



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109890413 B

(45) 授权公告日 2024.04.16

(21) 申请号 201780066432.4

(72) 发明人 R·D·肯辛格 S·L·豪瑟

(22) 申请日 2017.09.01

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理人 封新琴

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109890413 A

(51) Int.CI.

A61K 39/095 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.06.14

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

CN 101208102 A, 2008.06.25

62/383,279 2016.09.02 US

US 2008193476 A1, 2008.08.14

62/468,695 2017.03.08 US

62/505,525 2017.05.12 US

阳莉等.脑膜炎球菌疫苗研究新进展.《中国热带医学》.2009,(第10期),

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Michael Bröker等.Factors contributing to the immunogenicity of meningococcal conjugate vaccines.《Human Vaccines & Immunotherapeutics》.2016,第12卷(第7期),

2019.04.25

(86) PCT国际申请的申请数据

审查员 陈多

PCT/US2017/049856 2017.09.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/045286 EN 2018.03.08

(73) 专利权人 赛诺菲巴斯德股份有限公司

权利要求书2页 说明书55页 附图31页

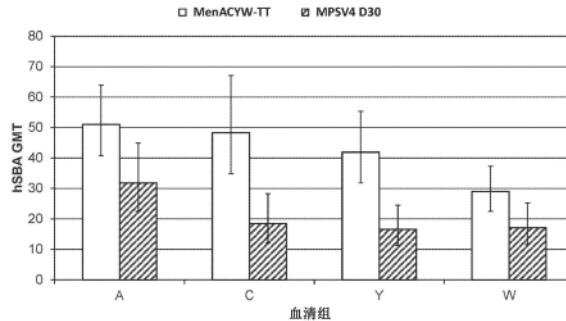
地址 美国宾夕法尼亚州

(54) 发明名称

脑膜炎奈瑟氏菌疫苗

(57) 摘要

本文提供了用于针对脑膜炎奈瑟氏菌给受试者接种疫苗的化合物、组合物、配制品、试剂盒、用途和方法。



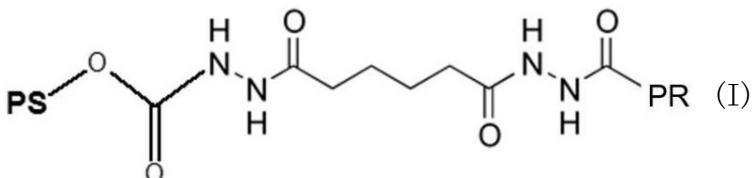
1. 一种脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其包含:

- a) MenA荚膜多糖与载体蛋白的第一缀合物;
- b) MenC荚膜多糖与载体蛋白的第二缀合物;
- c) MenW-135荚膜多糖与载体蛋白的第三缀合物;和
- d) MenY荚膜多糖与载体蛋白的第四缀合物;

其中:

(i) 该第二缀合物是包含双端连接的缀合多糖和单端连接的缀合多糖的群体,其中该第二缀合物的多糖的0-乙酰化水平为0.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖至1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖,而且其中该第二缀合物具有0.4至0.8的MenC荚膜多糖与载体蛋白质量比;

(ii) 其中该MenA荚膜多糖通过式(I)的接头与该载体蛋白附接:



其中PS指示与该多糖的附接,并且PR指示与该载体蛋白的附接,

其中所述第一缀合物具有0.8至1.3的MenA荚膜多糖与载体蛋白质量比;而且

其中所述第一缀合物的多糖的0-乙酰化水平为2.5、2.8、2.9或3.0 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖;

(iii) 其中该MenC、MenW-135和MenY荚膜多糖通过仲胺与该载体蛋白直接附接;

(iv) 该第三缀合物具有0.6至1.3的MenW-135荚膜多糖与载体蛋白质量比;而且

其中所述第三缀合物的多糖的0-乙酰化水平为0.6-1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖;

(v) 该第四缀合物具有0.5至1.3的MenY荚膜多糖与载体蛋白质量比;而且

其中所述第四缀合物的多糖的0-乙酰化水平为0.6-1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖;

(vi) 该载体蛋白是破伤风类毒素;

(vii) 该组合物包含相对于总多糖少于20%重量的游离多糖和pH为5.5至6.5的乙酸盐缓冲液;和

(viii) 其中该第一、第二、第三和第四缀合物的重均分子量范围为300 kDa至1500 kDa。

2. 根据权利要求1所述的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其中该第一、第二、第三和/或第四缀合物是包含分子量在700 kDa至1400 kDa范围内的分子的群体。

3. 根据权利要求1所述的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其中该第一、第二、第三和/或第四缀合物是包含分子量在800 kDa至1300 kDa范围内的分子的群体。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其中通过多角度光散射测定分子量。

5. 根据权利要求1-3中任一项所述的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其中该MenC多糖的0-乙酰化程度范围为0.8至1.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。

6. 根据权利要求1-3中任一项所述的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其中包含MenC多糖的该缀合物包含选自以下的一种或多种修饰:(i) 在位置7处的伯羟基和(ii) 在还原端处的(2-羟基)乙氧基,其中该修饰以不少于25 nmol/mg多糖存在。

7. 根据权利要求1-3中任一项所述的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其中包含MenW-135

和/或MenY多糖的所述缀合物包含选自以下的一种或多种修饰：天然MenW-135或MenY多糖中邻二醇位置处的伯羟基，其中该修饰以不少于60 nmol/mg多糖存在。

8. 根据权利要求6或7所述的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物，其中该修饰以少于200 nmol/mg多糖的量存在。

9. 根据权利要求1-3中任一项所述的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物，其中相对于天然MenC多糖，该MenC多糖的大小减小了3倍-8倍。

10. 根据权利要求1-3中任一项所述的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物，其中该组合物包含少于10%重量的游离多糖。

11. 根据权利要求1-3中任一项所述的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物，其不含佐剂。

12. 权利要求1-11中任一项的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物在制造用于针对受试者中的脑膜炎奈瑟氏菌引发免疫反应的药剂中的用途。

13. 根据权利要求12所述的用途，其中该脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物是肌内给予的。

14. 根据权利要求12或13所述的用途，其中该受试者的年龄为6周以上。

15. 根据权利要求12或13所述的用途，其中该受试者的年龄为56岁以上。

16. 根据权利要求12或13所述的用途，其中该受试者先前接受了脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖缀合物疫苗。

17. 根据权利要求12或13所述的用途，其中该受试者先前未接受过脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖缀合物疫苗。

脑膜炎奈瑟氏菌疫苗

[0001] I. 引言和发明内容

[0002] 脑膜炎奈瑟氏菌 (*N. meningitidis*) 是全世界细菌性脑膜炎和败血症的一个主要病因。脑膜炎奈瑟氏菌的A、C、Y、W-135血清组 (分别为MenA、MenC、MenY和MenW; 统称为MenACYW) 是世界上很大一部分脑膜炎球菌病的病因。目前有六种类型的疫苗可以预防脑膜炎奈瑟氏菌——四价脑膜炎球菌结合疫苗, 如**Menactra[®]**、**Nimenrix[®]**和**Menveo[®]**; 脑膜炎球菌多糖疫苗, 如**Menomune[®]**; 血清组C脑膜炎球菌疫苗, 如**Neisvac-C[®]**、**Menjugate[®]**和**Menitorix[®]**; 血清组A脑膜炎球菌疫苗, 如**MenAfriVac[®]**; 血清组C和Y脑膜炎球菌疫苗, 如**MenHibrix[®]**; 以及血清组B脑膜炎球菌疫苗, 如**Bexsero[®]**和**Trumenba[®]**。

[0003] 脑膜炎奈瑟氏菌的流行病学可以描述为复杂、不可预测、地域差异大且随时间而变化。因此, 需要开发改进的脑膜炎奈瑟氏菌疫苗。具体地, 现有的多糖结合疫苗可能不适合于向婴儿、幼儿、青少年和/或老年人中的一类或多类给药, 或者可能在一些接受者中导致微弱或检测不到的血清应答。

[0004] 在一些实施方案中, 本文公开的组合物、方法和/或用途提供了一种或多种益处, 或至少为公众提供了有用的选择。这些益处可包括以下一种或多种: 对MenA、MenC、MenY和MenW中的一种、两种、三种或全部四种的免疫原性改进; 在婴儿、幼儿、青少年和老年人中两类、三类或四类中的免疫原性改进; 以及足够的稳定性, 使其可以作为液体配制品长期储存, 例如, 在冷藏的情况下可储存多年(例如, 2.5、3、3.5、4或4.5年)或在室温下可储存数个月(例如2、3、4、5或6个月)。

[0005] 因此, 提供以下实施方案。实施方案1是一种脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物, 其包含: a) MenA荚膜多糖与载体蛋白的第一缀合物; b) MenC荚膜多糖与载体蛋白的第二缀合物; c) MenW-135荚膜多糖与载体蛋白的第三缀合物; 和d) MenY荚膜多糖与载体蛋白的第四缀合物; 其中该第二缀合物是包含均通过仲胺与该载体蛋白附接的双端连接的缀合多糖和单端连接的缀合多糖的群体, 并且该第二缀合物的多糖的0-乙酰化水平为0.3μmol/mg多糖至1.6μmol/mg多糖。0-乙酰化水平可以大于或等于0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1或1.2μmol/mg多糖。0-乙酰化水平可以少于或等于0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5μmol/mg多糖。例如, 水平范围可以为0.6至1.5μmol/mg多糖或0.8至1.4μmol/mg多糖。0-乙酰基含量可以通过Hestrin方法(Hestrin等人, J.Biol.Chem. 1949, 180, 第249页)测量。

[0006] 实施方案2是一种脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物, 其包含: a) MenA荚膜多糖与载体蛋白的第一缀合物; b) MenC荚膜多糖与载体蛋白的第二缀合物; c) MenW-135荚膜多糖与载体蛋白的第三缀合物; 和d) MenY荚膜多糖与载体蛋白的第四缀合物; 其中该第二缀合物是包含通过仲胺与该载体蛋白附接的单端连接的缀合多糖的群体, 其中该单端连接的缀合多糖具有末端未连接的糖, 其中该末端糖在位置7处具有伯羟基或仲胺连接, 或其中还原端被(2-羟基)乙氧基或仲胺连接修饰。该第二缀合物群体还可以包含其中载体蛋白与多糖的两端连接(例如通过仲胺)的双端连接的缀合物。

[0007] 实施方案3是一种脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其包含:a)MenA荚膜多糖与载体蛋白的第一缀合物;b)MenC荚膜多糖与载体蛋白的第二缀合物;c)MenW-135荚膜多糖与载体蛋白的第三缀合物;和d)MenY荚膜多糖与载体蛋白的第四缀合物;其中该MenA荚膜多糖通过包含氨基甲酸酯、间隔区和酰胺的接头与该载体蛋白附接,其中该间隔区处于该氨基甲酸酯和该酰胺之间并包含2-10个直链碳,并且该第一缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.3至1.5。该第一缀合物的多糖与载体蛋白质量比可以为例如,0.3至0.4、0.4至0.5、0.5至0.6、0.6至0.7、0.7至0.8、0.8至0.9、0.9至1.0、1.0至1.1、1.1至1.2、1.2至1.3、1.3至1.4或1.4至1.5。

[0008] 实施方案4是一种脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其包含:a)MenA荚膜多糖与载体蛋白的第一缀合物;b)MenC荚膜多糖与载体蛋白的第二缀合物;c)MenW-135荚膜多糖与载体蛋白的第三缀合物;和d)MenY荚膜多糖与载体蛋白的第四缀合物;其中该MenA荚膜多糖通过包含氨基甲酸酯、间隔区和酰胺的接头与该载体蛋白附接,其中该间隔区处于该氨基甲酸酯和该酰胺之间并包含2-10个直链碳;并且其中该MenC、MenW-135和MenY荚膜多糖通过仲胺与该载体蛋白附接;并且至少一种缀合物的重均分子量范围为300kDa至1500kDa。

[0009] 实施方案5是一种脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其包含:a)MenA荚膜多糖与载体蛋白的第一缀合物;b)MenC荚膜多糖与载体蛋白的第二缀合物;c)MenW-135荚膜多糖与载体蛋白的第三缀合物;和d)MenY荚膜多糖与载体蛋白的第四缀合物;其中该载体蛋白是破伤风类毒素;该第一、第二、第三和第四缀合物中的一种或多种的重均分子量范围为300kDa至1500kDa;并且该组合物包含相对于总多糖少于20%重量的游离多糖。在该组合物中,该缀合物中的至少一种、两种、三种或四种的重均分子量范围可以为300kDa至1500kDa。在该组合物中,该缀合物中的至少一种、两种、三种或四种的重均分子量可以大于或等于400kDa、500kDa、600kDa、700kDa、800kDa、900kDa、1000kDa、或1100kDa。在该组合物中,该缀合物中的至少一种、两种、三种或四种的重均分子量可以少于或等于600kDa、700kDa、800kDa、900kDa、1000kDa、1100kDa、1200kDa、1300kDa或1400kDa。至少一种缀合物的分子量可以为700-800、800-900、900-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400或1400-1500kDa。该MenA缀合物的分子量可以为700-800、800-900、900-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400或1400-1500kDa。该MenC缀合物的分子量可以为700-800、800-900、900-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400或1400-1500kDa。该MenY缀合物的分子量可以为700-800、800-900、900-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400或1400-1500kDa。该MenW-135缀合物的分子量可以为700-800、800-900、900-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400或1400-1500kDa。

[0010] 实施方案6是一种脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其包含:a)MenA荚膜多糖与载体蛋白的第一缀合物;b)MenC荚膜多糖与载体蛋白的第二缀合物;c)MenW-135荚膜多糖与载体蛋白的第三缀合物;和d)MenY荚膜多糖与载体蛋白的第四缀合物;其中该载体蛋白是破伤风类毒素;该第一、第二、第三和第四缀合物中的一种或多种的多糖与载体蛋白质量比为0.3至1.5;并且该组合物包含相对于总多糖少于20%重量的游离多糖。该第一缀合物的多糖与载体蛋白质量比可以为例如,0.3至0.4、0.4至0.5、0.5至0.6、0.6至0.7、0.7至0.8、0.8至0.9、0.9至1.0、1.0至1.1、1.1至1.2、1.2至1.3、1.3至1.4或1.4至1.5。该第二缀合物的多糖与载体蛋白质量比可以为例如,0.3至0.4、0.4至0.5、0.5至0.6、0.6至0.7、0.7至0.8、0.8

至0.9、0.9至1.0、1.0至1.1、1.1至1.2、1.2至1.3、1.3至1.4或1.4至1.5。该第三缀合物的多糖与载体蛋白质量比可以为例如,0.3至0.4、0.4至0.5、0.5至0.6、0.6至0.7、0.7至0.8、0.8至0.9、0.9至1.0、1.0至1.1、1.1至1.2、1.2至1.3、1.3至1.4或1.4至1.5。该第四缀合物的多糖与载体蛋白质量比可以为例如,0.3至0.4、0.4至0.5、0.5至0.6、0.6至0.7、0.7至0.8、0.8至0.9、0.9至1.0、1.0至1.1、1.1至1.2、1.2至1.3、1.3至1.4或1.4至1.5。

[0011] 实施方案7是前述实施方案中任一项的疫苗组合物,其中该第一、第二、第三和/或第四缀合物是包含分子量在700kDa至1400kDa或800kDa至1300kDa范围内的分子的群体。该第一和第二缀合物可以是包含分子量在700kDa至1400kDa或800kDa至1300kDa范围内的分子的群体。该第一和第三缀合物可以是包含分子量在700kDa至1400kDa或800kDa至1300kDa范围内的分子的群体。该第一和第四缀合物可以是包含分子量在700kDa至1400kDa或800kDa至1300kDa范围内的分子的群体。该第二和第三缀合物可以是包含分子量在700kDa至1400kDa或800kDa至1300kDa范围内的分子的群体。该第二和第四缀合物可以是包含分子量在700kDa至1400kDa或800kDa至1300kDa范围内的分子的群体。该第三和第四缀合物可以是包含分子量在700kDa至1400kDa或800kDa至1300kDa范围内的分子的群体。

[0012] 实施方案8是一种脑膜炎奈瑟氏菌疫苗组合物,其包含MenC荚膜多糖与载体蛋白的缀合物,其中该缀合物是包含均通过仲胺与该载体蛋白附接的双端连接的缀合多糖和单端连接的缀合多糖的群体,并且MenC荚膜多糖与该载体蛋白的缀合物的多糖的0-乙酰化水平范围为0.3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖至1.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。0-乙酰化水平可以大于或等于0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1或1.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。0-乙酰化水平可以少于或等于0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。例如,该水平可以为0.6至1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖或0.8至1.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。0-乙酰基含量可以通过Hestrin方法(Hestrin等人,J.Biol.Chem.1949,180,第249页)测量。

[0013] 实施方案9是实施方案8的疫苗组合物,其中该缀合物(a)重均分子量范围为300kDa至1500kDa;或(b)是包含分子量在700kDa至1400kDa或800kDa至1300kDa范围内的分子的群体。

[0014] 实施方案10是实施方案4、5、7或9中任一项的疫苗组合物,其中通过多角度光散射(MALS)测定分子量。

[0015] 实施方案11是前述实施方案中任一项的疫苗组合物,其中该MenC多糖的0-乙酰化程度范围为0.6至1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖或0.8至1.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。

[0016] 实施方案12是实施方案11的疫苗组合物,其中该0-乙酰化程度为大于或等于0.7、0.8、0.9、1.0、1.1或1.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。

[0017] 实施方案13是实施方案11的疫苗组合物,其中该0-乙酰化程度为少于或等于0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3或1.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。

[0018] 实施方案14是前述实施方案中任一项的疫苗组合物,其中包含MenC多糖的该缀合物是包含双端连接的缀合多糖和单端连接的缀合多糖的群体。

[0019] 实施方案15是实施方案14的疫苗组合物,其中该第二缀合物的单端连接的多糖包含末端未连接的糖,其中该单端连接的缀合多糖具有末端未连接的糖,其中该末端糖在位置7处具有伯羟基,或其中还原端被(2-羟基)乙氧基修饰。

[0020] 实施方案16是前述实施方案中任一项的疫苗组合物,其中包含MenC多糖的该缀合

物包含选自以下的一种或多种修饰：(i) 在位置7处的伯羟基，(ii) 在还原端处的(2-羟基)乙氧基，和(iii) 与该载体蛋白的缀合，其中该修饰以不少于25nmol/mg多糖存在。

[0021] 实施方案17是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其包含MenW-135和/或MenY多糖的缀合物，其包含选自以下的一种或多种修饰：(i) 天然MenW-135或MenY多糖中邻二醇位置处的伯羟基和(ii) 与该载体蛋白的缀合，其中该修饰以不少于60nmol/mg多糖存在。

[0022] 实施方案18是实施方案16或17的疫苗组合物，其中该修饰以少于200nmol/mg多糖、少于150nmol/mg多糖、少于100nmol/mg多糖或少于80nmol/mg多糖的量存在。

[0023] 实施方案19是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其中相对于天然MenC多糖，该MenC多糖的大小减小了3倍-8倍。

[0024] 实施方案20是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其包含MenA荚膜多糖与载体蛋白的缀合物，该缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.5至1.5。实施方案20A是实施方案20的疫苗组合物，其包含MenA荚膜多糖与载体蛋白的缀合物，该缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.7至1.4。

[0025] 实施方案21是实施方案20的疫苗组合物，其中该MenA缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.8至1.3。

[0026] 实施方案22是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其包含MenC和/或MenY荚膜多糖与载体蛋白的缀合物，该缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.3至1.1。

[0027] 实施方案23是实施方案22的疫苗组合物，其中该MenC缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.4至0.8。

[0028] 实施方案24是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其包含MenW-135荚膜多糖与载体蛋白的缀合物，该缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.3至1.3。

[0029] 实施方案25是实施方案24的疫苗组合物，其中该MenW-135缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.6至1.3。

[0030] 实施方案26是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其包含MenY荚膜多糖与载体蛋白的缀合物，该缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.5至1.3。

[0031] 实施方案27是实施方案26的疫苗组合物，其中该MenY缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.5至0.9。

[0032] 实施方案28是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其中该组合物包含少于20%重量的游离多糖。

[0033] 实施方案29是实施方案28的疫苗组合物，其中该组合物包含少于10%重量的游离多糖、少于5%重量的游离多糖，或基本上不含游离多糖。

[0034] 实施方案30是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其中该MenA、MenC、MenW-135或MenY缀合物的多糖通过接头与该载体蛋白附接。

[0035] 实施方案31是实施方案30的疫苗组合物，其中该接头包含2-10个直链碳。

[0036] 实施方案32是实施方案30和31的疫苗组合物，其该接头以每10-100个糖重复单元一个接头的比例存在于该MenA、MenC、MenW-135或MenY缀合物中。

[0037] 实施方案33是实施方案30和31的疫苗组合物，其该接头以每20-60个糖重复单元一个接头的比例存在于该MenA、MenC、MenW-135或MenY缀合物中。

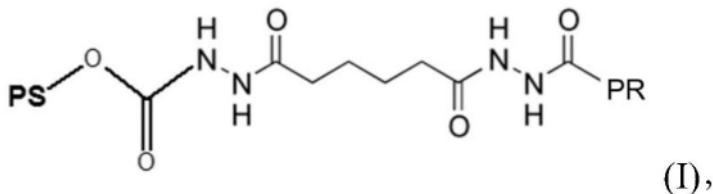
[0038] 实施方案34是实施方案30和31的疫苗组合物，其中该接头包含第一羰基和第二羰

基之间的间隔区，并且该间隔区包含4-8个碳。

[0039] 实施方案35是实施方案30-34中任一项的疫苗组合物，其中该MenA缀合物的接头包含二酰肼的残基。

[0040] 实施方案36是实施方案35的疫苗组合物，其中该MenA缀合物的接头包含己二酸二酰肼的残基。

[0041] 实施方案37是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其中该MenA、MenC、MenW-135和/或MenY缀合物的多糖通过式I的接头与该载体蛋白附接：



其中PS指示与该多糖的附接，并且PR指示与该载体蛋白的附接。

[0042] 实施方案38是实施方案30-37中任一项的疫苗组合物，其中该接头处于该MenA缀合物中。

[0043] 实施方案39是实施方案30-37中任一项的疫苗组合物，其中该接头处于该MenC缀合物中。

[0044] 实施方案40是实施方案30-37中任一项的疫苗组合物，其中该接头处于该MenW-135缀合物中。

[0045] 实施方案41是实施方案30-37中任一项的疫苗组合物，其中该接头处于该MenY缀合物中。

[0046] 实施方案42是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其中该MenA、MenC、MenW-135和/或MenY缀合物的多糖与如式II所示的载体蛋白附接：PR-NH-CH₂-PS (II)，其中PS指示与该多糖的附接，并且PR指示与该载体蛋白的附接。

[0047] 实施方案43是实施方案42的疫苗组合物，其中该MenA缀合物的多糖与如式II所示的载体蛋白附接。

[0048] 实施方案44是实施方案42的疫苗组合物，其中该MenC缀合物的多糖与如式II所示的载体蛋白附接。

[0049] 实施方案45是实施方案42的疫苗组合物，其中该MenW-135缀合物的多糖与如式II所示的载体蛋白附接。

[0050] 实施方案46是实施方案42的疫苗组合物，其中该MenY缀合物的多糖与如式II所示的载体蛋白附接。

[0051] 实施方案47是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其中该载体蛋白包含重组外蛋白A(rEPA)、白喉类毒素或白喉毒素B-片段、CRM197、破伤风类毒素或破伤风毒素C-片段或者由其组成。

[0052] 实施方案48是前述实施方案中任一项的疫苗组合物，其中该载体蛋白是破伤风类毒素。

[0053] 实施方案49是一种生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖与载体蛋白的缀合物的方法，其包括：a)用可形成氨基甲酸酯连接的活化剂活化该多糖，其中该活化剂以相对于该多糖20

倍至50倍的摩尔过量存在; b) 部分淬灭该活化的多糖并用相对于多糖重复单元以0.3至1.0的摩尔比添加的二酰肼接头衍生化该活化的多糖, 其中该多糖以每10-100个糖重复单元一个二酰肼接头的比例衍生化; c) 通过碳二亚胺化学将该衍生化的多糖与该载体蛋白缀合, 其中该多糖在该缀合反应开始时以相对于该载体蛋白3:1至5:1的重量比存在, 从而形成该缀合物。

[0054] 实施方案50是实施方案49的方法, 其中相对于多糖重复单元以0.4至0.6的摩尔比添加该二酰肼接头。

[0055] 实施方案51是实施方案49的方法, 其包括用甘油淬灭该反应的另一个步骤。

[0056] 实施方案52是实施方案49至51中任一项的方法, 其中该二酰肼接头是己二酸二酰肼。

[0057] 实施方案53是实施方案49至51中任一项的方法, 其中该衍生化的多糖在该缀合反应中的起始浓度为10g/L至20g/L。

[0058] 实施方案54是实施方案49至51中任一项的方法, 其中该活化剂包含与两个N-连接的杂芳基结合的羰基, 如CDI (1,1'-羰基二咪唑) 和CDT (1,1'-羰基-二-(1,2,4-三唑)), 或其他适当的离去基团。

[0059] 实施方案55是实施方案54的方法, 其中该活化剂是羰基二咪唑。

[0060] 实施方案56是实施方案49至51中任一项的方法, 其中该活化剂在该活化步骤中以相对于该多糖35倍至45倍的摩尔过量存在。

[0061] 实施方案57是实施方案49至51中任一项的方法, 其中该缀合步骤包括使该载体蛋白与N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺反应。

[0062] 实施方案58是实施方案49至51中任一项的方法, 其中该多糖是MenA荚膜多糖。

[0063] 实施方案59是实施方案49至51中任一项的方法, 其中该多糖是MenC荚膜多糖。

[0064] 实施方案60是实施方案49至51中任一项的方法, 其中该多糖是MenW-135或MenY荚膜多糖。

[0065] 实施方案61是一种生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖与载体蛋白的缀合物的方法, 其包括:a) 通过碱水解使该多糖部分脱0-乙酰化;b) 通过高碘酸盐处理来活化该多糖, 从而将二醇转化为醛至每mg多糖至少20nmol醛的程度;c) 通过还原胺化将该活化的多糖与该载体蛋白缀合, 其中该多糖以相对于该载体蛋白1:1至5:1的重量比存在于该缀合反应中, 从而形成该缀合物。

[0066] 实施方案62是实施方案61的方法, 其中该多糖以相对于该载体蛋白1.5至3:1的重量比存在于该缀合反应中。

[0067] 实施方案63是实施方案61的方法, 其中该脱0-乙酰化使该多糖中0-乙酰化的初始量减少40%至70%、或50%至60%。

[0068] 实施方案64是实施方案61至63中任一项的方法, 其中在脱0-乙酰化后, 该多糖的0-乙酰化程度为0.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖至1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖或0.8至1.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。

[0069] 实施方案65是实施方案64的方法, 其中该0-乙酰化程度为大于或等于0.7、0.8、0.9、1.0、1.1或1.2 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。

[0070] 实施方案66是实施方案64的方法, 其中该0-乙酰化程度为少于或等于0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3或1.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。

- [0071] 实施方案67是实施方案61至66中任一项的方法,其中该活化的多糖在该缀合反应中的起始浓度为20g/L至50g/L。
- [0072] 实施方案68是实施方案61至66中任一项的方法,其中该多糖是MenC荚膜多糖。
- [0073] 实施方案69是实施方案61至66中任一项的方法,其中该多糖是MenA荚膜多糖。
- [0074] 实施方案70是实施方案61至66中任一项的方法,其中该多糖是MenW-135或MenY荚膜多糖。
- [0075] 实施方案71是实施方案61至66中任一项的方法,其中该多糖的大小在该缀合反应之前减小至30至150kDa或50至100kDa。
- [0076] 实施方案72是一种生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖与载体蛋白的缀合物的方法,其中包括:a)通过高碘酸盐处理来活化该多糖,从而将二醇转化为醛至每mg多糖至少50nmol醛的程度;b)通过还原胺化将该活化的多糖与该载体蛋白缀合,其中该多糖以相对于该载体蛋白1:1至5:1的重量比存在于该缀合反应中,从而形成该缀合物。
- [0077] 实施方案73是实施方案72的方法,其中该多糖以相对于该载体蛋白1.5至3:1的重量比存在于该缀合反应中。
- [0078] 实施方案74是实施方案72和73中任一项的方法,其中该多糖是MenW-135或MenY荚膜多糖。
- [0079] 实施方案75是实施方案72和73中任一项的方法,其中该多糖是MenC荚膜多糖。
- [0080] 实施方案76是实施方案72和73中任一项的方法,其中该多糖是MenA荚膜多糖。
- [0081] 实施方案77是实施方案72至76中任一项的方法,其中该多糖的大小在该缀合反应之前减小至100至200kDa或125至175kDa。
- [0082] 实施方案78是实施方案49、61和72中任一项的方法,其中通过酸水解和/或加热减小该多糖的大小。
- [0083] 实施方案79是实施方案49、61和72中任一项的方法,其中通过氧化裂解减小该多糖的大小。
- [0084] 实施方案80是实施方案72至79中任一项的方法,其中还原胺化包括使用氰基硼氢化物或其他还原剂如吡啶硼烷(C_5H_8BN)和甲基吡啶硼烷络合物($C_6H_7N \cdot BH_3$)将亚胺还原为胺。
- [0085] 实施方案81是实施方案72至79中任一项的方法,其还包括用还原剂将该缀合物中未反应的醛转化为醇。
- [0086] 实施方案82是实施方案81的方法,其中该还原剂是硼氢化物。
- [0087] 实施方案83是实施方案72至79中任一项的方法,其中添加高碘酸盐至1mM至4mM或1.5mM至3mM的浓度以活化该多糖。
- [0088] 实施方案84是实施方案49至83中任一项的方法,其还包括通过疏水相互作用色谱法纯化该缀合物。
- [0089] 实施方案85是实施方案49至83中任一项的方法,其还包括通过混合模式树脂色谱法纯化该缀合物。
- [0090] 实施方案86是一种从含有脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖与载体蛋白的缀合物、盐和游离多糖的混合物中纯化该缀合物的方法,其包括:a)使疏水相互作用色谱树脂与该混合物接触,其中该缀合物结合该树脂;b)从该树脂中洗脱游离多糖;并且c)用水性液体从该树脂

中洗脱该缀合物，其中该水性液体不含盐或含有比该混合物少的盐，从而获得包含纯化的缀合物的组合物。

[0091] 实施方案87是实施方案86的方法，其中该盐包括硫酸铵。

[0092] 实施方案88是实施方案86或实施方案87的方法，其中该混合物包含的盐的量范围为0.5至1.5M或0.8至1.2M。

[0093] 实施方案89是实施方案86至88中任一项的方法，其中该水性液体包含少于0.2、0.1或0.05M的盐。

[0094] 实施方案90是实施方案86至89中任一项的方法，其中该水性液体是水。

[0095] 实施方案91是实施方案86至90中任一项的方法，其中该组合物包含少于20%重量的游离多糖、少于10%重量的游离多糖、少于5%重量的游离多糖，或基本上不含游离多糖。

[0096] 实施方案92是实施方案86至91中任一项的方法，其中该疏水相互作用色谱树脂是苯基、丙基或丁基树脂。

[0097] 实施方案93是实施方案49至92中任一项的方法，其中该载体蛋白是破伤风类毒素。

[0098] 实施方案94是根据实施方案49至85中任一项的方法生产的缀合物。

[0099] 实施方案95是疫苗组合物，其包含：a) MenA荚膜多糖与载体蛋白的第一缀合物；b) MenC荚膜多糖与载体蛋白的第二缀合物；c) MenW-135荚膜多糖与载体蛋白的第三缀合物；和d) MenY荚膜多糖与载体蛋白的第四缀合物；其中该第一、第二、第三和第四缀合物中的一种、两种、三种或全部是根据实施方案49至85中任一项的方法生产的。

