约50kDa至约

750kDa、约50kDa至约500kDa、约50kDa至约450kDa、约50kDa至约400kDa、约50kDa至约350kDa、约50kDa至约300kDa、约50kDa至约250kDa、约50kDa至约200kDa、约75kDa至约750kDa、约75kDa至约500kDa、约75kDa至约450kDa、约75kDa至约400kDa、约75kDa至约350kDa、约75kDa至约300kDa、约75kDa至约250kDa、约75kDa至约200kDa、约100kDa至约750kDa、约100kDa至约700kDa、约100kDa至约650kDa、约100kDa至约600kDa、约100kDa至约550kDa、约100kDa至约500kDa、约100kDa至约450kDa、约100kDa至约400kDa、约100kDa至约350kDa、约100kDa至约300kDa、约200kDa至约750kDa、约200kDa至约700kDa、约200kDa至约650kDa、约200kDa至约600kDa、约200kDa至约550kDa、约200kDa至约500kDa、约200kDa至约450kDa、约200kDa至约400kDa、约250kDa至约750kDa、约250kDa至约700kDa、约250kDa至约650kDa、约250kDa至约600kDa、约250kDa至约550kDa、约250kDa至约500kDa、约250kDa至约450kDa、约250kDa至约400kDa、约300kDa至约750kDa、约300kDa至约700kDa、约300kDa至约650kDa、约300kDa至约600kDa、约300kDa至约550kDa、或约300kDa至约500kDa。于一优选的实施方案中，荚膜多糖在缀合之前的分子量为约25kDa至约400kDa。在任何上述范围内的任何整数均被考虑作为本公开内容的实施方案。

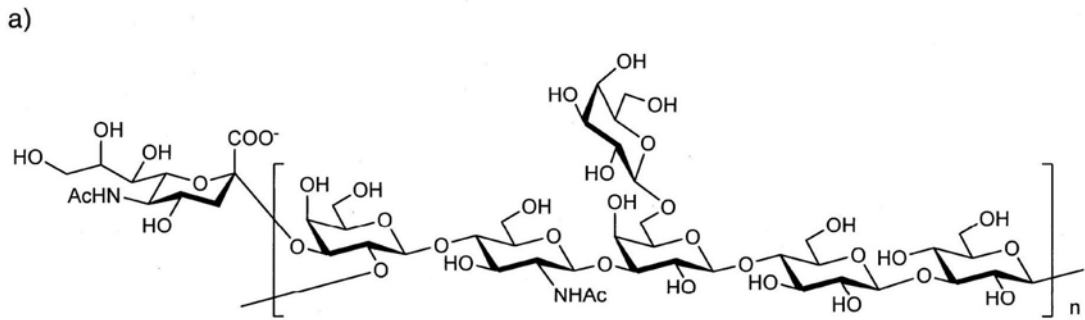
[0119] 于本发明的一实施方案中，血清型Ib荚膜多糖包含其天然唾液酸水平，诸如约100%或高于约95%。于另一实施方案中，荚膜多糖在缀合前可去唾液酸化高达约40%（唾液酸化程度高于约60%），诸如高达约35%（唾液酸化程度高于约65%）、高达约30%（唾液酸化程度高于约70%）、高达约25%（唾液酸化程度高于约75%）、高达约20%（唾液酸化程度高于约80%）、高达约15%（唾液酸化程度高于约85%）、高达约10%（唾液酸化程度高于约90%）、或高达约5%（唾液酸化程度高于约95%）。

[0120] 于另一实施方案中，血清型Ib荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中具有约1.0mM的唾液酸，诸如每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。于另一实施方案中，荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中可具有至少约0.6mM的唾液酸，诸如每mM多糖中具有至少约0.65mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.7mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.75mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.8mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.85mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.9mM的唾液酸、或每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。

[0121] 血清型Ib荚膜多糖被约0%至约40%0-乙酰化。于本发明的一实施方案中，多糖为脱-0-乙酰化的（即，少于约5%0-乙酰化）。本发明的血清型Ib荚膜多糖的一些例示性菌株包括H36B（ATCC登录号12401）、S40、S42、MB 4053（ATCC登录号31575）、M709、133、7357及PFEGBST0267。

[0122] 血清型II

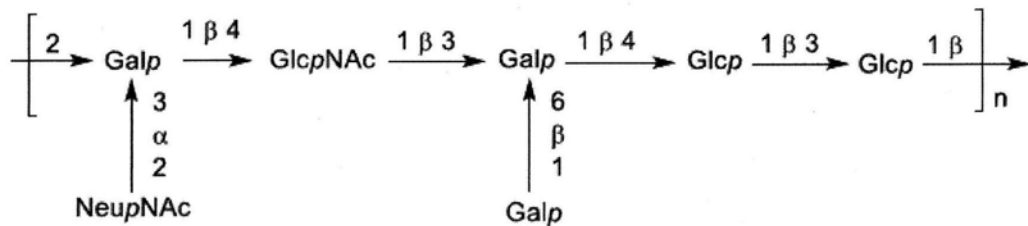
[0123] 一实施方案包括血清型II GBS荚膜多糖。血清型II的结构可描述如下：



[0124]

或

b)



[0125] 血清型II荚膜多糖在缀合之前的分子量为约5kDa至约1,000kDa,诸如约25kDa至约750kDa、约25kDa至约500kDa、约25kDa至约450kDa、约25kDa至约400kDa、约25kDa至约350kDa、约25kDa至约300kDa、约25kDa至约250kDa、约25kDa至约200kDa、约50kDa至约750kDa、约50kDa至约500kDa、约50kDa至约450kDa、约50kDa至约400kDa、约50kDa至约350kDa、约50kDa至约300kDa、约50kDa至约250kDa、约50kDa至约200kDa、约75kDa至约750kDa、约75kDa至约500kDa、约75kDa至约450kDa、约75kDa至约400kDa、约75kDa至约350kDa、约75kDa至约300kDa、约75kDa至约250kDa、约75kDa至约200kDa、约100kDa至约750kDa、约100kDa至约700kDa、约100kDa至约650kDa、约100kDa至约600kDa、约100kDa至约550kDa、约100kDa至约500kDa、约100kDa至约450kDa、约100kDa至约400kDa、约100kDa至约350kDa、约100kDa至约300kDa、约200kDa至约750kDa、约200kDa至约700kDa、约200kDa至约650kDa、约200kDa至约600kDa、约200kDa至约550kDa、约200kDa至约500kDa、约200kDa至约450kDa、约200kDa至约400kDa、约250kDa至约750kDa、约250kDa至约700kDa、约250kDa至约650kDa、约250kDa至约600kDa、约250kDa至约550kDa、约250kDa至约500kDa、约250kDa至约450kDa、约250kDa至约400kDa、约300kDa至约750kDa、约300kDa至约700kDa、约300kDa至约650kDa、约300kDa至约600kDa、约300kDa至约550kDa、或约300kDa至约500kDa。于一优选的实施方案中,荚膜多糖在缀合之前的分子量为约25kDa至约400kDa。在任何上述范围内的任何整数均被考虑作为本公开内容的实施方案。

[0126] 于本发明的一实施方案中,血清型II荚膜多糖包含其天然唾液酸水平,诸如约100%或高于约95%。于另一实施方案中,荚膜多糖在缀合前可去唾液酸化高达约40%(唾液酸化程度高于约60%),诸如高达约35%(唾液酸化程度高于约65%)、高达约30%(唾液酸化程度高于约70%)、高达约25%(唾液酸化程度高于约75%)、高达约20%(唾液酸化程度高于约80%)、高达约15%(唾液酸化程度高于约85%)、高达约10%(唾液酸化程度高于约90%)、或高达约5%(唾液酸化程度高于约95%)。

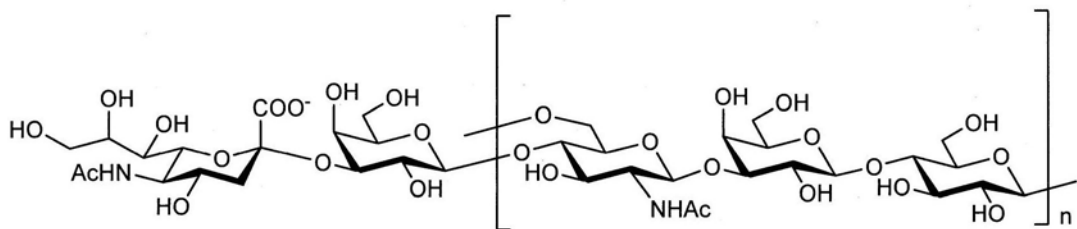
[0127] 于另一实施方案中,血清型II荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中具有约1.0mM的唾液酸,诸如每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。于另一实施方案中,荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中可具有至少约0.6mM的唾液酸,诸如每mM多糖中具有至少约0.65mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.7mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.75mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.8mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.85mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.9mM的唾液酸、或每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。

[0128] 血清型II荚膜多糖的O-乙酰化为少于约5%。本发明的血清型II荚膜多糖的一些例示性菌株包括MB 4055 (ATCC登录号31576)、18RS21 (ATCC登录号BAA-1175)、S16、S20、V8 (ATCC登录号12973)、DK21、DK23、UAB、5401及PFEGBST0708。

[0129] 血清型III

[0130] 一实施方案包括血清型III GBS荚膜多糖。血清型III的结构可描述如下:

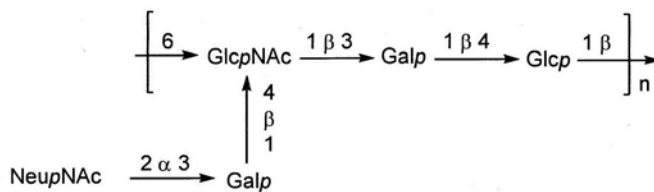
a)



[0131]

或

b)



[0132] 血清型III荚膜多糖在缀合之前的分子量为约5kDa至约1,000kDa,诸如约25kDa至约750kDa、约25kDa至约500kDa、约25kDa至约450kDa、约25kDa至约400kDa、约25kDa至约350kDa、约25kDa至约300kDa、约25kDa至约250kDa、约25kDa至约200kDa、约50kDa至约750kDa、约50kDa至约500kDa、约50kDa至约450kDa、约50kDa至约400kDa、约50kDa至约350kDa、约50kDa至约300kDa、约50kDa至约250kDa、约50kDa至约200kDa、约75kDa至约750kDa、约75kDa至约500kDa、约75kDa至约450kDa、约75kDa至约400kDa、约75kDa至约350kDa、约75kDa至约300kDa、约75kDa至约250kDa、约75kDa至约200kDa、约100kDa至约750kDa、约100kDa至约700kDa、约100kDa至约650kDa、约100kDa至约600kDa、约100kDa至约550kDa、约100kDa至约500kDa、约100kDa至约450kDa、约100kDa至约400kDa、约100kDa至约350kDa、约100kDa至约300kDa、约200kDa至约750kDa、约200kDa至约700kDa、约200kDa至约650kDa、约200kDa至约600kDa、约200kDa至约550kDa、约200kDa至约500kDa、约200kDa至约450kDa、约200kDa至约400kDa、约250kDa至约750kDa、约250kDa至约700kDa、约250kDa至约650kDa、约250kDa至约600kDa、约250kDa至约550kDa、约250kDa至约500kDa、约250kDa至约450kDa、约250kDa至约400kDa、约300kDa至约750kDa、约300kDa至约700kDa、约300kDa至约650kDa、约300kDa至约600kDa、约300kDa至约550kDa、或约300kDa至约500kDa。于一优选的

实施方案中,荚膜多糖在缀合之前的分子量为约25kDa至约200kDa。于另一优选的实施方案中,荚膜多糖在缀合之前的分子量为约100kDa至约400kDa。在任何上述范围内的任何整数均被考虑作为本公开内容的实施方案。

[0133] 于特定的实施方案中,使用高压均质化过程将天然GBS荚膜多糖血清型III的尺寸缩小,但保存多糖的结构特征,诸如唾液酸。

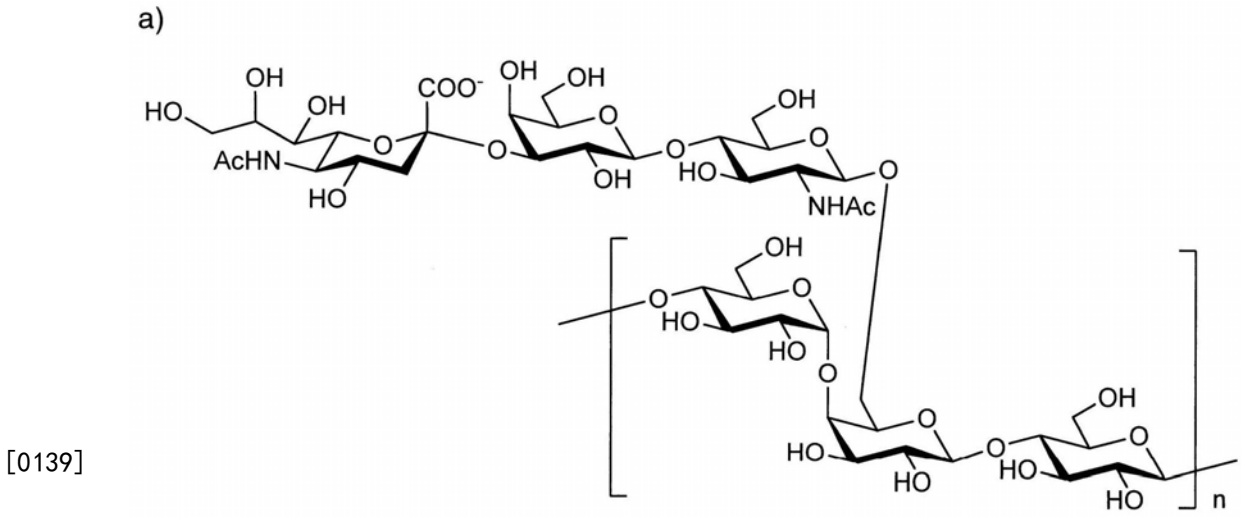
[0134] 于本发明的一实施方案中,血清型III荚膜多糖包含其天然唾液酸水平,诸如约100%或高于约95%。于另一实施方案中,荚膜多糖在缀合前可去唾液酸化高达约40% (唾液酸化程度高于约60%),诸如高达约35% (唾液酸化程度高于约65%)、高达约30% (唾液酸化程度高于约70%)、高达约25% (唾液酸化程度高于约75%)、高达约20% (唾液酸化程度高于约80%)、高达约15% (唾液酸化程度高于约85%)、高达约10% (唾液酸化程度高于约90%)、或高达约5% (唾液酸化程度高于约95%)。

[0135] 于另一实施方案中,血清型III荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中具有约1.0mM的唾液酸,诸如每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。于另一实施方案中,该荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中可具有至少约0.6mM的唾液酸,诸如每mM多糖中具有至少约0.65mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.7mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.75mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.8mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.85mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.9mM的唾液酸、或每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。

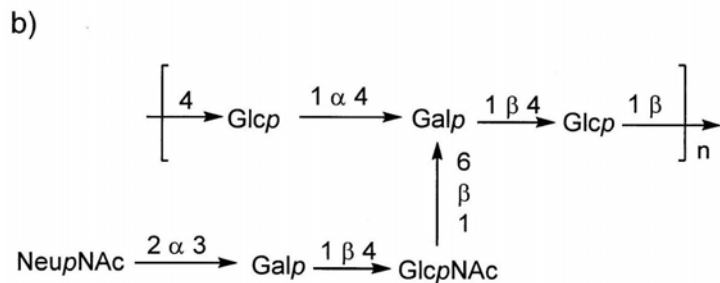
[0136] 血清型III荚膜多糖被约0%至约40% O-乙酰化。于本发明的一实施方案中,多糖为脱O-乙酰化的(即,O-乙酰化少于约5%)。本发明的血清型III荚膜多糖的一些例示性菌株包括MB 4082 (ATCC登录号31577)、M132、110、M781 (ATCC登录号BAA-22)、D136C (3) (ATCC登录号12403)、M782、S23、120、MB 4316 (M-732; ATCC登录号31475)、M132、K79、COH1 (ATCC登录号BAA-1176) 及PFEGBST0563。

[0137] 血清型IV

[0138] 一实施方案包括血清型IV GBS荚膜多糖。血清型IV的结构可描述如下:



或



[0140] 血清型IV荚膜多糖在缀合之前的分子量为约5kDa至约1,000kDa, 诸如约25kDa至约750kDa、约25kDa至约500kDa、约25kDa至约450kDa、约25kDa至约400kDa、约25kDa至约350kDa、约25kDa至约300kDa、约25kDa至约250kDa、约25kDa至约200kDa、约50kDa至约750kDa、约50kDa至约500kDa、约50kDa至约450kDa、约50kDa至约400kDa、约50kDa至约350kDa、约50kDa至约300kDa、约50kDa至约250kDa、约50kDa至约200kDa、约75kDa至约750kDa、约75kDa至约500kDa、约75kDa至约450kDa、约75kDa至约400kDa、约75kDa至约350kDa、约75kDa至约300kDa、约75kDa至约250kDa、约75kDa至约200kDa、约100kDa至约750kDa、约100kDa至约700kDa、约100kDa至约650kDa、约100kDa至约600kDa、约100kDa至约550kDa、约100kDa至约500kDa、约100kDa至约450kDa、约100kDa至约400kDa、约100kDa至约350kDa、约100kDa至约300kDa、约200kDa至约750kDa、约200kDa至约700kDa、约200kDa至约650kDa、约200kDa至约600kDa、约200kDa至约550kDa、约200kDa至约500kDa、约200kDa至约450kDa、约200kDa至约400kDa、约250kDa至约750kDa、约250kDa至约700kDa、约250kDa至约650kDa、约250kDa至约600kDa、约250kDa至约550kDa、约250kDa至约500kDa、约250kDa至约450kDa、约250kDa至约400kDa、约300kDa至约750kDa、约300kDa至约700kDa、约300kDa至约650kDa、约300kDa至约600kDa、约300kDa至约550kDa、或约300kDa至约500kDa。于一优选的实施方案中, 荚膜多糖在缀合之前的分子量为约25kDa至约400kDa。在任何上述范围内的任何整数均被考虑作为本公开内容的实施方案。

[0141] 于本发明的一实施方案中, 血清型IV荚膜多糖包含其天然唾液酸水平, 诸如约100%或高于约95%。于另一实施方案中, 荚膜多糖在缀合前可去唾液酸化高达约40% (唾

液酸化程度高于约60%)，诸如高达约35% (唾液酸化程度高于约65%)、高达约30% (唾液酸化程度高于约70%)、高达约25% (唾液酸化程度高于约75%)、高达约20% (唾液酸化程度高于约80%)、高达约15% (唾液酸化程度高于约85%)、高达约10% (唾液酸化程度高于约90%)、或高达约5% (唾液酸化程度高于约95%)。

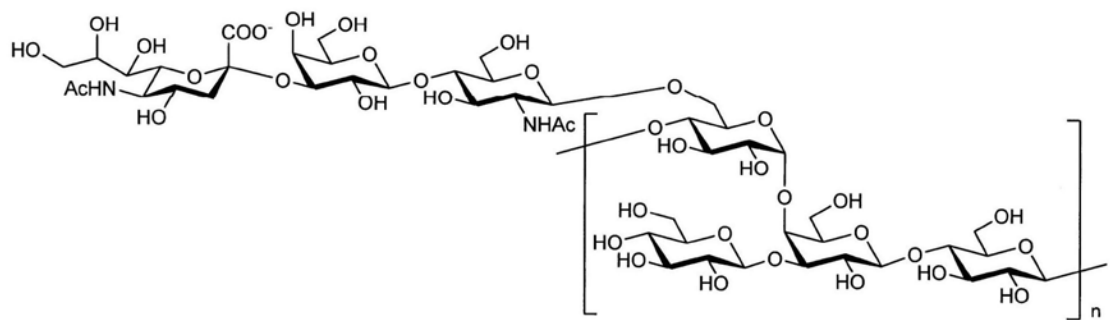
[0142] 于另一实施方案中，血清型IV荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中具有约1.0mM的唾液酸，诸如每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。于另一实施方案中，荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中可具有至少约0.6mM的唾液酸，诸如每mM多糖中具有至少约0.65mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.7mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.75mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.8mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.85mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.9mM的唾液酸、或每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。

[0143] 血清型IV荚膜多糖被约0%至约40% 0-乙酰化。于本发明的一实施方案中，多糖为脱0-乙酰化的 (即，0-乙酰化少于约5%)。本发明的血清型IV荚膜多糖的一些例示性菌株包括3139 (ATCC登录号49446)、CZ-NI-016及PFEGBST0961。

[0144] 血清型V

[0145] 一实施方案包括血清型V GBS荚膜多糖。血清型V的结构可描述如下：

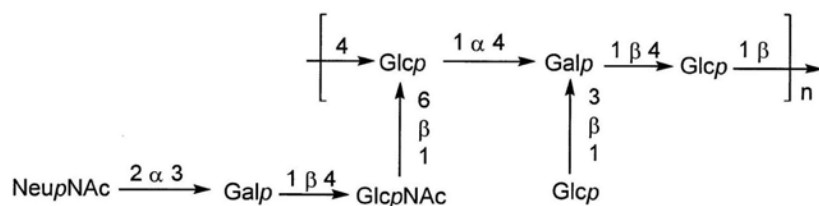
a)



[0146]

或

b)



[0147] 血清型V荚膜多糖在缀合之前的分子量为约5kDa至约1,000kDa，诸如约25kDa至约750kDa、约25kDa至约500kDa、约25kDa至约450kDa、约25kDa至约400kDa、约25kDa至约350kDa、约25kDa至约300kDa、约25kDa至约250kDa、约25kDa至约200kDa、约50kDa至约750kDa、约50kDa至约500kDa、约50kDa至约450kDa、约50kDa至约400kDa、约50kDa至约350kDa、约50kDa至约300kDa、约50kDa至约250kDa、约50kDa至约200kDa、约75kDa至约750kDa、约75kDa至约500kDa、约75kDa至约450kDa、约75kDa至约400kDa、约75kDa至约350kDa、约75kDa至约300kDa、约75kDa至约250kDa、约75kDa至约200kDa、约100kDa至约750kDa、约100kDa至约700kDa、约100kDa至约650kDa、约100kDa至约600kDa、约100kDa至约550kDa、约100kDa至约500kDa、约100kDa至约450kDa、约100kDa至约400kDa、约100kDa至约

350kDa、约100kDa至约300kDa、约200kDa至约750kDa、约200kDa至约700kDa、约200kDa至约650kDa、约200kDa至约600kDa、约200kDa至约550kDa、约200kDa至约500kDa、约200kDa至约450kDa、约200kDa至约400kDa、约250kDa至约750kDa、约250kDa至约700kDa、约250kDa至约650kDa、约250kDa至约600kDa、约250kDa至约550kDa、约250kDa至约500kDa、约250kDa至约450kDa、约250kDa至约400kDa、约300kDa至约750kDa、约300kDa至约700kDa、约300kDa至约650kDa、约300kDa至约600kDa、约300kDa至约550kDa、或约300kDa至约500kDa。于一优选的实施方案中，荚膜多糖在缀合之前的分子量为约25kDa至约400kDa。在任何上述范围内的任何整数均被考虑作为本公开内容的实施方案。

[0148] 于本发明的一实施方案中，血清型V荚膜多糖包含其天然唾液酸水平，诸如约100%或高于约95%。于另一实施方案中，荚膜多糖在缀合前可去唾液酸化高达约40%（唾液酸化程度高于约60%），诸如高达约35%（唾液酸化程度高于约65%）、高达约30%（唾液酸化程度高于约70%）、高达约25%（唾液酸化程度高于约75%）、高达约20%（唾液酸化程度高于约80%）、高达约15%（唾液酸化程度高于约85%）、高达约10%（唾液酸化程度高于约90%）、或高达约5%（唾液酸化程度高于约95%）。

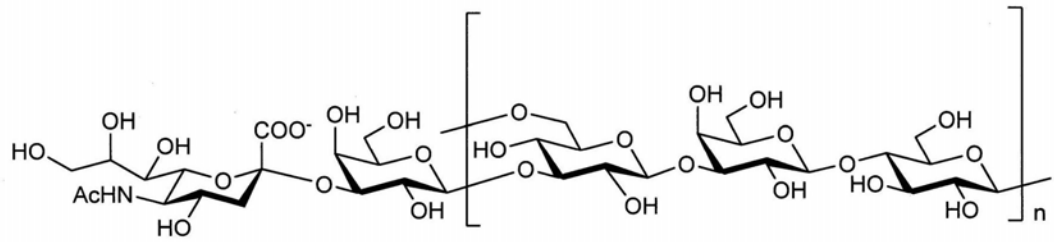
[0149] 于另一实施方案中，血清型V荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中具有约1.0mM的唾液酸，诸如每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。于另一实施方案中，荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中可具有至少约0.6mM的唾液酸，诸如每mM多糖中具有至少约0.65mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.7mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.75mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.8mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.85mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.9mM的唾液酸、或每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。

[0150] 血清型V荚膜多糖被约0%至约40% O-乙酰化。于本发明的一实施方案中，多糖为脱O-乙酰化的（即，O-乙酰化少于约5%）。本发明的血清型V荚膜多糖的一些例示性菌株包括1169-NT1、CJB111（ATCC登录号BAA-23）、CJB112、2603V/R（ATCC登录号BAA-611）、NCTC 10/81、CJ11及PFEGBST0837。

[0151] 血清型VI

[0152] GBS血清型VI荚膜多糖由von Hunolstein, C., 等人, *Infection and Immunity*, 6194 :1272-1280 (1993) (其全部公开内容在此以引用方式并入本文) 描述。血清型VI的结构可描述如下：

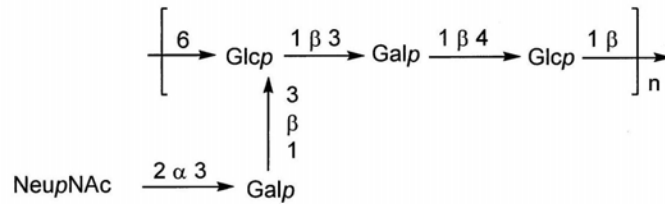
a)



[0153]

或

b)



[0154] 血清型VI荚膜多糖在缀合之前的分子量为约5kDa至约1,000kDa, 诸如约50kDa至约750kDa、约50kDa至约500kDa、约50kDa至约450kDa、约50kDa至约400kDa、约50kDa至约350kDa、约50kDa至约300kDa、约50kDa至约250kDa、约50kDa至约200kDa、约75kDa至约750kDa、约75kDa至约500kDa、约75kDa至约450kDa、约75kDa至约400kDa、约75kDa至约350kDa、约75kDa至约300kDa、约75kDa至约250kDa、约75kDa至约200kDa、约100kDa至约750kDa、约100kDa至约700kDa、约100kDa至约650kDa、约100kDa至约600kDa、约100kDa至约550kDa、约100kDa至约500kDa、约100kDa至约450kDa、约100kDa至约400kDa、约100kDa至约350kDa、约100kDa至约300kDa、约200kDa至约750kDa、约200kDa至约700kDa、约200kDa至约650kDa、约200kDa至约600kDa、约200kDa至约550kDa、约200kDa至约500kDa、约200kDa至约450kDa、约200kDa至约400kDa、约250kDa至约750kDa、约250kDa至约700kDa、约250kDa至约650kDa、约250kDa至约600kDa、约250kDa至约550kDa、约250kDa至约500kDa、约250kDa至约450kDa、约250kDa至约400kDa、约300kDa至约750kDa、约300kDa至约700kDa、约300kDa至约650kDa、约300kDa至约600kDa、约300kDa至约550kDa、或约300kDa至约500kDa。在任何上述范围内的任何整数均被考虑作为本公开内容的实施方案。

[0155] 于本发明的一实施方案中, 血清型VI荚膜多糖包含其天然唾液酸水平, 诸如约100%或高于约95%。于另一实施方案中, 荚膜多糖在缀合前可去唾液酸化高达约40% (唾液酸化程度高于约60%), 诸如高达约35% (唾液酸化程度高于约65%)、高达约30% (唾液酸化程度高于约70%)、高达约25% (唾液酸化程度高于约75%)、高达约20% (唾液酸化程度高于约80%)、高达约15% (唾液酸化程度高于约85%)、高达约10% (唾液酸化程度高于约90%)、或高达约5% (唾液酸化程度高于约95%)。

[0156] 于另一实施方案中, 血清型VI荚膜多糖于每mM多糖中具有约1.0mM的唾液酸, 诸如每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。于另一实施方案中, 荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中可具有至少约0.6mM的唾液酸, 诸如每mM多糖中具有至少约0.65mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.7mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.75mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.8mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.85mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约

0.9mM的唾液酸、或每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。

[0157] 血清型VI荚膜多糖被约0%至约40% 0-乙酰化。于本发明的一实施方案中,多糖为脱0-乙酰化的(即,0-乙酰化少于约5%)。本发明的血清型VI荚膜多糖的一些例示性菌株包括118754、114852、114862、114866、118775、B 4589、B 4645、SS1214及CZ-PW-119。

[0158] 血清型VII

[0159] GBS血清型VII荚膜多糖由Kogan,G.,等人,Carbohydrate Research,277(1):1-9(1995)(其全部公开内容在此以引用方式并入本文)描述。血清型VII的重复单元如下:

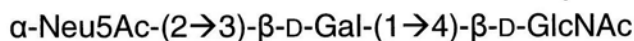


6

[0160]

↑

1



[0161] 血清型VII荚膜多糖在缀合之前的分子量为约5kDa至约1,000kDa,诸如约50kDa至约750kDa、约50kDa至约500kDa、约50kDa至约450kDa、约50kDa至约400kDa、约50kDa至约350kDa、约50kDa至约300kDa、约50kDa至约250kDa、约50kDa至约200kDa、约75kDa至约750kDa、约75kDa至约500kDa、约75kDa至约450kDa、约75kDa至约400kDa、约75kDa至约350kDa、约75kDa至约300kDa、约75kDa至约250kDa、约75kDa至约200kDa、约100kDa至约750kDa、约100kDa至约700kDa、约100kDa至约650kDa、约100kDa至约600kDa、约100kDa至约550kDa、约100kDa至约500kDa、约100kDa至约450kDa、约100kDa至约400kDa、约100kDa至约350kDa、约100kDa至约300kDa、约200kDa至约750kDa、约200kDa至约700kDa、约200kDa至约650kDa、约200kDa至约600kDa、约200kDa至约550kDa、约200kDa至约500kDa、约200kDa至约450kDa、约200kDa至约400kDa、约250kDa至约750kDa、约250kDa至约700kDa、约250kDa至约650kDa、约250kDa至约600kDa、约250kDa至约550kDa、约250kDa至约500kDa、约250kDa至约450kDa、约250kDa至约400kDa、约300kDa至约750kDa、约300kDa至约700kDa、约300kDa至约650kDa、约300kDa至约600kDa、约300kDa至约550kDa、或约300kDa至约500kDa。在任何上述范围内的任何整数均被考虑作为本公开内容的实施方案。

[0162] 于本发明的一实施方案中,血清型VII荚膜多糖包含其天然唾液酸水平,诸如约100%或高于约95%。于另一实施方案中,荚膜多糖在缀合前可去唾液酸化高达约40%(唾液酸化程度高于约60%),诸如高达约35%(唾液酸化程度高于约65%)、高达约30%(唾液酸化程度高于约70%)、高达约25%(唾液酸化程度高于约75%)、高达约20%(唾液酸化程度高于约80%)、高达约15%(唾液酸化程度高于约85%)、高达约10%(唾液酸化程度高于约90%)、或高达约5%(唾液酸化程度高于约95%)。

[0163] 于另一实施方案中,血清型VII荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中具有约1.0mM的唾液酸,诸如每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。于另一实施方案中,荚膜多糖在缀合前于每mM多糖中可具有至少约0.6mM的唾液酸,诸如每mM多糖中具有至少约0.65mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.7mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.75mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.8mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.85mM的唾液酸、每mM多糖中具有至少约0.9mM的唾液酸、或每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。

[0164] 血清型VII荚膜多糖的0-乙酰化为少于约5%。本发明的血清型VII荚膜多糖的一些例示性菌株包括7271及CZ-PW-045。

合至、吸附至荚膜多糖-载体蛋白,或陷入在荚膜多糖-载体蛋白中)的荚膜多糖。术语“游离荚膜多糖”、“游离多糖”及“游离糖”可互换使用且欲传达相同的含义。无论载体分子的性质,其可直接地或通过接头与荚膜多糖缀合。如本文所使用的“缀合”指细菌荚膜多糖与载体分子共价连接的过程。缀合增强细菌荚膜多糖的免疫原性。可根据下述方法或通过本领域已知的过程进行缀合。

[0181] 如本文所使用的“缀合物免疫原性组合物”指免疫原性组合物,其中,免疫原性物质包括与载体蛋白共价连接以产生多糖-蛋白质缀合物的抗原性多糖。于一实施方案中,本发明的多糖-蛋白质缀合物可配制成多价免疫原性组合物。

[0182] 如本文所用,多糖或载体蛋白-多糖缀合物的“分子量”一词指通过尺寸排阻层析法(SEC)结合多角度激光散射检测器(MALLS)计算的分子量。

[0183] 如本文所使用的“多糖-蛋白质缀合物”指多糖分子通过一或多个共价键与蛋白质载体分子缀合。可能期望将多糖与来自另一已知在目标宿主中具免疫原性的物种的蛋白质缀合。因此,于一实施方案中,载体分子为载体蛋白。如本文所定义的,这样的外来蛋白称为“载体蛋白”。载体蛋白用于加强多糖的抗原性和免疫原性。如本文所用,术语“载体效果”指弱免疫原性或非免疫原性分子的抗原性和免疫原性通过连接至作为载体的更具免疫原性的分子(例如异源蛋白质)而增强的过程。在此情况中,组合的多糖-蛋白质缀合物中的多糖变得较单独存在时更具免疫原性。载体蛋白含有用于刺激T细胞的T细胞表位协助产生抗体反应。

[0184] 如本文所使用的“载体蛋白”或“蛋白质载体”指可与所需的免疫反应所对应的抗原(诸如荚膜多糖)缀合的任何蛋白质分子。抗原(诸如多糖)与载体蛋白的缀合可使抗原具免疫原性。载体蛋白优选为非毒性和非反应原性且可获得足够的量和纯度的蛋白质。载体蛋白的实例为来自破伤风、白喉、百日咳、假单胞菌的种(*Pseudomonas species*)、大肠杆菌(*E.coli*)、葡萄球菌的种(*Staphylococcus species*)及链球菌的种(*Streptococcus species*)的毒素、类毒素、或毒素的任何突变体交叉反应物质(CRM₁₉₇)。载体蛋白应能经受标准的缀合程序。于本发明的一特定实施方案中,使用CRM₁₉₇作为载体蛋白。

[0185] 交叉反应物质或CRM对本发明的一些实施方案特别有用。可产生遗传改变的蛋白质,其抗原性类似于某些细菌毒素,但无毒性。这些被称为“交叉反应物质”或CRM。CRM₁₉₇(Wyeth/Pfizer Inc.,Sanford,NC)是值得注意的,因为其具有从天然白喉毒素的单一氨基酸变化,并与其在免疫上无区别。参见Pappenheimer,A.M.,等人,Immunochem.,9(9):891-906(1972)、美国专利号5,614,382,其全部公开内容以引用方式并入本文。CRM₁₉₇为白喉毒素的非毒性变体(即,类毒素(toxoid)),其从生长在酪蛋白氨基酸及酵母提取物基底培养基的白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)菌株C7(β197)培养物(culture)中分离出。CRM₁₉₇通过超滤、硫酸铵沉淀及离子交换层析法纯化。制造CRM₁₉₇蛋白的白喉杆菌菌株C7(*C.diphtheriae strain C7*)(β197)的培养物已保藏于美国典型培养物保藏中心(Rockville,Maryland)且已被指定登录号ATCC 53281。其他白喉类毒素也适合用来作为载体蛋白。CRM3201为百日咳毒素的基因工程操作变体。参见Black,W.J.,等人,Science,240(4852):656-659(1988),其全部公开内容以引用方式并入本文。

[0186] 除了白喉类毒素(DT)、CRM₁₉₇及百日咳类毒素外,载体蛋白的其他实例包括破伤风类毒素(TT)、霍乱类毒素(例如,如国际专利申请公开号WO 2004/083251中所描述的)、大肠

杆菌不耐热类毒素(LT)、大肠杆菌热稳定类毒素(E.coli heat stable toxoid)(ST)、来自肺炎链球菌(S.pneumonia)(野生型或具有降低的毒性的突变种)的肺炎球菌溶血素(pneumolysin)、肺炎球菌表面蛋白A(PspA)、肺炎球菌粘附素蛋白A(PsaA)、来自链球菌的C5a肽酶、来自金黄葡萄球菌的溶血素、未分型的流感嗜血杆菌(Nontypeable Haemophilus influenzae)(NTHi)蛋白、流感嗜血杆菌蛋白D、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)外毒素/类毒素、B型肝炎表面抗原、B型肝炎核心抗原、轮状病毒VP 7蛋白质及呼吸道合胞病毒F和G蛋白、卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、纯化的结核菌素蛋白衍生物(PPD),及假单胞菌外毒素或其衍生物,包括重组产生的非毒性突变种绿脓杆菌(Pseudomonas aeruginosa)外毒素A。还可使用细菌外膜蛋白,诸如外膜蛋白混合物c(OMPC)、孔蛋白(porin)、运铁蛋白结合蛋白、或艰难梭菌肠毒素(毒素A)和细胞毒素(毒素B)。其他蛋白质,诸如卵白蛋白、匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或结核菌素的纯化蛋白质衍生物(PPD)也可用来作为载体蛋白。于一优选的实施方案中,载体蛋白为白喉类毒素。更优选地,载体蛋白为CRM₁₉₇。于本发明的另一实施方案中,载体蛋白为破伤风类毒素。

[0187] 为了合成多价缀合物免疫原性组合物,多糖-蛋白质缀合物可通过将从两种不同细菌物种纯化的多糖的混合物与载体蛋白缀合来产生。或者,可通过将从相同细菌的两种或更多种不同血清型纯化的多糖组合并将其以混合物形式与载体蛋白缀合来制造多价缀合物免疫原性组合物。或者,可混合通过将单一类型的多糖与载体蛋白在独立反应(使用不同多糖)中反应来产生的多糖-蛋白质缀合物。因此,多价免疫原性组合物可包括带有连接的多糖的同质或异质群体的载体蛋白。

[0188] 将荚膜多糖与载体蛋白缀合后,通过各种技术纯化多糖-蛋白质缀合物(就多糖-蛋白质缀合物的量而言为富集的)。这些技术包括,例如浓缩/渗滤操作、沉淀/洗脱、柱层析法及深层过滤。

[0189] 如上文所述,本发明涉及包含与载体蛋白缀合的GBS荚膜多糖的缀合物。本发明的一实施方案提供包含与载体蛋白缀合的GBS血清型IV荚膜多糖的缀合物及至少一种另外的缀合物,该另外的缀合物包含与载体蛋白缀合的GBS血清型Ia荚膜多糖、与载体蛋白缀合的GBS血清型Ib荚膜多糖、与载体蛋白缀合的GBS血清型II荚膜多糖、与载体蛋白缀合的GBS血清型III荚膜多糖、与载体蛋白缀合的GBS血清型V荚膜多糖、与载体蛋白缀合的GBS血清型VI荚膜多糖、与载体蛋白缀合的GBS血清型VII荚膜多糖、与载体蛋白缀合的GBS血清型VIII荚膜多糖、或与载体蛋白缀合的GBS血清型IX荚膜多糖。于本发明的一方面中,多糖的分子量为约5kDa至1,000kDa;缀合物的分子量为约300kDa至约20,000kDa;且缀合物包含与多糖的总量相较下为少于约40%的游离多糖。于一实施方案中,缀合物包含与多糖的总量相较下为少于约30%、少于约25%、少于约20%、少于约15%、少于约10%、或少于约5%的游离多糖。

