

一种蛋白多糖结合物及其应用

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种蛋白多糖结合物及其应用。所述蛋白多糖结合物包含来自肺炎链球菌的多糖和破伤风杆菌毒素蛋白截短体。所述蛋白多糖结合物可以提高肺炎链球菌荚膜多糖的免疫原性。

背景技术

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, 肺炎球菌), 旧名“肺炎双球菌”, 是一种具有荚膜的革兰阳性双球菌, 根据荚膜多糖的组成差异, 区分为 91 多种血清型, 其中荚膜多糖为重要致病因子。肺炎球菌性疾病是全球严重的公共卫生问题之一。据世界卫生组织估计, 2005 年全球每年有 160 万人死于肺炎球菌疾病, 包括 70-100 万 5 岁以下的儿童, 其中多数生活在发展中国家。可见肺炎球菌一直在严重危害着儿童身体健康。在发达国家, 肺炎球菌的疾病主要来自于 2 岁以下儿童和老年人, 以及各年龄组免疫功能低下者。

肺炎球菌多糖结合疫苗通过肺炎球菌多糖与载体蛋白偶联而成, 载体蛋白对于提高肺炎多糖的免疫原性起到非常重要的作用。在国内外多项对肺炎链球菌疫苗的临床研究中, 未达到保护效果而终止的情况并不少见 (Marilla G Lucero et al, *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 28 (6) : 455-462, JUN 2009)(Jan Poolman et al, *Vaccine*. 2009 May 21;27(24):3213-22)。因此, 亟需开发能够诱导免疫原性更强的肺炎链球菌疫苗的方案。

发明内容

本申请提供了一种破伤风杆菌蛋白变体, 所述破伤风杆菌蛋白变体包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域部分片段, 所述蛋白变体可作为载体蛋白与肺炎链球菌多糖结合, 并具有提高肺炎链球菌多糖免疫原性的效果。本申请还提供蛋白多糖结合物, 所述蛋白多糖结合物包含来自肺炎链球菌的多糖和破伤风杆菌毒素蛋白截短体, 所述多糖结合物具有显著更好的免疫原性。本申请还提供了一种可以提高免疫原性的方法, 所述方法包括以下的步骤: 提供包含来自肺炎链球菌的多糖和破伤风杆菌毒素蛋白截短体的蛋白多糖结合物, 所述方法可以提高肺炎链球菌免疫原性。

一方面, 本申请提供了一种破伤风杆菌毒素蛋白变体, 其包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域部分片段。

在某些实施方式中，所述易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域的 T 细胞表位 P2。

在某些实施方式中，所述易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的第 829-864 位氨基酸。

在某些实施方式中，所述易位区域部分片段包含 SEQ ID NO: 7-8 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体包含 SEQ ID NO: 1-2 中任一项所示的氨基酸序列。

另一方面，本申请提供了蛋白多糖结合物，其包含来自肺炎链球菌的多糖和破伤风杆菌毒素蛋白截短体（TTD）。

在某些实施方式中，所述多糖源自肺炎链球菌荚膜多糖。

在某些实施方式中，所述多糖具备一种以上肺炎链球菌血清型。

在某些实施方式中，所述多糖选自下组中的任一种肺炎链球菌血清型：1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段，其中所述多糖选择下组中的任一种肺炎链球菌血清型：1、3、5、6A、6B、7F、10A、12F、15B、19A、19F 和 33F。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域部分片段。

在某些实施方式中，所述易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域的广谱的 T 细胞表位 P2。

在某些实施方式中，所述易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的第 829-864 位氨基酸。

在某些实施方式中，所述易位区域部分片段包含 SEQ ID NO: 7-8 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含 SEQ ID NO: 1-3 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述多糖与所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，1 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，3 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，5 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，6A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，6B 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，7F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，10A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，12F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，15B 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，19A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，19F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，33F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，所述的蛋白多糖结合物，可以采用偶联的方法将所述多糖和所述蛋白变体偶联起来。

在某些实施方式中，所述偶联的方法包含以下任一种方法：溴化氢法、CDAP 法、还原胺法。

另一方面，本申请提供了一种提高免疫原性的方法，其包括以下的步骤：提供包含来自肺炎链球菌的多糖和破伤风杆菌毒素蛋白截短体的蛋白多糖结合物。

在某些实施方式中，所述多糖源自肺炎链球菌荚膜多糖。

在某些实施方式中，所述多糖具备一种以上肺炎链球菌血清型。

在某些实施方式中，所述多糖选自下组中的任一种肺炎链球菌血清型：1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C

片段，其中所述多糖选择下组中的任一种肺炎链球菌血清型：1、3、5、6A、6B、7F、10A、12F、15B、19A、19F 和 33F。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌蛋白的 C 片段包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和破伤风杆菌毒素蛋白易位区域部分片段。

在某些实施方式中，所述易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域的广谱的 T 细胞表位 P2。

在某些实施方式中，所述的破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的第 829-864 位氨基酸。

在某些实施方式中，所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含 SEQ ID NO: 1-3 中任一项所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述肺炎链球菌多糖与所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，1 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，3 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，5 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，6A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，6B 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，7F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，10A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，12F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，15B 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，19A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，19F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，33F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

在某些实施方式中，所述方法包含采用偶联的方法将所述多糖和所述蛋白变体偶联起来。

在某些实施方式中，所述偶联的方法包含以下任一种方法：溴化氢法、CDAP 法、还原胺法。

在某些实施方式中，所述提高细菌多糖免疫原性包含与多糖 CRM197 结合物相比，所述

蛋白多糖结合物的免疫原性更高。

在某些实施方式中，所述免疫原性更高是在动物免疫实验中检测到的。

在某些实施方式中，所述动物免疫试验包含以下步骤：将所述的蛋白多糖结合物与佐剂配制成免疫抗原。

在某些实施方式中，所述的免疫抗原的注射方法包含腹腔注射、皮下注射、肌肉注射和/或静脉注射。

在某些实施方式中，所述动物免疫试验包含以下步骤：对获得的免疫动物的血清中的抗体进行 ELISA 检测。

在某些实施方式中，所述动物免疫试验包含以下步骤：对获得的免疫动物的血清进行调理吞噬杀菌试验。

在某些实施方式中，所述动物包含小鼠、大鼠和/或兔。

在某些实施方式中，所述佐剂包含氢氧化铝、磷酸铝和/或弗氏佐剂等。

另一方面，本申请提供了一种核酸分子，其包含编码所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体。

在某些实施方式中，所述的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 4-6 所示的核苷酸序列。

另一方面，本申请提供了载体，其包含所述的核酸分子。

另一方面，本申请还提供了细胞，其包含所述的核酸分子或所述的载体。

另一方面，本申请还提供了一种载体蛋白，其包含所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体。

另一方面，本申请还提供了一种药物组合物，其包含所述的蛋白多糖结合物和任选地药学上可接受的佐剂。

另一方面，本申请还提供了所述破伤风杆菌毒素蛋白变体用于制备药物的用途。

另一方面，本申请还提供了所述多糖结合物用于制备药物的用途。

在某些实施方式中，所述药物用于预防和/或治疗肺炎链球菌性疾病。

在某些实施方式中，所述肺炎链球菌性疾病包括肺炎、败血症、脑膜炎和/或中耳炎。

另一方面，本申请还提供了疫苗，其包含所述的蛋白多糖结合物、所述的药物组合物和/或任选地药学上可接受的佐剂。

另一方面，本申请还提供了预防肺炎链球菌性疾病的方法，其包含向有需要的受试者施用所述蛋白多糖结合物、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述载体蛋白、所述的药物组合物和/或所述的疫苗。

在某些实施方式中，所述肺炎链球菌性疾病包括肺炎、败血症、脑膜炎和/或中耳炎。

另一方面，本申请还提供了所述多糖结合物作为抗原制备抗体的用途。

在某些实施方式中，所述抗体用于分离菌株的诊断分型。

另一方面，本申请还提供了试剂盒，其包含所述多糖结合物。

在某些实施方式中，所述试剂盒用于分离菌株的诊断分型。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的实施方式，本申请所涉及的发明能够更好地理解本申请所涉及的发明的特点和优势。对附图简要说明书如下：

图 1 显示的是本申请所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体（TTD）表达质粒的电泳图。

图 2 显示的是本申请所述 TTD 在大肠杆菌中表达后的电泳图。

图 3 显示的是本申请所述 TTD 纯化后的电泳图。

图 4 显示的是本申请所述 TTD 纯化后的 SEC-HPLC 图谱。

图 5 显示的是本申请所述 3 型多糖-TTD-1、2、3 和 3 型多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血清中抗体滴度。

图 6 显示的是本申请所述 3 型多糖-TTD-1 和 3 型多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血清中特异性抗体的调理吞噬功能。

图 7 显示的是本申请所述 6B 型多糖-TTD-1 和 6B 型多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血清中的抗体滴度。

图 8 显示的是本申请所述 6B 型多糖-TTD-1 和 6B 型多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血清中特异性抗体的调理吞噬功能。

图 9 显示的是本申请所述 15B 型多糖-TTD-3 和 15B 型多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血清中的抗体滴度。

图 10 显示的是本申请所述 15B 型多糖-TTD-3 和 15B 型多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血清中特异性抗体的调理吞噬功能。

图 11 显示的是本申请所述 6A 型多糖-TTD-3 和 6A 型多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血清中的抗体滴度。

图 12 显示的是本申请所述 6A 型多糖-TTD-3 和 6A 型多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血清中特异性抗体的调理吞噬功能。

图 13 显示的是本申请所述 7F 型多糖-TTD-1 结合物和 7F 型多糖-CRM197 结合物免疫后大兔血清中的抗体滴度。

图 14 显示的是本申请所述 7F 型多糖-TTD-3 和 7F 型多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血

清中特异性抗体的调理吞噬功能。

图 15 显示的是本申请所述 10A 型多糖-TTD-2 结合物和 10A 型多糖-CRM197 结合物免疫后大兔血清中的抗体滴度。

图 16 显示的是本申请所述 10A 型多糖-TTD-2 和 10A 型多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血清中特异性抗体的调理吞噬功能。

图 17 显示的是本申请所述 19A 型多糖-TTD-1 结合物和 19A 型多糖-CRM197 结合物免疫后大兔血清中的抗体滴度。

图 18 显示的是本申请所述 19A 型多糖-TTD-1 结合物和 19A 型多糖-CRM197 结合物免疫后大兔血清中特异性抗体的调理吞噬功能。

图 19 显示的是本申请所述 1 型多糖-TTD-3 结合物和 1 型多糖-CRM197 结合物免疫后大兔血清中的抗体滴度。

图 20 显示的是本申请所述 1 型多糖-TTD-3 结合物和 1 型多糖-CRM197 结合物免疫后大兔血清中特异性抗体的调理吞噬功能。

图 21 显示的是本申请所述 5、12F、33F、19F 型多糖-TTD 及相应多糖-CRM197 结合物免疫后小鼠血清中的抗体滴度。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