[0100] 实施方案96是实施方案1-48或95中任一项的疫苗组合物，其不含佐剂。

[0101] 实施方案97是实施方案1-48或95-96中任一项的疫苗组合物，其还包含药学上可接受的缓冲液。

[0102] 实施方案98是实施方案97的疫苗组合物，其包含pH为5.5至6.5的乙酸盐缓冲液。

[0103] 实施方案99是实施方案1-48或95-98中任一项的疫苗组合物，其还包含药学上可接受的盐。

[0104] 实施方案100是实施方案99的疫苗组合物，其中该药学上可接受的盐是氯化钠。

[0105] 实施方案101是实施方案99或100的疫苗组合物，其中该药学上可接受的盐以0.45%w/v至0.9%w/v、或0.5%w/v至0.85%w/v存在。

[0106] 实施方案102是实施方案1-48或95-101中任一项的疫苗组合物，其中该第一、第二、第三和第四缀合物中的至少一种、两种、三种或全部四种包含该多糖和该载体蛋白之间的多个附接点。

[0107] 实施方案103是实施方案1-48或95-102中任一项的疫苗组合物，其被配制用于肌内给药。

[0108] 实施方案104是单一单位剂量的实施方案1-48或95-103中任一项的疫苗组合物，其包含6 μ g至15 μ g的该MenA、MenC、MenW-135和MenY多糖中的每一种。

[0109] 实施方案105是实施方案104的单一单位剂量，其中该载体蛋白以50 μ g至80 μ g的量存在。

[0110] 实施方案106是实施方案104或105的单一单位剂量，其含在注射器中。

[0111] 实施方案107是实施方案106的单一单位剂量，其中该注射器不含硅氧烷。

[0112] 实施方案108是实施方案106或107的单一单位剂量,其中该注射器被包装用于商业销售或配送。

[0113] 实施方案109是一种针对脑膜炎奈瑟氏菌给受试者接种疫苗的方法,其包括向该受试者给予一定剂量的实施方案1-48或95-103中任一项的疫苗组合物。实施方案109A是实施方案1-48或95-103中任一项的疫苗组合物,其用在针对脑膜炎奈瑟氏菌给受试者接种疫苗的方法中,该方法包括向该受试者给予一定剂量的该疫苗组合物。

[0114] 实施方案110是实施方案1-48或95-103中任一项的疫苗组合物或实施方案104-108中任一项的单一单位剂量用以针对脑膜炎奈瑟氏菌免疫受试者的用途。实施方案110A是实施方案1-48或95-103中任一项的疫苗组合物或实施方案104-108中任一项的单一单位剂量,用于针对脑膜炎奈瑟氏菌免疫受试者。

[0115] 实施方案111是实施方案1-48或95-103中任一项的疫苗组合物或实施方案104-108中任一项的单一单位剂量用于制造用以针对脑膜炎奈瑟氏菌免疫受试者的药剂的用途。实施方案111A是实施方案1-48或95-103中任一项的疫苗组合物或实施方案104-108中任一项的单一单位剂量,其用作用以针对脑膜炎奈瑟氏菌免疫受试者的药剂。

[0116] 实施方案112是实施方案109-111A中任一项的方法、用途或组合物,其中该疫苗是肌内给予的。

[0117] 实施方案113是实施方案109-112中任一项的方法、用途或组合物,其中该受试者的年龄为6周至3岁。

[0118] 实施方案114是实施方案113的方法、用途或组合物,其中该受试者为2月龄、6月龄、12月龄或15月龄。

[0119] 实施方案115是实施方案109-112中任一项的方法、用途或组合物,其中该受试者的年龄为50岁或以上、55岁或以上、60岁或以上、或65岁或以上。

[0120] 实施方案116是实施方案109-115中任一项的方法、用途或组合物,其中该疫苗按0.5mL剂量给予。

[0121] 实施方案117是实施方案116的方法、用途或组合物,其中该疫苗包含4-10 μ g的血清组A、C、Y和W-135中的每一种。

[0122] 实施方案118是实施方案116的方法、用途或组合物,其中该疫苗包含50-80 μ g的破伤风类毒素蛋白。

[0123] 实施方案119是实施方案116的方法、用途或组合物,其中该疫苗包含4-10 μ g的血清组A、C、Y和W-135中的每一种,以及50-80 μ g的破伤风类毒素蛋白。

[0124] 实施方案120是实施方案109-119中任一项的方法、用途或组合物,其还包括与该MenACYW-TT疫苗同时但非同次注射,给予不针对脑膜炎奈瑟氏菌的疫苗。

[0125] 实施方案121是实施方案120的方法、用途或组合物,其中非脑膜炎奈瑟氏菌疫苗是用于预防水痘、白喉、Hib、乙型肝炎、麻疹、腮腺炎、百日咳、脊髓灰质炎、肺炎球菌、轮状病毒、风疹或破伤风感染。

[0126] 实施方案122是实施方案120的方法、用途或组合物,其中该非脑膜炎奈瑟氏菌疫苗是DTaP5、Hib、HepB、DTap5-IPV/Hib、DTap5-IPV/Hib、HepB、MMR、IPV、PCV7、PCV13、RV1或RV5。

[0127] 实施方案123是实施方案109-122中任一项的方法、用途或组合物,其中该受试者

先前接受了脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖缀合物疫苗。

[0128] 实实施方案124是实施方案123的方法、用途或组合物，其中该受试者在4个月至10年前接受了该脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖缀合物疫苗。实施方案124A是实施方案123的方法、用途或组合物，其中该受试者在2个月至10年前接受了该脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖缀合物疫苗。

[0129] 实实施方案125是实施方案109-122中任一项的方法、用途或组合物，其中该受试者先前未接受过脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖缀合物疫苗。

II. 附图说明

[0130] 图1A显示了血清组A多糖-ADH连接的蛋白质缀合物的示意图。具有反应性位点残基11的血清组A多糖10是通过碳基二咪唑(CDI)活化和任选地在多糖的羟基上用己二酸二酰肼(ADH)衍生化并与蛋白质(例如，破伤风类毒素(TT))反应而形成。活化/衍生化的多糖通过连接12直接或间接地在基团14处交联至蛋白质13。例如，直接连接可以使用蛋白质的伯胺，例如通过形成氨基甲酸酯连接(例如衍生自CDI)。间接连接可以衍生自ADH和N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDAC)，其活化蛋白质的羧基。

[0131] 图1B示出了载体蛋白(例如TT)的活性O-酰基异脲中间体的制备，即使用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDAC)，使其与蛋白质的羧基基团反应(例如，在天冬氨酸或谷氨酸侧链或C-末端)。该中间体适合于与活化的衍生化多糖(未显示)的胺偶联。

[0132] 图1C示出了生产活化的衍生化血清组A多糖的一般方案，其可用于生产与载体蛋白(例如TT)连接的血清组A多糖-ADH缀合物。在该实施方案中，多糖在羟基基团处被CDI活化，形成咪唑氨基甲酸酯活性中间体，将其进一步用ADH衍生化。ADH衍生化的血清组A多糖适合于通过ADH接头上的伯胺基团与载体蛋白的活性O-酰基异脲中间体(未显示)的胺偶联而与载体蛋白共价附接。

[0133] 图1D显示了生产血清组A多糖通过氨基甲酸酯与破伤风类毒素连接的缀合物的一般方案。多糖(PS)在羟基基团处被CDI活化，形成咪唑氨基甲酸酯活性中间体。然后使活性中间体与蛋白载体(PR)反应。通过亲核取代反应形成氨基甲酸酯连接，其中蛋白质的伯胺攻击氨基甲酸酯碳，导致咪唑的损失和多糖与蛋白质之间氨基甲酸酯连接的形成。

[0134] 图1E-F显示了(E) CDI活化后和(F) CDI活化且用ADH衍生化后的血清组A多糖的结构。

[0135] 图1G示出了从活化的衍生化多糖和由破伤风类毒素载体蛋白和N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDAC)形成的活性O-酰基异脲中间体生产与载体蛋白(例如TT)连接的血清组A多糖-ADH缀合物。活化的衍生化多糖的伯胺取代异脲，其充当离去基团，得到如下产物，其中蛋白质通过酰胺键、ADH的残基和氨基甲酸酯连接与多糖连接，其中碳基衍生自CDI。未显示消除的脲副产物。

[0136] 图1H显示了图1F中反应的产物，拉出了连接的多糖重复单元(包括ADH残基)的结构。

[0137] 图2A显示了血清组C多糖-蛋白质缀合物的示意图。血清组C多糖20在其末端与蛋白质(例如，破伤风类毒素)21结合。

[0138] 图2B示出了使用偏高碘酸钠活化血清组C多糖(在多糖重复单元中用常规的碳编号显示)。偏高碘酸钠处理导致第7和第8个碳之间的裂解，将多糖氧化解聚成相应的末端

醛。

[0139] 图2C示出了通过还原胺化形成血清组C多糖-蛋白质(例如TT)缀合物。蛋白质(PR)的伯胺(例如,赖氨酸侧链或N-末端)与解聚的活化血清组C多糖(PS)的末端醛反应,形成席夫碱中间体(未显示),将其还原(例如,使用吡啶硼烷、甲基吡啶硼烷或氰基硼氢化物)得到仲胺连接。该多糖部分与该蛋白质端部相连接。单个蛋白质分子可以与多于一种多糖反应,并且一些多糖末端可能是未反应的(未显示;参见图2A中的图示)。在Schiff碱还原(未显示)后,可以使用合适的还原剂如硼氢化钠将未反应的醛封端,即还原成醇。

[0140] 图2D显示了图2C中反应的产物,拉出了连接的多糖重复单元的结构。蛋白质与其他多糖的连接是可能的(未显示)。

[0141] 图3显示了血清组W-135或血清组Y多糖-蛋白质缀合物的示意图。血清组W-135或血清组Y多糖31在一个或多个位置处与一种或多种蛋白质(例如,破伤风类毒素)30结合。

[0142] 图4A示出了血清组W-135多糖的解聚和活化。使用例如升高的温度使多糖解聚,并且然后通过用偏高碘酸钠处理进行活化,这裂解邻二醇(如例如在唾液酸部分的碳7和8之间),并将它们氧化成醛。

[0143] 图4B示出了通过还原胺化形成血清组W-135多糖-蛋白质(例如TT)缀合物。蛋白质(PR)的伯胺(例如,赖氨酸侧链或N-末端)与解聚的活化血清组W-135多糖(PS)的醛反应,形成席夫碱中间体(未显示)。通过氰基硼氢化钠还原中间体,得到仲胺连接。单个蛋白质分子可以与多于一种多糖反应,反之亦然(未显示;参见图3中的图示)。在Schiff碱还原(未显示)后,可以使用合适的还原剂如硼氢化钠将未反应的醛封端,即还原成醇。

[0144] 图4C显示了图4B中反应的产物,拉出了连接的多糖重复单元的一种可能结构。蛋白与其他多糖的连接(或反之亦然)是可能的(未示出;参见图3中的图示)。

[0145] 图5A示出了血清组Y多糖的解聚和活化。使用例如升高的温度使多糖解聚,并且然后通过用偏高碘酸钠处理进行活化,所述偏高碘酸钠裂解邻二醇,如例如在唾液酸部分的碳7和8之间,并将它们氧化成醛。

[0146] 图5B示出了通过还原胺化形成血清组Y多糖-蛋白质(例如TT)缀合物。蛋白质(PR)的伯胺(例如,赖氨酸侧链或N-末端)与解聚的活化血清组Y多糖(PS)的醛反应,形成席夫碱中间体(未显示)。将该中间体还原(例如,使用吡啶硼烷、甲基吡啶硼烷或氰基硼氢化物)得到仲胺连接。单个蛋白质分子可以与多于一种多糖反应,反之亦然(未显示;参见图3中的图示)。在Schiff碱还原(未显示)后,可以使用合适的还原剂如硼氢化钠将未反应的醛封端,即还原成醇。

[0147] 图5C显示了图5B中反应的产物,拉出了连接的多糖重复单元的一种可能结构。蛋白与其他多糖的连接(或反之亦然)是可能的(未示出;参见图3中的图示)。

[0148] 图6显示了在最后一次给予疫苗后30天(D30)第1-4组中对于血清组A、C、Y和W实现hSBA效价大于或等于1:8的受试者的百分比。

[0149] 图7显示了在最后一次给予疫苗后D30第1-4组中对于血清组A、C、Y和W实现rSBA效价大于或等于1:8的受试者的百分比。

[0150] 图8显示了在给予MenACYW-TT疫苗后7天内报告一次或多次征集性注射部位反应的参与者的累积百分比。

[0151] 图9显示了在给予MenACYW-TT疫苗加常规疫苗或单独的常规疫苗的7天内具有征

集性全身反应的受试者的百分比。

[0152] 图10显示了在给予MenACYW-TT或**Menomune®-A/C/Y/W-135**(MPSV4)疫苗后D30对于不同血清组实现hSBA效价 $\geq 1:8$ 的受试者的百分比。

[0153] 图11显示了在给予MenACYW-TT或MPSV4疫苗后D30的hSBA几何平均效价(GMT)的总结。

[0154] 图12显示了在给予MenACYW-TT或MPSV4疫苗后D30对于不同血清组实现rSBA效价 $\geq 1:8$ 的受试者的百分比。

[0155] 图13显示了在给予MenACYW-TT或MPSV4疫苗后,具有按类型和等级计的征集性注射部位反应的受试者的百分比。

[0156] 图14显示了在给予MenACYW-TT或MPSV4疫苗后,具有按类型和等级计的征集性全身反应的受试者的百分比。

[0157] 图15显示了在给予MenACYW-TT或MCV4-TT疫苗后D30实现hSBA疫苗血清应答的受试者的百分比。

[0158] 图16显示在给予MenACYW-TT或MCV4-TT疫苗后的疫苗接种后hSBA几何平均值。

[0159] 图17显示了在给予MenACYW-TT或MCV4-TT疫苗后D0-D7的征集性注射位点反应。

[0160] 图18显示了在给予MenACYW-TT或MCV4-TT疫苗后D0-D7的征集性全身反应。

III. 具体实施方式

[0161] 现在将详细参考本发明的某些实施方案,其实施例在附图中阐明。虽然将结合所列举的实施方案说明本发明,但是应该理解,它们并不旨在将本发明限制于那些实施方案。相反,本发明旨在覆盖可以包括在由所附权利要求定义的本发明内的所有替代物、修改和等同物。

[0162] 在详细描述本传授内容之前,应理解本公开文本不限于具体的组合物或工艺步骤,因为这些可以变化。应当注意,如在本说明书和所附权利要求书中所用的,单数形式的“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非上下文清楚地另外指明。因此,例如,提及“缀合物”包括多种缀合物,并且提及“一个细胞”包括多个细胞等。

[0163] 数值范围包括定义该范围的数字。测量值和可测量值被理解为近似值,考虑有效数字和与测量相关的误差。而且,“包含”、“含有”和“包括”的使用不是限制性的。应理解,前面的一般性描述和详细描述都仅是示例性和解释性的,并不是对本传授内容的限制。

[0164] 除非在上述说明书中特别指出,否则本说明书中叙述“包含”各种组分的实施方案也被考虑为“由(所述组分)组成”或“基本上由(所述组分)组成”;本说明书中叙述“由(各种组分)组成”的实施方案也被考虑为“包含”所述组分或“基本上由(所述组分)组成”;并且本说明书中叙述“基本上由(各种组分)组成”的实施方案也被考虑为“由(所述组分)组成”或“包含”所述组分(这种可互换性不适用于这些术语在权利要求中的使用)。

[0165] 本文使用的章节标题只是出于组织的目的,而不应被解释为以任何方式限制所希望的主题。如果通过引用并入的任何文献与本说明书中定义的任何术语相矛盾,则以本说明书为准。虽然结合各实施方案描述了本传授内容,但是并不旨在本传授内容限于这些实施方案。相反,如本领域技术人员将理解的,本传授内容涵盖各种替代物、修改和等同物。

[0166] A. 定义

[0167] 除非另有说明,否则本文使用的以下术语和短语旨在具有以下含义:

[0168] 如本文所用,术语“或其组合”是指该术语之前列出的术语的所有排列和组合。例如,“A、B、C或其组合”旨在包括以下中的至少一项:A、B、C、AB、AC、BC或ABC,并且如果顺序在特定上下文中是重要的,则还有BA、CA、CB、ACB、CBA、BCA、BAC或CAB。继续该例子,明确包括的是含有一项(item/term)或多项的重复的组合,例如BB、AAA、AAB、BBC、AAABC_n、CB_nAAA、CABABB等。本领域技术人员将理解,除非另外从上下文中显而易见,否则典型地对任何组合中的项(item/term)的数量没有限制。

[0169] 如本文所用,术语“试剂盒”是指一组经包装的相关组分,如一种或多种化合物或组合物和一种或多种相关材料,如溶剂、溶液、缓冲液、说明书或干燥剂。

[0170] 除非上下文另有要求,否则“或”以包括性含义使用,即等同于“和/或”。

[0171] 术语“接头”和“连接”可互换使用,并且是指包含原子链的化学部分,该原子链共价附接或被附接于如下项,如载体蛋白或多糖。

[0172] “连接部分”意指化学反应性基团、取代基或部分,例如,亲核试剂或亲电子试剂,能够与另一分子反应以通过共价键形成连接。

[0173] “烷基”是指通过从母体烷烃、烯烃或炔烃的单个碳原子上除去一个氢原子衍生的饱和或不饱和的支链、直链、支链或环状烃基。典型的烷基由1至12个饱和和/或不饱和碳组成,包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基等。

[0174] “重复单元”是在多糖中聚合的单糖或寡糖残基。MenA和MenC的重复单元是单糖(分别为N-乙酰甘露糖胺和唾液酸),并且MenW-135和MenY的重复单元是二糖(MenY的唾液酸和葡萄糖,或MenW-135的唾液酸和半乳糖)。关于侧链(例如,O-乙酰化)和/或修饰(如本文公开的那些),重复单元可以从一个变化为另一个。

[0175] MenA、MenC、MenW-135和MenY分别用作血清组A、C、W-135或Y脑膜炎奈瑟氏菌或其荚膜多糖的简写(如例如“MenC缀合物”的情况,其意指血清组C脑膜炎奈瑟氏菌的荚膜多糖与载体蛋白的缀合物)。

[0176] B.示例性疫苗组合物

[0177] 在一些实施方案中,提供了疫苗组合物。在一些实施方案中,疫苗组合物包含MenC荚膜多糖与载体蛋白的缀合物。在一些实施方案中,疫苗组合物包含MenA荚膜多糖与载体蛋白的缀合物。在一些实施方案中,疫苗组合物包含MenW-135荚膜多糖与载体蛋白的缀合物。在一些实施方案中,疫苗组合物包含MenY荚膜多糖与载体蛋白的缀合物。在一些实施方案中,疫苗组合物包含荚膜多糖与载体蛋白的至少两种、至少三种或至少四种缀合物。荚膜多糖与载体蛋白的至少两种、至少三种或至少四种缀合物可以是来自不同的脑膜炎奈瑟氏菌血清组的荚膜多糖的缀合物,例如, MenA、MenC、MenY和MenW荚膜多糖与载体蛋白质例如破伤风类毒素的缀合物。

[0178] 荚膜多糖可根据US 2003/0068336实施例1中描述的方法制备。荚膜多糖也可以使用例如US 6,933,137中描述的培养基和方法制备。

[0179] 本文公开了包含载体蛋白的缀合物。以下中讨论了蛋白载体的例子,例如 Pichichero ME. Protein carriers of conjugate vaccines: Characteristics, development, and clinical trials. Human Vaccines&Immunotherapeutics. 2013;9(12): 2505-2523. doi:10.4161/hv.26109,其通过引用并入本文。在一些实施方案中,载体蛋白包

含重组外蛋白 α (REPA)、白喉类毒素、CRM197、破伤风类毒素或破伤风毒素C-片段或由其组成。在一些实施方案中，蛋白载体是破伤风类毒素。

[0180] 在一些实施方案中，破伤风类毒素(TT)是通过对来自Mueller和Miller培养基或改良Mueller和Miller培养基中生长的破伤风梭菌(Harvard菌株)培养物的毒素进行提取、硫酸铵纯化和福尔马林灭活来制备。在一些实施方案中，处理TT以减少残留的甲醛，将其在氯化钠中浓缩并过滤灭菌。在一些实施方案中，通过色谱法而不是硫酸铵纯化来纯化TT。在一些实施方案中，改良Mueller和Miller培养基不含牛心浸液。在一些实施方案中，破伤风梭菌在WO 2006/042542表3第16页中描述的培养基中生长。

[0181] 下面讨论的某些实施方案涉及特征，如化学部分(例如，羟基或0-乙酰化)或与载体蛋白的缀合，其以每单位质量的多糖的给定量存在。例如，某个特征或多个特征的组合可以不少于25nmol/mg多糖的水平存在。这意味着在1mg多糖中，该特征或特征组合发生至少 15×10^{15} 次(其中 $25\text{nmol} = 25 \times 10^{-9}\text{摩尔} \times (6.02 \times 10^{23}\text{项}/\text{摩尔}) = 15 \times 10^{15}\text{项}$)。

[0182] 在一些实施方案中，MenC荚膜多糖与载体蛋白的缀合物的多糖的0-乙酰化水平范围为 $0.3\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖至 $1.6\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。在一些实施方案中，0-乙酰化水平为大于或等于0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1或 $1.2\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。在一些实施方案中，0-乙酰化水平为少于或等于0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4或 $1.5\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。例如，该水平可以为 0.6 至 $1.5\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖或 0.8 至 $1.4\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。0-乙酰基含量可以通过Hestrin方法(Hestrin等人，J.Biol.Chem.1949, 180, 第249页)测量。

[0183] 在一些实施方案中，在该组合物中，该缀合物中的至少一种的重均分子量范围为300kDa至1500kDa。在一些这样的实施方案中，该重均分子量大于或等于400kDa、500kDa、600kDa、700kDa、800kDa、900kDa、1000kDa、或1100kDa。在一些这样的实施方案中，该重均分子量少于或等于600kDa、700kDa、800kDa、900kDa、1000kDa、1100kDa、1200kDa、1300kDa或1400kDa。重均分子量可通过本领域已知的方法测定，例如多角度光散射(MALS)。在一些实施方案中，该组合物中的至少一种缀合物包含(即，作为包含以下的分子的群体)分子量在700kDa至1400kDa范围内的分子。应当注意，无论重均分子量或数均分子量是否在该范围内，该群体中的一些分子可具有在该范围内的重量。例如，重均分子量为600kDa或1500kDa的分子的群体可能含有分子量在700kDa至1400kDa范围内的分子。在一些实施方案中，该组合物中的至少一种缀合物包含分子量在800kDa至1300kDa范围内的分子。在一些实施方案中，该组合物中的至少一种缀合物包含分子量在700-800、800-900、900-1000、1000-1100、1100-1200、1200-1300、1300-1400或1400-1500kDa范围内的分子。在一些实施方案中，MenA缀合物具有如上所述的分子量。在一些实施方案中，MenC缀合物具有如上所述的分子量。在一些实施方案中，MenW-135缀合物具有如上所述的分子量。在一些实施方案中，MenY缀合物具有如上所述的分子量。在一些实施方案中，使用多角度光散射(MALS)测定分子量。在一些实施方案中，使用高效尺寸排阻色谱法(HPSEC)测定分子量。

[0184] 在一些实施方案中，缀合物(例如MenC的缀合物)是包含单端连接的缀合多糖、双端连接的多糖或其组合的群体。单端连接的缀合多糖在一端附接到载体蛋白上。双端连接的缀合多糖在两端附接到载体蛋白上。例如，通过裂解和活化多糖主链中的邻二醇以暴露活化末端，如通过高碘酸盐处理，可以形成端连接的缀合多糖。例如，MenC多糖在其唾液酸重复单元中具有7,8邻二醇，其程度为在相同的重复单元中位置7和8不是0-乙酰化的。该邻

二醇处于多糖的主链中,因为裂解它将一种糖与下一种糖分开,即邻二醇不是侧链的一部分。活化后,活化端然后可以与载体蛋白反应(或与接头反应,然后该接头将附接到载体蛋白或已经附接到载体蛋白),以形成端连接的多糖缀合物。如果多糖的仅一端(末端糖残基)与载体蛋白连接(如果适用,包括通过接头),则缀合物是单端连接的。双端连接的缀合物具有与多糖的两端连接的载体蛋白。通常,相对于载体蛋白使用更高化学计量的多糖或更低的总反应物浓度将使缀合反应偏向单端连接的产物。相反,相对于载体蛋白的更低化学计量的多糖或更高的总反应物浓度将使缀合反应偏向双端连接的产物。

[0185] 在一些实施方案中,单端连接的缀合多糖(例如,MenC缀合物)具有末端未连接的糖,其中在位置7处具有伯羟基,或其中还原端被(2-羟基)乙氧基修饰。这可以由以下产生:用高碘酸盐活化包含7,8邻二醇的多糖(其得到末端醛),在一端缀合,并且回还原另一端未反应的醛(例如用硼氢化物试剂)。在位置7处的伯羟基可以认为是截短的唾液酸残基的一端。被(2-羟基)乙氧基修饰的还原端可以认为是在其还原端附接到另一个残基的第9和8个碳及其相关氧的片段的唾液酸残基。

[0186] 在一些实施方案中,该缀合物是MenW-135和/或MenY多糖,其包含选自以下的一种或多种修饰:(i)天然MenW-135或MenY多糖中邻二醇位置处的伯羟基和(ii)与该载体蛋白的缀合,其中该修饰以不少于60nmol/mg多糖存在。可以通过高碘酸盐氧化随后缀合至载体蛋白并还原未反应的醛来形成修饰。高碘酸盐驱动的糖残基裂解可发生在邻二醇位置,如唾液酸的位置7,8或8,9处,并且也可能发生在重复单元的己糖环中,特别是在二醇处于顺式排列的情况下。在一些实施方案中,该修饰以少于200nmol/mg多糖、少于150nmol/mg多糖、少于100nmol/mg多糖或少于80nmol/mg多糖的量存在。

[0187] 在一些实施方案中,多糖通过仲胺与载体蛋白连接。在一些实施方案中,多糖与如式II所示的载体蛋白附接:

[0188] PR-NH-CH₂-PS(II)

[0189] 其中PS指示与该多糖的附接,并且PR指示与该载体蛋白的附接。这样的仲胺连接可以例如通过还原胺化形成,其中蛋白质上的伯胺(例如,赖氨酸侧链的N-末端或氨基基团)攻击多糖上的活化基团(例如醛),形成席夫碱,然后将其还原形成仲胺。还原可以使用合适的还原剂进行,如氰基硼氢化物(例如氰基硼氢化钠)或硼烷(例如吡啶硼烷或甲基吡啶硼烷)。

[0190] 在一些实施方案中,相对于天然MenC多糖, MenC多糖的缀合物的大小减小3倍-8倍,例如3倍-4倍、4倍-5倍、5倍-6倍、6倍-7倍或7倍-8倍。高碘酸盐裂解分离相邻的重复单元,并且因此减小多糖的大小。通过处理如加热和/或酸(例如在高碘酸盐处理之前)可以进一步减小大小。也可以使用其他已知用于减小大小的处理,如超声处理或微流化。

[0191] 在一些实施方案中, MenA多糖的缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.3至1.5,例如0.3至0.4、0.4至0.5、0.5至0.6、0.6至0.7、0.7至0.8、0.8至0.9、0.9至1.0、1.0至1.1、1.1至1.2、1.2至1.3、1.3至1.4或1.4至1.5。在一些实施方案中, MenA多糖的缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.5至1.5。

[0192] 在一些实施方案中, MenC多糖的缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.3至1.1,例如0.3至0.4、0.4至0.5、0.5至0.6、0.6至0.7、0.7至0.8、0.8至0.9、0.9至1.0或1.0至1.1。

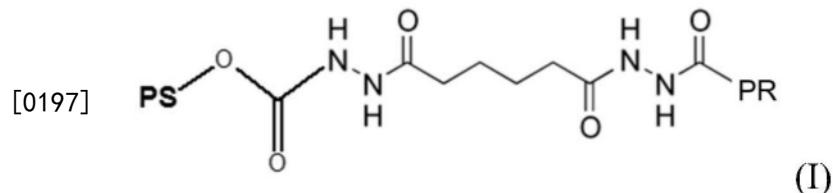
[0193] 在一些实施方案中, MenW-135多糖的缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.3至

1.3,例如0.3至0.4、0.4至0.5、0.5至0.6、0.6至0.7、0.7至0.8、0.8至0.9、0.9至1.0、1.0至1.1、1.1至1.2或1.2至1.3。

[0194] 在一些实施方案中, MenY多糖的缀合物的多糖与载体蛋白质量比为0.5至1.3, 例如0.3至0.4、0.4至0.5、0.5至0.6、0.6至0.7、0.7至0.8、0.8至0.9、0.9至1.0、1.0至1.1、1.1至1.2或1.2至1.3。

[0195] 在一些实施方案中, 本文提供的疫苗组合物包含少于20%重量的游离多糖, 例如包含少于10%重量的游离多糖、少于5%重量的游离多糖, 或基本上不含游离多糖。“基本上不含游离多糖”是指游离多糖的水平低于脱氧胆酸盐沉淀测定的检测极限, 其中将蛋白缀合多糖用脱氧胆酸盐沉淀, 并且测定残留在溶液中的多糖, 例如, 如Lei等人, “Quantification of free polysaccharide in meningococcal polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccines,” Dev Biol (Basel) . 2000;103:259-64 (PMID: 11214246) 所述。

[0196] 在一些实施方案中, 多糖通过包含2-10个直链碳(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳)的接头与该载体蛋白附接。“直链碳”是沿着从多糖到载体蛋白走向的链的碳, 并且在该链的分支上不包括碳。在一些实施方案中, 接头包含在第一羰基和第二羰基之间的间隔区, 并且间隔区包含4-8个碳(例如, 4、5、6、7或8个碳), 其可以是直链碳。第一羰基可以是氨基甲酸酯的一部分。第二羰基可以是酰胺的一部分。第一羰基可以靠近多糖并且远离载体蛋白。第二羰基可以靠近载体蛋白并且远离多糖。接头可包含二酰肼的残基, 如己二酸二酰肼(ADH)。在一些实施方案中, 多糖通过式I的接头与该载体蛋白附接:



[0198] 其中PS指示与该多糖的附接, 并且PR指示与该载体蛋白的附接。单个多糖可以与一种或多于一种载体蛋白附接(在不同位置), 反之亦然。

[0199] 在一些实施方案中, 接头以每10-100(例如20-60)个糖重复单元一个接头的比例存在于缀合物中。这包括附接载体蛋白和多糖的接头以及仅附接多糖的接头, 即不与载体蛋白形成附接的接头。

[0200] 在一些实施方案中, 提供了脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖与载体蛋白的通过接头的缀合物, 其中接头以每10-100个多糖重复单元1个接头的量存在, 例如每10-20个重复单元1个接头、每20-30个重复单元1个接头、每30-40个重复单元1个接头、每40-50个重复单元1个接头、每50-60个重复单元1个接头、或每60-70个重复单元1个接头。在一些实施方案中, MenA多糖通过如上所述的接头与该载体蛋白附接。在一些实施方案中, MenC多糖通过如上所述的接头与该载体蛋白附接。