[0190] 于一实施方案中,血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、和/或IX多糖在缀合前的分子量为约5kDa至约1,000kDa,诸如约50kDa至约750kDa、约50kDa至约500kDa、约50kDa至约450kDa、约50kDa至约400kDa、约50kDa至约350kDa、约50kDa至约300kDa、约50kDa至约250kDa、约50kDa至约200kDa、约75kDa至约750kDa、约75kDa至约500kDa、约75kDa至约450kDa、约75kDa至约400kDa、约75kDa至约350kDa、约75kDa至约300kDa、约75kDa至约

250kDa、约75kDa至约200kDa、约100kDa至约750kDa、约100kDa至约700kDa、约100kDa至约650kDa、约100kDa至约600kDa、约100kDa至约550kDa、约100kDa至约500kDa、约100kDa至约450kDa、约100kDa至约400kDa、约100kDa至约350kDa、约100kDa至约300kDa、约200kDa至约750kDa、约200kDa至约700kDa、约200kDa至约650kDa、约200kDa至约600kDa、约200kDa至约550kDa、约200kDa至约500kDa、约200kDa至约450kDa、约200kDa至约400kDa、约250kDa至约750kDa、约250kDa至约700kDa、约250kDa至约650kDa、约250kDa至约600kDa、约250kDa至约550kDa、约250kDa至约500kDa、约250kDa至约450kDa、约250kDa至约400kDa、约300kDa至约750kDa、约300kDa至约700kDa、约300kDa至约650kDa、约300kDa至约600kDa、约300kDa至约550kDa、或约300kDa至约500kDa。在任何上述范围内的任何整数均被考虑作为本公开内容的实施方案。

[0191] 于一实施方案中,缀合物的分子量为约300kDa至约20,000kDa,诸如约300kDa至约15,000kDa、约300kDa至约10,000kDa、约300kDa至约9,000kDa、约300kDa至约8,000kDa、约300kDa至约7,000kDa、约300kDa至约6,000kDa、约300kDa至约5,000kDa、约300kDa至约4,000kDa、约300kDa至约3,000kDa、约300kDa至约2,000kDa、约300kDa至约1,000kDa、约500kDa至约20,000kDa、约500kDa至约15,000kDa、约500kDa至约10,000kDa、约500kDa至约9,000kDa、约500kDa至约8,000kDa、约500kDa至约7,000kDa、约500kDa至约6,000kDa、约500kDa至约5,000kDa、约500kDa至约4000kDa、约500kDa至约3,000kDa、约500kDa至约2,000kDa、约500kDa至约1,000kDa、约1,000kDa至约20,000kDa、约1,000kDa至约15,000kDa、约1,000kDa至约10,000kDa、约1,000kDa至约9,000kDa、约1,000kDa至约8,000kDa、约1,000kDa至约7,000kDa、约1,000kDa至约6,000kDa、约1,000kDa至约5,000kDa、约1,500kDa至约20,000kDa、约1,500kDa至约15,000kDa、约1,500kDa至约10,000kDa、约1,500kDa至约9,000kDa、约1,500kDa至约8,000kDa、约1,500kDa至约7,000kDa、约1,500kDa至约6,000kDa、约1500kDa至约5,000kDa、约2,000kDa至约20,000kDa、约2,000kDa至约15,000kDa、约2,000kDa至约10,000kDa、约2,000kDa至约9,000kDa、约2,000kDa至约8,000kDa、约2,000kDa至约7,000kDa、约2,000kDa至约6,000kDa、约2,500kDa至约20,000kDa、约2,500kDa至约15,000kDa、约2,500kDa至约10,000kDa、约2,500kDa至约9,000kDa、约2,500kDa至约8,000kDa、约2,500kDa至约7,000kDa、约2,500kDa至约6,000kDa、约3,000kDa至约20,000kDa、约3,000kDa至约15,000kDa、约3,000kDa至约10,000kDa、约3,000kDa至约9,000kDa、约3,000kDa至约8,000kDa、约3,000kDa至约7,000kDa、或约3,000kDa至约6,000kDa。

[0192] 于一实施方案中,GBS血清型IV荚膜多糖缀合物具有任何上述范围的分子量。

[0193] 于一实施方案中,GBS血清型Ia荚膜多糖缀合物具有任何上述范围的分子量。

[0194] 于一实施方案中,GBS血清型Ib荚膜多糖缀合物具有任何上述范围的分子量。

[0195] 于一实施方案中,GBS血清型II荚膜多糖缀合物具有任何上述范围的分子量。

[0196] 于一实施方案中,GBS血清型III荚膜多糖缀合物具有任何上述范围的分子量。

[0197] 于一实施方案中,GBS血清型V荚膜多糖缀合物具有任何上述范围的分子量。

[0198] 于一实施方案中,GBS血清型VI荚膜多糖缀合物具有任何上述范围的分子量。

[0199] 于一实施方案中,GBS血清型VII荚膜多糖缀合物具有任何上述范围的分子量。

[0200] 于一实施方案中,GBS血清型VIII荚膜多糖缀合物具有任何上述范围的分子量。

[0201] 于一实施方案中,GBS血清型IX荚膜多糖缀合物具有任何上述范围的分子量。

[0202] 于一实施方案中,本发明的缀合物于每mM多糖中具有至少约0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、0.97或0.98mM的唾液酸。于一优选的实施方案中,缀合物于每mM多糖中具有至少约0.9或0.95mM的唾液酸。

[0203] 于一实施方案中,GBS血清型IV荚膜多糖缀合物具有至少为任一上述数值的唾液酸含量。

[0204] 于一实施方案中,GBS血清型Ia荚膜多糖缀合物具有至少为任一上述数值的唾液酸含量。

[0205] 于一实施方案中,GBS血清型Ib荚膜多糖缀合物具有至少为任一上述数值的唾液酸含量。

[0206] 于一实施方案中,GBS血清型II荚膜多糖缀合物具有至少为任一上述数值的唾液酸含量。

[0207] 于一实施方案中,GBS血清型III荚膜多糖缀合物具有至少为任一上述数值的唾液酸含量。

[0208] 于一实施方案中,GBS血清型V荚膜多糖缀合物具有至少为任一上述数值的唾液酸含量。

[0209] 于一实施方案中,GBS血清型VI荚膜多糖缀合物具有至少为任一上述数值的唾液酸含量。

[0210] 于一实施方案中,GBS血清型VII荚膜多糖缀合物具有至少为任一上述数值的唾液酸含量。

[0211] 于一实施方案中,GBS血清型VIII荚膜多糖缀合物具有至少为任一上述数值的唾液酸含量。

[0212] 于一实施方案中,GBS血清型IX荚膜多糖缀合物具有至少为任一上述数值的唾液酸含量。

[0213] 于一实施方案中,本发明的缀合物于每mM糖重复单元中具有少于约0.01、0.02、0.03、0.04、或0.05mM O-乙酸酯(O-acetate)。于另一实施方案中,缀合物于每mM糖重复单元中包含至少约0.1、0.2、0.3、0.35、或约0.4mM O-乙酸酯。

[0214] 于一实施方案中,GBS血清型IV荚膜多糖缀合物具有上述任一数值的O-乙酸酯含量。

[0215] 于一实施方案中,GBS血清型Ia荚膜多糖缀合物具有上述任一数值的O-乙酸酯含量。

[0216] 于一实施方案中,GBS血清型Ib荚膜多糖缀合物具有上述任一数值的O-乙酸酯含量。

[0217] 于一实施方案中,GBS血清型II荚膜多糖缀合物具有上述任一数值的O-乙酸酯含量。

[0218] 于一实施方案中,GBS血清型III荚膜多糖缀合物具有上述任一数值的O-乙酸酯含量。

[0219] 于一实施方案中,GBS血清型V荚膜多糖缀合物具有上述任一数值的O-乙酸酯含量。

[0220] 于一实施方案中,GBS血清型VI荚膜多糖缀合物具有上述任一数值的O-乙酸酯含量。

量。

[0221] 于一实施方案中,GBS血清型VII荚膜多糖缀合物具有上述任一数值的O-乙酸酯含量。

[0222] 于一实施方案中,GBS血清型VIII荚膜多糖缀合物具有上述任一数值的O-乙酸酯含量。

[0223] 于一实施方案中,GBS血清型IX荚膜多糖缀合物具有上述任一数值的O-乙酸酯含量。

[0224] 于另一实施方案中,与GBS荚膜多糖的总量相比较,免疫原性缀合物包含少于约40%、少于约35%、少于约30%、少于约25%、少于约20%、少于约15%、少于约10%、或少于约5%的游离GBS荚膜多糖。于一优选的实施方案中,与GBS荚膜多糖的总量相比较,免疫原性缀合物包含少于约5%的未反应的游离糖。

[0225] 于另一实施方案中,缀合物中的GBS荚膜多糖对载体蛋白的比例(重量对重量)为约0.5至约3.0。于一方面中,缀合物中的GBS荚膜多糖对载体蛋白的比例为约0.5至约2.0、约0.5至约1.5、约0.5至约1.0、约1.0至约1.5、或约1.0至约2.0。于一优选的实施方案中,缀合物中的GBS荚膜多糖对载体蛋白的比例为约0.8至约1.0。

[0226] 于另一实施方案中,缀合物的缀合程度为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10至12。于优选的实施方案中,缀合物的缀合程度为2至5。

[0227] 缀合

[0228] 缀合可为直接的,其中,来自多糖的原子与来自蛋白质表面的原子共价键合。或者,缀合可通过接头分子,该接头分子同时与多糖和蛋白质反应并连接此二者,从而将碳水化合物系在蛋白质上。

[0229] 当载体与一种或多种抗原(诸如多糖)缀合(即,共价结合)时,缀合可通过本领域已知的任何化学方法、过程、或遗传技术进行。例如,载体多肽与一种或多种选自包含碳水化合物、寡糖、脂质、脂寡糖、多糖、寡糖-蛋白质缀合物、多糖-蛋白质缀合物、肽-蛋白质缀合物、寡糖-肽缀合物、多糖-肽缀合物、蛋白质-蛋白质缀合物、脂寡糖-蛋白质缀合物、多糖-蛋白质缀合物、或其任何组合的群组的抗原可通过多种技术缀合,包括,但不限于:(1)通过蛋白质官能团直接偶联(例如硫醇-硫醇键联、胺-羧基键联、胺-醛键联;酶直接偶联);(2)胺的同双官能偶联(例如使用双-醛);(3)硫醇的同双官能偶联(例如使用双-马来亚酰胺);(4)通过光活化试剂的同双官能偶联;(5)胺与硫醇的异双官能偶联(例如使用马来亚酰胺);(6)通过光活化试剂的异双官能偶联(例如 β -羰基重氮族);(7)通过溴化氰活化或羧甲基化将胺反应性基团引入多糖或寡糖中;(8)通过异双官能化合物(诸如马来酰亚胺基-酰肼)将硫醇反应性基团引入多糖或寡糖中;(9)通过将疏水性基团引入蛋白质的蛋白质-脂质缀合及(10)通过将反应性基团并入脂质的蛋白质-脂质缀合。此外,异双官能“非共价偶联”技术(诸如生物素-抗生物素蛋白相互作用)在考虑之中。本领域熟知的其他用于使寡糖和多糖与免疫原性载体蛋白缀合的方法也在本发明的某些实施方案的范围内。

[0230] 于一实施方案中,GBS荚膜多糖-蛋白质缀合物的获得通过以1-氰基-4-二甲氨基吡啶鎓四氟硼酸盐(CDAP)活化多糖以形成氰酸酯来获得。经活化的多糖可与载体蛋白上的氨基直接偶联或者通过间隔子(接头)偶联。例如,间隔子可为脒胺或半脒胺以产生硫醇化

多糖,硫醇化多糖可通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白(例如使用GMBS)或卤乙酰化载体蛋白(例如使用碘乙酰胺、SIB、SIAB、磺基-SIAB、SIA、或SBAP)反应之后获得的硫醚键联来与载体偶联。

[0231] 于一方面中,氰酸酯(任选地通过CDAP化学制造)与己烷二胺或己二酸二酰肼(ADH)偶联,而氨基衍生糖使用碳二亚胺(例如EDAC或EDC)化学,通过蛋白载体上的羧基与载体蛋白缀合。这样的缀合物描述于例如国际专利申请公开号WO 93/15760、WO 95/08348和WO 96/29094中。

[0232] 其他合适的技术使用碳二亚胺、酰肼、活性酯、降冰片烷、对-硝基苯甲酸、N-羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC及TSTU。国际专利申请公开号WO 98/42721中有很多说明。缀合可能涉及羰基接头,其可通过使糖的游离羟基与1,1-羰基二咪唑(CDI)或1,1-羰基二-1,2,4-三唑(CDT)反应来形成(参见Bethell,等人,J.Biol.Chem.,254:2572-2574(1979);Hearn,等人,J.Chromatogr.,218:509-518(1981)),接着再与蛋白质反应以形成氨基甲酸酯键联。这可能涉及将变旋异构端还原成一级羟基,任选的一级羟基的保护/去保护,使一级羟基与CDI/CDT反应以形成CDI/CDT氨基甲酸酯中间体,以及使CDI/CDT氨基甲酸酯中间体与蛋白质上的氨基偶联。

[0233] 于优选的实施方案中,本发明的GBS荚膜多糖-蛋白质缀合物利用还原性胺化制造。还原性胺化涉及二个步骤:(1)将多糖氧化以从个体六糖单元中的相邻二醇产生醛官能及(2)将经活化的多糖及载体蛋白还原以形成缀合物。

[0234] 于一实施方案中,GBS荚膜多糖通过包括下列步骤的方法活化(氧化):

[0235] (a)使经分离的GBS荚膜多糖与氧化剂反应;以及

[0236] (b)通过加入淬灭剂来淬灭氧化反应以产生经活化的GBS荚膜多糖。

[0237] 于本发明的一方面中,经分离的荚膜多糖的浓度为约0.1mg/mL至约10.0mg/mL,诸如约0.5mg/mL至约5.0mg/mL、约1.0mg/mL至约3.0mg/mL、或约2.0mg/mL。

[0238] 于特定的实施方案中,氧化剂为高碘酸盐。高碘酸盐将相邻羟基氧化以形成羰基或醛基并引起C-C键断裂。术语“高碘酸盐”包括高碘酸盐和高碘酸二者。该术语还同时包括偏高碘酸盐(IO_4^-)及原高碘酸盐(IO_6^{5-})。术语“高碘酸盐”还包括各种高碘酸盐,包括高碘酸钠和高碘酸钾。于一优选的实施方案中,氧化剂为高碘酸钠。于一优选的实施方案中,用于氧化GBS荚膜多糖的高碘酸盐为偏高碘酸盐。于一优选的实施方案中,用于氧化血清型荚膜多糖的高碘酸盐为偏高碘酸钠。

[0239] 于另一实施方案中,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、或0.1至0.3摩尔当量的氧化剂反应。于特定的实施方案中,多糖与约0.05、约0.1、约0.15、约0.2、约0.25、约0.3、约0.35、约0.4、约0.45、约0.5、约0.55、约0.6、约0.65、约0.7、约0.75、约0.8、约0.85、约0.9、或约0.95摩尔当量的氧化剂反应。于另一实施方案中,多糖与约0.1摩尔当量的氧化剂反应。于另一实施方案中,多糖与约0.15摩尔当量的氧化剂反应。于另外的实施方案中,多糖与约0.25摩尔当量的氧化剂反应。于另一实施方案中,多糖与约0.5摩尔当量的氧化剂反应。于一替换的实施方案中,多糖与约0.6摩尔当量的氧化剂反应。于另一实施方案中,多糖与约0.7摩尔当量的氧化剂反应。

[0240] 于本发明的一方面中,氧化反应的持续时间为约1小时至约50小时、约10小时至约30小时、约15小时至约20小时、约15小时至约17小时、或约16小时。

[0241] 于本发明的另一方面中,氧化反应的温度保持在约2℃至约25℃、约2℃至约8℃、或约20℃至约25℃。于一优选的实施方案中,反应的温度保持在约23℃。于另一优选的实施方案中,反应的温度保持在约5℃。

[0242] 于另一方面中,氧化反应在选自由下列所组成的群组的缓冲剂中进行:磷酸钠、磷酸钾、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)及Bis-Tris。于一优选的实施方案中,缓冲剂为磷酸钾。

[0243] 于另外的方面中,缓冲剂的浓度为约1mM至约500mM、约1mM至约300mM、或约50mM至约200mM。于一优选的实施方案中,缓冲剂的浓度为约100mM。

[0244] 于一方面中,氧化反应在约4.0至约8.0、约5.0至约7.0、或约5.5至约6.5的pH进行。于一优选的实施方案中,pH为约6.0。

[0245] 于一实施方案中,经活化的GBS荚膜多糖通过使约0.5mg/L至约5.0mg/mL的经分离的荚膜多糖与约0.05至约0.3摩尔当量的高碘酸盐在约20℃至25℃的温度反应来获得。

[0246] 于另一实施方案中,经活化的GBS荚膜多糖通过使约0.5mg/L至约5.0mg/mL的经分离的荚膜多糖与约0.05至约0.3摩尔当量的高碘酸盐在约2℃至8℃的温度反应来获得。

[0247] 于另一实施方案中,经活化的GBS荚膜多糖根据本领域技术人员已知的方法(诸如凝胶渗透层析法(GPC)、透析、或超滤/渗滤)纯化。例如,经活化的荚膜多糖使用超滤装置通过浓缩和渗滤来纯化。

[0248] 于一实施方案中,经活化的GBS荚膜多糖的氧化程度为5至25,例如5至15、5至10、10至25、10至20、10至15。于一优选的实施方案中,经活化的GBS荚膜多糖的氧化程度为10至20、11至19、12至18、13至17、或14至16。

[0249] 于另一实施方案中,经活化的GBS荚膜多糖的分子量为约5kDa至约1,000kDa、诸如约50kDa至约300kDa、约75kDa至约400kDa、约75kDa至约200kDa、约100kDa至约700kDa、约100kDa至约500kDa、约100kDa至约400kDa、约100kDa至约300kDa、约200kDa至约400kDa、约300kDa至约700kDa。于一优选的实施方案中,经活化的GBS荚膜多糖的分子量为约75kDa至约400kDa。

[0250] 于一实施方案中,经活化的GBS荚膜多糖任选地在糖的存在下经冷冻干燥。于一优选的实施方案中,糖选自蔗糖、海藻糖(trehalose)、棉子糖、水苏糖(stachyose)、松三糖(melezitose)、葡聚糖(dextran)、甘露糖醇、乳糖醇(lactitol)及巴糖醇(palatinin)。于一优选的实施方案中,糖为蔗糖。然后,可将冷冻干燥的经活化的荚膜多糖与包含载体蛋白的溶液混合。

[0251] 于另一实施方案中,经活化的GBS荚膜多糖任选地在糖的存在下与载体蛋白混合并冷冻干燥。于一方面中,糖选自蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇和巴糖醇。于一优选的实施方案中,糖为蔗糖。然后,可将经共同冷冻干燥的多糖和载体蛋白重新悬浮于溶液中并与还原剂反应。

[0252] 经活化的GBS荚膜多糖可通过包括下列步骤的方法与载体蛋白缀合:

[0253] (a) 混合该经活化的GBS荚膜多糖与载体蛋白,

[0254] (b) 将经混合的经活化的GBS荚膜多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成GBS荚膜多糖-载体蛋白缀合物。

[0255] 例如,与在水溶液中的还原性胺化(其中,未反应(游离)的多糖的量明显提升)相比较,通过在极性非质子性溶剂中进行还原性胺化使经活化的GBS荚膜多糖与载体蛋白缀

合适于维持低水平的游离多糖。于一优选的实施方案中,步骤(a)和步骤(b)在极性非质子性溶剂中进行。

[0256] 于一实施方案中,步骤(a)包括将经冷冻干燥的GBS荚膜多糖溶于包含载体蛋白和极性非质子性溶剂的溶液中。于另一实施方案中,步骤(a)包括将经共同冷冻干燥的GBS荚膜多糖与载体蛋白溶于极性非质子性溶剂中。

[0257] 于一实施方案中,极性非质子性溶剂选自由下列所组成的群组:二甲亚砜(DMSO)、环丁砜、二甲基甲酰胺(DMF)及六甲基磷酰胺(HMPA)。于一优选的实施方案中,极性非质子性溶剂为DMSO。

[0258] 当步骤(a)和(b)在水溶液中进行时,步骤(a)和(b)在水性介质中的缓冲剂中进行,该缓冲剂优选为选自PBS、MES、HEPES、Bis-tris、ADA、PIPES、MOPSO、BES、MOPS、DIPSO、MOBS、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、Bicine、或HEPB,pH为约6.0至约8.5、约7.0至约8.0、或约7.0至约7.5。于一优选的实施方案中,缓冲剂为PBS。于一优选的实施方案中,pH为约7.3。

[0259] 于一实施方案中,步骤(b)中的经活化的GBS荚膜多糖的浓度为约0.1mg/mL至约10.0mg/mL、约0.5mg/mL至约5.0mg/mL、或约0.5mg/mL至约2.0mg/mL。于一优选的实施方案中,步骤(b)中的经活化的血清型GBS荚膜多糖的浓度为约0.1mg/mL、约0.2mg/mL、约0.3mg/mL、约0.4mg/mL、约0.5mg/mL、约0.6mg/mL、约0.7mg/mL、约0.8mg/mL、约0.9mg/mL、约1.0mg/mL、约1.1mg/mL、约1.2mg/mL、约1.3mg/mL、约1.4mg/mL、约1.5mg/mL、约1.6mg/mL、约1.7mg/mL、约1.8mg/mL、约1.9mg/mL、约2.0mg/mL、约2.1mg/mL、约2.2mg/mL、约2.3mg/mL、约2.4mg/mL、约2.5mg/mL、约2.6mg/mL、约2.7mg/mL、约2.8mg/mL、约2.9mg/mL、或约3.0mg/mL。

[0260] 于优选的实施方案中,经活化的血清型GBS荚膜多糖对载体蛋白的初始比例(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、0.6:1至1:1。于一优选的实施方案中,经活化的血清型GBS荚膜多糖对载体蛋白的初始比例为约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、2:1。

[0261] 于一实施方案中,还原剂为氰基硼氢化钠、三乙酰氧基硼氢化钠、布朗斯台德酸或刘易斯酸存在下的硼氢化钠和硼氢化锌、胺硼烷诸如吡啶硼烷、2-甲吡啶硼烷、2,6-二硼烷-甲醇、二甲胺-硼烷、 t -BuMeⁱPrN-BH₃、苄胺-BH₃、或5-乙基-2-甲吡啶硼烷(PEMB)。于一优选的实施方案中,还原剂为氰基硼氢化钠。

[0262] 于另一实施方案中,步骤(b)中所使用的还原剂的量为约0.1至约10.0摩尔当量、约0.5至约5.0摩尔当量、或约1.0至约2.0摩尔当量。于一优选的实施方案中,步骤(b)中所使用的还原剂的量为约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。

[0263] 于一优选的实施方案中,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。于一优选的实施方案中,步骤(b)的持续时间为约44小时。

[0264] 于另一实施方案中,步骤(b)的反应温度保持在10°C至40°C、15°C至30°C、或20°C至26°C。于一优选的实施方案中,步骤(b)中的反应温度保持在约23°C。

[0265] 于另外的实施方案中,用于制造包含与载体蛋白共价连接的GBS荚膜多糖的免疫原性缀合物的方法进一步包括通过添加硼氢化物来将未反应的醛封端(淬灭)的步骤(步骤(c))。

[0266] 于一实施方案中,封端试剂为选自由下列所组成的群组的硼氢化物:硼氢化钠(NaBH_4)、氰基硼氢化钠、硼氢化锂、硼氢化钾、四丁基硼氢化铵、硼氢化钙及硼氢化镁。于一优选的实施方案中,封端试剂为硼氢化钠。

[0267] 于另一实施方案中,步骤(c)中所使用的硼氢化物的量为约0.1至约10.0摩尔当量、约0.5至约5.0摩尔当量、或约1.0至约3.0摩尔当量。于一优选的实施方案中,步骤(c)中所使用的硼氢化物的量为约2.0摩尔当量。

[0268] 于一优选的实施方案中,步骤(c)中所使用的硼氢化物为 NaBH_4 ,其浓度为约2.0摩尔当量。

[0269] 于一实施方案中,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、2小时至4小时。于一优选的实施方案中,步骤(c)的持续时间为约3小时。

[0270] 于另一实施方案中,步骤(c)中的反应温度保持在约 15°C 至约 45°C 、约 15°C 至约 30°C 、或约 20°C 至约 26°C 。于一优选的实施方案中,步骤(c)的反应温度保持在约 23°C 。

[0271] GBS荚膜多糖与载体蛋白缀合并封端后,该多糖-蛋白质缀合物可通过本领域技术人员已知的各种技术纯化(就多糖-蛋白质缀合物的量而言为富集的)。这些技术包括透析、浓缩/渗滤操作、切向流过滤、沉淀/洗脱、柱层析法(DEAE或疏水相互作用层析法)及深层过滤。

[0272] 于另一实施方案中,免疫原性缀合物包含与GBS荚膜多糖的总量相较下为少于约40%、少于约35%、少于约30%、少于约25%、少于约20%、少于约15%、少于约10%、或少于约5%的游离GBS荚膜多糖。于一优选的实施方案中,免疫原性缀合物包含与GBS荚膜多糖的总量相较下为少于约5%的未反应的游离糖。

[0273] 于一优选的实施方案中,GBS多糖-蛋白质缀合物的分子量为约300kDa至约20,000kDa,诸如约1,000kDa至约15,000kDa、或约1,000kDa至约10,000kDa。

[0274] 于另一实施方案中,缀合物中的GBS荚膜多糖对载体蛋白的比例(重量/重量)为约0.5至约3.0。于一方面中,缀合物中的GBS荚膜多糖对载体蛋白的比例为约0.5至约2.0、约0.5至约1.5、约0.5至约1.0、约1.0至约1.5、或约1.0至约2.0。于一优选的实施方案中,缀合物中的GBS荚膜多糖对载体蛋白的比例为约0.8至约1.0。

[0275] 于另一实施方案中,缀合物的缀合程度为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10至12。于优选的实施方案中,缀合物的缀合程度为2至5。

[0276] 于本发明的一方面中,GBS荚膜多糖-蛋白质缀合物通过上述的还原性胺化方法获得。例如,于一方面中,本公开内容提供包含与载体蛋白缀合的多糖的GBS荚膜多糖-蛋白质缀合物,其可通过包括下列步骤的方法制造或获得:

[0277] (a) 使经分离的GBS荚膜多糖与氧化剂反应;

[0278] (b) 通过加入淬灭剂来淬灭氧化反应以产生经活化的GBS荚膜多糖;

[0279] (c) 混合该经活化的GBS荚膜多糖与载体蛋白,

[0280] (d) 将经混合的经活化的GBS荚膜多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成GBS荚膜多糖-载体蛋白缀合物,以及,任选地

[0281] (e) 通过加入硼氢化钠(NaBH_4)来将未反应的醛封端。

[0282] 于一优选的实施方案中,步骤(c)和(d)在DMSO中进行。

[0283] 于本发明的另一方面中,本发明的GBS荚膜多糖-蛋白质缀合物使用如上述的还原性胺化制造,但在活化/氧化步骤中使用2,2,6,6-四甲基-1-哌啶基氧(TEMPO)游离基和N-氯琥珀酰亚胺(NCS)作为共氧化剂。参见国际专利申请公开号WO 2014/097099,其全部内容以引用方式并入本文。于这样的实施方案中,来自GBS荚膜多糖的糖缀合物使用TEMPO游离基将糖的一级醇(primary alcohol)氧化成醛(使用NCS作为共氧化剂)(以下称为“TEMPO/NCS氧化”)来制造,诸如实施例7和国际专利申请公开号WO 2014/097099中所描述的。因此,于一方面中,GBS荚膜多糖的缀合物通过包括下列步骤的方法获得:a)使GBS荚膜多糖与TEMPO和NCS在溶剂中反应以制造经活化的糖;及b)使该经活化的糖与包括一或多个氨基的载体蛋白反应(以下称为“TEMPO/NCS-还原性胺化”)。于一实施方案中,该溶剂可为水性溶剂或DMSO。

[0284] 于一方面中,GBS荚膜多糖-蛋白质缀合物通过所述方法获得。例如,于一方面中,本公开内容提供GBS荚膜多糖-蛋白质缀合物,其包含通过包括下列步骤的方法制造或获得的与载体蛋白缀合的多糖:a)使糖与2,2,6,6-四甲基-1-哌啶基氧(TEMPO)和N-氯琥珀酰亚胺(NCS)在溶剂中反应,以制造经活化的糖;及b)使该经活化的糖与包含一或多个氨基的载体蛋白反应。于一实施方案中,该溶剂可为水性溶剂或DMSO。

[0285] 免疫原性组合物

[0286] 将个体缀合物纯化后,其可合并以配制本发明的免疫原性组合物,此免疫原性组合物可用于例如疫苗中。本发明的免疫原性组合物的配制可使用本领域认可的方法完成。

[0287] 对免疫原性组合物的“免疫反应”为受试者对存在于目标组合物中的分子(例如抗原,诸如蛋白质或多糖)发展出体液和/或细胞介导的免疫反应。就本发明的目的,“体液免疫反应”为由抗体介导的免疫反应且涉及产生对存在于本发明的免疫原性组合物中的抗原具亲和力的抗体,而“细胞介导的免疫反应”为由T-淋巴细胞和/或其他白细胞介导的免疫反应。“细胞介导的免疫反应”通过呈现与主要组织相容性复合体(MHC)的第I类或第II类分子关联的抗原性表位引起。这活化抗原特异性CD4⁺T辅助细胞或CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。CTL对与MHC或CD1所编码的蛋白质关联呈现且表达在细胞表面的肽或脂质抗原具特异性。CTL协助诱发并促进胞内微生物的细胞内破坏或被这样的微生物感染的细胞的裂解。细胞免疫的另一方面涉及由辅助T细胞产生的抗原特异性反应。辅助T细胞作用于协助刺激非特异性效应细胞对抗在其表面显示出肽抗原(与典型或非典型MHC分子关联)的细胞的功能且关注其活性。“细胞介导的免疫反应”还指产生细胞因子、趋化因子及其他由活化的T细胞和/或其他白细胞制造的这样的分子,包括那些源自CD4⁺和CD8⁺T细胞的。特定抗原或组合物刺激由细胞介导的免疫反应的能力可通过多种分析测定,诸如通过淋巴增生(淋巴细胞活化)分析、CTL细胞毒性细胞分析、通过分析对致敏受试者中的抗原有特异性的T淋巴细胞、或通过测量T细胞响应抗原再刺激时所产生的细胞因子。这样的分析为本领域所熟知。参见,例如,Erickson, A.L., 等人, *J. Immunol.*, 151 (8) : 4189-4199 (1993); Doe, B., 等人, *Eur. J. Immunol.* 24 (10) : 2369-2376 (1994)。

[0288] 术语“免疫原性”指抗原或疫苗引起免疫反应(由体液或细胞介导的、或此二者)的能力。

[0289] 本文中,“免疫原性量”、或“免疫有效量”、或“剂量”各可互换使用,通常指足以诱发免疫反应(为细胞(T细胞)、或体液(B细胞或抗体)反应、或此二者)的抗原或免疫原性组

合物的量(通过本领域技术人员已知的标准分析法所测量)。

[0290] 本文所使用的“免疫干扰”或“显著的免疫干扰”指,相较于对以单价疫苗施用的相同抗原所产生的免疫反应,对在多价或多组分疫苗中的个体抗原所产生的免疫反应为统计学上显著减少。

[0291] “保护性”免疫反应指免疫原性组合物引起用来保护受试者免于感染的免疫反应(体液或细胞介导)的能力。若与对照受试者群(例如未施用疫苗或免疫原性组合物的受感染的动物)相比较时具有统计学上显著的改善,所提供的保护不必是绝对的,即,不需要完全防止或根除感染。保护作用可能局限于减轻感染症状发作的严重程度或速度。本领域中已知数种用于测定免疫反应是否显示为“保护性免疫反应”的分析。例如,抗体水平增加可通过结合分析测量,诸如下文中进一步描述的全细胞ELISA分析。其他分析包括测量功能性抗体反应,诸如促进杀死细菌,其可以用如下述的调理吞噬分析(OPA)进行测试。在特定情况中,“保护性免疫反应”可包括在至少50%的受试者中诱发特异于特定抗原的抗体水平增加二倍或增加四倍。于另一情况中,“保护性免疫反应”可包括细菌数减少至少10%、25%、50%、65%、75%、80%、85%、90%、95%、或更多。

[0292] 组合物中的特定缀合物的量通常根据用于该缀合物的全部多糖(缀合及未缀合的)计算。例如,在100mcg/ml的GBS荚膜多糖剂量中,具有20%游离多糖的GBS荚膜多糖缀合物将具有约80mcg/ml的缀合的GBS荚膜多糖及约20mcg/ml的未缀合的GBS荚膜多糖。计算缀合物的剂量时,通常不考虑蛋白质载体对缀合物的贡献。缀合物的量可根据链球菌血清型而变化。通常,各剂量将包括约0.01mg/ml至约100mcg/ml的各多糖,尤其是约1mcg/ml至约70mcg/ml,更特别的为约5mcg/ml至约50mcg/ml。免疫原性组合物中的不同多糖组分的“免疫原性量”可不同且可各包括约0.01mcg/ml、约0.1mcg/ml、约0.25mcg/ml、约0.5mcg/ml、约1mcg/ml、约2mcg/ml、约3mcg/ml、约4mcg/ml、约5mcg/ml、约6mcg/ml、约7mcg/ml、约8mcg/ml、约9mcg/ml、约10mcg/ml、约15mcg/ml、约20mcg/ml、约25mcg/ml、约30mcg/ml、约40mcg/ml、约50mcg/ml、约60mcg/ml、约70mcg/ml、约80mcg/ml、约90mcg/ml、或约100mcg/ml的任何特定多糖抗原。除非另有说明,多价免疫原性组合物的剂量或免疫原性量将指各多糖的剂量。例如,10mcg/ml的六价免疫原性组合物剂量将含六种多糖中的每一种的10mcg/ml。

[0293] 作为免疫原的抗原的效力可通过测量B细胞活性水平(通过使用免疫分析、免疫沉淀分析、功能性抗体分析(诸如体外调理素分析)和本领域中已知的许多其他分析来测量血清中特异于该抗原的循环抗体水平)来测定。另一测量作为T细胞免疫原的抗原的效力的方法可通过增殖分析、通过细胞裂解分析(诸如铬释放分析)以测量T细胞裂解其特异性目标细胞的能力来测定。此外,本发明中,“免疫原性量”还可通过测量施用抗原后所诱发的抗原特异性抗体的血清水平来界定,或通过测量由此诱发的抗体增强如本文所描述的特定白细胞的调理吞噬能力的的能力来界定。免疫反应的保护水平可使用已注射的抗原攻击经免疫化的宿主来测量。例如,若免疫反应所需的抗原为细菌,由该抗原的“免疫原性量”所诱发的保护水平可通过检测用细菌细胞攻击动物后的存活百分比或死亡百分比来测量。于一实施方案中,保护量可通过测量与细菌感染相关的至少一种症状(例如与感染相关的发烧)来测定。在多抗原或多组分疫苗或免疫原性组合物中的各抗原的量将相对于其他各组分而变化,并可通过本领域技术人员已知的方法测定。这样的方法可包括例如用于测量免疫原性和/或体内效力的程序。

[0294] 术语“免疫原性组合物”涉及任何含有抗原(例如微生物或其组分)的药物组合物,该组合物可用于引起受试者的免疫反应。本发明的免疫原性组合物可通过经由全身性经皮或粘膜途径施用该免疫原性组合物而用于治疗易患GBS感染的人。这些施用可包括经由肌肉内(i.m.)、腹膜内(i.p.)、皮内(i.d.)、或皮下途径注射;通过贴剂或其他经皮投递装置施用;或通过粘膜施用至口腔/消化道、呼吸道或泌尿生殖道。于一实施方案中,免疫原性组合物可用于制造疫苗或用于引起可用于被动保护或治疗动物的多克隆或单克隆抗体。

[0295] 于一方面中,本发明涉及包括有效量的至少一种如本文所描述的多糖-寡糖、多糖-蛋白质缀合物、或其生物等效物的免疫原性组合物。例如,于一实施方案中,免疫原性组合物包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该荚膜多糖选自由下列所组成的群组:B族链球菌血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及IX,且其中,该荚膜多糖的唾液酸水平高于约60%。于另一实例中,免疫原性组合物包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自B族链球菌血清型IV及至少一种另外的血清型的荚膜多糖,该另外的血清型选自由下列所组成的群组:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于另一实施方案中,免疫原性组合物包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自B族链球菌血清型IV及至少两种另外的血清型的荚膜多糖,该另外的血清型选自由下列所组成的群组:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于另一实施方案中,免疫原性组合物包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自B族链球菌血清型IV及至少三种另外的血清型的荚膜多糖,该另外的血清型选自由下列所组成的群组:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于另一实施方案中,免疫原性组合物包含多糖-蛋白质缀合物。其中,该缀合物包含来自B族链球菌血清型IV及至少四种另外的血清型的荚膜多糖,该另外的血清型选自由下列所组成的群组:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于特定的实施方案中,免疫原性组合物包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自B族链球菌血清型Ia、Ib、II、III及V的荚膜多糖。于另一实施方案中,免疫原性组合物包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自B族链球菌血清型Ia、Ib、II、III和IV的荚膜多糖。于另一实施方案中,免疫原性组合物包含多糖-蛋白质缀合物,其中该缀合物包含来自B族链球菌血清型IV及至少五种另外的血清型的荚膜多糖,该另外的血清型选自由下列所组成的群组:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于一这样的实施方案中,免疫原性组合物包含六种多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自B族链球菌血清型Ia、Ib、II、III、IV及V的荚膜多糖。

[0296] 于一实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含2至10种不同血清型的无乳链球菌。因此,于一实施方案中,本发明的免疫原性组合物为2、3、4、5、6、7、8、9或10价的GBS缀合物组合物。于一个这样的实施方案中,免疫原性组合物为5价GBS缀合物组合物。于另一实施方案中,免疫原性组合物为6价GBS缀合物组合物。于另一实施方案中,免疫原性组合物为7价GBS缀合物组合物。于另一实施方案中,免疫原性组合物为8价GBS缀合物组合物。

[0297] 尽管现有技术教导在组合物中使用少于六、少于五、或少于四种GBS抗原(参见国际专利申请公开号W0 2006/082527和W0 2006/082530)以及经历免疫干扰,尤其是关于在多价组合物中使用血清型V(参见国际专利申请公开号W0 2012/035519),本发明在多价组合物中使用四种或更多种GBS抗原和使用血清型V时并未显示任何显著的免疫干扰。因此,本发明涉及包含多糖-蛋白质缀合物的多价免疫原性组合物,该多糖-蛋白质缀合物包含至少四种GBS荚膜多糖血清型,诸如至少五种GBS荚膜多糖血清型、至少六种GBS荚膜多糖血清

型、至少七种GBS荚膜多糖血清型、至少八种GBS荚膜多糖血清型、或至少九种GBS荚膜多糖血清型,其中,该组合物不具有显著的免疫干扰。于特定的实施方案中,免疫原性组合物包含GBS荚膜多糖血清型V。

[0298] 多糖-蛋白质缀合物可包含相同或不同的蛋白质载体。于一实施方案中,缀合物包含相同的蛋白质载体且糖与蛋白质载体的相同分子缀合(载体分子具有2或更多个不同多糖与其缀合)[参见,例如国际专利申请公开号W0 2004/083251]。于另一实施方案中,多糖各自独立地与蛋白质载体的不同分子缀合(蛋白质载体的各分子仅具有一个类型的多糖与其缀合)。于该实施方案中,描述为荚膜糖个别地与载体蛋白缀合。

