



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101208103 B

(45) 授权公告日 2013. 04. 24

(21) 申请号 200680023334. 4

(22) 申请日 2006. 06. 23

(30) 优先权数据

0513069. 5 2005. 06. 27 GB

0513071. 1 2005. 06. 27 GB

0515556. 9 2005. 07. 28 GB

0524204. 5 2005. 11. 28 GB

0526040. 1 2005. 12. 21 GB

0526041. 9 2005. 12. 21 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 12. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2006/006269 2006. 06. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02007/000342 EN 2007. 01. 04

(73) 专利权人 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司

地址 比利时里克森萨特

(72) 发明人 R·L·比曼斯 D·布特里奥

C·卡皮奥 P·德内尔

P·迪维维耶 J·普尔曼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 刘健 梁谋

(51) Int. Cl.

A61K 39/095(2006. 01)

A61K 39/102(2006. 01)

A61K 39/116(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1518456 A, 2004. 08. 04, 摘要, 说明书第 2 — 5 页.

WO 2004067030 A2, 2004. 08. 12, 第 2 页第 1 — 20 行, 第 10 页第 34 — 38 行, 第 11 页第 1 — 2 段、第 20 — 30 行.

CN 1401328 A, 2003. 03. 12, 全文.

WO 2004/103400 A2, 2004. 12. 02, 第 7 页倒数第 1 段, 第 8 页第 1 段, 第 9 页倒数第 1 段, 第 10 页第 1、3 — 4 段.

审查员 张颖

(54) 发明名称

免疫原性组合物

(57) 摘要

本申请公开了一种包含至少 2 种不同脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖的免疫原性组合物, 其中一种或多种所述糖选自由通过连接物缀合到载体蛋白上的 MenA、MenC、MenY 和 MenW 组成的第一组, 而一种或多种不同的糖选自由直接缀合到载体蛋白上的 MenA、MenC、MenY 和 MenW 组成的第二组。

权利要求书1页 说明书35页 附图1页

1. 一种包含至少 2 种不同脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖的免疫原性组合物,其中一种或多种糖选自由通过连接物缀合到破伤风类毒素载体蛋白上的 MenA 和 MenC 组成的第一组,而其他一种或多种不同的糖选自由直接缀合到破伤风类毒素载体蛋白上的 MenC、MenY 和 MenW 组成的第二组,其中在所述免疫原性组合物中, MenA 和 MenC 荚膜糖通过连接物缀合到载体蛋白上,并且 MenY 和 MenW 荚膜糖直接缀合到载体蛋白上,或者在所述免疫原性组合物中, MenA 荚膜糖通过连接物缀合到载体蛋白上,并且 MenC、MenY 和 MenW 荚膜糖直接缀合到破伤风类毒素载体蛋白上。

2. 如权利要求 1 所述的免疫原性组合物,其中至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖是用 CDAP 化学直接缀合的。

3. 如权利要求 1 所述的免疫原性组合物,其中至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖是通过双官能性的连接物缀合到载体蛋白上的。

4. 一种疫苗,其包含如权利要求 1-3 任意一项所述免疫原性组合物和药学上可接受的赋形剂。

5. 一种如权利要求 4 所述的疫苗的制备方法,其包括将权利要求 1-3 任意一项所述的免疫原性组合物与药学上可接受的赋形剂相混合的步骤。

6. 如权利要求 1-3 任意一项所述的免疫原性组合物在制备用于治疗或预防由脑膜炎奈瑟氏球菌感染所引起疾病的药物中的用途。

免疫原性组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及一种免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含缀合到载体蛋白上的细菌荚膜糖,尤其是那些脑膜炎奈瑟氏球菌 (*N.meningitidis*) 糖。其还涉及包含这样的糖缀合物的疫苗和疫苗试剂盒、制备所述免疫原性组合物和疫苗的方法以及本发明疫苗和免疫原性组合物在治疗中的用途。其还涉及使用糖缀合物来抗感染的免疫方法以及糖缀合物在制备药物方面的用途。

[0002] 脑膜炎奈瑟氏球菌是革兰氏阴性人感染性病原体,其能够引起细菌性脑膜炎。以有机体的荚膜多糖为基础,脑膜炎奈瑟氏球菌的十二个血清群已经得到了鉴定 (A, B, C, H, I, K, L, 29E, W135, X, Y 和 Z)。血清群 A (MenA) 是导致撒哈拉以南非洲地区的流行病的最常见原因。血清群 B 和 C 是导致发展中国家的大多数情况的原因,剩余的情况是由 W135 和 Y 引起的)。

[0003] 包含缀合到载体蛋白上的脑膜炎奈瑟氏球菌糖的免疫原性组合物是本领域已知的;载体蛋白具有将 T 细胞非依赖型多糖抗原转化为能够引发免疫记忆应答的 T 细胞依赖型抗原的已知作用。例如 W002/58737 公开了一种含有纯化的荚膜多糖的疫苗,所述纯化的荚膜多糖来自于脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 A、C、W135 和 Y 并且是缀合到载体蛋白上的。然而,该申请教导,所有的多糖必须基本上以同样的方式(通过相同的连接基连接到相同的蛋白载体上)进行缀合。

[0004] 仍存在对开发改善的抗奈瑟氏脑膜炎缀合疫苗的需要。本发明涉及提供一种脑膜炎球菌多糖缀合疫苗,其中可以设计每种多糖的缀合方式(而不是统一的)以获得有效的组合疫苗。特别地,使用连接分子将某些脑膜炎球菌缀合到它们的蛋白载体上而同时其它的脑膜炎球菌进行直接缀合是有利的。以这种方式,可以将那些是次好的免疫原的多糖通过连接物提供给免疫系统,而那些是非常好的免疫原的多糖则可以被直接地缀合以使得它们不会控制对组合物的免疫应答。

[0005] 因此,本发明的一个方面提供了一种包含至少 2 种不同脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖的免疫原性组合物,其中一种或多种所述糖选自由通过连接物缀合到载体蛋白上的 MenA、MenC、MenY 和 MenW 组成的第一组,而一种或多种不同的糖选自由直接缀合到载体蛋白上的 MenA、MenC、MenY 和 MenW 组成的第二组。

[0006] 例如,在 MenAC 疫苗中, MenA 可以通过连接物缀合而 MenC 可以直接地缀合。在 MenCY 疫苗中, MenC 可以通过连接物缀合而 MenY 可以直接地缀合。在 MenACWY 疫苗中, MenA 可以通过连接物缀合而 MenCWY 可以直接地缀合,或者 MenAC 可以通过连接物缀合而 MenWY 可以直接地缀合。

[0007] 对于含有缀合到相同载体上的多种糖的组合疫苗来说,一个值得考虑的问题是载体的免疫抑制作用;可能使用了太多的载体从而可能抑制了免疫应答。用统一的方法缀合载体将向免疫系统呈现相似的 B- 和 T- 细胞抗原表位的混合。然而,如果一种糖和另一种糖的缀合发生在载体蛋白内的不同化学基团上,则蛋白载体在怎样将它们自身呈现给免疫系统方面可能会有某种程度的不同。

[0008] 因此,在本发明单独的实施方案中提供了一种包含至少 2 种不同糖的免疫原性组合物,所述糖是分别缀合到同类载体蛋白(例如破伤风类毒素)上的,其中一种或多种糖是通过蛋白载体上的第一类化学基团缀合到载体蛋白上的,一种或多种糖是通过蛋白载体上的第二类(不同的)化学基团缀合到载体蛋白上的。

[0009] 第一和第二类化学基团可以存在于蛋白载体中在蛋白载体的互相排斥的第一和第二系列氨基酸(例如一个系列中的某些天冬氨酸/谷胺酸残基和第二系列中的某些赖氨酸残基)上。例如可以将一种糖缀合到载体上的羧基上,而将另一种糖缀合到氨基上。这样的缀合可以包括每种不同缀合物的在单独的 B- 和 / 或 T- 细胞抗原表位上的缀合。