[0201] 在一些实施方案中, 根据本公开文本的多糖缀合物组合物相对于现有配制品具有改进的稳定性。在一些实施方案中, 根据在2°C-8°C储存一段时间(例如2.5、3、3.5、4或4.5年)后对应于每种缀合多糖的游离多糖水平是否保持低于40%来测试稳定性。在一些实施方案中, 根据在23°C-27°C储存一段时间(例如2、3、4、5或6个月)后对应于每种缀合多糖的

游离多糖水平是否保持低于40%来测试稳定性。某些四价MenACYW多糖缀合物疫苗需要冻干或其他防腐措施,至少部分是由于作为液体配制品关于一种或多种成分缀合物的低稳定性。相对于单一液体配制品,冻干使制造和给药都变得复杂。在一些实施方案中,多糖在多个点处附接到载体蛋白。多点附接通常是缀合化学的结果,例如高碘酸盐活化随后还原胺化,或基于羧基二咪唑的偶联(任选地用接头,其可以形成载体蛋白和多糖的晶格)以及适当的多糖大小和装载比。关于这种示例性化学的详细讨论,参见下面的实施例。与涉及多个附接点的蛋白质-多糖晶格的形成相容的示例性多糖大小和装载比为至少30kDa(和上文讨论的示例性大小范围)和0.3至1.5的多糖/蛋白质比例(和上文讨论的示例性装载比范围)。不希望受特定理论的束缚,提供在多糖和载体蛋白之间具有多个附接点的缀合物可以有助于缀合物的长期稳定性,因为将需要多重裂解(例如,水解)事件来从载体蛋白释放多糖片段。这种对长期稳定性的贡献可能与具有磷酸二酯连接的MenA多糖特别相关,该磷酸二酯连接在以液体储存期间可能比糖苷键更不稳定。在一些实施方案中,组合物包含MenA多糖,其与载体蛋白具有多个附接点。在一些实施方案中,组合物包含MenC多糖,其与载体蛋白具有多个附接点。在一些实施方案中,组合物包含MenY多糖,其与载体蛋白具有多个附接点。在一些实施方案中,组合物包含MenW-135多糖,其与载体蛋白具有多个附接点。在一些实施方案中,组合物包含MenA、MenC、MenY和MenW-135多糖,其中每种与载体蛋白具有多个附接点。

[0202] 在一些实施方案中,本文所述的疫苗组合物是以处于注射器(例如预填充的和/或无硅氧烷的注射器)中的液体配制品提供。在一些实施方案中,对这种注射器进行商业包装用于销售和/或配送。

[0203] C. 生产缀合物和疫苗的示例性方法

[0204] 本文提供了用于生产和/或纯化荚膜多糖与载体蛋白的缀合物的方法。

[0205] 试剂(如活化剂)被认为在步骤(例如,活化步骤)中以给定量存在,如果它在相关步骤或反应期间的任何时间(例如,当反应开始时)以这样的量存在的话。

[0206] 在一些实施方案中,提供了生产多糖与载体蛋白的缀合物的方法。在一些实施方案中,多糖被脱O-乙酰化,例如通过碱水解。例如,可以使用氢氧化物如NaOH或KOH,例如浓度为50-150、60-140、70-130、80-120、90-110或95-100mM。在一些实施方案中,氢氧化物的浓度为50、60、70、80、90或100mM。在一些实施方案中,氢氧化物的浓度为100mM。脱O-乙酰化可以在足以使多糖脱O-乙酰化40%至70%或50%至60%的时间和温度下进行。在一些实施方案中,与起始量相比,脱O-乙酰化可以在足以使多糖脱O-乙酰化30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的时间和温度下进行。在某些实施方案中,在脱O-乙酰化后,该多糖的O-乙酰化程度为0.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖至1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖或0.8至1.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。在一些实施方案中,O-乙酰化程度为大于或等于0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。

[0207] 在一些实施方案中,0-乙酰化程度为少于或等于0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3或1.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。

[0208] 在一些实施方案中,多糖例如通过加热、酸处理、超声处理、微流化或其组合(如加热和酸)解聚。例如,可以将多糖加热至40°C-80°C(例如,45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C或75°C)和/或暴露于弱酸性pH,如5、5.5、6或6.5或更高。多糖可以解聚至以下重均分子量,

例如50kDa至200kDa,如50、75、100、125、150、175或200kDa。

[0209] 一些方法使用可形成氨基甲酸酯连接的活化剂,其例子是本领域已知的。可以形成氨基甲酸酯连接的活化剂可以是具有与两个良好离去基团附接的羰基的化合物,如N-连接的杂芳基,如咪唑、吡啶、嘧啶、嘌呤、三嗪、吡嗪、噻嗪、噻唑等。在一些实施方案中,活化剂是羰基二咪唑。该活化剂可以以相对于该多糖20倍至50倍,例如20倍至25倍、25倍至30倍、30倍至35倍、35倍至40倍、40倍至45倍、或45倍至50倍的摩尔过量存在。

[0210] 在一些实施方案中,接头如二酰肼接头与活化的多糖反应,例如相对于多糖重复单元的摩尔比为0.3至1.0,例如0.3至0.4、0.4至0.5、0.5至0.6、0.6至0.7、0.7至0.8、0.8至0.9或0.9至1.0。在一些实施方案中,二酰肼接头是己二酸二酰肼。在一些实施方案中,将多糖用接头衍生化,使得其每10-100个重复单元含有一个接头,例如每10-20、20-30、30-40、40-50、50-60、60-70、70-80、80-90或90-100个重复单位含有一个接头。在一些实施方案中,将多糖用接头衍生化,使得其每5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、,36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59 60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100个重复单位含有一个接头。

[0211] 在一些实施方案中,通过用氧化剂如高碘酸盐(例如偏高碘酸钠(也称为高碘酸钠))处理来活化多糖。在一些实施方案中,氧化剂与多糖反应形成醛。在一些实施方案中,醛在多糖的侧链上形成,例如,对于MenW-135和MenY多糖。在一些实施方案中,醛是通过裂解多糖主链形成,并且是在末端形成,例如,对于MenC多糖。可以使用2mM左右,例如1.5至3mM的氧化剂进行氧化处理。氧化处理可以在1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或230mM下进行。氧化处理可在足以产生至少20nmol/mg多糖的温度和时间下进行,例如20-30、20-40、20-50、20-60、20-70、20-80、20-90、20-100、20-150、20-160、20-170、20-180、20-190或20-200nmol/mg。氧化处理可在足以产生至少20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200nmol/mg多糖的温度和时间下进行。在一些实施方案中,氧化处理的pH范围为6.5至9.5,或pH为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0或9.5。在一些实施方案中,氧化处理在低于室温的液体溶液中进行,例如低于20°C、15°C、10°C或5°C。

[0212] 当通过还原胺化进行缀合时,席夫碱可以用合适的还原剂如氰基硼氢化物(例如NaCNBH₃)或硼烷如吡啶硼烷或甲基吡啶硼烷还原。

[0213] 在缀合后,在存在未反应的醛的情况下,可以通过还原或胺化该醛来稳定缀合物。硼氢化物如NABH₄是合适的还原剂。氨、甲胺、甘氨酸、丙氨酸等适合于胺化未反应的醛。

[0214] 在一些实施方案中,该缀合是经纯化的。一种涉及在硫酸铵存在下进行超滤的纯化方法描述于美国专利号6,146,902中。可替代地,可以通过许多标准技术从未反应的蛋白质和多糖中纯化缀合物,所述标准技术尤其包括尺寸排阻色谱、密度梯度离心、疏水相互作用色谱法、混合模式树脂色谱法或硫酸铵分馏法。参见,例如P.W.Anderson等人(1986) .J.Immunol.137:1181-1186。还参见H.J.Jennings和C.Lugowski(1981) J.Immunol.127: 1011-1018。

[0215] 在一些实施方案中,进行疏水相互作用色谱法(HIC)。可以使用如下树脂,如苯基、

己基、庚基、辛基、壬基或癸基树脂。可以将混合物装载到树脂上以纯化缀合物而与游离多糖分开。在一些实施方案中，混合物包含盐，如硫酸铵。在一些实施方案中，调节正装载的混合物的pH以使pH更接近中性。在一些实施方案中，将正装载的混合物的pH调节至5.5-8.5、6-8、6.5至7.5或7。盐可以以例如0.5M至1.5M的浓度存在，如0.5M至0.7M、0.7M至0.9M、0.9M至1.1M、1.1M至1.3M、或1.3M至1.5M。在装载之后，可以用盐溶液洗涤树脂，该盐溶液例如包含硫酸铵，其中盐浓度可以例如如前一句中所示。在一些实施方案中，树脂处于柱中，并且洗涤为至少两个、三个、四个、五个或六个柱体积，例如最多7、8、9或10个柱体积。在一些实施方案中，将树脂在多批盐溶液中洗涤，例如，两批或更多批，其中多批累积体积的体积为装载前混合物的体积的至少2、3、4、5、6或7倍。缀合物可以与树脂更强地相互作用，例如，在高离子强度下，并且可以洗掉游离多糖。在使用低离子强度洗脱液(如水，例如WFI)洗涤后，可以从树脂上洗脱缀合物。可替代地，可以使用低盐溶液，例如，盐浓度(例如，乙酸盐，如乙酸钠)为少于或等于0.2、0.1、0.05、0.02、0.01或0.005M。在一些实施方案中，洗脱液包含少于20%重量的游离多糖，例如包含少于10%重量的游离多糖、少于5%重量的游离多糖，或基本上不含游离多糖。

[0216] 在一些实施方案中，生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖与载体蛋白的缀合物的方法包括

[0217] a) 用可形成氨基甲酸酯连接的活化剂(例如羰基二咪唑)活化该多糖，其中该活化剂以相对于该多糖的20倍至50倍摩尔过量存在；

[0218] b) 泽灭该活化剂(例如，使用水)并用相对于多糖重复单元以0.3至1.0的摩尔比添加的二酰肼接头衍生化该活化的多糖，其中该多糖以每10-100个糖重复单元一个二酰肼接头的比例衍生化；

[0219] c) 通过碳二亚胺化学将该衍生化的多糖与该载体蛋白缀合，其中该多糖在该缀合反应开始时以相对于该载体蛋白3:1至5:1的重量比存在，从而形成该缀合物。

[0220] 在一些实施方案中，生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖与载体蛋白的缀合物的方法包括

[0221] a) 通过碱水解使该多糖部分脱O-乙酰化；

[0222] b) 通过高碘酸盐处理来活化该多糖，从而将二醇转化为醛至每mg多糖至少10、15、20、25、30、35、40或50nmol醛的程度；

[0223] c) 通过还原胺化将该活化的多糖与该载体蛋白缀合，其中该多糖以相对于该载体蛋白0.5-1至5:1的重量比存在于该缀合反应中，从而形成该缀合物。

[0224] 在一些实施方案中，生产脑膜炎奈瑟氏菌荚膜多糖与载体蛋白的缀合物的方法包括

[0225] a) 通过高碘酸盐处理来活化该多糖，从而将二醇转化为醛至每mg多糖至少25、30、35、40、45、50、55、60、65、70或75nmol醛的程度；并且

[0226] b) 通过还原胺化将该活化的多糖与该载体蛋白缀合，其中该多糖以相对于该载体蛋白1:1至5:1的重量比存在于该缀合反应中，从而形成该缀合物。

[0227] 在一些实施方案中，该纯化方法还包括通过疏水相互作用色谱法(HIC)纯化该缀合物。

[0228] A. 示例性疫苗配制品

[0229] 可以使用本领域公认的方法完成本发明的疫苗组合物的配制。本发明的疫苗组合物/配制品还可含有一种或多种佐剂。通过举例而非限制的方式,佐剂包括铝佐剂、弗氏佐剂、BAY、DC-chol、pcpp、单磷酰脂质A、CpG、QS-21、霍乱毒素和甲酰甲硫氨酰肽。参见,例如, Vaccine Design, the Subunit and Adjuvant Approach, 1995 (M.F. Powell 和 M.J. Newman 编, Plenum Press, N.Y.)。佐剂(如果存在)可以是铝佐剂,如氢氧化铝或磷酸铝。在一些实施方案中,疫苗组合物和配制品(例如MenACWY-TT疫苗)不包含佐剂。在一些实施方案中,疫苗组合物和配制品(例如MenACWY-TT疫苗)包含佐剂。

[0230] 本发明的疫苗组合物和配制品(例如,缀合疫苗/MenACWY-TT疫苗)可以作为单剂量或按系列(即,具有一次或多次“加强剂”)给予,或者作为早期给予的不同脑膜炎奈瑟氏菌疫苗(如脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖缀合疫苗)的加强剂给予。例如,儿童可以在生命早期接受单剂量,然后在长达10年后给予加强剂量,如目前推荐用于预防儿童疾病的其他疫苗一样。在一些实施方案中,本文所述的疫苗剂量是在先前给予脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖缀合物疫苗之后2个月至10年给予,如先前给予脑膜炎奈瑟氏菌荚膜糖缀合物疫苗之后2至4个月、4至6个月、6至12个月、1年至2年、2年至3年、3年至4年、4年至5年、5年至6年、6年至7年、7年至8年、8年至9年、或9年至10年。

[0231] 加强剂量将从初免B细胞生成抗体,即回忆应答。也就是说,疫苗组合物和配制品(例如MenACWY-TT疫苗)在年轻人群和老年人群中引起较高初次(即,单次给予疫苗后)功能性抗体应答,并且能够引起回忆应答(即在给予加强剂后),证明由本发明的疫苗组合物和配制品(例如MenACWY-TT疫苗)引起的保护性免疫应答是长生命周期的。

[0232] 在一些实施方案中,给药是肌内注射。在一些实施方案中,给药是皮下、皮内、腹膜内、肠胃外或静脉内。组合物和配制品可以与合适的载体、稀释剂或赋形剂混合,如乙酸钠缓冲盐水溶液、无菌水、生理盐水等。组合物/配制品也可以被冻干。组合物/配制品可含有辅助物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲液、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂等,这取决于给药途径和所希望的制剂。可以参考标准文本如“REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCE”,第17版,1985(通过引用并入本文)来制备合适的制剂而无需过多的实验。

[0233] 在一些实施方案中,疫苗组合物/配制品是液体配制品。在一些实施方案中,疫苗组合物/配制品(例如MenACWY-TT疫苗)是液体组合物,将其通过注射给予动物、儿童(特别是小孩)、老年人(例如超过55、60、65、70、75、80或90)。

[0234] 合适的载体和其他添加剂的选择将取决于确切的给药途径和特定制剂型的性质。

[0235] 在一个实施方案中,疫苗组合物和配制品(例如MenACYW-TT疫苗)包含药学上可接受的防腐剂、载体、缓冲液、赋形剂等。在一个实施方案中,药学上可接受的防腐剂、载体或赋形剂增加或延长组合物的保质期。在一些实施方案中,疫苗包含缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液是乙酸钠。在一些实施方案中,缓冲液是磷酸钠。在一些实施方案中,缓冲液以范围为10mM至100mM的浓度存在,例如,10mM至70mM、15mM至45mM、20mM至40mM、40mM至60mM、或60mM至100mM。在一些实施方案中,缓冲液的pH为4.5至7.5、4.5至7.0、4.5至6.5、4.5至6.0、4.5至5.5或4.5至5.0。在一些实施方案中,缓冲液的pH范围为5.5至7.0,例如,5.75至6.25或6.25至6.75。在一些实施方案中,缓冲液的pH为5.5至6.5。在一些实施方案中,缓冲液的pH为5或6。在一些实施方案中,疫苗组合物包含药学上可接受的盐。在一些实施方案中,疫苗组合物/配制品包含盐水。在一些实施方案中,盐水包含NaCl或是NaCl。NaCl可以以

0.45%至0.9%w/v的浓度存在,如0.5%至0.85%w/v,或0.6%至0.8%w/v,或0.6%、0.67%、0.75%、0.8%、0.85%或0.9%。

[0236] 在一个实施方案中,组合物的每种组分相对于脑膜炎奈瑟氏菌多糖-蛋白载体缀合物是化学惰性的。

[0237] 在一些实施方案中,将疫苗组合物和配制品(例如MenACWY-TT疫苗)配制成单一单位剂量。在一些实施方案中,单一单位剂量包含6 μ g至15 μ g的MenA、MenC、MenW-135和MenY多糖中的每一种。在一些实施方案中,单一单位剂量包含4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15 μ g的MenA、MenC、MenW-135和MenY多糖中的每一种。在一些实施方案中,载体蛋白在单一单位剂量中以50 μ g至80 μ g的量存在。在一些实施方案中,载体蛋白在单一单位剂量中以45、50、55、60、65、70、75或80 μ g的量存在。

[0238] 在一些实施方案中,将疫苗组合物和配制品(例如MenACWY-TT疫苗)配制在乙酸钠、乙酸钠缓冲盐水或类似缓冲液中的0.5mL剂量。在一些实施方案中,0.5mL剂量包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15 μ g的血清组A、C、Y和W-135中的每一种,其与50、55、60、65、70、80、85或90 μ g破伤风类毒素蛋白缀合。在一些实施方案中,肌内给予该0.5mL剂量。

[0239] B. 示例性方法和用途

[0240] 在一些实施方案中,涵盖了针对脑膜炎奈瑟氏菌给受试者接种疫苗的方法,其包括给予该疫苗组合物或配制品,例如本文所述的MenACWY-TT疫苗。在一些实施方案中,本发明包括本文所述的疫苗组合物或配制品用于针对脑膜炎奈瑟氏菌免疫受试者的用途。在一些实施方案中,涵盖了本文所述的疫苗组合物或配制品用于制备用以针对脑膜炎奈瑟氏菌免疫受试者的药剂的用途。

[0241] 在一些实施方案中,受试者在接种疫苗时为12个月或更大。在一些实施方案中,受试者在接种疫苗时为老年人。在一些实施方案中,老年人在接种疫苗时为50、55、60、65、70、75、80、85、90或100岁。

[0242] 在一些实施方案中,受试者在接种疫苗时年龄为6周至3岁。在一些实施方案中,受试者在接种疫苗时为4周、5周、6周、7周、8周、9周或10周。在一些实施方案中,受试者在接种疫苗时为2个月、4个月、6个月、12个月和/或15个月。在一些实施方案中,受试者基于年龄接种疫苗。在一些实施方案中,向受试者在6-8、10-12和14-16周时给予三剂本文所述的疫苗组合物或配制品(例如MenACWY-TT疫苗)。

[0243] 在一些实施方案中,受试者在一生当中接种不止一次。在一些实施方案中,受试者在第一剂后3年或更长时间接受加强剂量。在一些实施方案中,受试者在第一剂后4年或更长时间接受加强剂量。在一些实施方案中,受试者在其第一个生日之前接种最多三次,并且在其第一个生日左右或之后接种一次。在一些实施方案中,第一次疫苗接种是在2、3、4、5、6、7、8、9或10周龄时。在一些实施方案中,第一次或第二次疫苗接种是在3、4或5月龄时。在一些实施方案中,第一次、第二次或第三次疫苗接种是在5、6或7月龄时。在一些实施方案中,第一次、第二次、第三次或第四次疫苗接种是在11、12、13、14或15月龄时。在一些实施方案中,第一次、第二次、第三次或第四次疫苗接种是在14、15、16、17或18月龄时。在一些实施方案中,第一次疫苗接种是6、7、8或9个月时,并且在最多24个月给予第二次疫苗接种。在一些实施方案中,该受试者是作为老年人接种疫苗,无论他们先前是否接受过MenACWY-TT或其他针对脑膜炎奈瑟氏菌的疫苗。在一些实施方案中,当用本文所述的疫苗组合物或

配制品(例如MenACWY-TT疫苗)接种疫苗时,受试者年龄为50岁或更大、55岁或更大、60岁或更大、或65岁或更大。

[0244] 在一些实施方案中,本文所述的疫苗组合物或配制品(例如MenACWY-TT疫苗)与其他常规疫苗同时给予。在一些实施方案中,常规疫苗包括例如Pentacel[®](DTaP5-IPV/Hib)、Prevnar[®](PCV7)、Prevnar 13[®](PCV13)、RotaTeq[®](RV5)、ROTARIX[®](RV1)、ENGERIX-B[®](HepB)、RECOMBIVAX HB[®](HepB)、M-M-R[®](MMR)、M-M-R[®] II(MMR)和VARIVAX[®](V)疫苗。在一些实施方案中,常规疫苗包括例如Adacel[®](Tdap5)和Gardasil[®](HPV4)。在一些实施方案中,常规疫苗包括DTaP5-IPV/HibHepB。其他常规疫苗是本领域已知的,并且可以与本文所述的疫苗组合物或配制品(例如MenACWY-TT疫苗)同时、之前或之后提供给受试者。

[0245] IV. 实施例

[0246] 以下是本文所公开的方法、用途和组合物的实施例。应当理解,根据以上提供的一般描述和详细描述可以实施各种其他实施方案。给出以下实施例是出于说明本传授内容的目的,而不应解释为对本公开文本或权利要求的范围的限制。

[0247] 1. 组A缀合物的制备

[0248] 实施例1A

[0249] 将组A纯化的荚膜多糖溶解于二甲基亚砜(DMSO)中10%重量的四丁基氯化铵(TBAC)中至8mg/mL的目标浓度。将该溶液混合直至多糖在19°C-25°C下完全溶解。通过按每个N-乙酰甘露糖胺磷酸重复单元(PS RU)添加目标浓度为35-45摩尔过量的羰基二咪唑(CDI)来活化已溶解的多糖,并在19°C-25°C下混合50至70分钟(图1C,第一次反应;图1E所示产物)。用WFI(50% v/v)1:2稀释该多糖溶液,以便将50%DMSO中该活化的多糖的浓度调节至4mg/mL。通过添加己二酸二酰肼(ADH)(每1-3mol PS RU按1.0mol ADH)对该溶液进行衍生化(图1C,第二次反应;图1F所示的产物)并在室温下混合过夜。该反应得到一定量的衍生化,使得每10至100个多糖重复单元存在一个结合的ADH,例如每20、30、40、50或60个多糖重复单元一个结合的ADH。经10kDa MWCO PES膜超滤浓缩该活化的多糖,并且然后针对12-18体积的生理盐水交换进行渗滤。目标浓度为大约30mg/mL。将该活化的多糖过滤并在1°C-5°C下储存。

[0250] 将纯化的破伤风类毒素蛋白(TT)通过0.2微米膜过滤并在1°C-5°C下储存。将该衍生化的多糖和浓缩的破伤风蛋白以0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1的比例混合在一起。将一个等分试样的在1.0M MES缓冲液(pH 5.7)中的100mg/mL的交联剂1-乙基-3-(二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDAC)添加到该多糖-蛋白混合物中,使得EDAC的终浓度为10mg/mL且MES为100mM。添加盐水以得到16mg/mL多糖和4mg/mL TT的目标浓度。将最终pH调节至5.5-5.9,且在15.6°C-23.9°C下将该反应混合16-24小时。在此期间,该EDAC和TT反应形成O-酰基异脲中间体(图1B)。然后,该O-酰基异脲中间体和衍生化的多糖形成缀合物(图1G;图1H和图1A中所示的产物)。

[0251] 向缀合反应中添加硫酸铵,得到1M硫酸铵浓度。将pH调节至7并混合直至在室温下溶解。将该缀合反应混合物施加到填充有苯基树脂的HIC柱。用2至7个柱体积的1M硫酸铵溶液洗脱未缀合的多糖。用WFI洗脱该缀合物。在该实施例和随后的实施例中,该缀合物的HIC

纯化可以提供一种产物,在该产物中按质量计少于20%的多糖是游离(未缀合的)多糖。使用100kDa MWCO PES膜针对10体积的50mM乙酸钠(pH 6.0)交换对该缀合物洗脱液进行渗透。使用0.2微米膜对纯化的缀合物进行最终过滤,并将该缀合物储存在1°C-5°C。

[0252] 实施例1B

[0253] 将组A纯化的荚膜多糖溶解于氯化四丁基铵(TBAC)/二甲基亚砜(DMSO)(按重量计)中至6mg/mL的目标浓度。将该溶液在19°C-25°C下混合16至24小时。通过按每个N-乙酰甘露糖胺磷酸重复单元(PS RU)添加目标浓度为35-45摩尔过量的羰基二咪唑(CDI)来活化已溶解的多糖,并在19°C-25°C下混合50至70分钟(图1C,第一次反应;图1E所示产物)。使用WFI(45%-50% v/v)1:2稀释该多糖溶液,使得该活化的多糖的目标浓度为在50%DMSO中3mg/mL。

[0254] 将纯化的破伤风类毒素蛋白(TT)通过0.2微米膜过滤并在1°C-5°C下储存。添加破伤风蛋白至1mg/mL的终浓度。在此期间,活化的多糖和TT反应形成一种含有氨基甲酸酯连接的缀合物(图1D)。该反应室温下反应过夜。

[0255] 向缀合反应中添加硫酸铵,得到1M硫酸铵浓度。将pH调节至7并混合直至在室温下溶解。将该缀合反应混合物施加到填充有苯基树脂的HIC柱。用2至7个柱体积的1M硫酸铵溶液洗脱未缀合的多糖。用WFI洗脱该缀合物。在该实施例和随后的实施例中,该缀合物的HIC纯化可以提供一种产物,在该产物中按质量计少于20%的多糖是游离(未缀合的)多糖。使用100kDa MWCO PES膜针对10体积的50mM乙酸钠(pH 6.0)交换对该缀合物洗脱液进行渗透。使用0.2微米膜对纯化的缀合物进行最终过滤,并将该缀合物储存在1°C-5°C。

[0256] 2. 组C缀合物的制备

[0257] 实施例2A

[0258] 将组C纯化的荚膜多糖溶解于生理盐水中至10mg/mL的目标浓度。将该溶液混合直至溶解。将该多糖溶液的温度调节至37°C并添加氢氧化钠(NaOH)至100mM NaOH的目标终浓度。将该溶液混合并孵育20分钟,提供部分脱O-乙酰化,使得最终缀合物中的多糖的O-乙酰化水平为0.8至1.4μmol OAc/mg多糖和/或相对于起始材料O-乙酰化水平降低50%至60%。天然MenC多糖的每个单糖重复单元具有两个潜在的O-乙酰化位置,并且对于所有可能的O-乙酰化位点通常具有40%-45%的总O-乙酰化水平。相对于起始材料,O-乙酰基基团减少50%将得到少于25%的总O-乙酰化水平(所有可能的O-乙酰化位点)。

[0259] 将pH调节至6并将温度降至15°C。通过添加偏高碘酸钠活化溶解的多糖(图2B),使得目标浓度为2mM。将pH调节至6并将该溶液在15°C下混合。高碘酸盐在相邻二醇位置氧化和裂解,得到末端为醛的链。将该反应混合直至平均分子大小降至50,000至100,000道尔顿,如通过HPSEC测定的。还原活性(反映醛的量)为40至100nmol/mg多糖。通过以每克多糖0.5mL甘油的量添加甘油并混合最少5分钟来淬灭该反应。首先使用5kDa MWCO再生纤维素滤柱通过超滤浓缩多糖,并且然后针对8-12体积的50mM乙酸钠缓冲液(pH 6.0)交换进行渗透。将该物质进一步浓缩至50mg/mL的目标浓度。将该解聚/活化的多糖过滤并储存。

[0260] 将纯化的破伤风类毒素蛋白经10kDa MWCO PES膜浓缩至最多100mg/mL的目标终浓度,并且然后通过0.2微米过滤器。将已过滤的蛋白溶液在1°C-5°C下储存。将该解聚/活化的多糖和浓缩的破伤风蛋白以0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1(多糖:蛋白)的质量比混合在一起。将一个等分试样的在2.0M磷酸盐缓冲液中的100mg/mL的氰基硼氢化钠添加到多

糖-蛋白混合物中,使得氰基硼氢化钠为10mg/mL,并且磷酸盐缓冲液为200mM,pH 8.0。添加盐水以调节浓度,例如多糖调节至15-50mg/mL的目标。将该反应在37°C下混合(图2C)16-30小时。用6mM磷酸盐缓冲盐水(PBS)1:2稀释该反应。将一个等分试样的在6mM PBS中的100mg/mL硼氢化钠添加到反应混合物中,以获得每mL反应体积0.5mg硼氢化钠的目标。将该反应在室温下混合最少15分钟。硼氢化钠通过将未反应的醛还原成醇来封端未反应的醛,得到在位置7处具有伯羟基的末端未连接的糖,或者其中还原端被(2-羟基)乙氧基修饰。产物(末端糖类未显示)示于图2D和图2A。经50kDa MWCO PES膜针对10体积的6mM PBS交换对该缀合物溶液进行渗滤。将该溶液在1°C-5°C下储存。

[0261] 向缀合反应中添加硫酸铵,得到1M硫酸铵浓度。将pH调节至7并混合直至在室温下溶解。将该缀合反应混合物施加到填充有苯基树脂的HIC柱。用2至7个柱体积的1M硫酸铵溶液洗脱未缀合的多糖。用WFI洗脱该缀合物。在该实施例和随后的实施例中,该缀合物的HIC纯化可以提供一种产物,在该产物中按质量计少于20%的多糖是游离(未缀合的)多糖。使用100kDa MWCO PES膜针对10体积的50mM乙酸钠(pH 6.0)交换对该缀合物洗脱液进行渗滤。使用0.2微米膜对纯化的缀合物进行最终过滤,并将该缀合物储存在1°C-5°C。

[0262] 实施例2B

[0263] 将组C纯化的荚膜多糖溶解于生理盐水中至10mg/mL的目标浓度。将该溶液混合直至溶解。将pH调节至6.0并将温度改变为15°C。通过添加偏高碘酸钠活化溶解的多糖(图2B),使得目标浓度为2mM。将该反应混合直至平均分子大小为50,000至100,000道尔顿,如通过HPSEC测定的。通过以每克多糖0.5mL甘油的量添加甘油并混合最少5分钟来淬灭该反应。首先使用5kDa MWCO再生纤维素滤柱通过超滤浓缩多糖,并且然后针对8-12体积的50mM乙酸钠缓冲液(pH 6.0)交换进行渗滤。将该物质进一步浓缩至50mg/mL的目标浓度。将该解聚/活化的多糖过滤并在1°C-5°C下储存。

[0264] 将纯化的破伤风类毒素蛋白经10kDa MWCO PES膜浓缩至最多100mg/mL的目标终浓度,并且然后通过0.2微米过滤器。将已过滤的蛋白溶液在1°C-5°C下储存。将该解聚/活化的多糖和浓缩的破伤风蛋白以0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1(多糖:蛋白)的摩尔比混合在一起。将一个等分试样的在2.0M磷酸盐缓冲液中的100mg/mL的氰基硼氢化钠添加到多糖-蛋白混合物中,使得氰基硼氢化钠为10mg/mL,并且磷酸盐缓冲液为200mM,pH 8.0。添加盐水以调节浓度,例如多糖调节至15-50mg/mL的目标。将该反应在37°C下混合(图2C)16-30小时。用6mM磷酸盐缓冲盐水(PBS)1:2稀释该反应。将一个等分试样的在6mM PBS中的100mg/mL硼氢化钠添加到反应混合物中,以获得每mL反应体积0.5mg硼氢化钠的目标。将该反应在室温下混合最少15分钟。硼氢化钠通过将未反应的醛还原成醇来封端未反应的醛,得到在位置7处具有伯羟基的末端未连接的糖,或者其中还原端被(2-羟基)乙氧基修饰。产物(末端糖类未显示)示于图2D和图2A。经50kDa MWCO PES膜针对10体积的6mM PBS交换对该缀合物溶液进行渗滤。将该溶液在1°C-5°C下储存。