[0299] 特定的免疫原性组合物的最佳组分量可通过标准研究确定,该标准研究涉及观察受试者的适当免疫反应。初次接种疫苗后,受试者可接受一或多个适当隔开的加强免疫。

[0300] 除了多个荚膜多糖蛋白质缀合物外,本发明的免疫原性组合物可进一步包括一或多种防腐剂。FDA要求在多剂量小瓶中的生物产品含有防腐剂,只有少数例外。本发明考虑使用这样的多剂量小瓶。含有防腐剂的疫苗产品包括含有苄索氯铵(炭疽)、2-苯氧基乙醇(DTaP、HepA、Lyme、小儿麻痹(Polio)(肠道道外的))及酚(Pneumo、伤寒(肠道道外的))的疫苗。经批准用于注射药物的防腐剂包括,例如氯丁醇、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、2-苯氧基乙醇、氯化本索宁、氯化卞二甲烷铵、苄酸、苄醇、酚及硝酸苯汞。

[0301] 于另一方面中,本发明涉及包含至少一种本文所描述的任何多糖及药学上可接受的赋形剂、缓冲剂、稳定剂、佐剂、冷冻保护剂、盐、二价阳离子、非离子性洗涤剂、自由基氧化抑制剂、稀释剂或载体、或其混合物的组合物。

[0302] 免疫原性组合物任选可包括一种或多种生理学上可接受的缓冲剂,该缓冲剂选自,但不限于HEPES,PIPES,MES,Tris(氨基丁三醇)、磷酸盐、乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸及琥珀酸盐。于一优选的实施方案中,缓冲剂为组氨酸。

[0303] 于一实施方案中,免疫原性组合物包含缓冲剂,其浓度为约5mM至约50mM、约5mM至约40mM、约5mM至约30mM、约5mM至约20mM、约5mM至约10mM、约10mM至约50mM、约10mM至约40mM、约10mM至约35mM、约10mM至约30mM、约10mM至约25mM、约10mM至约20mM、约10mM至约15mM、约15mM至约50mM、约15mM至约40mM、约15mM至约35mM、约15mM至约30mM、约15mM至约25mM、或约15mM至约20mM。于一优选的实施方案中,免疫原性组合物包含缓冲剂,其浓度为约10mM至约25mM,且最佳为约20mM。

[0304] 于一优选的实施方案中,免疫原性组合物包含浓度为约20mM的组氨酸。

[0305] 于一些实施方案中,配制剂被缓冲成pH在约5.0至约7.1的范围内,诸如约5.3至约7.1、约5.5至约7.0、约6.0至约7.0、约6.0至约6.5、约6.3至约7.0、或约6.5至约7.0。于另一实施方案中,配制剂被缓冲成pH为约6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、或7.0。于一优选的实施方案中,配制剂被缓冲成pH范围为约6.0至约7.0,最佳为约6.5。

[0306] 免疫原性组合物任选可包含一或多种非离子性表面活性剂,包括,但不限于聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯、聚山梨醇酯-80(TWEEN 80)、聚山梨醇酯-60(TWEEN 60)、聚山梨醇酯-40(TWEEN 40)、聚山梨醇酯-20(TWEEN 20)及聚氧乙烷基醚(polyoxyethylene alkyl ether),包括,但不限于BRIJ 58、BRIJ 35,以及其他的诸如TRITON X-100;TRITON X-114、NP40、SPAN 85及非离子性表面活性剂的PLURONIC系列(例如PLURONIC 121)。于一实施方案中,免疫原性组合物包含聚山梨醇酯-80或聚山梨醇酯40,优选为聚山梨醇酯-80(PS80)。

[0307] 于一实施方案中,免疫原性组合物包含表面活性剂,其浓度为约0.001%至约2% (v/w)、约0.001%至约1%、约0.001%至约0.5%、约0.001%至约0.1%、约0.001%至约0.05%、约0.001%至约0.01%、约0.001%至0.005%、约0.005%至约2%、约0.005%至约1%、约0.005%至约0.5%、约0.005%至约0.1%、约0.005%至约0.05%、约0.005%至约0.01%、约0.01%至约2%、约0.01%至约1%、约0.01%至约0.5%、约0.01%至约0.1%、约0.01%至约0.05%、约0.01%至约0.04%、约0.01%至约0.03%、约0.015%至约2%、约0.015%至约1%、约0.015%至约0.5%、约0.015%至约0.1%、约0.015%至约0.05%、约0.015%至约0.04%、约0.015%至约0.03%、约0.02%至约2%、约0.02%至约1%、约0.02%至约0.5%、约0.02%至约0.1%、约0.02%至约0.05%、约0.02%至约0.04%、约0.02%至约0.03%、约0.05%至约2%、约0.05%至约1%、约0.05%至约0.5%、约0.05%至约0.1%、约0.1%至约2%、约0.1%至约1%、约0.1%至约0.5%、或约0.1%至约0.25%。于一优选的实施方案中,免疫原性组合物包含浓度为约0.01%至约0.03%的表面活性剂,且最优选为约0.02%。

[0308] 于另一实施方案中,免疫原性组合物包含浓度为约0.001%至约2% (优选为高达约0.25%)的聚山梨醇酯-80或浓度为约0.001%至1% (优选为高达约0.5%)的聚山梨醇酯40。

[0309] 于一优选的实施方案中,免疫原性组合物包含浓度为约0.02%的PS80。

[0310] 药学上可接受的载体不与“载体蛋白”混淆,载体蛋白用于连接本发明的碳水化合物与蛋白质,并修饰对该碳水化合物的免疫反应。为了避免与本文所描述的载体蛋白混淆,术语药学上可接受的稀释剂将优于药学上可接受的载体,但这些术语可偶尔会互换使用。术语“药学上可接受的载体”意指由联邦、州政府的管理机构、或其他管理机构批准的载体,或美国药典或其他公认的药典中所列出的可用于动物(包括人类及非人类的哺乳动物)的载体。术语“载体”指稀释剂、佐剂、赋形剂、或媒介物(药物组合物与其一起施用)。合适的药学上可接受的稀释剂包括任何及所有常规溶剂、分散介质、填充剂、固体载体、水溶液、涂覆物、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂、以及类似物。这样的药学上可接受的稀释剂可为无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的无菌液体。水、注射用水(WFI)、无菌等渗盐水溶液、磷酸盐缓冲盐水、佐剂悬浮液、葡萄糖水溶液和甘油溶液、以及其组合,可用来作为液体载体,尤其是用于注射用溶液。药学上可接受的稀释剂可进一步包括少量的辅助物质,诸如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其可增强储存寿命或在体内的效力。药学上可接受的稀释剂的制备和使用为本领域已知。合适的药物载体的实例描述于E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。于一实施方案中,稀释剂为水、注射用水(WFI)、佐剂悬浮液、或盐水。于特定的实施方案中,稀释剂为本文所描述的任何佐剂的悬浮液。于一优选的实施方案中,稀释剂为基于铝的佐剂悬浮液,诸如磷酸铝悬浮液。

[0311] 合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇、巴糖醇、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、氯化钠(NaCl)、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等等。于一个优选的实施方案中,赋形剂为NaCl。

[0312] 于一实施方案中,免疫原性组合物包含赋形剂,其浓度为约10mM至约500mM、约

10mM至约450mM、约10mM至约400mM、约10mM至约350mM、约10mM至约300mM、约10mM至约250mM、约10mM至约200mM、约10mM至约150mM、约10mM至约100mM、约10mM至约50mM、约10mM至约30mM、约10mM至约20mM、20mM至约500mM、约20mM至约450mM、约20mM至约400mM、约20mM至约350mM、约20mM至约300mM、约20mM至约250mM、约20mM至约200mM、约20mM至约150mM、约20mM至约100mM、约20mM至约50mM、约20mM至约30mM、50mM至约500mM、约50mM至约450mM、约50mM至约400mM、约50mM至约350mM、约50mM至约300mM、约50mM至约250mM、约50mM至约200mM、约50mM至约150mM、约50mM至约100mM、约100mM至约500mM、约100mM至约450mM、约100mM至约400mM、约100mM至约350mM、约100mM至约300mM、约100mM至约250mM、约100mM至约200mM、约100mM至约150mM、约150mM至约500mM、约150mM至约450mM、约150mM至约400mM、约150mM至约350mM、约150mM至约300mM、约150mM至约250mM、约150mM至约200mM、约200mM至约500mM、约200mM至约450mM、约200mM至约400mM、约200mM至约350mM、约200mM至约300mM、约200mM至约250mM、约250mM至约500mM、约250mM至约450mM、约250mM至约400mM、约250mM至约350mM、约250mM至约300mM、约300mM至约500mM、约300mM至约450mM、约300mM至约400mM、约300mM至约350mM、约350mM至约500mM、约350mM至约450mM、约350mM至约400mM、约400mM至约500mM、约400mM至约450mM、或约450mM至约500mM。于一优选的实施方案中,免疫原性组合物包含赋形剂,其浓度为约10mM至约250mM,最优选为约150mM。

[0313] 于一优选的实施方案中,赋形剂为浓度约150mM的NaCl。

[0314] 若需要时,组合物还可含有少量的湿润剂、增积剂、乳化剂、或pH缓冲剂。这些组合物可为溶液、悬浮液、乳剂、冷冻干燥粉末或块等形式。配制剂应适合施用模式。除了与活性成分不兼容者外,任何常规介质或试剂可考虑用于本发明的免疫原性组合物中。

[0315] 于一实施方案中,免疫原性组合物是经冷冻干燥(任选地在至少一种赋形剂的存在下)。于一优选的实施方案中,该至少一种赋形剂选自由下列所组成的群组:淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇、巴糖醇、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、氯化钠(NaCl)、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水及乙醇。于一优选的实施方案中,该至少一种赋形剂选自由下列所组成的群组:蔗糖、甘露糖醇及甘氨酸。于特定的实施方案中,该至少一种赋形剂为蔗糖。于另一实施方案中,冷冻干燥的组合物包含另外的赋形剂。于一这样的实施方案中,另外的赋形剂为甘露糖醇或甘氨酸。

[0316] 于另一实施方案中,冷冻干燥组合物包含约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的至少一种糖,诸如约1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、或10.0%。于一优选的实施方案中,冷冻干燥的组合物包含多于约5.5% (w/v) 的至少一种赋形剂,诸如多于约7.0% (w/v)。于另一实施方案中,冷冻干燥的组合物包含约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的另外的赋形剂,诸如约1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、或10.0%。于优选的实施方案中,冷冻干燥的组合物包含约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的至少一种赋形剂及约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的另外的赋形剂。

[0317] 于另一实施方案中,冷冻干燥的组合物用水、注射用水(WFI)、佐剂悬浮液、或盐水重构。于一优选的实施方案中,稀释剂为基于铝的佐剂悬浮液,诸如磷酸铝悬浮液。

[0318] 于一实施方案中,组合物包含本文所描述的经分离的多糖和载体分子。合适的载

体分子可包括蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚合型氨基酸、氨基酸共聚物、脂质聚集物(诸如油滴或脂质体)及无活性病毒颗粒。颗粒载体的实例包括源自聚甲基丙烯酸甲酯聚合物的那些,以及源自聚(乳丙交酯)和聚(丙交酯-共-乙交酯)(称为PLG)的微粒。

[0319] 本发明的免疫原性组合物可进一步包含一或多种另外的“免疫调节剂”,其为扰乱或改变免疫系统的药剂,以使得可观察到体液和/或细胞介导的免疫作用的上调或下调。于特定的实施方案中,优选上调体液和/或细胞介导的免疫系统分支(arm)。其中,一些免疫调节剂的实例包括,例如美国专利号5,254,339所描述的佐剂或细胞因子、或ISCOMATRIX(CSL Limited, Parkville, Australia)。术语“佐剂(adjuvant)”指如本文进一步所述的增强对抗原的免疫反应的化合物或混合物。

[0320] 可用于本发明的组合物中的佐剂的非限制性实例包括RIBI佐剂系统(Ribi Inc., Hamilton, Mont.);矿物凝胶,诸如氢氧化铝凝胶;油包水乳剂,诸如弗氏完全和不完全佐剂;嵌段共聚物(CytRx, Atlanta Ga.);SAF-M(Chiron, Emeryville, Calif.); **AMPHIGEN**[®]佐剂;皂苷;Quil A或其他皂苷部分;单磷酰脂质A;及阿夫立定(Avridine)脂质-胺佐剂。可作为本发明的疫苗中的佐剂的水包油乳剂的非限制性实例包括MF59(美国专利号6,299,884)(含有5%角鲨烯(Squalene)、0.5%聚山梨醇酯-80及0.5% Span 85(任选含有各种量的MTP-PE),其使用微射流器(microfluidizer)诸如型号110Y微射流器(Microfluidics, Newton, MA)配制成亚微米颗粒),及SAF(含有10%角鲨烯、0.4%聚山梨醇酯-80、5% pluronic嵌段聚合物L121和thr-MDP,其经微射流化成亚微米乳剂或经震荡混合以产生较大粒度的乳剂);经改性的SEAM62(含有5%(v/v)角鲨烯(Sigma)、1%(v/v) **SPAN**[®]**85**洗涤剂(ICI Surfactants)、0.7%(v/v)聚山梨醇酯80洗涤剂(ICI Surfactants)、2.5%(v/v)乙醇、200µg/ml Quil A、100µg/ml胆固醇、和0.5%(v/v)卵磷脂);及经改性的SEAM 1/2(含有5%(v/v)角鲨烯、1%(v/v) **SPAN**[®]**85**洗涤剂、0.7%(v/v)聚山梨醇酯80洗涤剂、2.5%(v/v)乙醇、100µg/ml Quil A、和50µg/ml胆固醇)。

[0321] 用于增强免疫反应的合适的佐剂还包括,但不限于美国专利号4,912,094中所描述的MPL[™](3-O-脱酰单磷酰脂质A, Corixa, Hamilton, MT)。还适合作为佐剂的有合成的脂质A类似物、或胺烷基葡糖胺磷酸酯化合物(AGP)、或其衍生物或类似物,其可从Corixa(Hamilton, MT)获得且描述于美国专利号6,113,918中。一种这样的AGP为2-[(R) -3-十四烷酰氧基-十四烷酰-氨基]乙基2-脱氧基-4-O-磷酰-3-O-[(R) -3-十四烷酰氧基-十四烷酰]-2-[(R) -3-十四烷酰氧基-十四烷酰-氨基]-b-D-葡萄糖吡喃糖苷,其还称为529(以前称为RC529)。此529佐剂被配制为水性形式(AF)或稳定的乳剂(SE)。

[0322] 其他佐剂包括环糊精衍生物(美国专利号6,165,995);聚阴离子性聚合物(polyanionic polymer)(美国专利号6,610,310);胞壁酰肽(muramyl peptide),诸如N-乙酰基-胞壁酰-L-苏胺酰基-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)及N-乙酰基-正胞壁酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'二棕榈酰基-sn-甘油基-3-羟基-磷酰基-氧基)-乙胺(MTP-PE);爱菲金(Amphigen);阿夫立定(Avridine);L121/角鲨烯;D-丙交酯-聚乳酸/糖苷; pluronic多元醇;经杀死的博德氏杆菌(killed Bordetella);皂苷,诸如美国专利号5,057,540中所描述的Stimulon[™] QS-21(Antigenics, Framingham, MA.);结核分枝杆菌;细菌脂多糖;合成的多核苷酸,诸如含有CpG基序的寡核苷酸(例如美国专利号6,207,646);欧洲专利号1,296,713和1,326,634

中所描述的IC-31 (Intercell AG, Vienna, Austria);百日咳毒素 (PT) 或其突变体,霍乱毒素或其突变体 (例如美国专利号7,285,281,7,332,174,7,361,355和7,384,640);或大肠杆菌不耐热毒素 (LT) 或其突变体,尤其是LT-K63、LT-R72 (例如美国专利号6,149,919、7,115,730和7,291,588)。

[0323] 可包括在疫苗中的其他“免疫调节剂”包括,例如下列中的一或多种:介白素1- α 、1- β 、2、4、5、6、7、8、10、12 (参见,例如美国专利号5,723,127)、13、14、15、16、17及18 (和其突变体形式);干扰素- α 、 β 及 γ ;粒细胞-巨噬细胞群落刺激因子 (GM-CSF) (参见,例如美国专利号5,078,996和ATCC登录号39900);巨噬细胞群落刺激因子 (M-CSF);粒细胞群落刺激因子 (G-CSF);或肿瘤坏死因子 α 和 β 。还有的可用于本文所描述的免疫原性组合物的其他佐剂包括趋化因子,包括,但不限于MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 及RANTES;粘附分子,诸如选择蛋白,例如L-选择蛋白、P-选择蛋白及E-选择蛋白;粘蛋白样分子,例如CD34、GlyCAM-1及MadCAM-1;整联蛋白族的成员,诸如LFA-1、VLA-1、Mac-1及p150.95;免疫球蛋白超家族的成员,诸如PECAM、ICAM (例如ICAM-1、ICAM-2和ICAM-3)、CD2及LFA-3;共刺激分子,诸如B7-1、B7-2、CD40和CD40L;生长因子,包括血管生长因子、神经生长因子、纤维母细胞生长因子、表皮生长因子、PDGF、BL-1及血管内皮生长因子;受体分子,包括Fas、TNF受体、Flt、Apo-1、p55、WSL-1、DR3、TRAMP、Apo-3、AIR、LARD、NGRF、DR4、DR5、KILLER、TRAIL-R2、TRICK2及DR6;及半胱天冬酶 (ICE)。

[0324] 应理解的是,是否使用免疫调节剂和/或佐剂的决定,或将使用何种免疫调节剂和/或佐剂的选择将取决于欲施用疫苗或免疫原性组合物的受试者、注射途径及欲给予的注射次数。例如,若受试者已天然暴露于病原体,则可能不需要佐剂,因疫苗抗原可有效地诱发记忆反应。于一些实施方案中,免疫原性组合物将包括一或多种佐剂。于一实施方案中,免疫原性组合物包含基于铝的佐剂。于一这样的实施方案中,铝佐剂为氢氧化铝、磷酸铝、或羟基磷酸铝。于特定的实施方案中,佐剂为磷酸铝。于本发明的另一实施方案中,免疫原性组合物包含QS-21作为佐剂。

[0325] 于一实施方案中,免疫原性组合物包含佐剂,其浓度为约0.1mg/ml至约1.0mg/ml、0.1mg/ml至约0.9mg/ml、0.1mg/ml至约0.8mg/ml、0.1mg/ml至约0.7mg/ml、0.1mg/ml至约0.6mg/ml、0.1mg/ml至约0.5mg/ml、0.1mg/ml至约0.4mg/ml、0.1mg/ml至约0.3mg/ml、0.1mg/ml至约0.2mg/ml、0.25mg/ml至约0.95mg/ml、0.25mg/ml至约0.85mg/ml、0.25mg/ml至约0.75mg/ml、0.25mg/ml至约0.65mg/ml、0.25mg/ml至约0.55mg/ml、0.25mg/ml至约0.45mg/ml、0.25mg/ml至约0.35mg/ml、0.5mg/ml至约1.0mg/ml、0.5mg/ml至约0.9mg/ml、0.5mg/ml至约0.8mg/ml、0.5mg/ml至约0.75mg/ml、0.5mg/ml至约0.7mg/ml、0.5mg/ml至约0.65mg/ml、0.5mg/ml至约0.6mg/ml、0.75mg/ml至约1.0mg/ml、0.75mg/ml至约0.95mg/ml、0.75mg/ml至约0.9mg/ml及0.75mg/ml至约0.85mg/ml。于一优选的实施方案中,免疫原性组合物包含浓度为约0.25mg/ml至约0.75mg/ml的佐剂,最优选为约0.5mg/ml。

[0326] 于一优选的实施方案中,佐剂为浓度约0.5mg/ml的基于铝的佐剂。于一这样的实施方案中,基于铝的佐剂为磷酸铝或羟基磷酸铝。

[0327] 于一实施方案中,免疫原性组合物包含如本文所描述的多糖-蛋白质缀合物、缓冲剂、表面活性剂、赋形剂及任选佐剂,其中,该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0。

[0328] 于一这样的实施方案中,免疫原性组合物包含GBS多糖-蛋白质缀合物、缓冲剂、表

面活性剂、赋形剂及任选佐剂,其中,该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0,且其中,荚膜多糖的唾液酸水平高于约60%。

[0329] 于特定的实施方案中,免疫原性组合物包含GBS多糖-蛋白质缀合物、组氨酸、聚山梨醇酯-80、氯化钠及任选磷酸铝,其中,该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0,且其中,荚膜多糖的唾液酸水平高于约60%。

[0330] 于一优选的实施方案中,免疫原性组合物包含约5mcg/ml至约50mcg/ml的GBS多糖-蛋白质缀合物、约10mM至约25mM的组氨酸、约0.01%至约0.03% (v/w) 的聚山梨醇酯-80、约10mM至约250mM的氯化钠及任选约0.25mg/ml至约0.75mg/ml的作为磷酸铝的铝,其中,荚膜多糖的唾液酸水平高于约60%。

[0331] 于一这样的实施方案中,免疫原性组合物包含至少两种GBS多糖-蛋白质缀合物、缓冲剂、表面活性剂、赋形剂及任选佐剂,其中,该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0,且其中,该缀合物包含来自B族链球菌 (GBS) 血清型IV及至少一选自由下列所组成的群组的另外的血清型的荚膜多糖:Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。

[0332] 于特定的实施方案中,免疫原性组合物包含至少两种GBS多糖-蛋白质缀合物、组氨酸、聚山梨醇酯-80、氯化钠及任选磷酸铝,其中,该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0,且其中,该缀合物包含来自B族链球菌 (GBS) 血清型IV及至少一种选自由下列所组成的群组的另外的血清型的荚膜多糖:Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。

[0333] 于一优选的实施方案中,免疫原性组合物包含各约5mcg/ml至约50mcg/ml的至少两种GBS多糖-蛋白质缀合物、约10mM至约25mM的组氨酸,约0.01%至约0.03% (v/w) 的聚山梨醇酯-80,约10mM至约250mM的氯化钠,及任选约0.25mg/ml至约0.75mg/ml的作为磷酸铝的铝,其中,该缀合物包含来自B族链球菌 (GBS) 血清型IV及至少一种选自由下列所组成的群组的另外的血清型的荚膜多糖:Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。

[0334] 免疫原性组合物的评估

[0335] 使用各种体外试验来评估本发明的免疫原性组合物的免疫原性。例如,将链球菌细胞、含有针对所研究的抗原的特异性抗体的经热灭活的血清及外源补体来源的混合物一起孵育以进行体外调理素分析。在孵育新鲜分离的多形核细胞 (PMN) 或分化的效应细胞诸如HL60及抗体/补体/链球菌细胞混合物期间进行调理吞噬。在调理吞噬时,以抗体和补体涂层的细菌细胞被杀死。从调理吞噬作用回收的幸存细菌的菌落形成单位 (cfu) 通过平皿接种该分析混合物来测定。报告的滴度为导致50%的细菌被杀死的最高稀释度的倒数,如通过与分析对照组相比较测定的。

[0336] 还可使用全细胞ELISA分析以评估抗原的体外免疫原性及表面暴露,其中,目标菌株 (无乳链球菌) 涂在盘 (例如96孔盘) 上,来自免疫化的动物的测试血清与细菌细胞反应。若对该测试抗原具有特异性的抗体与抗原的表面暴露的表位发生反应,此可通过本领域技术人员已知的标准方法进行检测。或者,可使用流式细胞术来测量荚膜多糖抗原的表面暴露及抗体 (包括单克隆抗体) 的特异性。

[0337] 然后,可在体内动物攻击模型中测试显示出所需的体外活性的抗原。于一些实施方案中,通过本领域技术人员已知的免疫化方法和途径 (例如鼻内、肠胃道外、口服、直肠、阴道、经皮、腹膜内、静脉内、皮下等等),使用免疫原性组合物将动物 (例如小鼠) 免疫化。用GBS免疫原性组合物将动物免疫化后,用无乳链球菌菌株攻击该动物,并分析其对链球菌感

染的抵抗力。

[0338] 于一实施方案中,用无乳链球菌免疫化并攻击无病原体的小鼠。例如,用在免疫原性组合物中的目标抗原的一种或多种剂量将小鼠免疫化。随后,用无乳链球菌攻击小鼠并在攻击后随时间监测存活。

[0339] 使用方法

[0340] 如本文中所使用的“免疫功能受损”指受试者在免疫系统的细胞和/或体液支线 (cellular and/or humoral arm) 方面遭受缺陷。因此,考虑了免疫功能缺陷的程度为从免疫过程中的轻微削弱至完全免疫抑制。

[0341] 术语“受试者”指哺乳动物、鸟、鱼、爬行动物 (reptile)、或任何其他动物。术语“受试者”还包括人类。术语“受试者”还包括家庭宠物。家庭宠物的非限制性实例包括:狗、猫、猪、兔、大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、天竺鼠、雪貂、鸟、蛇、蜥蜴、鱼、乌龟及青蛙。术语“受试者”还包括家畜。家畜的非限制性实例包括:羊驼、野牛、骆驼、牛、鹿、猪、马、骆马、骡、驴、绵羊、山羊、兔、驯鹿、牦牛、鸡、鹅及火鸡。

[0342] 如本文所使用的“治疗”(包括其变化,例如“医治”或“疗治”)指下列的任何一或多项:(i) 预防感染或再感染,如在传统疫苗中,(ii) 减轻症状的严重性或消除症状,及(iii) 实质上或完全消除所关注的病原体或状况。因此,治疗可预防性地(感染前)或治疗性地(感染后)起作用。本发明中,可使用预防性或治疗性治疗。根据本发明的一特定实施方案,提供了治疗(包括预防性地和/或治疗性地免疫化)宿主动物对抗微生物感染(例如细菌,诸如无乳链球菌)的组合物和方法。本发明的方法可用于赋予受试者预防性和/或治疗性免疫。本发明的方法还可在受试者中执行以用于生物医学研究应用。

[0343] 于另一方面中,本发明涉及通过给受试者施用有效量的本文所描述的免疫原性组合物来诱发受试者对GBS的免疫反应的方法。于一实施方案中,本发明涉及通过给受试者施用有效量的本文所描述的免疫原性组合物来预防或减轻受试者的与B族链球菌相关的疾病或状况的方法。于一方面中,本发明涉及使用本文所描述的免疫原性组合物作为药物。于一方面中,本发明涉及本文所描述的免疫原性组合物于诱发受试者对GBS的免疫反应的方法中的用途。于特定的实施方案中,该受试者为计划怀孕的女性或怀孕的女性。于一这样的实施方案中,该怀孕的女性为在其怀孕的第三妊娠中三个月半期(third trimester second half),诸如至少在妊娠20周或至少在妊娠27周。于一优选的实施方案中,怀孕的女性在妊娠27周至36周。于另一实施方案中,受试者为年长的成人诸如50岁或更年长的成人、65岁或更年长的成人及85岁或更年长的成人。于另一实施方案中,受试者是免疫功能受损的。于一方面中,受试者具有选自由下列所组成的群组的医学状况:肥胖、糖尿病、HIV感染、癌症、心血管疾病或肝脏疾病。于一优选的实施方案中,B族链球菌为无乳链球菌(*S. agalactiae*)。

[0344] 于一实施方案中,免疫原性组合物包含多糖-蛋白质缀合物,该多糖-蛋白质缀合物包含GBS血清型IV及至少一种选自由下列所组成的群组的另外的血清型:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于另一实施方案中,缀合物包含GBS血清型IV及至少两种选自由下列所组成的群组的另外的血清型:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于另外的实施方案中,缀合物包含GBS血清型IV及至少三种选自由下列所组成的群组的另外的血清型:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于另一实施方案中,缀合物包含GBS血清型IV及至少四种选自由下列所组成的群组的另外的血清型:血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、

VII、VIII及IX。于特定的实施方案中，缀合物包含GBS血清型Ia、Ib、II、III及IV。于另一实施方案中，缀合物包含GBS血清型IV及至少五种选自由下列所组成的群组的另外的血清型：血清型Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。于另一实施方案中，组合物包含GBS血清型V。于特定的实施方案中，缀合物包含GBS血清型Ia、Ib、II、III及V。于一优选的实施方案中，免疫原性组合物包含六种多糖-蛋白质缀合物，来自GBS血清型Ia、Ib、II、III、IV及V。本发明的一方面涉及不具有免疫干扰的免疫原性组合物。

[0345] 免疫原性组合物的免疫原性或有效量可通过执行剂量反应研究来测定，于该研究中，以逐步增加的免疫原性组合物量免疫化受试者并分析免疫反应以测定最佳剂量。研究的起始点可从动物模型中的免疫数据推断。剂量可根据受试者的特定情况而改变。该量可在常规试验中通过本领域技术人员已知的方式测定。

[0346] 给受试者施用适当剂量数的免疫有效量的免疫原性组合物，以引起免疫反应。剂量可根据受试者的特定状况诸如年龄和体重而变化。此量可在常规试验中通过本领域技术人员已知的方式测定。

[0347] 于一实施方案中，施用本发明的免疫原性组合物的患者显示出无乳链球菌带菌率(carriage rate)降低。从医疗需求观点来看，施用免疫原性组合物后这样的带菌率降低或作为非带菌者的时间间隔延长是显著的。例如，施用一个剂量本发明的免疫原性组合物后可评估带菌者的总体无乳链球菌带菌率的减少。例如，在施用免疫原性组合物前1天，可通过鼻、喉、腋下、直肠、会阴及阴道擦拭(swab)对一组年龄在18至50岁的成人进行带菌(carriage)的筛检，随后进行培养以测定其带菌状态(carriage state)。接着，给该组施用本发明的免疫原性组合物，而另一组则接受对照。在施用免疫原性组合物后的12周内持续每周进行鼻、喉、腋下、直肠、会阴及阴道擦拭，并且每月进行一次长达6个月，并与安慰剂组相比较。一个主要终点为以免疫化后3个月的周期比较施用免疫原性组合物和施用安慰剂后的患者的带菌率(carriage rate)。

[0348] 抗体

[0349] “抗体”为能够通过至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区的抗原识别位点特异结合至目标(诸如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等等)的免疫球蛋白分子。除非上下文另有说明，如本文所使用的此术语旨在不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体，还包括经基因工程处理的抗体(例如嵌合型、人源化和/或衍生化以改变效应功能、稳定性及其他生物活性)和其片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)和结构域抗体，包括鲨和骆驼抗体、和包含抗体部分的融合蛋白、多价抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体，只要其展现出期望的生物学活性)及如本文所描述的抗体片段，以及包括抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他经修饰的构型。抗体包括任何类别的抗体，诸如IgG、IgA、或IgM(或其子类别)，且该抗体不需为任何特定的类别。根据抗体重链的恒定结构域的氨基酸序列，免疫球蛋白可归为不同类别。人体的免疫球蛋白有五大类：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，其中有些可进一步分出子类别(同型)，例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型为众所周知。

[0350] “抗体片段”仅包括完整抗体的一部分，其中，该部分优选保留至少一种、优选为大部分或全部的通常与存在于完整抗体中的该部分相关的功能。

[0351] 本文所使用的抗体的“功能性活性”或“功能性抗体”指抗体至少可特异结合抗原。其他功能为本领域所已知且可包括能清除或杀死病原体(诸如通过调理素作用、ADCC、或补体介导的细胞毒性)的免疫系统的其他组分。抗原结合后,任何后续的抗体功能可通过抗体的Fc区介导。抗体调理吞噬分析(OPA)为一种体外分析,其设计用来测量以效应细胞(白细胞)进行体外Ig补体辅助的细菌杀死,从而模仿生物过程。抗体结合作用还可直接抑制其结合的抗原的生物学功能。于一些实施方案中,“功能性抗体”指在动物效力模型或证明抗体杀死细菌的调理吞噬杀死分析中通过杀死细菌测量的具有功能的抗体。

[0352] 于一方面中,本发明涉及特异结合本文所描述的多糖的经分离的抗体或其片段。如本文所使用的“经分离的”抗体指已鉴定且从其天然环境的组分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,且可包括酶、激素及其他蛋白质或非蛋白质性溶质。于例示性实施方案中,抗体将纯化至(1)超过抗体的95重量%(通过Lowry法测定),最优选为超过99重量%、(2)通过使用转杯式定序仪足以获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度、或(3)在还原或非还原条件下使用考马斯蓝或优选银染色时,通过SDS-PAGE分析时为均质性。经分离的抗体包括在重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一组分将不会存在。然而,经分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤制造。

[0353] “特异性结合”或“特异于”特定多糖或特定多糖上的表位的抗体为结合该特定多糖或特定多糖上的表位而实质上不与任何其他多糖或多糖表位结合的抗体。

[0354] 本文所使用的“标记”指直接或间接地与抗体缀合从而产生“经标记的”抗体的可检测的化合物或组合物。标记可本身为可检测的(例如放射性同位素标记或荧光标记),或者,在酶标记的情况下,可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0355] 本发明进一步提供特异地及选择性地结合本发明的免疫原性组合物的一种或多种抗原的抗体及抗体组合物。于一些实施方案中,抗体在给受试者施用本发明的免疫原性组合物时产生。于一些实施方案中,本发明提供针对本发明的免疫原性组合物的一种或多种抗原的纯化或分离的抗体。于一些实施方案中,本发明的抗体通过在动物效力模型中或经由调理吞噬杀死分析的杀死细菌测量为具有功能性。于一些实施方案中,本发明的抗体赋予受试者被动免疫力。本发明进一步提供编码本发明的抗体或抗体片段的多核苷酸分子、和产生本发明的抗体或抗体组合物的细胞或细胞系(诸如用于重组产生抗体的杂交瘤细胞或其他经基因工程处理的细胞系)及转基因动物(使用本领域技术人员所熟知的技术)。

[0356] 本发明的抗体或抗体组合物可用于治疗或预防受试者的与无乳链球菌相关的链球菌感染、疾病或状况,该方法包括产生多克隆或单克隆抗体制剂,及使用该抗体或抗体组合物赋予受试者被动免疫力。本发明的抗体还可用于诊断方法,例如检测本发明的免疫原性组合物的一种或多种抗原是否存在或进行定量。

[0357] 对重复结构(例如本发明的多糖)的抗体反应可显现出一些独特的特性。例如,重复单元的规律性可能意味分子量极不相同的抗原分子可结合至特异于该多糖的抗体。第二,较长的多糖的重复结构能够诱发T细胞无关性抗体反应。因此,当使用与具有T辅助细胞表位的蛋白质载体缀合的多糖时可同时刺激T细胞无关性及T细胞依赖性抗体反应。因此,可通过适当选择多糖尺寸及是否使用载体蛋白来修饰免疫反应。

[0358] 多克隆抗体

[0359] 于某些实施方案中,抗多糖抗体为多克隆抗体。如本文所定义的多克隆抗体指具有不同特异性的衍生自血清制剂且源自不同B细胞克隆的抗体的混合物。多克隆抗体的制备方法和定性为本领域已知。

[0360] 多克隆抗体通过施用一种或多种本文所描述的免疫原或免疫原性组合物和若需要时佐剂、缓冲剂和/或稀释剂的注射剂,而在受试者(例如哺乳动物)中引起。可用于制造特异性抗血清的动物物种很多。通常,用于制造抗糖多克隆抗血清的动物为非人灵长类、山羊、绵羊、兔、小鼠、大鼠、仓鼠、或天竺鼠。通常,具有或不具有佐剂的免疫原或免疫原性组合物通过多次注射来给哺乳动物注射。免疫原性物质可包括多糖、寡糖、本文所描述的多糖、多糖-蛋白质缀合物、或较大的免疫原组装体。通常,自第一次免疫化后2至6周开始,从免疫化的动物收集血液,使其凝结并收获血清。该血清含有来自免疫化动物的抗糖多克隆抗体,通常称为抗血清。

[0361] 单克隆抗体

[0362] 抗糖单克隆抗体可通过使用已知的杂交瘤技术制造。通常,制造单克隆抗体涉及首先以选定的免疫原(包括多糖、寡糖、本发明的多糖或多糖-蛋白质缀合物)将合适的目标动物宿主免疫化。若需要时,可包括佐剂、缓冲剂和/或稀释剂。免疫化以足以诱发B淋巴细胞制造或表达特异结合多糖或其缀合物的抗体的方式进行。或者,淋巴细胞在体外免疫化。

[0363] 然后,使用合适的融合剂(诸如聚乙二醇)使淋巴细胞与永生化细胞系融合,以形成杂交瘤细胞。淋巴细胞的来源决定该单克隆抗体为人或动物来源。一般而言,若需要人类来源的抗体和细胞时使用外周血淋巴细胞(“PBL”),而若需要非人的哺乳动物来源时,则使用脾细胞或淋巴结细胞。

[0364] 永生化细胞系通常为经转化的哺乳动物细胞,尤其是啮齿动物、牛和人类来源的骨髓瘤细胞。通常,使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。将杂交瘤细胞培养在合适的培养基中,优选为含有一种或多种抑制未融合的、永生化的细胞的生长或存活物质。例如,若亲代细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),用于杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基喋呤和胸苷(“HAT培养基”),这些物质将防止HGPRT缺乏型细胞的生长。

[0365] 永生化细胞系根据实际考虑的问题选择,诸如来源的物种、融合及生长特性。例如,合适的永生化细胞系为有效地融合、支持抗体通过所选定的抗体产生细胞的稳定且高水平表达及对培养基(诸如HAT培养基)敏感的那些。永生化细胞系的实例包括:鼠骨髓瘤系。人骨髓瘤及小鼠-人异源骨髓瘤细胞系还已被描述用于产生人单克隆抗体。

[0366] 单克隆抗体由杂交瘤细胞分泌到培养基中。然后,分析该培养基中是否存在能识别并结合多糖的单克隆抗体。由杂交瘤细胞制造的特定单克隆抗体的抗多糖结合特异性通过本领域所熟知的众多程序之一测定。例如,抗体结合特异性可通过免疫沉淀法、放射免疫分析(RIA)、蛋白质印迹法、酶联免疫吸附分析法(ELISA)、或表面等离子体共振(例如Biacore)测定。单克隆抗体所识别的精确表位通过表位定位(epitope mapping)测定。这样的技术和分析为本领域所熟知。

[0367] 鉴定具有所需特异性的产生抗体的杂交瘤细胞后,通过有限稀释法将该克隆株亚克隆并使用标准方法培养。用于此目的的合适的培养基包括,例如Dulbecco's Modified Eagle's Medium及RPMI-1640培养基。或者,该杂交瘤细胞在哺乳动物中以腹水形式在体内

生长。由亚克隆株分泌的单克隆抗体通过常规的免疫球蛋白纯化程序(诸如,例如蛋白质A-琼脂糖、羟磷灰石层析法、凝胶电泳、透析、或亲和层析)从培养基或腹水液体分离或纯化。

[0368] 或者,具有所需的特异性和来自所需的来源物种的抗体可通过使用噬菌体展示文库来获得。此外,特别适合用于产生和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实例可在本领域中找到。

[0369] 抗体用途

[0370] 于一方面中,本发明涉及本文所描述的免疫原性组合物用于制造GBS抗体和/或抗体片段的用途。本文所描述的多糖-蛋白质缀合物和/或由其产生的抗体可用于本领域技术人员已知的各种免疫诊断技术中,包括ELISA及微阵列相关技术。此外,这些试剂可用于评估抗体反应,包括,例如针对免疫原性多糖缀合物的血清抗体水平。本发明的分析方法学可涉及使用标记诸如荧光、化学发光、放射性、酶性标记,或染料分子,和/或用于直接或间接检测生物样本中的抗原或抗体与结合至固体支持物的对应抗体或抗原之间的复合物的第二免疫试剂。