术语定义

在本申请中，术语“破伤风杆菌”又名“破伤风梭菌”（*clostridium tetani*），通常指能够引起感染性、中毒性疾病的细菌。其可以通过合成一种毒素蛋白影响被感染者的神经系统。所述破伤风杆菌产生的毒素蛋白，可称为“破伤风杆菌毒素蛋白”、“破伤风杆菌类毒素”或“破伤风痉挛毒素”。所述破伤风杆菌毒素蛋白可以包含 A、B 和 C 三个片段，每个片段的分子量可以在 50 kDa 左右。例如，A 片段可以是具有多肽内切酶活性的催化区域。例如，B 片段可以是易位结构域。例如，C 片段可以是具有与受体结合能力的结构域（Ana C. Calvo, Int. J. Mol. Sci. 2012, 13, 6883-6901; doi:10.3390/ijms13066883）。例如，B 片段可以包含 SEQ ID NO: 7 中所示的氨基酸序列。例如，B 片段可以包含 SEQ ID NO: 8 中所示的氨基酸序列。例如，C 片段可以包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。在本申请中，术语“破伤风杆菌毒素蛋白易位区域”可以指所述破伤风杆菌毒素蛋白的 B 片段。在本申请中，术语“破伤风杆菌毒素蛋白

C 片段”可以指所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段。

在本申请中，术语“蛋白变体”“变体”通常指与天然生物活性蛋白质或多肽具有序列同源性的化合物。本申请所述的蛋白变体可以包括通过添加（包含插入）、缺失、修饰和/或取代一个或多个氨基酸残基而具有改变的氨基酸序列的蛋白，其同时保留亲本序列的至少一种生物活性。例如，变体可与亲本蛋白具有至少约 0%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%或至少约 99%的序列同一性。变体可以天然存在或者是非天然存在的。可以使用本领域已知的技术来生成非天然存在的变体。蛋白变体可以包含保守的或非保守的氨基酸替代、删除或添加。在本申请中，所述“破伤风杆菌毒素蛋白变体”可以指所述破伤风杆菌毒素蛋白部分氨基酸序列缺失的蛋白。

在本申请中，术语“截短体”通常是指少于整体的任何事物。在本申请中，所述“破伤风杆菌毒素蛋白截短体（TTD）”可以指所述氨基酸序列少于破伤风杆菌毒素蛋白全部序列的化合物。例如，截短体少于亲本蛋白至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 96%、至少约 97%、至少约 98%或至少约 99%的氨基酸序列。截短体可以天然存在或者是非天然存在的。可以使用本领域已知的技术来生成非天然存在的截短体。

在本申请中，术语“T 细胞表位”通常是指 T 淋巴细胞可以识别的多肽或者蛋白片段。所述“T 细胞表位 P2”通常是指破伤风杆菌毒素蛋白能够被 T 细胞识别的多肽，其可包含 p2、p4 和/或 p30。例如，p2 可具有识别所有 MHC（组织相容性复合物分子）的 DR 分子。所述 T 细胞表位 p2 可以包含破伤风杆菌毒素蛋白 830-844 位氨基酸序列。例如，p30 可以和大量不同的 MHC II 结合，显示能够被 T 细胞识别，具有免疫原性的特性。所述 T 细胞表位 p30 可以包含破伤风杆菌毒素蛋白 947-967 位氨基酸序列。所述 T 细胞表位 p4 可以包含破伤风杆菌毒素蛋白 1273-1284 位氨基酸序列。在本申请中，例如，蛋白变体可以包含所述“T 细胞表位 p2”区域。

在本申请中，术语“肺炎链球菌荚膜多糖”、“肺炎链球菌多糖”和“肺炎球菌多糖”可以互换使用，通常是指肺炎链球菌表面松散的粘液物质。肺炎链球菌多糖主要诱发机体的不依赖 T 细胞的免疫应答。在本申请中，所述免疫应答可以包含机体受抗原刺激后，免疫细胞对抗原分子识别、活化、增殖和分化，产生免疫物质发生特异性免疫效应的过程。所述免疫应答可包括抗原递呈、淋巴细胞活化、免疫分子形成及免疫效应发生等一系列的生理反应。肺炎链球菌可以根据荚膜多糖抗原性的不同分为不同的血清型。在某些情形中，根据荚膜多糖

抗原的不同，肺炎链球菌可以包含 91 种血清型。肺炎链球菌的主要致病性的血清型可以包括以下 24 种，分别是：1，2，3，4，5，6A，6B，7F，8，9N，9V，10A，11A，12F，14，15B，17F，18C，19A，19F，20，22F，23F 和 33F。

在某些情形中，肺炎链球菌的荚膜多糖可以包含重复的寡糖单元，所述寡糖单元可以包含多达 8 个糖残基。在某些情形中，荚膜多糖可以是全长多糖。在某些情形中，荚膜多糖可以是一个寡糖单元或短于天然长度的重复寡糖单元的糖链。

在本申请中，术语“肺炎链球菌性疾病”通常指因肺炎链球菌感染机体后造成的疾病，包含但不限于儿童肺炎、脑膜炎、菌血症、急性中耳炎和鼻窦炎等。

在本申请中，术语“载体蛋白”通常是指可以与来自微生物的糖或多糖结合，将微生物的糖或多糖携带到受试者体内并引起免疫应答的蛋白质、蛋白质同源物或多肽。糖与载体蛋白结合后可增强糖的免疫原性，因为这将糖由非胸腺依赖性抗原（thymus independent antigen）转变为胸腺依赖性抗原（thymus dependent antigen），由此能够引发免疫记忆。胸腺依赖性抗原，也可以称为 T 细胞依赖性抗原；非胸腺依赖性抗原，也可以称非 T 细胞依赖性抗原。对于儿童、老年人、免疫缺陷者，T 细胞依赖性抗原可以产生有效的免疫应答，产生更能维持免疫效果的抗体。在本申请中，术语“蛋白多糖结合物”，即将所述载体蛋白与来自细菌的糖或多糖结合后产生的单一结构的物质。

在本申请中，术语“偶联”是指将两个部分的物质以共价或者非共价的方式结合以形成单一结构，其中第一部分是抗原，尤其是多糖，而第二部分是免疫原性载体，例如载体蛋白。所述结合可通过分子之间的共价化学键或通过采用连接基团来实现，例如己二酸二酰肼。

在本申请中，术语“免疫原性”通常是指能够引起免疫应答的性能，包括但不限于能够刺激细胞活化、增殖、分化，产生免疫效应物质抗体和致敏淋巴细胞的特性。在本申请中，所述免疫原性更高包含但不限于在对受试者进行免疫后，受试者血清中抗体滴度更高、血清型特异性抗体更多和杀菌效率更高。

在本申请中，术语“多糖与蛋白质量比”通常可以用来衡量结合物中蛋白质被糖基化修饰程度，不同的质量比影响结合物的免疫原性，游离多糖、游离蛋白质均属于结合反应的底物，结合物中游离的荚膜多糖会降低结合物的免疫反应，过量的游离蛋白质也会对免疫反应有抑制作用。在某些情形下，结合物分子大小分布直接对产品免疫原性相关，也是衡量结合工艺和结合物稳定性的重要指标。

在本申请中，术语“载体”通常是指含有克隆的一个或多个核酸分子转录和翻译所必需的调节序列、且从而可以转录和克隆核酸分子的载体。所述载体可含有与核酸分子可操作地

连接的一个或多个调节序列，可以根据使用的宿主细胞类型选择此调节序列。调节序列包括启动子、增强子和其他表达控制元件，例如聚腺苷酸化（poly（A）+）序列。其他载体组分可包括但不限于下列一个或多个：信号序列、复制起点、一个或多个选择基因和转录终止序列。

在本申请中，术语“药物组合物”通常是指适合于向有需要的受试者施用的组合物。例如，本申请所述的药物组合物，其可以包含本申请所述的蛋白多糖结合物以及药学上可接受的载剂。

在本申请中，术语“疫苗”是指含有有效诱导受试者的抗特定病原体或疾病的治疗程度的免疫性的活性组分的试剂或组合物。在本申请中，所述疫苗可以包含细菌多糖和载体蛋白。在本申请中，所述疫苗还可以包含其他免疫原活性组分。在本申请中，所述细菌多糖和蛋白的结合物还可以作为多组分疫苗中的一种活性组分。在本申请中，所述“疫苗”还可以包含医药组合物，且因此通常包括医药学上可接受的稀释剂、运载剂或赋形剂。其可能包含或可能不包含其他活性成分。在某些情形下，其可为另外包含诱导免疫反应（例如抗细菌多糖的其他蛋白质和/或抗其他感染物）的其他组分的组合疫苗。

在本申请中，术语“ELISA”通常是指酶联免疫吸附测定。其可以包含用于免疫检测的多种方案。例如，ELISA 方法可以包括夹心 ELISA、桥连 ELISA、ELISA 直接法和 ELISA 间接法等。在某些情形中，ELISA 免疫测定可以是手动测定，也可以通过自动方式来实现。例如，在本申请中，可以用 ELISA 法评价肺炎链球菌多糖免疫原性。

在本申请中，术语“调理吞噬杀菌试验”也称“OPA”，通常是指通过抗体、补体促进吞噬细胞吞噬细菌等颗粒性抗原的试验。所述抗体包含来自受试者经抗原免疫后产生的抗体。所述抗体包含来自于血清中。所述吞噬细胞包含吞噬细胞或由具有分化能力的细胞（例如 HL（Hela 细胞）-60）分化而来的吞噬细胞。所述细菌包含肺炎链球菌。

在本申请中，术语“受试者”或“个体”或“动物”或“患者”可互换用于指施用本申请的药物组合物需要的受试者，例如哺乳动物受试者。动物受试者包括人类、非人类灵长类、狗、猫、豚鼠、兔子、大鼠、小鼠、马、黄牛、乳牛等等，例如小鼠，例如大鼠，例如兔。其中所述兔可以是兔，例如，新西兰大白兔。

在本申请中，术语“同源性”通常是指与比较的氨基酸序列和比较的核苷酸序列具有一定同源性的氨基酸序列或核苷酸序列。术语“同源性”可以等同于序列“同一性”。同源序列可以包括与主题序列是至少 80%、85%、90%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或 99.9%相同的氨基酸序列。通常，同源物将包含与主题氨基酸序列相

