

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於免疫以對抗艱難梭菌(*C. difficile*)之組合物及方法

COMPOSITIONS AND METHODS OF IMMUNIZING AGAINST
C. DIFFICILE

【相關申請案】

本申請案主張2013年6月14日申請之美國專利第61/835,246號之優先權，其全文併入本發明中。

【技術領域】

本發明係關於在成年人類個體(例如處於初始症狀性艱難梭菌感染風險中的成年人類)中誘發對抗艱難梭菌毒素A及毒素B之免疫反應的方法。

【先前技術】

艱難梭菌(*Clostridium difficile*，*C. difficile*)為形成革蘭氏陽性孢子的厭氧細菌。艱難梭菌之病理性作用係藉由所分泌的毒素A及毒素B介導，該等毒素引起結腸黏膜損傷及炎症。儘管艱難梭菌感染(CDI)在一些病患中為無症狀的，然CDI可導致急性腹瀉及結腸炎，且在嚴重情況下可產生偽膜性結腸炎及毒性巨結腸。艱難梭菌為在接受改變正常腸道菌群之藥物的住院病患中之院內腹瀉及結腸炎之臨床上重要的原因，且在群落中越來越多地報告CDI。症狀性艱難梭菌感染之風險因素包括抗生素治療、高齡、潛在疾病及在長期療養所中住院或駐留。

已進行早期階段臨床試驗以評估艱難梭菌類毒素疫苗之型式之安全性及免疫原性。在健康成年(18-55歲)志願者及老年(≥65歲)志願

者中，早期評估的包含類毒素A及類毒素B之艱難梭菌疫苗經證明為安全的，且誘發對毒素A及毒素B兩者之免疫反應(Greenberg等人，*Vaccine*, 30: 2245-2249(2012); Foglia等人，*Vaccine*, 30: 4307-4309(2012))。此類研究中之最大劑量為50 µg，且毒素A與毒素B比例為3:1。候選疫苗係在第0、28及56天投與。觀察到在多劑量之後在健康成年志願者組及老年志願者組兩者中毒素A之血清轉化高於毒素B之血清轉化，且在老年個體中的抗體反應相較於年輕組中的抗體反應更快衰退。一般技術者認為此為顯著問題，因為老年人常常免疫功能不全。持續需要用於處於症狀性艱難梭菌感染風險中之成人的艱難梭菌疫苗，尤其用於老年人的。

【發明內容】

本發明係關於在成年人類個體(例如處於初始症狀性艱難梭菌感染風險中的成年人)中誘發對抗艱難梭菌毒素A及毒素B之免疫反應之方法。在一些實施例中，該等方法可包含藉由任何合適之途徑(例如肌肉內)使用一或多次投與(例如三次)向個體投與組合物(例如疫苗)，該組合物以有效的類毒素A:類毒素B比例(例如按重量計約3:1、3:2或1:1類毒素A比類毒素B中之任一者)包含有效量之具有充分純度(例如至少約50%至約100%，諸如約90-100% (w/w))的艱難梭菌類毒素A及類毒素B(例如約40 µg/劑量至約500 µg/劑量(w/w，組合物中的類毒素A及類毒素B之總量))，多劑量投與方案之每一劑量如可藉由一般技術者確定如本文所述適當地彼此分離(例如，相隔約一天至十天，諸如約七天)。在一個實施例中，方法可包含第一、第二及第三次投與，其中第二次投與在第一次投與之後約七天，且第三次投與在第一及/或第二次投與之後至少約30天及/或至少約180天。在多劑量方案之較佳實施例中，第二劑量可在第一劑量之後約七天投與，及/或第三劑量在第一劑量之後約30天(或在第二劑量之後約20-25天)投與。在一

些實施例中，方法可包含一或多種佐劑(例如鋁佐劑)。在某些實施例中，方法可包含向處於感染風險中的人類個體投與組合物。在一些實施例中，人類個體可為至少約40、50、65歲或更年長者中之任一者。在一些實施例中，人類個體可為年齡約40歲至約65歲。在一些實施例中，人類個體可為年齡約65-75歲或更年長者。在某些此類實施例中，在第一次投與之前的12個月期間中人類個體可已具有至少一或兩次醫院停留，每次持續至少約24、48或72小時中之任一者或更長，且已接受全身(非局部)抗生素；及/或預期在第一次投與之60天內將成為住院病患住院接受已計畫之手術程序。在一些實施例中，預期/迫切醫院停留/住院可計劃為72小時或更多，且可用於涉及腎臟/膀胱/泌尿系統、肌肉骨骼系統、呼吸系統、循環系統及/或中樞神經至少一種系統的手術。較佳的是藉由此等方法誘發的免疫反應足以防止及/或治療及/或改善症狀性艱難梭菌感染及/或降低其風險。一般技術者可自本文所提供之描述推導其他實施例。

【圖式簡單說明】

無

【實施方式】

本發明係關於可用以治療、改善艱難梭菌之症狀性感染、降低艱難梭菌之症狀性感染風險及/或防止艱難梭菌之症狀性感染之組合物及方法。如上文所述，一般技術者已碰到設計對抗由艱難梭菌所導致的感染之有效疫苗之困難。有效疫苗可為一種例如治療、改善艱難梭菌之症狀性感染、降低艱難梭菌之症狀性感染風險及/或防止艱難梭菌之症狀性感染之疫苗。此等問題已出人意料地藉由本文所述之組合物及方法解決。此等出人意料有效的解決方案之多個實施例在本文中描述。提供示例性的組合物。舉例而言，藉由任何合適之途徑(例如肌肉內)使用一或多次投與(例如三次投與或劑量)，以有效的類毒素

A:類毒素B比例(例如約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%中之任一者，按重量計3:1、3:2或1:1類毒素A比類毒素B)提供包含有效量之具有充分純度(例如至少約50%至約100%，諸如約50、55、60、65、70、75、80、85、90、95%或90-100% (w/w)中之任一者)的艱難梭菌類毒素A及類毒素B (例如約40 µg/劑量至約500 µg/劑量，諸如約40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490或500 µg/劑量中之任一者，諸如約50 µg/劑量至約100 µg/劑量(w/w，組合物中的類毒素A及類毒素B之總量))之組合物，多劑量投與方案之每次劑量適當地彼此分離(例如至少約一天至約十天，諸如約一天、兩天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天或十天中之任一者，諸如約七天)。一般技術者將理解劑量之間的時間之長度(時間間隔)視個體而變化，且彼時間間隔應足夠長(例如以天為單位量測)從而來自之前劑量之免疫反應不但具有時間來產生(例如初打)而且不以任何方式受後續劑量(例如加打劑量)抑制。舉例而言，一個特定個體在劑量之間可需要至少約七天(例如5-8天)，而另一個可僅需要至少約四天(例如3-5天)。在一些實施例中，則給藥時間間隔可變化，例如約10-20%。一般技術者將理解劑量之間的時間可需要如本文所述調節。在一些實施例中，第二次投與在第一次投與(例如第0天)之後至少一天、兩天、三天、四天、五天、六天、七天、八天、九天或十天，且第三次投與在第一次投與之後至少約20-200天(例如約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200天，諸如約30天或約180天)。舉例而言，方法可包含第一、第二及/或第三次投與，其中第二次投與在第一次投與之後至少7天，且

第三次投與在第一及/或第二次投與之後至少約30天及/或至少約180天。在一些實施例中，第二次投與在第一次投與之後約七天，且第三次投與在第一次投與之後約30天。在使用此類方法向宿主/個體投與此類組合物之後，通常觀察到免疫反應，其通常包括體液免疫反應且可涉及細胞免疫反應。在某些實施例中，方法可包含向處於感染風險中的人類個體投與免疫原性組合物。在一些實施例中，人類個體可為至少約40、50、65歲或更年長者中之任一者。在一些實施例中，人類個體可為年齡約40歲至約65歲。在一些實施例中，人類個體可為年齡65-75歲。由此，亦提供投與組合物之方法。製造組合物之方法在本文中描述，且對於一般技術者為可用的。根據本文所提供之描述將使其他實施例變得清晰。

本發明亦描述藉由向個體(例如人類)投與包含一或多種艱難梭菌之抗原的組合物使其免疫對抗艱難梭菌之方法。舉例而言，適合之組合物可以大致類毒素A比類毒素B約3:2之比例包含總共約50 µg或約100 µg (或約50-100 µg)艱難梭菌類毒素(類毒素A及類毒素B)，具有或不具有佐劑(例如氫氧化鋁)。出於對比目的，可向一組個體投與含有抗原的組合物，且向另一組投與(例如在同一時程)安慰劑組合物(例如0.9%生理鹽水)。免疫學數據及安全性數據可在特定天數(例如第0、14、30、60、180及/或210天，及/或直至在第一次投與1000天之後)自個體獲得。組合物之投與可在例如第0天(第一次投與)、約第7天(第二次投與)、約第30天(第三次投與)及/或約第180天(替代的第三次投與或第四投與)進行。

如上文所提及，組合物可以有效的類毒素A:類毒素B比例(例如按重量計約3:1、3:2或1:1類毒素A比類毒素B中之任一者)包含充分純度(例如約90%或更高純度(w/w))的艱難梭菌類毒素A及類毒素B。舉例而言，組合物可以約3:2之大致類毒素A比類毒素B比例包含艱難梭

菌類毒素A及類毒素B之高度純化(例如>90% (w/w))製劑。此類組合物可使用可用的製備方法(例如如在2013年3月15日申請的美國臨時申請案第 61/790,423 號、同在申請中的2014年3月14日申請的PCT/US2014/029035、2013年3月15日申請的61/793,376及/或同在申請中的2014年3月14日申請的PCT/US2014/029070中所描述，其中之每一者在此全文併入本發明中)中之任一者製備。如本發明之實例中所描述，毒素A及毒素B係自艱難梭菌之不活化培養物純化，並以目標3:2比例混合，且在誘發及/或增強對抗艱難梭菌毒素A及毒素B之免疫反應中顯示為有效的。如上文所提及，然而，類毒素A及類毒素B可以任何有效量及/或有效比例(有效表明例如提供有效疫苗)組合。

術語「艱難梭菌類毒素(*C. difficile* toxoid)」在本文中用以指代已部分或完全不活化的艱難梭菌毒素(毒素A或毒素B)。若毒素如藉由例如活體外細胞毒性分析或藉由動物毒性來量測具有比未經處理之毒素更小的毒性(例如100%、99%、98%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或更小毒性或其間的任何值)，則其為不活化的。艱難梭菌類毒素可藉由純化來自艱難梭菌培養物之毒素及藉由化學物質(例如甲醛、戊二醛、過氧化物或氧氣處理)使毒素不活化來產生。或者，可使用重組方法產生缺乏毒性或具有降低之毒性的野生型或突變艱難梭菌毒素。藉由基因方法製造類毒素之方法在此項技術中已為吾人熟知。舉例而言，可產生導致降低的毒性之突變。亦可產生缺乏特定的區域而降低毒性之野生型或突變艱難梭菌毒素。

組合物(其可為疫苗)可以凍乾調配物形式提供，其可在臨床場所使用稀釋劑復原，且在指定時與佐劑(例如鋁佐劑，諸如磷酸鋁或氫氧化鋁)或注射用水(WFI)混合。稀釋劑可為例如任何醫藥學上可接受之稀釋劑(例如20 mM檸檬酸鈉、5%蔗糖及0.016%甲醛；10 mM檸檬酸鹽、4%蔗糖、0.008%甲醛、0.57%氯化鈉)。佐劑可包含例如適合