[0371] 所产生的抗体或抗体片段还可用于针对抗链球菌感染的被动免疫疗法或预防疗法中。

[0372] 产生多糖的方法

[0373] 于另一方面中,本发明涉及用于制造本文所描述的多糖的方法。该方法包括培养GBS,并收集由该细菌产生的多糖。于一实施方案中,该GBS包括无乳链球菌。该细菌可为无乳链球菌的任何菌株。于一优选的实施方案中,该细菌为无乳链球菌的包覆株(encapsulated strain)。用于本发明的无乳链球菌菌株包括090、A909(ATCC登录号BAA-1138)、515(ATCC登录号BAA-1177)、B523、CJB524、MB4052(ATCC登录号31574)、H36B(ATCC登录号12401)、S40、S42、MB 4053(ATCC登录号31575)、M709、133、7357、PFEGBST0267、MB 4055(ATCC登录号31576)、18RS21(ATCC登录号BAA-1175)、S16、S20、V8(ATCC登录号12973)、DK21、DK23、UAB、5401、PFEGBST0708、MB 4082(ATCC登录号31577)、M132、110、M781(ATCC登录号BAA-22)、D136C(3)(ATCC登录号12403)、M782、S23、120、MB 4316(M-732;ATCC登录号31475)、M132、K79、COH1(ATCC登录号BAA-1176)、PFEGBST0563、3139(ATCC登录号49446)、CZ-NI-016、PFEGBST0961、1169-NT1、CJB111(ATCC登录号BAA-23)、CJB112、2603V/R(ATCC登录号BAA-611)、NCTC 10/81、CJ11、PFEGBST0837、118754、114852、114862、114866、118775、B 4589、B 4645、SS1214、CZ-PW-119、7271、CZ-PW-045、JM9130013、JM9130672、IT-NI-016、IT-PW-62及IT-PW-64。

[0374] 本文所描述的多糖可通过在适当的培养基中培养GBS来产生。合适的培养基可包括Columbia培养液。培养基可包含右旋糖、氯化血红素、和/或葡萄糖。优选地,培养基包含Columbia培养液和右旋糖。若无乳链球菌使用Columbia培养液和右旋糖培养,培养温度优选为20至40℃,优选为37℃。于一优选的实施方案中,细菌在有氧条件下培养。于另一优选的实施方案中,细菌培养12至60小时。

[0375] 可利用本领域已知的用来从培养物中收集目标物质的方法(诸如,例如加热、酶处理、离心、沉淀、以活性炭处理、和/或过滤)从所得的培养物收集多糖。(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;国际专利申请公开号WO 2008/118752)。于一实施方案中,将含有细菌和多

糖的培养物离心并以酶处理,诸如,例如以溶菌酶、核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、链霉蛋白酶、变溶菌素及其组合处理。例如,于一实施方案中,在所获得的上清液中加入适当的有机溶剂以沉淀蛋白质,并通过离心除去沉淀。然后,通过进一步在上清液中加入适当的有机溶剂以使多糖沉淀并可通过离心收集多糖。更具体地说,本文所描述的多糖可通过下述步骤获得:在已除去细菌的上清液中加入最终浓度为约25体积%的乙醇,通过离心移除含有蛋白质的沉淀物,进一步在其中加入最终浓度为约75体积%的乙醇,然后通过离心收集沉淀物。所得沉淀物可以用氮气干燥。将所得沉淀物再悬浮于Tris和0.05%叠氮化钠中。

[0376] 本发明的另一方面提供使用有机试剂(诸如衍生的羟胺化合物)来分离大部分完整高分子量CP、并保留N-和O-乙酰基的新颖方法。由于此方法不会裂解细胞,通过离心分离的CP最低限度地受胞内组分的污染且可导致较高的总产率。此外,由于B族抗原杂质具有多个磷酸二酯键,这些试剂将B族抗原杂质裂解成可通过渗滤容易除去的非常小的片段。

[0377] 于一实施方案中,CP通过使羟胺与包含产荚膜多糖的细菌的细胞糊状物反应来分离。于特定的实施方案中,该方法进一步包括离心步骤。于另一实施方案中,该方法进一步包括过滤步骤。于另一实施方案中,该产荚膜多糖的细菌选自由下列所组成的群组:无乳链球菌、肺炎链球菌、金黄葡萄球菌、脑膜炎奈瑟球菌、大肠杆菌、伤寒沙门杆菌、流感嗜血杆菌、克雷白氏肺炎杆菌、屎肠球菌及粪肠球菌。

[0378] 于本发明的一方面中,羟胺可为实施例2中的表2中所列出的那些。于一优选的实施方案中,羟胺选自由下列所组成的群组:二苄基羟胺;二乙基羟胺;羟胺;乙二胺;三乙四胺;1,1,4,7,10,10六甲基三乙四胺;及2,6,10,三甲基2,6,10三氮杂十一烷。

[0379] 于本发明的一方面中,羟胺的浓度为约5mM至约200mM,诸如约5mM至约150mM、约5mM至约100mM、约5mM至约75mM、约5mM至约50mM、约5mM至约25mM、约5mM至约10mM、10mM至约200mM、诸如约10mM至约150mM、约10mM至约100mM、约10mM至约75mM、约10mM至约50mM、约10mM至约25mM、约25mM至约200mM、约25mM至约150mM、约25mM至约100mM、约25mM至约75mM、约25mM至约50mM、约50mM至约200mM、约50mM至约150mM、50mM至约100mM及约50mM至约75mM。

[0380] 于另一方面中,反应的pH保持在约5.5至约9.5,诸如约5.5至约9.0、约5.5至约8.5、约5.5至约8.0、约5.5至约7.5、约5.5至约7.0、约5.5至约6.5、约6.0至约9.5、约6.0至约9.0、约6.0至约8.5、约6.0至约8.0、约6.0至约7.5、约6.0至约7.0、约6.5至约9.5、约6.5至约8.5、约6.5至约8.0、约6.5至约7.5、约7.0至约9.5、约7.0至约9.0、7.0至约8.5及约7.0至约8.0。

[0381] 于本发明的另一方面中,反应在约20°C至约85°C的温度发生,诸如约20°C至约80°C、约20°C至约75°C、约20°C至约70°C、约20°C至约65°C、约20°C至约60°C、约20°C至约55°C、约20°C至约50°C、约25°C至约85°C、约25°C至约80°C、约25°C至约75°C、约25°C至约70°C、约25°C至约65°C、约25°C至约60°C、约25°C至约55°C、约25°C至约50°C、约30°C至约85°C、约30°C至约80°C、约30°C至约75°C、约30°C至约70°C、约30°C至约65°C、约30°C至约60°C、约30°C至约55°C、约30°C至约50°C、约35°C至约85°C、约35°C至约80°C、约35°C至约75°C、约35°C至约70°C、约35°C至约65°C、约35°C至约60°C、约35°C至约55°C、约40°C至约85°C、约40°C至约80°C、约40°C至约75°C、约40°C至约70°C、约40°C至约65°C、约40°C至约60°C、约45°C至约85°C、约45°C至约80°C、约45°C至约75°C、约45°C至约70°C、约45°C至约65°C、约50°C至约85°C、约50°C至约80°C、约50°C至约75°C、约50°C至约70°C、约55°C至约85

℃、约55℃至约80℃、约55℃至约75℃、约60℃至约85℃及约65℃至约85℃。

[0382] 于另一方面中,反应时间为约10小时至约90小时,诸如约10小时至约85小时、约10小时至约80小时、约10小时至约75小时、约10小时至约70小时、约10小时至约60小时、约10小时至约50小时、约10小时至约40小时、约10小时至约30小时、约10小时至约25小时、约10小时至约20小时、约10个小时至约15小时、约15小时至约90小时、约15小时至约85小时、约15小时至约80小时、约15小时至约75小时、约15小时至约70小时、约15小时至约60小时、约15小时至约50小时、约15小时至约40小时、约15小时至约30小时、15小时至约20小时、诸如约20小时至约90小时、约20小时至约85小时、约20小时至约80小时、约20小时至约75小时、约20小时至约70小时、约20小时至约60小时、约20小时至约50小时、约20小时至约40小时、约20小时至约30小时及约20小时至约25小时。

[0383] 或者,于本发明的另一实施方案中,多糖是经化学方式合成的。多糖可根据常规方法通过化学方法合成。

[0384] 于本发明的另一实施方案中,多糖在替代宿主中克隆并表达用于产生多糖的生物合成途径后通过表达制造。例如,宿主细胞可经修饰以产生具有类似于本文所描述的多糖的结构的多糖,其中,在该宿主细胞中产生的多糖的重复单元与本文所描述的多糖的重复单元部分一致。例如,与本文所描述的多糖的重复单元相比较,若多糖的重复单元具有缺失的分支、尺寸上为异质性的和/或在支化结构(branching arrangement)中为异质性的,该多糖为结构上类似于本文所描述的多糖。优选地,该宿主细胞为细菌宿主细胞。

实施例

[0385] 下列实施例展示本发明的一些实施方案。然而,应理解,这些实施例仅用于说明,并非意欲完全限定本发明的条件和范围。应理解的是当已给定典型的反应条件(例如温度、反应时间等等)时,还可使用高于及低于所指定范围的条件,虽然通常较不方便。除非另有指明,本文所提及的所有份数及百分比都是按重量计且所有温度以摄氏温度表示。

[0386] 此外,除非另有详细说明,下列实施例使用本领域技术人员所熟知及常规的标准技术进行。如上文所述,下列实施例用于举例说明且不应以任何方式限制本发明的范围。

[0387] 实施例1:制造具有脱-O-乙酰化多糖的多糖-蛋白质缀合物

[0388] 在pH受控制的限定培养基中将各血清型的无乳链球菌菌株在深层培养(submerged culture)中发酵。所使用的程序和培养基通过实验优化且是先前 von Hunolstein, C. 等人, Appl. Micro. Biotech. 38 (4): 458-462 (1993) 中所描述的基本技术的延伸。通过NaOH处理从细胞移出荚膜多糖。澄清(clarification)后,进行一系列的UF/DF、沉淀及碳滤(carbon filtration)步骤来产生纯化的多糖。参见,例如美国专利号8,652,480。使用还原性胺化化学(reductive amination chemistry)来使经活化的多糖与CRM₁₉₇缀合。参见,例如美国专利号5,360,897。

[0389] 实施例2. 分离O-乙酰化多糖

[0390] 将发酵液(fermentation broth) (1.2L) 热杀灭(heat killing) 和离心后所获得的来自GBS荚膜多糖(CP) 血清型Ia的细胞糊状物重新悬浮于175mL的25mM磷酸钾缓冲剂(25mM, pH 6.9) 中。将该悬浮液与羟胺O-磺酸水溶液(aqueous hydroxyl amine O-sulfonic acid solution) 混合,至最终浓度为10mM。该悬浮液的pH经测定为约5.8。将该悬

浮液在55℃搅拌72小时。之后,将悬浮液在约10,000rpm离心并收集上清液。分析含有经粗裂解的CP (crude cleaved CP) 的上清液的分子量和产率。采用30kDa MWC0膜,使用注射用水(WFI)将剩余部分通过渗滤(diafiltration)纯化。通过尺寸排阻层析法(size exclusion chromatography)结合多角度光散射检测器(multiangle light scattering detector) (SEC-MALS)进一步分析该纯化的多糖的分子量(表1)。

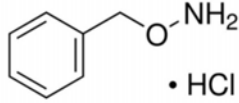
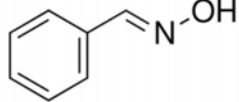
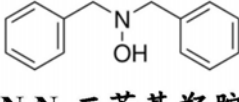
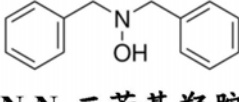
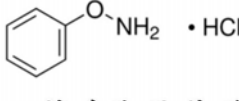
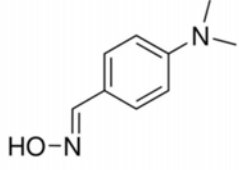
[0391] 表1.通过渗滤纯化GBS血清型Ia

样本	Mw (kDa)	多糖分散性 (PD)
未加工的	340	1.2
纯化的多糖	320	1.3

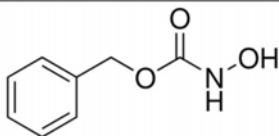
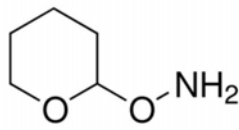
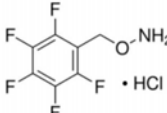
[0393] 使用上述方法筛选数种羟胺(经氮和氧取代的化合物二者)的活性。通过未加工的上清液(crude supernatant)的凝胶渗透层析(gel permeation chromatography)结合多角度光散射检测(multi-angle light scattering detection) (GPC-MALS),使用折射率(RI)反应及0.135的比折射率增量(dn/dc)值的平方来计算产率。产率取决于羟胺的类型和条件(诸如浓度、温度和反应时间)的优化(见表2)。一般而言,增加的羟胺浓度、较高的温度及较长的反应时间导致较高的产率。

[0394] 表2.各种羟胺的筛选和GBS荚膜多糖血清型Ia的条件优化

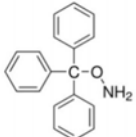
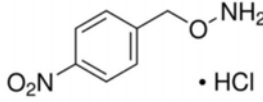
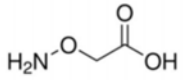
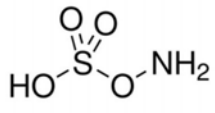
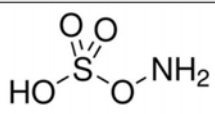
[0395]

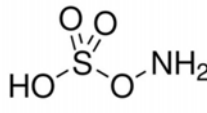
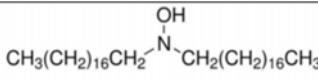
实验编号	试剂	浓度 (Mm)	温度 (°C)	时间 (hr)	产率 /1L 发酵	多糖 Mw (kDa)	多糖分散性 (PD)
1	 O-苄基羟胺盐酸盐	10	55	72	42	2240	1.2
2	 苯甲醛肟	10	55	72	68	1400	1.2
3	 N,N-二苄基羟胺	10	55	72	101	980	1.3
4	 N,N-二苄基羟胺	50	55	17	320	590	1.3
5	 O-苄基羟胺盐酸盐	10	55	72	109	850	1.3
6	 4-(二甲胺基) 苯甲 醛肟	10	55	72	90	1400	1.2

[0396]

7	 苄基羟胺甲酸酯	10	55	84	323	1835	1.5
8	 O-(四氢-2H-吡喃-2-基)羟胺	10	55	84	304	1270	1.4
9	 O-((全氟苯基)甲基)羟胺	10	55	84	185	1330	1.6

[0397]

10	 O-三苯甲基羟胺	10	55	84	371	1275	1.7
11	 O-(4-硝苄基)羟胺盐酸盐	10	55	84	190	3500	1.3
12	 2-(胺氧基)乙酸盐 酸	10	55	84	252	2600	1.2
13	 (胺氧基)磺酸	10	55	84	463	490	1.4
14	 (胺氧基)磺酸	50	55	17	460	270	1.2

	 (胺氧基)磷酸	100	23	21	240	500	1.2
[0398]	 N,N-二十八烷基羟胺	10	55	84	380	4700	1.7

[0399] 发现经取代及未经取代的羟胺非常有效地使GBS荚膜多糖从细胞壁中释放。此方法使得分离出高分子量CPS并保存N-和O-乙酰基。在筛选的数种化合物中,二苄基羟胺被认为是最有效的。数据显示于表3中([二苄基羟胺]-50mM;pH-7至8;温度-50℃;时间-24小时)。

[0400] 表3. 使用二苄基羟胺的GBS CP释放数据

[0401]	GBS类型	Ia	Ib	III
	多糖释放产率	86%	81%	46%
	总纯化产率	63%	54%	30%
	分子量(Mw)	330kDa	212kDa	171kDa
	O-乙酰化(NMR)	NA	31%	37%
	N-乙酰基(NMR)	106%	104%	87%

[0402] NA-血清型Ia是未O-乙酰化的

[0403] 由于二苄基羟胺在水中的溶解度差,羟胺的易溶于水且具有类似二苄基羟胺或更高的活性的替代衍生物是想要的。筛选一些化合物后,二乙基羟胺被认为是好的选择。数据显示于表4中([二乙基羟胺]-100mM;pH-7至8;温度-60℃;时间-19小时)。

[0404] 表4. 使用二乙基羟胺的GBS CP释放数据

[0405]	GBS 类型	Ia	Ib	III
	多糖释放产率%	100	94	59

[0406]	分子量(Mw)	890 kDa	560 kDa	309 kDa
--------	----------------	----------------	----------------	----------------

[0407] 羟胺(NH₂-OH)还被发现能有效地使CPS从细胞壁裂解。数据显示于表5中([羟胺]-100mM;pH-7至7.5;温度-65℃;时间-17小时)。在血清型III方面,17小时后的产率为54%;然而,3天半后的产率增加至70%。

[0408] 表5. 使用羟胺的GBS CP释放数据

	GBS 类型	Ia	III
[0409]	多糖释放产率%	100	54
	分子量(Mw)	1160 kDa	500 kDa

[0410] 用于从细胞释放GBS荚膜多糖的寡胺的筛选

[0411] 羟胺及其经取代的化合物被发现能非常有效地使荚膜多糖从GBS细胞壁裂解。然而,它们被发现对血清型II和V较不有效。因此,对寡胺(oligoamine)进行测试,因为相信它们由于具有多个胺官能性(amine functionality)而可更为活跃。

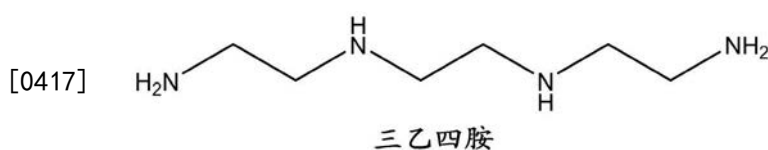
[0412] 乙二胺(ethylene diamine)被发现能有效地使荚膜多糖从所有血清型释放。数据显示于表6中([乙二胺]-50或100mM;pH 8.0;16小时;80℃;25mM EDTA)。

[0413] 表6:使用乙二胺的GBS CP释放数据

[0414]	GBS血清型	回收(%)	Mw (kDa)
	Ia	96%	242
	Ib	83%	225
	II	30%	76
	III	68%	94
	V	30%	235

[0415] 使用血清型Ia及V细胞糊状物测试其他代表性寡胺的活性,但还发现对血清型V较不有效。数据显示于表7([三乙四胺(triethylenetetramine)]-100mM;pH-8.9;温度-60℃;时间-15小时)、表8([1,1,4,7,10,10六甲基三乙四胺]-10mM;pH-6.3;温度-60℃;时间-20小时)及表9([2,6,10,三甲基2,6,10三氮杂十一烷]-10mM;pH-7至8;温度-60℃;时间-19小时)。

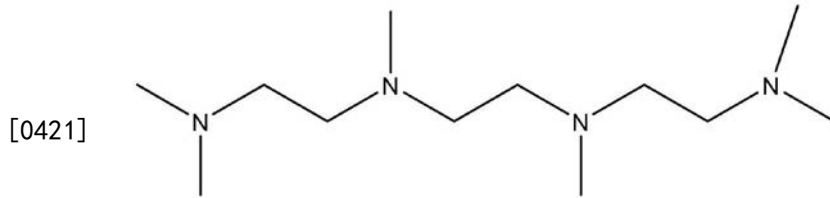
[0416] 表7.使用三乙四胺的GBS CP释放数据



[0418]	GBS类型	Ia	V
	多糖释放产率%	100	2.5天后~10
	分子量(Mw)	1280	nd

[0419] nd-未测定

[0420] 表8.使用1,1,4,7,10,10六甲基三乙四胺的GBS CP释放数据



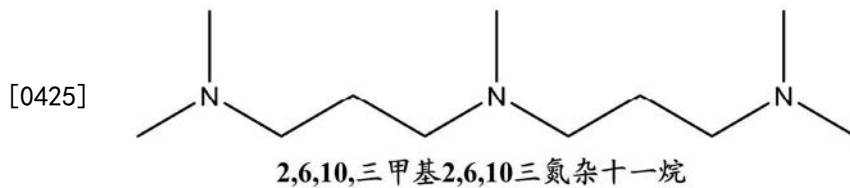
1,1,4,7,10,10六甲基三乙四胺

[0422]

GBS类型	Ia	V
多糖释放产率%	100	~1%
分子量 (Mw)	980	nd

[0423] nd-未测定

[0424] 表9. 使用2,6,10,三甲基2,6,10三氮杂十一烷的GBS CP释放数据



2,6,10,三甲基2,6,10三氮杂十一烷

[0426]

GBS类型	Ia	V
多糖释放产率%	100	~1%
分子量 (Mw)	1100	nd

[0427] nd-未测定

[0428] 实施例3. 通过还原性胺化进行GBS荚膜多糖的缀合

[0429] 活化多糖 (Activating Polysaccharide)

[0430] 通过依序加入计算量的500mM磷酸钾缓冲剂 (pH 6.0) 及注射用水 (WFI), 在100mM磷酸钾缓冲剂 (pH 6.0±0.5) 中进行多糖氧化反应以产生最终浓度为2.0g/L的多糖。若需要时, 将反应pH调整为约pH 6.0。调节pH后, 将反应温度调节成23℃。通过加入约0.25摩尔当量的高碘酸钠来起始氧化反应。氧化反应在5±3℃进行约16小时。

[0431] 使用5K MWC0超滤盒 (5K MWC0 ultrafiltration cassette) 将经活化的多糖浓缩和渗滤 (diafiltration)。针对20倍渗滤体积 (diavolume) 的注射用水 (WFI) 进行渗滤。然后, 将纯化的经活化的多糖储存于5±3℃。纯化的经活化的多糖的表征可通过除其它以外 (i) 比色检验测定糖浓度; (ii) 比色检验测定醛浓度; (iii) 氧化程度 (degree of oxidation); 以及 (iv) 通过SEC-MALLS测定分子量来进行。

[0432] 该经活化的多糖的氧化程度 (DO=糖重复单元的摩尔数/醛的摩尔数) 依下述测定:

[0433] 通过各种比色法 (colorimetric method) 测定糖重复单元的摩尔数, 例如, 通过使用蒽酮 (Anthrone) 方法对于蒽酮方法, 先通过硫酸和热的作用将多糖分解成单糖。蒽酮试剂与己糖 (hexose) 反应以形成黄绿色混合物, 其吸亮度 (absorbance) 在625nm以分光光度测量读取。在分析范围内, 吸光度与己糖的存在量成正比。

[0434] 还使用MBTH比色法同时测定醛的摩尔数。MBTH分析涉及通过使醛基 (来自给定的样本) 与3-甲基-2-苯并噻唑酮腙 (3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone) (MBTH分析试剂) 反应来形成吡嗪 (azine) 化合物。过量的3-甲基-2-苯并噻唑酮腙氧化形成反应性阳离

子(reactive cation)。反应性阳离子与吡嗪反应以形成蓝色发色团(chromophore)。然后在650nm以分光光度测量读取所形成的发色团。

[0435] 混合经活化的多糖与蔗糖赋形剂,并且冷冻干燥

[0436] 以每克经活化的多糖25克蔗糖的比率将经活化的多糖与蔗糖混合。然后将经混合的混合物的瓶子冷冻干燥。冷冻干燥后,将含有冷冻干燥的经活化的多糖的瓶子储存在 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 。将计算量的CRM₁₉₇蛋白分别进行壳式冷冻(shell-frozen)和冷冻干燥。将冷冻干燥的CRM₁₉₇储存在 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 。

[0437] 重构冷冻干燥的经活化的多糖和载体蛋白

[0438] 冷冻干燥的经活化的多糖在无水二甲亚砜(DMSO)中重构(reconstitute)。在多糖完全溶解时,将等量的无水DMSO加入冷冻干燥的CRM₁₉₇中以进行重构(reconstitution)。

[0439] 缀合(Conjugating)及封端(Capping)

[0440] 将重构的经活化的多糖与重构的CRM₁₉₇在反应容器中合并,接着使其充分混合以在使用氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride)起始缀合之前获得澄清的溶液。反应溶液中的最终多糖浓度为约1g/L。通过在反应混合物中加入1.0至1.5MEq的氰基硼氢化钠并在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 孵育20至48小时来起始缀合反应(conjugation)。通过加入2MEq的硼氢化钠(NaBH_4)将未反应的醛封端来终止缀合反应。使封端反应在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 持续进行 3 ± 1 小时。

[0441] 纯化缀合物

[0442] 在准备通过使用100-300K MWCO膜的切向流过滤(tangential flow filtration)纯化时,以冷却的5mM琥珀酸盐-0.9%盐水(pH 6.0)将缀合物溶液稀释1:10。

[0443] 将稀释的缀合物溶液通过 $5\mu\text{m}$ 过滤器,并使用5mM琥珀酸盐/0.9%盐水(pH 6.0)作为介质进行渗滤。渗滤完成后,将缀合物滞留物(conjugate retentate)转移通过 $0.22\mu\text{m}$ 过滤器。以5mM琥珀酸盐/0.9%盐水(pH 6)进一步稀释缀合物至约0.5mg/mL的目标糖浓度。或者,使用20mM组氨酸-0.9%盐水(pH 6.5),通过利用100至300KMWCO膜的切向流过滤来纯化缀合物。完成最后的 $0.22\mu\text{m}$ 过滤步骤,以获得免疫原性缀合物。

[0444] 实施例4:改变的缀合条件对GBS多糖-CRM₁₉₇缀合物的影响

[0445] GBS血清型Ia、Ib、II、III、IV及V缀合物通过刻意改变高碘酸盐氧化(periodate oxidation)/还原胺化化学(reductive amination chemistry)(PO/RAC)条件(包括用于试剂的溶剂(水性介质相对于DMSO)、改变初始多糖中的唾液酸水平及氧化程度/糖表位修饰)来产生。一般而言,使用DMSO作为溶剂所制造的缀合物被发现相较于使用水性介质所制造的缀合物具有较低水平的未反应(游离)的多糖、较高的缀合物分子量及较高的糖/蛋白质比率。

[0446] 产生具有较低水平的未反应(游离)的多糖的缀合物的缀合方法是有利且优选的。众所周知,高水平的未反应(游离)的多糖可能引起过度的T细胞无关性免疫反应(T-cell independent immune response),这可能会稀释由多糖-蛋白质缀合物产生的T细胞依赖性反应(T-cell dependent response),从而减低因缀合物产生的免疫原性反应。

[0447] 通过本领域已知的方法将选择的GBS多糖化学地去唾液酸化(chemically desialylate)(参见Chaffin,D.O,等人,J Bacteriol 187(13):4615-4626(2005))以生成缀合物变体(conjugate variant),以测定去唾液酸化%对免疫原性的影响。去唾液酸化超过约40%(即,唾液酸水平少于约60%)对免疫原性具有负面影响。

[0448] 同样地,在大多数情况中,氧化程度低于约5%或糖表位修饰(saccharide epitope modification)超过约20%对免疫原性有负面影响。因为氧化反应通过荚膜多糖上的唾液酸发生,结果似乎指出糖表位修饰超过约20%会减少唾液酸含量,这导致免疫原性降低。

[0449] 相反地,具有各种糖/蛋白质比或多糖分子量的缀合物可在小鼠中产生免疫原性反应,这表明关于这些特性的接受标准(acceptance criteria)的范围相当宽。

[0450] 还使用替代的化学途径生成另外的缀合物变体(conjugate variant)。一种替代化学包括使多糖与羰基双三唑(carbonylditriazole) (CDT) 反应、并在DMSO中进行缀合反应,以生成缀合物。于另一替代化学中,通过使用TEMPO[(2,2,6,6-四甲基哌啶-1-基)氧基((2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl) oxy)]试剂(代替高碘酸钠)来氧化多糖,再在DMSO中利用还原性胺化化学(TEMPO/RAC)进行缀合,以生成缀合物,详见上述实施例3。通过这些替代化学所生成的全部缀合物被证明在小鼠内具免疫原性,这表明除了PO/RAC外的替代化学途径的合适性。然而,一些缀合化学使用某些血清型执行时较其他血清型好。

[0451] 按照Nanra, J.S., 等人, Hum. Vaccin. Immunother., 9(3):480-487 (2013) 进行OPA, 但以B族链球菌分离株(group B streptococcal isolate)代替金黄色葡萄球菌分离株(Staphylococcus aureus isolate), 并省略预调理(preopsonization)步骤。三剂量后(PD3)OPA滴度(OPA titer)被提供为来自一组10至20只小鼠(以各自的缀合物的每剂量中的1mcg/ml来免疫化)的几何平均(geomean)。

[0452] GBS血清型Ia多糖-CRM₁₉₇缀合物

[0453] 使用PO/RAC及DO为16至17(约6%糖表位修饰)的活化多糖生成的缀合物显示出具免疫原性(缀合物1和3)。然而,使用DO为5.4的活化多糖(约19%糖表位修饰)对免疫原性具有负面影响(缀合物2)。同样地,50%的唾液酸水平几乎不产生免疫原性反应(缀合物4)。结果显示于表10中。

[0454] 表10. 改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件对GBS血清型Ia-CRM₁₉₇缀合物的影响

缀合物	1	2	3	4
溶剂	DMSO	DMSO	水性	DMSO

	多糖 MW (kDa)	190	190	190	190
	在初始多糖中的% 唾液酸	>95	>95	>95	50
	%修饰	6	19	6	6
	氧化程度(DO)	16.8	5.4	16.2	16.4
[0456]	糖/蛋白质比	0.8	0.8	2.0	1.1
	%游离糖	<5	<5	26	<5
	通过 SEC-MALLS 测量的缀合物 MW, kDa	6040	15390	806	3763
	OPA 滴度	300	172	406	68

[0457] 使用替代的缀合化学和缀合物分子特性生成另外的缀合物变体(结果显示于表11中)。缀合物5通过使多糖与羰基双三唑(carbonylditriazole) (CDT) 反应生成,并且在DMSO中进行缀合反应。缀合物6通过使用TEMPO试剂(代替高碘酸钠)将多糖氧化,随后在DMSO中利用还原性胺化化学进行缀合来生成,详见上述实施例3。缀合物7通过PO/RAC并刻意改变缀合参数以产生具有高糖/蛋白质比 (SPR) 的缀合物来生成。缀合物8使用具有低MW (40kDa) 的多糖,通过PO/RAC生成。所有这些缀合物均证明在小鼠中具免疫原性,这表示除了高碘酸盐氧化(periodate oxidation)/还原性胺化化学(reductive amination chemistry)外的替代(alternative)缀合化学(conjugation chemistry)以及替代(alternative)缀合物特性(conjugate attribute) (诸如初始多糖的SPR及低MW) 的合适性。

[0458] 表11.改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件和替代化学选择对GBS血清型Ia-CRM₁₉₇缀合物的影响

	缀合物	5	6	7	8
	缀合化学	CDT	TEMPO/RAC	PO/RAC	PO/RAC
[0459]	多糖 MW (kDa)	383	220	383	40
	在初始多糖中的%	>95	>95	>95	>95

	唾液酸			
	%修饰	N/A	11	6
	氧化程度(DO)	N/A	9.2	17.5
[0460]	糖/蛋白质比	1.2	0.9	2.5
	%游离糖	12.5	11.2	13.3
	通过 SEC-MALLS 测量的 MW, kDa	7128	1678	4347
	OPA 滴度	1028	371	303
				1484

[0461] GBS血清型Ib多糖-CRM₁₉₇缀合物

[0462] 在DMSO中,使用PO/RAC及DO为15.8(约6%糖表位修饰)的活化多糖生成的缀合物显示出在小鼠中具免疫原性(缀合物9和11)。当所有其他缀合分子特性相似(缀合物9和11,分别地)时,在DMSO中通过PO/RAC生成的缀合物比在水性介质中通过PO/RAC生成的缀合物稍微更具有免疫原性。然而,使用DO为4.7(约21%糖表位修饰)的活化多糖对免疫原性具有负面影响(缀合物10)。在使用PO/RAC及95%去唾液酸化(5%唾液酸水平)多糖所生或的缀合物(缀合物12)中,免疫原性几乎完全被废除,只有极少数有反应。结果显示于表12中。

[0463] 表12.改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件对GBS血清型Ib-CRM₁₉₇缀合物的影响

	缀合物	9	10	11	12
	溶剂	DMSO	DMSO	水性	DMSO
	多糖 MW (kDa)	120	120	120	120
[0464]	在初始多糖中的% 唾液酸	>95	>95	>95	5
	%修饰	6	21	6	9
	氧化程度(DO)	15.8	4.7	15.8	11.7
	糖/蛋白质比	1.1	1	2	1.1
	%游离糖	11	<5	33	7
[0465]	通过 SEC-MALLS 测量的 MW, kDa	2608	7302	381	8418
	OPA 滴度	417	159	278	62

[0466] 使用替代的缀合化学和缀合分子特性生成另外的缀合物变体(结果显示于表13中)。缀合物13使用在初始多糖(initial polysaccharide)中具有低唾液酸化(65%)的多糖通过PO/RAC生成。缀合物14通过PO/RAC并刻意改变缀合参数以产生具有高糖/蛋白质比(saccharide/protein ratio) (SPR)的缀合物来生成。缀合物15通过使多糖与羰基双三唑

(CDT) 反应来生成并在DMSO中进行缀合反应。缀合物16通过使用TEMPO试剂(代替高碘酸钠)将多糖氧化,随后在DMSO中利用还原性胺化化学(TEMPO/RAC)进行缀合来生成,详见上述实施例3。所有这些缀合物均证明在小鼠中具免疫原性,这表示除了高碘酸盐氧化/还原性胺化化学外的替代缀合化学以及替代缀合物特性(诸如初始多糖的SPR及低MW)的合适性。

[0467] 表13.改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件和替代化学选择对GBS血清型Ib-CRM₁₉₇缀合物的影响

缀合物	13	14	15	16
缀合化学	PO/RAC	PO/RAC	CDT	TEMPO/RAC
多糖 MW (kDa)	141	141	141	150
在初始多糖中的%唾液酸	65	>95	>95	>95
%修饰	8	7	N/A	13
[0468] 氧化程度(DO)	12	14.7	N/A	7.8
糖/蛋白质比	1.06	2.1	1.29	0.85
%游离糖	<5%	16%	21	7
通过SEC-MALLS测量的MW, kDa	5345	1594	2760	1400
OPA滴度	246	118	287	548

[0469] GBS血清型II多糖-CRM₁₉₇缀合物

[0470] 使用PO/RAC及DO为4至15(约7至23%的糖表位修饰)的活化多糖生成的缀合物显示出小鼠具免疫原性(缀合物17至20)。使用PO/RAC及唾液酸化程度为74%(26%去唾液酸化)的多糖所生成的缀合物也显示出免疫原性(缀合物20)。结果显示于表14。

[0471] 表14.改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件对GBS血清型II-CRM₁₉₇缀合物的影响

	缀合物	17	18	19	20
	溶剂	DMSO	DMSO	水性	DMSO
	多糖 MW (kDa)	95	95	109	109
	在初始多糖中的% 唾液酸	>95	>95	>95	74
[0472]	%修饰	8	23	10	7
	氧化程度(DO)	12.6	4.3	9.8	15.2
	糖/蛋白质比	0.84	0.90	1.13	0.63
	%游离糖	16	<5	6	<5
	通过 SEC-MALLS 测量的 MW, kDa	3600	4650	1611	6140
	OPA 滴度	610	967	2149	684

[0473] 使用替代的缀合化学和缀合分子特性生成另外的缀合物变体(结果显示于表15中)。缀合物21和22通过PO/RAC并刻意改变缀合参数以分别产生具有低的和高的糖/蛋白质比(SPR)的缀合物来生成。缀合物23通过使用TEMPO试剂(代替高碘酸钠)将多糖氧化,随后在DMSO中利用还原性胺化化学进行缀合来生成,详见上述实施例3。缀合物24通过使多糖与羰基双三唑(CDT)反应并在DMSO中进行缀合反应来生成。所有这些缀合物均证明在小鼠中具免疫原性,这表示除了高碘酸盐氧化/还原性胺化化学外的替代的(alternative)缀合化学(conjugation chemistry)以及替代的(alternative)缀合物特性(conjugate attribute)(诸如SPR)的合适性。

[0474] 表15.改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件和替代化学选择对GBS血清型II-CRM₁₉₇缀合物的影响

缀合物	21	22	23	24
缀合化学	PO/RAC	PO/RAC	TEMPO/RAC	CDT
多糖 MW (kDa)	109	109	109	109
在初始多糖中的% 唾液酸	>95	>95	>95	>95
%修饰	10	10	11	N/A
氧化程度(DO)	10	10	8.8	N/A
糖/蛋白质比	0.61	2.03	0.66	0.87
%游离糖	<5	25	<5%	12
通过 SEC-MALLS 测量的 MW, kDa	8850	1480	5270	603
OPA 滴度	3117	891	2167	631

[0475] GBS血清型III多糖-CRM₁₉₇缀合物

[0476] 在DMSO中使用PO/RAC及DO为10至17(约6至10%糖表位修饰)的活化多糖生成的缀合物显示出在小鼠中具免疫原性(缀合物25及30)。其DO为2.9(约34%糖表位修饰)或具有高的糖/蛋白质比(2.1)的缀合物(分别为缀合物26和27)显示出免疫原性相对低。使用PO/RAC及唾液酸化程度(sialylation level)为81%(19%去唾液酸化(desialylated))的多糖所生成的缀合物显示出具免疫原性(缀合物30)。然而,使用唾液酸化程度为58%(42%去唾液酸化)的多糖所生成的缀合物显示出差的免疫原性(缀合物29)。当所有其他缀合物分子的特性相似(分别,缀合物25和28)时,在DMSO中通过PO/RAC生成的缀合物比在水性介质中通过PO/RAC生成的缀合物稍微更具有免疫原性。结果显示于表16。

[0477] 表16.改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件对GBS血清型III-CRM₁₉₇缀合物的影响

[0478]	缀合物	25	26	27	28	29	30
--------	------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

溶剂	DMSO	DMSO	DMSO	水性	DMSO	DMSO
多糖 MW (kDa)	263	358	358	358	355	358
在初始多糖中的%唾液酸	>95	>95	>95	>95	58	81
%修饰	10	34	6	8	6	6
氧化程度(DO)	10	2.9	17	13	16	17
糖/蛋白质比	1.1	1.2	2.1	1.7	1.15	1.19
%游离糖	10	7	24	19	<5	<5
通过 SEC-MALLS 测量的 MW, kDa	2396	14340	3066	1885	5110	4643
OPA 滴度	701	57	252	248	137	505

[0479]

[0480] 使用替代的缀合化学和缀合分子特性生成另外的缀合物变体(结果显示于表17中)。缀合物31至35通过PO/RAC并刻意改变缀合参数以产生具有不同MW的缀合物而生成。缀合物36通过使多糖与羰基双三唑(CDT)反应并在DMSO中进行缀合反应来生成。缀合物37通过使用TEMPO试剂(代替高碘酸钠)将多糖氧化,随后在DMSO中利用还原性胺化化学进行缀合来生成,详见上述实施例3。所有这些缀合物均证明在小鼠中具免疫原性,这表示除了高碘酸盐氧化/还原性胺化化学外的替代缀合化学以及替代缀合物特性(诸如MW)的合适性(suitability)。与以2.9的DO(约34%糖表位修饰)生成的缀合物(上述表16中的缀合物26)相比较,使用低至5的DO(约20%糖表位修饰)生成的缀合物在小鼠中仍具免疫原性(表17中,缀合物32)。

[0481] 表17. 改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件和替代化学选择对GBS血清型III-CRM₁₉₇缀合物的影响

缀合物	31	32	33	34	35	36	37
缀合化学	PO/R	PO/R	PO/R	PO/R	PO/R	CD	TEMPO/

	AC	AC	AC	AC	AC	T	RAC
多糖 MW (kDa)	353	350	355	50	349	355	355
在初始多糖中的%唾液酸	>95	>95	>95	>95	>95	>95	>95
%修饰	6	5	6	8	20	N/A	10
氧化程度 (DO)	17	19	17	12	5	N/A	10
糖/蛋白质比	0.8	1.1	1.2	0.9	1.0	1.16	0.96
%游离糖	<5	<5	<5	20	<5	<5	<5
通过 SEC-MALLS 测量的 MW, kDa	9278	5291	4982	1201	8024	10740	3415
OPA 滴度	646	204	176	441	1116	448	336