同的活性位点等。同源性可以根据相似性(即具有相似化学性质/功能的氨基酸残基)来考虑,也可以在序列同一性方面表达同源性。在本申请中,提及的氨基酸序列或核苷酸序列的 SEQ ID NO 中的任一项具有百分比同一性的序列是指在所提及的 SEQ ID NO 的整个长度上具有所述百分比同一性的序列。

为了确定序列同一性,可进行序列比对,其可通过本领域技术人员了解的各种方式进行,例如,使用 BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE 或 Megalign (DNASTAR) 软件等。本领域技术人员能够确定用于比对的适当参数,包括在所比较的全长序列中实现最优比对所需要的任何算法。

在本申请中,术语“和/或”应理解为意指可选项中的任一项或可选项的两项。

在本申请中,术语“包含”或“包括”通常是指包括明确指定的特征,但不排除其他要素。

在本申请中,术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动,例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。

发明详述

蛋白变体

一方面,本申请提供一种破伤风杆菌毒素蛋白(tetanus toxin)变体(Tetanus Toxin Domain, TTD),与野生型破伤风杆菌毒素蛋白(NBCI 登录号 WP011100836)的氨基酸序列相比,所述破伤风杆菌毒素蛋白变体包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域部分片段。

在某些情形下,所述破伤风杆菌蛋白变体是通过基因工程重组蛋白的技术,去除了破伤风杆菌毒素蛋白的 N 端的氨基酸序列,获得不含有 N 端部分氨基酸序列的新的蛋白片段。破伤风杆菌毒素蛋白 N 端的 A 片段可以通过抑制神经递质释放发挥毒性作用,因此在本申请中,有毒性的 N 段的片段通过本领域的常用的技术去除了。

在某些情形下,所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段包含如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。在某些情形下,所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段可包含与 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列具有至少约 70% (例如,至少约 75%,至少约 80%,至少约 85%,至少约 90%,至少约 91%,至少约 92%,至少约 93%,至少约 94%,至少约 95%,至少约 96%,至少约 97%,至少约 98%,至少约 99%,或至少约 100%) 序列同一性的氨基酸序列。

在某些情形下,所述的破伤风杆菌毒素蛋白易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素

蛋白的易位区域的 T 细胞表位 P2。

在某些情形下，例如，所述破伤风杆菌毒素蛋白易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的第 829-864 位氨基酸。

在某些情形下，所述破伤风杆菌毒素蛋白易位区域部分片段可以包含所述破伤风杆菌毒素蛋白易位区域的 1-36 个氨基酸，例如：1 个氨基酸、2 个氨基酸、3 个氨基酸、4 个氨基酸、5 个氨基酸、6 个氨基酸、7 个氨基酸、8 个氨基酸、9 个氨基酸、10 个氨基酸、11 个氨基酸、12 个氨基酸、13 个氨基酸、14 个氨基酸、15 个氨基酸、16 个氨基酸、17 个氨基酸、18 个氨基酸、19 个氨基酸、20 个氨基酸、21 个氨基酸、22 个氨基酸、23 个氨基酸、24 个氨基酸、25 个氨基酸、26 个氨基酸、27 个氨基酸、28 个氨基酸、29 个氨基酸、30 个氨基酸、31 个氨基酸、32 个氨基酸、33 个氨基酸、34 个氨基酸、35 个氨基酸或 36 个氨基酸。

在某些情形下，所述第 829-864 位氨基酸是 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的第 1-36 位氨基酸残基。

在某些情形下，例如，所述破伤风杆菌毒素蛋白易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的：第 830-864 位氨基酸、第 831-864 位氨基酸、第 832-864 位氨基酸、第 833-864 位氨基酸、第 834-864 位氨基酸、第 835-864 位氨基酸、第 836-864 位氨基酸、第 837-864 位氨基酸、第 838-864 位氨基酸、第 839-864 位氨基酸、第 840-864 位氨基酸、第 841-864 位氨基酸、第 842-864 位氨基酸、第 843-864 位氨基酸、第 844-864 位氨基酸、第 845-864 位氨基酸、第 846-864 位氨基酸、第 847-864 位氨基酸、第 848-864 位氨基酸、第 849-864 位氨基酸、第 850-864 位氨基酸、第 851-864 位氨基酸、第 852-864 位氨基酸、第 853-864 位氨基酸、第 854-864 位氨基酸、第 855-864 位氨基酸、第 856-864 位氨基酸、第 857-864 位氨基酸、第 858-864 位氨基酸、第 859-864 位氨基酸、第 860-864 位氨基酸、第 862-864 位氨基酸或第 863-864 位氨基酸。

在某些情形中，所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域部分片段可以包含 SEQ ID NO: 7 中所示的氨基酸序列。

在某些情形中，所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域部分片段可以包含 SEQ ID NO: 8 中所示的氨基酸序列。

在某些情形下，所述的破伤风杆菌毒素蛋白可包含与 SEQ ID NO: 1-3 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 70%（例如，至少约 75%，至少约 80%，至少约 85%，至少约 90%，至少约 91%，至少约 92%，至少约 93%，至少约 94%，至少约 95%，至少约 96%，至少约 97%，至少约 98%，至少约 99%，或至少约 100%）序列同一性的氨基酸序列。

在某些情形下,所述蛋白变体可以包含所述破伤风杆菌 C 片段的至少约 70%(如约 75%,至少约 80%,至少约 85%,至少约 90%,至少约 91%,至少约 92%,至少约 93%,至少约 94%,至少约 95%,至少约 96%,至少约 97%,至少约 98%,至少约 99%,或至少约 100%)的部分和所述易位的区域片段的至少约 70%(如约 75%,至少约 80%,至少约 85%,至少约 90%,至少约 91%,至少约 92%,至少约 93%,至少约 94%,至少约 95%,至少约 96%,至少约 97%,至少约 98%,至少约 99%,或至少约 100%)的部分。

在某些情形中,所述的蛋白变体包含如 SEQ ID NO: 1-2 中任一项所示的氨基酸序列。在某些情形中,所述的蛋白变体包含如与 SEQ ID NO: 1-2 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 70%(例如,至少约 75%,至少约 80%,至少约 85%,至少约 90%,至少约 91%,至少约 92%,至少约 93%,至少约 94%,至少约 95%,至少约 96%,至少约 97%,至少约 98%,至少约 99%,或至少约 100%)序列同一性的氨基酸序列。

在某些情形下,可以对所述蛋白变体氨基酸序列进行各种添加,删除和替代,以产生变体,而不会不利地影响分子的载体能力。例如,可以进行保守和半保守氨基酸取代。示例性的保守氨基酸取代包括但不限于以下变化:丙氨酸变为丝氨酸;精氨酸变为赖氨酸;天冬酰胺变为谷氨酰胺或组氨酸;半胱氨酸到丝氨酸;谷氨酰胺转化为天冬酰胺;谷氨酸到天冬氨酸;甘氨酸到脯氨酸;组氨酸为天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸为亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸为缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸为精氨酸、谷氨酰胺或谷氨酸;甲硫氨酸转化为亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸转化为酪氨酸、亮氨酸或蛋氨酸;丝氨酸至苏氨酸;苏氨酸到丝氨酸;色氨酸为酪氨酸;酪氨酸变成色氨酸或苯丙氨酸;缬氨酸为异亮氨酸或亮氨酸。如蛋白质工程领域的普通技术人员将理解的,本文提到的保守和半保守突变不影响 TTD 的载体功能。例如,用于各种目的突变的合适区域(例如,添加多肽“标签”以简化蛋白质的纯化)包括 C 端和 N 端区域。

另一方面,本申请提供了核酸分子,其包含编码所述破伤风杆菌毒素蛋白变体。在某些情形下,所述编码 TTD 的核酸序列包含野生型的 TTD 的核酸序列、序列片段、互补序列和/或其同源物。在某些情形下,所述编码 TTD 的核酸序列包含野生型 TTD 核酸序列的突变、截短、置换突变或易位。

在某些情形下,所述 TTD 蛋白表达的核酸编码序列经过密码子优化得到。例如,所述 TTD 蛋白的核酸编码序列如 SEQ ID NO: 4-6 中任一项所示。例如,所述密码子优化的 TTD 核苷酸序列可以包含与 SEQ ID NO: 4-6 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 70%(例如,至少约 75%,至少约 80%,至少约 85%,至少约 90%,至少约 91%,至少约 92%,至少约

93%，至少约 94%，至少约 95%，至少约 96%，至少约 97%，至少约 98%，至少约 99%，或至少约 100%）序列同一性的核苷酸序列。在某些情形中所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段核酸编码序列经过密码子优化得到。例如，所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段的核酸编码序列如 SEQ ID NO: 6 所示。例如，所述密码子优化的破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段可以包含与 SEQ ID NO: 6 所示的核苷酸序列具有至少约 70%（例如，至少约 75%，至少约 80%，至少约 85%，至少约 90%，至少约 91%，至少约 92%，至少约 93%，至少约 94%，至少约 95%，至少约 96%，至少约 97%，至少约 98%，至少约 99%，或至少约 100%）序列同一性的核苷酸序列。所述密码子优化可提高所述 TTD 的蛋白表达量。例如，经过所述密码子优化后，所述 TTD 蛋白表达的核酸序列导入细胞后，蛋白表达量提高、序列完整程度提高、序列正确程度提高和/或扩增情况提高至少约 10%（例如，至少约 15%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%或更高）。

在某些情形下，所述 TTD 蛋白可以包含所述 T 细胞表位 p2。在某些情形下，所述 T 细胞表位 p2 可以包含破伤风杆菌毒素蛋白 830 位到 844 位氨基酸。在某些情形下，所述 TTD 蛋白可以包含所述 T 细胞表位 p2 的氨基酸序列至少约 70%（例如，至少约 75%，至少约 80%，至少约 85%，至少约 90%，至少约 91%，至少约 92%，至少约 93%，至少约 94%，至少约 95%，至少约 96%，至少约 97%，至少约 98%，至少约 99%，或至少约 100%）序列同一性的核苷酸序列。

在某些情形中，所述 TTD 蛋白可以通过将其表达序列克隆到蛋白表达载体中，实现高产量蛋白表达。在某些情形中，所述蛋白表达载体的宿主可以是本领域常用的表达系统，例如，大肠杆菌表达系统、毕赤酵母表达系统、或枯草芽孢杆菌表达系统、昆虫细胞表达系统、植物细胞表达系统和/或哺乳动物表达系统。例如，所述蛋白表达系统可以包括大肠杆菌表达系统。