之濃度(例如約800-1600 $\mu\text{g/mL}$ 中之任一者)之佐劑，諸如於WFI中包含鋁(例如氫氧化鋁或磷酸鋁)的佐劑。舉例而言，佐劑(例如800-1600 $\mu\text{g/mL}$ 氫氧化鋁於0.57%氯化鈉中)可用作稀釋劑以復原凍乾調配物。WFI可用以稀釋凍乾疫苗以得到無佐劑的調配物。最終給藥溶液可包含例如組合物/疫苗、稀釋劑及佐劑。如上文所述，安慰劑亦可以液體調配物(例如0.9%生理鹽水)形式提供。研究藥物(疫苗或安慰劑)之各遞送劑量之體積可為約0.5 mL。調配物可藉由任何合適之途徑(例如皮下、靜脈內、肌肉內、腹膜內、皮內、結節內、鼻內、經口)投與。

本文所述之材料(例如組合物)及/或方法中之任一者的有用性(例如免疫原性)可藉由熟習此項技術者已知之多種方法中之任一者分析。本文所述之分析之任何一或多種或任何其他一或多種適合之分析可用以確定本文所述之材料中之任一者對於既定目的之適合性。應理解此等方法為示例性的及非限制性的；其他分析亦可為適合的。

舉例而言，本文所述之組合物通常在投與至個體之後誘導及/或增強對抗艱難梭菌之抗體之產生。可使用一般技術者可使用的方法中之任一者在個體中偵測此類抗體。舉例而言，如實例部分中所描述，血清可獲自個體且藉由ELISA測試以偵測艱難梭菌毒素A及/或毒素B之免疫球蛋白G型(IgG)抗體(例如「一級免疫原性數據」)。存在於測試血清中的抗體可與吸附至微量滴定盤之個別孔的毒素A或毒素B抗原反應。結合至經抗原包覆之孔的抗體之量可在二級抗IgG(例如抗人類IgG)抗體-酶結合物之結合之後使用比色受質反應確定。隨後通常添加酶之受質產生與結合至抗原的抗體成正比的比色變化。血清中抗體之濃度可藉由自標準曲線外推來推導，該標準曲線自具有規定的IgG單位量(ELISA單位(EU)/mL)之參考標準血清之多種稀釋液產生。

毒素中和分析(TNA)亦可用於定量中和艱難梭菌毒素之抗體。在

此分析中，可使用固定量之艱難梭菌毒素A或毒素B培育連續稀釋血清。隨後可添加測試細胞(例如維羅(Vero)細胞)及在合適的條件(例如37°C持續6天)下培育血清-毒素-細胞混合物。血清中和艱難梭菌毒素之細胞毒性作用之能力可藉由細胞之成活力確定及與細胞之成活力相關。分析利用封閉培養孔中的酸代謝物之積聚作為正常細胞呼吸之指示。在暴露於毒素的細胞中，代謝及CO₂產生降低；因此，pH上升(例如至7.4或更高)，如在細胞培養基中藉由酚紅pH指示劑所指示。在此pH，培養基呈現紅色。然而，細胞對照物或暴露於已藉由抗體中和的毒素之細胞以正常量代謝及產生CO₂；因此，pH得以維持(例如在7.0或更低)，且在此pH，培養基呈現黃色。因此，艱難梭菌毒素中和抗體與血清中和艱難梭菌毒素對細胞之代謝作用之能力相關，如藉由其維持某一pH(例如7.0或更低)之能力所證明。培養基之顏色變化可使用酶標儀量測(例如在562 nm至630 nm處)以進一步計算在艱難梭菌毒素介導的細胞毒性之50%抑制下抗毒素中和抗體力價。

在某些實施例中，較佳的是本文所述之組合物在適當投與至個體之後展現免疫原性特性(例如誘發可偵測的及/或中和及/或保護性免疫反應)。中和及/或保護性免疫反應之存在可如上文所述證明及/或藉由顯示在已向其投與本文所述材料之個體(例如人類或其他動物)中與尚未向其投與材料之個體相比病原體(例如艱難梭菌)之感染受影響(例如減少)來證明。舉例而言，可藉由任何合適之途徑及時程向一或多個測試個體(例如人類或非人類)投與本文所述之組合物，且隨後在適合之時間量(例如約1、2、3、4、5、6、7、8、9或10週)之後藉由病原性有機體攻擊。可在投與及/或攻擊之後監測動物免疫功能(例如抗體產生、T細胞活性)。可使用例如抗體ELISA及/或病原體中和分析來關於整體抗體反應或特定亞型之表現分析血清。T細胞活性可藉由例如量測使用抗原再刺激之後IFN- γ 產生來量測。隨後可對數據進行統

計分析(例如費雪(Fisher's)精確檢定、威爾科克森(Wilcoxon)檢定、曼-惠特尼(Mann-Whitney)檢定)以確定材料之有效性是否影響免疫反應。

如本文所述之艱難梭菌類毒素A及/或類毒素B可與一或多種醫藥學上可接受之載劑組合以在投與至宿主之前提供組合物。醫藥學上可接受之載劑為非生物學上非所需或者其他方面非所需的材料，例如該材料可在不引起任何非所需生物作用或以有害方式與醫藥組合物(其中含有該材料)的其他成份中之任一者相互作用的情況下投與至個體。載劑應天然選定以使活性成份之降解降至最低且使個體中的任何有害副作用降至最低，如應為熟習此項技術者所熟知。適合之醫藥載體及其調配物描述於例如 *Remington's: The Science and Practice of Pharmacy*, 第 21 版, David B. Troy 編, Lippicott Williams 及 Wilkins(2005)中，且可為合適的。通常，適量之醫藥學上可接受之鹽在調配物中使用以賦予調配物等張性。醫藥學上可接受之載劑之實例包括(但不限於)無菌水、鹽水、如林格氏(Ringer's)溶液之緩衝溶液及右旋糖溶液。溶液之pH一般為約5至約8或約7至約7.5。其他載劑包括持續釋放製劑，諸如含有多肽的固態疏水性聚合物之半滲透基質或其片段。基質可呈成形物件形式，例如薄膜、脂質體或微米粒子。熟習此項技術者將顯而易知某些載劑視例如投與途徑及所投與組合物之濃度而定可為更佳的。載劑為適合於向人類或其他個體投與者。

醫藥組合物亦可包括增稠劑、稀釋劑、緩衝劑、防腐劑、表面活性劑、佐劑、免疫刺激劑。醫藥組合物亦可包括一或多種活性成分，諸如抗微生物劑、消炎劑及麻醉劑。亦可包括佐劑(例如如本文所述的或如可以其他方式可用的)以刺激或增強免疫反應。

如上文所述，組合物亦可包含一或多種佐劑。可包括佐劑以刺激或增強免疫反應。佐劑之適合種類之非限制性實例包括彼等凝膠型

(亦即氫氧化鋁/磷酸鋁(「礬佐劑」)，磷酸鈣，微生物源(胞壁醯二肽(MDP))，細菌外毒素(霍亂毒素(CT)，原生霍亂毒素亞單位B (CTB)，大腸桿菌(*E. coli*)不穩定毒素(LT)，百日咳毒素(PT)，CpG寡核苷酸，BCG序列，破傷風類毒素，例如大腸桿菌、明尼蘇達沙門桿菌(*Salmonella minnesota*)、鼠傷寒沙門桿菌(*Salmonella typhimurium*)或伊克塞里志賀桿菌(*Shigella exseri*)之單磷醯基脂質A (MPLA)，顆粒狀佐劑(生物可降解的聚合物微粒)，免疫刺激性錯合物(ISCOMs)，油狀乳液及基於界面活性劑之佐劑(弗氏(Freund's)不完整佐劑(FIA)、微流化乳液(MF59、SAF)、皂苷(QS-21))，合成物(胞壁醯肽衍生物(莫拉布胺(murabutide)、羥丁胺醯基-MDP)、非離子嵌段共聚物(L121)、聚磷氮烯(PCCP)、合成聚核苷酸(聚A:U、聚I:C)、沙立度胺衍生物(CC-4407/ACTIMID)、RH3-配位體或聚丙交酯乙交酯(PLGA)微粒。此等毒素中之任一者之片段、同系物、衍生物及融合物亦為適合的，限制條件為其保持佐劑活性。佐劑之適合之突變體或變體例如描述於WO 95/17211 (Arg-7-Lys CT突變體)、WO 96/6627 (Arg-192-Gly LT突變體)及WO 95/34323 (Arg-9-Lys及Glu-129-Gly PT突變體)中。可使用的另外的LT突變體包括例如Ser-63-Lys、Ala-69-Gly、Glu-110-Asp及Glu-112-Asp突變體。諸如礬佐劑之金屬鹽佐劑由於提供具有佐劑活性之安全賦形劑在此項技術中為熟知的。認為此等佐劑之作用機制包括抗原儲存物之形成從而抗原可停留在注射部位處直至投與之後3週，且亦包括更易於由抗原呈現細胞吸收的抗原/金屬鹽錯合物之形成。除鋁以外，其他金屬鹽亦已用於吸附抗原，包括鋅、鈣、銻、鉻、鐵及鉍之鹽。鋁之氫氧化物及磷酸鹽為最常見的。含有鋁鹽、抗原及另外的免疫刺激劑之調配物或組合物在此項技術中已知。免疫刺激劑之實例為3-去O-醯基化單磷醯基脂質A (3D-MPL)。在一些實施例中，一或多種佐劑可為任何一或多種鋁鹽、乳液、脂質

體、聚合物及/或其組合。舉例而言，適合之佐劑可包括任何一或多種陰離子聚合物、包含脂質體及Toll樣7/8受體促效劑之佐劑、乙基DOPC脂質體、DC-膽固醇、包含Toll樣7/8受體促效劑或Toll樣4受體促效劑之角鯊烯乳液、包含Toll樣4受體促效劑之鋁鹽。此等組份之某些可包括於免疫原性組合物及/或疫苗(例如治療性或預防性免疫原性組合物)中。如熟習此項技術者應理解，其他佐劑亦可為適合的。在生產過程之前、期間或之後可將此類佐劑中之任一者引入組合物中。

如上文所提及，免疫組合物通常為包含艱難梭菌抗原且在投與至宿主(例如動物)之後誘導或增強針對抗原(及例如艱難梭菌)的免疫反應之一者。此類反應可包括如上文所述之抗體之生成(例如經由B細胞之刺激)或基於T細胞之反應(例如細胞溶解反應)，其可為保護性及/或中和的。保護性或中和免疫反應可為對與抗原對應之感染性有機體(例如抗原來源於其)有害且對宿主有利(例如藉由減少或防止感染)之一者。如本文所使用，保護性或中和抗體及/或細胞反應可能與本文所描述之艱難梭菌抗原反應，尤其當依有效量及/或時程投與時。當在動物中測試時，彼等抗體及/或細胞反應可降低或抑制艱難梭菌感染之嚴重性、時間及/或致死率。如實例中所示，本文所述之組合物可用於誘導對抗艱難梭菌之免疫反應。在投與宿主時，可產生治療性(例如通常在活性感染期間投與)及/或保護性(例如通常在活性感染之前或之後投與)及/或中和免疫反應之免疫組合物可視為疫苗。

在一些實施例中，亦提供防止、改善、降低艱難梭菌之感染風險及/或治療(例如影響)艱難梭菌之感染的方法。在個體中治療一或多種由艱難梭菌所導致或涉及艱難梭菌之病況的方法包括向該個體投與至少一或多個有效劑量之本文所述之組合物(例如包含艱難梭菌抗原(例如類毒素A、類毒素B))。抗原可依約1 μg至約300 μg(例如約1、