[0010] 例如在 MenAC 疫苗中,可以将 MenA 连接到载体蛋白上的第一类化学基团(例如羧基)上,而将 MenC 连接到第二类(例如氨基)上。在 MenCY 疫苗中,可以将 MenC 连接到载体蛋白上的第一类化学基团(例如羧基)上,而将 MenY 连接到第二类(例如氨基)上。在 MenACWY 疫苗中,可以将 MenAC 连接到载体蛋白上的第一类化学基团(例如羧基)上,而将 MenWY 连接到第二类(例如氨基)上,或者可以将 MenA 连接到载体蛋白上的第一类化学基团(例如羧基)上,而将 MenCWY 连接到第二类(例如氨基)上。

[0011] 根据本发明更进一步的方面,其提供了一种使人宿主对由脑膜炎奈瑟氏球菌引起的疾病具有免疫性的方法,其包括向宿主给药以免疫保护剂量的本发明免疫原性组合物或疫苗。

[0012] 根据本发明更进一步的方面,其提供了一种用于治疗或预防由脑膜炎奈瑟氏球菌引起的疾病的本发明免疫原性组合物。

[0013] 根据本发明更进一步的方面,其提供了本发明免疫原性组合物或疫苗在制备治疗或预防由脑膜炎奈瑟氏球菌引起的疾病的药物方面的用途。

[0014] 附图描述

[0015] 图 1-A- 条形图显示了在抗 -MenY ELISA 中的 GMC 应答。ENYTT012 是由天然 MenY 多糖制备的 MenY-TT 缀合物。ENYTT014 是由微流化 MenY 多糖制备的 MenY-TT 缀合物,其中所述 MenY 多糖经历了 40 个周期的微流化作用。ENYTT015bis 是由微流化 MenY 多糖制备的 MenY-TT 缀合物,其中所述 MenY 多糖经历了 20 个周期的微流化作用。

[0016] -B- 条形图显示了在抗 -MenY SBA 试验中的 GMT 应答。ENYTT012 是由天然 MenY 多糖制备的 MenY-TT 缀合物。ENYTT014 是由微流化 MenY 多糖制备的 MenY-TT 缀合物,其中所述 MenY 多糖经历了 40 个周期的微流化作用。ENYTT015bis 是由微流化 MenY 多糖制备的 MenY-TT 缀合物,其中所述 MenY 多糖经历了 20 个周期的微流化作用。

[0017] 详细描述

[0018] 本发明的一个方面提供了一种包含至少 2 种不同脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖的免疫原性组合物,其中一种或多种荚膜糖选自由通过连接物缀合到载体蛋白上的 MenA、MenC、MenY 和 MenW 组成的第一组,一种或多种不同的糖选自由直接缀合到载体蛋白上的 MenA、MenC、MenY 和 MenW 组成的第二组。

[0019] 更具体地说是,第一组可以由 MenA 和 MenC,第二组由 MenC、MenY 和 MenW 组成。本发明的一个具体实施方案是下述的免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含:通过连接物缀合到载体蛋白上的 MenA 荚膜糖和直接缀合到载体蛋白上的 MenC 荚膜糖;通过连接物缀合到载体蛋白上的 MenC 荚膜糖和直接缀合到载体蛋白上的 MenY 荚膜糖;通过连接物缀

合到载体蛋白上的 MenA 和 MenC 荚膜糖和直接缀合到载体蛋白上的 MenY 和 MenW 荚膜糖 ; 通过连接物缀合到载体蛋白上的 MenA 荚膜糖和直接缀合到载体蛋白上的 MenC、MenY 和 MenW 荚膜糖。在所有这些实施方案中还可以包括 Hib 缀合物, 它是直接或通过连接物连接到载体蛋白 (参见上文或下文中的载体列表, 例如 TT) 上的。

[0020] 在整个本说明书中, 术语“糖”可以表示多糖或低聚糖, 或者两者都包含。多糖是从细菌中分离出来的, 或者是从细菌中分离出来并通过已知方法 (参见例如 EP497524 和 EP497525) 以及任选地通过微流化作用将尺寸调整到某一程度的。可以调整多糖的尺寸从而减少多糖样品的粘度和 / 或改善缀合产品的过滤性。低聚糖的重复单元数少 (一般地具有 5-30 个重复单元), 其一般是水解的多糖。

[0021] 各脑膜炎奈瑟氏球菌 (和 / 或 Hib) 荚膜糖可以缀合到独立地选自 TT、DT、CRM197、TT 的 C 片段和蛋白 D 的载体蛋白上。可用于本发明缀合物的蛋白载体的更加全面的列表呈现于下文中。虽然可以将一种或多种脑膜炎奈瑟氏球菌 (和 / 或 Hib) 荚膜糖缀合到与其它糖不同的载体蛋白上, 但在一个实施方案中它们是全部缀合到相同载体蛋白上的。例如可以将它们全部缀合到相同的选自 TT、DT、CRM197、TT 的 C 片段和蛋白 D 的载体蛋白上。由于 CRM197 与 DT 的区别仅在于一个氨基酸, 因此在本文的上下文中认为它们是相同的载体蛋白。在一个实施方案中, 将存在的所有脑膜炎奈瑟氏球菌 (和 / 或 Hib) 荚膜糖都缀合到 TT 上。

[0022] 如果组合物中 2 种或 2 种以上糖的蛋白载体是相同的, 则可以将所述糖缀合到蛋白载体的相同分子上 (有 2 种以上的不同的糖缀合在载体分子上) [参见例如 W004/083251 ; 例如可以向单个的载体蛋白上缀合 MenA 和 MenC ; MenA 和 MenW ; MenA 和 MenY ; MenC 和 MenW ; MenC 和 MenY ; MenW 和 MenY ; MenA、MenC 和 MenW ; MenA、MenC 和 MenY ; MenA、MenW 和 MenY ; MenC、MenW 和 MenY ; MenA、MenC、MenW 和 MenY ; Hib 和 MenA ; Hib 和 MenC ; Hib 和 MenW ; 或 Hib 和 MenY]。或者可以将各糖分别缀合到蛋白载体的不同分子上 (蛋白载体的每种分子仅有一种糖缀合在其上面)。

[0023] 本申请第一方面的免疫原性组合物还可以具有本发明第二方面的任意或全部附加特征, 反之亦然。

[0024] 本发明的第二方面提供了一种包含至少 2 种分别缀合在同类载体蛋白上的不同糖缀合物的免疫原性组合物, 其中一种或多种糖是通过蛋白载体上的第一类化学基团缀合到载体蛋白上的, 而一种或多种糖是通过蛋白载体上的第二 (不同的) 类化学基团缀合到载体蛋白上的。

[0025] 在一个实施方案中所述的 2 种缀合物包含连接在相同载体上的相同的糖, 但所述糖是通过不同的缀合化学连接的。在另一个实施方案中所述的 2 种不同的糖是缀合到蛋白载体的不同基团上的。

[0026] “分别缀合到同类载体蛋白上”的意思是指将糖各自缀合到相同的载体上 (例如, 将 MenA 通过破伤风类毒素上的氨基缀合到破伤风类毒素上, 将 MenC 通过破伤风类毒素不同分子上的羧酸基团缀合到破伤风类毒素上。)

[0027] 荚膜糖可以是缀合到相同载体蛋白上的, 所述载体蛋白独立地选自 TT、DT、CRM197、TT 的 C 片段和蛋白 D。下文中给出了可用在本发明缀合物中的蛋白载体的更全面的列表。由于 CRM197 和 DT 的区别仅在于一个氨基酸, 所以在本文的上下文中认为它们是

相同的载体蛋白。在一个实施方案中,存在的所有荚膜糖都是缀合到 TT 上的。

[0028] 在一个实施方案中,蛋白载体上的第一和第二类化学基团是存在于载体蛋白上单独的 B- 和 / 或 T- 细胞抗原表位上的。也就是说,它们彼此存在于不同系列的 B- 和 / 或 T- 细胞抗原表位上。可以使用已知方法例如以下两种方法中的任一种或两种来预测用作载体的 B- 细胞抗原表位: 2D- 结构预测和 / 或抗原指数预测。2D- 结构预测可以使用 PSIPRED 程序进行(来自 David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, UK)。抗原指数可以以 Jameson 和 Wolf (CABIOS 4:181-186[1988]) 所描述的方法为基础进行计算。该程序中所使用的参数是抗原指数和抗原肽的最小长度。在该程序中可以使用对于最少 5 个连续氨基酸的 0.9 的抗原指数作为初始值。T- 辅助细胞抗原表位是结合在 HLA 类 II 型分子上的肽,并且其能够被 T- 辅助细胞识别。对有效 T- 辅助细胞抗原表位的预测可以基于已知技术进行,所述已知技术例如 Sturniolo 等人描述的 TEPITOPE 法。(Nature Biotech. 17:555-561[1999])。