[0484] GBS血清型IV多糖-CRM₁₉₇缀合物

[0485] 使用PO/RAC及其DO为6.9至14.2(约7至14%糖表位修饰(saccharide epitope modification))的活化多糖(activated polysaccharide)生成的缀合物显示出在小鼠中具免疫原性(immunogenic)(缀合物38至41)。使用PO/AC及其唾液酸化程度为60%(40%去唾液酸化)的多糖所生成的缀合物也显示出具免疫原性(缀合物41)。结果显示于表18中。

[0486] 表18. 改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件对GBS血清型IV-CRM₁₉₇缀合物的影响

缀合物	38	39	40	41
溶剂	DMSO	DMSO	水性	DMSO

[0488]	多糖 MW (kDa)	143	143	133	121
	在初始多糖中的% 唾液酸	>95	>95	>95	60
	%修饰	7	14	7	8
	氧化程度(DO)	14.2	6.9	13.6	13.2
	糖/蛋白质比	0.80	0.91	1.92	1.0
	%游离糖	<5	<5	33.4	<5
	通过 SEC-MALLS 测量的 MW, kDa	8268	10210	657	5691
	OPA 滴度	3140	2379	3080	6708

[0489] 使用替代的缀合化学和缀合物分子特性生成另外的缀合物变体 (conjugate variant)。结果显示于表19中。缀合物42和45通过PO/RAC并刻意改变缀合参数以产生分别具有高DO (较低氧化水平 (oxidation level)) 及高SPR的缀合物来生成。缀合物43通过使多糖与羰基双三唑 (CDT) 反应并在DMSO中进行缀合反应来生成。缀合物44通过使用TEMPO试剂 (代替高碘酸钠) 将多糖氧化, 随后在DMSO中利用还原性胺化化学进行缀合来生成, 详见上述实施例3。所有血清型IV缀合物均显示出在小鼠中具免疫原性, 这表示除了高碘酸盐氧化/还原性胺化化学外的替代缀合化学以及缀合物特性诸如SPR的合适性。以高达至少20的DO (较低氧化) (约5%糖表位修饰) 生成的缀合物在小鼠中仍具有免疫原性。

[0490] 表19. 改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件和替代化学选择对GBS血清型IV-CRM₁₉₇缀合物的影响

缀合物	42	43	44	45
缀合化学	PO/RAC	CDT	TEMPO	PO/RAC
多糖 MW (kDa)	143	133	133	140
在初始多糖中的% 唾液酸	>95	>95	>95	>95
%修饰	5	N/A	7	7
氧化程度(DO)	20	N/A	13.7	14.6
糖/蛋白质比	1.0	0.9	0.52	1.96
%游离糖	<5	<5	6	<5
通过 SEC-MALLS 测量的 MW, kDa	3580	12390	4580	2710
OPA 滴度	8614	1989	7567	3695

[0492] GBS血清型V多糖-CRM₁₉₇缀合物

[0493] 使用PO/RAC及其DO为4.4至14.6(约7至23%糖表位修饰)的活化多糖生成的缀合物显示出在小鼠中具免疫原性(缀合物46和47)。去唾液酸化(5%唾液酸化程度)的缀合物不具免疫原性(缀合物49),而使用水性溶剂,利用PO/RAC方法生成的缀合物产生弱免疫反应(缀合物48)。结果显示于表20中。

[0494] 表20.改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件对GBS血清型V-CRM₁₉₇缀合物的影响

缀合物	46	47	48	49
溶剂	DMSO	DMSO	水性	DMSO
多糖 MW (kDa)	132	132	132	132
在初始多糖中的% 唾液酸	>95%	>95%	>95%	5%
%修饰	7	23	8	6
[0495] 氧化程度(DO)	14.6	4.4	12.1	18
糖/蛋白质比	1.32	1.43	1.27	0.94
%游离糖	11	<5	25.4	<5
通过 SEC-MALLS 测量的 MW, kDa	4304	14510	573	4847
OPA 滴度	335	181	93	60

[0496] 使用替代的缀合化学和缀合分子特性生成另外的缀合物变体。结果显示于表21中。缀合物50和53通过PO/RAC并刻意改变缀合参数以产生分别具有较低唾液酸化程度(81%唾液酸化)和低分子量(MW)的缀合物来生成。缀合物51通过使多糖与羰基双三唑(CDT)反应并在DMSO中进行缀合反应来生成。缀合物52通过使用TEMPO试剂(代替高碘酸钠)将多糖氧化,随后在DMSO中利用还原性胺化化学进行缀合来生成,详见上述实施例3。所有血清型V缀合物(除了使用CDT化学生成的缀合物)均显示出在小鼠中具免疫原性,这表示除了高碘酸盐氧化/还原性胺化化学外的替代缀合化学以及缀合物特性诸如MW的合适性。与通过RAC生成的其他缀合物相比较,使用CDT化学生成的缀合物显示出明显较弱的免疫原性。与>95%唾液酸化的缀合物(缀合物53)相比较,81%唾液酸化的缀合物(缀合物50)提供的免疫反应较弱,但较5%唾液酸化的缀合物(上述表20中的缀合物49)的反应强。

[0497] 表21.改变高碘酸盐氧化/还原性胺化化学的方法条件和替代化学选择对GBS血清型V-CRM₁₉₇缀合物的影响

缀合物	50	51	52	53
缀合化学	PO/RAC	CDT	TEMPO	PO/RAC
多糖 MW (kDa)	159	193	193	37
在初始多糖中的% 唾液酸	>81%	>95%	>95%	>95%
%修饰	7	N/A	5	10
氧化程度(DO)	13.5	N/A	18.2	10.3
糖/蛋白质比	1.2	1.14	0.71	0.53
%游离糖	<5	<5	22.3	7.3
通过 SEC-MALLS 测量的 MW, kDa	3037	4756	3501	3044
OPA 滴度	160.3	101	320	279

[0498] 实施例5:GBS III-CRM₁₉₇和GBS V-CRM₁₉₇单价缀合物疫苗在小鼠中产生OPA反应

[0499] 在第0、3和6周经由皮下途径以1mcg、0.1mcg或0.01mcg的与CRM₁₉₇缀合的B族链球菌(GBS)血清型III(GBS III-CRM₁₉₇)、或与CRM₁₉₇缀合的GBS血清型V(GBS V-CRM₁₉₇)将雌性CD-1小鼠免疫化(immunize)三次。通过调理吞噬分析(opsonophagocytic assay)(OPA)评估第3剂量后(Post dose three)(PD3)血清。依实施例4中的描述进行OPA。两种缀合物均在小鼠中诱发OPA反应(表22)。不具有可检测的OPA反应的样本被指派为数值50。

[0500] 表22:GBS III和GBS V缀合物在小鼠中诱发OPA反应

缀合物类型	剂量 (mcg)	几何平均 OPA 滴度
III	1	701
	0.1	103
	0.01	50
V	1	378
	0.1	204

[0502] 实施例6:GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇单价缀合物疫苗在小鼠中产生OPA反应

[0503] 在第0、3和6周经由皮下途径以含有1mcg与CRM₁₉₇缀合的个体GBS荚膜多糖(CP)的疫苗给六组雌性CD-1小鼠进行免疫化三次。初步研究显示小鼠对所测试的六种血清型的任一种均不具有预先存在的OPA滴度(pre-existing OPA titer)。通过针对包含在该疫苗中的同源(cognate)GBS血清型的OPA分析来自PD3的血清。依实施例4中的描述进行OPA。结

果显示于下列表23和24中。

[0504] 表23:用个体GBS CPS-CRM₁₉₇缀合物免疫化后的小鼠的几何平均OPA滴度

[0505]

血清型	几何平均 OPA 滴度
Ia	300
Ib	417
II	610
III	188
IV	3140
V	378

[0507] 表24:用个体GBS CPS-CRM₁₉₇缀合物免疫化后的小鼠的倍数上升OPA滴度

血清型	几何平均 OPA 滴度
Ia	6
Ib	8
II	12
III	4
IV	63
V	8

[0509] 注意:倍数上升的计算是假定小鼠不具有预先存在的滴度。

[0510] 实施例7:与从用GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇和GBS V-CRM₁₉₇单价缀合物疫苗免疫化的小鼠分离出的IgG相比较的血清调理素活性

[0511] 在第0、3和6周经由皮下途径以1mcg的与CRM₁₉₇缀合的个体GBS CP将雌性CD-1或BALB/c小鼠免疫化三次。使用AlPO₄或QS-21作为佐剂。通过血清型特异性OPA (serotype-specific OPA) 测试PD3血清,然后分离出免疫球蛋白G级分 (immunoglobulin G fraction) 并测试OPA活性。将纯化的IgG OPA活性标准化至5mg/ml (在正常小鼠血清的IgG量的范围内)。所有六种GBS CPS缀合物均诱发具有调理素活性 (opsonic activity) 的IgG抗体 (图1)。

[0512] 实施例8:GBS Ia-TT, GBS Ib-TT, GBS II-TT, GBS III-TT, GBS IV-TT及GBS V-TT单价缀合物疫苗在兔子中产生OPA反应

[0513] 以50mcg/ml的与破伤风类毒素缀合的GBS血清型Ia多糖、10mcg/ml的与破伤风类毒素(tetanus toxoid)缀合的GBS血清型Ib多糖、50mcg/ml的与破伤风类毒素缀合的GBS血清型II多糖、50mcg/ml的与破伤风类毒素缀合的GBS血清型III多糖、50mcg/ml的与破伤风类毒素缀合的GBS血清型IV多糖、或50mcg/ml的与破伤风类毒素缀合的GBS血清型V多糖将兔子免疫化三次,其中第一剂量中配伍完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant),而第二和第三剂量中配伍不完全弗氏佐剂(Incomplete Freund's Adjuvant)。该缀合物使用其唾液酸水平>95%的多糖及CDAP(四氟硼酸1-氰基-4-二甲氨基吡啶化学制造。依实施例4中的描述通过OPA测量PD3免疫反应。血清滴度显示于表25中,而纯化的IgG滴度显示于下列表26中。与TT缀合的GBS血清型Ia、Ib、II、III、IV及V多糖在兔子中具高度免疫原性。

[0514] 表25:用个体GBS CPS-TT缀合物免疫化后兔子血清的几何平均OPA滴度

GBS 血清型	几何平均 OPA 滴度
Ib	11550
II	36753
IV	34345

[0516] 表26:用个体GBS CPS-TT缀合物免疫化后兔子血清的几何平均OPA滴度

[0517]

GBS 血清型	几何平均 OPA 滴度 (1 mg/ml pAb)
Ia	7190
Ib	2817
II	41870
III	40146
IV	15565
V	12124

[0519] 实施例9:六价GBS缀合物疫苗在非人灵长类动物中产生OPA反应

[0520] 在第0、4和8周经由肌肉内途径(intramuscularly)以六价(hexavalent)B族链球菌(GBS6)疫苗将三组恒河猴(rhesus macaque)免疫化三次。GBS6疫苗包括GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇。两组包括磷酸铝(AlPO₄)作为佐剂且施用5mcg的各缀合物或施用50mcg的各缀合物。第三组施用5mcg的各缀合物且不含佐剂。下列表27描述免疫化计划表(immunization schedule)。

[0521] 表27:恒河猴的免疫化计划表Immunization schedule of rhesus macaques

组	疫苗剂作为					
	NHP 数	量 (各缀合物)	AlPO ₄ 的明矾 (mg/mL)	疫苗接种 体积	递送	免疫化计 划表 (周)
[0522] 1	10	5 µg	0.5	1.0 mL	IM	0, 4, 8
2	10	50 µg	0.5	1.0 mL	IM	0, 4, 8
[0523] 3	10	5 µg	无	1.0 mL	IM	0, 4, 8

[0524] 通过OPA分析免疫前血清 (preimmune serum) 及来自PD3的血清中的包含于疫苗中的所有六种GBS血清型。依实施例4中的描述进行OPA。结果显示于下列表28和29中。在所有六种血清型方面, 添加磷酸铝 (AlPO₄) 佐剂的配制剂引起可检测的OPA反应 (免疫前 (pre) 到PD3的滴度增加; 或上升倍数免疫前/PD3 (pre/PD3) >1)。未添加佐剂的5mcg/缀合物剂量引起对6种血清型中的5种血清型的可检测的OPA反应。

[0525] 表28: 用GBS6免疫化之前和之后的恒河猴的几何平均OPA滴度

血清型	5 mcg + AlPO ₄		50 mcg + AlPO ₄		5 mcg 无佐剂	
	Pre	PD3	Pre	PD3	Pre	PD3
[0526] Ia	97	2907	118	8106	166	69
Ib	53	3821	53	2957	50	313
II	54	980	62	764	61	362
III	105	7759	204	8448	762	4515
IV	78	2350	89	3331	309	899
V	233	5556	442	16476	6192	4226

[0527] 表29: 用GBS6免疫化后恒河猴的OPA滴度上升倍数

血清型	5mcg + AlPO ₄	50mcg AlPO ₄	+ 5mcg 无佐剂
Ia	30	69	4
Ib	72	56	6
II	18	12	6
III	74	41	6
IV	30	37	3
V	24	37	1

[0529] 实施例10:六价GBS缀合物疫苗在大鼠中产生OPA反应

[0530] 经由皮下途径 (subcutaneously), 以5mcg/ml的在GBS6多糖缀合物疫苗 (如实施例9中所配制, 具有或不具有磷酸铝 (AlPO₄)) 中的各缀合物将雌性史-道二氏大鼠 (Sprague-Dawley rat) 免疫化二次。评估免疫前 (preimmune) (基线 (baseline)) 和给药后 (post-dose) 的两种血清的针对所有六种同源 (cognate) GBS血清型的OPA分析滴度 (OPA assay titer)。在GBS 384孔分析形式 (GBS 384well assay format) 中测量各血清型的OPA滴度并计算上升倍数 (fold rise)。施用GBS6疫苗的大鼠在第二剂量后具有对每种血清型的强大的功能性抗体反应 (functional antibody response); 当无AlPO₄存在时, 在血清型间可见到增加7至205倍, 而存在AlPO₄时, 此范围在11至294倍 (表30)。表30. 用六价GBS缀合物疫苗免疫化的大鼠, 在调理吞噬活性 (OPA) 分析中, 在第2剂量 (PD2) 后的滴度上升倍数

1.	2. 几何平均 OPA 滴度从免疫前至 PD2 的上升倍数	
3. GBS 血清型	4. 无 AlPO ₄	5. 具有 AlPO ₄
Ia	36	11
Ib	7	39
II	205	294
III	107	141
IV	45	33
V	185	195

[0532] 实施例11:以单价或六价GBS糖缀合物疫苗免疫化的怀孕雌亲显示出使其后代在出生后免于GBS III或V感染的保护作用

[0533] 经由皮下途径以如实施例9中所描述的含有5mcg/ml各缀合物及100mcg/ml AlPO₄的GBS6疫苗、GBS III或V单价糖缀合物疫苗 (monovalent glycoconjugate vaccine) (各含有10mcg/ml的缀合物及100mcg/ml的AlPO₄)、或单独的媒介物对照组 (vehicle control alone) 将雌性CD-1小鼠免疫化三次。在第三次免疫化前孕育 (breed) 小鼠。根据所接受的疫苗, 以GBS血清型 III或GBS血清型V细菌的致死剂量 (lethal dose) 攻击 (challenge) 免疫化

的小鼠之后代,并监控存活情况90小时。以GBS6+A1PO₄或GBS III-CRM₁₉₇+A1PO₄免疫化的雌亲(dam)给其幼鼠提供显著的保护(p<0.0001)来对抗致命的GBS血清型III攻击。同样地,以GBS V-CRM₁₉₇+A1PO₄免疫化的雌亲(dam)给其幼鼠提供显著的保护(p<0.0001)对抗致命的GBS血清型V攻击(lethal GBS serotype V challenge)。结果显示于表31中。

[0534] 表31:用单价和六价GBS疫苗免疫化增加后代的存活

	# 存活后代/全部后代 (% 存活)		
[0535] 血清型攻击	用 GBS6 免疫化的雌亲的后代	用同源单价免疫化的雌亲的后代	用媒介物免疫化的雌亲的后代
III	20/22 (91%)	28/28 (100%)	9/29 (31%)
V		35/40 (85%)	3/27 (11%)

[0536] 实施例12:GBS III单克隆抗体在幼鼠内的被动免疫(Passive Immunization)显示出保护作用

[0537] 以包括血清型Ia、Ib、II、III及V的五价疫苗将小鼠免疫化以生成B族链球菌血清型III(GBS III)单克隆抗体(mAb)。选择GBS III-特异性mAb克隆株(GBS III-specific mAb clone),并使用标准程序生成识别GBS III的CP的mAb。在用临床GBS III分离株(clinical GBS III isolate)攻击前16小时,将GBS血清型III mAb被动施用幼鼠(每组n=10;显示2个独立实验)。攻击后四小时采血并计算所余CFU(remaining CFU)。以GBS III mAb治疗可降低幼鼠中回收的CFU(recovered CFU)达4log或更高(见表32)。

[0538] 表32:GBS III mAb降低幼鼠中回收的CFU

	处理	回收的 CFU (log)
[0539] 实验 1	GBS III mAb	1.8
	对照	7.5
实验 2	GBS III mAb	2.4
[0540]	对照	6.4

[0541] 实施例13:GBS Ib、III和V单克隆抗体在怀孕小鼠内的被动免疫显示出对其出生后的后代的保护作用

[0542] 使用标准程序从以五价疫苗(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇和GBS V-CRM₁₉₇)免疫化的小鼠产生单克隆抗体(mAb)。然后,确认mAb可特异识别(specifically recognizing)该5种血清型中各血清型的荚膜多糖。在怀孕小鼠分娩前约24至48小时,将500mcg/ml剂量的GBS血清型Ib(GBS Ib)mAb、GBS血清型III(GBS III)mAb、GBS血清型V(GBS V)mAb、或同种型匹配(isotype-matched)的对照mAb被动施用该怀孕小鼠。出生后24至48小时,以GBS Ib、GBS III或GBS V细菌的致死剂量攻击经免疫化的雌亲鼠

之后代。监控存活情况96小时。与以对照mAb免疫化者相比较,以GBS Ib mAb、GBS III mAb、或GBS V mAb免疫化的雌亲所生育的幼鼠在以GBS攻击后的存活率显著较高(见表33)。

[0543] 表33:GBS III&V mAb增加后代的存活

经被动免疫化的雌亲所生育的幼鼠的%存活:		
GBS 攻击血清型	同源 mAb	对照 mAb
Ib	80	0
III	93	0
V	100	12

[0545] 实施例14:GBS缀合物的稳定性

[0546] 于不同pH水平,在10mM琥珀酸盐-磷酸盐和155mM NaCl中分别配制GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇,以测试缀合物在加速储存条件(accelerated storage condition)下的稳定性。分子量的百分比变化(通过SEC MALLS测定)在50℃储存4周后测量。结果显示于图2至7中。

[0547] 在表34中显示的各种缓冲条件下测试GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇及GBS IV-CRM₁₉₇缀合物的唾液酸化稳定性。在37℃储存1个月后,使用HPLC测量游离唾液酸(N-乙酰基神经氨酸(N acetyl neuraminic acid);NANA)。结果显示于第8图中。

[0548] 两个研究表明该缀合物在pH 6.0以上表现更好,且最理想在约pH 6.5。

[0549] 表34.用于唾液酸化稳定性试验的缓冲条件

pH	盐	盐浓度(mM)	缓冲剂	缓冲剂浓度(mM)
5.8	无	0	琥珀酸盐	10
6.2	无	0	琥珀酸盐	10
6.6	无	0	琥珀酸盐	10
6.9	无	0	琥珀酸盐	10
5.8	NaCl	150	琥珀酸盐	10
6.3	NaCl	150	琥珀酸盐	10
6.6	NaCl	150	琥珀酸盐	10
6.9	NaCl	150	琥珀酸盐	10
6.1	无	0	组氨酸	10
6.5	无	0	组氨酸	10
6.9	无	0	组氨酸	10
6.1	NaCl	150	组氨酸	10
6.5	NaCl	150	组氨酸	10
6.9	NaCl	150	组氨酸	10

[0551] 实施例15:GBS6配制剂

[0552] 为了确定缓冲剂的选择,使用如上述表33所示的相同缓冲条件一起配制GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇(GBS6)。在下列时间点测试这样的配制剂的实际pH:0(制造配制剂时)、在5°C1个月后、在25°C1个月后及在37°C1个月后。在使用琥珀盐作为缓冲剂的配制剂中见到pH转变,而在使用组氨酸作为缓冲剂的配制剂则未见到转变。结果显示于图9至10中。

[0553] 还测试组氨酸缓冲剂浓度对GBS缀合物与铝结合的效果。以两种不同浓度的缀合物(10mcg/ml和40mg/ml的各血清型)和数种不同浓度的组氨酸测试包括150mM NaCl、pH 6.5的0.01%聚山梨醇酯-80及0.5mg/ml的作为AlPO₄的铝的配制剂。通过测量疫苗中各缀合物的总量及与铝结合的各缀合物的量来测定与铝结合的缀合物的百分比。通过下述步骤测量经结合的缀合物:将疫苗配制剂离心,重新悬浮铝沉淀,溶解铝,并使用比浊法(nephelometry)以抗各血清型的血清型特异性多克隆抗体(serotype-specific polyclonal antibody)测量经结合的缀合物。结果显示于图11至12中。结果发现组氨酸缓冲剂的浓度会影响各血清型与铝结合的百分比,此影响在较低剂量时比较高剂量时更为明显。

[0554] 进行搅拌研究(agitation study)以测定理想的聚山梨醇酯-80(PS80)的量。测试包含20mM组氨酸,150mM NaCl,0.5mg/ml AlPO₄(若存在时),和不含PS80、含0.01%PS80、0.02%PS80、或0.03%PS80(pH 6.5)的GBS6配制剂在搅拌压力(agitation stress)下的总抗原性损失(total antigenicity lost)百分比。将预先填充了配制剂的注射器(syringe)在室温、500RPM下搅拌72小时。对照组样本(未经搅拌)在室温储存72小时。结果显示于图13

中。

[0555] 还研究了GBS6配制剂中的铝浓度以测定其对GBS缀合物结合至铝的影响。对包含10mM组氨酸,150mM NaCl,0.02%PS80,及0.25mg/ml、0.5mg/ml、或0.75mg/ml、或1.0mg/ml的作为磷酸铝($AlPO_4$)的铝(pH 6.5)的GBS6配制剂测试与铝结合的缀合物的百分比。与 $AlPO_4$ 结合的百分比随着 $AlPO_4$ 浓度的增加而增加。结果显示于图14中。

[0556] 实施例16:GBS6冷冻干燥配制剂

[0557] 测试GBS6(GBS Ia-CRM₁₉₇、GBS Ib-CRM₁₉₇、GBS II-CRM₁₉₇、GBS III-CRM₁₉₇、GBS IV-CRM₁₉₇及GBS V-CRM₁₉₇)的各种冷冻干燥配制剂的稳定性。将包括20mM组氨酸(pH 6.5)、0.02%PS80、约28mM NaCl,及5.5%、7.0%、或8.5%(w/v)的蔗糖的低(10mcg/ml)和高(50mcg/ml)剂量配制剂冷冻干燥。在5°C4个月、在37°C4个月及在50°C1个月后,测量pH及水分以测试冷冻干燥配制剂的稳定性。根据pH和水分(未显示出数据),所有配制剂均稳定。此外,测试所有配制剂在5°C和37°C1、4和9个月以及50°C1、2和4周后各血清型的抗原性恢复(antigenicity recovery)百分比。结果显示于图15至20中。

[0558] 还制备并评估了用于40mcg/ml剂量的GBS6配制剂的赋形剂的下列变化:1)7%(w/v)蔗糖,2)2%(w/v)蔗糖和4%(w/v)甘露糖醇,3)3%(w/v)蔗糖和3%(w/v)甘露糖醇,4)2%(w/v)蔗糖和4%(w/v)甘氨酸,或5)3%(w/v)蔗糖和3%(w/v)甘氨酸。所有五种配制剂在5°C3个月、25°C3个月、37°C3个月及50°C1个月后其pH和水分(moisture)均稳定(数据未显示)。此外,测试所有配制剂在52-8°C、25°C和37°C1、3和7个月,及在50°C1、2和4周后的各血清型的抗原性恢复的百分比。结果显示于图21至25中。

[0559] 使用比浊法测试在重构的冷冻干燥配制剂(reconstituted lyophilized formulation)和液体配制剂(liquid formulation)中的GBS6疫苗的与磷酸铝佐剂结合的抗原的百分比。制备低剂量(10mcg/ml)和高剂量(50mcg/ml)的含有20mM组氨酸、0.02%PS80、7.0%(w/v)蔗糖及500mcg/ml的作为磷酸铝的铝的冷冻干燥和液体配制剂。还测试改变的氯化钠(NaCl)浓度以测定对抗原结合(antigen binding)的影响。冷冻干燥配制剂和液体配制剂的结果分别显示于表35和36中。当使用约150mM或更高的NaCl浓度时,冷冻干燥和液体组合物两者的低剂量配制剂具有彼此相当的结果。

[0560] 表35.具有不同NaCl量的配制的冷冻干燥配制剂中与磷酸铝结合的抗原的百分比

[0561]

	NaCl	Ia (%)	Ib	II	III	IV	V(%)
--	------	--------	----	----	-----	----	------

	(mM)		(%)	(%)	(%)	(%)	
[0562] 10 mcg/ml 的各缀 合物 w/ 7.0 % 蔗糖	~23	40	36	31	34	38	39
	~80	46	45	37	40	44	44
	~150	78	69	63	62	82	84
	~300	77	64	63	60	79	86
50 mcg/mL 的各缀 合物 w/ 7.0 % 蔗糖	~23	21	23	24	18	27	24
	~34	24	23	23	21	27	40
	~150	66	58	52	46	65	67
	~300	65	56	50	48	66	64

[0563] 表36. 具有不同NaCl量的液体配制剂中与磷酸铝结合的抗原的百分比

	NaCl (mM)	Ia (%)	Ib (%)	II (%)	III (%)	IV (%)	V (%)
[0564] 10 mcg/mL 的各缀 合物	40	78.4	72.4	62.9	73.3	70.9	70.8
	100	61.0	63.3	52.3	51.9	49.8	53.9
	150	72.7	77.0	68.1	67.1	64.0	71.0
	200	67.7	73.0	58.6	52.3	51.9	60.1
	300	78.3	79.2	71.1	57.1	58.0	74.1
50 mcg/mL 的各缀 合物	100	50.5	38.3	49.0	52.8	51.7	37.9
	150	49.8	37.6	49.0	50.8	50.9	38.7
	200	40.1	35.9	45.3	47.4	44.0	34.7
	300	40.3	41.9	50.9	42.2	43.5	37.5

[0565] 本发明的方面

[0566] 下列各项描述本发明的另外的实施方案:

[0567] C1. 免疫原性多糖-蛋白质缀合物, 其包含B族链球菌 (GBS) 荚膜多糖和载体蛋白, 其中, 该荚膜多糖的唾液酸水平高于约60%。

- [0568] C2. 如C1的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖选自由下列所组成的群组:血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及IX。
- [0569] C3. 如C2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖为血清型Ia。
- [0570] C4. 如C2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖为血清型Ib。
- [0571] C5. 如C2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖为血清型II。
- [0572] C6. 如C2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖为血清型III。
- [0573] C7. 如C2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖为血清型IV。
- [0574] C8. 如C2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖为血清型V。
- [0575] C9. 如C2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖为血清型VI。
- [0576] C10. 如C2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖为血清型VII。
- [0577] C11. 如C2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖为血清型VIII。
- [0578] C12. 如C2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖为血清型IX。
- [0579] C13. 如C1至C12中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖的唾液酸水平高于约95%。
- [0580] C14. 如C1至C13中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖的唾液酸水平为约100%。
- [0581] C15. 如C1至C14中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM多糖中具有至少约0.6mM的唾液酸。
- [0582] C16. 如C1至C15中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM多糖中具有至少约0.65mM的唾液酸。
- [0583] C17. 如C1至C16中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM多糖中具有至少约0.7mM的唾液酸。
- [0584] C18. 如C1至C17中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM多糖中具有至少约0.75mM的唾液酸。
- [0585] C19. 如C1至C18中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM多糖中具有至少约0.8mM的唾液酸。
- [0586] C20. 如C1至C19中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM多糖中具有至少约0.85mM的唾液酸。
- [0587] C21. 如C1至C20中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM多糖中具有至少约0.9mM的唾液酸。
- [0588] C22. 如C1至C21中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM多糖中具有至少约0.95mM的唾液酸。
- [0589] C23. 如C1至C22中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖的分子量为约5kDa至约1,000kDa。
- [0590] C24. 如C1至C23中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖的分子量为约25kDa至约750kDa。
- [0591] C25. 如C1至C24中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖的分子量为约25kDa至约400kDa。
- [0592] C26. 如C1至C25中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖的分子量为约

25kDa至约200kDa。

[0593] C27. 如C1至C25中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖的分子量为约100kDa至约400kDa。

[0594] C28. 如C1至C27中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该缀合物的分子量为约300kDa至约20,000kDa。

[0595] C29. 如C1至C28中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该缀合物的分子量为约1,000kDa至约15,000kDa。

[0596] C30. 如C1至C29中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该缀合物的分子量为约1,000kDa至约10,000kDa。

[0597] C31. 如C1至C30中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖被约0%至约40% O-乙酰化。

[0598] C32. 如C1至C31中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖的O-乙酰化为少于约5%。

[0599] C33. 如C1至C32中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖的O-乙酰化为少于约4%。

[0600] C34. 如C1至C33中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖的O-乙酰化为少于约3%。

[0601] C35. 如C1至C34中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖的O-乙酰化为少于约2%。

[0602] C36. 如C1至C35中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖的O-乙酰化为少于约1%。

[0603] C37. 如C1至C36中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖于每mM糖重复单元中包括至少约0.1mM O-乙酸酯。

[0604] C38. 如C1至C37中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖于每mM糖重复单元中包括至少约0.2mM O-乙酸酯。

[0605] C39. 如C1至C38中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖于每mM糖重复单元中包括至少约0.3mM O-乙酸酯。

[0606] C40. 如C1至C39中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖于每mM糖重复单元中包括至少约0.35mM O-乙酸酯。

[0607] C41. 如C1至C40中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖于每mM糖重复单元中包括约0.4mM O-乙酸酯。

[0608] C42. 如C1至C41中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖于每mM糖重复单元中包括少于约0.01mM O-乙酸酯。

[0609] C43. 如C1至C42中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖于每mM糖重复单元中包括少于约0.05mM O-乙酸酯。

[0610] C44. 如C1至C43中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖于每mM糖重复单元中包括少于约0.04mM O-乙酸酯。

[0611] C45. 如C1至C44中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖于每mM糖重复单元中包括少于约0.03mM O-乙酸酯。

- [0612] C46. 如C1至C45中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该荚膜多糖于每mM糖重复单元中包括少于约0.02mM O-乙酸酯。
- [0613] C47. 如C1至C46中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该多糖各自独立地与载体蛋白缀合。
- [0614] C48. 如C1至C47中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该载体蛋白为CRM₁₉₇或破伤风类毒素。
- [0615] C49. 如C1至C48中任一项的免疫原性缀合物, 其中, 该载体蛋白为CRM₁₉₇。
- [0616] C50. 分离荚膜多糖的方法, 其包括使有机试剂与包含产荚膜多糖的细菌的细胞培养液 (cell broth) 反应。
- [0617] C51. 如C50的方法, 其中, 该细菌是未经裂解 (not lysed) 的。
- [0618] C52. 如C50或51的方法, 其中, 该细菌是经热杀死的 (heat killed)。
- [0619] C53. 如C50至52中任一项的方法, 其中, 该方法进一步包括离心步骤以提供细胞糊状物 (cell paste)。
- [0620] C54. 如C50至53中任一项的方法, 其中, 该方法进一步包括过滤步骤。
- [0621] C55. 如C54的方法, 其中, 该过滤步骤为渗滤 (diafiltration)。
- [0622] C56. 如C50至55中任一项的方法, 其中, 该产荚膜多糖的细菌选自由下列所组成的群组: 无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、金黄葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、伤寒沙门杆菌 (*Salmonella typhi*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、克雷白氏肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*) 及粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)。
- [0623] C57. 如C56的方法, 其中, 该细菌为无乳链球菌。
- [0624] C58. 如C50至57中任一项的方法, 其中, 该有机试剂为衍生的羟胺化合物 (derivatized hydroxyl amine compound)。
- [0625] C59. 如C50至58中任一项的方法, 其中, 羟胺为实施例2的表2中所列的任何羟胺。
- [0626] C60. 如C50至59中任一项的方法, 其中, 羟胺选自由下列所组成的群组: 二苄基羟胺 (dibenzyl hydroxylamine); 二乙基羟胺 (diethyl hydroxylamine); 羟胺 (hydroxylamine); 乙二胺 (ethylenediamine); 三乙四胺 (triethylenetetramine); 1,1,4,7,10,10六甲基三乙四胺 (1,1,4,7,10,10hexamethyl triethylene tetramine); 及2,6,10,三甲基2,6,10三氮杂十一烷 (2,6,10,Trimethyl 2,6,10triazoundecane)。
- [0627] C61. 如C50至C60中任一项的方法, 其中, 羟胺的浓度为约5mM至约200mM。
- [0628] C62. 如C50至C61中任一项的方法, 其中, 反应的pH为约5.5至约9.5。
- [0629] C63. 如C50至C62中任一项的方法, 其中, 反应在约20°C至约85°C的温度进行。
- [0630] C64. 如C50至C63中任一项的方法, 其中, 反应时间为约10小时至约90小时。
- [0631] C65. 制造如C1至C49中任一项的免疫原性多糖-蛋白质缀合物的方法, 其中, 该荚膜多糖根据如C50至C64中任一项的方法分离。
- [0632] C66. 免疫原性多糖-蛋白质缀合物, 其包含通过如C50至C64中任一项的方法制造的荚膜多糖。
- [0633] C67. 免疫原性组合物, 其包含如C1至C49或C66中任一项的免疫原性多糖-蛋白质

缀合物。

[0634] C68. 免疫原性组合物, 其包含多糖-蛋白质缀合物, 其中, 该缀合物包含来自B族链球菌(GBS)血清型IV及至少一种另外的血清型的荚膜多糖, 该另外的血清型选自由下列所组成的群组: Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。

[0635] C69. 如C68的免疫原性组合物, 其中, 该至少一种另外的血清型为Ia。

[0636] C70. 如C69的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型Ib的荚膜多糖的缀合物。

[0637] C71. 如C69或C70的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型II的荚膜多糖的缀合物。

[0638] C72. 如C69至C71中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型III的荚膜多糖的缀合物。

[0639] C73. 如C69至C72中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型V的荚膜多糖的缀合物。

[0640] C74. 如C69至C73中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VI的荚膜多糖的缀合物。

[0641] C75. 如C69至C74中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VII的荚膜多糖的缀合物。

[0642] C76. 如C69至C75中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VIII的荚膜多糖的缀合物。

[0643] C77. 如C69至C76中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型IX的荚膜多糖的缀合物。

[0644] C78. 如C68的免疫原性组合物, 其中, 该至少一种另外的血清型为Ib。

[0645] C79. 如C78的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型II的荚膜多糖的缀合物。

[0646] C80. 如C78或C79的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型III的荚膜多糖的缀合物。

[0647] C81. 如C78至C80中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型V的荚膜多糖的缀合物。

[0648] C82. 如C78至C81中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VI的荚膜多糖的缀合物。

[0649] C83. 如C78至C82中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VII的荚膜多糖的缀合物。

[0650] C84. 如C78至C83中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VIII的荚膜多糖的缀合物。

[0651] C85. 如C78至C84中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型IX的荚膜多糖的缀合物。

[0652] C86. 如C68的免疫原性组合物, 其中, 该至少一种另外的血清型为II。

[0653] C87. 如C86的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型III的荚膜多糖的缀合物。

- [0654] C88. 如C86或C87的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型V的荚膜多糖的缀合物。
- [0655] C89. 如C86至C88中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VI的荚膜多糖的缀合物。
- [0656] C90. 如C86至C89中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VII的荚膜多糖的缀合物。
- [0657] C91. 如C86至C90中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VIII的荚膜多糖的缀合物。
- [0658] C92. 如C86至C91中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型IX的荚膜多糖的缀合物。
- [0659] C93. 如C68的免疫原性组合物, 其中, 该至少一种另外的血清型为III。
- [0660] C94. 如C93的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型V的荚膜多糖的缀合物。
- [0661] C95. 如C93或C94的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VI的荚膜多糖的缀合物。
- [0662] C96. 如C93至C95中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VII的荚膜多糖的缀合物。
- [0663] C97. 如C93至C96中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VIII的荚膜多糖的缀合物。
- [0664] C98. 如C93至C97中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型IX的荚膜多糖的缀合物。
- [0665] C99. 如C68的免疫原性组合物, 其中, 该至少一种另外的血清型为V。
- [0666] C100. 如C99的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VI的荚膜多糖的缀合物。
- [0667] C101. 如C99或C100中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VII的荚膜多糖的缀合物。
- [0668] C102. 如C99至C101中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VIII的荚膜多糖的缀合物。
- [0669] C103. 如C99至C102中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型IX的荚膜多糖的缀合物。
- [0670] C104. 如C68的免疫原性组合物, 其中, 该至少一种另外的血清型为VI。
- [0671] C105. 如104的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VII的荚膜多糖的缀合物。
- [0672] C106. 如C104或C105中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型VIII的荚膜多糖的缀合物。
- [0673] C107. 如C104至C106中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型IX的荚膜多糖的缀合物。
- [0674] C108. 如C68的免疫原性组合物, 其中, 该至少一种另外的血清型为VII。
- [0675] C109. 如C108的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含含有来自GBS血清型

VIII的荚膜多糖的缀合物。

[0676] C110. C108或C109中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物进一步包含含有来自GBS血清型IX的荚膜多糖的缀合物。

[0677] C111. 如C68的免疫原性组合物,其中,该至少一种另外的血清型为VIII。

[0678] C112. 如C111的免疫原性组合物,其中,该组合物进一步包含含有来自GBS血清型IX的荚膜多糖的缀合物。

[0679] C113. 如C112的免疫原性组合物,其中,该至少一种另外的血清型为IX。

[0680] C114. 免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自GBS血清型Ia、Ib、II、III及IV的荚膜多糖。

[0681] C115. 免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自GBS血清型Ia、Ib、II、III及V的荚膜多糖。

[0682] C116. 免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自GBS血清型Ia、Ib、II、III、IV及V的荚膜多糖。

[0683] C117. 包括多糖-蛋白质缀合物的免疫原性组合物,该多糖-蛋白质缀合物包含至少四种选自下列所组成的群组的GBS荚膜多糖血清型:Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及IX。

[0684] C118. 如C117的免疫原性组合物,其中,该组合物包含至少五种GBS荚膜多糖血清型。

[0685] C119. 如C117或C118的免疫原性组合物,其中,该组合物包含至少六种GBS荚膜多糖血清型。

[0686] C120. 如C117至C119中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物包含至少七种GBS荚膜多糖血清型。

[0687] C121. 如C117至C120中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物包含至少八种GBS荚膜多糖血清型。

[0688] C122. 如C117至C121中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物包含至少九种GBS荚膜多糖血清型。

[0689] C123. 如C117至C122中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物包含GBS荚膜多糖血清型V。

[0690] C124. 如C117至C123中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物不具有免疫干扰(immune interference)。

[0691] C125. 如C67至C124中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物进一步包含药理学上可接受的赋形剂、缓冲剂、稳定剂、佐剂、冷冻保护剂(cryoprotectant)、盐、二价阳离子、非离子性洗涤剂、自由基氧化抑制剂、载体、或其混合物。

[0692] C126. 如C67至C125中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物进一步包含缓冲剂。