2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290及/或300 µg中之任一者)之給藥量投與。可以投與超過一次相同或不同給藥量之抗原。在某些實施例中，可藉由相同或不同的合適途徑向個體投與艱難梭菌抗原一次、兩次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或更多次。當投與多重劑量時，該等劑量可在每次劑量中包含約相同或不同類型及/或量之艱難梭菌抗原。該等劑量亦可彼此間隔相同或不同時間分開投藥。舉例而言，可間隔約6、12、24、36、48、60、72、84或96小時、7天、14天、21天、30天、40天、50天、60天、70天、80天、90天、100天、110天、120天、130天、140天、150天、160天、170天、180天、190天、200天、一週、兩週、三週、一個月、兩個月、三個月、四個月、五個月、六個月、七個月、八個月、九個月、10個月、11個月、12個月、1.5年、2年、3年、4年、5年中之任一者或在此等時間段中之任一者之前、之後及/或之間的任何時間段分開投與該等劑量。在一些實施例中，可單獨或連同其他試劑(例如抗生素)投與艱難梭菌抗原。可將該等其他試劑與相同或不同艱難梭菌抗原同時(或約同時)或在不同時間及/或以不同頻率投與。該等方法之其他實施例亦可為合適的，如藉由一般技術者可容易確定。

本文亦提供用於投與艱難梭菌抗原之套組。在一個實施例中，一或多種艱難梭菌抗原可形成部分用於投與至個體之套組及/或以用於投與至個體之套組形式提供。亦可由套組提供投與艱難梭菌抗原之說明書。包含如本文所述之艱難梭菌抗原的組合物可包括在套組(例如疫苗套組)中。舉例而言，套組可包含含有呈無水形式的本文所述之組合物的第一容器及含有用於復原該組合物之水溶液的第二容器。

套組可視情況包括用於投與組合物之復原液體形式的裝置(例如皮下注射器、微針陣列)及/或使用說明書。用於投與的裝置可預填充有用於復原組合物之水溶液而供應。

由此，本發明提供用於提供對抗艱難梭菌之治療性或保護性免疫反應的組合物，該組合物包含艱難梭菌類毒素A及類毒素B。本發明亦提供投與該等組合物從而誘導及/或增強對抗艱難梭菌(例如艱難梭菌抗原)之免疫反應的方法。在某些實施例中，組合物可進一步包含一或多種艱難梭菌抗原，一或多種醫藥學上可接受之載劑及/或一或多種佐劑(例如鋁鹽、乳液、陽離子脂質體、陰離子聚合物、Toll樣受體促效劑及其組合)。在一些實施例中，組合物為免疫原性組合物及/或疫苗。亦提供藉由向個體(諸如人類)投與任何該等組合物而使其免疫的方法。在一些實施例中，方法可包含使用一或多次投與(例如至少三次，每次劑量適當地彼此分離(例如至少約7天))向個體投與免疫原性組合物(例如疫苗)，該組合物以有效類毒素A:類毒素B比例(例如按重量計(w/w)3:1、3:2、1:1)包含有效量(例如至少約40 µg至約500 µg，諸如約50 µg至約100 µg)之具有充分純度(例如至少90% (w/w))的艱難梭菌類毒素A及類毒素B (w/w組合)。有效類毒素A:類毒素B比例為可包括在組合物中且誘導對抗艱難梭菌毒素A及/或毒素B之有效免疫反應的任何比例。在一個實施例中，方法可包含第一、第二及第三次投與，其中第二次投與在第一次投與之後至少7天，且第三次投與在第一及/或第二次投與之後至少約30天及/或至少約180天。在一些實施例中，方法可包含第一、第二及第三次投與，其中第二次投與在第一次投與(在第0天)之後約七天，且第三次投與在第一次投與之後約30天。在一些實施例中，方法可包含第一、第二及第三次投與，其中第二次投與在第一次投與之後約七天，且第三次投與在第一次投與之後約180天。在一些實施例中，方法可包含一或多種佐劑(例如鋁佐

S

劑)。在一些實施例中，方法可在先前暴露於艱難梭菌的人類(例如血清反應陽性的人類，抗體再生免疫反應)中增強及/或誘導現存之免疫反應。在某些實施例中，在第一次投與之前的12個月期間中人類可能已具有至少一或兩次醫院停留，每次持續至少約24、48或72小時或更長，及/或已接受全身(非局部)抗生素；及/或預期在第一次投與之約60天內將成為住院病患住院接受已計畫之手術程序。在一些實施例中，可計劃預期/迫切醫院停留/住院為約24、48小時至72小時或更長，且可用於涉及腎臟/膀胱/泌尿系統、肌肉骨骼系統、呼吸系統、循環系統及中樞神經至少一種系統的手術。較佳的是藉由此等方法誘發的免疫反應足以防止及/或改善症狀性艱難梭菌感染及/或降低症狀性艱難梭菌感染風險。在某些實施例中，方法可包含向處於症狀性感染風險中的人類個體(其為年齡至少約40、50或65歲)投與免疫原性組合物。在一些實施例中，方法可包含向年齡介於約40歲與約65歲之間及/或介於約65歲與約75歲之間的組之各位個體投與組合物。在一些實施例中，如藉由例如ELISA及/或TNA量測，方法可在個體(在第一次投與之前視為血清反應陽性)之約80%、85%、90%、95%或100%中之任一者之群體中誘導對抗艱難梭菌毒素A及/或毒素B的基於抗體之免疫反應之約兩倍至四倍增強。在一些實施例中，如在第一次投與(例如遵循在第0天、第七天及第30天投與)之後14天藉由例如ELISA及/或TNA所量測，方法可在個體(在投與組合物之前視為血清反應陰性)之約20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%中之任一者之群體中誘導對抗艱難梭菌毒素A及/或毒素B的基於抗體之免疫反應之約兩倍至四倍增強。在一些實施例中，如在第一次投與(例如遵循在第0天、第七天及第30天投與)之後60天藉由例如ELISA及/或TNA所量測，方法可在個體(在投與組合物之前視為血清反應陰性)之約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75或80%中之任一者之

群體中誘導對抗艱難梭菌毒素A及/或毒素B的基於抗體之免疫反應之約兩倍至四倍增強。在一些實施例中，該等群體中之個體為約40歲至約65歲。在一些實施例中，該等群體中之個體為約75歲至約65歲。在一些實施例中，此增強在第一次投與(在第0天)之後約30天觀察到，通常在約第7天跟隨第二次投與，且通常在第三次投與(在例如約第30天或第180天)之前觀察到。在一些實施例中，對抗毒素A及/或毒素B之免疫反應可為可偵測的直至在多療程投與方案中之第一、第二及/或第三次投與之後的約30個月(例如約1000天)。在一些實施例中，如藉由例如ELISA及/或TNA所量測，在第0天(第一次投與)、約第7天(第二次投與)及約第30天(第三次投與)向人類個體投與本文所述之組合物增強或誘導對抗艱難梭菌毒素A及/或毒素B之免疫反應直至約30個月或約1000天。在一些實施例中，如藉由例如ELISA及/或TNA所量測，免疫反應之程度在三次劑量投與方案之第一次投與之後約第1000天可能與在第一次投與之後約第14天至少約一樣高。在一些實施例中，如藉由例如ELISA及/或TNA所量測，免疫反應之程度在第一次投與之後約第100、200、300、400、500、600、700、800、900及1000天中之任一者可能與在第一次投與之後約第14天至少約一樣高。在一些實施例中，如藉由例如ELISA及/或TNA所量測，免疫反應可能約高於在第一次投與之前的基線(例如在第0天的抗毒素A及/或毒素B抗體含量)兩倍至八倍。在一些實施例中，如藉由例如ELISA及/或TNA所量測，免疫反應可能為高於基線約2.5倍至約6.8倍。在一些實施例中，如藉由毒素A及/或毒素B之ELISA所量測(例如遵循在第0、7及30天投與)，血清反應陽性個體(例如非未經治療)中的免疫反應自基線增大(在約第7天為約3倍；在約第14天為約10至約70倍；在約第30天為約30至約200倍；及在約第60天為約100至約200倍)。在一些實施例中，如藉由毒素A及/或毒素B之TNA所量測(例如遵循在第0、7及30天

投與)，在血清反應陽性個體(例如非未經治療)中的免疫反應自基線增大(在約第7天為約3倍；在約第14天為約10至約100倍；在約第30天為約15至約130倍；及在約第60天為約100至約130倍)。在一些實施例中，如藉由毒素A及/或毒素B之ELISA所量測(例如遵循在第0、7及30天投與)，血清反應陰性個體(例如未經治療)中的免疫反應自基線增大(在約第14天為2倍；在約第30天為約5至約10倍；及在約第60天為約25至約60倍)。在一些實施例中，如藉由毒素A及/或毒素B之TNA所量測(例如遵循在第0、7及30天投與)，血清反應陰性個體(例如未經治療)中的免疫反應自基線增大(在約第14天為約2至約3倍；在約第30天為約2至約5倍；及在約第60天為約5至約40倍)。在一些實施例中，於在第0天(例如在第一次投與之前)視為血清反應陽性或血清反應陰性的個體中偵測到本文所述之免疫反應。在一些實施例中，如藉由例如ELISA及/或TNA所量測，偵測到艱難梭菌毒素A及毒素B之該等免疫反應。亦提供製造該等艱難梭菌抗原(例如類毒素A及/或類毒素B)之方法(例如活體外或活體內)及包含該等艱難梭菌抗原之組合物。該等方法可包括，例如彼等一般技術者可用的及/或已知的中之任一者及/或描述於此前提及的在2013年3月15日申請的同在申請中之美國臨時申請案第61/790,423號、2014年3月14日申請的同在申請中PCT/US2014/029035、2013年3月15日申請的61/793,376及/或2014年3月14日申請的同在申請中之PCT/US2014/029070中之方法。一般技術者可自本文所提供之描述推導其他實施例。

如一般技術者應理解，亦提供其他實施例。

術語「約」、「大致」及類似者在值或範圍之列表之前時，分別指代列表或範圍中之各個值，如同該術語緊靠在該列表或範圍中之各個值之前。該等術語意謂其所指代之值精確接近或類似該等值。

如本文所使用，個體(subject)或宿主意謂個體(individual)。個體

可包括馴養動物(諸如貓及狗)、家畜(例如牛、馬、豬、綿羊及山羊)、實驗室動物(例如小鼠、家兔、大鼠、天竺鼠)及鳥類。在一個態樣中，個體為哺乳動物，諸如靈長類或人類。

視情況可選之(optional)或視情況(optionally)意謂隨後描述之事件或情形可能發生或可能不發生，且該描述包括其中該事件或情形發生之實例及其中該事件或情形未發生之實例。舉例而言，片語組合物可視情況包含組合意謂組合物可包含不同分子之組合或可不包括組合，從而該描述包括組合及組合(亦即組合之個別成員)不存在兩者。

範圍在本文中可表示為自約一個特定值及/或至約另一特定值。當表示此類範圍時，另一個態樣包括自一個特定值及/或至其他特定值。類似地，當藉由使用前提約或大致將值表示為近似值時，應理解特定值形成另一態樣。應進一步理解範圍中之每一者的端點相對於其他端點及獨立於其他端點均為重要的。範圍(例如90%-100%)意欲包括範圍本身以及在該範圍內之各個獨立值，如同單獨列舉各值。