[0265] 向缀合反应中添加硫酸铵,得到1M硫酸铵浓度。将pH调节至7并混合直至在室温下溶解。将该缀合反应混合物施加到填充有苯基树脂的HIC柱。用2至7个柱体积的1M硫酸铵溶液洗脱未缀合的多糖。用WFI洗脱该缀合物。在该实施例和随后的实施例中,该缀合物的HIC纯化可以提供一种产物,在该产物中按质量计少于20%的多糖是游离(未缀合的)多糖。使用100kDa MWCO PES膜针对10体积的50mM乙酸钠(pH 6.0)交换对该缀合物洗脱液进行渗

滤。使用0.2微米膜对纯化的缀合物进行最终过滤，并将该缀合物储存在1°C - 5°C。

[0266] 3. 组W-135和组Y缀合物的制备

[0267] 将组W-135纯化的荚膜多糖溶解于乙酸钠缓冲液中至10mg/mL的目标浓度。将该溶液混合直至溶解。使用夹套式热交换器将多糖溶液加热至50°C - 70°C。将pH调节至4.5。使该反应(图4A, 步骤1)混合，直至平均分子大小为150,000道尔顿，如通过HPSEC测定的。将该反应混合物冷却至1°C - 5°C。添加偏高碘酸钠到多糖溶液中，使得偏高碘酸盐目标浓度为2mM(图4A, 步骤2)。将pH调节至6.0并将该溶液在0和5°C之间混合60分钟。高碘酸盐在相邻二醇位置氧化和裂解，得到醛，例如在唾液酸残基的位置7处，如图4A所示。还原活性(反映醛的量)为60至150nmol/mg多糖。通过每克多糖添加0.5mL甘油并混合最少5分钟来淬灭该反应。使用10kDa MWCO再生纤维素过滤器通过超滤浓缩多糖，并且然后针对10体积的50mM乙酸钠缓冲液(pH 6.0)交换进行渗滤。将该物质进一步浓缩至50mg/mL的目标浓度。将该解聚/活化的多糖过滤并在1°C - 5°C下储存。

[0268] 将纯化的破伤风类毒素蛋白经10kDa MWCO PES膜浓缩至最多100mg/mL的目标终浓度，并且然后通过0.2微米过滤器并在1°C - 5°C下储存。将该衍生/活化的多糖和浓缩的破伤风蛋白以0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1或5:1(多糖:蛋白)的质量比混合在一起。将一个等分试样的在2.0M磷酸盐缓冲液中的100mg/mL的氰基硼氢化钠添加到多糖-蛋白混合物中，使得氰基硼氢化钠为10mg/mL，并且磷酸盐缓冲液为200mM, pH 9.0。添加盐水以调节目标浓度，例如多糖调节至15-50mg/mL的目标。将该反应(图4B)在室温下混合过夜。

[0269] 用6mM磷酸盐缓冲盐水(PBS)1:2稀释该反应。将一个等分试样的在6mM PBS中的100mg/mL硼氢化钠添加到反应混合物中，以获得每mL反应体积0.5mg硼氢化钠的目标。将该反应在室温下混合最少15分钟。硼氢化钠通过将未反应的醛还原成醇来封端未反应的醛。产物显示在图4C和图3中。

[0270] 向缀合反应中添加硫酸铵，得到1M硫酸铵浓度。将pH调节至7并混合直至在室温下溶解。将该缀合反应混合物施加到填充有苯基树脂的HIC柱。用2至7个柱体积的1M硫酸铵溶液洗脱未缀合的多糖。用WFI洗脱该缀合物。使用100kDa MWCO PES膜针对10体积的50mM乙酸钠(pH 6.0)交换对该缀合物洗脱液进行渗滤。使用0.2微米膜对纯化的缀合物进行最终过滤，并将缀合物储存在1°C - 5°C。可对组Y纯化的荚膜多糖进行相同工艺。

[0271] 4. 四价疫苗的配制

[0272] 实施例4A

[0273] 如实施例1A、2A和3-4所述制备的4种单价PS-蛋白质缀合物来配制四价MenACYW-TT缀合物疫苗，并在乙酸钠缓冲盐水溶液中稀释至10μg PS/血清组/0.5mL的终浓度。换言之，0.5mL剂量的MenACYW缀合物疫苗含有10μg的脑膜炎球菌PS血清组A、C、Y和W-135中的每一种，其与总计45至80μg破伤风类毒素蛋白缀合(破伤风类毒素蛋白的实际数量取决于配制品中所使用的各批单价混合浓缩物的特定PS与蛋白比)。

[0274] 每0.5mL剂量的MenACYW缀合物疫苗是在30mM乙酸钠缓冲的盐水溶液(pH 6.0)中配制。

[0275] 实施例4B

[0276] 如实施例1A、2B和3-4所述制备的4种单价PS-蛋白质缀合物来配制四价MenACYW-TT缀合物疫苗，并在乙酸钠缓冲盐水溶液中稀释至10μg PS/血清组/0.5mL的终浓度。换言

之,0.5mL剂量的MenACYW缀合物疫苗含有10 μg 的脑膜炎球菌PS血清组A、C、Y和W-135中的每一种,其与总计45至80 μg 破伤风类毒素蛋白缀合(破伤风类毒素蛋白的实际数量取决于配制品中所使用的各批单价混合浓缩物的特定PS与蛋白比)。

[0277] 每0.5mL剂量的MenACYW缀合物疫苗是在30mM乙酸钠缓冲的盐水溶液(pH 6.0)中配制。

[0278] 实施例4C

[0279] 如实施例1B、2B和3-4所述制备的4种单价PS-蛋白质缀合物来配制四价MenACYW-TT缀合物疫苗,并在乙酸钠缓冲盐水溶液中稀释至10 μg PS/血清组/0.5mL的终浓度。换言之,0.5mL剂量的MenACYW缀合物疫苗含有10 μg 的脑膜炎球菌PS血清组A、C、Y和W-135中的每一种,其与总计45至80 μg 破伤风类毒素蛋白缀合(破伤风类毒素蛋白的实际数量取决于配制品中所使用的各批单价混合浓缩物的特定PS与蛋白比)。

[0280] 每0.5mL剂量的MenACYW缀合物疫苗是在30mM乙酸钠缓冲的盐水溶液(pH 6.0)中配制。

[0281] 5.示例性缀合物的性质和免疫原性

[0282] 在不具有ADH接头的情况下,MenA缀合物通常如上所述进行制备,除了在与破伤风类毒素的缀合反应中使用的多糖浓度为12mg/ml之外。缀合物具有0.3多糖/蛋白(PS/PR)质量比。测定0-乙酰化水平为3.0 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。

[0283] 在具有ADH接头的情况下,MenA缀合物通常如上所述进行制备,除了在与破伤风类毒素的缀合反应中使用的多糖浓度为12mg/ml之外。缀合物具有1.0PS/PR质量比。测定0-乙酰化水平为2.8 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。制备了若干其他批次的具有ADH接头的MenA缀合物,其中与破伤风类毒素的缀合反应中使用的多糖浓度为12mg/ml或16mg/ml。这些批次的PS/PR质量比的测量值为1.0、1.1、1.2和1.3,并且以 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖计的0-乙酰化水平的测量值为2.5、2.8、2.9和3.0。一些值观察到过不止一次。

[0284] 相对于处理前样品和/或未免疫对照,当以四价配制品给予未接种MenA疫苗的人、小鼠和/或豚鼠受试者时,证实每批MenA缀合物具有免疫原性(即,如通过血清杀菌测定和/或ELISA测量的,在至少实质性且具有统计学显著性的比例的受者中引起抗MenA抗体)。

[0285] 通常如上所述制备MenC缀合物。缀合物具有0.6多糖/蛋白(PS/PR)质量比。测定0-乙酰化水平为2.4 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。制备了若干其他批次的MenC缀合物。这些批次的PS/PR质量比的测量值为0.4、0.6和0.7,并且以 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖计的0-乙酰化水平的测量值为0.8、1.2、1.3、1.4、1.5、2.2和2.3。一些值观察到过不止一次。

[0286] 相对于处理前样品和/或未免疫对照,当以四价配制品给予未接种MenC疫苗的人、小鼠和/或豚鼠受试者时,证实每批MenC缀合物具有免疫原性(即,如通过血清杀菌测定和/或ELISA测量的在至少实质性且具有统计学显著性的比例的受者中引起抗MenC抗体)。

[0287] 通常如上所述制备MenW-135缀合物。缀合物具有0.9多糖/蛋白(PS/PR)质量比。测定0-乙酰化水平为1.6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。制备了若干其他批次的MenW-135缀合物。这些批次的PS/PR质量比的测量值为0.6、0.7、0.8、0.9和1.2,并且以 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖计的0-乙酰化水平的测量值为0.7、0.8和1.3。一些值观察到过不止一次。

[0288] 相对于处理前样品和/或未免疫对照,当以四价配制品给予未接种MenW-135疫苗的人、小鼠和/或豚鼠受试者时,证实每批MenW-135缀合物具有免疫原性(即,如通过血清杀

菌测定和/或ELISA测量的在至少实质性且具有统计学显著性的比例的受者中引起抗MenW-135抗体)。

[0289] 通常如上所述制备MenY缀合物。缀合物具有1.0多糖/蛋白(PS/PR)质量比。测定0-乙酰化水平为 $1.3\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖。制备了若干其他批次的MenY缀合物。这些批次的PS/PR质量比的测量值为0.6、0.7、0.8和0.9，并且以 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 多糖计的0-乙酰化水平的测量值为0.8、0.9、1.0、1.1和1.3。一些值观察到过不止一次。

[0290] 相对于处理前样品和/或未免疫对照，当以四价配制品给予未接种MenY疫苗的人、小鼠和/或豚鼠受试者时，证实每批MenY缀合物具有免疫原性(即，如通过血清杀菌测定和/或ELISA测量的在至少实质性且具有统计学显著性的比例的受者中引起抗MenY抗体)。

[0291] 上述所有缀合物批次均为重均分子量在300至1500kDa范围内的缀合物分子的群体。

[0292] 6. 临床试验

[0293] 在临床研究中使用了如本文所述的四价MenACYW-TT缀合物以评价不同疫苗接种时间表在婴幼儿(6周龄及以上)和56岁及以上成年人中的安全性和免疫原性。

[0294] a) I/II期临床试验1-向未接种脑膜炎球菌疫苗的幼儿给予的各MenACYW-TT样配制品的安全性和免疫原性(12个月+/-21天)

[0295] 该I/II期研究评价了肌内给予12个月+/-21天大的幼儿(第1-5组)的单剂量的与MenACYW-TT相关的各四价脑膜炎球菌多糖-破伤风类毒素缀合物配制品的安全性和免疫原性。将NeisVac-C®(完全脱0-乙酰化的脑膜炎球菌组C多糖-破伤风类毒素缀合物，本文称为“MenC-TT”，一种已获许可的单价脑膜炎球菌缀合物疫苗)给予对照组(第6组)。

[0296] 配制品1A含有 $4\mu\text{g}$ 多糖(四种多糖(即MenACYW)中每一种)且每 0.5mL 剂量含有 $22.1\mu\text{g}$ TT。所有都具有天然0-乙酰化水平并且基本上如上所述通过高碘酸盐活化和还原胺化(MenCYW)或使用簇基二咪唑和己二酸二酰肼(MenA)来缀合。

[0297] 配制品1B含有 $10\mu\text{g}$ 的MenA和MenW多糖中的每一种以及 $4\mu\text{g}$ 的MenC和MenY多糖中的每一种且每 0.5mL 剂量含有 $36.6\mu\text{g}$ TT。其他方面与配制品1A相同。

[0298] 配制品1C含有 $10\mu\text{g}$ 的四种多糖中的每一种且每 0.5mL 剂量含有 $54.8\mu\text{g}$ TT。其他方面与配制品1A相同。

[0299] 配制品2A含有 $4\mu\text{g}$ 多糖(四种多糖中的每一种)且每 0.5mL 剂量含有 $33.9\mu\text{g}$ TT。MenC、Y和W多糖通过碱处理部分脱0-乙酰化，并且基本上如上所述通过高碘酸盐活化和还原胺化来缀合。MenA多糖具有天然0-乙酰化水平，并使用基本上如US 2005/0002957实施例5中所述的缀合化学制备为新糖缀合物。

[0300] 配制品2B含有 $10\mu\text{g}$ 的四种多糖中的每一种且每 0.5mL 剂量含有 $84.8\mu\text{g}$ TT。其他方面与配制品2A相同。

[0301] 所有上述配制品均含有 0.67% NaCl并用pH 6的磷酸钠缓冲。

[0302] 表1中总结并表征了六个研究组。

表1: I/II期临床试验1的研究组			
组	n	治疗	符合方案分析群体
[0303]	1	63 配制品1A	54
	2	61 配制品1B	51
	3	61 配制品1C	51
	4	60 配制品2A	48
	5	61 配制品2B	51
	6	62 MenC-TT	51

[0304] 在各治疗组中,男女比例不同,第2组的极值为39.3%至60.7%,并且第5组为62.3%至37.7%。所有组的年龄范围为11.0至12.0个月;各个组的平均值为11.5至11.7个月。

[0305] 在疫苗给药后30-37天收集作为非征集性不良事件(AE)的安全性数据。征集性AE的间隔是在D0和D7之间(即给药后0至7天)。征集性反应原性的集合包括注射部位压痛、发红和肿胀,以及发热、呕吐、食欲不振、异常啼哭、嗜睡和易激惹。

[0306] 所有接种疫苗的受试者均完成了该研究,但56名接种疫苗的受试者(所有组)因方案偏离被排除在分析之外,其中最常见的原因是未能在规定的时间窗口内提供第30-37天的血样。

[0307] 两名受试者经历了即刻非征集性AE,其中一名被认为与接种疫苗有关(第1组中一名受试者发生皮疹)。

[0308] 第0天和第7天之间的征集性注射部位反应:所有组中大多数受试者经历了征集性反应。总体而言,各组之间的征集性反应率相当。第1-5组中报告一例注射部位反应的接受者的百分比与对接受对照疫苗的受试者(第6组)看到的情况相似。

[0309] 注射部位反应率与每种疫苗配制品中含有的破伤风类毒素的量之间没有明显的相关性。

[0310] 最常见的注射部位反应是压痛,比率的范围从第1组的25.4%到第5组的39.3%;下一个红斑,范围从第2组的29.5%到第5组的39.3%;并且最不常见的反应是肿胀,范围从第4组的13.6%到第3组的23.0%。大多数征集性注射部位反应的强度为1级,在接种3天内开始并好转,并且不需要任何干预。就强度、发作时间、持续时间或已采取行动而言未见群组趋势。

[0311] 在第0天和第7天之间的征集性全身反应:与注射部位反应一样,发热、呕吐、异常啼哭、嗜睡、食欲不振和易激惹等全身反应的总体发生率在第1-5组之间相当,且与对照疫苗看到的结果相似。所有组中最常见的全身反应是易激惹,范围从第4组的54.2%到第2组和第5组的70.5%。下一个最常见的(除了第2组的所有)是异常啼哭,范围从第2组的34.4%

到第6组的48.4%，随后是食欲不振(这是第2组中第二常见的反应)，范围从第6组的27.9%到第6组的46.8%。呕吐率范围从第4组的18.6%到第6组的32.3%；并且发热是报告最少的反应，范围从第1组的11.1%到第6组的25.8%。大多数征集性全身反应的强度为1级，在接种3天内开始并好转，并且不需要任何干预。就强度、发作时间、持续时间或已采取行动而言未见群组趋势。

[0312] 在第0天和第30天之间的非征集性不良事件：327名受试者共报告了931例非征集性AE。共有107例非征集性AE被认为与疫苗接种有关，并被鉴定为不良反应(AR)。SOC中最常见的AR是1)全身性疾病及给药部位各种反应(25例)；2)感染和侵染以及皮肤和皮下组织疾病(各20例)；和3)胃肠失调和呼吸系统、胸及纵隔疾病(各16例)。AR的数量与接受的疫苗之间没有明显的相关性。共报告了4例3级强度的全身性AR：第1组和第4组各1例，以及第5组2例。

[0313] 严重AE：没有发生死亡。研究期间，在7名受试者中总共发生7例SAE：第1组受试者中2例，第2组受试者中1例，第3组受试者中2例，以及第4组受试者中2例。第5组和第6组没有报告SAE。这些SAE中的一例，即第3组中的一名受试者经历的反应性关节炎，被认为与疫苗接种有关。该受试者在23天后完全康复。

[0314] 关于安全性的结论是单剂量在所有组中都有良好耐受性，并且在安全性概况方面没有显著差异。

[0315] 通过使用人类补体(SBA-HC)和幼兔补体(SBA-BR)进行血清杀菌测定来测量脑膜炎球菌血清组A、C、Y和W-135的功能性抗体以确定1)SBA-HC效价 $\geq 1:8$ 和 $\geq 1:4$ ，或SBA-BR效价 $\geq 1:8$ 的受试者的比例；2)几何平均效价(GMT)；3)反向累积分布曲线(RCDC)；以及4)效价的分布。另外，通过ELISA评估疫苗中存在的破伤风类毒素的抗体效价。对接种前(表2和表3中的“之前”)和疫苗接种后(表2和表3中的“之后”)第30-37天采集的血样进行测定。

[0316] 表2和表3显示了SBA-HC结果。在表2和表3中，95%置信区间是百分比。

表2：基线和疫苗接种后效价 $\geq 1:8$ 的受试者的数量和百分比，SBA-HC测定（符合方案群体）

血清组	时间点	第1组 (N = 54)	第2组 (N = 51)	第3组 (N = 51)	第4组 (N = 48)	第5组 (N = 51)	第6组 (N = 51)
		N/M; %	N/M; %	N/M; %	N/M; %	N/M; %	N/M; %
		95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI	95% CI
[0317] A	之前	19/54; 35.2 (22.7; 49.4)	11/51; 21.6 (11.3; 35.3)	15/50; 30.0 (17.9; 44.6)	9/48; 18.8 (8.9; 32.6)	16/51; 31.4 (19.1; 45.9)	13/51; 25.5 (14.3; 39.6)
	之后	47/54; 87.0 (75.1; 94.6)	50/50; 100.0 (92.9; 100.0)	45/51; 88.2 (76.1; 95.6)	36/48; 75.0 (60.4; 86.4)	47/51; 92.2 (81.1; 97.8)	23/50; 46.0 (31.8; 60.7)
C	之前	0/54; 0.0 (0.0; 6.6)	0/51; 0.0 (0.0; 7.0)	0/51; 0.0 (0.0; 7.0)	1/48; 2.1 (0.1; 11.1)	0/51; 0.0 (0.0; 7.0)	0/51; 0.0 (0.0; 7.0)
	之后	49/54; 90.7 (79.7; 96.9)	44/51; 86.3 (73.7; 94.3)	43/51; 84.3 (71.4; 93.0)	45/48; 93.8 (82.8; 98.7)	49/51; 96.1 (86.5; 99.5)	51/51; 100.0 (93.0; 100.0)
Y	之前	1/54; 1.9 (0.0; 9.9)	2/51; 3.9 (0.5; 13.5)	1/51; 2.0 (0.0; 10.4)	0/48; 0.0 (0.0; 7.4)	0/51; 0.0 (0.0; 7.0)	3/51; 5.9 (1.2; 16.2)

[0318] W-135	之后	36/54; 66.7 (52.5; 78.9)	40/51; 78.4 (64.7; 88.7)	40/51; 78.4 (64.7; 88.7)	44/48; 91.7 (80.0; 97.7)	42/51; 82.4 (69.1; 91.6)	4/51; 7.8 (2.2; 18.9)
	之前	0/54; 0.0 (0.0; 6.6)	0/51; 0.0 (0.0; 7.0)	0/51; 0.0 (0.0; 7.0)	0/48; 0.0 (0.0; 7.4)	0/51; 0.0 (0.0; 7.0)	0/51; 0.0 (0.0; 7.0)
	之后	35/54; 64.8 (50.6; 77.3)	35/50; 70.0 (55.4; 82.1)	33/51; 64.7 (50.1; 77.6)	30/48; 62.5 (47.4; 76.0)	36/51; 70.6 (56.2; 82.5)	1/50; 2.0 (0.1; 10.6)

表3：基线和疫苗接种后的几何平均效价 (GMT)，SBA-HC测定 (符合方案群体)							
抗原	时间点	第1组 (N = 54)	第2组 (N = 51)	第3组 (N = 51)	第4组 (N = 48)	第5组 (N = 51)	第6组 (N = 51)
		GMT (95% CI)	GMT (95% CI)	GMT (95% CI)	GMT (95% CI)	GMT (95% CI)	GMT (95% CI)
A	之前	4.79 (3.75; 6.11)	3.84 (3.12; 4.73)	4.17 (3.35; 5.19)	3.83 (3.07; 4.78)	4.77 (3.59; 6.35)	3.84 (3.11; 4.74)
	之后	21.22 (14.85; 30.33)	41.64 (30.30; 57.24)	29.10 (20.18; 41.95)	14.89 (10.54; 21.03)	29.10 (21.30; 39.75)	6.87 (5.10; 9.26)
[0319] C	之前	2.00 (2.00; 2.00)	2.03 (1.97; 2.08)	2.03 (1.97; 2.08)	2.06 (1.94; 2.18)	2.00 (2.00; 2.00)	2.08 (1.99; 2.18)
	之后	60.80 (37.71; 98.01)	46.19 (29.29; 72.82)	73.32 (42.18; 127.43)	131.75 (80.90; 214.56)	252.54 (170.84; 373.32)	471.91 (373.90; 595.60)
Y	之前	2.08 (1.96; 2.20)	2.14 (1.94; 2.36)	2.20 (1.86; 2.60)	2.00 (2.00; 2.00)	2.00 (2.00; 2.00)	2.32 (1.96; 2.76)
	之后	13.89 (9.19; 21.00)	17.36 (11.50; 26.21)	23.73 (14.86; 37.90)	26.52 (18.61; 37.79)	26.46 (17.29; 40.49)	2.42 (2.09; 2.80)
W-135	之前	2.03 (1.97; 2.08)	2.00 (2.00; 2.00)	2.03 (1.97; 2.08)	2.03 (1.97; 2.09)	2.03 (1.97; 2.08)	2.00 (2.00; 2.00)
	之后	10.21 (7.32; 14.25)	13.00 (8.59; 19.66)	16.00 (9.74; 26.28)	10.53 (7.10; 15.60)	15.57 (10.56; 22.95)	2.17 (2.01; 2.34)

[0320] 从表中可以看出,所有血清组的接种前效价都很低。对于血清组A,所有组中大多数受试者的效价为8或更低;对于其他三个血清组,几乎所有受试者的值都<4。在疫苗接种后在第1-5组中,对于血清组A,大多数效价值在8和128之间;对于血清组C,在16和1024之间;对于血清组Y,在<4和128之间;并且对于血清组W-135,在<4和64之间。对于对照组,血清组A、Y和W-135的值大多在<4和4之间,而对于血清组C,大多值在256和1024之间。与低剂量组相比,高剂量组趋向于更高的抗体应答。

[0321] 在SBA-BR测定中,给药前各治疗组的GMT相当,血清组A的范围为4.22至5.26;血清组C为4.00至6.26;血清组W-135为6.01至8.45。在血清组Y中看到更高的变异性,其值范围为17.36(第5组)至35.92(第1组)。

[0322] 在第1-5组中,血清组A疫苗接种后的值范围为336.91(第1组)至759.35(第5组);对照组的值为5.66。血清组C的值范围为145.53(第1组)至636.37(第5组)。对照组的值为1290.16。血清组Y的值范围为586.54(第3组)至713.70(第4组)。对照组的值为23.41。血清

组W-135的值范围为912.28(第4组)至1518.71(第5组)。对照组的值为8.57。

[0323] b) II期临床试验1-MenACYW-TT在婴幼儿中的安全性和免疫原性

[0324] 在美国在580名儿童中进行了一项II期随机、开放标签、多中心临床试验。该试验旨在研究以不同时间表给予和与儿科常规疫苗接种同时给予时MenACYW-TT疫苗的安全性和免疫原性概况。该研究还旨在描述MenACYW-TT疫苗和与MenACYW-TT疫苗同时给予的选定的已获许可儿科疫苗(Pentacel®(DTaP-IPV/Hib)、Prevnar®(PCV7)或Prevnar®13(PCV13)、M-M-R®II(MMR)Varivax®(V)、ENGERIX-B®或RECOMBIVAX HB®(HepB)、Rotarix®(RV1)以及Rotateq®(RV5)的免疫原性概况。

[0325] 参与者接受MenACYW-TT疫苗同时伴随常规疫苗(研究组;表1中的第1-5组)或单独接受儿科常规疫苗(对照组;第6-7组)。

[0326] 将2个月大的婴儿随机分配到3个研究组(第1-3组)和2个对照组(第6和7组)中,如表1所示。如表4中所述,研究组第1-3组中的婴儿接受3剂或4剂MenACYW-TT疫苗(与常规疫苗同时)。

[0327] 表4提供了该临床试验设计的总结。

[0328]

表4: 该临床试验的研究设计和接受的疫苗

试验时间表 (年龄)					
组	2个月	4个月	6个月	12个月	15个月
1	MenACYW	MenACYW-	MenACYW-	MenACYW-	

	-TT, DTaP-IPV/ Hib, PCV7 或 PCV13 , RV1 或 RV5 , HepB ¹	TT, DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13, RV1 或 RV5	TT, DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13 , RV5 ² , HepB	TT, MMR, V, PCV7 或 PCV13	
2	MenACYW -TT, DTaP-IPV/ Hib, PCV7 或 PCV13 , RV1 或 RV5 , HepB ¹	MenACYW- TT, DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13, RV1 或 RV5	MenACYW- TT, DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13 , RV5 ² , HepB	MMR, V, PCV7 或 PCV13	MenACY W-TT , DTaP-IPV/ Hib
[0329]	3	MenACYW -TT, DTaP-IPV/ Hib, PCV7 或 PCV13 , RV1 或 RV5 , HepB ¹	MenACYW- TT, DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13 , RV5 ² , HepB	DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13 , RV5 ² , HepB	MenACYW- TT, MMR, V, PCV7 或 PCV13
	4		MenACYW- TT, DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13 , RV5 ² , HepB	MenACYW- TT, MMR, V, PCV7 或 PCV13	
	5			MenACYW- TT, MMR, V,	

				PCV7 或 PCV13	
[0330]	6	DTaP-IPV/ Hib, PCV7 或 PCV13 , RV1 或 RV5 , HepB ¹	DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13, RV1 或 RV5	DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13 , RV5 ² , HepB	MMR, V, PCV7 或 PCV13
	7	DTaP-IPV/ Hib, PCV7 或 PCV13 , RV1 或 RV5 , HepB ¹	DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13, RV1 或 RV5	DTaP-IPV/H ib, PCV7 或 PCV13 , RV5 ² , HepB	MMR, V, PCV7 或 PCV13 DTaP-IPV/ Hib

¹先前仅给予了一剂; ²先前用RV5进行了疫苗接种

[0331] 还招募了在6月龄和12月龄时接受了2剂MenACYW-TT疫苗(与常规疫苗同时)的6个月大的婴儿(第4组)以及在12月龄时接受了1剂MenACYW-TT疫苗(与常规疫苗同时)的12个月大的婴儿(第5组)。

[0332] 使用以人类(hSBA)和幼兔(rSBA)补体进行的血清杀菌测定来测量在基线和最后一次婴幼儿剂量后30天针对脑膜炎球菌血清组A、C、Y和W的抗体。两种测定的定量下限(LLQ)为1:4。参见例如Maslanka等人, Standardization and a Multilaboratory Comparison of Neisseria meningitidis Serogroup A and C Serum Bactericidal Assays, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1997年3月, 第156-167页以及GoldschneiderGotschlich和Artenstein, Immunity to Meningococcus, The Role of Humoral Antibodies, the Journal of Experimental Medicine, 1969。

[0333] 在最后一剂疫苗后收集长达6个月的安全性数据。征集性不良事件(AE)的间隔是在D0和D7之间(即给药后0至7天)。征集性反应原性的集合包括每日测量体温及注射部位发红和肿胀,以及记录注射部位疼痛、头痛、肌痛和不适的强度。还收集了整个研究过程中非征集性AE和严重不良事件(SAE)。所有统计分析均为描述性的。

[0334] 针对安全性分析集分析人口统计学特征,其被定义为接受至少一剂研究疫苗或对照疫苗并且可获得安全性数据的受试者。第1组、第2组、第3组、第6组和第7组的研究纳入平均年龄分别为2.19个月、2.20个月、2.24个月、2.18个月和2.20个月。第1组年龄范围为1.57个月至2.97个月,第2组为1.57个月至2.90个月,第3组为1.53个月至3.00个月,第6组为1.53个月至2.87个月,并且第7组为1.70个月至2.97个月(纳入标准2个月[42天至89天])。在第4组中,平均年龄为6.23个月,并且年龄范围为5.63个月至6.50个月(纳入标准6个月[180天±14天])。在第5组中,平均年龄为12.4个月,并且年龄范围为12.2个月至12.7个月

(纳入标准12个月[365天+14天])。

[0335] 在完成婴儿系列并在生命的第二年中接受附加的MenACYW-TT疫苗剂量(第1-4组)后,无论在生命的第一年中接受的剂量数如何,对于包括在MenACYW-TT疫苗中的所有4个血清组(ACYW),大多数研究参与者实现1:8的保护效价(对于人类补体[hSBA]为91%-100%,并且对于幼兔补体[rSBA]为80%-100%)。对于在12月龄时接受单剂量的参与者(第5组),1:8的ACYW保护效价是在47.5%-90%(hSBA)和62%-100%(rSBA)之间。因此,无论在生命的第一年中接受的初次时间表如何,在生命的第二年中附加给药后,MenACYW-TT缀合物疫苗证明稳健的免疫原性应答。

[0336] 图6提供了在第1-4组中对于血清型A、C、Y和W中每一种hSBA水平大于或等于1:8的受试者的百分比。图7提供了这些相同组的类似rSBA结果。

[0337] 在12月龄(第5组)给予单剂量MenACYW-TT疫苗后,血清组C(90%)的hSBA的免疫应答与3剂量系列(第3组)中看到的应答相似,但血清组Y(47.5%)、A(75%)和W-135(54%)较低。参见表5,其显示了在12月龄时接受单次MenACYW-TT疫苗剂量的受试者(第5组)的hSBA和rSBA效价。

表5. 在MenACYW-TT疫苗后D30实现hSBA和rSBA效价≥ 1 : 8的受试者的百分比 (在生命的第二年仅接受一剂的受试者)

血清组	实现血清杀菌测定效价≥ 1 : 8的受试者的百分比	
	人类补体 (hSBA) % (95% CI)	幼兔补体 (rSBA) % (95% CI)
A	74.6 (61.6; 85.0)	62.1 (48.4; 74.5)
C	90.2 (79.8; 96.3)	91.4 (81.0; 97.1)
Y	47.5 (34.6; 60.7)	94.8 (85.6; 98.9)
W	54.2 (40.8; 67.3)	100.0 (93.8; 100.0)

[0338]

D: 天; CI: 置信区间

[0339] 没有证据表明同时给予MenACYW-TT疫苗会干扰儿科常规疫苗(数据未显示)。

[0340] 征集性注射部位反应的频率并未随着疫苗重复剂量而增加。参见图8,其呈现了在给予MenACYW-TT疫苗的7天内报告一次或多次征集性注射部位反应的参与者的累积百分比。在给予MenACYW-TT疫苗后7天内报告≥1次征集性注射部位反应的参与者的累积百分比在接受4剂的组中最高(第1组和第2组,80.0%-80.8%),随后是接受2剂的组(第4组,75.3%)或接受3剂(第2组,74.0%)的组,并且在接受1剂的组中是最低的(第5组,57.4%)。