[0693] C127. 如C126的免疫原性组合物,其中,该缓冲剂选自下列所组成的群组:HEPES、PIPES、MES、Tris(氨基丁三醇(trimethamine))、磷酸盐、乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸及琥珀酸盐。

[0694] C128. 如C127的免疫原性组合物,其中,该缓冲剂为组氨酸。

- [0695] C129. 如C67至C128中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含表面活性剂。
- [0696] C130. 如C129的免疫原性组合物, 其中, 该表面活性剂选自由下列所组成的群组: 聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯 (polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester)、聚山梨醇酯-80、聚山梨醇酯-60、聚山梨醇酯-40、聚山梨醇酯-20及聚氧乙烯烷基醚 (polyoxyethylene alkyl ether)。
- [0697] C131. 如C130的免疫原性组合物, 其中, 该表面活性剂为聚山梨醇酯-80。
- [0698] C132. 如C67至C131中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含赋形剂。
- [0699] C133. 如C132的免疫原性组合物, 其中, 该赋形剂选自由下列所组成的群组: 淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、海藻糖 (trehalose)、棉子糖、水苏糖 (stachyose)、松三糖 (melezitose)、葡聚糖 (dextran)、甘露糖醇、乳糖醇 (lactitol)、巴糖醇 (palatinit)、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、氯化钠 (NaCl)、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水及乙醇。
- [0700] C134. 如C133的免疫原性组合物, 其中, 该赋形剂为氯化钠。
- [0701] C135. 如C67至C134中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物进一步包含佐剂。
- [0702] C136. 如C135的免疫原性组合物, 其中, 该佐剂为基于铝的佐剂或QS-21。
- [0703] C137. 如C136的免疫原性组合物, 其中, 该基于铝的佐剂选自由下列所组成的群组: 磷酸铝、羟基磷酸铝 (aluminum hydroxyl phosphate) 及氢氧化铝。
- [0704] C138. 如C137的免疫原性组合物, 其中, 该佐剂为磷酸铝。
- [0705] C139. 如C138的免疫原性组合物, 其中, 该佐剂为羟基磷酸铝。
- [0706] C140. 如C67至C139中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物包含缓冲剂、表面活性剂、赋形剂及任选佐剂, 其中, 该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0。
- [0707] C141. 如C67至C140中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物包含组氨酸、聚山梨醇酯-80、NaCl及任选磷酸铝, 其中, 该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0。
- [0708] C142. 如C67至C141中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物包含约10mM至约25mM的组氨酸、约0.01%至约0.03% (v/w) 的聚山梨醇酯-80、约10mM至约250mM的NaCl及任选约0.25mg/ml至约0.75mg/ml的作为磷酸铝的铝。
- [0709] C143. 如C67至C142中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物包含约5mcg/ml至约50mcg/ml的剂量。
- [0710] C144. 如C67至C143中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物任选地在至少一种赋形剂的存在下, 经冷冻干燥。
- [0711] C145. 如C144的免疫原性组合物, 其中, 该至少一种赋形剂选自由下列所组成的群组: 淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇、巴糖醇、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、氯化钠 (NaCl)、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水及乙醇。
- [0712] C146. 如C145的免疫原性组合物, 其中, 该至少一种赋形剂为蔗糖。
- [0713] C147. 如C144至C146中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物包含约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的至少一种赋形剂。

- [0714] C148. 如C144至C147中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物包含另外的赋形剂。
- [0715] C149. 如C148的免疫原性组合物, 其中, 该另外的赋形剂为甘露糖醇或甘氨酸。
- [0716] C150. 如C148或C149的免疫原性组合物, 其中, 该组合物包含约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的另外的赋形剂。
- [0717] C151. 如C143至C150中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该组合物用水、注射用水(WFI)、佐剂悬浮液、或盐水重构。
- [0718] C152. 如C67至C151中任一项的免疫原性组合物, 用于作为药物。
- [0719] C153. 如C67至C152中任一项的免疫原性组合物, 用于诱发受试者对GBS的免疫反应的方法中。
- [0720] C154. 如C153的免疫原性组合物, 其中, 该受试者为计划怀孕的女性或怀孕的女性。
- [0721] C155. 如C154的免疫原性组合物, 其中, 该女性为在其怀孕后半期。
- [0722] C156. 如C155的免疫原性组合物, 其中, 该怀孕女性至少在妊娠20周。
- [0723] C157. 如C156的免疫原性组合物, 其中, 该怀孕女性在妊娠27周至36周。
- [0724] C158. 如C157的免疫原性组合物, 其中, 该受试者为50岁或更年长的成人。
- [0725] C159. 如C158的免疫原性组合物, 其中, 该受试者为65岁或更年长的成人。
- [0726] C160. 如C159的免疫原性组合物, 其中, 该受试者为85岁或更年长的成人。
- [0727] C161. 如C153至C160中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该受试者是免疫功能受损的 (immunocompromised)。
- [0728] C162. 如C161的免疫原性组合物, 其中, 该受试者具有选自由下列所组成的群组的医学状况: 肥胖、糖尿病、HIV感染、癌症、心血管疾病或肝脏疾病。
- [0729] C163. 如C153至C162中任一项的免疫原性组合物, 其中, 该B族链球菌为无乳链球菌。
- [0730] C164. 诱发对B族链球菌的免疫反应的方法, 其包括给受试者施用有效量的如C67至C150中任一项的免疫原性组合物。
- [0731] C165. 预防或减少受试者中与B族链球菌相关的疾病或状况的方法, 其包括给受试者施用有效量的如67至C151中任一项的免疫原性组合物。
- [0732] C166. 如C164或C165的方法, 其中, 该受试者为计划怀孕的女性或怀孕的女性。
- [0733] C167. 如C166的方法, 其中, 该女性为在其怀孕后半期。
- [0734] C168. 如C166或C167的方法, 其中, 该怀孕女性至少在妊娠20周。
- [0735] C169. 如C166至C168中任一项的方法, 其中, 该怀孕女性在妊娠27周至36周。
- [0736] C170. 如C164或C165的方法, 其中, 该受试者为50岁或更年长的成人。
- [0737] C171. 如C170的方法, 其中, 该受试者为成人65岁或更年长的成人。
- [0738] C172. 如C170或C171的方法, 其中, 该受试者为85岁或更年长的成人。
- [0739] C173. 如C164至C172中任一项的方法, 其中, 该受试者是免疫功能受损的。
- [0740] C174. 如C173的方法, 其中, 该受试者具有选自由下列所组成的群组的医学状况: 肥胖、糖尿病、HIV感染、癌症、心血管疾病、或肝脏疾病。
- [0741] C175. 如C164至C174中任一项的方法, 其中, 该B族链球菌为无乳链球菌。

- [0742] C176. 抗体,其结合至如C1至C49或C66中任一项的免疫原性缀合物中的荚膜多糖。
- [0743] C177. 组合物,其包含如C176的抗体。
- [0744] C178. 制造抗体的方法,其包括给受试者施用如C67至C151中任一项的免疫原性组合物。
- [0745] C179. 抗体,其通过如C178的方法产生。
- [0746] C180. 赋予受试者被动免疫力的方法,其包括下列步骤:
- [0747] (a) 使用如C67至C151中任一项的免疫原性组合物产生抗体制剂;以及
- [0748] (b) 给受试者施用该抗体制剂以赋予被动免疫力。
- [0749] C181. 制造如C1至C49或C66中任一项的免疫原性多糖-蛋白质缀合物的方法,其包括下列步骤:
- [0750] (a) 使GBS荚膜多糖与氧化剂反应,以产生经活化的多糖;
- [0751] (b) 使该经活化的多糖与载体蛋白反应以产生多糖-蛋白质缀合物。
- [0752] C182. 如C181的方法,其中,步骤(b)在极性非质子性溶剂中进行。
- [0753] C183如C182的方法,其中,该溶剂选自由下列所组成的群组:二甲亚砜(DMSO)、环丁砜(sulfolane)、二甲基甲酰胺(DMF)及六甲基磷酰胺(hexamethylphosphoramide)(HMPA)。
- [0754] C184. 如C183的方法,其中,该溶剂为二甲基亚砜(DMSO)。
- [0755] C185. 如C181至C184中任一项的方法,其中,该多糖与0.01至10.0摩尔当量的氧化剂反应。
- [0756] C186. 如C181至C185中任一项的方法,其中,该氧化剂为高碘酸盐。
- [0757] C187. 如C186的方法,其中,该高碘酸盐为高碘酸钠。
- [0758] C188. 如C181至C187中任一项的方法,其中,该步骤(a)的氧化反应为1小时至50小时。
- [0759] C189. 如C181至C188中任一项的方法,其中,氧化反应的温度保持在约2°C至约25°C。
- [0760] C190. 如C181至C189中任一项的方法,其中,氧化反应在选自由下列所组成的群组的缓冲剂中进行:磷酸钠、磷酸钾、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)及Bis-Tris。
- [0761] C191. 如C190的方法,其中,该缓冲剂的浓度为约1mM至约500mM。
- [0762] C192. 如C181至C191中任一项的方法,其中,氧化反应在pH约4.0至约8.0进行。
- [0763] C193. 如C181的方法,其中,该氧化剂为2,2,6,6-四甲基-1-哌啶基氧(TEMPO)。
- [0764] C194. 如C193的方法,其中N-氯琥珀酰亚胺(NCS)为共氧化剂。
- [0765] C195. 如C181至C194中任一项的方法,其中,步骤(a)进一步包含通过加入淬灭剂来淬灭氧化反应。
- [0766] C196. 如C182至C195中任一项的方法,其中,该多糖的浓度为约0.1mg/mL至约10.0mg/mL。
- [0767] C197. 如C181至C196中任一项的方法,其中,该经活化的多糖的氧化程度为5至25。
- [0768] C198. 如C181至C197中任一项的方法,其中,该方法进一步包括冷冻干燥该经活化的多糖的步骤。
- [0769] C199. 如C188的方法,其中,该经活化的多糖在选自由下列所组成的群组的糖的存

在下被冷冻干燥：蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇和巴糖醇。

[0770] C200. 如C181至C199中任一项的方法, 其中, 步骤 (b) 包含:

[0771] (1) 混合该经活化的多糖与载体蛋白, 以及

[0772] (2) 使经混合的经活化的多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成GBS荚膜多糖-载体蛋白缀合物。

[0773] C201. 如C200的方法, 其中, 步骤 (2) 中的经活化的多糖的浓度为约0.1mg/mL至约10.0mg/mL。

[0774] C202. 如C200或C201的方法, 其中, 该经活化的多糖对载体蛋白的初始比率(重量/重量)为约5:1至0.1:1。

[0775] C203. 如C200至C202中任一项的方法, 其中, 该还原剂选自由下列所组成的群组: 氰基硼氢化钠(sodium cyanoborohydride)、三乙酰氧基硼氢化钠(sodium triacetoxyborohydride)、布朗斯台德酸(Bronsted acid)或路易斯酸(Lewis acid)存在下的硼氢化钠和硼氢化锌、吡啶硼烷(pyridine borane)、2-甲吡啶硼烷(2-picoline borane)、2,6-二硼烷-甲醇(2,6-diborane-methanol)、二甲胺-硼烷(dimethylamine-borane)、t-BuMe¹PrN-BH₃、苄胺-BH₃或5-乙基-2-甲吡啶硼烷(5-ethyl-2-methylpyridine borane) (PEMB)。

[0776] C204. 如C203的方法, 其中, 该还原剂为氰基硼氢化钠。

[0777] C205. 如C200至C204中任一项的方法, 其中, 该还原剂的量为约0.1至约10.0摩尔当量。

[0778] C206. 如C200至C205中任一项的方法, 其中, 步骤 (2) 的还原反应的持续时间为1小时至60小时。

[0779] C207. 如C200至C206中任一项的方法, 其中, 还原反应的温度保持在10°C至40°C。

[0780] C208. 如C181至C207中任一项的方法, 其中, 该方法进一步包括通过添加硼氢化物来将未反应的醛封端的步骤(步骤(c))。

[0781] C209. 如C208的方法, 其中, 该硼氢化物的量为约0.1至约10.0摩尔当量。

[0782] C210. 如C208的方法, 其中, 该硼氢化物选自由下列所组成的群组: 硼氢化钠(NaBH₄)、氰基硼氢化钠、硼氢化锂、硼氢化钾、四丁基硼氢化铵(tetrabutylammonium borohydride)、硼氢化钙及硼氢化镁。

[0783] C211. 如C209的方法, 其中, 该硼氢化物为硼氢化钠(NaBH₄)。

[0784] C212. 如C207至C211中任一项的方法, 其中, 封端步骤的持续时间为0.1至10小时。

[0785] C213. 如C207至C212中任一项的方法, 其中, 封端步骤的温度保持在约15°C至约45°C。

[0786] C214. 如C181至C213中任一项的方法, 其中, 该方法进一步包括纯化该多糖-蛋白质缀合物的步骤。

[0787] C215. 如C181至C214中任一项的方法, 其中, 该多糖-蛋白质缀合物包含与多糖的总量相较下为少于约40%的游离多糖。

[0788] C216. 如C181至C215中任一项的方法, 其中, 该缀合物中的多糖对载体蛋白的比率(重量/重量)为约0.5至约3.0。

- [0789] C217. 如C181至C216中任一项的方法,其中,该缀合物的缀合程度为2至15。
- [0790] C218. 制造多糖-蛋白质缀合物的方法,其包括下列步骤:
- [0791] (a) 使经分离的GBS荚膜多糖与氧化剂反应;
- [0792] (b) 通过加入淬灭剂来淬灭步骤(a)的氧化反应以产生经活化的GBS荚膜多糖;
- [0793] (c) 混合该经活化的GBS荚膜多糖与载体蛋白,
- [0794] (d) 使经混合的活化的GBS荚膜多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成GBS荚膜多糖-载体蛋白缀合物,以及
- [0795] (e) 通过加入硼氢化钠(NaBH_4)来将未反应的醛封端,其中,步骤(c)和(d)在DMSO中进行。
- [0796] 本发明还涉及以下实施方式:
- [0797] 1. 一种免疫原性多糖-蛋白质缀合物,其包含B族链球菌(GBS)荚膜多糖和载体蛋白,其中,该荚膜多糖的唾液酸水平高于约60%、高于约95%、或为约100%。
- [0798] 2. 如实施方式1的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖选自由下列所组成的群组:血清型Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及IX。
- [0799] 3. 如实施方式1或2的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM多糖中具有至少约0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9或0.95mM的唾液酸。
- [0800] 4. 如实施方式1-3中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖的分子量为约5kDa至约1,000kDa、约25kDa至约750kDa、约25kDa至约400kDa、约25kDa至约200kDa、或约100kDa至约400kDa。
- [0801] 5. 如实施方式1-4中任一项的免疫原性缀合物,其中,该缀合物的分子量为约300kDa至约20,000kDa、约1,000kDa至约15,000kDa、或约1,000kDa至约10,000kDa。
- [0802] 6. 如实施方式1-5中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖的O-乙酰化为约0%至约40%。
- [0803] 7. 如实施方式1-6中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖的O-乙酰化为少于约5%、少于约4%、少于约3%、少于约2%、或少于约1%。
- [0804] 8. 如实施方式1-7中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM糖重复单元中具有至少约0.1、0.2、0.3、0.35或约0.4mM O-乙酸酯。
- [0805] 9. 如实施方式1-7中任一项的免疫原性缀合物,其中,该荚膜多糖于每mM糖重复单元中具有至少约0.01、0.02、0.03、0.04、或0.05mM O-乙酸酯。
- [0806] 10. 如实施方式1-9中任一项的免疫原性缀合物,其中,该载体蛋白为CRM₁₉₇、或破伤风类毒素。
- [0807] 11. 如实施方式10的免疫原性缀合物,其中,该载体蛋白为CRM₁₉₇。
- [0808] 12. 一种分离荚膜多糖的方法,其包括使有机试剂与包含产荚膜多糖的细菌的细胞培养液反应。
- [0809] 13. 如实施方式12的方法,其中,该细菌是未经裂解的。
- [0810] 14. 如实施方式12或13的方法,其中,该细菌是经热杀死的。
- [0811] 15. 如实施方式12-14中任一项的方法,其中,该方法进一步包括离心步骤以提供细胞糊状物。
- [0812] 16. 如实施方式12-15中任一项的方法,其中,该方法进一步包括过滤步骤。

- [0813] 17. 如实施方式16的方法,其中,所述过滤步骤为渗滤。
- [0814] 18. 如实施方式12-17中任一项的方法,其中,该产荚膜多糖的细菌选自由下列所组成的群组:无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、伤寒沙门杆菌(*Salmonella typhi*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、克雷白氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)及粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)。
- [0815] 19. 如实施方式18的方法,其中,该细菌为无乳链球菌。
- [0816] 20. 如实施方式12-19中任一项的方法,其中,所述有机试剂为衍生的羟胺化合物。
- [0817] 21. 如实施方式12-20中任一项的方法,其中,羟胺为实施例2的表2中所列的任何羟胺。
- [0818] 22. 如实施方式12-21中任一项的方法,其中,羟胺选自由下列所组成的群组:二苄基羟胺;二乙基羟胺;羟胺;乙二胺;三乙四胺;1,1,4,7,10,10六甲基三乙四胺;及2,6,10三甲基2,6,10三氮杂十一烷。
- [0819] 23. 如实施方式12-22中任一项的方法,其中,羟胺的浓度为约5mM至约200mM。
- [0820] 24. 如实施方式12-23中任一项的方法,其中,反应的pH为约5.5至约9.5。
- [0821] 25. 如实施方式12-24中任一项的方法,其中,反应在约20°C至约85°C的温度进行。
- [0822] 26. 如实施方式12-26中任一项的方法,其中,反应时间为约10小时至约90小时。
- [0823] 27. 一种制造如实施方式1至11中任一项的免疫原性多糖-蛋白质缀合物的方法,其中,该荚膜多糖根据如实施方式12至26中任一项的方法分离。
- [0824] 28. 一种免疫原性多糖-蛋白质缀合物,其包含通过如实施方式12至26中任一项的方法制造的荚膜多糖。
- [0825] 29. 一种免疫原性组合物,其包含如实施方式1至11或28中任一项的免疫原性多糖-蛋白质缀合物。
- [0826] 30. 一种免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自B族链球菌(GBS)血清型IV及至少一种另外的血清型的荚膜多糖,该另外的血清型选自由下列所组成的群组:Ia、Ib、II、III、V、VI、VII、VIII及IX。
- [0827] 31. 一种免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自GBS血清型Ia、Ib、II、III及IV的荚膜多糖。
- [0828] 32. 一种免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自GBS血清型Ia、Ib、II、III及V的荚膜多糖。
- [0829] 33. 一种免疫原性组合物,其包含多糖-蛋白质缀合物,其中,该缀合物包含来自GBS血清型Ia、Ib、II、III、IV及V的荚膜多糖。
- [0830] 34. 一种包括多糖-蛋白质缀合物的免疫原性组合物,该多糖-蛋白质缀合物包含至少四种选自由下列所组成的群组的GBS荚膜多糖血清型:Ia、Ib、II、III、IV、V、VI、VII、VIII及IX。
- [0831] 35. 如实施方式34的免疫原性组合物,其中,该组合物包含GBS荚膜多糖血清型V。
- [0832] 36. 如实施方式34或35的免疫原性组合物,其中,该组合物不具有免疫干扰。
- [0833] 37. 如实施方式29-36中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物进一步包含药

学上可接受的赋形剂、缓冲剂、稳定剂、佐剂、冷冻保护剂、盐、二价阳离子、非离子性洗涤剂、自由基氧化抑制剂、载体、或其混合物。

[0834] 38. 如实施方式29-37中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物进一步包含缓冲剂。

[0835] 39. 如实施方式38的免疫原性组合物,其中,该缓冲剂选自由下列所组成的群组: HEPES、PIPES、MES、Tris(氨基丁三醇)、磷酸盐、乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸及琥珀酸盐。

[0836] 40. 如实施方式39的免疫原性组合物,其中,该缓冲剂为组氨酸。

[0837] 41. 如实施方式29-40中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物进一步包含表面活性剂。

[0838] 42. 如实施方式41的免疫原性组合物,其中,该表面活性剂选自由下列所组成的群组: 聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯、聚山梨醇酯-80、聚山梨醇酯-60、聚山梨醇酯-40、聚山梨醇酯-20及聚氧乙烯烷基醚。

[0839] 43. 如实施方式42的免疫原性组合物,其中,该表面活性剂为聚山梨醇酯-80。

[0840] 44. 如实施方式29-43中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物进一步包含赋形剂。

[0841] 45. 如实施方式44的免疫原性组合物,其中,该赋形剂选自由下列所组成的群组: 淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇、巴糖醇、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、氯化钠(NaCl)、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水及乙醇。

[0842] 46. 如实施方式45的免疫原性组合物,其中,该赋形剂为氯化钠。

[0843] 47. 如实施方式29-46中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物进一步包含佐剂。

[0844] 48. 如实施方式47的免疫原性组合物,其中,该佐剂为基于铝的佐剂或QS-21。

[0845] 49. 如实施方式48的免疫原性组合物,其中,该基于铝的佐剂选自由下列所组成的群组: 磷酸铝、羟基磷酸铝及氢氧化铝。

[0846] 50. 如实施方式49的免疫原性组合物,其中,该佐剂为磷酸铝。

[0847] 51. 如实施方式49的免疫原性组合物,其中,该佐剂为羟基磷酸铝。

[0848] 52. 如实施方式29-51中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物包含缓冲剂、表面活性剂、赋形剂及任选佐剂,其中,该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0。

[0849] 53. 如实施方式29-52中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物包含组氨酸、聚山梨醇酯-80、氯化钠及任选磷酸铝,其中,该组合物被缓冲成pH为约6.0至约7.0。

[0850] 54. 如实施方式29-53中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物包含约10mM至约25mM的组氨酸、约0.01%至约0.03%(v/w)的聚山梨醇酯-80、约10mM至约250mM的氯化钠及任选约0.25mg/ml至约0.75mg/ml的作为磷酸铝的铝。

[0851] 55. 如实施方式29-54中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物包含约5mcg/ml至约50mcg/ml的剂量。

[0852] 56. 如实施方式29-55中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物,任选地在至少一种赋形剂的存在下,经冷冻干燥。

- [0853] 57. 如实施方式56的免疫原性组合物,其中,该至少一种赋形剂选自由下列所组成的群组:淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇、巴糖醇、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、甘氨酸、精氨酸、赖氨酸、氯化钠(NaCl)、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水及乙醇。
- [0854] 58. 如实施方式57的免疫原性组合物,其中,该至少一种赋形剂为蔗糖。
- [0855] 59. 如实施方式56-58中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物包含约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的至少一种赋形剂。
- [0856] 60. 如实施方式56-59中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物包含另外的赋形剂。
- [0857] 61. 如实施方式60的免疫原性组合物,其中,该另外的赋形剂为甘露糖醇、或甘氨酸。
- [0858] 62. 如实施方式60或61的免疫原性组合物,其中,该组合物包含约1% (w/v) 至约10% (w/v) 的另外的赋形剂。
- [0859] 63. 如实施方式29-66中任一项的免疫原性组合物,其中,该组合物用水、注射用水(WFI)、佐剂悬浮液或盐水重构。
- [0860] 64. 如实施方式29-63中任一项的免疫原性组合物,用于作为药物。
- [0861] 65. 如实施方式29-63中任一项的免疫原性组合物,用于诱发受试者对GBS的免疫反应的方法中。
- [0862] 66. 如实施方式65的免疫原性组合物,其中,该受试者为计划怀孕的女性或怀孕的女性。
- [0863] 67. 如实施方式66的免疫原性组合物,其中,该女性为在其怀孕后半期,至少在妊娠20周、或在妊娠27周至36周。
- [0864] 68. 如实施方式65的免疫原性组合物,其中,该受试者为50岁或更年长的成人、65岁或更年长的成人、或85岁或更年长的成人。
- [0865] 69. 如实施方式65-68中任一项的免疫原性组合物,其中,该受试者是免疫功能受损的。
- [0866] 70. 如实施方式69的免疫原性组合物,其中,该受试者具有选自由下列所组成的群组的医学状况:肥胖、糖尿病、HIV感染、癌症、心血管疾病、或肝脏疾病。
- [0867] 71. 如实施方式65-70中任一项的免疫原性组合物,其中,该B族链球菌为无乳链球菌。
- [0868] 72. 一种诱发针对B族链球菌的免疫反应的方法,包括向受试者施用有效量的如实施方式29至63中任一项的免疫原性组合物。
- [0869] 73. 一种预防或减轻受试者的与B族链球菌相关的疾病或状况的方法,包括向受试者施用有效量的如实施方式29至63中任一项的免疫原性组合物。
- [0870] 74. 如实施方式72或73的方法,其中,该受试者为计划怀孕的女性或怀孕的女性。
- [0871] 75. 如实施方式74的方法,其中,该女性为在其怀孕后半期,至少在妊娠20周、或在妊娠27周至36周。
- [0872] 76. 如实施方式72或73的方法,其中,该受试者为50岁或更年长的成人、65岁或更年长的成人、或85岁或更年长的成人。

- [0873] 77. 如实施方式72-76中任一项的方法,其中,该受试者是免疫功能受损的。
- [0874] 78. 如实施方式77的方法,其中,该受试者具有选自由下列所组成的群组的医学状况:肥胖、糖尿病、HIV感染、癌症、心血管疾病、或肝脏疾病。
- [0875] 79. 如实施方式72-78中任一项的方法,其中,该B族链球菌为无乳链球菌。
- [0876] 80. 一种抗体,其结合如实施方式1至11或28中任一项的免疫原性缀合物中的荚膜多糖。
- [0877] 81. 一种组合物,其包含如实施方式80的抗体。
- [0878] 82. 一种产生抗体的方法,包括向受试者施用如实施方式29至63中任一项的免疫原性组合物。
- [0879] 83. 一种通过如实施方式82的方法而产生的抗体。
- [0880] 84. 一种赋予受试者被动免疫力的方法,包括以下步骤:
- [0881] (a) 使用如实施方式29至63中任一项的免疫原性组合物产生抗体制剂,和
- [0882] (b) 将该抗体制剂施用至受试者以赋予被动免疫力。
- [0883] 85. 一种制造如实施方式1至11或28中任一项的免疫原性多糖-蛋白质缀合物的方法,其包括下列步骤:
- [0884] (a) 使GBS荚膜多糖与氧化剂反应以产生经活化的多糖;以及
- [0885] (b) 使该经活化的多糖与载体蛋白反应以产生多糖-蛋白质缀合物。
- [0886] 86. 如实施方式85的方法,其中,步骤(b)在极性非质子性溶剂中进行。
- [0887] 87. 如实施方式86的方法,其中,该溶剂选自由下列所组成的群组:二甲亚砜(DMSO)、环丁砜、二甲基甲酰胺(DMF)及六甲基磷酰胺(HMPA)。
- [0888] 88. 如实施方式87的方法,其中,该溶剂为二甲亚砜(DMSO)。
- [0889] 89. 如实施方式85-88中任一项的方法,其中,将多糖与0.01至10.0摩尔当量的氧化剂反应。
- [0890] 90. 如实施方式85-89中任一项的方法,其中,该氧化剂为高碘酸盐。
- [0891] 91. 如实施方式90的方法,其中,该高碘酸盐为高碘酸钠。
- [0892] 92. 如实施方式85-91中任一项的方法,其中,步骤(a)的氧化反应为1小时至50小时。
- [0893] 93. 如实施方式85-92中任一项的方法,其中,氧化反应的温度保持在约2°C至约25°C。
- [0894] 94. 如实施方式85-93中任一项的方法,其中,氧化反应在选自由下列所组成的群组的缓冲剂中进行:磷酸钠、磷酸钾、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)及Bis-Tris。
- [0895] 95. 如实施方式94的方法,其中,该缓冲剂的浓度为约1mM至约500mM。
- [0896] 96. 如实施方式85-95中任一项的方法,其中,氧化反应在pH为约4.0至约8.0进行。
- [0897] 97. 如实施方式85的方法,其中,该氧化剂为2,2,6,6-四甲基-1-哌啶基氧(TEMPO)。
- [0898] 98. 如实施方式97的方法,其中,N-氯琥珀酰亚胺(NCS)为共氧化剂。
- [0899] 99. 如实施方式85-98中任一项的方法,其中,步骤(a)进一步包括通过加入淬灭剂来淬灭氧化反应。
- [0900] 100. 如实施方式85-99中任一项的方法,其中,该多糖的浓度为约0.1mg/mL至约

10.0mg/mL。

[0901] 101.如实施方式85-100中任一项的方法,其中,该经活化的多糖的氧化程度为5至25。

[0902] 102.如实施方式85-101中任一项的方法,其中,该方法进一步包括冷冻干燥该经活化的多糖的步骤。

[0903] 103.如实施方式102的方法,其中,该经活化的多糖在选自由下列所组成的群组的糖的存在下被冷冻干燥:蔗糖、海藻糖、棉子糖、水苏糖、松三糖、葡聚糖、甘露糖醇、乳糖醇和巴糖醇。

[0904] 104.如实施方式85-103中任一项的方法,其中,步骤(b)包括:

[0905] (1)混合该经活化的多糖与载体蛋白,以及

[0906] (2)使经混合的经活化的多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成GBS荚膜多糖-载体蛋白缀合物。

[0907] 105.如实施方式104的方法,其中,步骤(2)中的经活化的多糖的浓度为约0.1mg/mL至约10.0mg/mL。

[0908] 106.如实施方式104或105的方法,其中,该经活化的多糖对载体蛋白的初始比率(重量/重量)为约5:1至0.1:1。

[0909] 107.如实施方式104-106中任一项的方法,其中,该还原剂选自由下列所组成的群组:氰基硼氢化钠、三乙酰氧基硼氢化钠、布朗斯台德酸或路易斯酸存在下的硼氢化钠和硼氢化锌、吡啶硼烷、2-甲吡啶硼烷、2,6-二硼烷-甲醇、二甲胺-硼烷、 $t\text{-BuMe}^i\text{PrN-BH}_3$ 、苄胺- BH_3 、或5-乙基-2-甲吡啶硼烷(PEMB)。

[0910] 108.如实施方式107的方法,其中,该还原剂为氰基硼氢化钠。

[0911] 109.如实施方式104-108中任一项的方法,其中,该还原剂的量为约0.1至约10.0摩尔当量。

[0912] 110.如实施方式104-109中任一项的方法,其中,步骤(2)的还原反应的持续时间为1小时至60小时。

[0913] 111.如实施方式104-110中任一项的方法,其中,还原反应的温度保持在10°C至40°C。

[0914] 112.如实施方式104-111中任一项的方法,其中,该方法进一步包括通过加入硼氢化物来将未反应的醛封端的步骤(步骤(c))。

[0915] 113.如实施方式112的方法,其中,该硼氢化物的量为约0.1至约10.0摩尔当量。

[0916] 114.如实施方式112的方法,其中,该硼氢化物选自由下列所组成的群组:硼氢化钠(NaBH_4)、氰基硼氢化钠、硼氢化锂、硼氢化钾、四丁基硼氢化铵、硼氢化钙及硼氢化镁。

[0917] 115.如实施方式114的方法,其中,该硼氢化物为硼氢化钠(NaBH_4)。

[0918] 116.如实施方式112-114中任一项的方法,其中,封端步骤的持续时间为0.1小时至10小时。

[0919] 117.如实施方式112-116中任一项的方法,其中,封端步骤的温度保持在约15°C至约45°C。

[0920] 118.如实施方式85-117中任一项的方法,其中,该方法进一步包括纯化该多糖-蛋白质缀合物的步骤。

[0921] 119. 如实施方式85-118中任一项的方法, 其中, 该多糖-蛋白质缀合物包含与多糖的总量相较下为少于约40%的游离多糖。

[0922] 120. 如实施方式85-119中任一项的方法, 其中, 该缀合物中的多糖对载体蛋白的比率(重量/重量)为约0.5至约3.0。

[0923] 121. 如实施方式85-120中任一项的方法, 其中, 该缀合物的缀合程度为2至15。

[0924] 122. 一种制造多糖-蛋白质缀合物的方法, 其包括下列步骤:

[0925] (a) 使经分离的GBS荚膜多糖与氧化剂反应;

[0926] (b) 通过加入淬灭剂来淬灭步骤(a)的氧化反应以产生经活化的GBS荚膜多糖;