當在本文中結合給定病狀之給定治療(例如防止感染)使用術語防止(prevent/preventing/prevention)時，其意謂傳達經治療的個體完全不產生臨床上可觀擦程度之病狀亦或與未治療時他/她應具有的相比不太頻繁地產生該病狀。此等術語並不僅限於其中個體不經歷任何病狀之態樣的情況。舉例而言，若在將個體暴露於應已預期將產生病狀給定表現之刺激期間進行治療，且使得個體相比於其它方式所預期的經歷更少及/或更輕度的病狀症狀，則稱該治療已防止該病狀。治療可藉由使個體僅呈現輕度明顯感染症狀來「防止」感染；並不暗示必須已不存在感染微生物之任何細胞之滲透。類似地，在給定治療情況下可結合症狀性感染風險來陳述如本文所使用的降低(reduce/reducing/reduction) (例如降低症狀性艱難梭菌感染風險)。舉例而言，降低(reduce/reducing/reduction)通常可指代個體相較於在不

存在治療(例如使用所揭示之抗原或組合物投與或疫苗接種)下產生感染之對照或基本程度而言更緩慢產生感染或至更低程度。症狀性感染風險的降低可使個體僅呈現輕度明顯感染症狀或延緩的感染症狀；其不暗示必須已不存在感染性微生物之任何細胞之滲透。

本發明內所引用之所有參考文獻均以全文引用之方式併入本文中。在以下實例中進一步描述某些實施例。此等實施例僅作為實例提供，且並不意欲以任何方式限制申請專利範圍之範疇。

實例

實例1

A. 試驗設計

在成人中進行階段II，隨機的、安慰劑對照的、經雙盲(對於給藥及調配物雙盲；對於疫苗接種時程為開放標籤)修飾的、劑量變化的多中心試驗。招募由於(i)在招募之60天內迫切住院或(2)在招募之60天內在長期護理設備或康復設備中的當前或迫切停留而在試驗期間處於產生艱難梭菌感染風險中的年齡為40至75歲之成年個體。已排除具有當前或先前CDI事件之個體。個體係依據年齡分層：40歲至65歲(個體之50%)及65歲至75歲(個體之50%)。試驗具有兩個階段。階段I測試候選疫苗之4個不同調配物且階段II探究使用此等調配物中之一者的不同疫苗接種時程。在階段I中，總共招募455位個體且在第0、7及30天隨機接受以下調配物或安慰劑中之一者：

第1組：低劑量(總共50 µg抗原(類毒素A、類毒素B)，具有類毒素A比類毒素B大致3:2之比例)，具有佐劑(400 µg氫氧化鋁(ALOH))；

第2組：低劑量(總共50 µg抗原(類毒素A、類毒素B)，具有類毒素A比類毒素B大致3:2之比例)，無佐劑；

第3組：高劑量(總共100 µg抗原(類毒素A、類毒素B)，具有類毒素A比類毒素B大致3:2之比例)，具有佐劑(400 µg ALOH)；

第4組：高劑量(總共100 µg抗原(類毒素A、類毒素B)，具有類毒素A比類毒素B大致3:2之比例)，無佐劑；及

第5組：安慰劑(0.9%生理鹽水)。

基於在第0、14、30及60天取得的血液樣品之免疫結果及安全性數據，選定一種調配物用於階段II。在階段II中，由206位個體依據另外兩個時程中之一者，隨機接受3次劑量之選定調配物：

第6組：第0、7及180天；

第7組：第0、30及180天。

將來自於階段II招募之個體之結果與關於在研究之階段I期間在第0、7及30天接受選定的疫苗調配物的個體所得之數據相比。在階段I中，要求個體在第0、7、14、30天直至第60天且包括第180及210天提供血液樣品，直至選定調配物。在階段II中，要求全部個體在第0、7、14、30、60、180及210天提供血液樣品。

所評估之疫苗為艱難梭菌類毒素A及類毒素B(類毒素A對類毒素B之比例為約3:2)之高度純化製劑。毒素A及毒素B係自艱難梭菌之培養物純化，已失活，且依目標3:2比例混合。疫苗以凍乾調配物形式提供，該凍乾調配物在臨床場所使用稀釋劑復原，且依照指示與ALOH佐劑或注射用水(WFI)混合。稀釋劑由20 mM檸檬酸鈉、5%蔗糖及0.016%甲醛組成。佐劑由存於WFI中的1600 µg/mL ALOH組成。使用WFI稀釋凍乾疫苗以得到無佐劑的調配物。最終疫苗給藥溶液係由疫苗及稀釋劑及佐劑(當需要時)組成。以液體調配物(0.9%生理鹽水)形式提供作為安慰劑。研究藥物(疫苗或安慰劑)之每次遞送劑量之體積為0.5 mL。疫苗調配物係經肌肉內投與。

採用ELISA測試血清中針對艱難梭菌毒素A及毒素B之免疫球蛋白類型G(IgG)抗體，以產生初始免疫原性數據。存在於測試血清中的抗體會與吸附至微量滴定盤之個別孔的毒素A或毒素B抗原反應。在

二級抗人類IgG抗體-酶結合物結合之後，藉由比色受質反應確定與已塗覆抗原之孔內之抗體之結合量。添加酶之受質所引起之比色變化會與結合至抗原的抗體成正比。藉由自標準曲線外推來推算血清中抗體之濃度，該標準曲線係由具有指定的IgG單位量(ELISA單位(EU)/mL)之參考標準血清之多種稀釋液產生。

毒素中和分析(TNA)亦用於定量中和艱難梭菌毒素之抗體。在分析中，使用固定量之艱難梭菌毒素A或毒素B培育連續稀釋血清。隨後添加維羅細胞(Vero cell)且在37°C下培育血清-毒素-細胞混合物6天。血清中和艱難梭菌毒素之細胞毒性效應之能力藉由維羅細胞之成活力確定且與維羅細胞之成活力相關。分析利用封閉培養孔中的酸代謝物之積聚作為正常細胞呼吸之指示。在暴露於毒素的細胞中，代謝及CO₂產生降低；因此，pH上升至7.4或更高，如在細胞培養基中藉由酚紅pH指示劑所指示。在此pH，培養基呈現紅色。然而，已藉由抗體中和的細胞對照物或暴露於毒素之細胞以正常量代謝及產生CO₂；因此，pH維持在7.0或更低。在此pH，培養基呈現黃色。因此，艱難梭菌毒素中和抗體與血清中和細胞上的艱難梭菌毒素之代謝效應之能力相關，如藉由其維持7.0或更低之pH的能力所證明。培養基之顏色變化可藉由酶標儀在562 nm至630 nm處量測以進一步計算在艱難梭菌毒素介導的細胞毒性之50%抑制下抗毒素中和抗體力價。研究包括之觀測目標亦即為了描述CDI事件之第一次發生。

B. 階段I

安全性評估

不存在任何治療組中之個體之相關SAE或死亡報告，且在全部治療組中請求或未請求的等級3反應之數目為類似的及極小的。請求有害反應(AR)與未請求AE以強度計一般為等級1，具有較短持續時間，並不導致研究中斷且不視為臨床上顯著。在疫苗治療組中存在更多請

求注射部位及全身反應；然而，耐受性概況為可接受的及類似的或與其他特許疫苗之耐受性概況相比更好。與無佐劑的組相比在有佐劑組中有更多個體報告一般病症及投與部位病狀之SOC中的未請求非嚴重AR（尤其未請求注射部位反應）；然而，耐受性概況為可接受的及類似的或與其他特許疫苗之耐受性概況相比更好。總體而言，較年長年齡組（年齡為65-75歲）中之個體未經歷增加的請求AR或未請求AE；安全性彙總與年齡為40-64歲的較年輕個體之安全性彙總類似。對於較年輕個體，在有佐劑組中存在稍微更多的報告AE及AR之個體；然而，耐受性概況為可接受的。確定無安全性問題。

免疫原性評估

與安慰劑相比全部疫苗組中存在值得注意的療效。

ELISA結果-幾何平均濃度(GMC)

在第60天全部治療組中的免疫反應為穩固的且持續增加。對於毒素A及毒素B兩者，在第60天(在第三疫苗劑量之後30天)看到各個活性疫苗組中的最高GMC (EU/mL)。在第0天至第60天之各個血液取樣日GMC中存在一致上升(表1)。對於年齡為40歲至64歲的個體及年齡為65歲至75歲的個體，毒素A及毒素B之GMC自第0天至第60天增大。對於年齡為65歲至75歲的個體，當投與具有佐劑的疫苗時GMC趨向於更高。在基線處對於毒素B為血清反應陽性(定義為對於毒素A ≥ 1.5 EU/mL及對於毒素B ≥ 0.8 EU/mL)的個體之數目高於對於毒素A為血清反應陽性的個體之數目，其可表示先前暴露及/或分析靈敏度。在第60天基線處的血清陽性增強對於毒素A及毒素B之免疫反應。

ELISA結果-血清轉化

第3組個體在按方案群體中具有最高百分比之在第60天相比於第0天展示4倍之血清轉化之全部個體(毒素A為97.3%及毒素B為91.8%)。對於毒素A與毒素B之複合物(定義為血清轉化為毒素A及毒

素B兩者之個體)，在第3組中在第0天與第60天之間伴以IgG的 ≥ 4 倍上升而血清轉化的全部個體之數目與百分比為90.4% (66/73)。此高於第1組 (85.7% ; 60/70)、第2組 (82.4% ; 56/68)及第4組 (86.1% ; 62/72)。對於毒素A與毒素B之複合物，第3組中年齡為65歲至75歲的在第0天與第60天之間伴以IgG的 ≥ 4 倍上升而血清轉化之個體之數目及百分比為89.1% (41/46)。此高於第1組 (77.3% ; 34/44)、第2組 (71.1% ; 32/45)及第4組 (73.8% ; 31/42)。在免疫原性之全分析集(Full Analysis Set For Immunogenicity, FASI)中，對於毒素A，各個組中在第0天與第60天之間伴以IgG的 ≥ 4 倍上升而血清轉化的個體之數目及百分比為如下：第1組 94.3% (82/87)；第2組 88.3% (83/94)；第4組 88.6% (78/88)；第5組 6.3% (3/48)。對於毒素B，各個組中在第0天與第60天之間伴以IgG的 ≥ 4 倍上升而血清轉化之個體之數目與百分比為如下：第1組 87.5% (77/88)；第2組 77.7% (73/94)；第4組 91.1% (82/90)；第5組 12.5% (6/48)。對於毒素A與毒素B之複合物，各個組中在第0天與第60天之間、第180天與第210天之間伴以IgG的 ≥ 4 倍上升而血清轉化之個體之數目及百分比陳述於表2中。

毒素中和分析(TNA)結果-GMT

對於毒素A及毒素B兩者，在第60天(在第三疫苗劑量之後30天)看到各個活性疫苗組中的最高GMT。在第0天至第60天之各個血液取樣日GMT存在一致上升。對於毒素A，在第1組及第3組中GMT較高。在第60天在第3組中看到最高GMT。對於毒素B，在第1組及第2組中GMT為類似的。投與高劑量疫苗時的GMT高於投與低劑量時的GMT。在第60天在第4組中看到最高GMT。

TNA結果-血清轉化

對於毒素A，第3組個體具有最高百分比(97.3%)之在第60天相比於第0天展示4倍血清轉化之個體。第4組個體具有最高百分比之在第

60天相比於第0天展示4倍血清轉化之個體，對於毒素B (66.2%)及對於毒素A與毒素B之複合物(63.5%)。對於毒素A與毒素B之複合物，FASI中各個組中在第0天與第60天之間、第180天與第210天之間伴以IgG的 ≥ 4 倍上升而血清轉化的個體之數目及百分比陳述於表2中。