另一方面，本申请提供了载体，其包含所述核酸分子。在某些情形下，所述载体可以包含所述核酸分子、复制起始位点、选择标记基因、多克隆位点、增强子、启动子以及终止子。表达载体可以有很多类型，可以使用任何合适的表达载体。通常使用的是质粒表达载体、cosmid 载体还有病毒载体。在某些情形下，所述载体可以包含原核表达载体和真核表达载体，例如大肠杆菌表达系统的 pET300、pET302、pBAD 载体；噬菌体 DNA 的衍生物，例如 M 13 和其他丝状单链 DNA 噬菌体；毕赤酵母表达系统的 pPIC9、pPIC9K、pPIC3K、pPICZ；枯草芽孢杆菌表达系统的 pGPST、pEB10、pEB20、pUB18；哺乳动物表达系统的 SV40，腺病毒，逆转录病毒衍生的 DNA 序列的众所周知的衍生物和衍生自功能性哺乳动物载体（例如

上述那些)的组合的穿梭载体,以及功能性质粒和噬菌体 DNA。在某些情形下,所述载体可以包含 pGEX-4T、pET21。

另一方面,本申请提供了细胞,所述细胞可以包含所述核酸分子和/或所述载体。在某些情形下,所述核酸分子可以包含密码子优化的 TTD 的核苷酸序列。本申请所述的细胞可以表达正确的所述 TTD 蛋白。所述细胞可以包括来自真核生物和原核生物,例如,酿酒酵母、毕赤酵母、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、sf9、植物细胞、CHO 细胞、HEK293 细胞、COS 细胞、BHK 细胞、SP2/0 细胞、NIH3T3 细胞等。在本申请中,所述细胞可以包含大肠杆菌细胞。

另一方面,本申请提供了一种载体蛋白,其包含所述破伤风杆菌蛋白变体及所述蛋白变体衍生物、同源物、类似物。在某些情形下,所述破伤风杆菌蛋白变体可以结合来自细菌的多糖或其衍生的寡糖。在某些情形下,所述细菌多糖包含但不限于肺炎链球菌多糖、土拉杆菌内多糖、炭疽杆菌多糖、流感嗜血杆菌多糖、伤寒沙门氏菌多糖、沙门氏菌种多糖和志贺氏杆菌多糖。

蛋白多糖复合物及制备方法

另一方面,本申请提供了蛋白多糖结合物,所述蛋白多糖结合物可以包含所述来自肺炎链球菌的多糖和所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体。大多数多糖不能诱导胸腺依赖的免疫应答反应,不足 2 岁的儿童或老年人无法获得免疫能力,所以有必要通过与蛋白载体化学结合而使多糖具有胸腺依赖性特性,能诱导比较强的免疫原性,可同时诱导抗多糖和抗蛋白的抗体。

在某些情形中,所述“来自肺炎链球菌的多糖”可以包含来自肺炎链球菌荚膜的多糖和衍生自多糖的寡糖。所述肺炎链球菌可以是来自天然的肺炎链球菌,也可以是经过人为改造的肺炎链球菌。根据荚膜多糖的抗原性,肺炎链球菌可以包含 91 种血清型,而肺炎球菌主要致病性的血清型可以包括以下 24 种,分别是 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 和 33F。在某些情形下,所述的蛋白多糖结合物的多糖具备一种以上肺炎链球菌血清型,例如,至少 1 种、至少 2 种、至少 3 种、至少 4 种、至少 5 种、至少 6 种、至少 7 种、至少 9 种、至少 12 种、至少 15 种或至少 24 种。

在某些情形下,所述的蛋白多糖结合物的多糖可以选自下组中的任一种肺炎链球菌血清型: 1、3、5、6A、6B、7F、10A、12F、15B、19A、19F 和 33F。

在本申请中,所述来自肺炎链球菌荚膜的糖还可以包括衍生自荚膜多糖的寡糖。所述“多糖”通常指含有至少 10 个的单糖组成的聚合糖高分子碳水化合物。所述“寡糖”含有至少 2 个糖残基。肺炎链球菌的荚膜多糖可以包含多至 8 个糖残基的重复寡糖单元。在某些情形下,

作为抗原的荚膜糖可以是全长多糖，也可以是一个寡糖单元，或者可以是比重复寡糖单元的天然长度的糖链更短的单元。在某些情形下，所述蛋白多糖结合物中存在的所有糖都是多糖。

在某些情形下，所述多糖和/或寡糖可以不是天然存在的多糖和/或寡糖，其可以通过本领域已知的任何技术合成，也可以衍生自天然存在的化合物或对其进行修饰得到。例如，全长多糖可以经“大小调整”，例如它们的大小可以通过各种方法缩减，例如通过酸解处理、过氧化物处理、通过随后通过过氧化物处理以产生寡糖片段从而调整其大小。例如对多糖和/或寡糖的修饰可以包括纯化、羧化、磺化、硫酸化、解聚和/或脱乙酰基。

在某些情形下，对多糖和/或寡糖的修饰可以在其活化前，也可以采用后处理的步骤。

在某些情形下，修饰的多糖或寡糖与野生型相比可以增加抗原性。

在某些情形下，本申请所述的多糖和/或寡糖可以来自所述肺炎链球菌的抗原结合片段。

在某些情形下，本申请所述的多糖和/或寡糖可以由来自不同类型和/或菌株的多糖和/或寡糖的片段通过合成手段连接，形成包含多个表位的多糖和/或寡糖。

在某些情形下，肺炎链球菌多糖可以通过本领域已知技术制备。例如，将制备好的肺炎链球菌菌种扩增培养后杀菌灭活，收集澄清培养液，加入多糖沉淀剂，再通过纯化步骤得到精制多糖。纯化的步骤可以包括加入 NaCl 溶液溶解复合糖，溶解后离心，取上清，加入酒精去除杂质和沉糖。可通过多次洗涤沉淀去杂，利用层析法例如离子交换柱、复合型填料纯化得到精制多糖。

在某些情形下，所述的破伤风杆菌毒素蛋白截短体可以包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和所述破伤风杆菌毒素蛋白变体。

在某些情形下，所述的破伤风杆菌毒素蛋白截短体可以包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段。

在某些情形下，所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体可以包含 SEQ ID NO: 1-3 中任一项所示的氨基酸序列。所述的破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含与 SEQ ID NO: 1-3 中任一项所示的氨基酸序列具有至少约 70%（例如，至少约 75%，至少约 80%，至少约 85%，至少约 90%，至少约 91%，至少约 92%，至少约 93%，至少约 94%，至少约 95%，至少约 96%，至少约 97%，至少约 98%，至少约 99%，或至少约 100%）序列同一性的氨基酸序列。在某些情形中，表达所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体的核酸编码序列通过密码子优化得到。例如，破伤风杆菌毒素蛋白截短体的核酸编码序列如 SEQ ID NO: 4-6 中任一项所示。例如，所述密码子优化的破伤风杆菌毒素蛋白截短体的核苷酸序列可以包含与 SEQ ID NO: 4-6 中任一项所示的核苷酸序列具有至少约 70%（例如，至少约 75%，至少约 80%，至少约 85%，至少约 90%，至少

约 91%，至少约 92%，至少约 93%，至少约 94%，至少约 95%，至少约 96%，至少约 97%，至少约 98%，至少约 99%，或至少约 100%）序列同一性的核苷酸序列。

在某些情形下，所述蛋白多糖结合物包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的截短体和来自所述任一种血清型肺炎链球菌的荚膜多糖或其衍生的寡糖。在某些情形下，所述蛋白多糖结合物包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的截短体和来自所述肺炎链球菌荚膜多糖或其衍生的寡糖选自下组的任一种肺炎链球菌血清型：1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F。在某些情形下，所述蛋白多糖结合物包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的截短体和来自所述肺炎链球菌荚膜多糖或其衍生的寡糖选自下组的任一种肺炎链球菌血清型：1、3、5、6A、6B、7F、10A、12F、15B、19A、19F 和 33F。在某些情形下，所述蛋白多糖结合物包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和来自肺炎链球菌荚膜多糖或其衍生的寡糖选自下组的任一种肺炎链球菌血清型：1、3、5、6A、6B、7F、10A、12F、15B、19A、19F 和 33F。在某些情形下，所述蛋白多糖结合物包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和来自肺炎链球菌荚膜多糖或其衍生的寡糖选自下组的任一种肺炎链球菌血清型：1、3、6A 和 15B。在某些情形下，所述蛋白多糖结合物包含所述破伤风杆菌毒素蛋白变体 TTD-1 和来自肺炎链球菌荚膜多糖或其衍生的寡糖选自下组的任一种肺炎链球菌血清型：3、6B、7F 和 19A。在某些情形下，所述蛋白多糖结合物包含所述破伤风杆菌毒素蛋白变体 TTD-2 和 10A 型肺炎链球菌荚膜多糖或其衍生的寡糖。

在本申请中，所述蛋白可以和至少 1 个（例如至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个或至少 5 个）所述多糖结合，所述多糖可以包含 1 种或 1 种以上（例如至少 2 种，至少 3 种或至少 4 种）肺炎链球菌血清型的多糖。在本申请中，所述多糖可以和不止 1 个所述蛋白分子结合（例如至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个或至少 5 个）。

在本申请中，所述“质量比”可以包含所述多糖的分子质量和所述蛋白的分子质量的比例。在某些情形下，所述多糖与所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体的质量比可以为 0.4-2.5。

在某些情形下，3 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比可以为 0.4-2.5。

在某些情形下，5 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比可以为 0.4-2.5。

在某些情形下，6A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比可以为 0.4-2.5。

在某些情形下，6B 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比可以为 0.4-2.5。

在某些情形下，12F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比可以为 0.4-2.5。

在某些情形下，15B 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比可以为 0.4-2.5。

在某些情形下，19A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比可以为 0.4-2.5。

在某些情形下，19F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比可以为 0.4-2.5。

在某些情形下，33F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比可以为 0.4-2.5。

在本申请中，所述蛋白多糖结合物可以通过任何已知的偶联技术制备。结合方法可以依靠用四氟硼酸 1-氰基-4-二甲氨基吡啶（CDAP）来活化糖从而形成氰酸酯。因此活化的糖可以直接或通过间隔物（接头）基团与载体蛋白上的氨基缀合。例如，间隔物可以是肼胺或半肼胺，以产生硫醇化（thiolated）多糖，后者可以通过与马来酰亚胺活化的载体蛋白（例如使用 GMBS）或与卤代乙酰化载体蛋白（例如使用碘乙酰亚胺（例如乙基碘乙酰亚胺）或溴乙酸 N-丁二酰亚胺基酯或 SIAB、或 SIA、或 SBAP）反应后获得的硫醚键，与载体偶联。在某些情形下，根据多糖的特点，可以选择有溴化氰法（US5952454）、1-氰基-4-二甲氨基吡啶四氟硼酸酯（CDAP）（EP0720485）、高碘酸氧化法（US4711779）。