[0341] 图9显示了在给予MenACYW-TT疫苗加常规疫苗或单独的常规疫苗的7天内的征集性全身反应。

[0342] 在接种MenACYW-TT疫苗或常规疫苗后报告了大多数非严重不良事件(NSAE),并且报告的3级NSAE中的每一例均与研究疫苗无关。没有与疫苗相关的严重不良事件。

[0343] 与给予常规疫苗而未给予MenACYW-TT疫苗的对照组相比,同时给予MenACYW-TT疫苗和常规疫苗时(即在同一天,作为单独的疫苗),二者均具有免疫原性,这指示MenACYW-TT

疫苗与常规疫苗之间没有负相互作用。

[0345] 总之,无论免疫接种时间表和给予的剂量数如何, MenACYW-TT 疫苗在婴幼儿中都有安全性和良好的耐受性。无论免疫接种时间表和给予的剂量数如何, MenACYW-TT 疫苗的安全性概况总体上与对照组的情况相似。

[0346] 因此,研究MenACYW-TT疫苗有良好的耐受性和免疫原性。包括在生命的第一年和第二年中一次或多次给药的所有疫苗接种时间表均诱导了针对所有4种脑膜炎奈瑟氏菌血清组A、C、Y和W的稳健免疫应答,并伴有可接受的安全性概况。

[0347] c) II期临床试验2-向56岁及以上成年人给予的MenACYW-TT的安全性和免疫原性

[0348] 年龄和潜在的慢性疾病是脑膜炎球菌病的重要危险因素,因此老年人的风险增加。在56岁及以上的成年人中进行了一项临床研究以评价与已获许可的四价脑膜炎球菌普通多糖疫苗 (MPSV4) **Menomune®-A/C/Y/W-135** 相比, MenACYW-TT 疫苗的安全性和免疫原性。

[0349] 在美国,在301名年龄大于或等于56岁的健康成年人进行了一项随机、开放标签、多中心II期研究。12个研究中心的参与者被随机分配为接受一剂MenACYW-TT或MPSV4

(**Menomune® - A/C/Y/W-135**)。根据年龄将患者分为2个子集:1) 56至64岁和2) 大于或等于65岁。

[0350] 形成如下四个研究组。第1a组 (n=101, 年龄56-64岁) 和第1b组 (n=100, ≥65岁) 接受MenACYW-TT。第2a组 (n=50, 年龄56-64岁) 和第2b组 (n=50, ≥65岁) 接受MPSV4疫苗。“第1组”将指第1a组和第1b组。“第2组”将指第2a组和第2b组。上述人口统计学结果归纳于表6中。

表6: 该临床试验的研究设计和接受的疫苗

研究组 (研究参与者人数)	接受的疫苗 (研究参与者的年龄范围)	
	MenACYW-TT	(56-64岁)
第1a组 (N = 101)	MenACYW-TT	(≥ 65岁)
第1b组 (N = 100)	MPSV4	(56-64岁)
第2a组 (N = 50)	MPSV4	(≥ 65岁)
第2b组 (N = 50)		

[0352] 如上所述,使用以人类补体 (hSBA) 和幼兔补体 (rSBA) 进行的血清杀菌测定 (SBA) 来测量在基线和给予疫苗后30天针对脑膜炎球菌血清组A、C、Y和W的抗体。两种测定的定量下限 (LLOQ) 为1:4。

[0353] 在给药后收集长达30天的安全性数据。征集性AE的间隔是在D0和D7之间(即给药后0至7天)。征集性反应原性的集合包括每日测量体温及注射部位发红和肿胀,以及记录注射部位疼痛、头痛、肌痛和不适的强度。还收集了整个研究过程中非征集性AE和严重不良事件(SAE)。所有统计分析均为描述性的。

[0354] 针对安全性分析集分析人口统计学特征,其被定义为接受至少一剂研究疫苗或对照疫苗并且可获得安全性数据的受试者。招募时,第1组和第2组的受试者平均年龄相似(分别为 66.1 ± 7.13 岁和 65.8 ± 6.58 岁)。此外,受试者56-64岁的组和受试者 ≥ 65 岁的组的年龄相似(第1a组 60.3 ± 2.52 岁,第2a组 60.8 ± 2.59 岁,第1b组 71.9 ± 5.28 岁,并且第2b组 70.8 ± 5.45 岁)。

[0355] 在第1组和第2组中,女性受试者(分别为60.8%[121/199]和55.0%[55/100])略多于男性受试者(39.2%[78/199]和45.0%[45/100])。在子集中观察到相同的趋势,除了第2b组,其中女性和男性受试者的数量相等(50.0%[25/50])。

[0356] 所有亚组中,针对血清组A、C、Y和W-135,hSBA效价 $\geq 1:8$ 的研究参与者的百分比在第30天与基线相比显著增加。在两个年龄层(56至64岁和 ≥ 65 岁)中,每个疫苗接种组内的结果总体相似,如表7所示。

表7. 在D30实现hSBA效价 $\geq 1:8$ 的受试者的百分比

血清组	第1a组 MenACYW-TT (56岁-64岁) (N = 98) %	第1b组 MenACYW-TT (≥ 65 岁) (N = 97) %	第2a组 MPSV4 (56岁-64岁) (N = 46) %	第2b组 MPSV4 (≥ 65 岁) (N = 48) %
A	95.9 (89.9; 98.9)	91.8 (84.4; 96.4)	78.3 (63.6; 89.1)	91.7 (80.0; 97.7)
C	71.4 (61.4; 80.1)	78.4 (68.8; 86.1)	58.7 (43.2; 73.0)	66.7 (51.6; 79.6)
Y	81.6 (72.5; 88.7)	79.4 (70.0; 86.9)	60.9 (45.4; 74.9)	58.3 (43.2; 72.4)
W	77.6 (68.0; 85.4)	81.4 (72.3; 88.6)	58.7 (43.2; 73.0)	62.5 (47.4; 76.0)
D: 天; CI: 置信区间				

[0358] 图10提供了在D30对于血清组A、C、Y和W实现hSBA水平 $\geq 1:8$ 的受试者的百分比(使用来自所有患者(即组合年龄组)的数据)。针对血清组A和C,给予MenACYW-TT后hSBA效价 $\geq 1:8$ 的个体的百分比与给予MPSV4后的效价相当。针对血清组Y和W,给予MenACYW-TT后hSBA效价 $\geq 1:8$ 的个体的百分比高于给予MPSV4后的效价。

[0359] 图11提供了在D30两种疫苗针对不同血清组的几何平均效价(GMT)。对于所有血清

组, MenACYW-TT的GMT大于或等于MPSV4的GMT。

[0360] 对于所有四个疫苗组, 具有大于或等于1:8的rSBA效价的参与者的百分比在MenACYW-TT接受者和MPSV4接受者之间相当。参见图12。

[0361] 在给予MenACYW-TT的7天内, 征集性注射部位反应(图13)和征集性全身反应(图14)与给予MPSV4疫苗相似。

[0362] 总体而言, MenACYW-TT和MPSV4疫苗的反应原性概况相似。大多数非征集性不良事件的强度为1级或2级。没有即刻超敏反应和归因于AE或SAE的中止。未观察到老年疫苗接受者的反应原性增加。未报告严重不良事件。

[0363] 当向56岁或以上的成年人给予时, MenACYW-TT有良好的耐受性和免疫原性。因此, MenACYW-TT代表了一种预防侵袭性脑膜炎球菌疾病的替代疫苗, 包括世界上目前仅普通多糖疫苗(如MPSV4)可用于老年人免疫的地区。

[0364] d) II期临床试验3-向健康的未接种脑膜炎球菌疫苗的幼儿(12-23个月)给予的MenACYW-TT的安全性和免疫原性

[0365] MenACYW-TT缀合物疫苗旨在用于6周龄及以上的个体。本研究使用 **Nimenrix®** (一种已获许可的四价脑膜炎球菌缀合物疫苗(MCV4-TT))作为对照, 评价了幼儿中单剂量的安全性和免疫原性。

[0366] 在芬兰, 在188名未接种脑膜炎球菌疫苗的幼儿(12-23月龄)中进行了一项II期、随机、开放标签研究。参与者被随机分配为接受一剂MenACYW-TT疫苗或MCV4-TT。使用以人类(hSBA)和幼兔(rSBA)补体进行的血清杀菌测定来测量在基线和给药后30天针对脑膜炎球菌血清组A、C、W和Y的抗体。两种杀菌测定的LLQ均为1:4。还测量了针对破伤风的抗体应答。

[0367] 在给药后收集长达30天的安全性数据。征集性不良事件(AE)的间隔是在D0和D7之间。征集性反应原性的集合包括每日测量体温及注射部位发红和肿胀, 以及记录注射部位疼痛、头痛、肌痛和不适的强度。收集了整个研究过程中非征集性AE和严重不良事件(SAE)。所有分析均为描述性的。

[0368] 表8提供了关于该试验的研究设计和受试者配置的数据。

表8: 研究设计和受试者配置			
[0369]	MenACYW-TT 缀合物疫苗, n (%)	MCV4-TT 对照疫苗, n (%)	所有受试者, n (%)
	计划样本 100	100	200

量			
招募的受试者	94 (100%)	94 (100%)	188 (100%)
随机化的受试者	94 (100%)	94 (100%)	188 (100%)
完成研究的受试者	94 (100%)	94 (100%)	188 (100%)
中止的受试者	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
符合方案分析集	91 (96.8%)	86 (91.5%)	177 (94.1%)

[0370] [0371] 对安全性分析集进行了人口统计学分析。安全性分析集被定义为接受至少一剂研究疫苗或对照疫苗并且可获得安全性数据的受试者。在安全性分析集中,共有98名(52.1%)男性受试者和90名(47.9%)女性受试者;男性/女性受试者的整体比例为1.09。MenACYW-TT组中男性多于女性(男性/女性比例为1.54)。MCV4-TT组中女性多于男性(男性/女性比例为0.77)。受试者的年龄在两组之间相当。招募时,受试者的平均年龄在MenACYW-TT组中为 1.44 ± 0.302 岁,并且在MCV4-TT组中为 1.47 ± 0.314 岁。

[0372] 对于血清组A、W和Y,对MenACYW-TT疫苗具有hSBA疫苗血清应答的受试者的百分比与MCV4-TT的情况相当[范围96.7%至98.9% (MenACYW-TT) 和91.9%至98.8% (MCV4-TT)] (图15)。hSBA疫苗血清应答如下定义:基线时效价<1:8,疫苗接种后效价 $\geq 1:8$ 或者基线时效价 $\geq 1:8$,疫苗接种后增加 ≥ 4 倍。

[0373] 对于血清组C,对MenACYW-TT (100.0%) 具有血清应答的受试者的百分比高于MCV4-TT的情况(86.0%)。使用rSBA,血清组C的趋势相似。

[0374] 在疫苗后D30实现hSBA效价 $>= 8$ ($= 1:8$) 的受试者的百分比的数据呈现于表9中。

表9: 实现hSBA效价 ≥ 8 的患者的百分比	
血清组	实现人血清杀菌测定效价 ≥ 8 的受试者

[0375]

		的百分比 % (95% CI)	
		MenACYW-TT	MCV4-TT
[0376]	A	97.8 (92.3; 99.7)	91.9 (83.9; 96.7)
	C	100.0 (96.0; 100.0)	89.5 (81.1; 95.1)
	W	98.9 (94.0; 100.0)	96.5 (90.1; 99.3)
	Y	98.9 (94.0; 100.0)	100.0 (95.8; 100.0)

[0377] 当使用hSBA几何平均效价和疫苗接种后hSBA效价 $\geqslant 8$ ($\geqslant 1:8$) 的受试者的百分比进行评价时, MenACYW-TT引起的对血清组A、W和Y的免疫应答相当, 并且对血清组C的免疫应答更高(图16和表10)。图16和表10显示了相同的数据, 除了表10中的数据被转换为log2标度, 如图16所示。

表10: 疫苗接种后hSBA几何平均效价		
	MenACYW-TT	MCV4-TT
A	76.8	61.5
C	492.9	28.4
W	71.7	44.5
Y	96.6	76.4

[0379] 还在该研究中评价了安全性。反应原性概况在两种疫苗之间相当。报告至少1例征集性注射部位反应的受试者的百分比在两种疫苗之间相当(48.9% 和 53.2%)。注射部位红斑、压痛和肿胀相关数据显示在图17中。注射部位的大部分反应强度均为1级或2级, 均在D0和D03之间开始, 并且大部分持续1至3天。

[0380] 很少受试者报告3级征集性注射部位反应: MenACYW-TT组中3.2%的受试者和 MCV4-TT组中4.3%的受试者。

[0381] 两组之间的征集性全身反应也相似(图18)。

[0382] 报告至少1例非征集性非严重AE的受试者的百分比在各研究组之间相当。大多数非征集性不良事件的强度为1级或2级。在任何一组中都没有报告即刻非征集性AE。没有即刻SAE, 包括任何过敏事件或危及生命的事件。报告的两例严重不良事件被认为没有相关性。

[0383] 研究MenACYW-TT疫苗有良好的耐受性和免疫原性。单剂量MenACYW-TT疫苗证明有极好的潜力成为首次接受脑膜炎球菌疫苗的幼儿的替代疫苗选择。

[0384] e) II期临床试验4-向健康的未接种脑膜炎球菌疫苗的青少年(10-18岁)给予的

MenACYW-TT的安全性和免疫原性

[0385] 该II期研究评价了向10岁-18岁青少年肌肉内给予的单剂量(每个血清组 $10\mu\text{g}$ 多糖,与总计 $65\mu\text{g}$ TT缀合,在 $0.67\% \text{NaCl}/30\text{mM}$ 醋酸钠中缓冲为pH 6.0) MenACYW-TT的安全性和免疫原性。将**Menveo®**(脑膜炎球菌(组A、C、Y和W-135)寡糖白喉CRM197缀合物疫苗,本文称为“MenACYW-CRM₁₉₇”,一种已获许可的四价脑膜炎球菌缀合物疫苗)给予对照组(第2组)。还将联合给予MenACYW-TT与**Tdap/Adacel®**和**HPV/Gardasil®**(第3组)的效果与单独给予**Tdap/Adacel®**和**HPV/Gardasil®**(第4组)进行比较。根据标签说明给予对照疫苗和**Tdap/Adacel®**和**HPV/Gardasil®**疫苗。表11总结并表征了四个研究组。

表11：临床试验4的研究组					
组	n	治疗	男性	女性	年龄平均值、年龄中值(岁)
1	503	MenACYW-TT	243	260	11.4, 11.1
2	501	MenACYW-CRM ₁₉₇	272	229	11.4, 11.2
3	392	MenACYW-TT 与 Tdap/Adacel® 和 HPV*/Gardasil®	201	191	11.3, 11.1
4	155	Tdap/Adacel® 和 HPV*/Gardasil®	155	141	11.4, 11.1

[0386] *:在D0给予第一剂HPV疫苗;分别在剂量1后2个月和6个月给予HPV剂量2和剂量3。

[0387] 共有74名受试者(4.3%)没有完成试验:第1组中10名(2.0%),第2组中7名(1.4%),第3组中27名(6.7%),以及第4组中30名(10.0%)。最常报告的中止原因是:并非不良事件引起的自愿中止、失访以及不遵守方案。没有归因于SAE或其他AE的提前终止。

[0388] 使用以人类(hSBA)补体进行的血清杀菌测定来测量在基线和给药后30天针对脑膜炎球菌血清组A、C、W和Y的抗体。杀菌测定的LLOQ为1:4。收集了第1组463名成员、第2组464名成员和第3组360名成员的hSBA数据。hSBA结果在表12中,其中%受试者指示具有阳性血清应答的受试者的百分比,即疫苗接种前hSBA效价<1:8的受试者在疫苗接种后hSBA $\geq 1:8$,或疫苗接种前效价 $\geq 1:8$ 的受试者从疫苗接种前到疫苗接种后hSBA效价至少增加4倍。对于所有四个,显示对MenACYW-TT的阳性血清应答的受试者的百分比高于血清组MenACYW-CRM₁₉₇的情况。

表12. II期临床试验4的hSBA结果						
	第1组 (MenACYW-TT) (N = 463)		第2组 (MenACYW-CRM ₁₉₇) (N = 464)		第3组 (MenACYW-TT + Tdap + HPV (N = 360)	
血清组	%受试者	95% CI	%受试者	95% CI	%受试者	95% CI
A	75.6	71.4; 79.4	66.4	61.9; 70.7	80.6	76.1; 84.5
C	97.2	95.2; 98.5	72.6	68.3; 76.6	97.2	95.0; 98.7
Y	97.0	95.0; 98.3	80.8	76.9; 84.3	95.6	92.9; 97.4
W	86.2	82.7; 89.2	66.6	62.1; 70.9	83.9	79.7; 87.5

[0391] 第1组和第2组之间的血清应答频率的差异连同其95 %置信区间显示在

[0392] 表13中。

表13. 第1组-第2组不同血清应答		
血清组	差异 (%受试者)	95% CI
A	9.2	3.4; 15.0
C	24.6	20.3; 29.0
Y	16.2	12.3; 20.2
W	19.6	14.2; 24.8

[0394] 第1组和第3组之间的血清应答频率的差异在95 %置信度下不显著,这与MenACYW-TT有效性不受与Tdap/Adacel[®]及HPV/Gardasil[®]联合给药影响的结论一致。

[0395] 表14显示了在第0天(D0) 和第30天(D30)以几何平均效价(GMT)表示的hSBA结果,以及95%置信区间。

[0396]

表14. hSBA几何平均效价							
		第1组 (N = 463)		第2组 (N = 464)		第3组 (N = 360)	
血清组		GMT	95% CI	GMT	95% CI	GMT	95% CI
A	D0	6.19	5.62; 6.83	5.75	5.24; 6.31	5.34	4.8; 5.94
	D30	44.1	39.2; 49.6	35.2	30.3; 41.0	47.9	41.7; 55.0
C	D0	3.36	3.12; 3.62	3.08	2.88; 3.30	3.38	3.13; 3.64
	D30	387	329; 456	51.4	41.2; 64.2	335	280; 399
Y	D0	2.33	2.23; 2.43	2.41	2.28; 2.54	2.46	2.32; 2.62
	D30	75.7	66.2; 86.5	27.6	23.8; 32.1	77.3	66.5; 89.9
W	D0	5.17	4.67; 5.73	5.35	4.82; 5.94	5.87	5.22; 6.60
	D30	86.9	77.8; 97	36.0	31.5; 41.0	91	80.2; 103

[0397] 比较所有组对白喉和破伤风的免疫应答。结果显示在表15中,表示为几何平均浓度(GMC); $\geq 0.1\text{IU/mL}$ 的%受试者;和抗破伤风抗体和抗白喉抗体浓度 $\geq 10\text{IU/mL}$ 的%受试者。

[0398]

表15. 疫苗接种后白喉和破伤风的几何平均数和效价						
	白喉			破伤风		
	GMC	$\geq 0.1\text{ IU/mL}$ (%)	$\geq 1.0\text{ IU/mL}$ (%)	GMC	$\geq 0.1\text{ IU/mL}$ (%)	$\geq 1.0\text{ IU/mL}$ (%)
第1组 (N = 463)	0.152	57.4	7.4	21.4	100	97.9
第2组 (N = 464)	35.4	100	98.9	0.346	90.1	18.7
第3组 (N =)	11.9	99.4	97.8	29.0	99.7	99.7

	360)						
[0399]	第4组 (N = 263)	15.7	99.6	98.9	14.7	100	99.6

[0400] 结果与第3组中联合给予MenACYW-TT与**Tdap/Adacelas®**不干扰后者的免疫原性的结论一致(参见第4组结果)。

[0401] 还关于以下抗原表征了疫苗应答:百日咳毒素(PT)、百日咳丝状血凝素(FHA)、百日咳百日咳粘着素(PRN)和百日咳菌毛抗原(FIM)。参见表16。

表16. 对PT、FHA、PRN和FIM抗原的应答。

		第3组 (N = 360)			第4组 (n = 263)		
Ag	GMT/ GMC	95% CI	疫苗应 答 (%)	GMT/ GMC	95% CI	疫苗应 答 (%)	
PT	37.5	33.8; 41.7	67.3	44.4	39.5; 49.9	78.2	
FHA	180	168; 194	92.1	242	218; 268	89.4	
PRN	200	177; 225	94.7	265	231; 304	96.6	
FIM	339	285; 403	92.2	499	414; 601	95.4	

[0403] 在安全性方面观察以下项:疫苗接种后30分钟内报告的任何非征集性全身不良事件(AE)的发生、性质、持续时间、强度和与疫苗接种的关系;在D0疫苗接种后长达7天发生的征集性注射部位反应的发生、发作时间、发生天数、强度、采取的行动以及反应是否导致研究提前终止;在D0疫苗接种后长达7天发生的征集性全身反应的发生、发作时间、发生天数、强度、采取的行动以及反应是否导致研究提前终止;在D0疫苗接种后长达23-37天的非征集性AE的发生、性质、发作时间、持续时间、强度、采取的行动、与疫苗接种的关系(仅针对全身AE)以及该事件是否导致研究提前终止;在D0疫苗接种后至长达180天(第1组和第2组)或210天(第3组和第4组)的整个试验期间SAE的发生、性质、发作时间、持续时间、严重性标准、与疫苗接种的关系、结果以及严重不良事件(SAE)是否导致研究提前终止。征集性全身反应包括发热、肌痛和头痛。征集性注射部位反应包括疼痛、红斑和肿胀。

[0404] 在D0和D07之间报告至少1例征集性反应的受试者的百分比在MenACYW-TT缀合物疫苗和**MENVEO®**之间相当:分别为第1组中63.5%(315/496)的受试者和第2组中64.2%(316/492)的受试者。报告至少1例征集性反应的受试者的百分比在接受MenACYW-TT缀合物疫苗同时接受Tdap和HPV的受试者与接受单独的Tdap和HPV的受试者之间相当:分

别为第3组中88.9% (345/388) 的受试者和第4组中89.0% (258/290) 的受试者。报告至少1例征集性注射部位反应的受试者的百分比在第1组、第2组和第3组之间相当:分别为46.6% (231/496)、45.7% (225/492) 和49.0% (190/388)。与单独给予MenACYW-TT缀合物疫苗(第1组)相比,当MenACYW-TT缀合物疫苗与Tdap和HPV同时给予(第3组)时,未看到MenACYW-TT缀合物疫苗的局部反应性增加。

[0405] 最常报告的征集性注射部位反应是第1组中45.2% (224/496) 的受试者、第2组中42.5% (209/492) 的受试者和第3组中47.2% (183/388) 的受试者报告的疼痛,随后是第1组中5.0% (25/496) 的受试者、第2组中7.5% (37/491) 的受试者和第3组中3.9% (15/388) 的受试者报告的注射部位红斑,以及第1组中5.4% (27/496) 的受试者、第2组中6.5% (32/491) 的受试者和第3组中4.4% (17/388) 的受试者报告的注射部位肿胀。MenACYW-TT缀合物疫苗或**MENVEO®**注射部位的大多数反应为1级或2级强度,在D0和D03之间开始,并且持续1至3天。在MenACYW-TT缀合物疫苗或**MENVEO®**注射部位具有任何3级注射部位反应的受试者的百分比在第1组中为1.8% (9/496),在第2组中为2.2% (11/492),并且在第3组中为2.8% (11/388)。在MenACYW-TT缀合物疫苗或**MENVEO®**注射部位具有3级疼痛的受试者的百分比在第1组中为1.4% (7/496),在第2组中为1.0% (5/492),并且在第3组中为2.3% (9/388)。具有3级红斑的受试者的百分比在第1组中为0.4% (2/496),在第2组中为1.2% (6/491),并且在第3组中为0.5% (2/388)。具有3级肿胀的受试者的百分比在第1组中为0.2% (1/496),在第2组中为0.4% (2/491),并且在第3组中为0.3% (1/388)。强度等级通常具有以下含义。1级:不干扰活动。2级:有些干扰活动。3级:严重干扰日常活动。

[0406] 接种疫苗后报告至少1例征集性全身反应的受试者的百分比在第1组 (52.0% [258/496]) 和第2组 (51.0% [251/492]) 之间相当。肌痛是最常报告的征集性全身反应,随后是头痛和不适,很少报告发热。第1组中35.3% (175/496) 的受试者和第2组中35.2% (173/492) 的受试者报告了肌痛。第1组中30.2% (150/496) 的受试者和第2组中30.9% (152/492) 的受试者报告了头痛。第1组中26.0% (129/496) 的受试者和第2组中26.4% (130/492) 的受试者报告了不适。第1组中1.4% (7/494) 的受试者和第2组中1.2% (6/488) 的受试者报告了发热。

[0407] 接种疫苗后出现至少1例征集性全身反应的受试者的百分比在第3组 (70.6% [274/388]) 和第4组 (65.9% [191/290]) 之间相当。肌痛是最常报告的全身反应:第3组中61.3% (238/388) 的受试者和第4组中55.4% (160/289) 的受试者。第3组中33.8% (131/388) 的受试者和第4组中29.0% (84/290) 的受试者报告了头痛。第3组中29.1% (113/388) 的受试者和第4组中27.9% (81/290) 的受试者报告了不适。第3组中1.6% (6/387) 的受试者和第4组中0.7% (2/286) 的受试者报告了发热。总体而言,大多数征集性全身反应为1级或2级强度,在D0和D03之间开始,并且持续1至3天。

[0408] 总体而言,报告3级征集性全身反应的受试者的百分比在第1组 (3.8% [19/496]) 和第2组 (4.3% [21/492]) 之间相当。报告3级征集性全身反应的受试者的百分比在第3组 (7.5% [29/388]) 和第4组 (5.5% [16/290]) 之间相当。最常报告的3级全身反应是肌痛,随后是不适和头痛。报告3级肌痛的受试者的百分比在第1组 (1.6% [8/496]) 和第2组 (1.8% [9/492]) 和第3组 (4.6% [18/388]) 和第4组 (3.8% [11/289]) 之间相当。报告3级不适的受

试者的百分比在第1组(2.2%[11/496])和第2组(2.8%[14/492])之间相当。第3组(2.6%[10/388])报告不适的频率高于第4组(1.7%[5/290])。报告3级头痛的受试者的百分比在第1组(1.8%[9/496])和第2组(1.8%[9/492])中相同。第3组(2.8%[11/388])报告头痛的频率高于第4组(1.7%[5/290])。

[0409] 总体而言,在D0和D30之间报告至少1例非征集性AE的受试者的百分比在4个研究组中相当:第1组中22.9%(115/503)的受试者和第2组中25.7%(129/501)的受试者;第3组中26.0%(102/392)的受试者和第4组中22.6%(67/296)的受试者。很少受试者报告即刻非征集性AE:第1组中0.6%(3/503)的受试者,第2组中0.2%(1/501)的受试者,第3组中0.8%(3/392)的受试者,以及第4组中0.7%(2/296)的受试者。没有即刻SAE,包括任何过敏事件或危及生命的事件。在第23-37天,9名受试者报告了12例即刻非征集性AE。一名受试者在D0疫苗接种后6个月报告了1例即刻非征集性AE。

[0410] 在D0疫苗接种后报告至少1例非征集性非严重注射部位AR的受试者的百分比在第1组和第2组之间相当:分别为1.4%(7/503)和1.6%(8/501);在第3组中报告至少1例非征集性非严重注射部位AR的受试者的百分比在数值上高于第4组:分别为4.3%(17/392)和2.0%(6/296)。最常报告的非征集性注射部位反应是14名受试者中报告的瘙痒,随后是13名受试者中报告的瘀伤。上述非征集性注射部位反应通常可能在任何疫苗接种后发生。

[0411] 在MenACYW-TT缀合物疫苗或MENVEO®注射部位报告至少1例非征集性非严重注射部位AR的受试者的百分比相当:在第1组中为1.4%(7/503),在第2组中为1.6%(8/501),并且在第3组中为1.8%(7/392)。第2组中的一名受试者报告了1例3级非征集性非严重注射部位AR(注射部位发热),其开始于D01,持续4天,并自行好转。没有采取任何行动。在第1组中或在第3组的MenACYW-TT缀合物疫苗注射部位未报告3级非征集性非严重注射部位AR。

[0412] 在30天内报告至少1例非征集性非严重AE的受试者的百分比在4个研究组中相当:第1组中22.7%(114/503)的受试者,第2组中25.5%(128/501)的受试者,第3组中26.0%(102/392)的受试者和第4组中22.3%(66/296)的受试者。最常报告的是感染和侵染(第1组中7.2%[36/503]的受试者,第2组中8.0%[40/501]的受试者,第3组中8.2%[32/392]的受试者,第4组中6.1%[18/296]的受试者);最常见的类型是上呼吸道感染。

[0413] 16名受试者在试验期间报告了SAE;4名受试者在D0疫苗接种30天内报告了SAE。均不认为与疫苗有关,且均未导致研究中止。所有受试者均康复。在研究期间没有报告死亡。

[0414] 发现在青少年中接种MenACYW-TT缀合物疫苗是安全的,在单独或与Tdap和HPV疫苗同时给予时未鉴定出安全性问题。MenACYW-TT缀合物疫苗的安全性概况与已获许可的MENVEO®疫苗相当。

[0415] f) III期临床试验1-加强剂量的MenACYW-TT在青少年和成年人中的免疫原性和安全性

[0416] 该研究评价了向青少年(≥ 15 至<18岁)和成年人(18-59岁)肌内给予的单剂量(每个血清组10 μ g多糖,与总计65 μ g TT缀合,在0.67%NaCl/30mM醋酸钠中缓冲为pH 6.0)MenACYW-TT的安全性和免疫原性。在给予MenACYW-TT之前4-10年向受试者给予了一剂四价脑膜炎球菌缀合物疫苗(“初免疫苗”)(第1组;n=402)。

[0417] 将Menactra[®] (脑膜炎球菌(A、C、Y和W-135组)荚膜糖白喉类毒素缀合物疫苗,本文称为“MenACYW-DT”,一种已获许可四价脑膜炎球菌缀合物疫苗)给予对照组(第2组;n=407)。在4-10年前第2组的受试者也被给予了一剂初免疫苗。

[0418] 在两组中,初免疫苗为MenACYW-DT(占所有受试者的86.3%)、MenACYW-CRM₁₉₇(占所有受试者的11.25%;MenACYW-CRM₁₉₇已在上文中就临床试验4进行了讨论)或未知(占所有受试者的2.45%;第1组9名和第2组10名)。研究组人口统计学特征如表17所示。

表17: III期临床试验1的研究组								
组	n	治疗	男性	女性	平均值, 中值 年龄(年)	初免疫苗 MenACYW-DT	初免疫苗 MenACYW-CRM ₁₉₇	
1	402	MenACYW-TT	195	207	22.0, 16.5	327	48	
2	407	MenACYW-DT	207	200	22.5, 16.4	340	39	

[0419] [0420] 在治疗后30天进行hSBA和幼兔血清杀菌(rSBA)测定。还在第6天进行hSBA测定。表18中给出了显示阳性血清应答的受试者的百分比。对于hSBA结果,阳性血清应答是基线效价<1:8时疫苗接种后效价≥1:16,或基线效价≥1:8时疫苗接种后增加4倍。第1组384名受试者和第2组389名受试者在第30天的hSBA结果有效。对于rSBA结果,阳性血清应答是基线效价<1:8时疫苗接种后效价≥1:32,或基线效价≥1:8时疫苗接种后增加4倍。

表18. 临床试验5的hSBA和rSBA结果				
hSBA, 第30天	第 1 组 (MenACYW-TT)		第 2 组 (MenACYW-DT)	
血清组	% 受 试者	95% CI	% 受试 者	95% CI