階段I結論

確定無安全性問題，且由此未自基於安全性原因的進一步評價排除治療組。來自階段I之結果支持全部治療組中的疫苗之安全性。

總體而言，如藉由ELISA及毒素中和分析(TNA)兩者所量測，更高劑量誘發最佳免疫反應。如藉由ELISA所量測，高劑量加佐劑疫苗誘發最佳免疫反應，尤其在年齡為65歲至75歲之組中。由於耐受性概況為可接受的且整體免疫反應視為較佳的，尤其在年齡為65歲至75歲之組中，因而選定高劑量加佐劑(第3組)用於進展至階段II。由於更年長個體可能為投與對抗症狀性艱難梭菌感染(CDI)之疫苗的目標群體之主要部分，因而選擇此劑量可能提供最大疫苗保護。

基於如在階段I期間所確定的至第60天的安全性及免疫原性結果(包括靴帶式分析)，選定調配物100 μg + ALOH(第3組)作為待推進至階段II之較佳調配物。此選擇受免疫原性之按方案分析集(PPSI)中的全部個體之複合物ELISA分級分析影響。尤其對於免疫原性之全分析集(FASI)中之年齡為65歲至75歲的個體，第3組(高劑量疫苗加佐劑)確定為最佳調配物。重要的是，相比於其他組在高劑量加佐劑組中有更多個體(數目及百分比)在第0天與第60天之間展示4倍血清轉化。

第3組第0天至第210天之數據連同第6組及第7組數據在標題「階段2」下呈現於下文。選擇階段II調配物之後，持續收集第1組至第5組之在第60天與第210天之間的安全性數據。在第180天及第210天獲得兩個另外的血液樣品用於免疫原性測試。對於第1組、第2組及第4組，第0天至第60天毒素A及毒素B兩者之GMC(藉由ELISA量測)及

GMT (藉由TNA量測)增大，在第60天達到峰值，隨後至第210天減小。然而，相比於基線第210天值保持較高。毒素A在第210天之GMC大致與第30天之GMC相等，且毒素B之GMC大致與第14天之GMC相等。毒素A及毒素B在第210天之GMT大致為第60天之GMT之一半。量測各個組之GMT第0天基線值。在第5組 (安慰劑)中量測的GMC或GMT之基線幾乎不存在變化。

在第60天在第1組、第2組及第4組中之每一者中看到毒素A及毒素B之ELISA複合物之血清轉化相較於第0天最高 ≥ 4 倍上升。儘管在第60天之後血清轉化減小，其在第210天保持較高，其中第1組中有68.9% (51/74)個體、第2組中有47.4% (36/76)個體及第4組中有64.9% (48/74)個體。在第60天在第1組、第2組及第4組中之每一者中看到毒素A及毒素B之TNA複合物之血清轉化相較於第0天最高 ≥ 4 倍上升。儘管在第60天之後血清轉化減小，其在第210天保持較高，其中第1組中有39.7% (29/73)個體、第2組中有40.8% (31/76)個體及第4組中有58.1% (43/74)個體。基於至第210天之全部階段I數據，在第60天之後達成的總體結論為選定調配物為安全的及免疫原性的。具有或不具有佐劑之低劑量(亦即50 μg /劑量，A:B為3:2之比例的類毒素A及類毒素B)提供良好免疫反應，尤其在較年輕年齡組(亦即年齡為40歲至64歲)之中。

C. 階段II

在研究之階段II期間，使用2個另外的時程(第0、7、180天；及第0、30、180天)評估較高劑量加佐劑調配物(100 μg + ALOH)。數據(至第210天)與在第3組中所獲得的相比，亦即數據與在階段I中在使用階段I之時程(第0、7、30天)投與同一調配物之個體組中所獲得的相比。

1. 安全性評估-綜述

總體而言，以3個不同時程投與的疫苗調配物(100 µg + ALOH)具有可接受之安全概況，其中未確定安全性訊號。對於任何治療組中的個體未報告相關SAE。在治療組中報告請求或未請求等級3反應之個體之數目為類似的及極小的。請求AR及未請求AE之強度一般為等級1，具有較短持續時間，未導致研究中斷，且不視為臨床上顯著。藉由3個組中個體之類似數目及百分比報告任何疫苗注射之後的請求反應。藉由各個組中個體之類似數目及百分比報告未請求非嚴重AR (其包括注射部位及全身AR兩者)。較年長年齡組(年齡為65-75歲)中之個體未經歷增加的請求AR或未請求AE；安全性彙總與年齡為40-64歲的較年輕個體之安全性彙總類似。總體而言，確定無安全性問題。

免疫原性評估

ELISA結果

對於毒素A及毒素B兩者，在第3組及第7組中的最高GMC (EU/mL)自第0天至第60天增加，而在第6組中最高GMC在第30天量測。在第180天的第三疫苗接種之後，在第3組中，GMC在第210天減小，而在第6組及第7組中，GMC在第210天增大。在年齡為40歲至64歲的個體及年齡為65歲至75歲的個體中看到此相同模式。在基線處對於毒素B為血清反應陽性(定義為對於毒素A ≥ 1.5 EU/mL及對於毒素B ≥ 0.8 EU/mL)的個體之數目高於對於毒素A為血清反應陽性的個體之數目。在第3組及第7組中在第60天或是在第6組中第30天在基線處之血清陽性增強對於毒素A及毒素B之免疫反應。

對於第3組及第7組，對於包括於第210天分析中之PPSI中之個體，毒素A之GMC (藉由ELISA量測)自第0天至第60天增大，在該時刻其分別為96.44 EU/mL及80.37 EU/mL。對於第6組，第210天之前的最高GMC係在第30天(而非第60天)達到，在該時刻其為23.33 EU/mL。在第180天之第三疫苗接種之後，在第3組中，GMC在第210

天減小至20.74 EU/mL，而在第6組及第7組中，GMC在第210天分別增大至266.2 EU/mL及252.1 EU/mL。對於第3組及第7組，對於包括在第210天分析中之PPSI中之個體，毒素B之GMC (藉由ELISA量測)自第0天至第60天增大，在該時刻其分別為142.1 EU/mL及87.65 EU/mL。對於第6組，第210天之前的最高GMC係在第30天(而非第60天)達到，在該時刻其為93.59 EU/mL。在第180天之第三疫苗接種之後，在第3組中，GMC在第210天減小至26.57 EU/mL，而在第6組及第7組中，GMC在第210天分別增大至119.6 EU/mL及124.7 EU/mL。

在包括於第210天分析中之第3組、第6組及第7組中之FASI中的年齡為40歲至64歲及65歲至75歲的個體之ELISA GMC方面不存在顯著差異。

對於在基線處為血清反應陽性的個體，當對於第3組、第6組及第7組中之個體而言在第0天毒素A之基線GMC (3.75 EU/mL、3.55 EU/mL及2.99 EU/mL)及毒素B之基線GMC (8.65 EU/mL、5.65 EU/mL及4.68 EU/mL)分別較低時，GMC在第30天或第60天趨向於達到比在基線處為血清反應陰性的個體之GMC更高的峰值。

在第60天對於包括於第210天分析中之PPSI中的個體，靴帶式分析確定第3組對於毒素B (91.5%)及毒素A與毒素B之複合物(84.7%)具有至少80%分級為第1級之機率。在第60天，對於毒素A未達到80%機率，儘管具有72.1%的第3組分級高於第6組或第7組。

對於包括於第210天分析中之PPSI中的個體之毒素A (藉由ELISA量測)，在第3組中，相比於第0天GMFR在第60天為最高(57.0)。在第6組中，相比於第0天在第30天GMFR為14.4，在第60天相比於第0天為11.3，但隨後相比於第0天在第210天達到158.8。在第7組中，相比於第0天在第60天GMFR為48.8，但隨後相比於第0天在第210天達到151.4。對於毒素B (藉由ELISA量測)，對於包括於第210天分析中之

PPSI中的個體，在第3組中相比於第0天在第60天GMFR為最高(64.2)。在第6組中，相比於第0天在第30天GMFR為43.0，相比於第0天在第60天為34.5，且相比於第0天在第210天達到52.5。在第7組中，相比於第0天在第30天GMFR為23.0，相比於第0天在第60天為40.1，且相比於第0天在第210天達到53.6。

ELISA結果-血清轉化

在第60天，對於第3組中之97.0% (64/66)個體，第6組中之65.6% (40/61)個體且第7組中之91.2% (52/57)個體，對於毒素A在血清轉化方面藉由ELISA所量測存在 ≥ 4 倍上升。(第3組及第7組中的個體在第30天接受疫苗接種；第6組之最後疫苗接種在第7天)。相比之下，藉由ELISA所量測，對於毒素B在第60天在血清轉化方面之 ≥ 4 倍上升遍及治療組為類似的：第3組中之92.4%(61/66)個體，第6組中之85.2% (52/61)個體及第7組中之89.5%(51/57)個體。在第60天，對於第3組中之90.9% (60/66)個體，第6組中之60.7% (37/61)個體及第7組中之84.2% (48/57)個體，對於毒素A及毒素B之複合物在血清轉化方面藉由ELISA所量測存在 ≥ 4 倍上升。對於包括於第210天分析中之PPSI中之個體，第60天/第0天、第180天/第0天及第210天/第0天之毒素A及毒素B以及毒素A與毒素B之複合物之 ≥ 4 倍血清轉化速率(藉由ELISA量測)的彙總呈現於表3。在包括於第210天分析中之第3組、第6組及第7組中之FASI中的年齡為40歲至64歲的個體與年齡為65歲至75歲的個體之ELISA血清轉化速率方面不存在顯著差異。

包括於第210天分析中之FASI中之在基線處對於毒素A為血清反應陽性且相比於第0天在第60天具有 ≥ 4 倍血清轉化的個體之百分比對於第3組中之個體為100%、在第6組為個體之92.3% (12/13)及在第7組中為個體之87.5% (7/8)。包括於第210天分析中之FASI中之在基線處對於毒素B為血清反應陽性且相比於第0天在第60天具有 ≥ 4 倍血清轉

化的個體之百分比在第3組中為個體之94.6% (35/37)、在第6組中為個體之91.5% (43/47)及在第7組中為個體之94.1% (48/51)。

TNA結果- GMT

對於第3組及第7組，毒素A及毒素B之GMT自第0天至第60天增大。對於第6組，在第30天達到最高GMT。在第180天的第三疫苗接種之後，在第3組中，GMT在第210天減小，而在第6組及第7組中，GMT在第210天增大。在年齡為40歲至64歲的個體及年齡為65歲至75歲的個體中看到此相同模式。在基線處對於毒素B為血清反應陽性的個體之數目高於對於毒素A為血清反應陽性的個體之數目。在第3組及第7組中在第60天或是在第6組中第30天在基線處之血清陽性增強對於毒素A及毒素B之免疫反應。

對於第3組及第7組，對於包括於第210天分析中之PPSI中之個體，毒素A之GMT (藉由TNA量測)自第0天至第60天增大，在該時刻其分別為628.6 1/dil及553.7 1/dil。對於第6組，第210天之前的最高GMT係在第30天(而非第60天)達到，在該時刻其為158.6 1/dil。在第180天之第三疫苗接種之後，在第3組中，GMT在第210天減小至270.2 1/dil，而在第6組及第7組中，GMT在第210天分別顯著地增大至8939.4 1/dil及9015.6 1/dil。對於第3組及第7組，毒素B之GMT (藉由TNA量測)自第0天至第60天增大，在該時刻其分別為466.3 1/dil及415.0 1/dil。對於第6組，第210天之前的最高GMT係在第30天(而非第60天)達到，在該時刻其為351.1 1/dil。在第180天之第三疫苗接種之後，在第3組中，GMT在第210天減小至164.4 1/dil，而在第6組及第7組中，GMT在第210天分別增大至1488.4 1/dil及2070.3 1/dil。