[0029] 所述糖可以选自: 脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 A 荚膜糖 (MenA)、脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 C 荚膜糖 (MenC)、脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 Y 荚膜糖 (MenY)、脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 W 荚膜糖 (MenW)、流感嗜血杆菌 (*H. influenzae*) b 型荚膜糖 (Hib)、B 群链球菌 (*Streptococcus*) I 群荚膜糖、B 群链球菌 II 群荚膜糖、B 群链球菌 III 群荚膜糖、B 群链球菌 IV 群荚膜糖、B 群链球菌 V 群荚膜糖、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 5 型荚膜糖、金黄色葡萄球菌 8 型荚膜糖、来自伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 的 Vi 糖、脑膜炎奈瑟氏球菌 LPS (例如 L3 和 / 或 L2)、卡他莫拉菌 (*M. catarrhalis*) LPS 和来自任意的荚膜肺炎球菌糖例如来自血清型: 1、2、3、4、5、6A、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 或 33F。在一个实施方案中本发明的免疫原性组合物是由来自同属细菌(例如,奈瑟氏球菌属、链球菌属、葡萄球菌属或嗜血杆菌属)的两种或两种以上的不同的糖组成的,或者其包含来自同属细菌的两种或两种以上的不同的糖。

[0030] 存在于蛋白载体上的第一和第二化学基团是彼此不同的,并且理想地是可以易于用于缀合目的的天然化学基团。它们可以独立地选自: 羧基、氨基、巯基、羟基、咪唑基、胍基和吡啶基。在一个实施方案中,第一化学基团是羧基,第二化学基团是氨基,或者相反。对于这些基团在下文中有更加详细的解释。

[0031] 在一个具体的实施方案中,免疫原性组合物包含至少 2 种不同的脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖,其中一种或多种选自由 MenA 和 MenC 组成的第一组,其中所述 MenA 和 MenC 是通过蛋白载体上的第一类化学基团(例如羧基)缀合到载体蛋白上的,一种或多种不同的糖选自由 MenC、MenY 和 MenW 组成的第二组,其中所述 MenC、MenY 和 MenW 是通过蛋白载体上的第二类化学基团(例如氨基)缀合到载体蛋白上的。

[0032] 在进一步的实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含通过第一类化学基团(例如羧基)缀合的 MenA 和通过第二类化学基团(例如氨基)缀合的 MenC。

[0033] 在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含通过第一类化学基团(例如羧基)缀合的 MenC 和通过第二类化学基团(例如氨基)缀合的 MenY。

[0034] 在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含通过第一类化学基团(例如羧基)缀合的 MenA 和通过第二类化学基团(例如氨基)缀合的 MenC、MenY 和 MenW。

[0035] 在另一个实施方案中,免疫原性组合物包含通过第一类化学基团(例如羧基)缀

合的 MenA 和 MenC, 和通过第二类化学基团(例如氨基)缀合的 MenY 和 MenW。

[0036] 在任意以上的实施方案中, 还可以存在 Hib, 其是缀合到同类蛋白载体上的。可以将 Hib 通过第一或第二类化学基团缀合到载体上。在一个实施方案中其是通过羧基缀合的。

[0037] 本发明各方面的概述

[0038] 包含于本发明药物(免疫)组合物中的本发明的糖(特别是脑膜炎奈瑟氏球菌糖和/或 Hib 荚膜糖)是缀合到载体蛋白上的, 所述载体蛋白例如破伤风类毒素(TT)、破伤风类毒素片段 C、破伤风类毒素的无毒突变株[注意, 为了本发明的目的, 所有这样的 TT 变形株均被认为是同一种载体蛋白]、白喉类毒素(DT)、CRM197、白喉类毒素的其它无毒突变株[例如 RM176、CRM 197、CRM228、CRM 45(Uchida 等人, J. Biol. Chem. 218 ;3838-3844, 1973); CRM 9、CRM45、CRM102、CRM103 和 CRM107 以及 Nicholls 和 Youle 在 Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc. 1992 中描述的其它突变株; Glu-148 到 Asp 的缺失或突变、Gln 或 Ser 和/或 Ala158 到 Gly 的突变以及 US4709017 或 US4950740 中公开的其它突变; 残基 Lys516、Lys526、Phe530 和/或 Lys534 中的至少一种或多种的突变以及 US5917017 或 US6455673 中公开的其它突变; 或 US5843711 中公开的片段](注意, 为了本发明的目的, 所有这样的 DT 变形株均被认为是同一类载体蛋白)、肺炎球菌的肺炎球菌溶血素(Kuo 等人(1995) Infect Immun 63 ;2706-13)、OMPC(脑膜炎球菌的外膜蛋白一通常提取自脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 B-EP0372501)、合成肽(EP0378881, EP0427347)、热休克蛋白(W093/17712, W094/03208)、百日咳蛋白(W098/58668, EP0471177)、细胞因子、淋巴因子、生长因子或激素(W091/01146)、包含多个人类 CD4+T 细胞抗原表位的人工蛋白, 其中所述人工蛋白来自于由抗原衍生的多种病原体(Falugi 等人(2001) Eur J Immunol 31 ;3816-3824) 例如 N19 蛋白(Baraldoi 等人(2004) Infect Immun 72 ;4884-7) 肺炎球菌表面蛋白 PspA(W002/091998)、铁吸收蛋白(W001/72337)、难辨梭状芽孢杆菌毒素 A 或 B(W000/61761) 或蛋白 D(EP594610 和 W000/56360)。

[0039] 在一个实施方案中, 本发明的免疫原性组合物在其所含有的至少两种、三种、四种或每种糖(例如脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖和/或 Hib) 中(独立地)使用了同一类型的载体蛋白。在一个含有 Hib 和脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖的实施方案中, 可以将 Hib 缀合到与至少两种、三种、四种或每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖所缀合的载体蛋白相同类型的载体蛋白上。例如, 将 2、3、或 4 种脑膜炎奈瑟氏球菌糖(MenA、C、Y、W) 独立地缀合到破伤风类毒素上以制备 2、3 或 4 缀合物, 并且任选地将 Hib 也缀合到 TT 上。

[0040] 在一个实施方案中, 本发明的免疫原性组合物包含缀合到选自 TT、DT、CRM197、TT 的 C 片段和蛋白 D 的载体蛋白上的脑膜炎奈瑟氏球菌糖。在一个实施方案中, 本发明的免疫原性组合物包含缀合到选自 TT、DT、CRM197、TT 的 C 片段和蛋白 D 的载体蛋白上的 Hib 糖。

[0041] 本发明的免疫原性组合物任选地包含至少一种脑膜炎双球菌糖(例如, MenA ; MenC ; MenW ; MenY ; MenA 和 MenC ; MenA 和 MenW ; MenA 和 MenY ; MenC 和 Men W ; Men C 和 MenY ; Men W 和 MenY ; MenA、MenC 和 MenW ; MenA、MenC 和 MenY ; MenA、MenW 和 MenY ; MenC、MenW 和 MenY 或 MenA、MenC、MenW 和 MenY) 缀合物, 所述缀合物的 Men 糖与载体蛋白的比例在 1 : 5 至 5 : 1, 1 : 2 至 5 : 1, 1 : 0.5 至 1 : 2.5 或 1 : 1.25 至 1 : 2.5(w/w) 之间。

[0042] 本发明免疫原性组合物任选地包含 Hib 糖缀合物, 所述缀合物的 Hib 与载体蛋白

的比例在 1 : 5 至 5 : 1 ; 1 : 2 至 2 : 1 ; 1 : 1 至 1 : 4 ; 1 : 2 至 1 : 3.5 之间 ; 或者在 1 : 2.5 或 1 : 3 左右, 或刚好为 1 : 2.5 或 1 : 3 (w/w)。