免疫原性提高的方法

另一方面，本申请提供了一种提高免疫原性的方法，其可以包括以下的步骤：提供包含来自肺炎链球菌的多糖和破伤风杆菌毒素蛋白截短体的蛋白多糖结合物。大部分多糖属于 2 型 T 细胞非依赖抗原（T cell-independent type 2, TI-2），进入机体后，可以通过与 B 细胞表面的抗原识别受体即表面免疫球蛋白分子（surface immunoglobulin molecules, sIg）交联而激活 B 细胞，引起一系列下游变化，使 B 细胞分化为可分泌抗体的浆细胞，在整个免疫过程中并没有 T 细胞的参与，因此不会形成免疫记忆，产生的抗体主要是亲和力较低的 IgM 和 IgG2。在结合糖蛋白后，蛋白多糖结合物可以经抗体提呈细胞提呈，由 T 辅助细胞活化成熟的 B 细胞，诱导产生 IgG 类抗体，可以引起免疫记忆性应答。因此载体蛋白类型对多糖结合物免疫原性存在影响。最典型案例就是以 DT 为蛋白载体的 Hib 结合疫苗的撤市：与以破伤风类毒素（TT），CRM197 等蛋白为载体的结合疫苗相比，以 DT 为载体的 Hib 结合疫苗在 18 个月以下的婴幼儿中免疫原性较差，因此，在上市后被淘汰；此外，一项国外的 11 价肺炎结合疫苗的临床研究显示，与百白破联合疫苗共同免疫时，以 TT 为载体的多糖血清抗体受到明显抑制，该项研究由于该结果终止研发，但这种抑制效应没有出现在以 DT 为载体的结合物中。

目前，已上市结合疫苗中使用的载体蛋白质包括白喉类毒素（DT）、白喉类毒素突变体（CRM197）、破伤风类毒素（TT）、B 群流脑外膜蛋白复合物（OMP）、不可分型流感嗜血杆菌蛋白 D（PD）。目前在研究开发的载体蛋白质还有重组铜绿假单胞菌外毒素 A（rEPA）、重组金黄色葡萄球菌肠毒素 C1（rSEC）、霍乱毒素 B 亚单位（CTB）等。白喉类毒素无毒变异体（CRM197）是一种常用的，在临床已证明安全、有效的载体蛋白，已在上市的肺炎球菌多糖结合疫苗中广泛使用。CRM197 由感染不产毒噬菌体 β 197tox 的白喉棒杆菌（*C. diphtheriae*）

产生,噬菌体 β 197tox 通过亚硝基胍诱变产毒素 carynephage b 而产生 (Uchida 等 Nature New Biology (1971) 233; 8-11)。CRM197 蛋白具有与白喉毒素类似的序列和分子量,但与白喉毒素不同的是结构基因中单个碱基改变。这导致第 52 位的氨基酸由甘氨酸转变为谷氨酰胺,该转变致使片段不能与 NAD 结合并因此而不具毒性 (Pappenheimer 1977, Ann Rev, Biochem .46; 69-94, Rappuoli Applied and Environmental Microbiology Sept 1983p560-564)。

辉瑞公司开发的 13 价肺炎球菌结合疫苗 Prevenar-13 利用 CRM197 (白喉类毒素无毒变异体) 为载体蛋白在 2010 年首次在美国上市,然而在临床应用中发现不同血清型多糖的免疫原性存在比较大的差别。TTD 作为一种新型的载体蛋白与 CRM197 的比较具有重要的临床意义和价值。在本申请中,所述免疫原性的提高,是指所述多糖在结合破伤风杆菌截短体后,具有可以提高多糖免疫原性的作用。在某些情形下,所述免疫原性的调高,包含与多糖 CRM197 结合物相比,所述多糖与破伤风杆菌截短体的结合物具有不差于或者更高的免疫原性。

在本申请中,所述免疫原性可以通过进行任一本领域技术人员熟知的方法进行检测。在某些情形下,所述检测方法可以包括以下步骤:将多糖-蛋白截短体结合物和多糖-CRM197 结合物分别加入任选的佐剂,配制成免疫抗原;所述免疫抗原可以被导入到受试者体内,在一定期限内抽取受试者的血样进行检测。在本申请中,所述佐剂可以包括氢氧化铝凝胶、磷酸铝或明矾的铝盐,但也可以是诸如钙盐、镁盐、铁盐或锌盐的其他金属盐;或者可以是酰化酪氨酸、或酰化糖、阳离子衍生化或阴离子衍生化的糖或含聚磷腈的不溶性混合液。在某些情形下,所述佐剂可以包括氢氧化铝、磷酸铝和/或弗氏佐剂。在某些情形下,所述导入可以包括通过静脉注射、腹腔注射、肌肉注射、皮下注射等注射方式。

在某些情形下,所述检测方式可以包含通过 ELISA-桥法、ELISA 直接法、ELISA 间接法、放射免疫分析法、电化学发光法、表面等离子体共振、酶联免疫斑点法、免疫 PCR 法检测免疫血清中的抗体滴度。在某些情形下,所述检测方法可以包含通过调理吞噬杀菌试验检测特异性抗体的产生。

药物组合物、疫苗、用途和预防方法

另一方面,本申请提供了药物组合物,其包含所述蛋白多糖结合物和任选地药学上可接受的佐剂。合适的佐剂可以包括:诸如氢氧化铝凝胶、磷酸铝或明矾的铝盐,但也可以是诸如钙盐、镁盐、铁盐或锌盐的其他金属盐;或者可以是酰化酪氨酸、或酰化糖、阳离子衍生化或阴离子衍生化的糖或含聚磷腈的不溶性混合液。

另一方面,本申请提供了所述破伤风杆菌毒素蛋白变体用于制备药物的用途。在某些情

形下，所述用途可以包括治疗细菌性疾病，例如革兰氏阳性菌引起的疾病，如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、 α 型溶血链球菌、 β 型溶血链球菌、非溶血链球菌、肺炎球菌、肠球菌等引起的疾病。在某些情形下，所述用途可以包括治疗革兰氏阴性菌引起的疾病，脑膜炎球菌、淋球菌、摩拉卡他菌、不动杆菌属、假单胞菌属、粪产碱杆菌、布鲁菌属、百日咳杆菌、军团菌、沙门菌属、志贺菌属、克雷伯菌属。在某些情形下，所述细菌性疾病可以包含肺炎链球菌性疾病。在某些情形下，所述肺炎链球菌性疾病可以包括肺炎、败血症、脑膜炎和/或中耳炎。

另一方面，本申请提供了所述多糖结合物用于制备药物的用途。在某些情形下，所述用途可以包括预防和/或治疗细菌性疾病。在某些情形下，所述细菌性疾病可以包含肺炎链球菌性疾病。在某些情形下，所述肺炎链球菌性疾病可以包括肺炎、败血症、脑膜炎和/或中耳炎。

在本申请中，所述“预防”通常是指通过预先采取某些措施而防止疾病或其一种或多种症状的产生和发作，复发，和/或扩散。所述“治疗”通常是指消除或改善疾病，或缓解与疾病相关的一种或多种症状。例如，使用本申请所述破伤风杆菌毒素蛋白变体和/或其制备的药物防止细菌性疾病产生，发作，复发和/或扩散。例如，使用本申请所述多糖结合物和/或其制备的药物防止细菌性疾病的产生，发作，复发和/或扩散。例如，所述细菌性疾病可以是肺炎链球菌性疾病。例如，所述肺炎链球菌性疾病可以包括肺炎、败血症、脑膜炎和/或中耳炎。

另一方面，本申请提供了疫苗，其可以包含所述蛋白多糖结合物、所述药物组合物和/或任选地药学上接受的佐剂。所述蛋白多糖结合物可以包含所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体、所述破伤风杆菌毒素蛋白变体和/或所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段。每种类型的载体蛋白可以用作不止一种糖的载体，其中所述糖可以相同或不同。例如，肺炎链球菌血清型 3 和 5 可以与相同的载体蛋白缀合，或者与载体蛋白的相同分子或与相同载体蛋白的不同分子结合。在某些情形下，两种或更多种不同的糖可以与相同的载体蛋白结合，或者与载体蛋白的相同分子或与相同载体蛋白的不同分子结合。

含有本申请药物组合物的疫苗制剂可以通过系统途径或粘膜途径施用所述疫苗，用于保护或治疗易于感染的哺乳动物。这些施用可以包括通过肌内、腹膜内、皮内或皮下途径注射；或通过粘膜施用到口腔/消化道、呼吸道、泌尿生殖道。在某些情形下，所述药物组合物的组分也可以于同一时间或不同时间共同施用（例如可以同时地或在施用疫苗的任何细菌蛋白组分 1-2 周后，单独施用肺炎链球菌糖结合物，使两者相互之间的免疫应答达到最佳的配合）。对于共同施用，可以在任何或所有不同的施用中存在任选的佐剂。除了单一的施用途径以外，还可以使用 2 种不同的施用途径。例如，糖或糖结合物可以肌内（或皮内）施用，而细菌蛋

白可以粘膜（或皮内）施用。

另一方面，本申请提供了预防肺炎链球菌性疾病的方法，其可以包含向有需要的受试者施用所述蛋白多糖结合物、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述载体蛋白、所述药物组合物和/或所述疫苗。在某些情形下，所述肺炎链球菌性疾病可以包括肺炎、败血症、脑膜炎和/或中耳炎。

在某些情形中，本申请提供的所述蛋白多糖结合物、所述药物组合物和/或药学上可接受的佐剂可以用于制备抗血清。在某些情形中，本申请提供的所述蛋白多糖结合物、所述药物组合物和/或药学上可接受的佐剂可以用于制备抗体。所述蛋白多糖结合物可以包含所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体、所述破伤风杆菌毒素蛋白变体和/或所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段。每种类型的载体蛋白可以用作不止一种糖的载体，其中所述糖可以相同或不同。所述糖可以是肺炎链球菌荚膜多糖。

在某些情形中，本申请提供的所述蛋白多糖结合物、所述药物组合物和/或药学上可接受的佐剂可以用于检测样品中的抗体。在某些情形中，本申请提供的所述蛋白多糖结合物、所述药物组合物和/或药学上可接受的佐剂可以用于制备检测样品中的抗体的试剂盒。

例如，所述抗体可以是细菌的抗体。例如，所述细菌的抗体可以是肺炎链球菌的抗体。例如，肺炎链球菌血清型 3 的抗体、肺炎链球菌血清型 5 的抗体、肺炎链球菌血清型 6A 的抗体、肺炎链球菌血清型 6B 的抗体、肺炎链球菌血清型 10A 的抗体、肺炎链球菌血清型 12F 的抗体、肺炎链球菌血清型 15B 的抗体、肺炎链球菌血清型 19A 的抗体和/或肺炎链球菌血清型 33F 的抗体。