在包括於第210天分析中之第3組、第6組及第7組中之年齡為40歲至64歲的個體及年齡為65歲至75歲的個體中之毒素A或毒素B之TNA GMT方面不存在顯著差異。

對於在基線處為血清反應陽性的個體，對於第3組、第6組及第7組中之個體，在0天毒素A之基線GMT分別為72.07 1/dil、44.55 1/dil及59.94 1/dil，且毒素B之基線GMT分別為161.8 1/dil、79.31 1/dil及76.35 1/dil。GMT趨向於在第30天或第60天達到比在基線處為血清反應陰性的個體之GMT高許多倍的峰值。

對第3組、第6組及第7組之包括於第210天分析中之PPSI中的個體進行TNA靴帶式分級分析(表4)。在第60天第3組，對於毒素A(66.9%)、毒素B(58.7%)及毒素A與毒素B之複合物(63.0%)，分級可能高於第6組或第7組。

包括於第210天分析中之PPSI中之第3組、第6組及第7組中的個體之GMFR(藉由TNA量測)之彙總呈現於表5中。

對於第210天分析中之PPSI中之第3組中的個體之毒素A(藉由TNA量測)，相比於第0天在第60天GMFR為最高(31.6)。在第6組中，相比於第0天在第30天GMFR為8.5，相比於第0天在第60天為6.1，但隨後相比於第0天在第210天達到419.8。在第7組中，相比於第0天在第60天GMFR為26.0，但隨後相比於第0天在第210天達到412.6。對於第210天分析中之PPSI中之第3組中的個體之毒素B(藉由TNA量測)，相比於第0天在第30天GMFR為14.6且相比於第0天在第60天為17.0。在第6組中，相比於第0天在第30天GMFR為17.8，相比於第0天在第60天為13.3，且相比於第0天在第210天達到60.2。在第7組中，相比於第0天在第30天GMFR為14.2，相比於第0天在第60天為16.7，且相比於第0天在第210天達到70.2。

TNA結果-血清轉化

在第60天，對於第3組中之97.0% (64/66)個體、第6組中之41.0% (25/61)個體及第7組中之82.5% (47/57)個體，對於毒素A在血清轉化方面存在≥4倍上升。(第3組及第7組中的個體在第30天接受疫苗接種；

第6組之第二疫苗接種在第7天)。相比之下，在第60天對於毒素B在血清轉化方面之 ≥ 4 倍上升遍及治療組為類似的：第3組中之63.6% (42/66)個體、第6組中之57.4% (35/61)個體及第7組中之63.2% (36/57)個體。在第60天，對於第3組中之62.1% (41/66)個體、第6組中之31.1% (19/61)個體及第7組中之56.1% (32/57)個體，對於毒素A與毒素B之複合物，在血清轉化方面存在 ≥ 4 倍上升。對於包括於第210天分析中之PPSI中之個體，第60天/第0天、第180天/第0天及第210天/第0天之毒素A與毒素B之複合物的 ≥ 4 倍血清轉化速率(藉由TNA量測)之彙總呈現於表6中。

在包括於第210天分析中之第3組、第6組及第7組中之FASI中的年齡為40歲至64歲的個體及年齡為65歲至75歲的個體之TNA血清轉化速率方面不存在顯著差異(附錄15，表15.56)。

包括於第210天分析中之FASI中之在基線處對於毒素A為血清反應陽性且相比於第0天在第60天具有 ≥ 4 倍血清轉化的個體之百分比對於第3組中之個體為100%、第6組中為96.0%(24/25)個體及第7組中為100%個體(附錄15，表15.59)。包括於第210天分析中之FASI中之在基線處對於毒素B為血清反應陽性且相比於第0天在第60天具有 ≥ 4 倍血清轉化的個體之百分比對於第3組中之個體為96.2% (25/26)、第6組及第7組中為100%個體。包括於第210天分析中之FASI中之在基線處對於毒素A為血清反應陰性且相比於第0天在第60天具有 ≥ 4 倍血清轉化的個體之百分比對於第3組中之個體為95.1% (78/82)、第6組中為25.0% (17/68)個體及第7組中為80.0% (60/75)個體。包括於第210天分析中之FASI中之在基線處對於毒素B為血清反應陰性且相比於第0天在第60天具有 ≥ 4 倍血清轉化的個體之百分比在第7組中為45.6% (31/68)。

階段II結論

如在階段I中，階段II中之結果持續支撐疫苗之安全性。確定無安全性訊號且整體耐受性概況為可接受的，且與階段I類似。特定言之，報告SAE的個體之數目遍及組為類似的；不存在視為與疫苗接種相關的SAE。四位個體在研究期間死亡，但死亡不視為與疫苗接種相關。很少個體報告導致研究中斷的AE。在第180天之最後疫苗接種之後在第6組及第7組中之請求反應(尤其注射部位疼痛及肌痛之全身反應)略微更高。生物學上重要之實驗室參數大部分與潛在醫學病狀相關聯。

依據ELISA與TNA，在全部3個時程之疫苗調配物對於毒素A及毒素B為免疫原性的。免疫反應為穩固的且在第3組及第7組中持續增大至第60天及在第6組中至第30天。在第3組中在第210天之免疫反應保持較高。在基線處對於毒素B為血清反應陽性的個體多於對於毒素A為血清反應陽性的個體。總體而言，如藉由ELISA與TNA兩者所量測，在個體可能處於最大CDI風險之時間段期間時程第0、7、30天(第3組)誘發最佳免疫反應。

最終，最佳疫苗時程與住院前之時間段期間、在住院期間及之後應保護之快速發作及與療程之較高順應程度符合。研究已顯示CDI之最高風險中在暴露於醫院孢子後大約3天至5天開始。此外，已顯示CDI病例之70%在出院之1個月內發生，病例之其餘部分在出院之後3個月發生(最早資料庫)。在全球範圍內計劃手術之平均等待時間已估計為2週至5個月(31)。在時程之選擇期間，對第60天免疫反應之判定分級給予優先權，由於第60天反應應在最大CDI風險之時間段期間發生。儘管尚未知免疫保護之特定相關，在第60天之良好免疫反應及至第180天之持續反應之示範為可預期在計劃住院期間及之後向個體提供保護之較佳疫苗療程之選擇中的重要準則。

在全部時間點，100 µg + ALOH之疫苗調配物對於所測試的3個

疫苗注射時程(第0、7、30天；第0、7、180天；第0、30、180天)及對於成年(年齡為40歲至64歲)與老年(年齡為65歲至75歲)個體均為免疫原性的。在第7天及第14天在成年個體及老年個體中之免疫反應對於3個測試時程為類似的。在第60天及第180天第3組中之個體的ELISA GMC及TNA GMT高於第6組或第7組中之個體的ELISA GMC及TNA GMT。正如預期的，由於第6組及第7組中之個體已在第180天之前30天(不同於第3組中之個體)接種疫苗，所以其在第210天具有最高GMC及GMT。在第60天及第180天第3組中之個體之血清轉化(藉由ELISA亦或TNA量測)高於第6組或第7組中之個體之血清轉化。基於主要聚焦在整個第一60天時間段之免疫反應上的靴帶式分級分析，選擇第3組為最佳時程。重要的是，當觀測整個180天時間段(亦即第0天+180天=第180天)(在其期間在近期已進入CDI之定義風險期之病患中將需要最大疫苗保護)時，考慮在第30、60及180天所量測到的免疫反應，以第0、7及30天療程(第3組)投與3次劑量整體提供與其他2個療程(第6組或第7組)相比最佳的免疫反應。此時間段表示病患可能有罹患CDI之最大風險的時間段。總體而言，具有第0、7及30天之疫苗時程的第3組在第30、60及180天產生良好免疫反應。重要的是，由於相比於第三疫苗在第180天之組更多此等個體接受全部3次疫苗注射，因而階段II之結果亦表明第3組中之個體之更佳的順應性。設想可能藉由一般醫師或初級護理醫師，尤其彼等護理老年人或具有慢性潛在醫學病狀者之醫師在門診環境中投與疫苗。由於在疾病發作之前將藉由使用第0、7及30天疫苗時程使個體免疫，保護性免疫反應可最佳早在第二疫苗劑量(例如第14天)之後1週獲得。亦已發現此療程誘發對毒素A及毒素B兩者之持續中和Ab力價至少30個月(例如1000天)，其中力價到第14天在彼等處或高於彼等，甚至對於血清反應陰性的個體(例如未經治療個體)。已注意對於兩種毒素之免疫反應均持久超過30

個月。

研究亦顯示疫苗接種之後第零天血清反應陽性的個體在血清轉化方面展現比血清反應陰性的個體(例如未經治療個體)多於兩倍至四倍之增加。在疫苗接種(第0及7天給藥)後14天，血清反應陽性的個體以血清反應陰性的個體之頻率的約兩倍至三倍之頻率血清轉化(如藉由ELISA或TNA所量測兩倍及四倍增大)。在疫苗接種(在第二劑量之後約21天且在第三劑量之前)後30天，血清反應陽性的個體以比血清反應陰性的個體更高之頻率(但差值並非如此大)血清轉化(如藉由ELISA所量測兩倍至四倍增大)。舉例而言，如藉由ELISA (毒素A及毒素B)所量測之血清轉化在第30天在血清反應陽性的個體中為約20%-30%更頻繁。如藉由TNA所量測，血清反應陽性的個體維持血清反應陰性的個體之2-3倍之血清轉化頻率。然而，應注意每次劑量之後證明對於基線血清反應陽性及血清反應陰性兩者抗體力價增大。

亦已發現此療程在成年(年齡為40歲至65歲)及老年(年齡為65歲至75歲)個體中誘發抗毒素A及抗毒素B兩者之類似的血清轉化速率(例如如藉由ELISA所量測%之個體具有自第0天4倍上升)。

結論

結果顯示以評估劑量水準之疫苗能夠誘發對毒素A及毒素B兩者之完全血清轉化。此類反應可用於對抗毒素A陰性/毒素B陽性艱難梭菌病原性病毒株且對抗產生更大量之毒素A及毒素B之艱難梭菌的傳染性病毒株之效果。此類反應亦適用於既定目標群體，其包括老年個體及免疫功能減少的個體。在早期人類臨床研究中，誘發對毒素A之良好反應但對毒素B該反應低於預期。結果顯示100 µg劑量之抗原增大對毒素B之血清轉化速率高於使用50 µg劑量所觀察到的速率。類毒素A及類毒素B兩者之更高劑量與兩種毒素之血清轉化的更快速反應時間相關聯。向第60天免疫反應提供優先權，由於按照流行病學資料

此為當個體暴露於醫院環境時最大CDI風險中之時間段。已確定CDI病例之70%發生在出院之30天內，而其餘部分發生在出院之後3個月。疫苗調配物(100 µg + ALOH)在階段I之後選擇且以3個不同時程(第0、7、30天；第0、7、180天；第0、30、180天)評估具有可接受之安全概況以及確定無安全性訊號。如藉由GM量測值及IgG抗體之血清轉化速率以及毒素A及毒素B之TNA結果證明疫苗以不同時程投與時在成年及老年個體中誘發強免疫反應。結果顯示可在第14天建立免疫反應。在第210天之反應之耐久性亦持續。總體而言，在所關注之時間段期間至第60天第0、7、30天之時程最佳滿足所需的最大保護之概況。就安全性及免疫原性兩者而言，調配物(100 µg + ALOH)與第0、7、30天之時程之組合得到最佳結果。