[0422]	A	92.2	(89.0;94.7)	87.1	(83.4;90.3)
	C	97.1	(94.9;98.6)	91.8	(88.6;94.3)
	Y	97.4	(95.3;98.7)	95.6	(93.1;97.4)
	W	98.2	(96.3;99.3)	90.7	(87.4;93.4)
	hSBA, 第6天	第 1 组 (MenACYW-TT)		第 2 组 (MenACYW-DT)	
	血清组	% 受试者	95% CI	%受试者	95% CI
	A	72.7	(59.0;83.9)	66.1	(53.0;77.7)
	C	83.6	(71.2;92.2)	87.1	(76.1;94.3)
	Y	90.9	(80.0;97.0)	83.9	(72.3;92.0)
	W	94.5	(84.9;98.9)	83.9	(72.3;92.0)
	rSBA , 第30天	第 1 组 (MenACYW-TT)		第 2 组 (MenACYW-DT)	
	血清组	% 受试者	95% CI	%受试者	95% CI
	A	80.2	(70.6;87.8)	71	(61.1;79.6)
	C	98.9	(94.0;100.0)	96	(90.1;98.9)
	Y	95.6	(89.1;98.8)	87	(78.8;92.9)
	W	94.5	(87.6;98.2)	95	(88.7;98.4)

[0423] 对于所有血清组,在第30天显示hSBA效价 $\geq 1:8$ 的受试者的百分比为 $\geq 99\%$,并且与先前给予的疫苗的同一性没有显著变化(数据未显示)。

[0424] 表19显示了如通过hSBA和rSBA测定的第0天(治疗前)和第30天的几何平均效价(GMT)。对于第30天,hSBA结果呈现为各组整体和先前已经给予了MenACYW-DT和MenACYW-

CRM₁₉₇的子组的结果。

[0425]

表19. 几何平均效价							
hSBA		第1组（全部）		第2组（全部）		第1组/第2组GMT	
血清组		GMT	95% CI	GMT	95% CI	比例	
A	D0	13.7	(12.2;15.5)	15.1	(13.5;16.9)		
	D30	497	(436;568)	296	(256;343)	1.68	(1.38;2.05)
C	D0	11.0	(9.32;13.1)	10.6	(9.10;12.4)		
	D30	2618	(2227;3078)	599	(504;71)	4.37	(3.45;5.53)
Y	D0	7.7	(6.56;9.04)	7.27	(6.21;8.50)		
	D30	2070	(1807;2371)	811	(699;941)	2.55	(2.09;3.12)
W	D0	9.76	(8.46;11.2)	10.6	(9.21;12.2)		
	D30	1747	(1508;2025)	723	(614;853)	2.42	(1.94;3.01)
hSBA		第1组（先前已给予MenACYW-DT）		第2组（先前已给予MenACYW-DT）		第1组/第2组GMT	
血清组		GMT	95% CI	GMT	95% CI	比例	
A	D30	490	(424;565)	298	(255;349)	1.64	(1.33;2.03)
C	D30	2505	(2096;2993)	575	(478;691)	4.36	(3.37;5.63)
Y	D30	2009	(1737;2324)	771	(660;902)	2.61	(2.10;3.23)
W	D30	1758	(1497;2065)	671	(563;800)	2.62	(2.06;3.32)
hSBA		第1组（先前已给予MenACYW-CRM ₁₉₇ ）		第2组（先前已给予MenACYW-CRM ₁₉₇ ）		第1组/第2组GMT	
血清组		GMT	95% CI	GMT	95% CI	比例	
A	D30	636	(439;920)	238	(148;384)	2.67	(1.49;4.79)
C	D30	4096	(2745;6113)	771	(439;1351)	5.31	(2.74;10.3)
Y	D30	2981	(2011;4420)	1245	(738;2101)	2.39	(1.27;4.51)
W	D30	1773	(1185;2651)	1202	(697;2071)	1.48	(0.768;2.83)
rSBA		第1组		第2组			

血清组		GMT	95% CI	GMT	95% CI
A	D0	1097	(724;1662)	1144	(812;1613)
	D30	10859	(8844;13333)	6608	(5410;8071)
C	D0	15.2	(9.38;24.5)	9.1	(5.90;14.1)
	D30	11898	(9425;15021)	2665	(1934;3672)
Y	D0	84.2	(45.7;155)	52.7	(29.0;95.9)
	D30	9468	(7447;12037)	3848	(2778;5331)
W	D0	141	(74.3;269)	145	(85.0;247)
	D30	21227	(17199;26200)	9410	(7203;12294)

[0426] [0427] 上面呈现的结果显示,对于所有4个血清组,使用hSBA测定,在加强剂后第30天给予MenACYW-TT后证明血清应答的受试者的百分比大于MenACYW-DT的情况。对于所有4个血清组, MenACYW-TT疫苗的根据hSBA的疫苗接种后GMT在数值上也高于MenACYW-DT。

[0428] 此外,在4-10年前接受过单剂量MenACYW-DT或MenACYW-CRM₁₉₇的成年人和青少年中给予单剂量MenACYW-TT的耐受性良好,并且未生成任何新的安全性问题或安全性信号。在安全性方面观察以下项:疫苗接种后30分钟内报告的任何非征集性全身AE的发生、性质、持续时间、强度和与疫苗接种的关系;疫苗接种后长达7天发生的征集性注射部位反应的发生、发作时间、发生天数、强度、采取的行动以及反应是否导致研究提前终止;疫苗接种后长达7天发生的全身反应的发生、发作时间、发生的天数、强度、采取的行动以及反应是否研究导致提前终止;长达D30 (+14天) 的非征集性AE的发生、性质、发作时间、持续时间、强度、采取的行动、与疫苗接种的关系(仅针对全身性AE) 以及该事件是否导致研究提前终止;在整个试验期间SAE的发生、性质、发作时间、持续时间、严重性标准、与疫苗接种的关系、结果以及是否导致研究提前终止。征集性AE基本上如上文针对II期临床试验4中所述。

[0429] 总体而言,报告至少1例征集性反应的受试者的百分比在第1组和第2组之间相当:分别为第1组中64.3% (256/398) 的受试者和第2组中65.4% (263/402) 的受试者。报告至少1例3级征集性反应的受试者的百分比在第1组和第2组之间相当:分别为第1组中5.0% (20/398) 的受试者和第2组中5.5% (22/402) 的受试者。报告至少1例征集性注射部位反应的受试者的百分比在第1组和第2组之间相当:分别为第1组中46.5% (185/398) 的受试者和第2组中49.3% (198/402) 的受试者。最常报告的征集性注射部位反应是第1组中44.7% (178/398) 的受试者和第2组中48.8% (196/402) 的受试者报告的疼痛。报告红斑和肿胀的频率较低。第1组中(分别为5.0% [20/398] 和4.0% [16/398]) 报告的红斑和肿胀的频率高于第2组(分别为1.5% [6/402] 和0.7% [3/402])。大多数是1级强度;报告2级红斑和肿胀的受试者的百分比在第1组(分别为0.5% [2/398] 和0.8% [3/398]) 和第2组(分别为0.2% [1/402] 和0.5% [2/402])之间相当。两组均未报告3级红斑或肿胀。MenACYW缀合物疫苗或 Menactra® 注射部位的大部分反应均为1级或2级强度,大多数在D0和D03之间开始,并且大多数持续1至3天。很少受试者报告3级征集性注射部位反应:第1组中1.0% (4/398) 的受试者和第2组

中2.0% (8/402)的受试者报告了3级疼痛。两组中均无受试者报告3级红斑或肿胀。

[0430] 报告至少1例征集性全身反应的受试者的百分比在第1组和第2组之间相当:分别为第1组中55.3% (220/398) 的受试者和第2组中的54.2% (218/402) 的受试者。肌痛和头痛是最常报告的全身反应:第1组中36.7% (146/398) 的受试者和第2组中38.8% (156/402) 的受试者报告了肌痛;第1组中37.9% (151/398) 的受试者和第2组中33.3% (134/402) 的受试者报告了头痛。第1组中27.6% (110/398) 的受试者和第2组中26.9% (108/402) 的受试者报告了不适。第1组中未报告发热(0.0% [0/390]),并且第2组0.5% (2/395) 的受试者报告了发热。总体而言,大多数征集性全身反应为1级或2级强度,在D0和D30之间开始,并且持续1至3天。很少受试者报告3级征集性全身反应。报告3级征集性全身反应的受试者的百分比在第1组和第2组之间相似:发热(分别为0.0% [0/390]和0.3% [1/395])、头痛(分别为2.3% [9/398]和3.5% [14/402])、不适(分别为2.8% [11/398]和3.5% [14/402])以及肌痛(2.0% [8/398]和2.2% [9/402])。

[0431] 在D0和D30之间报告至少1例非征集性非严重AE的受试者的百分比在第1组(26.1% [105/402])和第2组(25.3% [103/407])之间相当。第1组(n=164例AE)和第2组(n=164例AE)中非征集性非严重AE的数量相同。认为小的且相当比例的非征集性非严重AE与D0给予的疫苗相关:第1组中3.0% (12/402)的受试者和第2组中2.9% (12/407)的受试者。上述大多数事件的强度为1级或2级。

[0432] 第1组中的两名受试者(0.5%)和第2组中的零例受试者(0.0%)报告至少1例即刻非征集性AE(两名受试者均头晕)。

[0433] 总计第1组中的5名受试者(1.2%)和第2组中的6名受试者(1.5%)报告了至少1例非征集性非严重注射部位AR。第1组中的2名受试者(0.5%)和第2组中的3名受试者(0.7%)报告了注射部位瘀伤。第1组中的2名受试者(0.5%)和第2组中的1名受试者(0.2%)报告了注射部位瘙痒。第1组中的1名受试者(0.2%)报告了注射部位发热。第2组中各有1名受试者报告了注射部位变色和注射部位荨麻疹(0.2%)。注射部位变色为3级,并且在研究结束时仍持续。

[0434] 感染和侵染是最常报告的非征集性非严重全身性AE(第1组中7.5%的受试者[30/402]和第2组中6.6%的受试者[27/407])。第1组中1.7% (7/402)的受试者和第2组中1.7% (7/407)的受试者报告了鼻咽炎,为最常报告的感染或侵染类型;并且第1组中1.0% (4/402)的受试者和第2组中1.7% (7/407)的受试者报告了上呼吸道感染。SOC中经常报告的还有呼吸系统、胸及纵隔疾病(包括咳嗽和口咽疼痛):第1组中6.0% (24/402)的受试者和第2组中6.6% (27/407)的受试者。疫苗注射30天内大多数非征集性非严重AE的强度为1级或2级。报告至少1例3级非征集性非严重全身AE的受试者的百分比在两组中之间相当:第1组中3.7% (15/402)的受试者和第2组中4.2% (17/407)的受试者。

[0435] 第1组中2.2% (9/402)的受试者和第2组中1.7% (7/407)的受试者报告了全身性疾病及给药部位各种反应分类中最常报告的非征集性非严重全身性AR。第1组中0.5% (2/402)的受试者和第2组中0.2% (1/407)的受试者报告了疲劳,是该分类中最常报告的非征集性非严重全身性AR。第2组中仅1名受试者报告了2例3级非征集性非严重全身性AR:SOC中肠胃失调的3级恶心和全身性疾病及给药部位各种反应分类中的3级疲劳。两者都在D0开始并持续2天。针对恶心采用药物治疗;针对疲劳没有采取任何行动。

[0436] 在任何一组中都没有导致研究中止的AE或AR。3名受试者在接种疫苗后的前30天内经历了SAE:第1组中1名受试者的双侧肺栓塞和第2组中各一名受试者的重度抑郁症和胸痛。这些SAE中没有一项被研究者认为与疫苗有关,且均未导致研究中止。

[0437] D30至6个月随访后,6名受试者(第1组4名,第2组2名)共经历6例SAE:第1组4名受试者(1.0%)经历4例SAE,并且第2组受试者2名(0.5%)经历2例SAE。这些SAE中没有一项被认为与疫苗有关,且均未导致研究中止。在研究期间没有报告死亡。

[0438] 发现初免四价脑膜炎球菌缀合物疫苗的青少年和至少15岁的成年人接种加强剂量的MenACYW缀合物疫苗是安全的,未鉴定出安全性问题。总体而言, MenACYW缀合物疫苗的安全性概况与已获许可的**Menactra®**疫苗相当。

[0439] 7. MenACYW-TT液体配制品稳定性

[0440] 现有的如**MenACWY-CRM₁₉₇/Menveo®**(与CRM197的四价缀合物,其中MenA缀合物是经冻干的)和**MCV4-TT/Nimenrix®**(一种完全冻干的与TT的四价缀合物)等脑膜炎球菌多糖缀合物疫苗的某些或所有组分作为液体配制品无法长期储存。**Menactra®**(与TT的四价缀合物)作为液体配制品储存,但其保质期为24个月。在最新出版物中,Beresford等人表征了各种现有疫苗的稳定性和在一定条件下观察到的解聚和免疫原性的丧失,因此他们建议“any newly developing MenACWY saccharide-protein conjugate vaccines, a key recommendation would be to consider the lyophilization of final product to prevent deleterious degradation that would affect immunogenicity[对于任何新开发的MenACWY糖-蛋白质缀合物疫苗,一个关键的建议是考虑冻干终产品以防止可能影响免疫原性的有害降解]”。Beresford等人,Vaccine 2017年6月16日;35(28):3598-3606的摘要。

[0441] 液体配制品具有优势,至少是因为它们在制造期间不需要冻干步骤,在给药前不需要重构步骤,并且避免了与重构相关的可能错误的风险。当然,如果产品本身经历了损害免疫原性的降解,则这些优点无关紧要。因此,将希望MenACYW缀合物疫苗作为液体配制品在超过24个月内是稳定的。根据本公开文本, MenACYW-TT的稳定性如下表征。

[0442] 在2°C-8°C下,将MenACYW-TT储存在缓冲为pH 6.0的0.67%NaCl/30mM乙酸钠中54个月,并在选自0、1、3、6、9、12、18、24、30、36、42、48和54个月的时间点测试稳定性(参见表20)。测量的参数包括视觉外观、无菌性、不存在异常毒性、每个血清组的总多糖、游离多糖的百分比%、分子量、多分散度、pH和免疫原性。

[0443] MenACYW-TT的加速稳定性测试也通过将配制品储存在23°C-27°C下进行。测试在1周、3个月和6个月中的一个或多个处进行(参见表21)。

[0444] 关于视觉外观,在2°C-8°C下54个月和在23°C-27°C下6个月的整个时间段内溶液保持清澈,并且没有注释缺陷(测试了上面列出的所有时间点)。

[0445] 通过在给予一剂MenACYW-TT后观察啮齿动物(小鼠或豚鼠)来确定不存在异常毒性。在所有测试中,所有动物在给药后28天的测试期间存活;没有非特异性或意外的应答;且在测试期间动物体重未减轻。在0、12、24、36、42、48和54个月时间点进行异常毒性测试。

[0446] 在0个月时pH为6.1,并且在整个时间过程中所有测量值均在6.1至6.3的范围内(针对pH的时间点是在2°C-8°C下的0、1、6、12、24、36、42、48和54个月和在23°C-27°C下的6

个月)。在任何测试时间点(包括54个月)均未观察到生长(针对无菌性的时间点是在2°C-8°C下的0、12、24、36、42、48和54个月和在23°C-27°C下的6个月)。

[0447] 通过DionexTM色谱法来测量总多糖。通过DionexTM色谱法和脱氧胆酸盐沉淀来测量%游离多糖。通过尺寸排阻色谱法/多角度光散射(SEC/MALS)测量分子量和多分散度。

[0448] 表20中是2°C-8°C的结果,并且表21中是23°C-27°C的结果。

[0449] 表20:2°C至8°C下储存的稳定性测试结果。

[0450]

测试	血清组	时间0	1 个月	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	18 个月
总多糖 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	A	20.2	19.3	16.6	18.2	18.8	21.3	21.9
	C	19.4	20.8	15.0	14.5	16.2	18.3	20.4
	Y	16.7	16.2	20.7	16.8	16.9	17.2	16.4
	W-13 5	15.9	15.6	12.4	15.9	15.5	16.3	17.5
%游离 多糖	A	< 15%	< 16%	< 18%	< 17%	< 16%	< 14%	< 14%
	C	< 16%	< 14%	< 20%	< 21%	< 19%	< 16%	< 15%
	Y	< 18%	19%	< 15%	< 18%	< 18%	18%	< 18%
	W-13 5	< 19%	< 19%	< 24%	< 19%	< 19%	< 18%	< 17%
分子量	全部	9.122 E5	5.095 E5	7.679 E5	7.713 E5	1.533 E6	8.348E 5	9.958 E5

[0451]

多分散度	全部	1.381	1.359	1.298	1.311	1.862	1.256	1.581
测试	血清组	时间0	24个月	30个月	36个月	42个月	48个月	54个月
总多糖 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	A	20.2	19.4	19.4	18.4	19.2	18.6	18.8
	C	19.4	17.7	18.2	18.2	22.4	21.6	20.0
	Y	16.7	13.5	14.6	14.7	18.5	14.8	14.2
	W-135	15.9	14.6	13.3	13.5	15.3	15.5	14.5
%游离多糖	A	< 15%	< 15%	< 15%	< 16%	< 16%	17	17
	C	< 16%	< 17%	< 16%	< 16%	< 13%	< 14	< 15
	Y	< 18%	< 22%	< 20%	< 20%	21%	< 20	< 21
	W-135	< 19%	< 21%	< 23%	< 22%	< 20%	< 19	< 21
分子量	全部	9.122 E5	9.958 E5	1.192 E6	5.419 E5	8.286 E5	7.700E5	8.092 E5
多分散度	全部	1.381	1.581	1.432	1.288	1.485	1.572	1.495

[0452] NS:未安排。†:在测试之前,将血清样品在其可保持稳定的温度<-20℃下保存约6-7个月。

[0453] 表21:23℃至27℃下储存的稳定性测试结果。

测试	血清组	1周	3月	6月
[0454] 总多糖 ($\mu\text{g/mL}$)	A	19.4	22.0	22.0
	C	14.1	20.5	19.9
	Y	13.9	17.0	15.9
	W-135	15.5	17.3	16.2
% 游离多糖	A	< 15%	27%	31%
	C	< 21%	25%	18%
	Y	< 22%	< 18%	30%
	W-135	< 19%	17%	28%
分子量	全部	8.212E5	8.285E5	6.209E5
多分散度	全部	1.335	1.361	1.474

[0455] NS:未安排。

[0456] 该结果指示了在2°C - 8°C下54个月以及在23°C - 27°C下6个月整个期间的良好稳定性。特别是在2°C - 8°C时,对于所有四个血清组,多糖与TT的缀合损失最小(游离多糖%增加0-3%),并且除24个月外的所有时间点都基本保持免疫原性,其中低值显现是异常值和/或是由基于在36个月及以后的观察的技术问题而产生,其与0和12个月的测量值更相似。在23°C - 27°C下, MenA、MenY和MenW的游离多糖6个月时增加,但水平仍然低于40%的可接受限度。六个月时免疫原性仍然存在。