在某些情形中，本申请提供的所述破伤风杆菌毒素蛋白变体、破伤风杆菌毒素蛋白截短体和/或所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段还可以用于制备抗破伤风杆菌毒素的抗体、用于制备抗破伤风杆菌毒素的抗原和/或疫苗、和/或用于诊断破伤风杆菌毒素抗体的试剂盒。

另一方面，本申请还提供了所述多糖结合物作为抗原制备抗体的用途。

在某些实施方式中，所述抗体用于分离菌株的诊断分型。

另一方面，本申请还提供了试剂盒，其包含所述多糖结合物。

在某些实施方式中，所述试剂盒用于分离菌株的诊断分型。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的蛋白变体、制备方法和用途等，而不适用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1: TTD 重组蛋白序列设计

基于已公开 *Clostridium tetani* 的 tetanus neurotoxin 序列 (NCBI WP011100836) 及其晶体结构 (PDB: 5N0B), 本申请设计了破伤风杆菌毒素蛋白截短体 (Tetanus Toxin Domain, TTD), 排除了破伤风杆菌毒素蛋白 (Tetanus toxin, TT) 的 N 端序列, 而包含其 C 端序列。所以该 TTD 蛋白没有破伤风杆菌毒素蛋白的毒性, 但保留了其 C 端的结构域及功能片段, 在保持蛋白的正确的折叠、稳定性基础上, 提供 T 细胞表位和结构灵活性, 更有利于化学偶联。

所设计的蛋白序列 01 (TTD-1) 是将 TT 序列去除了 N 端 828 个氨基酸后, 获得的含有 487 个氨基酸的 TTD 蛋白序列, 即去除了 N 端的多肽酶 M27 及部分转位区域, 保留了 C 端的功能域 (受体结合域), 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。相应的核酸序列 (TTD-4) 经过密码子优化后如序列 SEQ ID NO: 4 所示。

所设计的蛋白序列 02 (TTD-2) 是将 TT 序列去除了 N 端 839 个氨基酸后, 获得的含有 476 个氨基酸的 TTD 蛋白序列, 即去除了 N 端的多肽酶 M27 及部分转位区域, 保留了 C 端的功能域 (受体结合域), 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。相应的核酸序列 (TTD-5) 经过密码子优化后如序列 SEQ ID NO: 5 所示。

所设计的蛋白序列 03 (TTD-3) 是将 TT 序列去除了 N 端 864 个氨基酸后, 获得的含有 451 个氨基酸的 TTD 蛋白序列, 即去除了 N 端的多肽酶 M27 及部分易位区域, 保留了 C 端的功能域 (受体结合域), 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。相应的核酸序列 (TTD-6) 经过密码子优化后如序列 SEQ ID NO: 6 所示。

实施例 2: 表达载体构建及蛋白表达

为利用大肠杆菌蛋白表达系统, 将所设计的蛋白 TTD 和其相应的基因序列先后通过基因序列合成、引物设计、PCR 扩增、分子克隆等常用技术构建到蛋白表达载体中 (如 pGEX-4T, pET21), 得到重组表达质粒。将重组蛋白表达质粒通过 BL21(DE3) 感受态细胞 (Thermo Fisher) 转化后, 获得重组表达质粒。TTD-4、TTD-5 和 TTD-6 的 PCR 电泳的结果如图 1 所示。取保存的菌种在含 Amp^r 的平板上划线活化, 挑取单克隆接种到含有 Amp^r 的 LB 液体培养基中, 于 37°C, 250rpm 培养过夜。将培养的菌种按比例稀释接种于含有 Amp^r 的 LB 液体培养基中, 37°C 震荡培养至 OD₆₀₀ 达到 0.5-1.5 时, 加入 1mM IPTG 诱导。培养结束后, 取样 1mL 离心, 去上清后加入裂解液, 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 以确定重组蛋白表达。电泳结果如图 2 所示, 均获得了目的 TTD 蛋白。

实施例 3: TTD 蛋白的纯化

将重组 TTD 菌种通过发酵得到的菌体 25g, 用 10 倍 50 mM Tris-HCl 缓冲液溶解为 250mL 的体系, 用高压均质机破碎二次, 通过高速离心后去沉淀, 保留上清。在上清中加入硫酸铵沉淀, 低温搅拌 2 小时, 再通过高速离心 1 小时收集沉淀, 将收集得到的沉淀用缓冲液溶解后, 通过超滤换液, 然后分别通过复合型层析、离子交换层析, 并采用不同 NaCl 浓度梯度洗脱, 去除杂质, 最后得到纯化度超过 95% 的 TTD 蛋白。纯化结果如图 3 所示。纯化的 TTD 蛋白通过 SEC-HPLC 分析显示, 蛋白有良好的均一性。TTD-1 的 SEC-HPLC 的结果如图 4 所示。

实施例 4: 肺炎链球菌多糖制备

将一管制备好的肺炎链球菌菌种 (ATCC) 接种到摇瓶中, 在 37°C CO₂ 培养箱培养过夜, 镜检结果正常后, 将培养液接种到 10 升发酵罐, 发酵培养 6-10 小时。培养结束后, 加入灭活剂杀菌灭活, 然后通过离心收集澄清培养液, 在澄清培养液中加入多糖沉淀剂, 得到粗制沉淀复合糖。然后通过一系列纯化后得到精制多糖。通常精制多糖纯化工艺包括, 但不限于, 加入 NaCl 溶液溶解复合糖, 溶解后离心, 取上清, 加入酒精去除杂质和沉糖。可通过多次洗涤沉淀去杂, 利用层析法例如离子交换柱、复合型填料纯化得到精制多糖。制备的不同类型多糖通过质量分析, 各个指标符合欧州药典标准, 例如蛋白及核酸等杂质含量均低于 1%。

实施例 5: 制备肺炎链球菌多糖-蛋白结合物

肺炎链球菌多糖经过活化后具有与载体蛋白化学反应活性。多糖-蛋白化学偶联可以直接偶联或通过连接子实施, 如利用连接子己二酸二酰肼进行偶联。化学偶联通常方法有通过溴化氰法、CDAP 法或还原胺化法 (US5952454, EP0720485, US4711779)。通过偶联得到的多糖-蛋白缀合物能诱导比较强的免疫原性, 可同时诱导抗多糖和抗蛋白的特异性抗体。

使用溴化氰法制备细菌多糖-蛋白结合物的步骤如下: 将纯化多糖 200 mg 溶解在 20 ml 0.9% NaCl 溶液中, 加入溴化氰, 加入 0.5N NaOH 溶液, 调整溶液 pH 到 10.5, 反应 10-15 分钟后, 加入 0.5 N HCl 将溶液调整到 pH 7.8。然后加入己二酸二酰肼溶液 (ADH) 制备成多糖-ADH 衍生物。同时将载体蛋白 (TTD 或 CRM97) 与 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride) 反应, 制备载体蛋白衍生物。最后将多糖-ADH 衍生物与活化载体蛋白按比例混合后, 反应生成多糖-蛋白结合物, 再通过超滤浓缩或层析, 去除杂质及未反应物质, 纯化得到多糖-蛋白结合物。

使用 CDAP 法制备细菌多糖-蛋白结合物的步骤如下: 在一个典型的反应中, 将肺炎多糖

(50 mg) 溶解于 10 ml 的硼酸钠缓冲液中 (100 mM, pH 9.0) 后, 依次加入 CDAP 溶液, 和 0.2 N NaOH 溶液调整反应液 pH 到 9.0。室温搅拌反应 5-10 分钟后, 加入 0.1 N HCl 溶液调整 pH 到 7.5。然后将反应液通过 G25 柱脱盐, 收集活化多糖。同时将载体蛋白溶解于 0.1 M NaHCO₃ pH8.0 缓冲液中, 然后与活化多糖混合, 在室温条件下, 搅拌 6-10 小时。反应结束后, 通过超滤浓缩换液, 去除杂质, 最终得到多糖-蛋白结合物。

使用还原胺法制备细菌多糖-蛋白结合物的步骤如下: 在一个典型的反应中, 将冻干多糖溶解于磷酸缓冲液中 (4 mg/ml), 加入 100 mM 高碘酸钠溶液, 搅拌过夜后, 通过 G25 柱脱盐, 得到活化多糖。同时将载体蛋白溶解在磷酸缓冲液中, 然后按比例与活化多糖溶液混合, 加入一定当量氨基硼氢化钠, 在室温或 37°C 度搅拌过夜。反应结束后, 将反应液通过层析, 去除杂质, 纯化得到多糖-蛋白结合物。

实施例 6-15: 蛋白多糖结合物的免疫原性评价

小鼠免疫实验方案: 将肺炎链球菌多糖-蛋白结合物加入氢氧化铝或磷酸铝佐剂, 配制成免疫抗原, 选择 6-8 周龄的 Balb/c 小鼠进行腹腔免疫, 每组 5-8 个小鼠, 每次免疫剂量为 2 微克, 分别在第 0 天、第 14 天、第 21 天进行免疫, 并在第 21 天和第 35 天抽血评价其多糖的免疫原性。

大兔免疫实验方案: 将多糖-蛋白结合物加入弗氏佐剂, 配制成免疫抗原, 选择 2~2.5kg 的新西兰大白兔进行免疫, 每组 2 只兔。首次以弗氏完全佐剂与抗原乳化混合, 皮下免疫, 剂量为 200 微克; 第 14 天以弗氏不完全佐剂与抗原乳化混合, 皮下第二次免疫, 剂量为 200 微克; 第 28 天以 100 微克抗原静脉免疫。并在第 21 天与 42 天抽血评价其多糖的免疫原性。

ELISA 法评价肺炎链球菌多糖免疫原性: 将肺炎链球菌多糖用包被缓冲液稀释, 包被到 96 孔酶标板, 100 μ l/孔, 并在 37°C 孵育 5 小时后洗板。将小鼠、大兔抗血清通过吸附剂处理后, 小鼠血清先以 1: 200 稀释 (大兔血清先以 1: 10000 稀释), 然后 2.5 倍梯度稀释, 稀释 8 个梯度, 再加入酶标板中, 每孔 50 μ l, 孵育过夜。洗板后, 将二抗以 1: 20000 稀释后加入酶标板中, 每孔 100 μ l, 孵育 2 小时后洗板, 然后加入 1 mg/ml 的 PNPP-Na 显色底物, 每孔 100 μ l, 孵育 2 小时后, 以 50 μ l/孔加入 3M NaOH 中止反应, 上机读取波长 405nm 处吸收值。测定孔 OD 值与阴性孔 OD 值比值大于或等于 2.1 判定为阳性, 以稀释最大倍数为阳性的稀释度定为每个血清的抗体滴度, 并计算每组免疫动物的抗体滴度几何平均值, 利用 T-test 分析不同组别间的统计学意义。