雖然已根據較佳實施例描述某些實施例，但應瞭解熟習此項技術者將進行變化及改良。因此，希望所附申請專利範圍覆蓋出現在以下申請專利範圍之範疇內的所有該等等效變化。

【符號說明】

無

表1

ELISA GMC、第1-5組 (免疫原性之按方案分析集，第60天分析)之彙總

毒素 訪問	第1組 低劑量+佐劑 (第0、7、30天) (N=70)			第2組 低劑量、無佐劑 (第0、7、30天) (N=68)			第3組 高劑量+佐劑 (第0、7、30天) (N=73)			第4組 高劑量、無佐劑 (第0、7、30天) (N=73)			第5組 安慰劑 (第0、7、30天) (N=38)		
	M	GMC	(95% CI)	M	GMC	(95% CI)	M	GMC	(95% CI)	M	GMC	(95% CI)	M	GMC	(95% CI)
毒素A IgG(ELISA-EU/mL)															
第0天，V01	70	0.82	(0.76; 0.88)	68	0.90	(0.78; 1.03)	73	0.92	(0.80; 1.06)	71	0.98	(0.83; 1.15)	38	0.88	(0.76; 1.02)
第14天，V03	69	5.17	(2.91; 9.21)	68	3.90	(2.07; 7.36)	72	4.18	(2.34; 7.46)	73	5.16	(2.76; 9.65)	38	0.93	(0.79; 1.09)
第30天，V04	70	24.37	(14.86; 39.97)	68	9.49	(5.42; 16.62)	72	17.30	(10.52; 28.43)	73	16.52	(9.02; 30.27)	38	1.19	(0.80; 1.77)
第60天，V05	69	76.65	(51.80; 113.42)	68	59.66	(41.09; 86.61)	73	91.53	(63.30; 132.36)	73	83.12	(49.48; 139.66)	38	1.53	(0.89; 2.62)
毒素B IgG(ELISA-EU/mL)															
第0天，V01	70	0.97	(0.71; 1.31)	68	0.97	(0.68; 1.39)	73	1.32	(0.88; 1.98)	73	1.61	(1.09; 2.38)	38	0.99	(0.65; 1.52)
第14天，V03	70	20.34	(8.68; 47.64)	68	8.88	(3.74; 21.06)	73	19.95	(8.59; 46.35)	73	27.58	(11.48; 66.29)	38	1.05	(0.66; 1.66)
第30天，V04	70	47.94	(22.14; 103.81)	68	18.65	(8.23; 42.25)	73	50.66	(22.49; 114.09)	73	53.12	(22.24; 126.87)	38	1.30	(0.71; 2.35)
第60天，V05	70	80.93	(44.95; 145.70)	68	77.90	(39.96; 151.85)	73	125.3	(71.1; 221.0)	73	156.8	(84.2; 292.2)	38	1.62	(0.79; 3.29)

N：根據免疫原性之按方案分析集的個體之數目

M：可用於端點之個體之數目

幾何平均值之雙邊95%可信區間(2-sided 95% CI)係基於學生t-分佈。

表2

未選定組之血清轉化速率之彙總(免疫原性之全分析集，第210天分析)

		訪問	第1組 低劑量+佐劑 (第0、7、30天) (N=94)			第2組 低劑量、無佐劑 (第0、7、30)天 (N=98)			第4組 高劑量、無佐劑 (第0、7、30天) (N=96)			第5組 安慰劑 (第0、7、30天) (N=48)		
			n/M	%	(95% CI)	n/M	%	(95% CI)	n/M	%	(95% CI)	n/M	%	(95% CI)
ELISA 複合毒素 A與毒素B IgG	≥4倍上升	第60天/第0天	75/87	86.2	(77.2; 92.7)	70/94	74.5	(64.4; 82.9)	75/88	85.2	(76.1; 91.9)	3/48	6.3	(13; 17.2)
		第180天/第0天	56/79	70.9	(59.6; 80.6)	44/81	54.3	(42.9; 65.4)	55/85	64.7	(53.6; 74.8)	1/41	2.4	(0.1; 12.9)
		第210天/第0天	51/74	68.9	(57.1; 79.2)	36/76	47.4	(35.8; 59.2)	48/74	64.9	(52.9; 75.6)	1/37	2.7	(0.1; 14.2)
TNA 複合毒素 A 與毒素	≥4倍上升	第60天/第0天	49/88	55.7	(44.7; 66.3)	47/94	50.0	(39.5; 60.5)	56/90	62.2	(51.4; 72.2)	0/48	0.0	(0.0; 7.4)
		第180天/第0天	36/79	45.6	(34.3; 57.2)	32/81	39.5	(28.8; 51.0)	48/86	55.8	(44.7; 66.5)	0/41	0.0	(0.0; 8.6)
		第210天/第0天	29/73	39.7	(28.5; 51.9)	31/76	40.8	(29.7; 52.7)	43/74	58.1	(46.1; 69.5)	0/37	0.0	(0.0; 9.5)

N：根據免疫原性之全分析集分析的個體之數目。

M：可用於端點之個體之數目

血清轉化定義為自指定訪問增大最低4倍。

精確單比例之雙邊95%可信區間係基於克魯伯-皮爾森(Clopper-Pearson)方法。



表3

ELISA血清轉化速率、第3、6及7組之彙總(免疫原性之按方案分析集，第210天分析)

毒 素	訪問	第3組 高劑量+佐劑 (第0、7、30天) (N=66)				第6組 高劑量+佐劑 (第0、7、180天) (N=61)				第7組 高劑量+佐劑 (第0、30、180天) (N=57)			
		n/M	%	(95% CI)		n/M	%	(95% CI)		n/M	%	(95% CI)	
毒 素 A IgG	第60天/第0天	≥4倍上升	64/66	97.0	(89.5; 99.6)	40/61	65.6	(52.3; 77.3)		52/57	91.2	(80.7; 97.1)	
	第180天/第0天	≥4倍上升	56/66	84.8	(73.9; 92.5)	31/61	50.8	(37.7; 63.9)		41/57	71.9	(58.5; 83.0)	
	第210天/第0天	≥4倍上升	54/66	81.8	(70.4; 90.2)	61/61	100.0	(94.1; 100.0)		57/57	100.0	(93.7; 100.0)	
毒 素 B IgG	第60天/第0天	≥4倍上升	61/66	92.4	(83.2; 97.5)	52/61	85.2	(73.8; 93.0)		51/57	89.5	(78.5; 96.0)	
	第180天/第0天	≥4倍上升	49/66	74.2	(62.0; 84.2)	38/61	62.3	(49.0; 74.4)		41/57	71.9	(58.5; 83.0)	
	第210天/第0天	≥4倍上升	46/66	69.7	(57.2; 80.4)	57/61	93.4	(84.1; 98.2)		53/57	93.0	(83.0; 98.1)	
複合物	第60天/第0天	≥4倍上升	60/66	90.9	(81.3; 96.6)	37/61	60.7	(47.3; 72.9)		48/57	84.2	(72.1; 92.5)	
	第180天/第0天	≥4倍上升	45/66	68.2	(55.6; 79.1)	23/61	37.7	(25.6; 51.0)		31/57	54.4	(40.7; 67.6)	
	第210天/第0天	≥4倍上升	41/66	62.1	(49.3; 73.8)	57/61	93.4	(84.1; 98.2)		53/57	93.0	(83.0; 98.1)	

N：根據免疫原性之全分析集分析的個體之數目。

M：可用於端點之個體之數目

複合物：當個體同時到達兩種毒素之指定血清轉化時。

精確單比例之雙邊95%可信區間係基於克魯伯-皮爾森方法。比例之差值之雙邊95%可信區間係基於紐康比-威爾遜(Newcombe-Wilson)評分方法。

表4

第3、6及7組之TNA分級分析(免疫原性之按方案分析集，第210天分析)

毒素	時間點	治療組	機率
毒素A (TNA-I/dil)	第60天	第3組	66.9
		第7組	33.1
		第6組	0.0
	第14天	第6組	52.9
		第7組	44.3
		第3組	2.8
	第210天	第7組	55.6
		第6組	44.4
		第3組	0.0
毒素B (TNA-I/dil)	第60天	第3組	58.7
		第7組	37.6
		第6組	3.7
	第14天	第7組	51.5
		第6組	31.9
		第3組	16.6
	第210天	第7組	83.3
		第6組	16.7
		第3組	0.0
複合物	第60天	第3組	63.0
		第7組	36.6
		第6組	0.4
	第14天	第7組	53.1
		第6組	40.7
		第3組	6.2
	第210天	第7組	69.5
		第6組	30.6
		第3組	0.0



表5

毒素	訪問	第3組 高劑量+佐劑 (第0、7、30天) (N=66)			第6組 高劑量+佐劑 (第0、7、180天) (N=61)			第7組 高劑量+佐劑 (第0、30、180天) (N=57)		
		M	GMFR	(95% CI)	M	GMFR	(95% CI)	M	GMFR	(95% CI)
毒素A	第7天/第0天	66	1.7	(1.2; 2.4)	61	1.6	(1.1; 2.2)	57	1.7	(1.2; 2.6)
	第14天/第0天	66	4.5	(2.6; 8.0)	61	6.2	(3.3; 11.5)	57	5.6	(3.2; 9.9)
	第14天/第7天	66	2.7	(1.9; 3.9)	61	3.9	(2.4; 6.2)	57	3.2	(2.2; 4.5)
	第30天/第0天	66	5.7	(3.5; 9.3)	61	8.5	(5.0; 14.7)	57	4.4	(2.6; 7.3)
	第30天/第7天	66	3.4	(2.4; 4.8)	61	5.4	(3.5; 8.3)	57	2.5	(1.8; 3.4)
	第30天/第14天	66	1.2	(1.0; 1.6)	61	1.4	(1.1; 1.8)	57	0.7	(0.6; 0.9)
	第60天/第0天	66	31.6	(22.8; 43.7)	61	6.1	(3.8; 9.7)	57	26.0	(16.5; 40.8)
	第60天/第30天	66	5.6	(4.0; 7.7)	61	0.7	(0.6; 0.8)	57	5.9	(4.1; 8.6)
	第180天/第0天	65	14.6	(11.2; 19.1)	61	4.7	(3.2; 6.9)	57	11.3	(7.5; 17.2)
	第210天/第0天	66	13.6	(10.5; 17.6)	61	419.8	(284.7; 619.0)	57	412.6	(284.3; 598.7)
毒素B	第7天/第0天	66	1.8	(1.3; 2.4)	61	2.4	(1.7; 3.4)	57	2.2	(1.6; 3.2)
	第14天/第0天	66	11.9	(6.2; 22.7)	61	16.3	(8.1; 33.0)	57	16.3	(7.9; 33.3)
	第14天/第7天	66	6.7	(4.0; 11.0)	61	6.8	(4.1; 11.3)	57	7.2	(4.1; 12.5)
	第30天/第0天	66	14.6	(7.7; 27.6)	61	17.8	(8.9; 35.5)	57	14.2	(7.3; 27.8)
	第30天/第7天	66	8.2	(4.7; 14.0)	61	7.4	(4.4; 12.4)	57	6.3	(3.7; 10.8)
	第30天/第14天	66	1.2	(0.9; 1.6)	61	1.1	(0.9; 1.3)	57	0.9	(0.8; 1.0)
	第60天/第0天	66	17.0	(9.7; 29.7)	61	13.3	(7.1; 24.7)	57	16.7	(9.0; 30.8)
	第60天/第30天	66	1.2	(1.0; 1.4)	61	0.7	(0.7; 0.8)	57	1.2	(1.0; 1.4)
	第180天/第0天	66	6.8	(4.3; 10.8)	61	8.6	(5.1; 14.4)	57	9.0	(5.4; 14.7)
	第210天/第0天	66	6.4	(4.1; 10.0)	61	60.2	(35.4; 102.2)	57	70.2	(43.0; 114.7)