[0043] 缀合物中糖与载体蛋白的比例 ((w/w) 可以用灭菌后的缀合物来确定。蛋白的量是使用 Lowry 试验 (例如 Lowry 等人 (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 或者 Peterson 等人 *Analytical Biochemistry* 100, 201-220 (1979)) 确定的, 糖的量对于 MenA 是使用 ICP-OES (感应耦合等离子体 - 发射光谱) 确定的, 对于 MenC 是使用 DMAP 试验确定的, 对于 MenW 和 MenY 是使用苯二酚试验 (Resorcinol assay) (Monsigny 等人 (1988) *Anal. Biochem.* 175, 525-530) 确定的。

[0044] 在一个实施方案中, 本发明的免疫原性组合物包含脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物和 / 或 Hib 糖缀合物, 其中所述脑膜炎奈瑟氏球菌糖和 / 或 Hib 糖是通过连接物, 例如双官能连接物, 缀合到载体蛋白上的。连接物任选地是异双官能的或同双官能的, 其具有例如反应性氨基基团和反应性羧酸基团、2 个反应性氨基基团或者两个反应性羧酸基团。连接物具有例如 4 到 20, 4 到 12, 5 到 10 个碳原子。可能的连接物是 ADH。其它连接物包括 B- 丙酰胺基 (W000/10599)、硝基苯 - 乙胺 (Gever 等人 (1979) *Med. Microbiol. Immunol.* 165 ; 171-288)、卤代烷基卤化物 (US4057685)、糖苷键 (US4673574, US4808700)、己二胺和 6- 氨基己酸 (US4459286)

[0045] 存在于本发明免疫原性组合物中的糖缀合物可以通过任何已知的偶联技术制备。缀合方法可以借助用 1- 氰基 -4- 二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐 (CDAP) 使糖活化以形成氰酸酯。这样, 活化的糖就可以直接地或通过间隔 (连接) 基团被偶合到载体蛋白的氨基上。例如, 间隔物可以是脒胺或半脒胺以提供硫醇化糖, 所述硫醇化糖能够通过硫醚键偶合到载体上, 所述硫醚键是在与马来酰亚胺 - 活化载体蛋白 (例如使用 GMBS) 或卤代乙酰化载体蛋白 (例如使用碘代乙酰亚胺或溴乙酸 N- 琥珀酰亚胺酯) 反应后获得的。任选地, 将氰酸酯 (任选地是通过 CDPA 化学制得的) 与己二胺或 ADH 偶合, 并且将氨基 - 衍生化的糖用碳二亚胺 (例如 EDC 或 EDC) 化学通过蛋白载体上的羧基缀合到载体蛋白上。这样的缀合物描述于 PCT 公开申请 W093/15760 Uniformed Services University 和 W096/08348 和 W096/29094 中。

[0046] 其它合适的技术使用了碳二亚胺、酰肼、活性酯、降冰片烷、对 - 硝基苯甲酸、N- 羟基琥珀酰亚胺、S-NHS、EDC、TSTU。许多描述于 W098/42721 中。缀合可以使用羰基连接物, 其可以通过使糖的游离羟基基团与 CDI 反应 (Bethell 等人 *J. Biol. Chem.* 1979, 254 ; 2572-4, Hearn 等人 *J. Chromatogr.* 1981. 218 ; 509-18) 后接着与蛋白反应以形成氨基甲酸酯连接而形成。其可以包括将异头端基还原为伯羟基 ; 任选地进行伯羟基基团的保护 / 脱保护反应, 所述反应为使伯羟基与 CDI 反应以形成氨基甲酸 CDI 酯中间体以及使氨基甲酸 CDI 酯中间体与蛋白上的氨基偶合。

[0047] 缀合物也可以如 US4365170 (Jennings) 和 US 4673574 (Anderson) 中所描述的那样通过直接还原氨化的方法来制备。其它方法描述于 EP-0-161-188、EP-208375 和 EP-0-477508 中。

[0048] 进一步的方法包括将溴化氰 (或 CDAP) 活化的糖通过碳二亚胺缩合作用 (Chu C. 等人 *Infect. Immunity*, 1983 245256), 例如使用 EDC, 偶合到蛋白载体上, 其中所述糖是用己二酸二酰肼 (ADH) 衍生化的。

[0049] 在一个实施方案中,将糖上的羟基(任选地为活化的羟基,例如用氰酸酯活化的羟基)直接地或间接地(通过连接物)连接到蛋白上的氨基或羧基上。当存在连接物时,将糖上的羟基任选地连接到连接物上的氨基上,例如通过使用 CDAP 缀合。可以将连接物(例如 ADH)中的其它氨基基团缀合到蛋白上的羧酸基团上,例如通过使用碳二亚胺化学,例如通过使用 EDAC。在一个实施方案中,在将连接物缀合到载体蛋白上之前,先将 Hib 或脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖(或通常所说的糖)缀合到第一连接物上。或者在缀合到糖上之前,可以先将连接物缀合到载体上。

[0050] 通常,蛋白载体上可以用于偶合/缀合的化学基团的类型如下:

[0051] A) 羧基(例如通过天冬氨酸或谷氨酸)。在一个实施方案中将该基团直接连接到糖上的氨基基团上,或者用碳二亚胺化学例如用 EDAC 连接到连接物上的氨基基团上。

[0052] B) 氨基(例如通过赖氨酸)。在一个实施方案中将该基团直接连接到糖上的羧基基团上,或者用碳二亚胺化学例如用 EDAC 连接到连接物上的羧基基团上。在一个实施方案中将该基团直接连接到糖上用 CDAP 或 CNBr 活化的羟基上,或者连接到连接物上的上述基团上;连接到具有醛基的糖或连接物上;连接到具有琥珀酰亚胺酯基的糖或连接物上。

[0053] C) 巯基(例如通过半胱氨酸)。在一个实施方案中将该基团连接到溴或氯乙酰化的糖上,或者用马来酰亚胺化学连接到连接物上。在一个实施方案中该基团是用双二重氮联苯胺(bis diazobenzidine)活化/修饰的。

[0054] D) 羟基(例如通过酪氨酸)。在一个实施方案中该基团是用双二重氮联苯胺活化/改性的。

[0055] E) 咪唑基(例如通过组氨酸)。在一个实施方案中该基团是用双二重氮联苯胺活化/改性的。

[0056] F) 胍基(例如通过精氨酸)。

[0057] G) 吡啶基(例如通过色氨酸)。

[0058] 在糖上,能够用于偶合的通常是以下基团:OH、COOH 或 NH₂。醛基能够在本领域已知的不同处理后产生,所述处理例如用高碘酸盐、酸解、过氧化氢等。

[0059] 直接偶合法:

[0060] 糖-OH+CNBr 或 CDAP----->氰酸酯+NH₂-Prot----->缀合物

[0061] 糖-醛+NH₂-Prot---->西佛碱+NaCNBH₃----->缀合物

[0062] 糖-COOH+NH₂-Prot+EDAC----->缀合物

[0063] 糖-NH₂+COOH-Prot+EDAC----->缀合物

[0064] 通过间隔物(连接物)的间接偶合法:

[0065] 糖-OH+CNBr 或 CDAP----->氰酸酯+NH₂-----NH₂----->糖-----

[0066] NH₂+COOH-Prot+EDAC----->缀合物

[0067] 糖-OH+CNBr 或 CDAP----->氰酸酯+NH₂-----SH----->糖-----SH+SH-Prot(具有暴露的半胱氨酸的天然蛋白,或是通过例如 SPDP 将蛋白的氨基改性后获得的)----->糖-S-S-Prot

[0068] 糖-OH+CNBr 或 CDAP----->氰酸酯+NH₂-----SH----->糖-----SH+马来酰亚胺-Prot(氨基的改性物)----->缀合物

[0069] 糖-COOH+EDAC+NH₂-----NH₂----->糖-----NH₂+EDAC+COOH-Prot----->缀合物

[0070] 糖-COOH+EDAC+NH₂-----SH----- > 糖-----SH+SH-Prot(具有暴露的半胱氨酸的天然蛋白,或是通过例如 SPDP 将蛋白的氨基改性后获得的)----- > 糖-S-S-Prot