[0927] (c) 混合该经活化的GBS荚膜多糖与载体蛋白,

[0928] (d) 使该经混合的经活化的GBS荚膜多糖和载体蛋白与还原剂反应以形成GBS荚膜多糖-载体蛋白缀合物, 以及

[0929] (e) 通过加入硼氢化钠(NaBH_4)来将未反应的醛封端,

[0930] 其中, 步骤(c)和(d)在DMSO中进行。

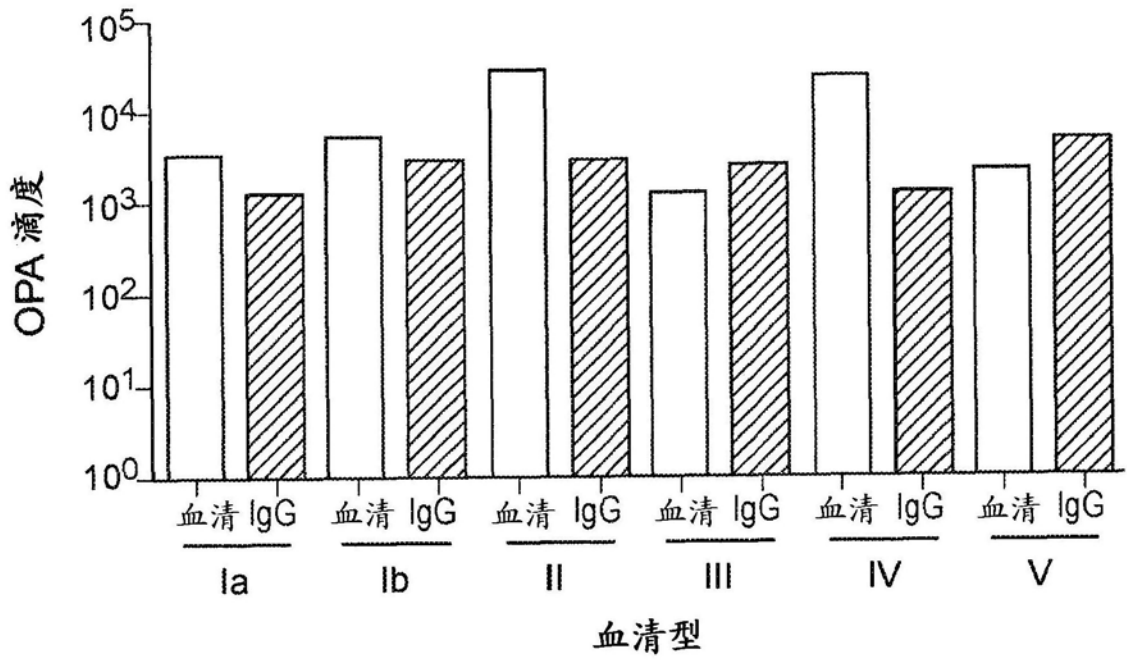


图1

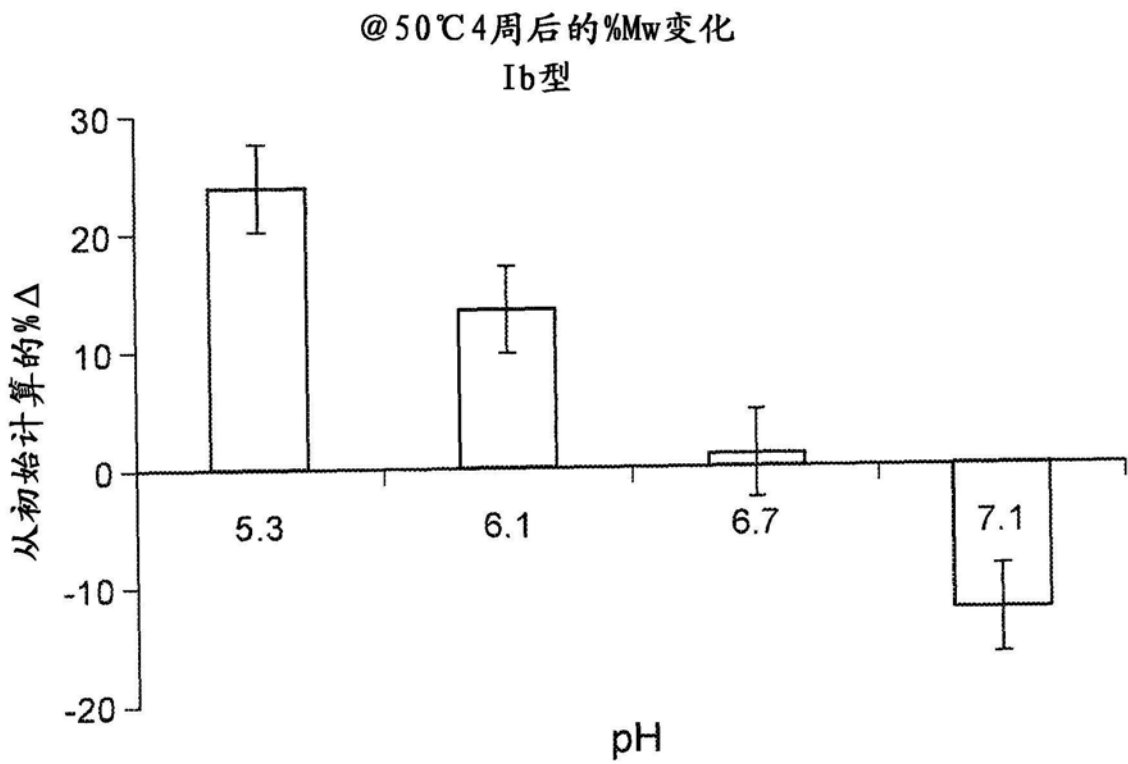


图2

@ 50°C 4周后的%Mw变化
Ib型

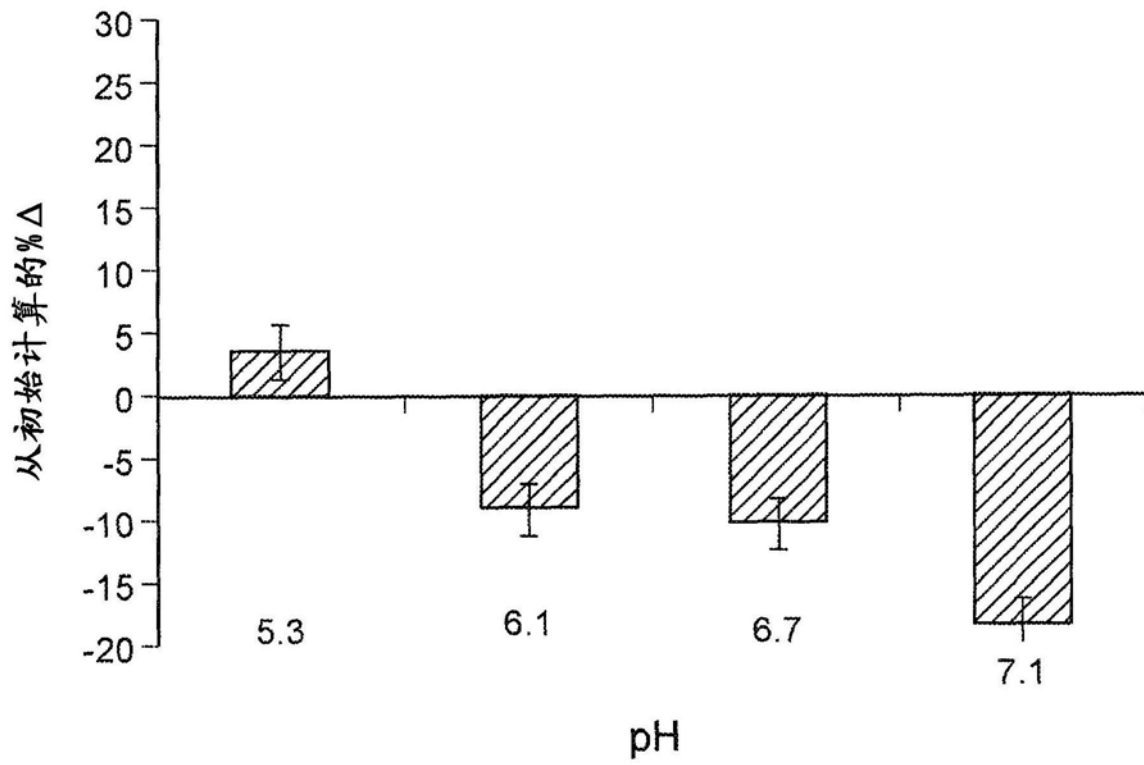


图3

II型
@50°C4周后的%Mw变化

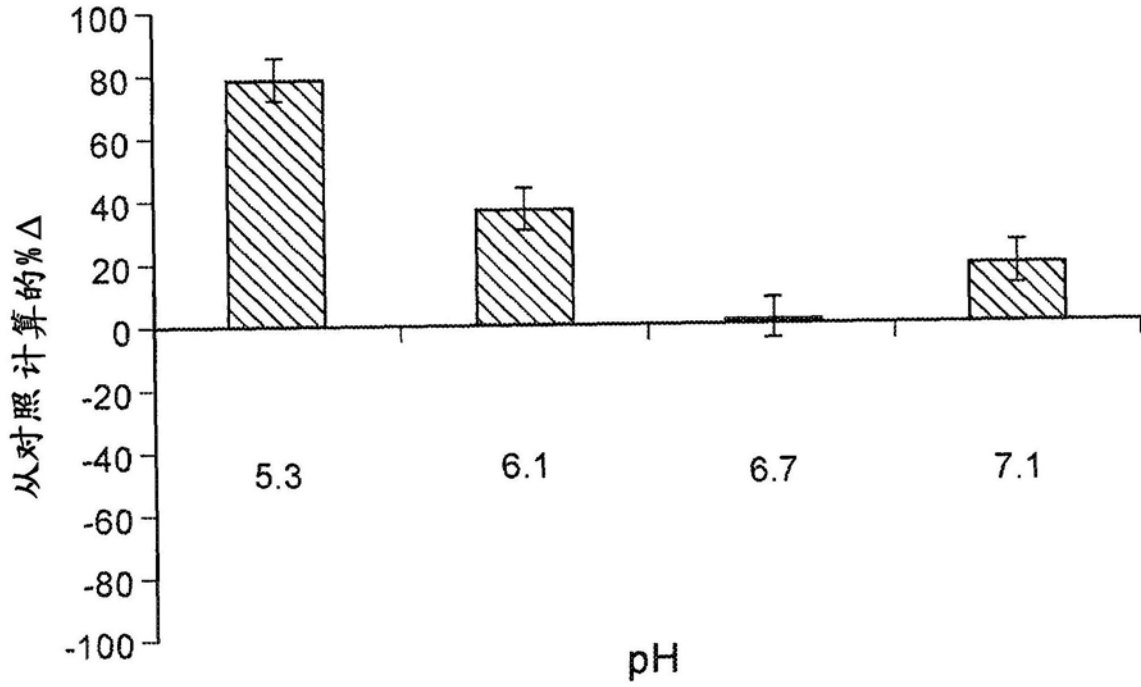


图4

III型
@50°C 4周后的%Mw变化

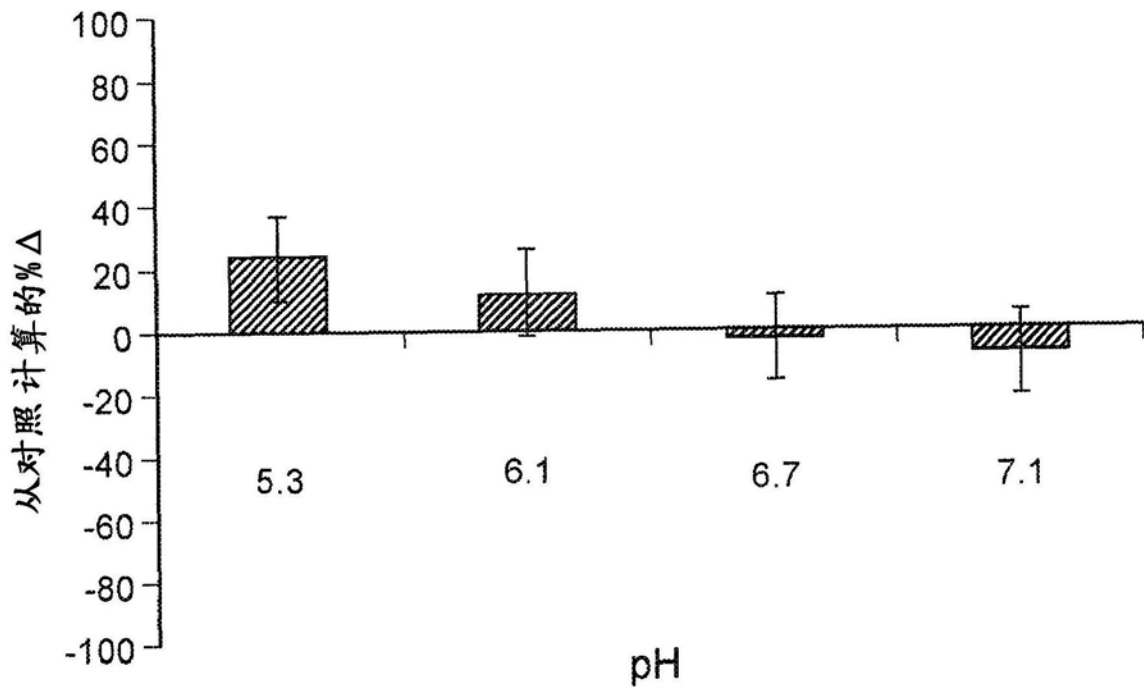


图5

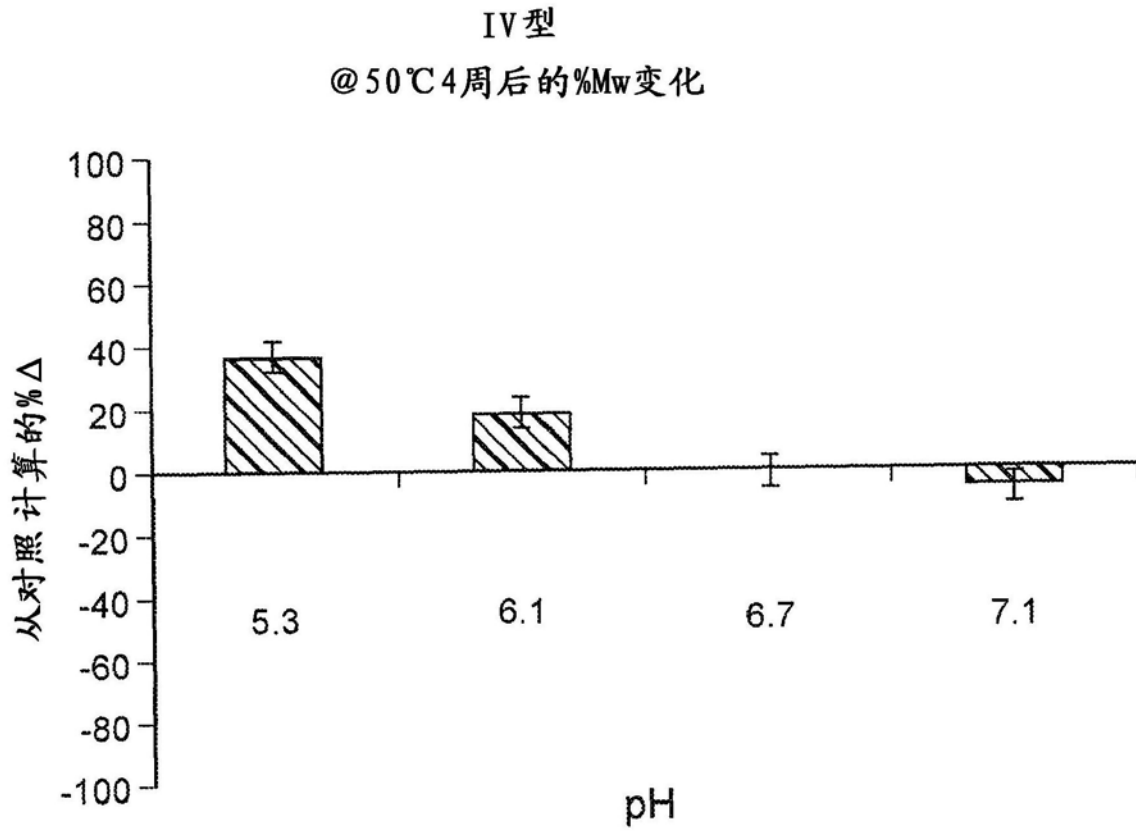


图6

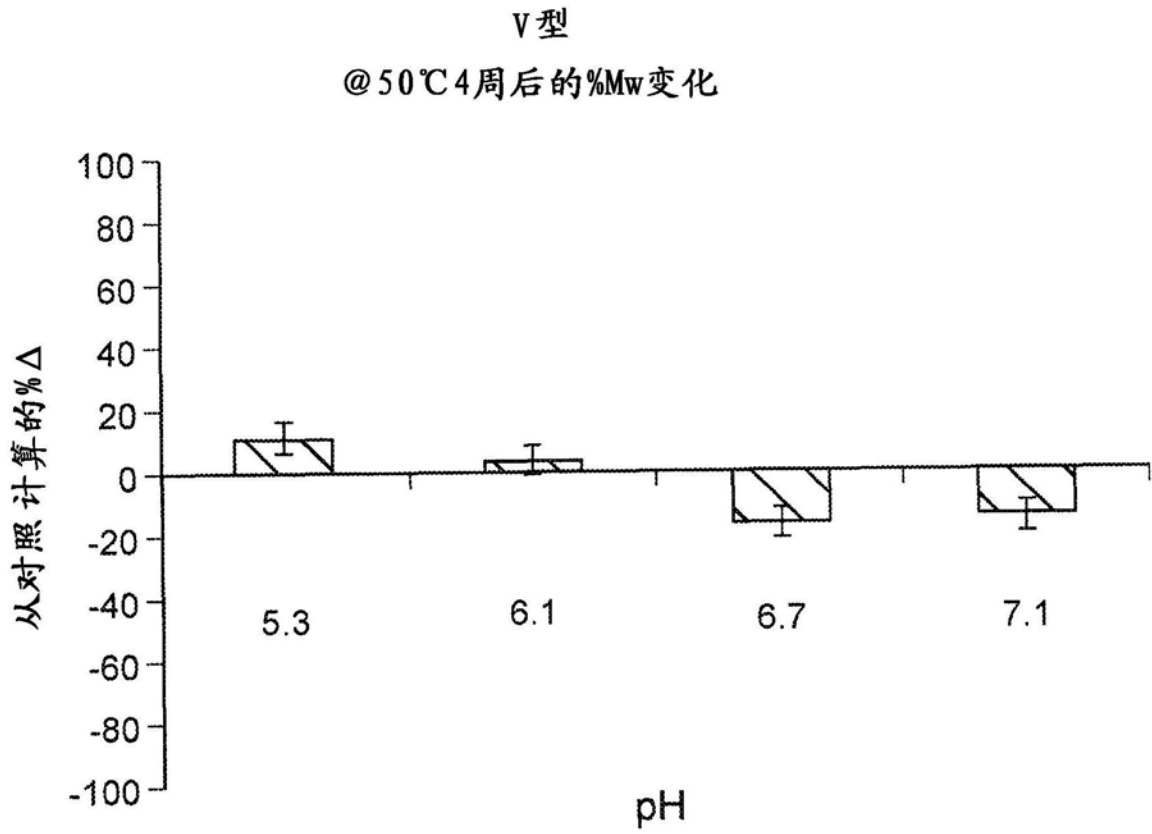


图7

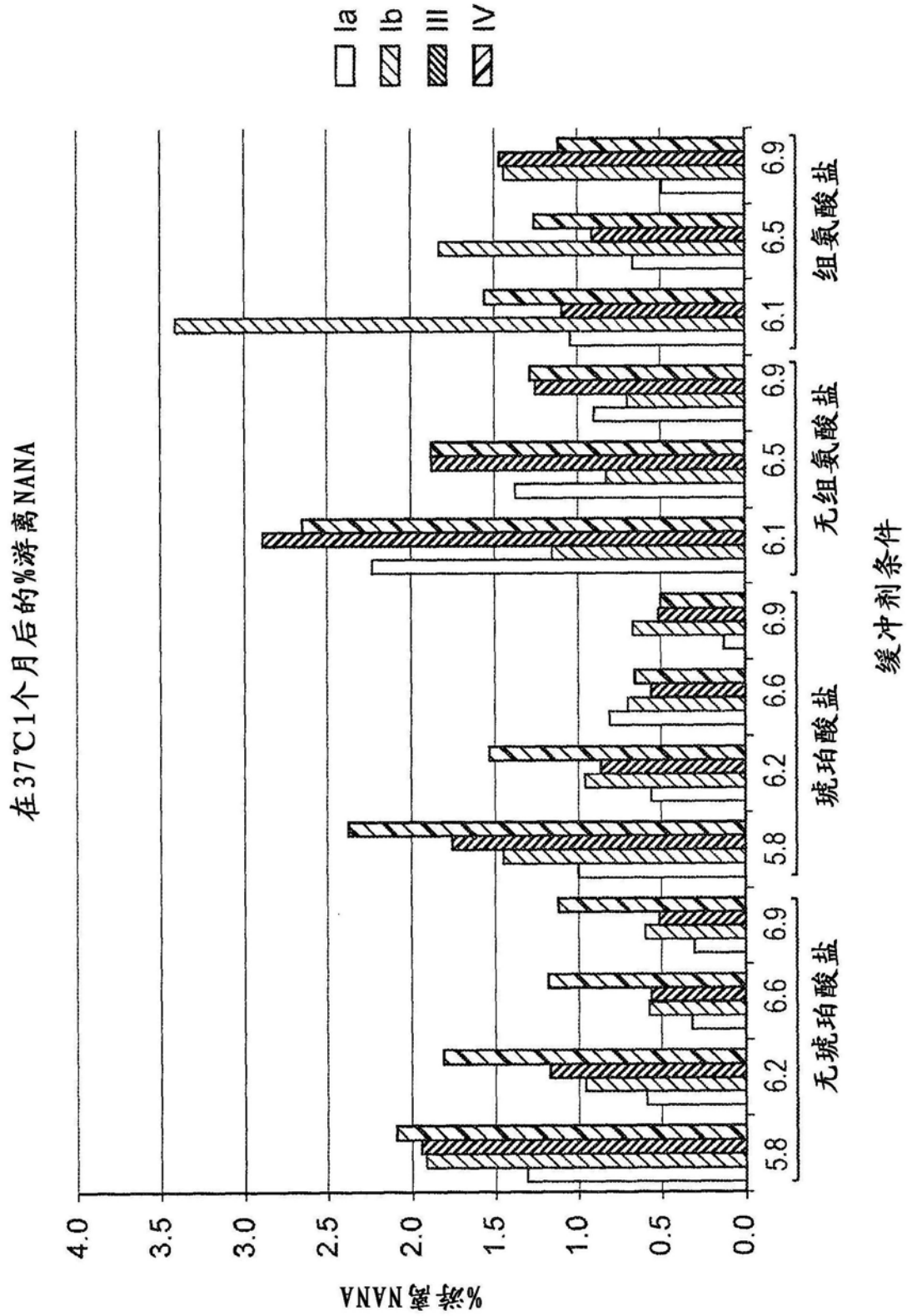


图8

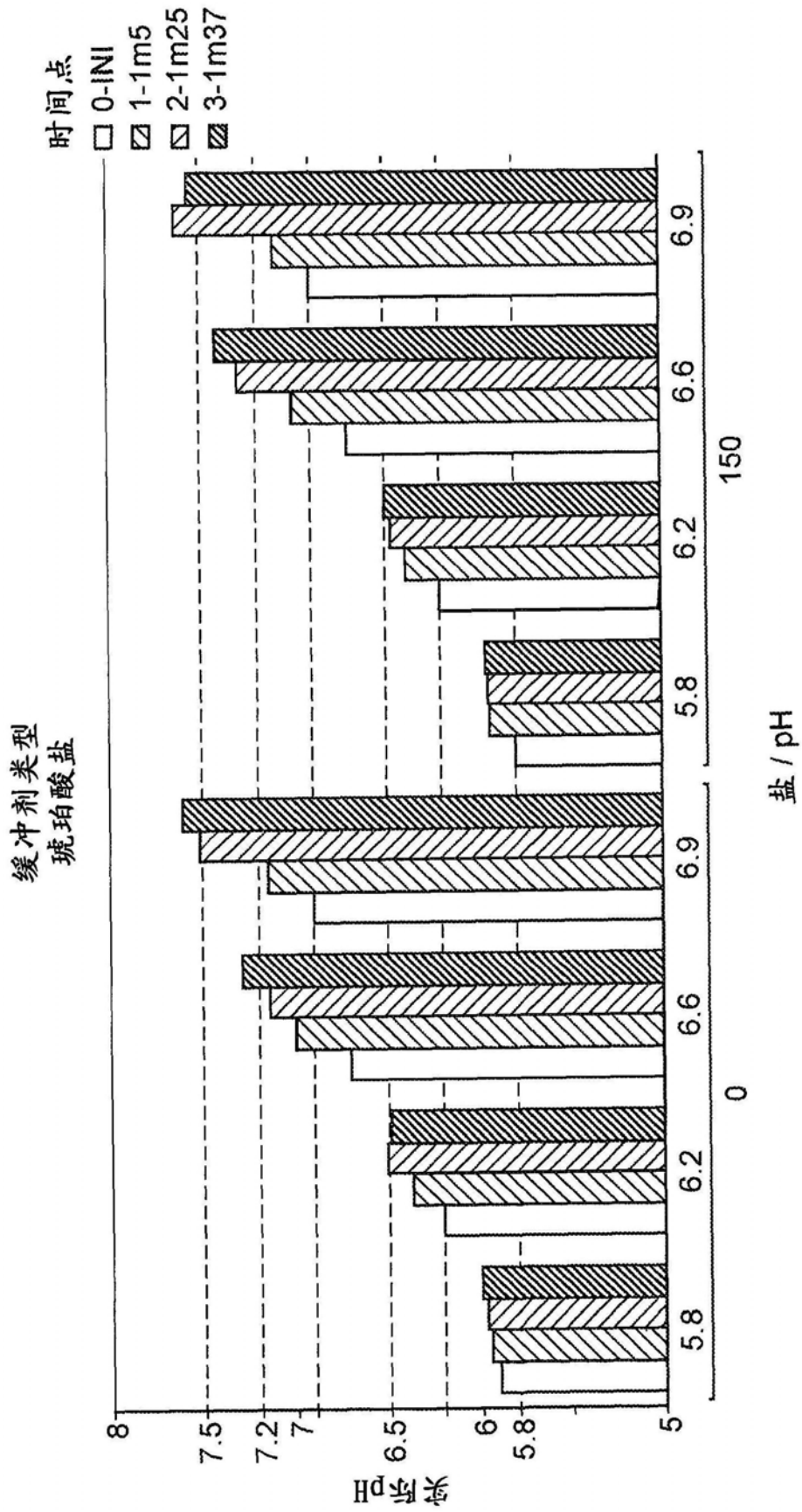


图9

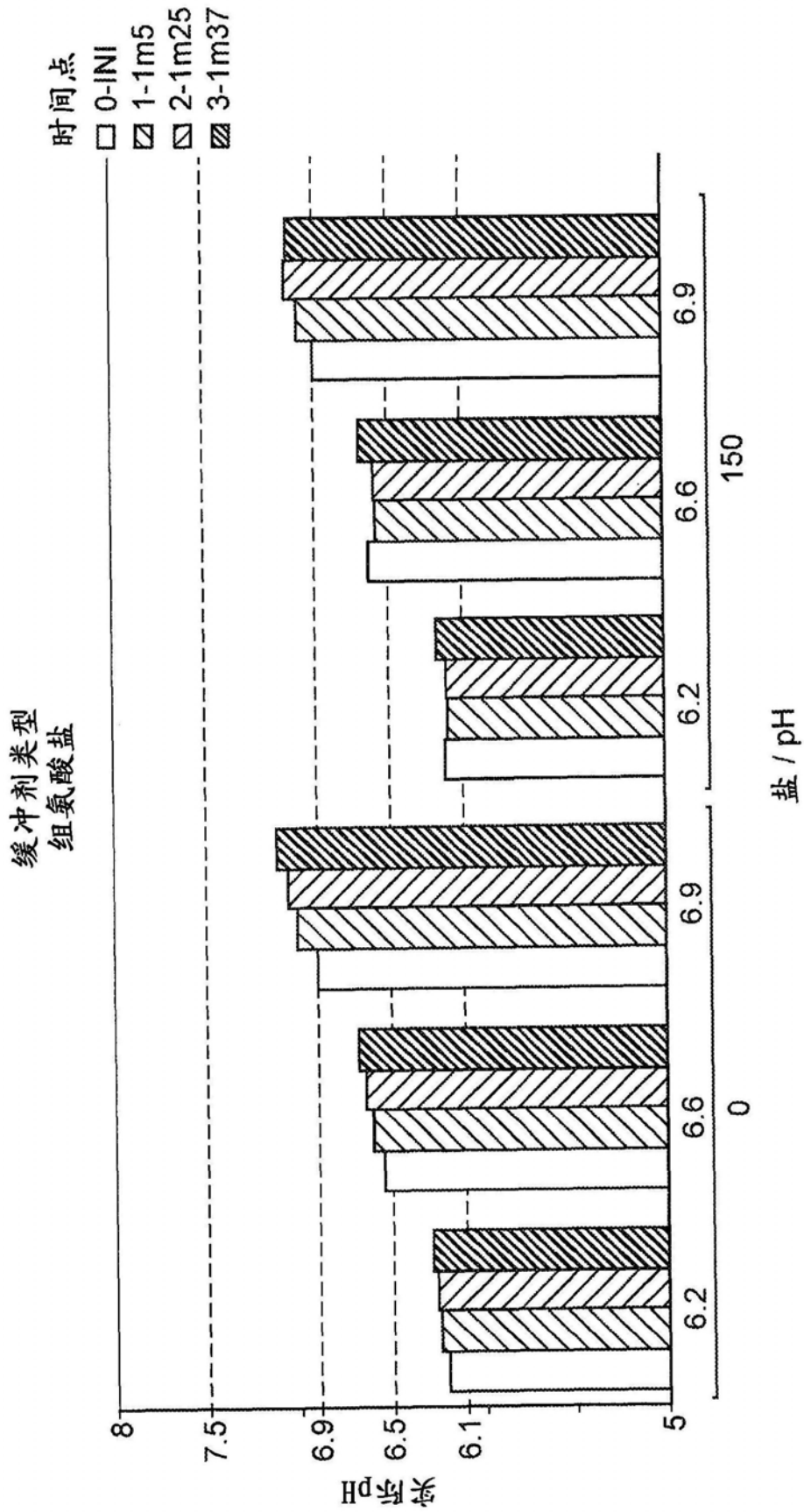


图10