N：根據免疫原性之全分析集分析的個體之數目。
M：可用於端點之個體之數目
GMFR之雙邊95%可信區間係基於學生t-分佈。

表6

TNA血清轉化速率、第3、6及7組之彙總(免疫原性之按方案分析集，第210天分析)

毒素	訪問	第3組 高劑量+佐劑 (第0、7、30天) (N=66)				第6組 高劑量+佐劑 (第0、7、180天) (N=61)				第7組 高劑量+佐劑 (第0、30、180天) (N=57)			
		n/M	%	(95% CI)		n/M	%	(95% CI)		n/M	%	(95% CI)	
毒素A (TNA-I/dil)	第60天/第0天	≥4倍上升	64/66	97.0	(89.5; 99.6)	25/61	41.0	(28.6; 54.3)		47/57	82.5	(70.1; 91.3)	
	第180天/第0天	≥4倍上升	60/65	92.3	(83.0; 97.5)	27/61	44.3	(31.6; 57.6)		42/57	73.7	(60.3; 84.5)	
	第210天/第0天	≥4倍上升	58/66	87.9	(77.5; 94.6)	61/61	100.0	(94.1; 100.0)		57/57	100.0	(93.7; 100.0)	
毒素B (TNA-I/dil)	第60天/第0天	≥4倍上升	42/66	63.6	(50.9; 75.1)	35/61	57.4	(44.1; 70.0)		36/57	63.2	(49.3; 75.6)	
	第180天/第0天	≥4倍上升	35/66	53.0	(40.3; 65.4)	33/61	54.1	(40.9; 66.9)		34/57	59.6	(45.8; 72.4)	
	第210天/第0天	≥4倍上升	34/66	51.5	(38.9; 64.0)	53/61	86.9	(75.8; 94.2)		51/57	89.5	(78.5; 96.0)	
複合物	第60天/第0天	≥4倍上升	41/66	62.1	(49.3; 73.8)	19/61	31.1	(19.9; 44.3)		32/57	56.1	(42.4; 69.3)	
	第180天/第0天	≥4倍上升	33/65	50.8	(38.1; 63.4)	21/61	34.4	(22.7; 47.7)		27/57	47.4	(34.0; 61.0)	
	第210天/第0天	≥4倍上升	31/66	47.0	(34.6; 59.7)	53/61	86.9	(75.8; 94.2)		51/57	89.5	(78.5; 96.0)	

N：根據免疫原性之全分析集分析的個體之數目。

M：可用於端點之個體之數目

複合物：當個體同時到達兩種毒素之指定血清轉化時。

精確單比例之雙邊95%可信區間係基於克魯伯-皮爾森方法。比例之差值之雙邊95%可信區間係基於紐康比-威爾遜評分方法。



I648063

發明摘要

※ 申請案號：103120772

※ 申請日：

※IPC 分類：A61K 39/08 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

【發明名稱】

用於免疫以對抗艱難梭菌(*C. difficile*)之組合物及方法COMPOSITIONS AND METHODS OF IMMUNIZING AGAINST
C. DIFFICILE

【中文】

本發明係關於在成年人類個體中誘發對抗艱難梭菌(*C. difficile*)毒素A及毒素B之免疫反應之方法。該個體可能處於初始症狀性艱難梭菌感染風險中。在一些實施例中，一種方法係在處於初始症狀性艱難梭菌感染風險中的成年人類個體中誘發對抗艱難梭菌毒素A及毒素B之免疫反應，且該方法包含向個體投與包含艱難梭菌類毒素A及類毒素B之組合物至少三次，每次投與相隔約七天。

【英文】

This disclosure relates to methods for eliciting an immune response against *C. difficile* toxin A and toxin B in an adult human subject. The subject may be at risk for a primary symptomatic *C. difficile* infection. In some embodiments, a method is for eliciting an immune response against *C. difficile* toxin A and toxin B in an adult human subject at risk for a primary symptomatic *C. difficile* infection, and comprises administering to the subject a composition comprising *C. difficile* toxoid A and toxoid B at least three times, each administration being about seven days apart.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：(無)。

【本代表圖之符號簡單說明】：

(無)

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

申請專利範圍

1. 一種包含純度約90%或更高純度(w/w)之艱難梭菌(*C. difficile*)類毒素A及類毒素B之組合物的用途，其用於製造可在處於症狀性艱難梭菌感染風險中的成年人類個體中誘發對抗艱難梭菌毒素A及毒素B之中和免疫反應的藥劑，該組合物係用於投與該個體至少三次，其中該第二次投與係在該第一次投與之後約7天，該第三次投與係在該第二次投與之後約30或180天，以及該免疫反應持續至少約210天。
2. 如請求項1之用途，其中所誘發的該免疫反應足以在該成年人類個體中防止及/或降低症狀性艱難梭菌感染風險。
3. 如請求項1之用途，其中所誘發的該免疫反應足以在該成年人類個體中防止症狀性艱難梭菌感染發作。
4. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該組合物包含約3:1至約1:1之比例的艱難梭菌類毒素A及類毒素B。
5. 如請求項4之用途，其中艱難梭菌類毒素A與類毒素B之比例為約3:2。
6. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該組合物包含組合總量約40 µg至500 µg之艱難梭菌類毒素A及類毒素B。
7. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該組合物包含佐劑。
8. 如請求項7之用途，其中該組合物包含鋁佐劑。
9. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該處於風險中的個體為至少40歲且：
 - (i) 在該第一次投與之前的12個月期間中曾經停留在醫院至少2次，每次持續至少約24小時或72小時，且已接受全身(非局部)抗生素，或

(ii) 預期在該第一次投與之60天內將成為住院病患住院接受已計畫之手術程序。

10. 如請求項9之用途，其中該預期住院計劃為至少約24小時或72小時，且係用於涉及以下至少一種系統之手術：(i)腎臟/膀胱/泌尿系統；(ii)肌肉骨骼系統；(iii)呼吸系統；(iv)循環系統；及(v)中樞神經系統。
11. 如請求項1至3中任一項之用途，其中該成年人類個體為至少約65歲或更年長者。
12. 如請求項1至3中任一項之用途，其中對抗艱難梭菌毒素A及/或毒素B之免疫反應持續至少約1000天。
13. 一種包含純度約90%或更高純度(w/w)之艱難梭菌類毒素A及類毒素B之組合物，其用於在人類個體中誘發對抗艱難梭菌毒素A及毒素B之中和免疫反應，該組合物係投與該個體至少三次，其中該第二次投與係在該第一次投與之後約7天，該第三次投與係在該第二次投與之後約30或180天；或該第二次投與係在該第一次投與之後約30天，該第三次投與係在該第二次投與之後約180天；以及該免疫反應持續至少約210天。
14. 如請求項13之組合物，其包含約3:1至約1:1之比例的艱難梭菌類毒素A及類毒素B。
15. 如請求項14之組合物，其中艱難梭菌類毒素A與類毒素B之比例為約3:2或約1:1。
16. 如請求項13至15中任一項之組合物，其包含組合總量約40 μg 至500 μg 之艱難梭菌類毒素A及類毒素B。
17. 如請求項13至15中任一項之組合物，其中該組合物包含組合總量至少約100 μg 之艱難梭菌類毒素A及類毒素B。
18. 如請求項17之組合物，其中該組合物包含組合總量至少約200 μg

之艱難梭菌類毒素A及類毒素B。

19. 如請求項13至15中任一項之組合物，其中該組合物包含佐劑。
20. 如請求項19之組合物，其中該佐劑係鋁佐劑。
21. 如請求項13至15中任一項之組合物，其中該處於風險中的個體為至少40歲且：
 - (i) 在該第一次投與之前的12個月期間中曾經停留在醫院至少2次，每次持續至少約24小時或72小時，且已接受全身(非局部)抗生素，或
 - (ii) 預期在該第一次投與之60天內將成為住院病患住院接受已計畫之手術程序。
22. 如請求項21之組合物，其中該預期住院計劃為至少約24小時或72小時，且係用於涉及以下至少一種系統之手術：(i)腎臟/膀胱/泌尿系統；(ii)肌肉骨骼系統；(iii)呼吸系統；(iv)循環系統；及(v)中樞神經系統。
23. 如請求項13至15中任一項之組合物，其中該人類個體至少約50歲。
24. 如請求項23之組合物，其中該人類個體至少約65歲。
25. 一種包含純度約90%或更高純度(w/w)之艱難梭菌(*C. difficile*)類毒素A及類毒素B之組合物的用途，其用於製造可在處於症狀性艱難梭菌感染風險中的人類個體中誘發對抗艱難梭菌毒素A及毒素B之中和免疫反應的藥劑，該組合物係用於投與該個體至少三次，其中該第二次投與係在該第一次投與之後約30天，該第三次投與係在該第二次投與之後約180天，以及該免疫反應持續至少約210天。
26. 如請求項25之用途，其中所誘發的該免疫反應足以在該人類個體中防止及/或降低症狀性艱難梭菌感染風險。

27. 如請求項25之用途，其中所誘發的該免疫反應足以在該人類個體中防止症狀性艱難梭菌感染發作。
28. 如請求項25至27中任一項之用途，其中該組合物包含約3:1至約1:1之比例的艱難梭菌類毒素A及類毒素B。
29. 如請求項28之用途，其中艱難梭菌類毒素A與類毒素B之比例為約3:2或1:1。
30. 如請求項25至27中任一項之用途，其中該組合物包含組合總量約40 µg至500 µg之艱難梭菌類毒素A及類毒素B。
31. 如請求項25至27中任一項之用途，其中該組合物包含組合總量至少約100 µg之艱難梭菌類毒素A及類毒素B。
32. 如請求項31之用途，其中該組合物包含組合總量至少約200 µg之艱難梭菌類毒素A及類毒素B。
33. 如請求項25至27中任一項之用途，其中該組合物包含佐劑。
34. 如請求項33之用途，其中該佐劑係鋁佐劑。
35. 如請求項25至27中任一項之用途，其中該處於風險中的個體為至少40歲且：
 - (i) 在該第一次投與之前的12個月期間中曾經停留在醫院至少2次，每次持續至少約24小時或72小時，且已接受全身(非局部)抗生素，或
 - (ii) 預期在該第一次投與之60天內將成為住院病患住院接受已計畫之手術程序。
36. 如請求項35之用途，其中該預期住院計劃為至少約24小時或72小時，且係用於涉及以下至少一種系統之手術：(i)腎臟/膀胱/泌尿系統；(ii)肌肉骨骼系統；(iii)呼吸系統；(iv)循環系統；及(v)中樞神經系統。
37. 如請求項25至27中任一項之用途，其中該人類個體至少約50

歲。

38. 如請求項25至27中任一項之用途，其中該人類個體至少約65歲。
39. 如請求項25至27中任一項之用途，其中對抗艱難梭菌毒素A及/或毒素B之免疫反應持續至少約1000天。