[0071] 糖-COOH+EDAC+NH₂-----SH----- > 糖-----SH+马来酰亚胺-Prot(氨基的改性物)----- > 缀合物

[0072] 糖-醛+NH₂-----NH₂----- > 糖-----NH₂+EDAC+COOH-Prot----- > 缀合物

[0073] 注意:除了以上的 EDAC,还可以使用任何合适的碳二亚胺。

[0074] 总之,通常可以用于与糖偶合的蛋白载体化学基团的类型是氨基(例如赖氨酸残基上的)、COOH 基团(例如天冬氨酸和谷氨酸残基上的)和 SH 基团(如果能够获得的话)(例如半胱氨酸残基上的)。

[0075] 在一个实施方案中,将 Hib 糖,当存在时,用 CNBr、或 CDAP、或 CDAP 与碳二亚胺化学(例如 EDAC)的结合、或 CNBr 与碳二亚胺化学(例如 EDAC)的结合而缀合到载体蛋白上。任选地 Hib 是用 CNBr 和碳二亚胺化学缀合的,其中所述碳二亚胺化学任选地为 EDAC。例如,用 CNBr 连接糖和连接物,接着用碳二亚胺化学连接连接物和蛋白载体。

[0076] 在一个实施方案中,至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖(或通常所说的糖)是直接缀合到载体蛋白上的;任选地将 MenW 和 / 或 MenY 和 / 或 MenC 糖直接缀合到载体蛋白上。例如将 MenW ;MenY ;MenC ;MenW 和 MenY ;MenW 和 MenC ;MenY 和 MenC ;或 MenW、MenY 和 MenC 直接连接到载体蛋白上。任选地,脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖中的至少一种是通过 CDAP 直接缀合的。例如将 MenW ;MenY ;MenC ;MenW 和 MenY ;MenW 和 MenC ;MenY 和 MenC ;或 MenW、MenY 和 MenC 通过 CDAP 直接连接到载体蛋白上(参见 WO 95/08348 和 W096/29094)。在一个实施方案中,将所有的脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖均缀合到破伤风类毒素上。

[0077] 在一个实施方案中, MenW 和 / 或 Y 糖与载体蛋白的比例是 1 : 1.05 到 1 : 2(w/w),和 / 或 MenC 糖与载体蛋白的比例是 1 : 0.5 到 1 : 4 或 1 : 0.5 到 1 : 1.5(w/w),尤其是当这些糖是直接连接到所述蛋白上的时,其中所述连接任选地使用了 CDAP。

[0078] 在一个实施方案中,脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖(或通常所说的糖)中的至少一种是通过连接物,例如双官能连接物,缀合到载体蛋白上的。所述连接物任选地是异双官能的或是同双官能的,其具有例如反应性氨基基团和反应性羧酸基团、2 个反应性氨基基团或者 2 个反应性羧酸基团。连接物具有例如 4 到 20,4 到 12,5 到 10 个碳原子。可能的连接物是 ADH。

[0079] 在一个实施方案中, MenA ;MenC ;或 MenA 和 MenC 是通过连接物缀合到载体蛋白(例如破伤风类毒素)上的。

[0080] 在一个实施方案中,至少一种脑膜炎奈瑟氏球菌糖是通过连接物用 CDAP 和 EDAC 缀合到载体蛋白上的。例如,如上所述地将 MenA ;MenC ;或 MenA 和 MenC 通过连接物(例如那些在其端基上具有两个胍基的连接物如 ADH)用 CDAP 和 EDAC 缀合到蛋白上。例如,用 CDAP 将糖缀合到连接物上,用 EDAC 将连接物缀合到蛋白上。任选地,对于 MenA ;MenC ;或 MenA 和 MenC 来说,通过连接物的缀合导致糖与载体蛋白的比例在 1 : 0.5 到 1 : 6 ; 1 : 1 到 1 : 5 或 1 : 2 到 1 : 4 之间。

[0081] 在一个实施方案中, MenA 荚膜糖,当存在时其至少是部分 O-乙酰化的,从而使得至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%或 98%的重复单元在至少一个位置上是 O-乙酰化的。O-乙酰化例如出现在至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%或 98%的重复单元的至少

0-3 位置上。

[0082] 在一个实施方案中, MenC 荚膜糖, 当存在时其至少是部分 0- 乙酰化的, 从而使得至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 98% 的 (α 2- > 9)- 连接 NeuNAc 重复单元在至少一或两个位置上是 0- 乙酰化的。0- 乙酰化例如出现在至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 98% 的重复单元的 0-7 和 / 或 0-8 位置上。

[0083] 在一个实施方案中, MenW 荚膜糖, 当存在时其至少是部分 0- 乙酰化的, 从而使得至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 98% 的重复单元在至少一或两个位置上是 0- 乙酰化的。0- 乙酰化例如出现在至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 98% 的重复单元的 0-7 和 / 或 0-9 位置上。

[0084] 在一个实施方案中, MenY 荚膜糖, 当存在时其至少是部分 0- 乙酰化的, 从而使得至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 98% 的重复单元在至少一或两个位置上是 0- 乙酰化的。0- 乙酰化出现在至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 98% 的重复单元的 7 和 / 或 9 位上。

[0085] 0- 乙酰化的百分比是指含有 0- 乙酰化基团的重复单元的百分比。可以在缀合前和 / 或缀合后在糖中对其进行测量。

[0086] 在本发明的一个实施方案中, 免疫原性组合物中所存在的糖或者所存在的各脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖是缀合到 TT 上的。在进一步的实施方案中, 各脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖是分别缀合到不同的载体蛋白上的。在进一步的实施方案中, 各脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖缀合物的糖: 载体比是 1 : 5-5 : 1 或 1 : 1-1 : 4(w/w)。在进一步的实施方案中, 至少一种、两种或三种脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖缀合物是直接缀合到载体蛋白上的。在进一步的实施方案中, MenW 和 / 或 MenY、MenW 和 / 或 MenC、MenY 和 / 或 MenC、或者 MenW 和 MenC 和 MenY 是直接缀合到载体蛋白上的。在进一步的实施方案中, 至少一种、两种或三种脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物是通过 CDAP 化学直接缀合的。在进一步的实施方案中, MenW 和 / 或 Y 糖与载体蛋白的比例在 1 : 0.5 到 1 : 2(w/w) 之间。在进一步的实施方案中, MenC 糖与载体蛋白的比例在 1 : 0.5 到 1 : 2(w/w) 之间。在进一步的实施方案中, 至少一种、两种或三种脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖是通过连接物 (其可以是双官能的, 例如具有两个反应性氨基 (例如 ADH) 或两个反应性羧基或者一端具有反应性氨基而另一端具有反应性羧基) 缀合到载体蛋白上的。连接物能够具有 4 到 12 个碳原子。在进一步的实施方案中, 所述的或每种通过连接物缀合的脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖都是用 CDAP 化学缀合到连接物上的。在进一步的实施方案中, 载体蛋白是使用碳二亚胺化学例如使用 EDAC 缀合到连接物上的。在进一步的实施方案中, 所述的或每个脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖都是在将载体蛋白缀合到连接物上之前缀合到连接物上的。在进一步的实施方案中, MenA 是通过连接物缀合到载体蛋白上的 (MenA 糖与载体蛋白的比例可以在 1 : 2 到 1 : 5(w/w) 之间)。在进一步的实施方案中, MenC 是通过连接物缀合到载体蛋白上的 (MenC 糖与载体蛋白的比例可以在 1 : 2 到 1 : 5(w/w) 之间)。

[0087] 本发明人还注意到本领域的焦点曾经是使用低聚糖以便于产生缀合物。本发明人发现通过使用天然的或稍微调整过尺寸的多糖缀合物可以获得以下优点中的一种或多种: 1) 具有高免疫原性的缀合物, 并且所述缀合物是可通过 0.2 微米过滤器过滤的; 2) 免疫记忆可以得到提高 (如实施例三所示); 3) 能够改变缀合物中多糖与蛋白的比例从而可以增

加缀合物中多糖与蛋白的比例 (w/w) (这能够导致载体抑制作用的减少); 4) 通过使用较大的多糖进行缀合可以使易于水解的免疫原性缀合物 (例如 MenA 缀合物) 得到稳定化。使用较大的多糖能够导致与缀合物载体进行更多的交联并且可以减少游离糖从缀合物上的脱离。现有技术中所描述的缀合疫苗倾向于在缀合之前将多糖解聚以改善缀合作用。本发明人发现, 保留了较大尺寸的糖的脑膜炎球菌 (或糖) 缀合疫苗能够提供良好的对脑膜炎球菌疾病的免疫应答。