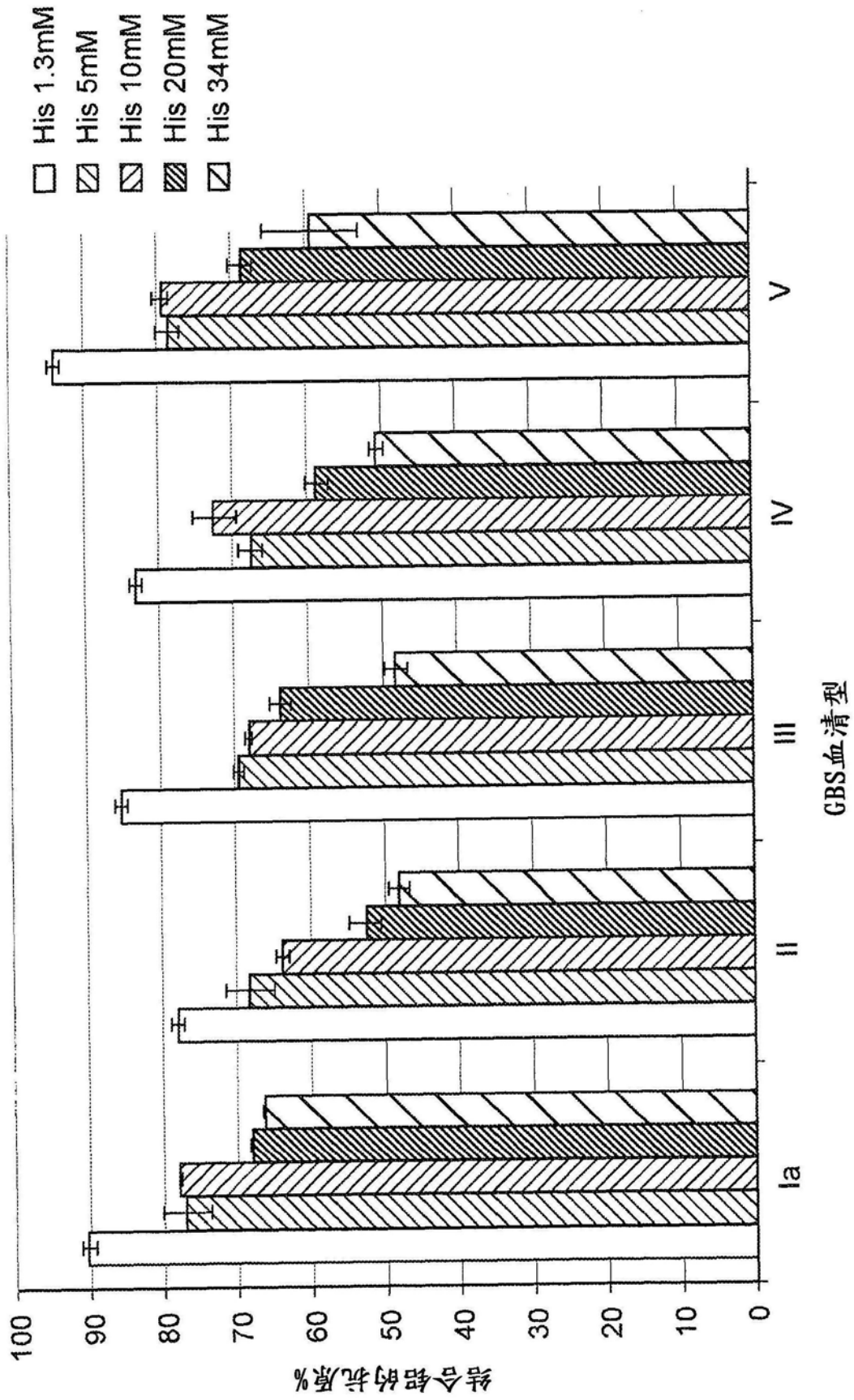


图11

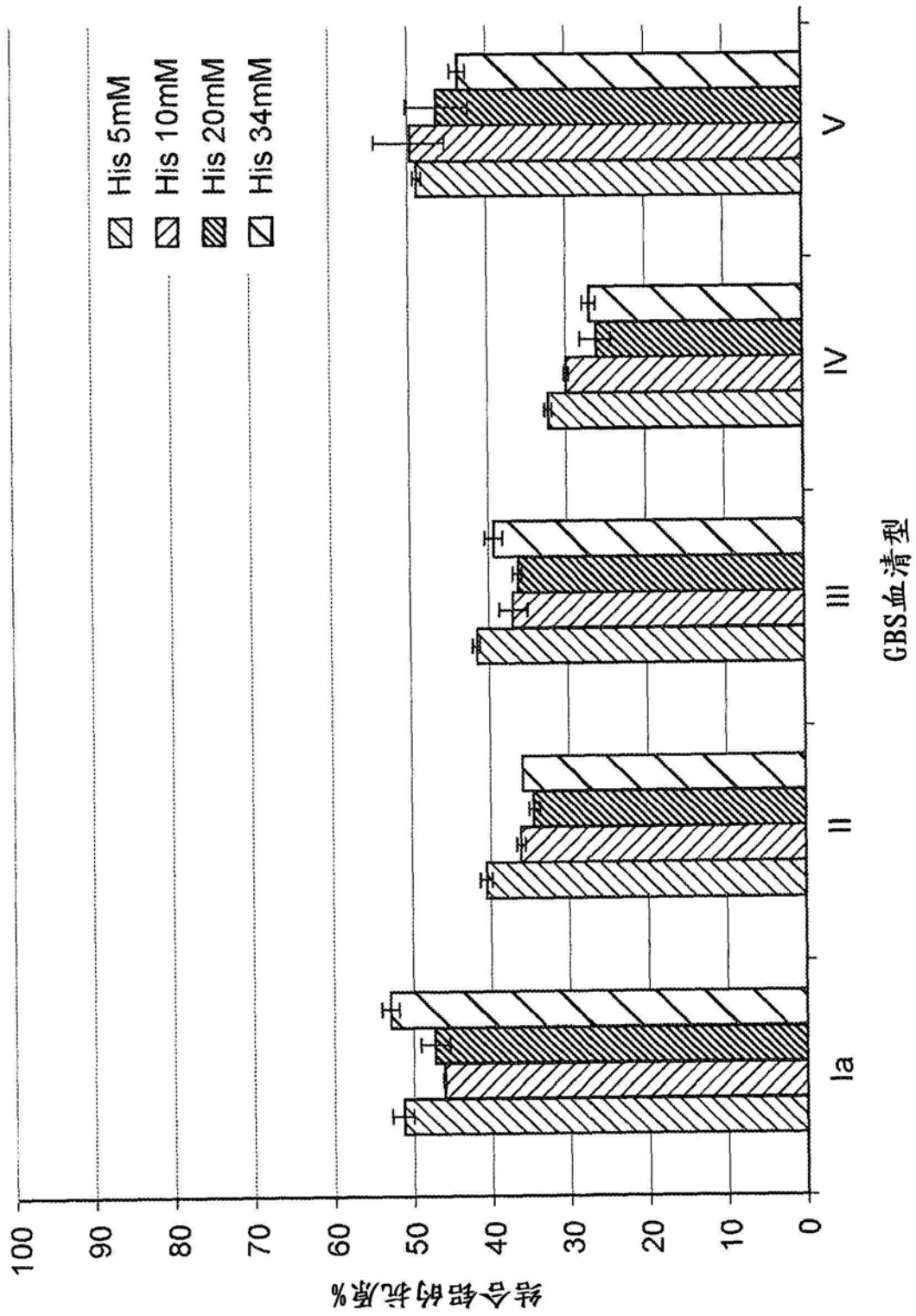


图12

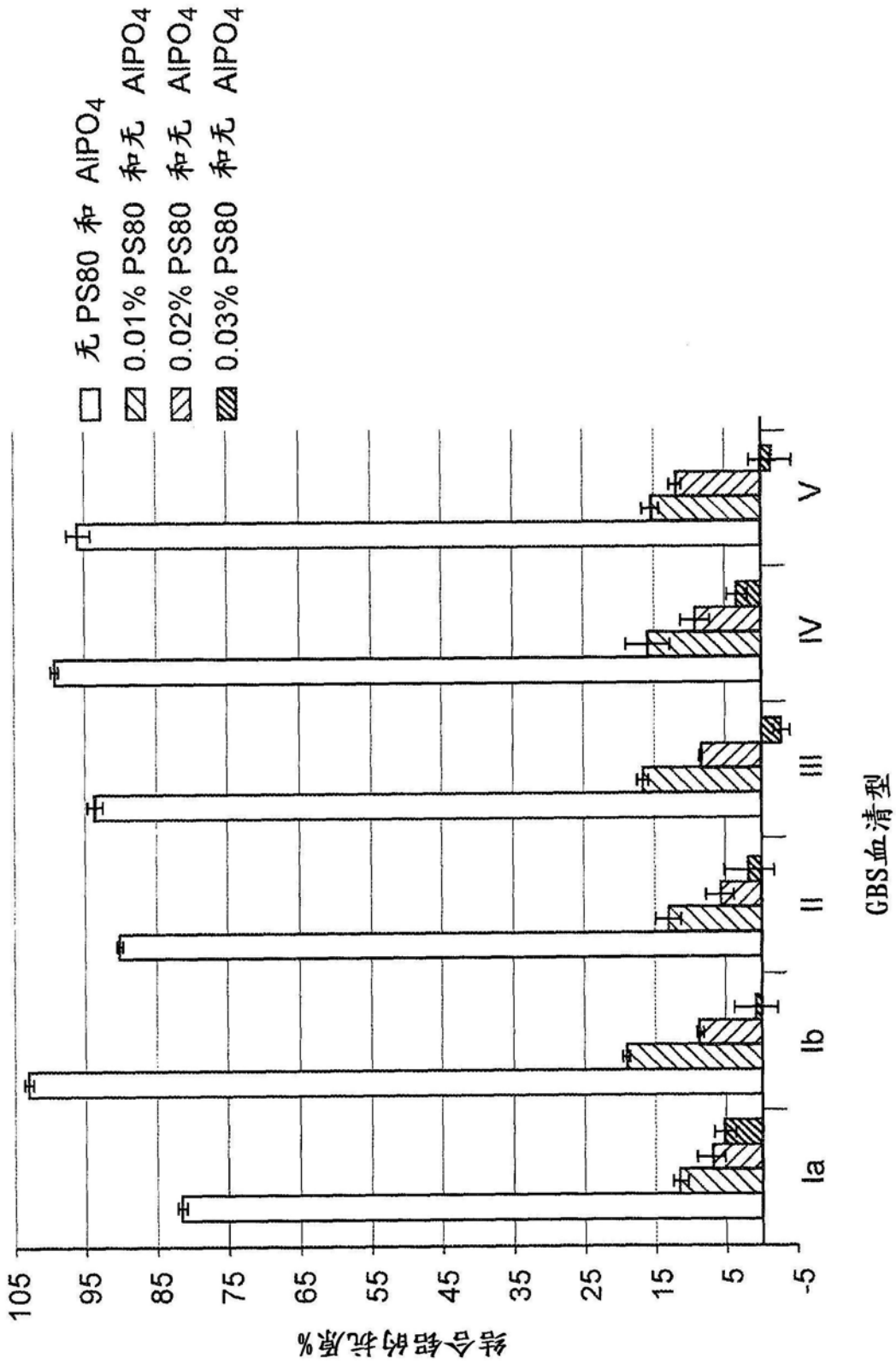


图13

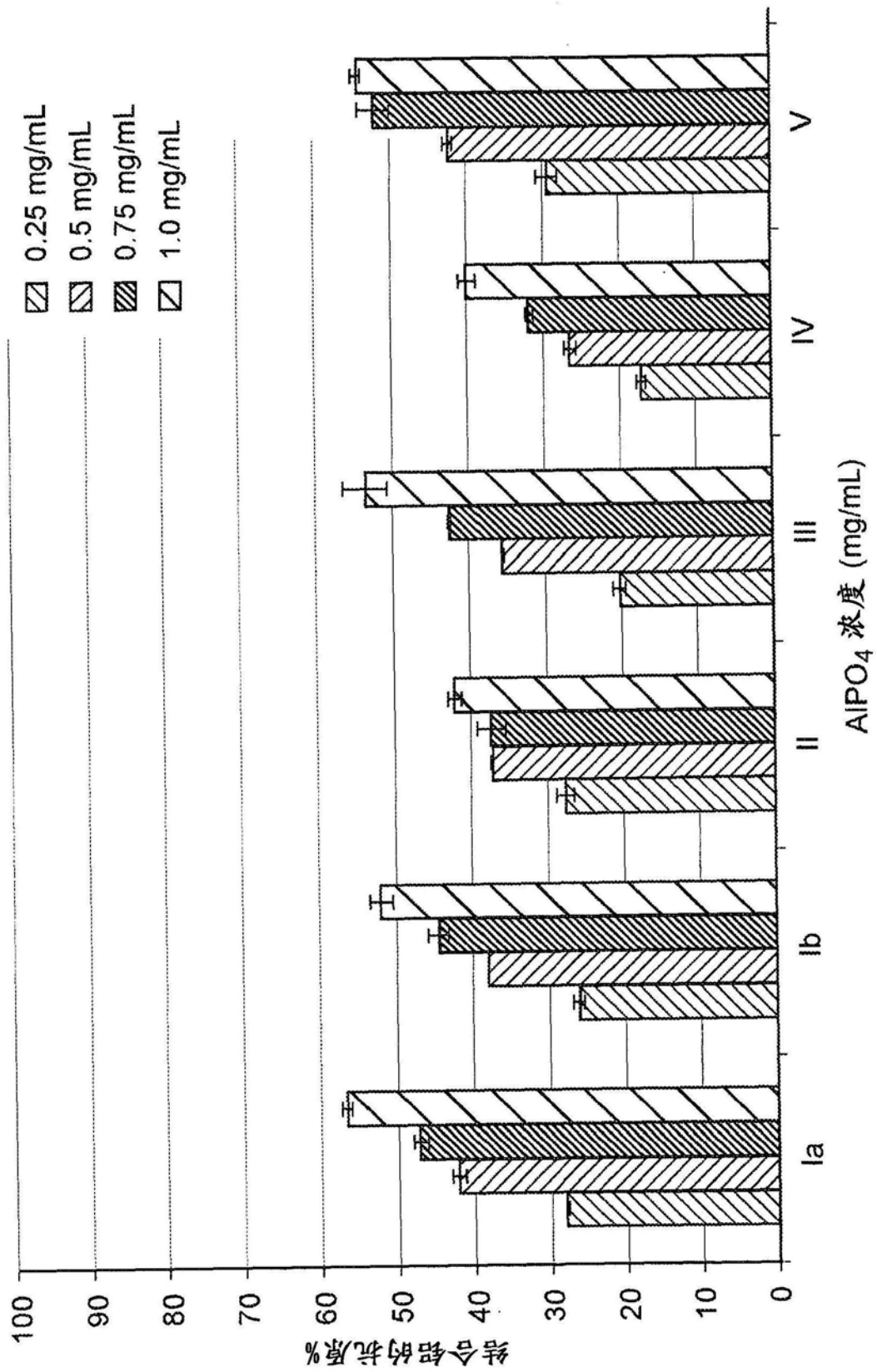


图14

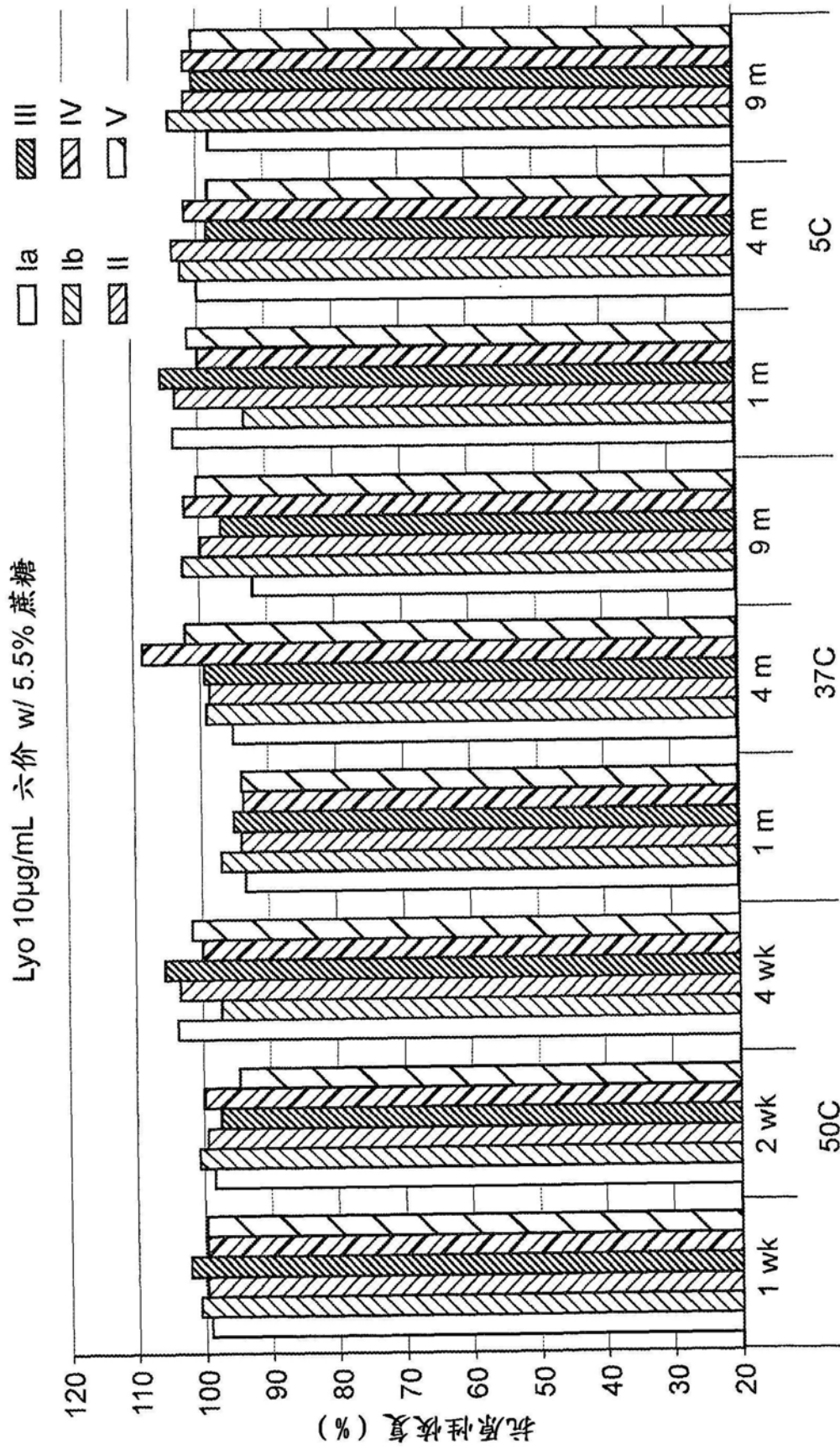


图15

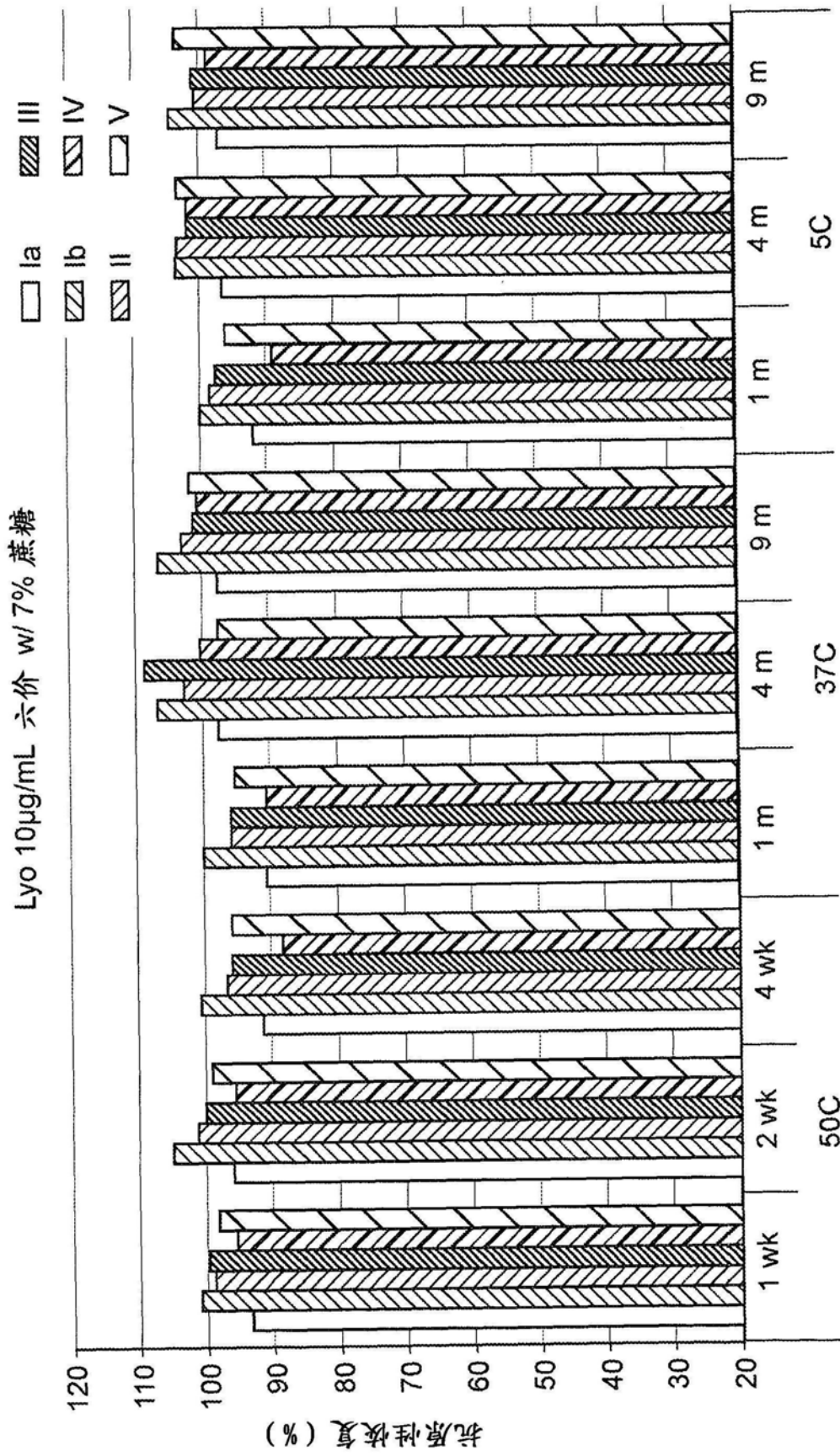


图16

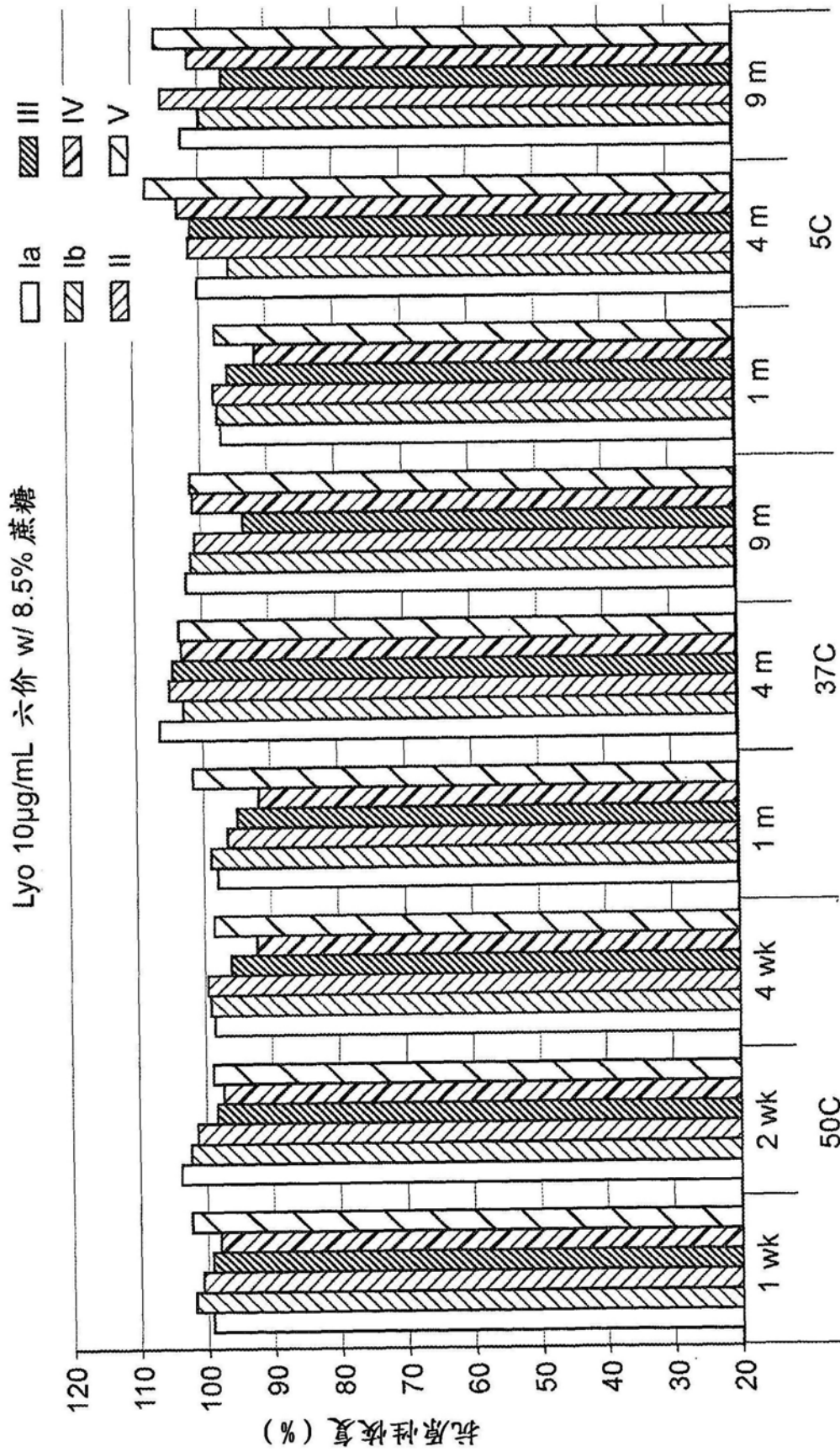


图17

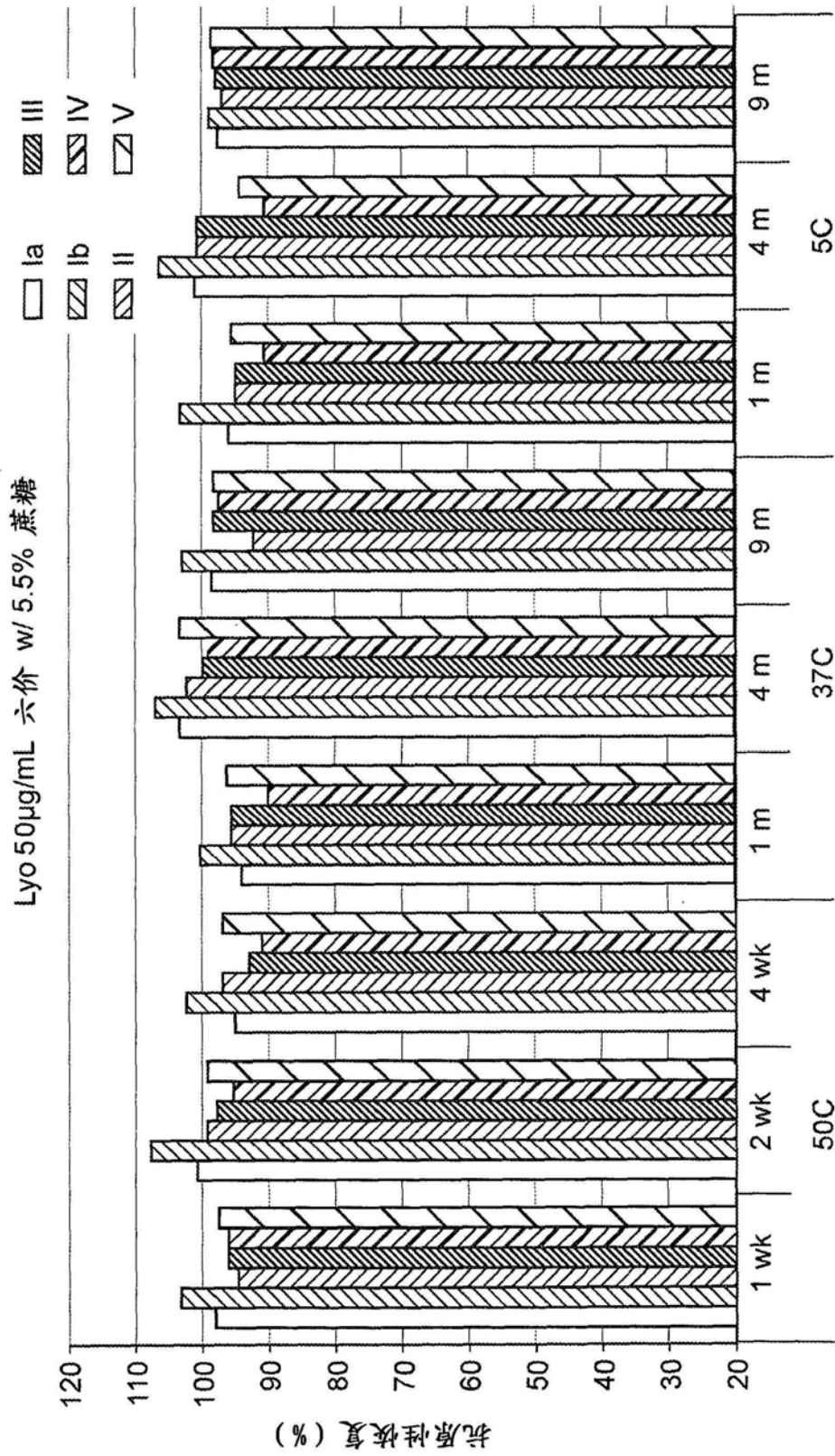


图18

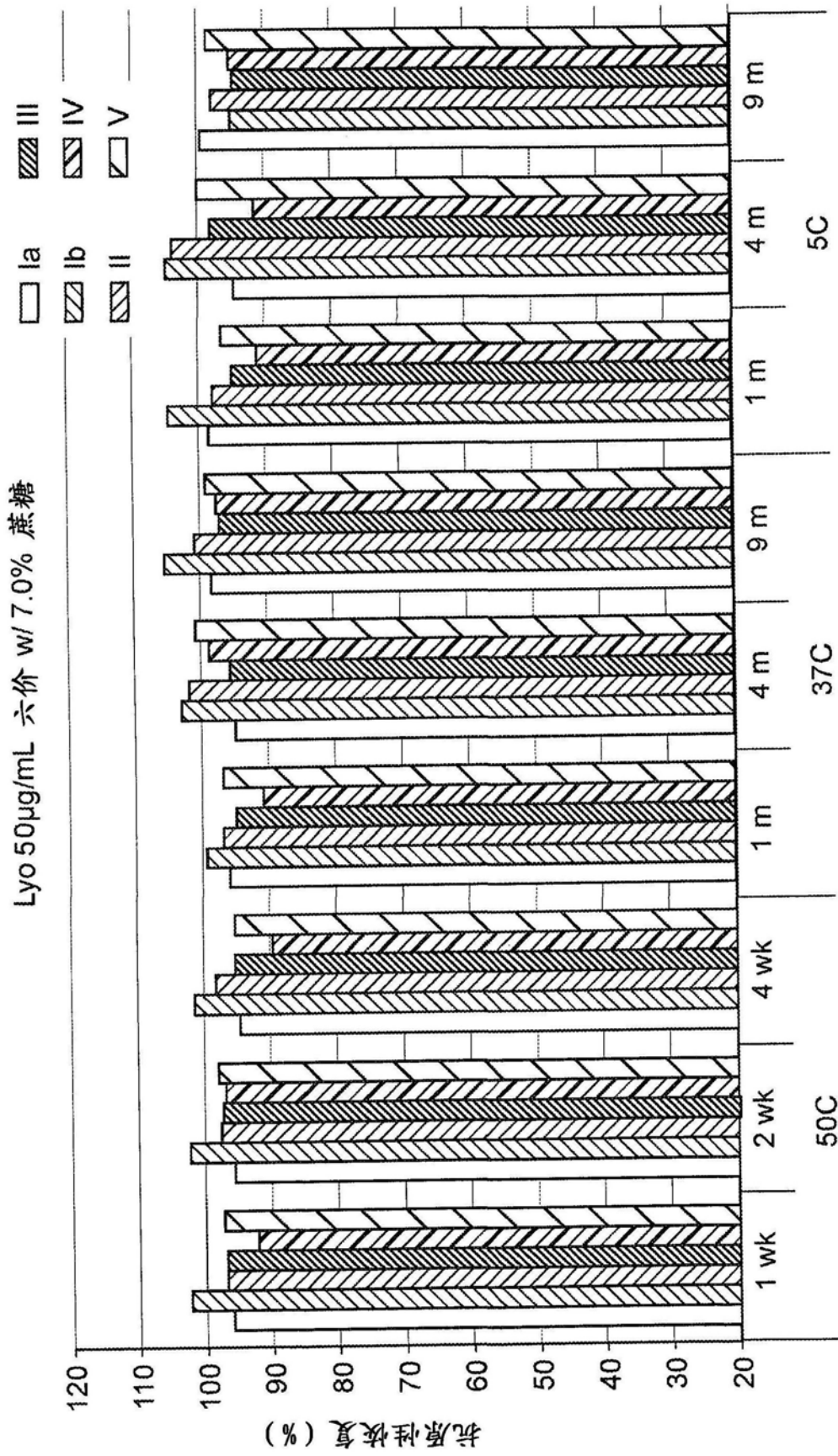


图19

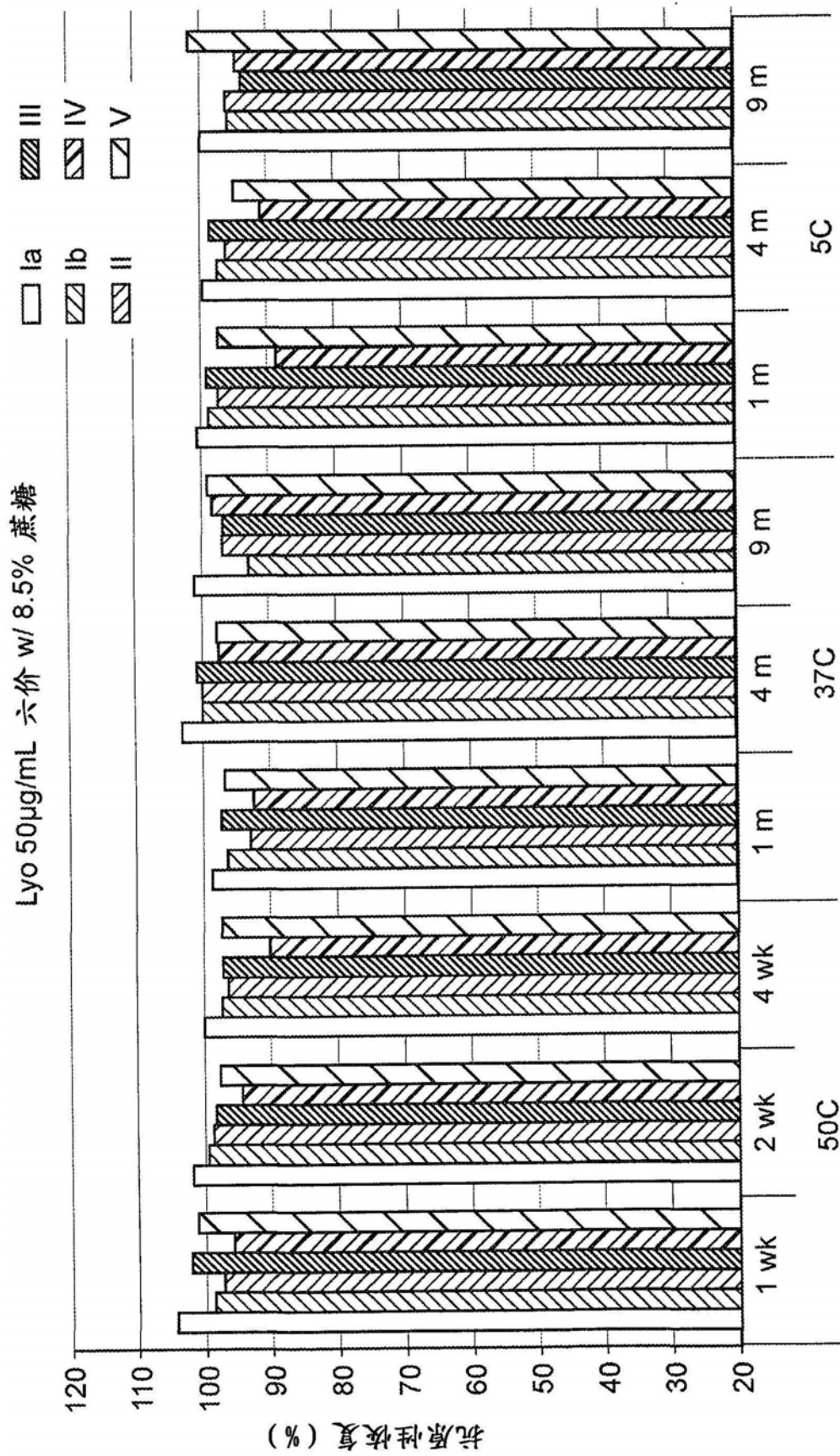


图20

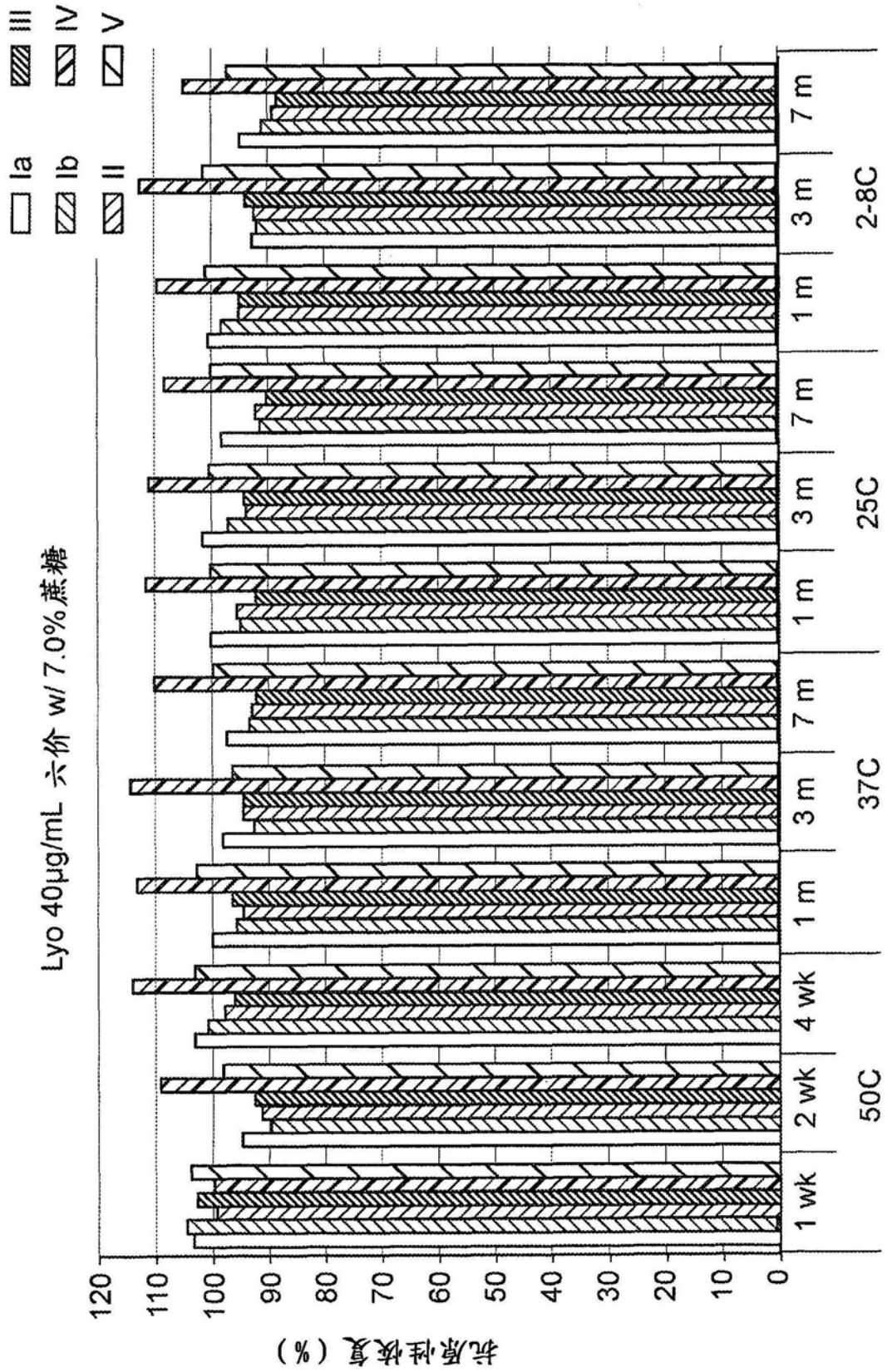


图21

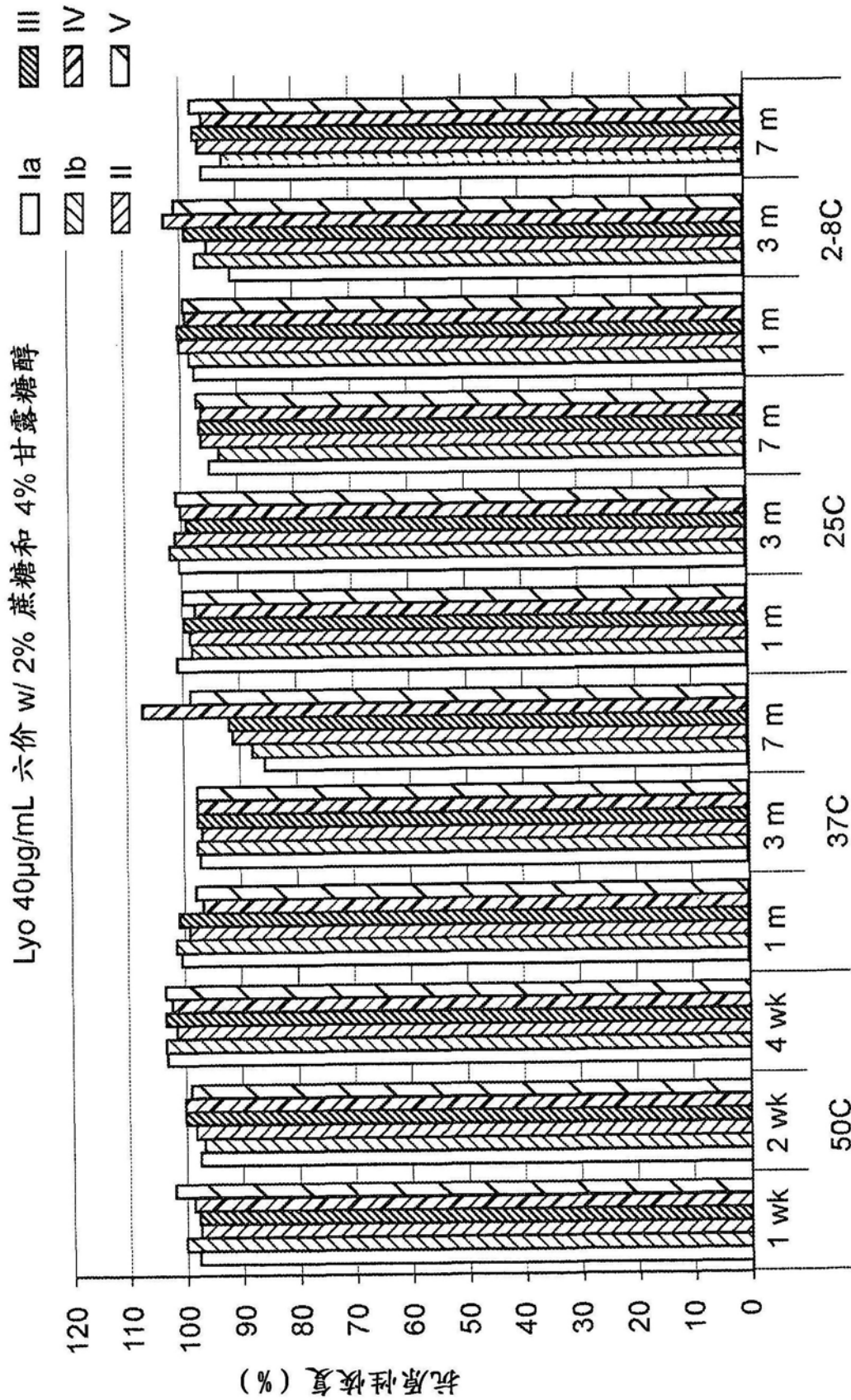


图22

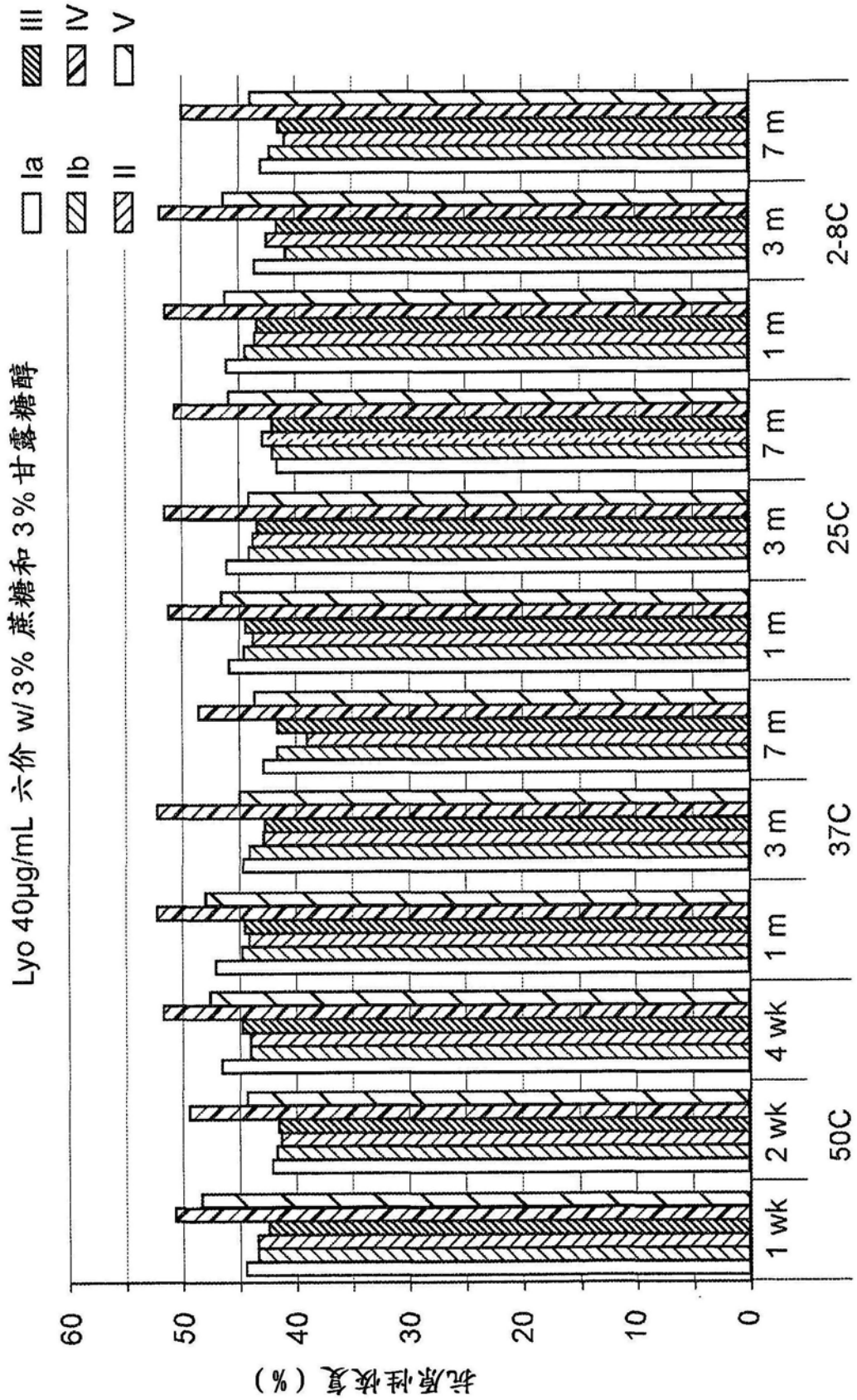


图23

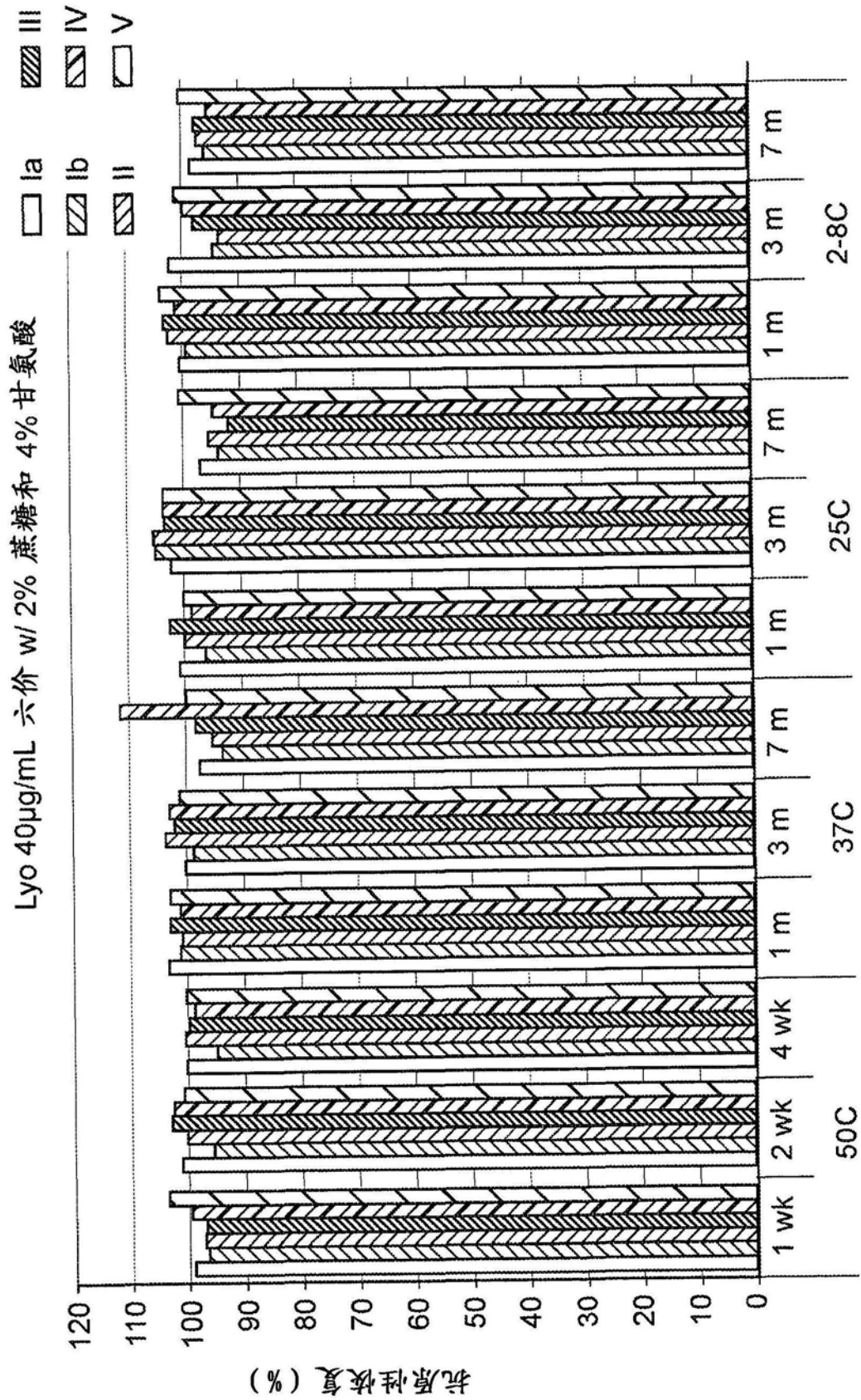


图24

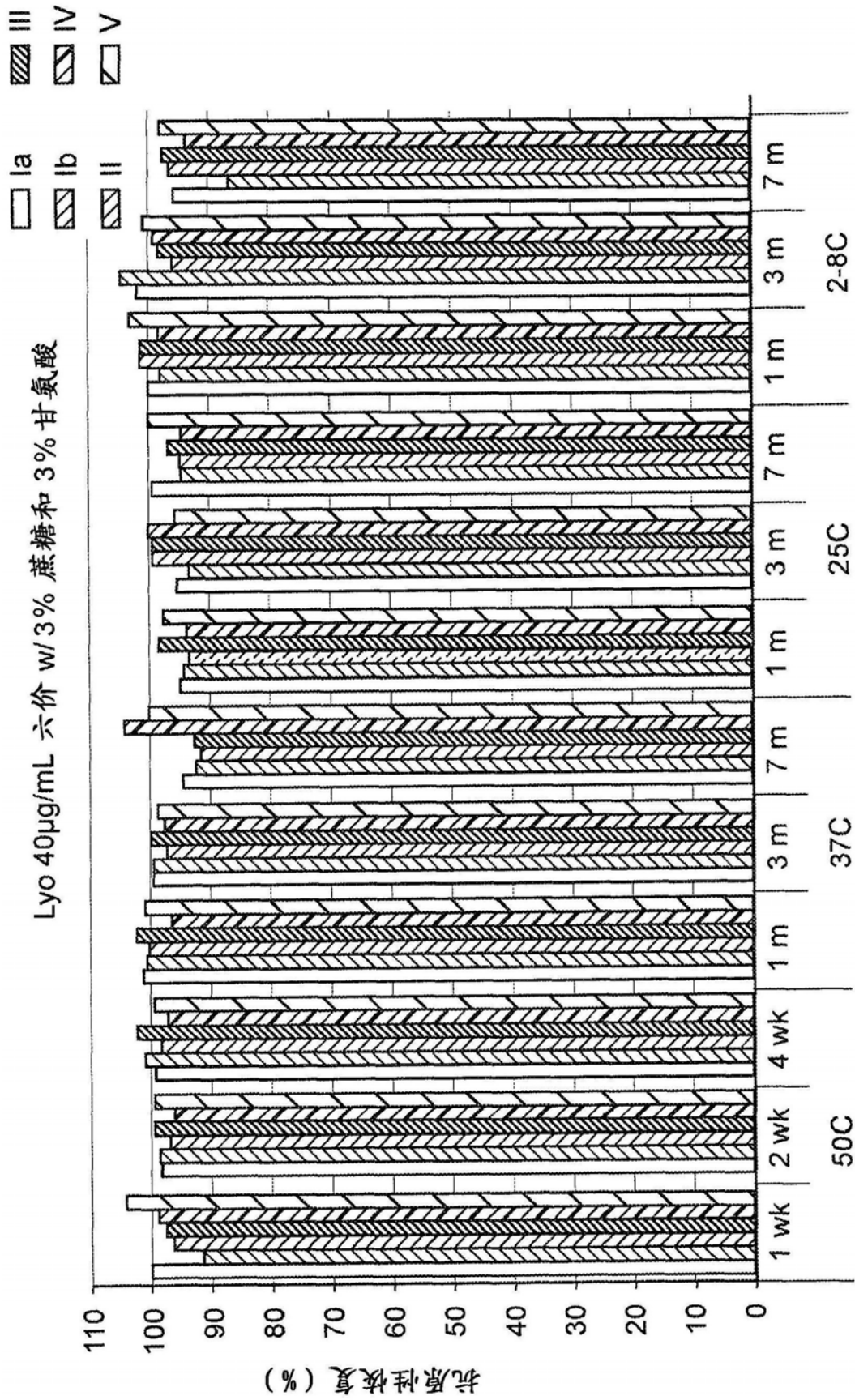


图25