肺炎链球菌荚膜多糖特异性抗体调理吞噬杀菌试验: 将肺炎链球菌稀释 10⁵ CFU/ml, 以 10 μ l/孔加入到 96 孔细胞工作板中。将灭活的血清样品梯度稀释后以 20 μ l/孔加入到上述细胞

工作板中,使菌体与抗血清在 700 rpm/min 孵育 30min,将经 DMF 分化的 HL-60 细胞经 HBSS 缓冲液洗涤后调整到浓度 1×10^7 个/ml,再将 1×10^7 个/ml 的细胞液与稀释好的补体按 1:4 体积比混合,混合液以 50 μ l/孔加入到 96 孔细胞工作中。将 96 孔细胞工作板置混匀仪上,放入 5% CO₂、温度为 37°C 的 CO₂ 培养箱中,振荡培养 45min。经中止调理吞噬后,点样到血平板中,于 CO₂ 培养箱中培养过夜。计算各稀释血清下的杀菌率。

实施例 6: 载体蛋白 TTD 对 3 型多糖的免疫增强效应

通过比较 3 型 (T3) 肺炎链球菌多糖-TTD 结合物与 3 型肺炎链球菌多糖-CRM197 的免疫效果,分析该型肺炎链球菌多糖-TTD 在小鼠中的免疫增强效应。

分别以 3 型多糖-CRM197 结合物和 3 型多糖-TTD-1、2、3 结合物免疫小鼠,并分别评价在 21 天和 35 天的抗体滴度。结果如图 5 所示,在 35 天,T3-TTD-1、T3-TTD-2、T3-TTD-3 组均可诱导出更加高的抗体滴度。

对 35 天免疫血清的抗体滴度进行组间分析,经 ANOVA 单因素方差分析,T3-TTD 组与 T3-CRM197 组比较, $P=0.001<0.01$,统计差异有高度统计学意义,说明 TTD-1、TTD-2 和 TTD-3 载体蛋白均比 CRM197 具有更加明显的免疫加强效应。

将 T3-CRM197 和 T3-TTD-1 二组 35 天的免疫血清进行 OPA 试验。结果如图 6 所示,T3-CRM197 与 T3-TTD-1、T3-TTD-2 和 T3-TTD-3 的 IC₅₀ (50%杀菌率时抗血清的稀释倍数) 分别为 1599 与 9926、7142 和 5728。结果表明 TTD-1、TTD-2 和 TTD-3 载体蛋白结合物诱产生的 3 型多糖特异性抗体均明显多于 CRM197 载体蛋白结合物。

实施例 7: 载体蛋白 TTD 对肺炎 6B 型多糖的免疫增强效应

通过比较 6B 型 (T6B) 肺炎链球菌多糖-TTD-1 结合物与 6B 型肺炎链球菌多糖-CRM197 的免疫效果,分析该型肺炎链球菌多糖-TTD-1 在小鼠中的免疫增强效应。

分别以 6B 型多糖-CRM197 结合物、6B 型多糖-TTD-1 结合物进行免疫小鼠,并分别评价在 21 天和 35 天的抗体滴度。结果如图 7 所示,在 35 天,6B 多糖-TTD-1 结合物可诱导出更加高的抗体滴度。

将 6B-TTD-1、6B-CRM197 二组 21 天和 35 天的免疫血清进行 OPA 试验。结果如图 8 所示,6B-TTD-1 与 6B-CRM197 免疫 21 天血清的 IC₅₀ (50%杀菌率时抗血清的稀释倍数) 分别为 2851 与 746.3,6B-TTD-1 与 6B-CRM197 免疫 35 天血清的 IC₅₀ (50%杀菌率时抗血清的稀释倍数) 分别为 7677 与 1802,表明 TTD-1 载体蛋白结合物比 CRM197 载体蛋白结合物能诱导产生更高的 6B 型多糖特异性功能抗体。

实施例 8：载体蛋白 TTD 对肺炎 15B 型多糖的免疫增强效应

通过比较 15B 型（T15B）肺炎链球菌多糖-TTD-3 结合物与 15B 型肺炎链球菌多糖-CRM197 的免疫效果，分析该型肺炎链球菌多糖-TTD 在小鼠中的免疫增强效应。

分别以 15B 型多糖-CRM197 结合物和 15B 型多糖-TTD-3 结合物免疫小鼠，并分别评价在 21 天和 35 天的抗体滴度，结果如图 9 所示，在 35 天，多糖-TTD-3 结合物可诱导出更加高的抗体滴度。

将 15B-CRM197 和 15B-TTD-3 二组 21 天与 35 天的免疫血清进行 OPA 试验。结果如图 10 所示，15B-CRM197 与 15B-TTD-3 21 天免疫血清 IC_{50} 分别为 1392 与 2633。15B-CRM197 与 15B-TTD-3 35 天免疫血清 IC_{50} 分别为 9005 与 14997。表明 TTD-3 载体蛋白结合物诱导产生的 15B 型多糖特异性抗体明显多于 CRM197 载体蛋白结合物。

实施例 9：载体蛋白 TTD 对肺炎 6A 型多糖的免疫增强效应

分别以 6A 型（T6A）肺炎链球菌多糖-CRM197 结合物和 6A 型多糖-TTD-3 结合物免疫小鼠，并分别评价在 21 天和 35 天的抗体滴度（如图 11 所示）。在 35 天，多糖-TTD 结合物可诱导出不低于多糖-CRM197 的抗体滴度。

将 T6A-CRM197 和 T6A-TTD-3 二组 21 天与 35 天的免疫血清进行 OPA 试验。结果，如图 12 所示，T6A-CRM197 与 T6A-TTD-3 21 天免疫血清 IC_{50} 分别为 458 与 1606。T6A-CRM197 与 T6A-TTD-3 35 天免疫血清 IC_{50} 分别为 9103 与 20850，TTD-3 载体蛋白结合物诱导产生的 6A 型多糖特异性抗体明显高于 CRM197 载体蛋白结合物。

实施例 10：载体蛋白 TTD 对肺炎 7F 型多糖的免疫增强效应

7F 型（T7F）肺炎链球菌多糖-TTD-1 结合物与多糖-CRM197 结合物的比较。分别对以多糖-CRM197 结合物和多糖-TTD-1 结合物进行免疫小鼠，并分别评价在 21 天和 35 天的抗体滴度。结果如图 13 所示，在 35 天，7F 多糖-TTD-1 结合物可诱导出与多糖-CRM197 的抗体滴度相当。

将 T7F-CRM197 和 T7F-TTD-1 二组 21 天与 35 天的免疫血清进行 OPA 试验。结果如图 14 所示：T7F-CRM197 与 T7F-TTD-1 21 天免疫血清 IC_{50} 分别为 1213 与 1925；T7F-CRM197 与 T7F-TTD-1 35 天免疫血清 IC_{50} 分别为 5362 与 7975。结果表明 TTD-1 载体蛋白结合物诱导产生的 7F 型多糖特异性抗体不低于 CRM197 载体蛋白结合物。

实施例 11：载体蛋白 TTD 对肺炎 10A 型多糖的免疫增强效应

10A 型 (T10A) 肺炎链球菌多糖-TTD-2 结合物与多糖-CRM197 结合物的比较。分别对以多糖-CRM197 结合物和多糖-TTD-2 结合物进行免疫小鼠，并分别评价在 21 天和 35 天的抗体滴度，结果如图 15 所示，在 35 天，10A 多糖-TTD-2 结合物可诱导出比多糖-CRM197 结合物更高的抗体滴度。

将 T10A-CRM197 和 T10A-TTD-2 二组 35 天的免疫血清进行 OPA 试验。结果如图 16 所示：T10A-CRM197 与 T10A-TTD-2 35 天免疫血清 IC_{50} 分别为 23264 与 30709。结果表明 TTD-2 载体蛋白结合物诱导产生的 10A 型多糖特异性抗体与 CRM197 载体蛋白结合物相当。

实施例 12：载体蛋白 TTD 对肺炎 19A 型多糖的免疫增强效应

通过比较 19A 型 (T19A) 肺炎链球菌多糖-TTD 结合物与 19A 型肺炎链球菌多糖-CRM197 的免疫效果，分析该型肺炎链球菌多糖-TTD 在新西兰大白兔中的免疫增强效应。

分别以 19A 型多糖-CRM197 结合物和 19A 型多糖-TTD-1 结合物进行免疫新西兰大白兔，并分别评价在 21 天和 42 天的抗体滴度。结果如图 17 所示，在 42 天，多糖-TTD 结合物可诱导出更加高的抗体滴度。

将 T19A-CRM197 和 T19A-TTD-1 二组 42 天的免疫血清进行 OPA 试验。结果如图 18 所示，19A-CRM197 与 19A-TTD-1 42 天免疫血清 IC_{50} 分别为 8617 与 35780。结果表明 TTD-1 载体蛋白结合物诱导产生的 19A 型多糖特异性抗体明显多于 CRM197 载体蛋白结合物。

实施例 13：载体蛋白 TTD 对肺炎 1 型多糖的免疫增强效应

1 型 (T1) 肺炎链球菌多糖-TTD-3 结合物与多糖-CRM197 结合物的比较。分别对以多糖-CRM197 结合物和多糖-TTD-3 结合物进行免疫大兔，并分别评价在 21 天和 42 天的抗体滴度。结果如图 19 所示，在 42 天，多糖-TTD 结合物可诱导出更加高的抗体滴度。

将 T1-CRM197 和 T1-TTD-3 二组 21 天与 42 天的免疫血清进行 OPA 试验。结果如图 20 所示：T1-CRM197 与 T1-TTD-3 21 天免疫血清 IC_{50} 分别为 6523 与 35571；T1-CRM197 与 T1-TTD-3 42 天免疫血清 IC_{50} 分别为 193732 与 493114。结果表明 TTD-3 载体蛋白结合物诱导产生的 1 型多糖特异性抗体明显高于 CRM197 载体蛋白结合物。

实施例 14：载体蛋白 TTD 对其他型肺炎链球菌多糖的免疫增强效应

其它血清型肺炎链球菌多糖结合物，如血清型 5、12F、33F、19F。分别以多糖-CRM197 结合物和多糖-TTD 结合物免疫小鼠，并分别评价在 21 天和 35 天的抗体滴度 (如图 21 所示)。

在 35 天，多糖-TTD 结合物可诱导出更加高的抗体滴度。

本发明同时比较了 TTD 蛋白对其他血清型肺炎多糖的免疫增强效应，发现 TTD 蛋白比 CRM197 能诱导更高的免疫原性。例如，以多糖-CRM197 结合物和多糖-TTD 结合物分别进行免疫小鼠，并分别评价在 21 天和 35 天的抗体滴度，在 35 天，多糖-TTD 结合物诱导出抗体滴度与多糖-CRM197 结合物的抗体滴度比值可达到 2-20 倍，进一步说明 TTD 作为载体蛋白的优势。