[0088] 因此本发明的免疫原性组合物可以包含一种或多种糖缀合物, 其中各糖在缀合前的平均尺寸大于 50kDa、75kDa、100kDa、110kDa、120kDa 或 130kDa。在一个实施方案中, 缀合后的缀合物能够容易地过滤通过 0.2 微米的过滤器使得与过滤前的样品相比, 过滤后能够获得大于 50、60、70、80、90 或 95% 的收率。

[0089] 特别是, 本发明的免疫原性组合物包含脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖, 所述荚膜糖来自缀合到载体蛋白上的血清群 A、C、W 和 Y 中的至少一种、两种、三种或四种, 其中至少一种、两种、三种或四种或者每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖的平均尺寸 (重均分子量; Mw) 在 50kDa、60kDa、75kDa、100kDa、110kDa、120kDa 或 130kDa 以上。

[0090] 免疫原性组合物可以包含脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖, 所述荚膜糖来自缀合到载体蛋白上的血清群 A、C、W 和 Y 中的至少一种、两种、三种或四种, 其中至少一种、两种、三种或四种或者每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖是天然糖, 或者是相对于天然多糖重均分子量用直到 $\times 2$ 、 $\times 3$ 、 $\times 4$ 、 $\times 5$ 、 $\times 6$ 、 $\times 7$ 、 $\times 8$ 、 $\times 9$ 或 $\times 10$ 的因子调整过尺寸的。

[0091] 为了本发明的目的, “天然多糖”是指已经经历过以减小糖的尺寸为目的的方法的糖。在通常的纯化过程中, 多糖的尺寸会稍微地减小。这样的糖仍然是天然的。只有当多糖已经用调整尺寸的技术调整过尺寸后才认为所述多糖不再是天然的。

[0092] 为了本发明的目的, “用直到 $\times 2$ 的因子调整尺寸”的意思是指用下述方法处理过的糖, 所述方法试图减小糖的尺寸但却将其尺寸保持在天然多糖尺寸的一半以上。 $\times 3$ 、 $\times 4$ 等也是以同样的方式解释的, 即, 糖是用下述方法处理过的, 所述方法试图减小多糖的尺寸但却将其尺寸保持在天然多糖尺寸的三分之一、四分之一以上。

[0093] 在本发明的一个方面, 免疫原性组合物包含脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖, 所述荚膜糖来自缀合到载体蛋白上的血清群 A、C、W 和 Y 中的至少一种、两种、三种或四种, 其中至少一种、两种、三种或四种或者每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖是天然多糖。

[0094] 在本发明的一个方面, 免疫原性组合物包含脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖, 所述荚膜糖来自缀合在载体蛋白上的血清群 A、C、W 和 Y 中的至少一种、两种、三种或四种, 其中至少一种、两种、三种或四种或者每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖是用 $\times 1.5$ 、 $\times 2$ 、 $\times 3$ 、 $\times 4$ 、 $\times 5$ 、 $\times 6$ 、 $\times 7$ 、 $\times 8$ 、 $\times 9$ 或 $\times 10$ 的因子调整过尺寸的。

[0095] 本发明的免疫原性组合物任选地包含缀合物: 脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 C 荚膜糖 (MenC)、血清群 A 荚膜糖 (MenA)、血清群 W135 荚膜糖 (MenW)、血清群 Y 荚膜糖 (MenY)、血清群 C 和 Y 荚膜糖 (MenCY)、血清群 C 和 A 荚膜糖 (MenCA)、血清群 C 和 W 荚膜糖 (MenCW)、血清群 A 和 Y 荚膜糖 (MenAY)、血清群 A 和 W 荚膜糖 (MenAW)、血清群 W 和 Y 荚膜糖 (MenWY)、血清群 A、C 和 W 荚膜糖 (MenACW)、血清群 A、C 和 Y 荚膜糖 (MenACY)、血清群 A、W135 和 Y 荚膜糖 (MenAWY)、血清群 C、W135 和 Y 荚膜糖 (MenCWY); 或血清群 A、C、W135 和 Y 荚膜糖 (MenACWY)。这是本文所提到的“一种、两种、三种或四种”, 或者血清群 A、C、W 和 Y 中或各

脑膜炎奈瑟氏球菌糖中的“至少一种”的定义。

[0096] 在一个实施方案中,至少一种、两种、三种、四种或每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖的通过 MALLS 确定的平均尺寸在 50kDa 到 1500kDa、50kDa 到 500kDa、50kDa 到 300kDa、101kDa 到 1500kDa、101kDa 到 500kDa、101kDa 到 300kDa 之间。

[0097] 在一个实施方案中, MenA 糖, 如果存在, 其分子量为 50-500kDa、50-100kDa、100-500kDa、55-90kDa、60-70kDa 或 70-80kDa 或 60-80kDa。

[0098] 在一个实施方案中, MenC 糖, 如果存在, 其分子量为 100-200kDa、50-100kDa、100-150kDa、101-130kDa、150-210kDa 或 180-210kDa。

[0099] 在一个实施方案中, MenY 糖, 如果存在, 其分子量为 60-190kDa、70-180kDa、80-170kDa、90-160kDa、100-150kDa 或 110-140kDa、50-100kDa、100-140kDa、140-170kDa 或 150-160kDa。

[0100] 在一个实施方案中, MenW 糖, 如果存在, 其分子量为 60-190kDa、70-180kDa、80-170kDa、90-160kDa、100-150kDa 或 110-140kDa、50-100kDa、120-140kDa。

[0101] 本文中的糖的分子量或平均分子量是指在缀合前测量的糖的重均分子量 (Mw), 其是通过 MALLS 测量的。

[0102] MALLS 技术是本领域所熟知的, 其一般是如实施例 2 中所描述的那样进行的。对于脑膜炎球菌糖的 MALLS 分析, 可以联合使用两个塔 (TSKG6000 和 5000PWx1), 并且糖是在水中洗脱的。糖是使用光散射检测器 (例如装有 488nm 的 10mW 氩激光器的 Wyatt Dawn DSP) 和干涉测量折光计 (例如装有 P100 管和 498nm 红色滤光片的 Wyatt OtilabDSP) 检测的。

[0103] 在一个实施方案中, 脑膜炎奈瑟氏球菌糖是天然多糖, 或者是在通常的提取过程中减小了尺寸的天然多糖。

[0104] 在一个实施方案中, 脑膜炎奈瑟氏球菌糖是通过机械切割, 例如通过微流化作用或超生处理调整过尺寸的。微流化作用和超生处理具有能够将较大天然多糖的尺寸减小到足以提供可过滤缀合物 (例如通过 0.2 微米的过滤器) 的尺寸的优势。尺寸调整是用最高达 $\times 20$ 、 $\times 10$ 、 $\times 8$ 、 $\times 6$ 、 $\times 5$ 、 $\times 4$ 、 $\times 3$ 、 $\times 2$ 或 $\times 1.5$ 的因子进行的。

[0105] 在一个实施方案中, 免疫原性组合物包含脑膜炎奈瑟氏球菌缀合物, 所述缀合物是由天然多糖和用最高达 $\times 20$ 的因子调整过尺寸的糖的混合物制成的。例如, 来自 MenC 和 / 或 MenA 的糖是天然的。例如, 来自 MenY 和 / 或 MenW 的糖是用最高达 $\times 20$ 、 $\times 10$ 、 $\times 8$ 、 $\times 6$ 、 $\times 5$ 、 $\times 4$ 、 $\times 3$ 或 $\times 2$ 的因子调整过尺寸的。例如, 免疫原性组合物含有由 MenY 和 / 或 MenW 和 / 或 MenC 和 / 或 MenA 制成的缀合物, 其中所述 MenY 和 / 或 MenW 和 / 或 MenC 和 / 或 MenA 是用最高达 $\times 10$ 的因子调整过尺寸的和 / 或是微流化的。例如, 免疫原性组合物含有由天然的 MenA 和 / 或 MenC 和 / 或 MenW 和 / 或 MenY 制成的缀合物。例如, 免疫原性组合物包含由天然 MenC 制成的缀合物。例如, 免疫原性组合物包含由天然 MenC 和用最高达 $\times 10$ 的因子调整过尺寸的和 / 或微流化的 MenA 制成的缀合物。例如, 免疫原性组合物包含由天然 MenC 和用最高达 $\times 10$ 的因子调整过尺寸的和 / 或微流化的 MenY 制成的缀合物。