[0457] 基于这些结果,我们可以得出结论, MenACYW-TT可以在冷藏下长期维持为液体制品,例如在包装、配送和储存期间,并且不需要冻干或其他保存措施。

[0458] ***

[0459] 尽管出于清楚理解的目的,已经通过说明和实施例的方式详细地描述了前述发明,但是描述和实施例不应被解释为限制本发明的范围。

血清组A缀合物

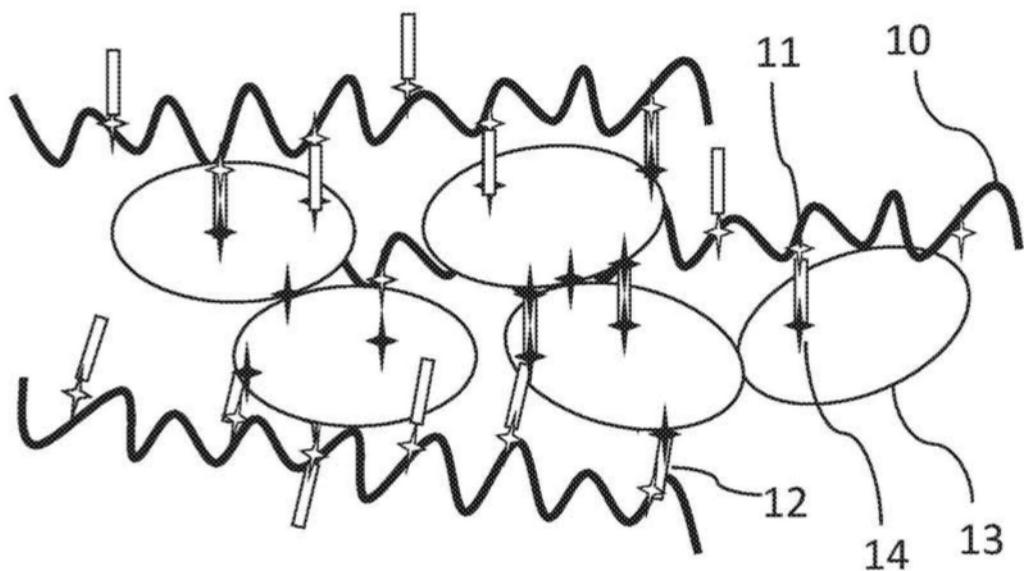


图1A

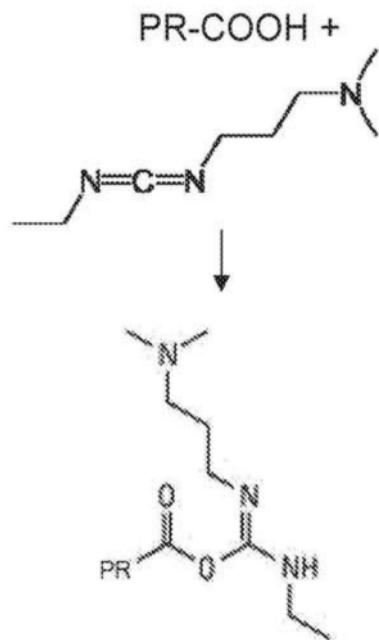


图1B

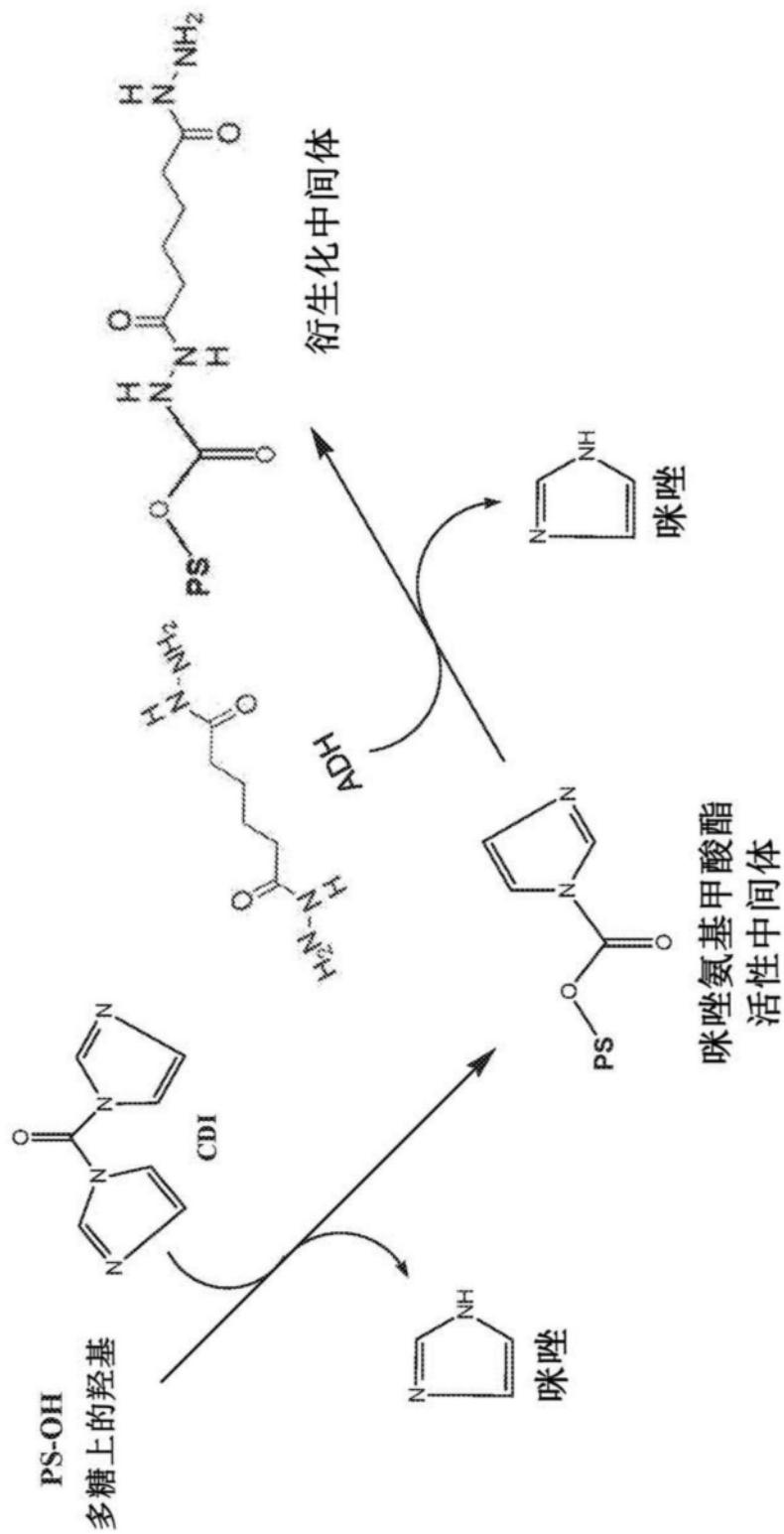


图1C

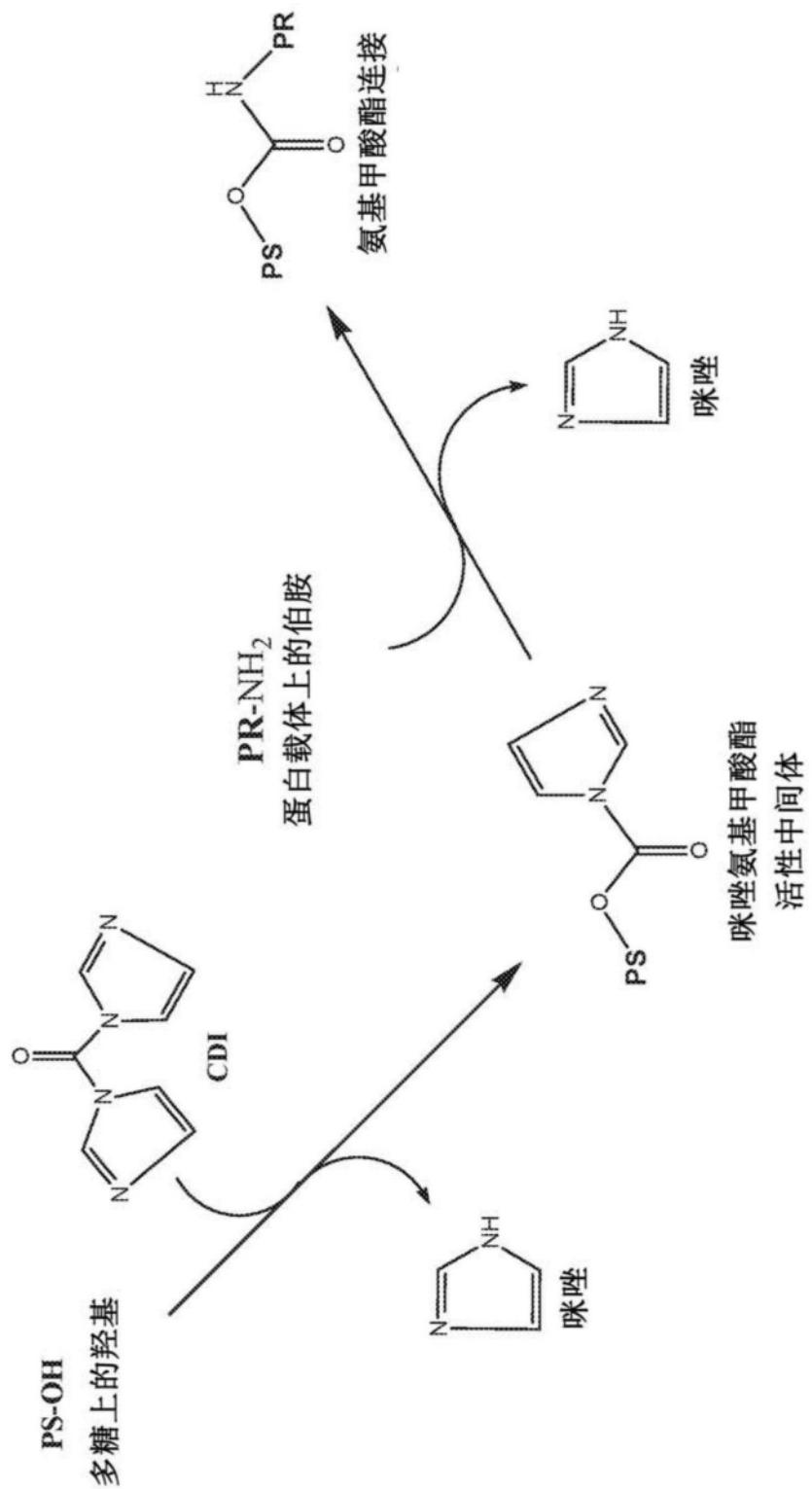


图1D

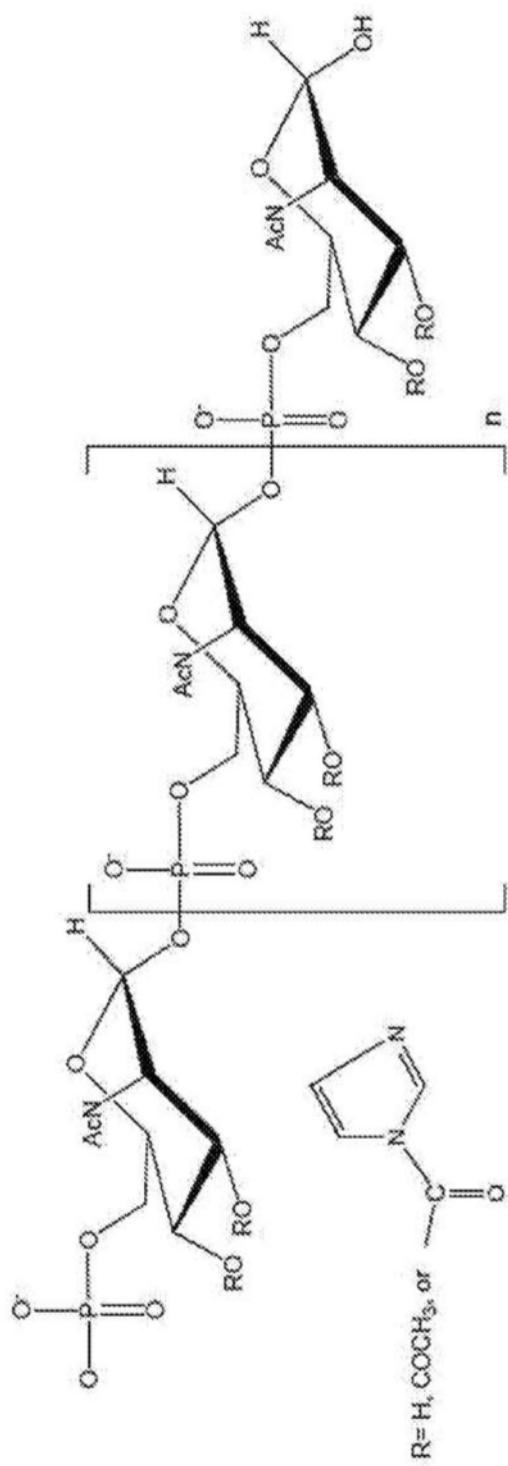


图1E

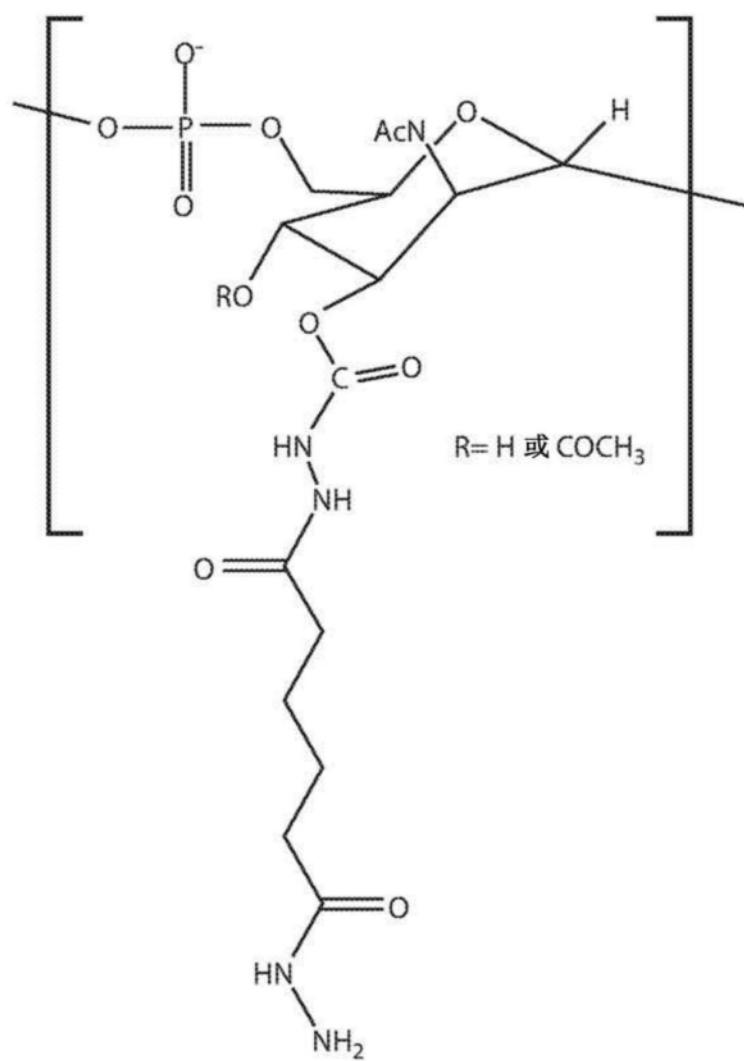


图1F

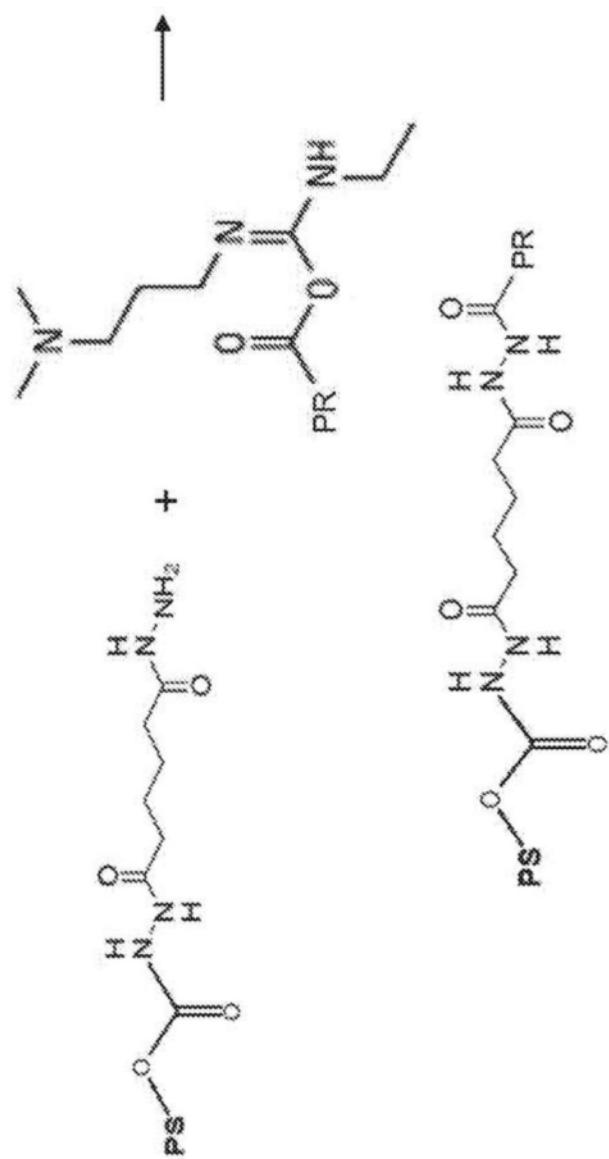


图1G

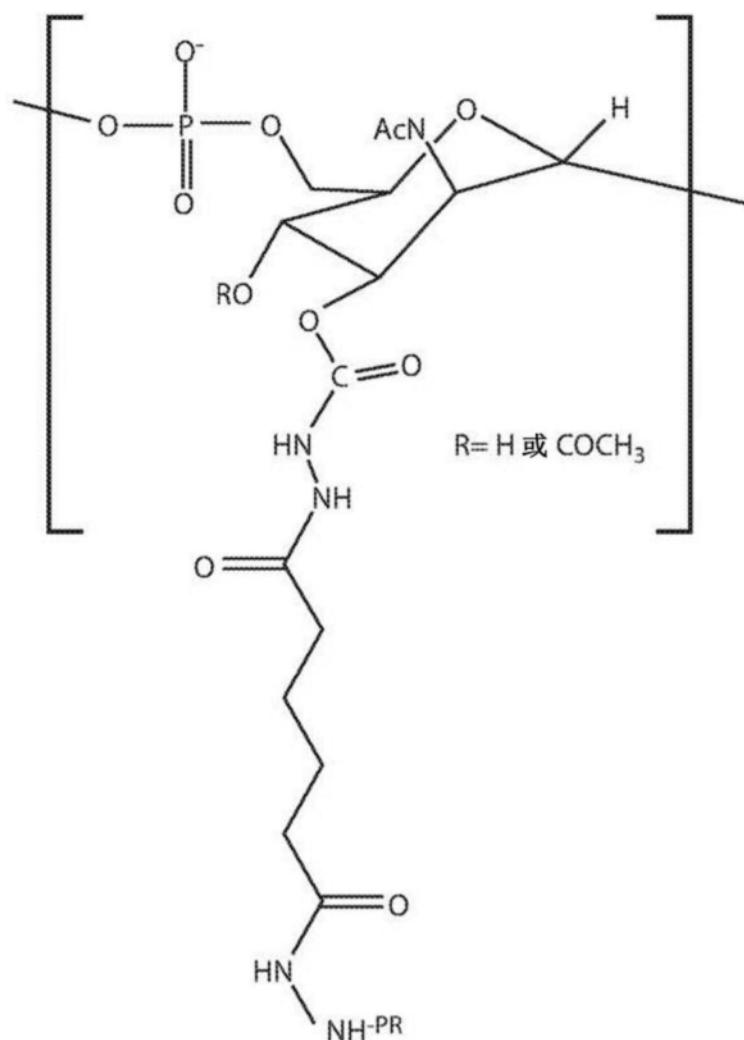


图1H

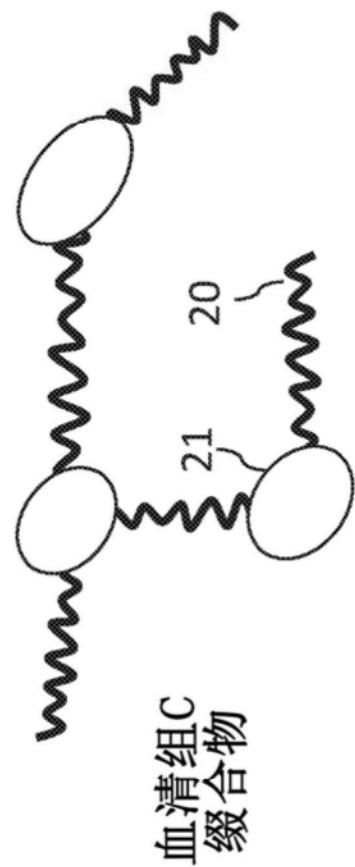


图2A

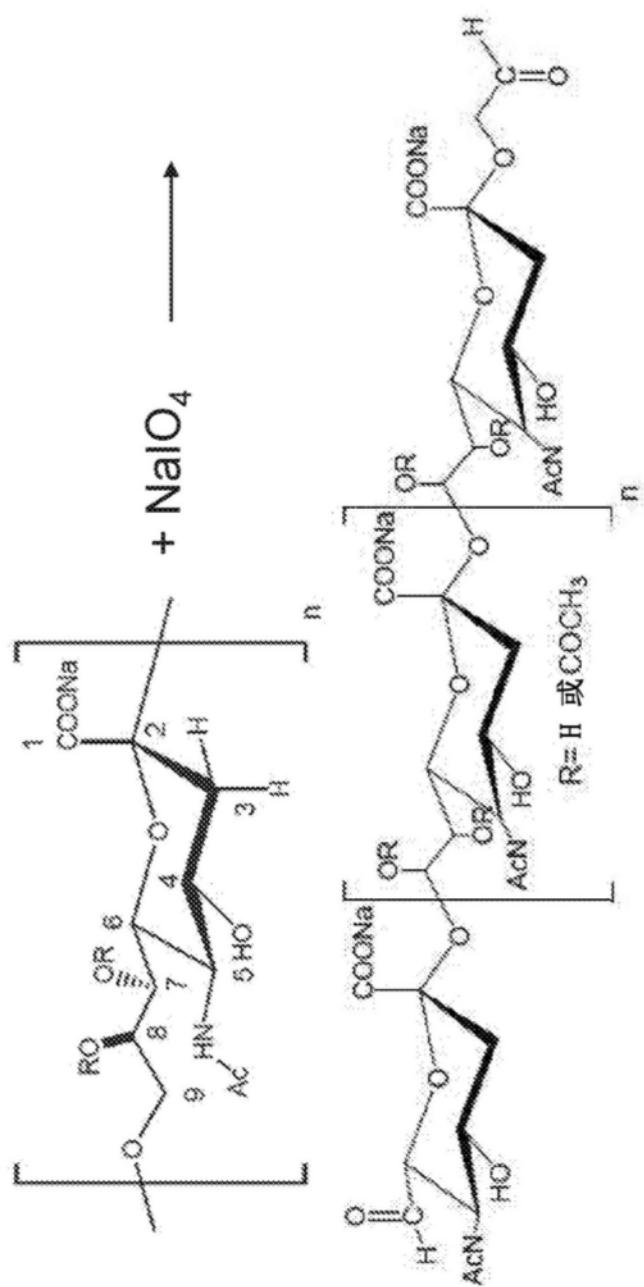


图2B



图2C

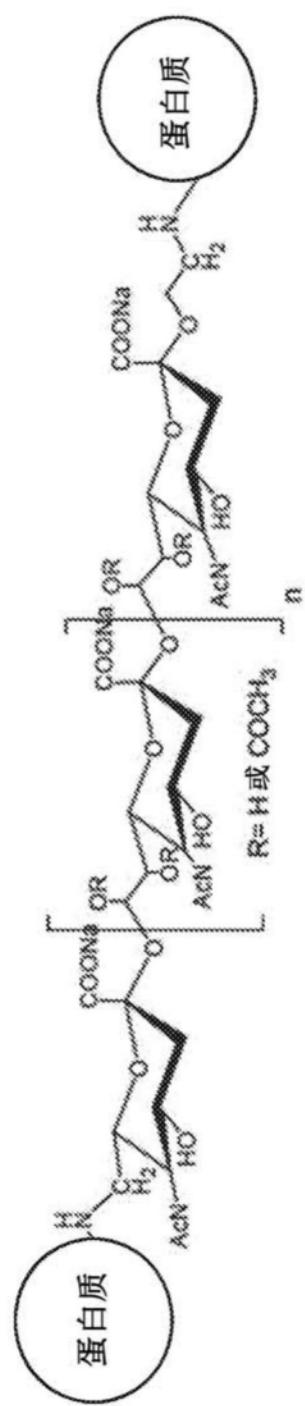


图2D

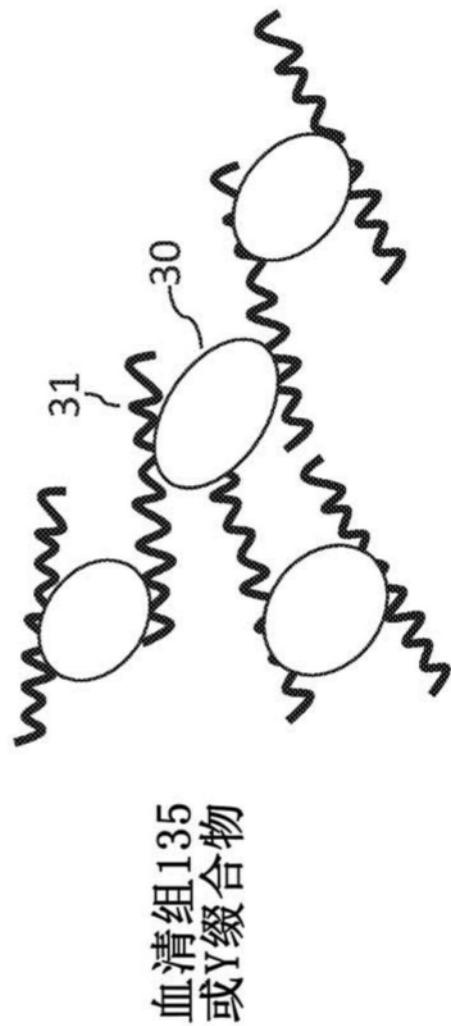


图3

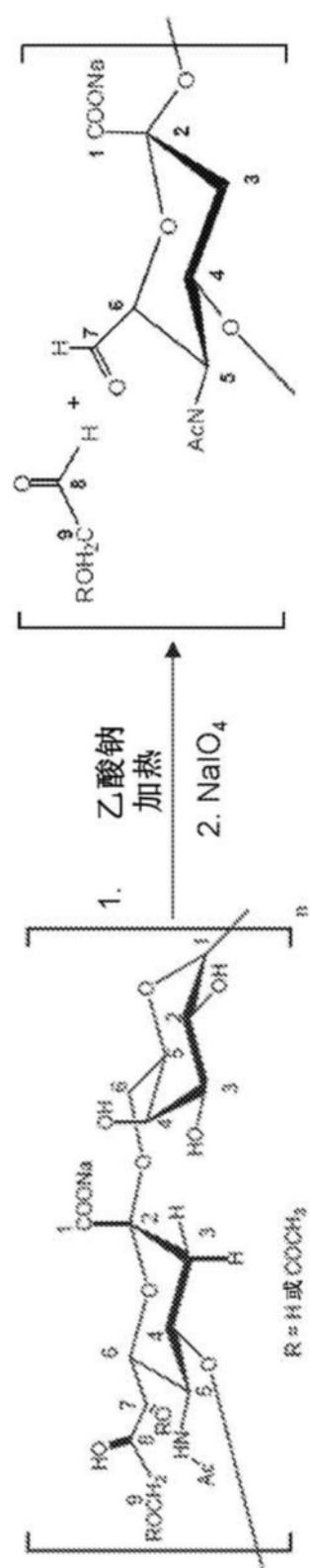


图4A



图4B

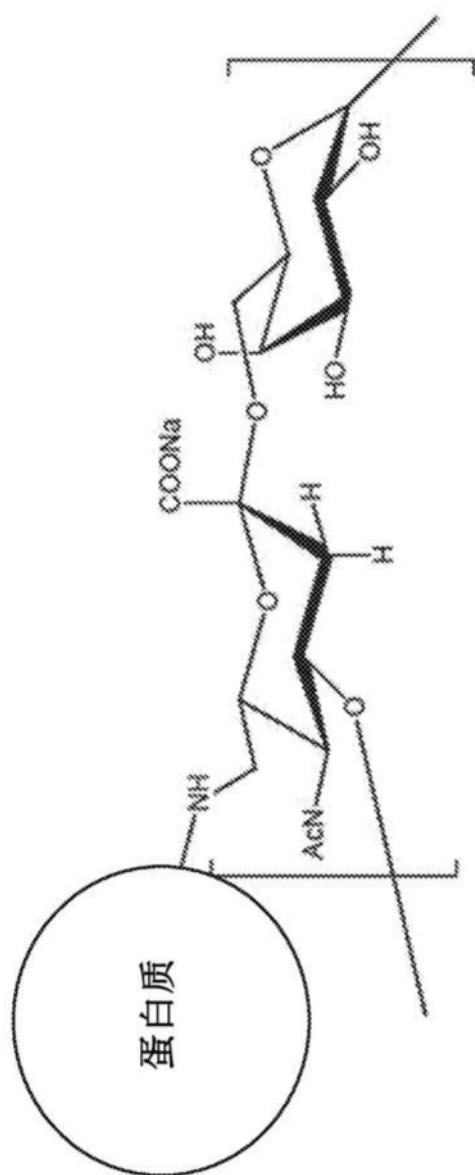


图4C

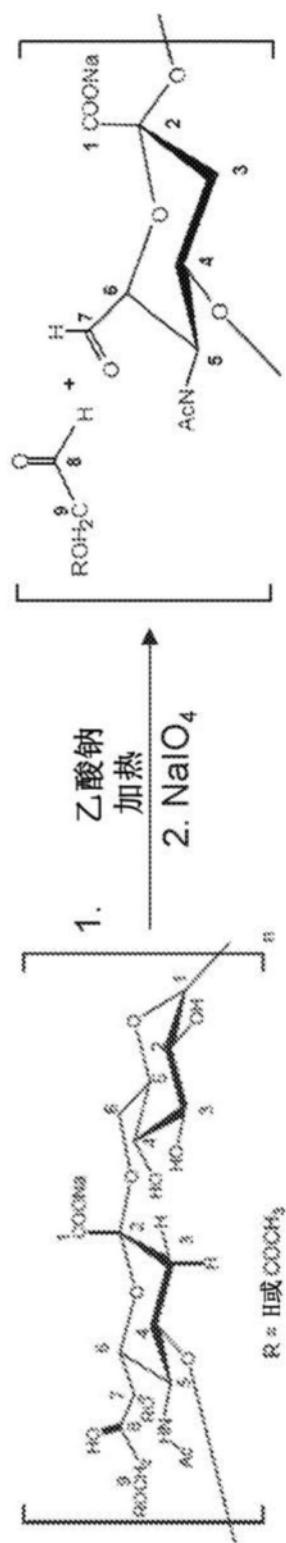


图5A



图5B

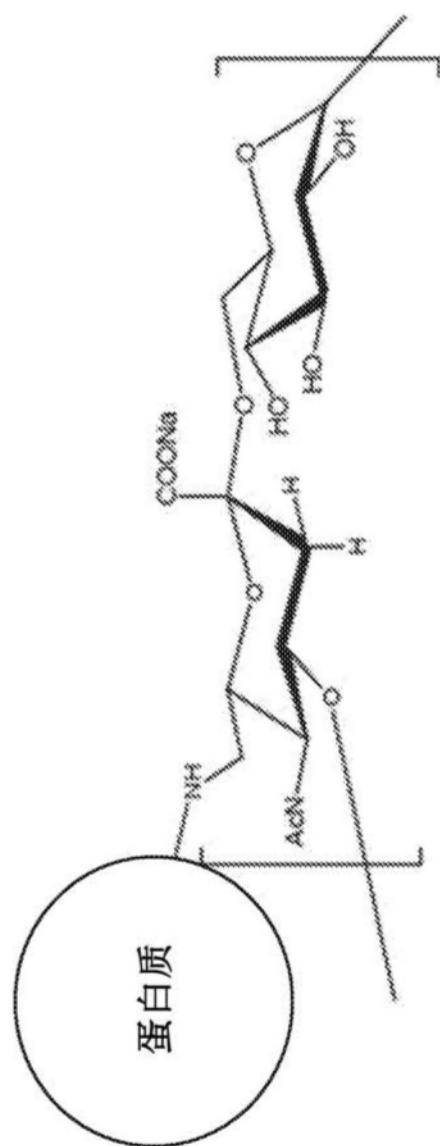
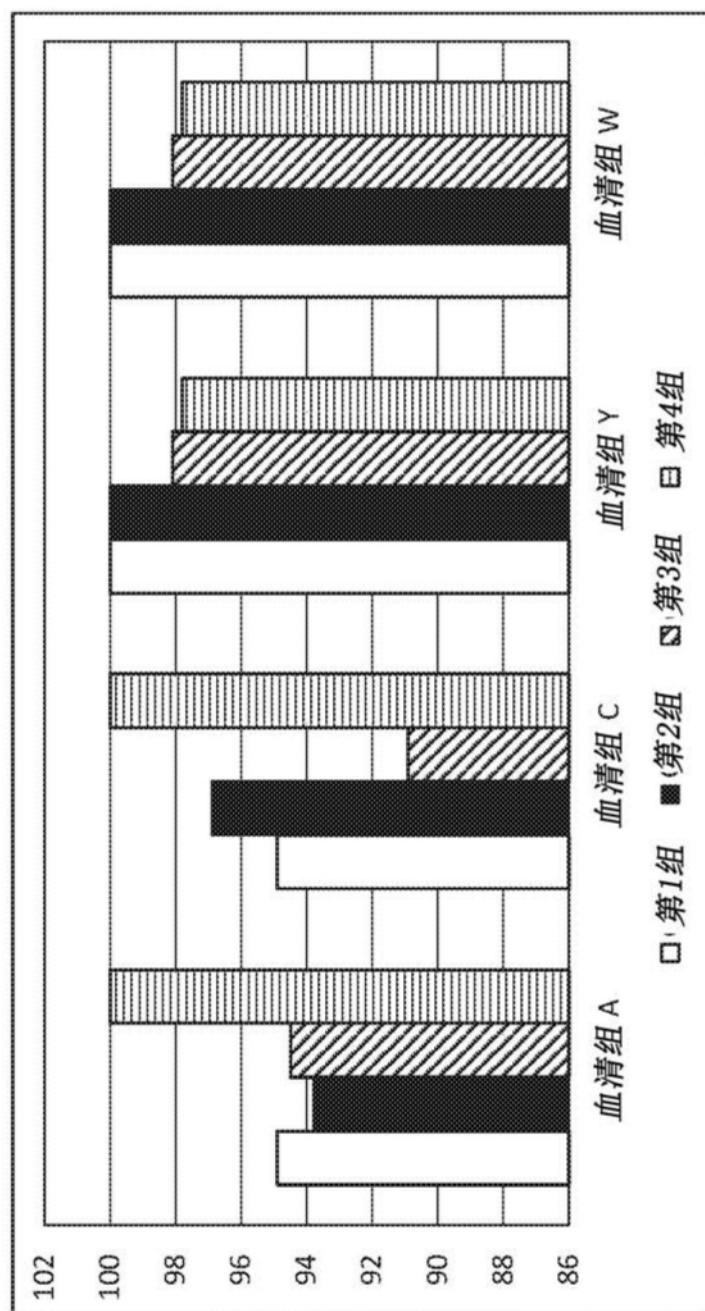
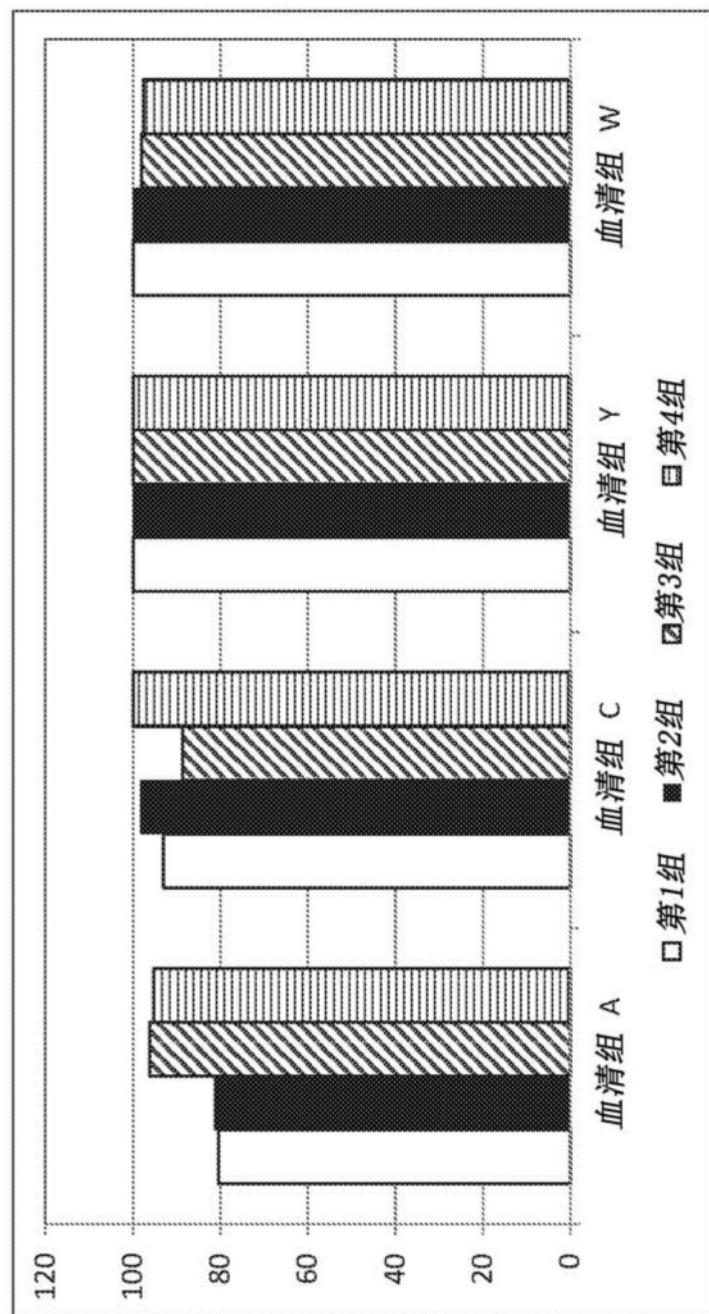