实施例 15：多糖-与 TTD 变异体结合物的免疫原性

TTD 变异体的设计：以蛋白序列 01、02、03 为基础，截断 N 端不同长度的氨基酸，而包含其 C 端序列。

多糖-TTD 变异体结合物的免疫原性：分别以 X 型多糖-CRM197 结合物（TX-CRM197 组）和 X 型多糖-TTD 结合物（TX-TTD）免疫小鼠，并分别评价在 21 天和 35 天的抗体滴度。在 35 天，多糖-TTD 结合物可诱导出更加高的抗体滴度。X 为任一种肺炎链球菌多糖糖型。

将 TX-CRM197 和 TX-TTD 二组 35 天的免疫血清进行 OPA 试验。结果表明 TTD 载体蛋白结合物诱导产生的 X 型多糖特异性抗体明显多于 CRM197 载体蛋白结合物。

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的，并非要限制所附权利要求的范围。目前本申请所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，且保留在所附的权利要求和其等同方案的范围内。

1. 一种破伤风杆菌毒素蛋白变体，其包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域部分片段。
2. 根据权利要求 1 所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体，其中所述易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域的 T 细胞表位 P2。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体，其中所述易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的第 829-864 位氨基酸。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体，其中所述易位区域部分片段包含 SEQ ID NO: 7-8 中任一项所示的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体，其中所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体，其包含 SEQ ID NO: 1-2 中任一项所示的氨基酸序列。
7. 蛋白多糖结合物，其包含来自肺炎链球菌的多糖和破伤风杆菌毒素蛋白截短体（TTD）。
8. 根据权利要求 7 所述的蛋白多糖结合物，其中所述多糖源自肺炎链球菌荚膜多糖。
9. 根据权利要求 7-8 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述多糖具备一种以上肺炎链球菌血清型。
10. 根据权利要求 7-9 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述多糖选自下组中的任一种肺炎链球菌血清型：1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F。
11. 根据权利要求 7-10 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段。
12. 根据权利要求 7-11 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段，其中所述多糖选择下组中的任一种肺炎链球菌血清型：1、3、5、6A、6B、7F、10A、12F、15B、19A、19F 和 33F。
13. 根据权利要求 7-12 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
14. 根据权利要求 7-13 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域部分片段。
15. 根据权利要求 14 所述的蛋白多糖结合物，其中所述易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域的广谱的 T 细胞表位 P2。
16. 根据权利要求 14-15 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述易位区域部分片段包含所

述破伤风杆菌毒素蛋白的第 829-864 位氨基酸。

17. 根据权利要求 14-16 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述易位区域部分片段包含 SEQ ID NO: 7-8 中任一项所示的氨基酸序列。
18. 根据权利要求 7-17 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含 SEQ ID NO: 1-3 中任一项所示的氨基酸序列。
19. 根据权利要求 7-18 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述多糖与所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
20. 根据权利要求 10-19 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 1 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
21. 根据权利要求 10-20 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 3 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
22. 根据权利要求 10-21 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 5 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
23. 根据权利要求 10-22 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 6A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
24. 根据权利要求 10-23 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 6B 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
25. 根据权利要求 10-24 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 7F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
26. 根据权利要求 10-25 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 10A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
27. 根据权利要求 10-26 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 12F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
28. 根据权利要求 10-27 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 15B 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
29. 根据权利要求 10-28 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 19A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
30. 根据权利要求 10-29 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 19F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
31. 根据权利要求 10-30 中任一项所述的蛋白多糖结合物，其中所述 33F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

32. 根据权利要求 7-31 中任一项所述的蛋白多糖结合物, 可以采用偶联的方法将所述多糖和所述蛋白变体偶联起来。
33. 根据权利要求 32 中所述的蛋白多糖结合物, 其中所述偶联的方法包含以下任一种方法: 溴化氢法、CDAP 法、还原胺法。
34. 一种提高免疫原性的方法, 其包括以下的步骤: 提供包含来自肺炎链球菌的多糖和破伤风杆菌毒素蛋白截短体的蛋白多糖结合物。
35. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中所述多糖源自肺炎链球菌荚膜多糖。
36. 根据权利要求 34-35 中任一项所述的方法, 其中所述多糖具备一种以上肺炎链球菌血清型。
37. 根据权利要求 34-36 中任一项所述的蛋白多糖结合物, 其中所述多糖选自下组中的任一种肺炎链球菌血清型: 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F。
38. 根据权利要求 34-37 中任一项所述的方法, 其中所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段。
39. 根据权利要求 34-38 所述的方法, 其中所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段, 其中所述多糖选择下组中的任一种肺炎链球菌血清型: 1、3、5、6A、6B、7F、10A、12F、15B、19A、19F 和 33F。
40. 根据权利要求 38-39 中任一项所述的方法, 其中所述破伤风杆菌蛋白的 C 片段包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
41. 根据权利要求 34-40 中任一项所述的方法, 其中所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含破伤风杆菌毒素蛋白的 C 片段和破伤风杆菌毒素蛋白易位区域部分片段。
42. 根据权利要求 41 中所述的方法, 其中所述易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域的广谱的 T 细胞表位 P2。
43. 根据权利要求 41-42 中任一项所述的方法, 其中所述的破伤风杆菌毒素蛋白的易位区域部分片段包含所述破伤风杆菌毒素蛋白的第 829-864 位氨基酸。
44. 根据权利要求 34-43 中任一项所述的方法, 其中所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体包含 SEQ ID NO: 1-3 中任一项所示的氨基酸序列。
45. 根据权利要求 34-44 中任一项所述的方法, 其中所述肺炎链球菌多糖与所述破伤风杆菌毒素蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
46. 根据权利要求 37-45 中任一项所述的方法, 其中所述 1 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。

47. 根据权利要求 37-46 中任一项所述的方法, 其中所述 3 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
48. 根据权利要求 37-47 中任一项所述的方法, 其中所述 5 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
49. 根据权利要求 37-48 中任一项所述的方法, 其中所述 6A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
50. 根据权利要求 37-49 中任一项所述的方法, 其中所述 6B 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
51. 根据权利要求 37-50 中任一项所述的方法, 其中所述 7F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
52. 根据权利要求 37-51 中任一项所述的方法, 其中所述 10A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
53. 根据权利要求 37-52 中任一项所述的方法, 其中所述 12F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
54. 根据权利要求 37-53 中任一项所述的方法, 其中所述 15B 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
55. 根据权利要求 37-54 中任一项所述的方法, 其中所述 19A 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
56. 根据权利要求 37-55 中任一项所述的方法, 其中所述 19F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
57. 根据权利要求 37-56 中任一项所述的方法, 其中所述 33F 型肺炎链球菌多糖与所述蛋白截短体的质量比为 0.4-2.5。
58. 根据权利要求 34-57 中任一项所述的方法, 其中所述方法包含采用偶联的方法将所述多糖和所述蛋白变体偶联起来。
59. 根据权利要求 58 所述的方法, 其中所述偶联的方法包含以下任一种方法: 溴化氢法、CDAP 法、还原胺法。
60. 根据权利要求 34-59 中任一项所述的方法, 其中所述提高细菌多糖免疫原性包含与多糖 CRM197 结合物相比, 所述蛋白多糖结合物的免疫原性更高。
61. 根据权利要求 34-60 中任一项所述的方法, 其中所述免疫原性更高是在动物免疫实验中检测到的。

62. 根据权利要求 61 中所述的方法, 其中所述动物免疫试验包含以下步骤: 将权利要求 7-33 所述的蛋白多糖结合物与佐剂配制成免疫抗原。
63. 根据权利要求 62 中所述的方法, 其中所述的免疫抗原的注射方法包含腹腔注射、皮下注射、肌肉注射和/或静脉注射。
64. 根据权利要求 61-63 中任一项所述的方法, 其中所述动物免疫试验包含以下步骤: 对获得的免疫动物的血清中的抗体进行 ELISA 检测。
65. 根据权利要求 61-64 中任一项所述的方法, 其中所述动物免疫试验包含以下步骤: 对获得的免疫动物的血清进行调理吞噬杀菌试验。
66. 根据权利要求 61-65 中任一项所述的方法, 其中所述动物包含小鼠、大鼠和/或兔。
67. 根据权利要求 62-66 中任一项所述的方法, 其中所述佐剂包含氢氧化铝、磷酸铝和/或弗氏佐剂等。
68. 核酸分子, 其包含编码权利要求 1-6 中任一项所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体。
69. 根据权利要求 68 所述的核酸分子, 其包含如 SEQ ID NO: 4-6 所示的核苷酸序列。
70. 载体, 其包含权利要求 68-69 中任一项所述的核酸分子。
71. 细胞, 其包含权利要求 68-69 中任一项所述的核酸分子或权利要求 70 所述的载体。
72. 一种载体蛋白, 其包含权利要求 1-6 中任一项所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体。
73. 药物组合物, 其包含权利要求 7-33 中任一项所述的蛋白多糖结合物和任选地药学上可接受的佐剂。
74. 权利要求 1-6 中任一项所述的破伤风杆菌毒素蛋白变体用于制备药物的用途。
75. 权利要求 7-33 中任一项所述的多糖结合物用于制备药物的用途。
76. 根据权利要求 74-75 中任一项所述的用途, 其中所述药物用于预防和/或治疗肺炎链球菌性疾病。
77. 根据权利要求 76 所述的用途, 其中所述肺炎链球菌性疾病包括肺炎、败血症、脑膜炎和/或中耳炎。
78. 疫苗, 其包含权利要求 7-33 中任一项所述的蛋白多糖结合物、权利要求 73 所述的药物组合物和/或任选地药学上可接受的佐剂。
79. 预防肺炎链球菌性疾病的方法, 其包含向有需要的受试者施用权利要求 7-33 中任一项所述蛋白多糖结合物、权利要求 68-69 中任一项所述的核酸分子、权利要求 70 所述的载体、权利要求 71 所述的细胞、权利要求 72 所述的载体蛋白、权利要求 73 所述的药物组合物和/或权利要求 78 所述的疫苗。
80. 根据权利要求 79 所述的方法, 其中所述肺炎链球菌性疾病包括肺炎、败血症、脑膜炎

和/或中耳炎。

81. 权利要求 7-33 中任一项所述的多糖结合物作为抗原制备抗体的用途。
82. 根据权利要求 81 所述的用途，其中所述抗体用于分离菌株的诊断分型。
83. 试剂盒，其包含权利要求 7-33 中任一项所述的多糖结合物。
84. 根据权利要求 83 所述的试剂盒，其用于分离菌株的诊断分型。