[0106] 在一个实施方案中, 糖的多分散性是 1-1.5、1-1.3、1-1.2、1-1.1 或 1-1.05, 在缀合到载体蛋白上以后, 缀合物的多分散性是 1.0-2.5、1.0-2.0、1.0-1.5、1.0-1.2、1.5-2.5、1.7-2.2 或 1.5-2.0。所有的多分散性都是通过 MALLS 测量的。

[0107] 任选地调整糖的尺寸直到其是从细菌中分离出多糖的尺寸的 1.5、2、4、6、8、10、12、14、16、18 或 20 倍。

[0108] 在一个实施方案中,各脑膜炎奈瑟氏球菌糖或者是天然多糖,或者是用最高达 $\times 10$ 的因子调整过尺寸的。在进一步的实施方案中,每种脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖均是天然多糖。在进一步的实施方案中,至少一种、两种、三种或四种脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖是通过微流化作用调整过尺寸的。在进一步的实施方案中,各脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖是用最高达 $\times 10$ 的因子调整过尺寸的。在进一步的实施方案中,脑膜炎奈瑟氏球菌缀合物是由天然多糖和用最高达 $\times 10$ 的因子调整过尺寸的糖的混合物制成的。在进一步的实施方案中,来自血清群 Y 的荚膜糖是用最高达 $\times 10$ 的因子调整过尺寸的。在进一步的实施方案中,来自血清群 A 和 C 的荚膜糖是天然的多糖,而来自血清群 W135 和 Y 的糖是用最高达 $\times 10$ 的因子调整过尺寸的。在进一步的实施方案中,各脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖的平均尺寸在 50kDa 到 300kDa 或 50kDa 到 200kDa 之间。在进一步的实施方案中,免疫原性组合物包含平均尺寸大于 50kDa、75kDa、100kDa 或者平均尺寸在 50-100kDa 或 55-90kDa 或 60-80kDa 之间的 MenA 荚膜糖。在进一步的实施方案中,免疫原性组合物包含平均尺寸大于 50kDa、75kDa、100kDa 或者在 100-200kDa、100-150kDa、80-120kDa、90-110kDa、150-200kDa、120-240kDa、140-220kDa、160-200kDa 或 190-200kDa 之间的 MenC 荚膜糖。在进一步的实施方案中,免疫原性组合物包含平均尺寸大于 50kDa、75kDa、100kDa 或者在 60-190kDa 或 70-180kDa 或 80-170kDa 或 90-160kDa 或 100-150kDa、110-145kDa 或 120-140kDa 之间的 MenY 荚膜糖。在进一步的实施方案中,免疫原性组合物包含平均尺寸大于 50kDa、75kDa、100kDa 或者在 60-190kDa 或 70-180kDa 或 80-170kDa 或 90-160kDa 或 100-150kDa、140-180kDa、150-170kDa 或 110-140kDa 之间的 MenW 荚膜糖。

[0109] 本发明的免疫原性组合物可以包含缀合到载体蛋白上的 b 型流感嗜血杆菌 (*H. influenzae* b) 荚膜糖 (Hib)。其可以缀合到选自 TT、DT、CRM197、TT 的 C 片段和蛋白 D 的载体蛋白上,例如缀合到 TT 上。可以将 Hib 糖缀合到与至少一种、两种、三种或全部脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖缀合物相同的载体蛋白上,例如缀合到 TT 上。在 Hib 荚膜糖缀合物中 Hib 与载体蛋白的比例可以在 1 : 5 到 5 : 1 (w/w) 之间,例如在 1 : 1 到 1 : 4、1 : 2 到 1 : 3.5 之间,或者在 1 : 3 (w/w) 左右。Hib 荚膜糖可以通过连接物 (参见上面) 缀合到载体蛋白上的。连接物可以是双官能的 (具有两个反应性氨基,例如 ADH,或者具有两个反应性羧酸基团,或者一端具有反应性氨基另一端具有反应性羧酸基团)。其可以具有 4 到 12 各碳原子。可以将 Hib 糖缀合到载体蛋白上,或者使用 CNBr 或 CDAP 缀合到连接物上。载体蛋白可以通过连接物并使用包括碳二亚胺化学,例如 EDAC 化学 (因此使用了载体上的羧基化学基团) 的方法而缀合到 Hib 糖上。Hib 糖缀合物的剂量可以在 0.1 到 9 μ g、1 到 5 μ g 或 2 到 3 μ g 糖之间。

[0110] 在进一步的实施方案中,本发明的免疫原性组合物包含 Hib 糖缀合物和至少两种脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物,其中 Hib 缀合物以比所述至少两种脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物的平均糖剂量低的糖剂量存在。或者,所述 Hib 缀合物以比所述至少两种脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物中的每一种的糖剂量低的糖剂量存在。例如, Hib 缀合物的剂量可以比所述至少两种其它脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物的平均或最低糖剂量低至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70% 或 80%。

[0111] 平均剂量是通过将所有的其它糖的剂量相加再除以其它糖的数目而确定的。所述其它糖是指免疫原性组合中除 Hib 以外的所有的糖,其能够包括脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖。“剂量”是向人给予的免疫原性组合或疫苗的量。

[0112] Hib 糖是 b 型流感嗜血杆菌的磷酸聚核糖基核糖醇 (PRP) 荚膜糖,或者是由其衍生的低聚糖。

[0113] 除 Hib 缀合物以外的两种其它细菌糖缀合物意味着至少包括两种其它细菌糖缀合物。两种其它细菌缀合物可以包括脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖缀合物。

[0114] 本发明的免疫原性组合可以包含由脑膜炎奈瑟氏球菌、肺炎链球菌、A 组链球菌、B 组链球菌、伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌中的一种或多种衍生的其它糖缀合物。在一个实施方案中,免疫原性组合包含由脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 A、C、W135 和 Y 中的一种或多种衍生的荚膜糖。一个进一步的实施方案包含由肺炎链球菌衍生的荚膜糖。所述肺炎球菌荚膜糖抗原任选地选自血清型 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F (任选地选自血清型 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F)。一个进一步的实施方案包含金黄色葡萄球菌的 5 型、8 型或 336 荚膜糖。一个进一步的实施方案包含表皮葡萄球菌的 I 型、II 型或 III 型荚膜糖。一个进一步的实施方案包含来自伤寒沙门氏菌的 Vi 糖。一个进一步的实施方案包括 B 组链球菌的 Ia 型、Ic 型、II 型、III 型或 V 型荚膜糖。一个进一步的实施方案包含 A 组链球菌的荚膜糖,任选地进一步包含至少一种 M 蛋白和任选地多种类型的 M 蛋白。

[0115] 本发明的免疫原性组合还可以包含 DTPa 或 DTPw 疫苗 (例如含有 DT、TT 以及全细胞百日咳 (Pw) 疫苗或无细胞百日咳 (Pa) 疫苗 (包含例如百日咳类毒素、FHA、pertactin 和任选地 agglutinogens 2 和 3) 的疫苗)。这样的组合还可以包含抗乙型肝炎的疫苗 (例如其可以包含乙型肝炎表面抗原 [HepB],其任选地是吸附在磷酸铝上的)。在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合包含 DTPwHepBHibMenAC 疫苗,其中的 HibMenAC 组分是如上所述的。

[0116] 本发明的免疫原性组合任选地还包含另外的病毒抗原,所述病毒抗原能够赋予组合抵抗由麻疹和 / 或流行性腮腺炎和 / 或风疹和 / 或水痘所引起的疾病的功能。例如,本发明的免疫原性组合含有来自麻疹、流行性腮腺炎和风疹 (MMR) 或者麻疹、流行性腮腺炎、风疹和水痘 (MMRV) 的抗原。在一个实施方案中,这些病毒抗原任选地存在于与脑膜炎球菌和 / 或 Hib 糖缀合物相同的容器中。在一个实施方案中。这些病毒抗原是冻干的。