图5C



hsBA效价 \times = 1:8的受试者的百分比

图6



rSBA效价 = 1:8的受试者的百分比

图7

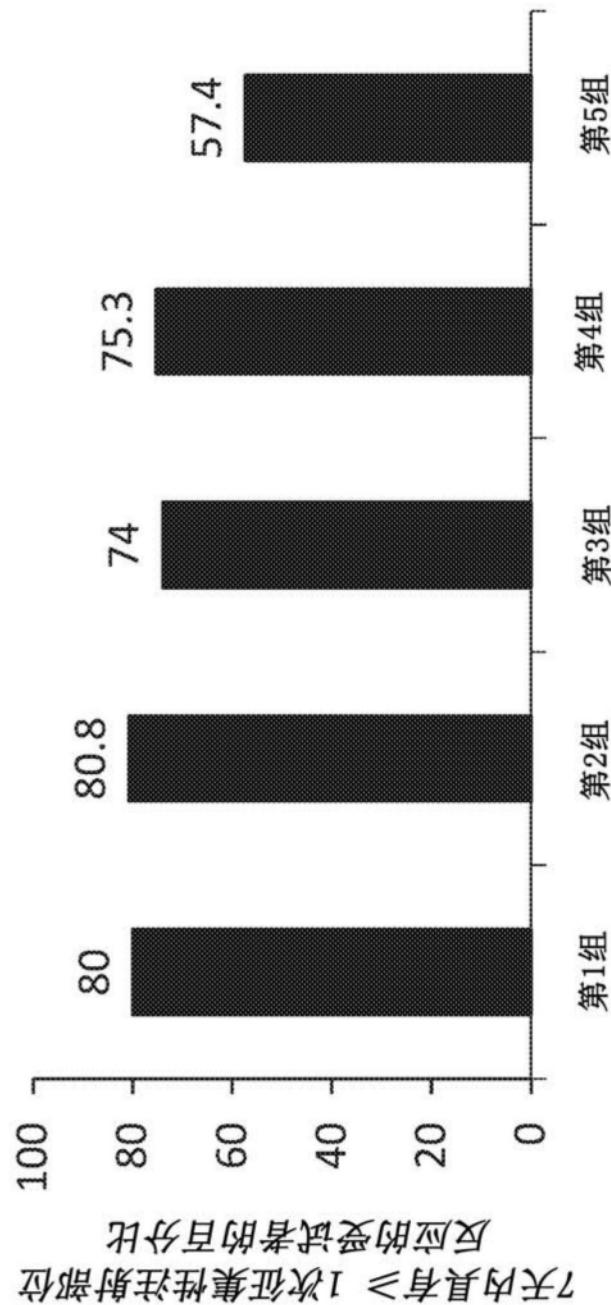


图8

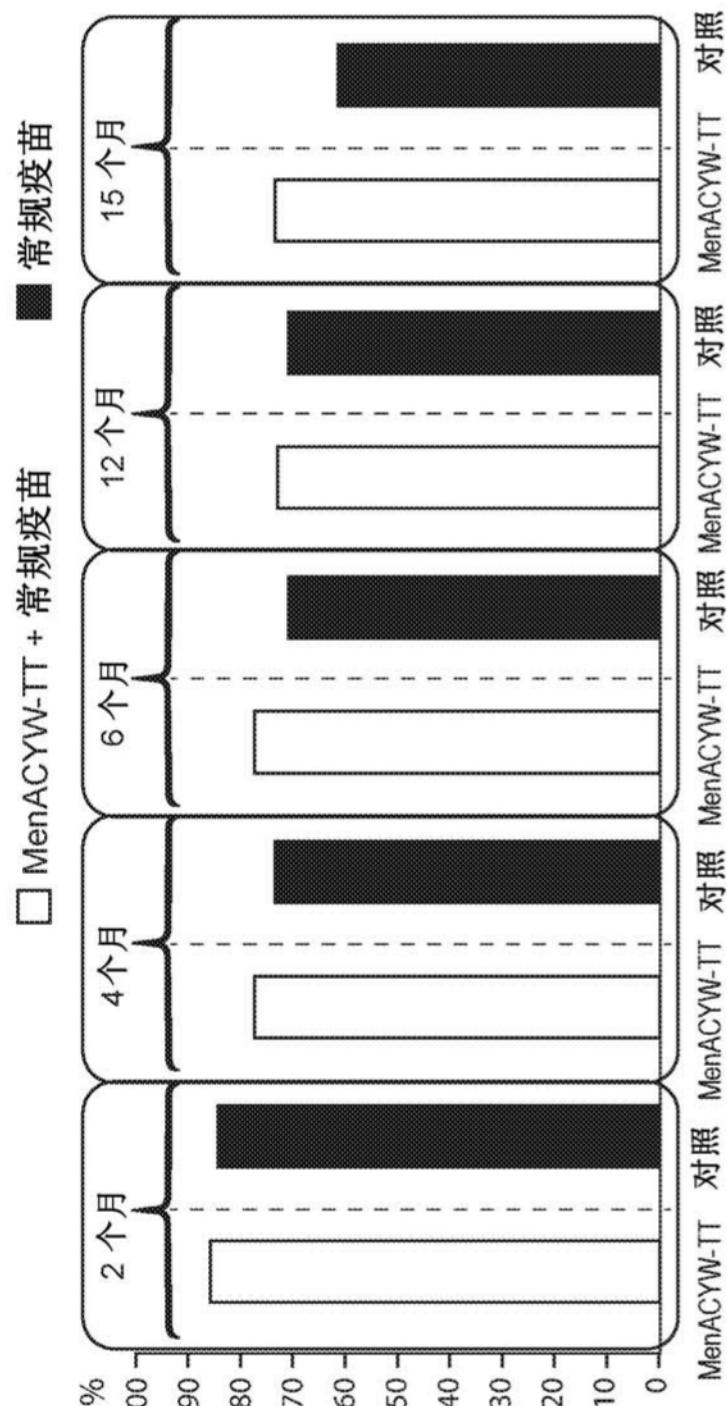


图9

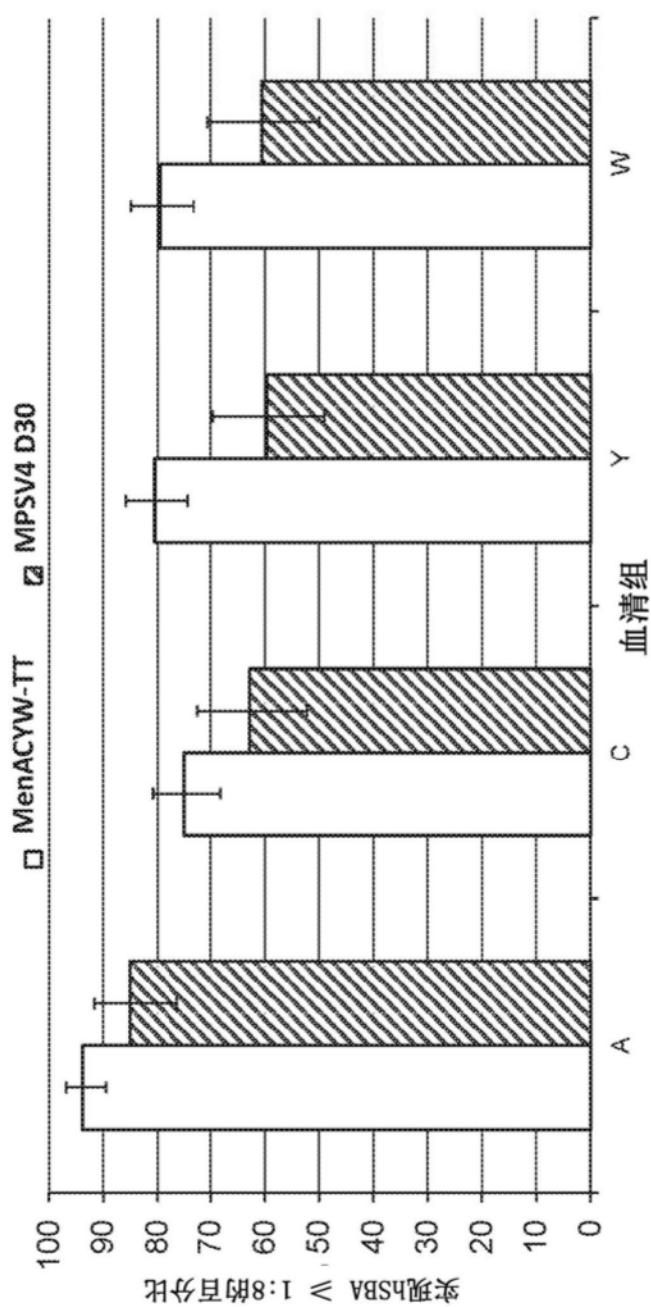


图10

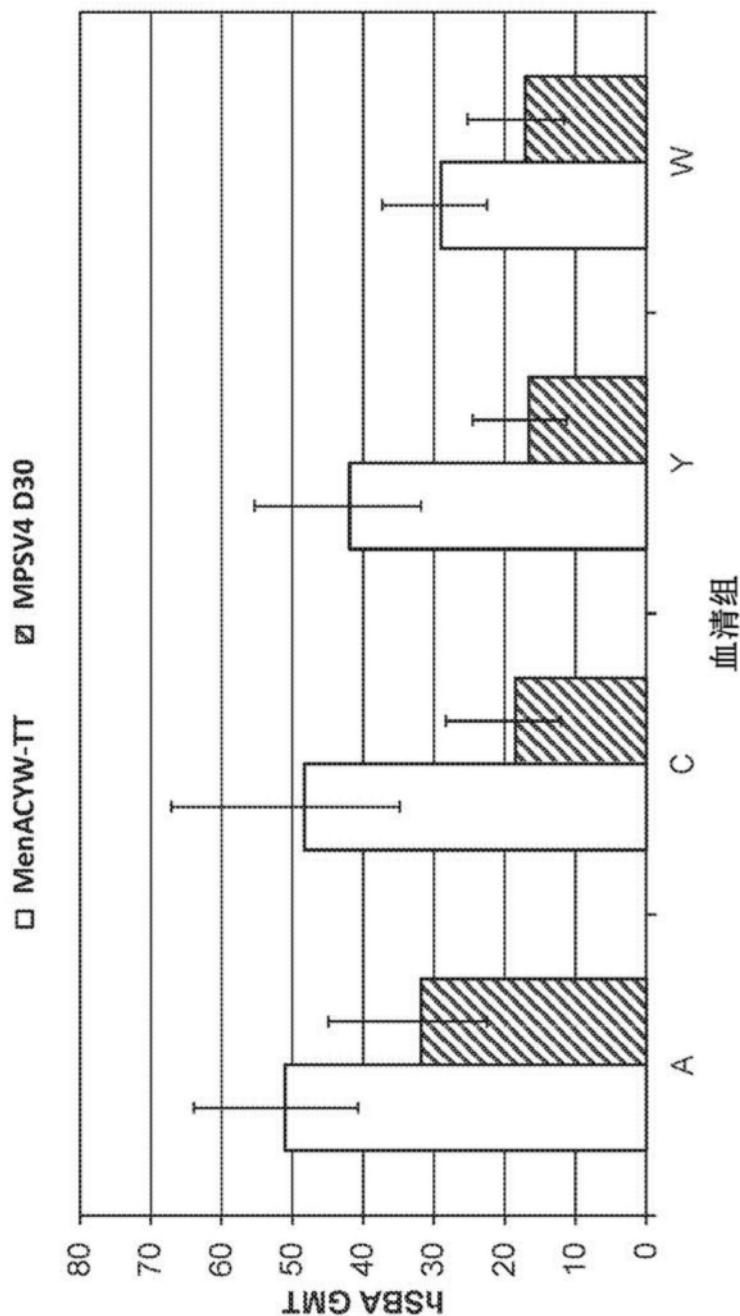


图11

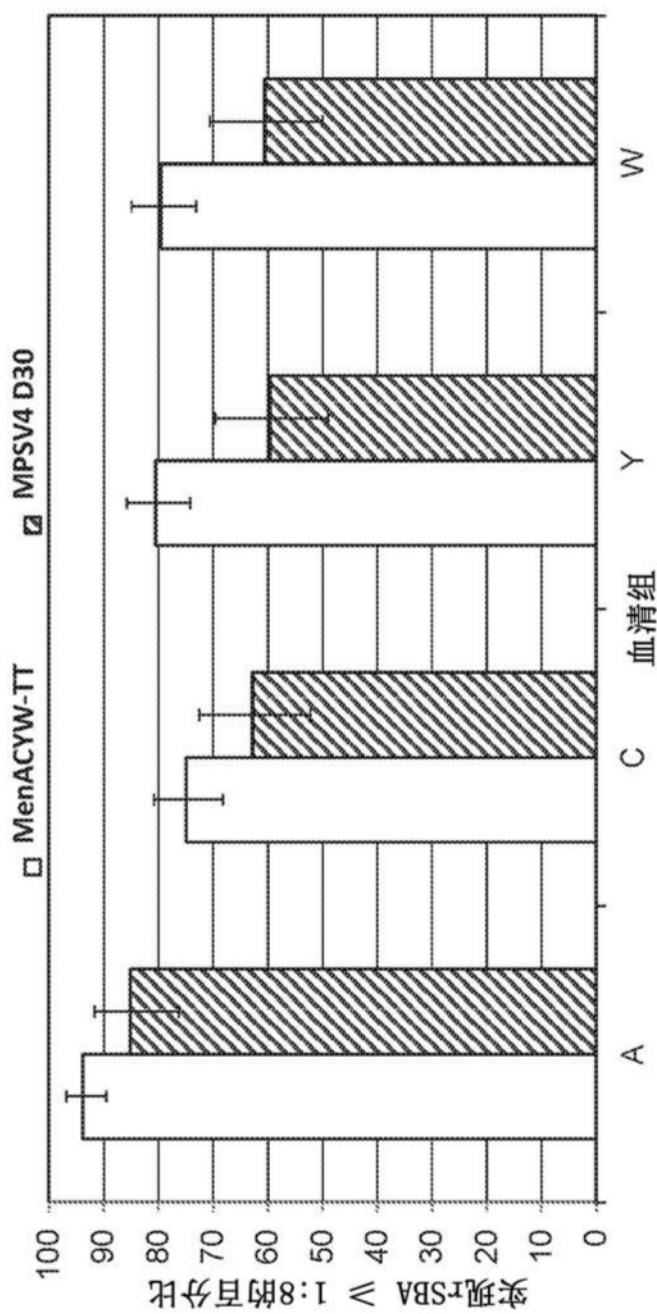


图12

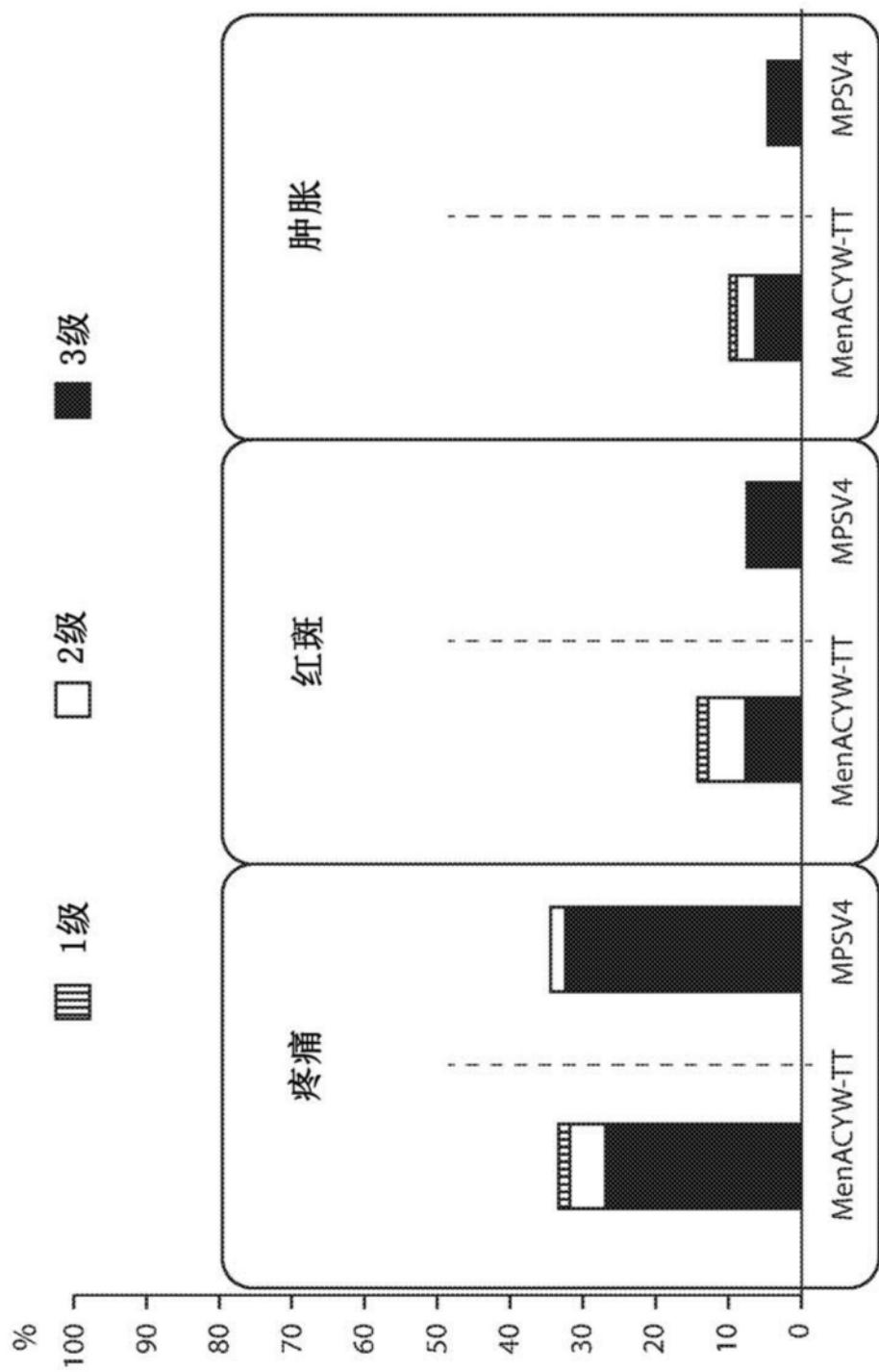


图13

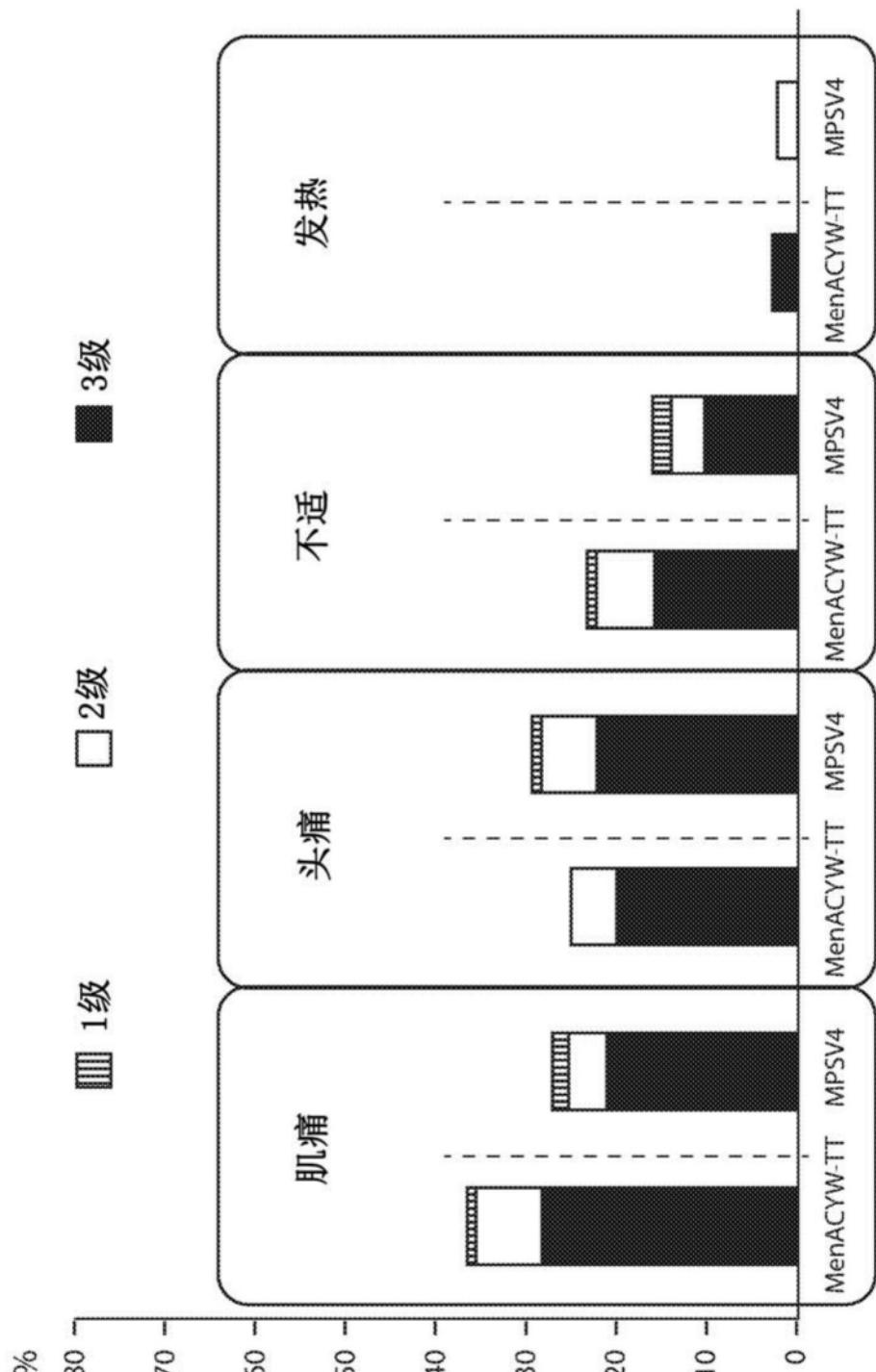
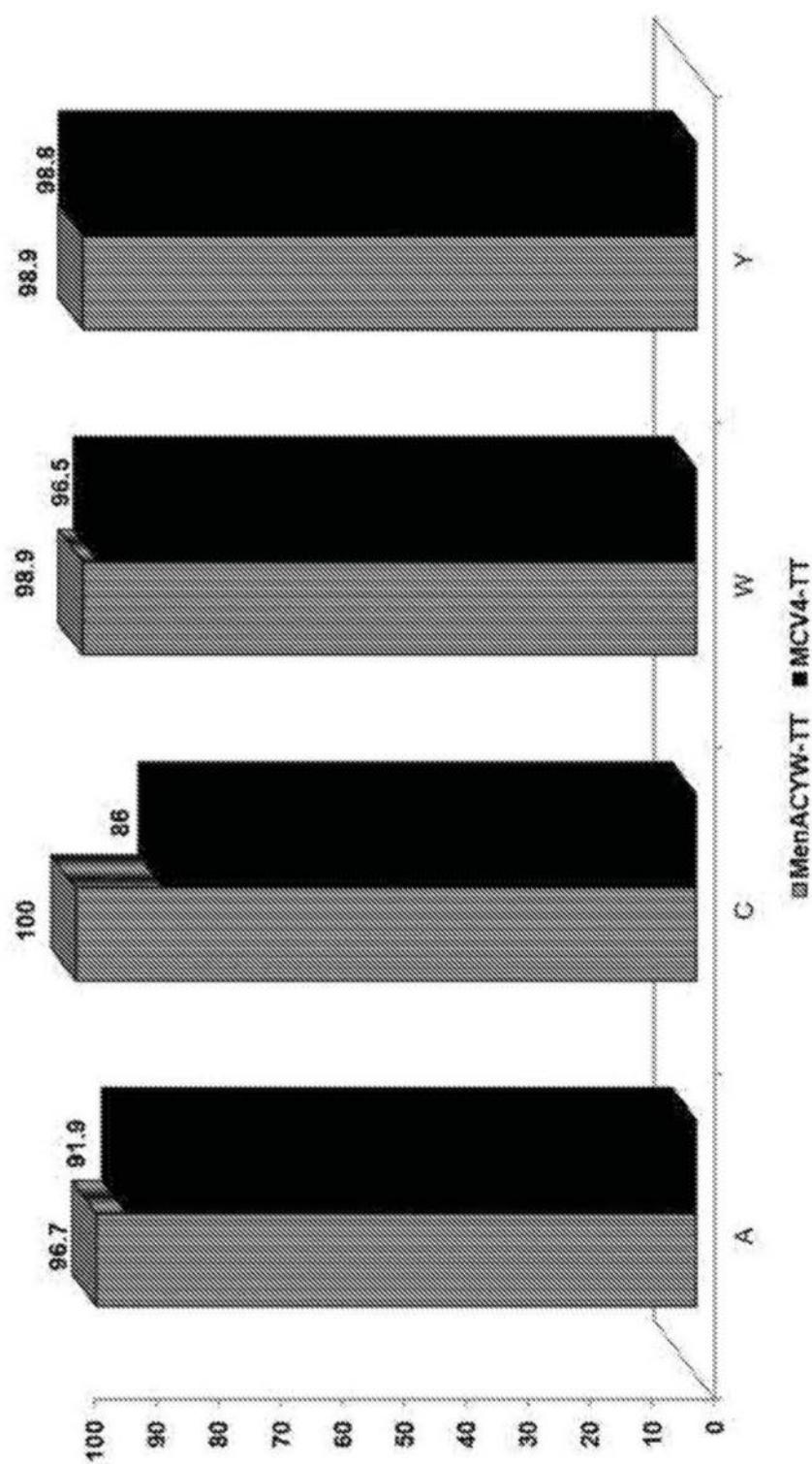
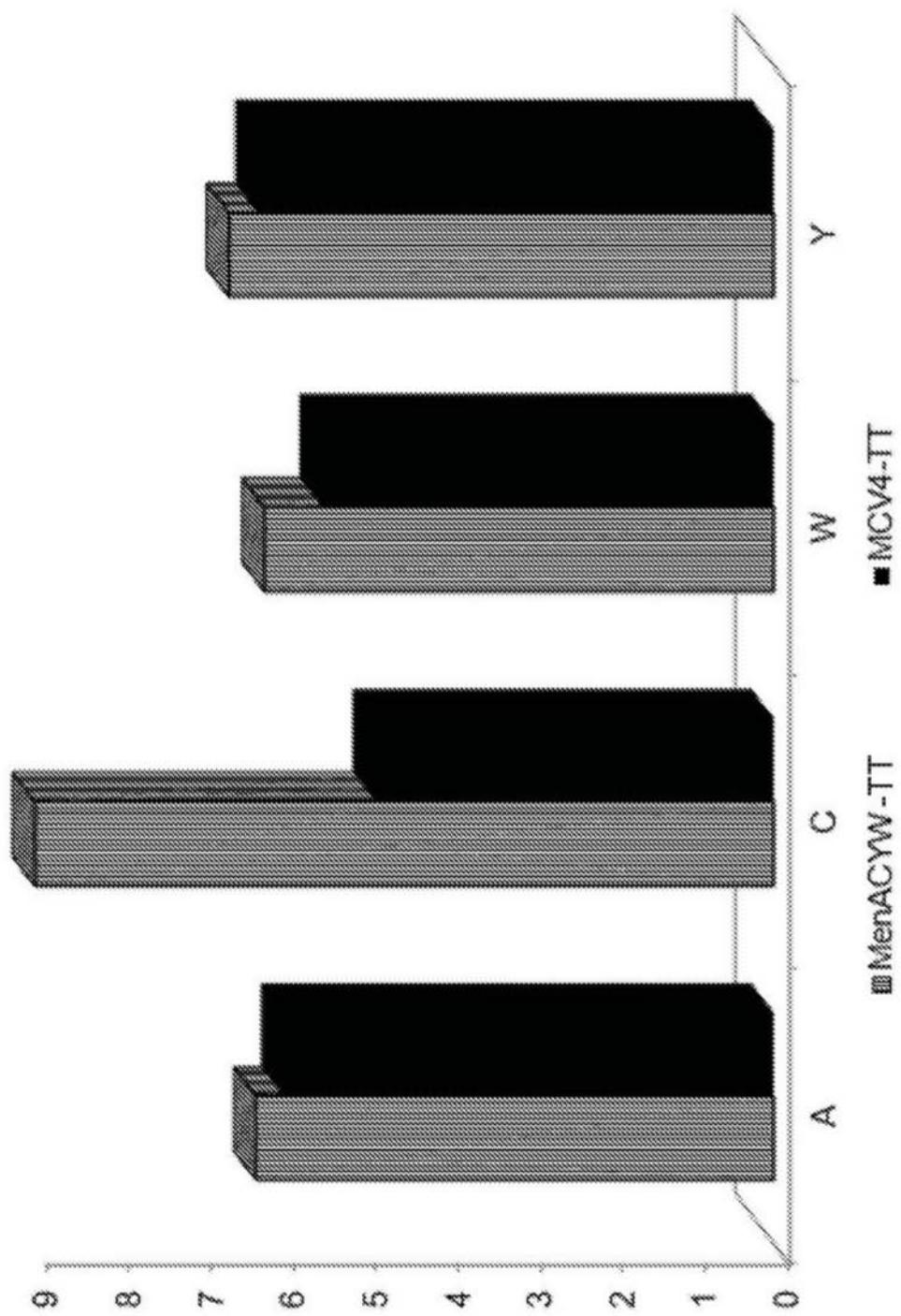


图14



具有hSBA荧苗血清反应的受试者的百分比

图15



Log₂(hsBA₂基质接种后GMT)

图16

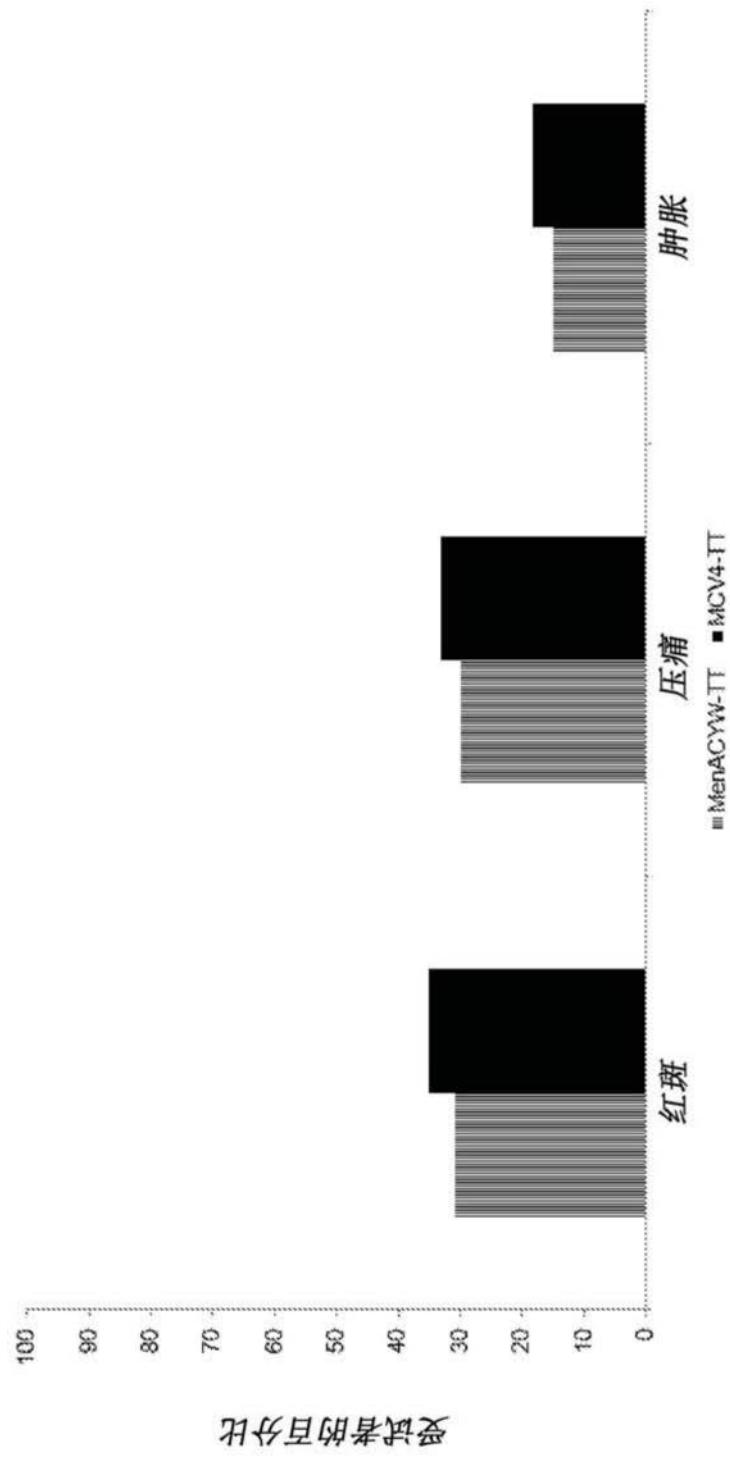


图17

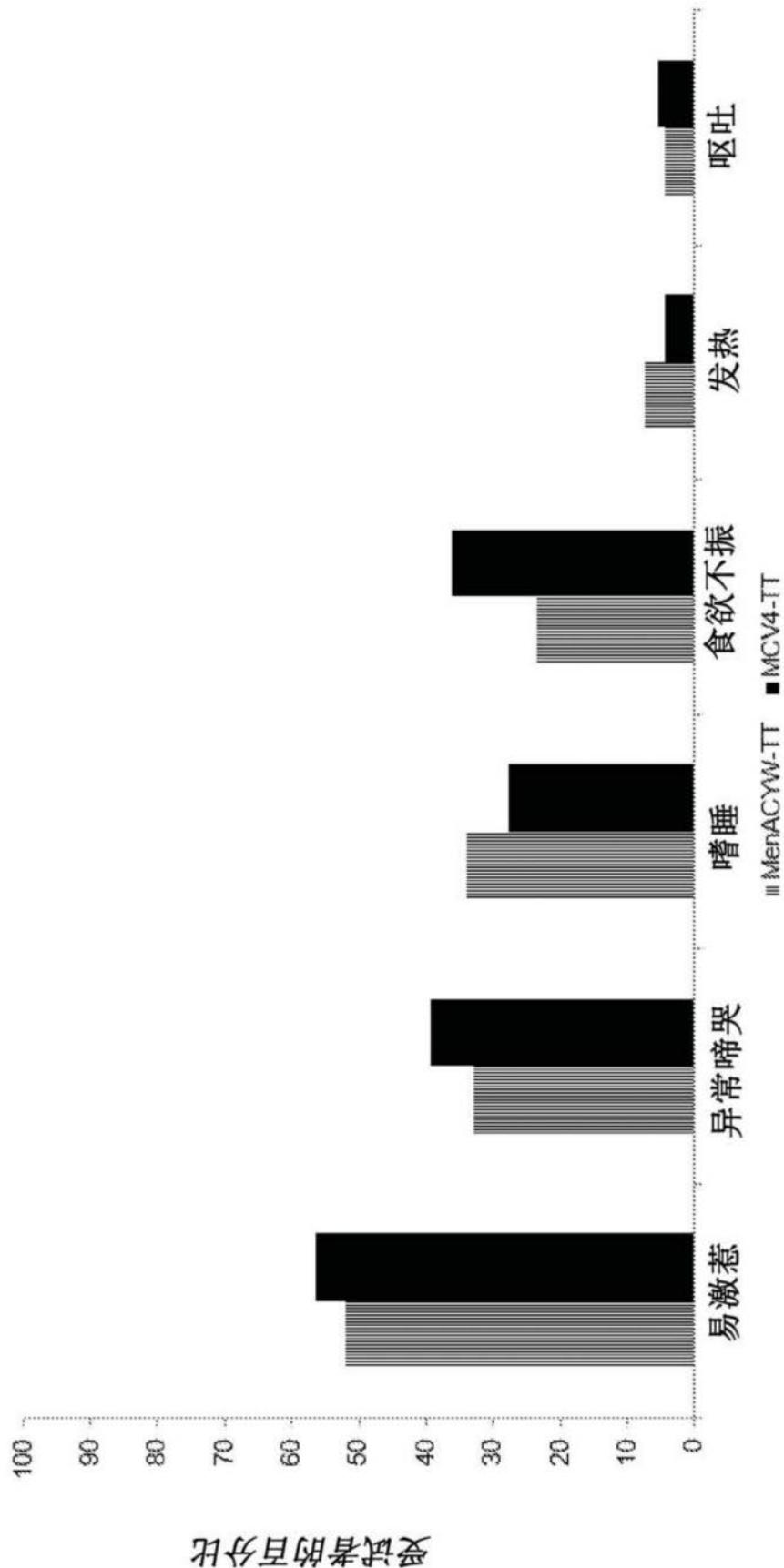


图18