[0117] 在一个实施方案中,本发明的免疫原性组合进一步包含来自脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 B 的抗原。所述抗原任选地是来自脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 B (MenB) 或调整过尺寸的多糖或由其衍生的低聚糖的荚膜多糖,其可以是缀合到蛋白载体上的。所述抗原任选地是如 EP301992、W001/09350、W004/14417、W004/14418 和 W004/14419 中所描述的那些来自脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 B 的外膜囊制备物。

[0118] 通常,本发明免疫原性组合所包含的每种糖缀合物的剂量可以在 0.1 到 20 μ g、2 到 10 μ g、2 到 6 μ g 或 4 到 7 μ g 糖之间。

[0119] 在一个实施方案中,本发明免疫原性组合所含有的每种脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖的剂量可以在 0.1-20 μ g;1-10 μ g;2-10 μ g;2.5-5 μ g 之间,或者在 5 μ g 左右或恰好为 5 μ g;或者在 2.5 μ g 左右或恰好为 2.5 μ g。在一个实施方案中,本发明免疫原性组合所

包含的 MenA、MenC、MenW 和 MenY (任选地缀合在破伤风类毒素上) 的剂量分别为 2.5、2.5、2.5 和 2.5 μg , 分别为 5、5、5 和 5 μg 或者分别为 5、5、2.5 和 2.5 μg 。

[0120] 在一个实施方案中, 本发明免疫原性组合物所含有的 Hib 糖缀合物的糖剂量例如可以在 0.1 到 9 μg ; 1 到 5 μg 或 2 到 3 μg 之间, 或者在 2.5 μg 左右或恰好为 2.5 μg 。在进一步的实施方案中, 本发明的免疫原性组合物所含有的 Hib 糖缀合物的糖剂量例如在 0.1 到 9 μg ; 1 到 5 μg 或 2 到 3 μg 之间, 或者在 2.5 μg 左右或恰好为 2.5 μg , 所含有的每种脑膜炎奈瑟氏球菌多糖缀合物的糖剂量在 2 到 20 μg 、3 到 10 μg 或 4 到 7 μg 之间, 或者在 5 μg 左右或恰好为 5 μg 。

[0121] 为了本发明的目的, “左右”或“大约”被定义为在所给出范围的 10% 上下以内。

[0122] 在一个实施方案中, 本发明免疫原性组合物所含有的 Hib 糖缀合物的糖剂量例如小于至少两种、三种、四种或每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物平均糖剂量的 90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20% 或 10%。Hib 糖的糖剂量例如是至少两种、三种、四种或每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物平均糖剂量的 20% 到 60%、30% 到 60%、40% 到 60% 或者是 50% 左右或恰好为 50%。

[0123] 在一个实施方案中, 本发明免疫原性组合物所含有的 Hib 糖缀合物的糖剂量例如小于至少两种、三种、四种或每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物最低糖剂量的 90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、20% 或 10%。Hib 糖的糖剂量例如是至少两种、三种、四种或每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物最低糖剂量的 20% 到 60%、30% 到 60%、40% 到 60% 或者是 50% 左右或恰好为 50%。

[0124] 在本发明的一个实施方案中, 所述至少两种、三种、四种或每种脑膜炎奈瑟氏球菌糖缀合物中的每一种的糖剂量任选地是相同的或近似相同的。

[0125] 本发明免疫原性组合物的实例是由以下物质组成或含有以下物质的组合物:

[0126] Hib 缀合物和 MenA 缀合物和 MenC 缀合物, 任选地各糖的剂量比为 1 : 2 : 2, 1 : 2 : 1, 1 : 4 : 2, 1 : 6 : 3, 1 : 3 : 3, 1 : 4 : 4, 1 : 5 : 5, 1 : 6 : 6 (w/w)。任选地, MenA 的糖剂量大于 MenC 的糖剂量。

[0127] Hib 缀合物和 MenC 缀合物和 MenY 缀合物, 任选地各糖的剂量比为 1 : 2 : 2, 1 : 2 : 1, 1 : 4 : 2, 1 : 4 : 1, 1 : 8 : 4, 1 : 6 : 3, 1 : 3 : 3, 1 : 4 : 4, 1 : 5 : 5, 1 : 6 : 6 (w/w)。任选地, MenC 的糖剂量大于 MenY 的糖剂量。

[0128] Hib 缀合物和 MenC 缀合物和 MenW 缀合物, 任选地各糖的剂量比为 1 : 2 : 2, 1 : 2 : 1, 1 : 4 : 2, 1 : 4 : 1, 1 : 8 : 4, 1 : 6 : 3, 1 : 3 : 3, 1 : 4 : 4, 1 : 5 : 5, 1 : 6 : 6 (w/w)。任选地, MenC 的糖剂量大于 MenW 的糖剂量。

[0129] Hib 缀合物和 MenA 缀合物和 MenW 缀合物, 任选地各糖的剂量比为 1 : 2 : 2, 1 : 2 : 1, 1 : 4 : 2, 1 : 4 : 1, 1 : 8 : 4, 1 : 6 : 3, 1 : 3 : 3, 1 : 4 : 4, 1 : 5 : 5, 1 : 6 : 6 (w/w)。任选地, MenA 的糖剂量大于 MenW 的糖剂量。

[0130] Hib 缀合物和 MenA 缀合物和 MenY 缀合物, 任选地各糖的剂量比为 1 : 2 : 2, 1 : 2 : 1, 1 : 4 : 2, 1 : 4 : 1, 1 : 8 : 4, 1 : 6 : 3, 1 : 3 : 3, 1 : 4 : 4, 1 : 5 : 5, 1 : 6 : 6 (w/w)。任选地, MenA 的糖剂量大于 MenY 的糖剂量。

[0131] Hib 缀合物和 MenW 缀合物和 MenY 缀合物, 任选地各糖的剂量比为 1 : 2 : 2, 1 : 2 : 1, 1 : 1 : 2, 1 : 4 : 2, 1 : 2 : 4, 1 : 4 : 1, 1 : 1 : 4, 1 : 3 : 6, 1 : 1 : 3,

1 : 6 : 3, 1 : 3 : 3, 1 : 4 : 4, 1 : 5 : 5, 1 : 6 : 6 (w/w)。任选地, MenY 的糖剂量大于 MenW 的糖剂量。

[0132] MenA、MenC、MenW 和 MenY, 其糖剂量比为 1 : 1 : 1 : 1 或 2 : 1 : 1 : 1 或 1 : 2 : 1 : 1 或 2 : 2 : 1 : 1 或 1 : 3 : 1 : 1 或 1 : 4 : 1 : 1 (w/w)。

[0133] 本发明进一步的方面是包含本发明免疫原性组合物和药学上可接受赋形剂的疫苗。

[0134] 在一个实施方案中, 将本发明的免疫原性组合物调节到或缓冲到 pH7.0 到 8.0 或 pH7.2 到 7.6 之间或 pH7.4 左右或恰好为 pH7.4。

[0135] 本发明的免疫原性组合物或疫苗任选地是在稳定剂例如多元醇如蔗糖或海藻糖的存在下进行冻干的。

[0136] 任选地, 本发明的免疫原性组合物或疫苗含有足以使对免疫原的免疫应答加强的量的助剂。合适的助剂包括, 但不限于, 铝盐 (磷酸铝或氢氧化铝)、角鲨烯混合物 (SAF-1)、胞壁肽、皂草苷衍生物、分枝杆菌细胞壁制品、单磷酸脂质 A、霉菌酸衍生物、非离子嵌段共聚物表面活性剂、Quil A、霍乱毒素 B 亚单位、聚磷腈及其衍生物、和免疫刺激复合物 (ISCOMs) 例如 Takahashi 等人, (1990) Nature 344 : 873-875 中所描述的那些免疫刺激复合物。

[0137] 对于以上所讨论的脑膜炎奈瑟氏球菌或 HibMen 组合来说, 不使用任何铝盐助剂, 或者根本不使用任何助剂是有利的。

[0138] 对于所有的免疫原性组合物或疫苗来说, 免疫原的免疫有效量必须是凭经验确定的。所考虑的因素包括免疫原性、免疫原是否将会被复合到或共价附着到助剂或载体蛋白或其它载体上, 给药途径和给药的致免疫剂量的数量。

[0139] 本发明的药物组合物或疫苗中可以存在不同浓度的活化剂。一般地, 物质的最低浓度是获得其使用目所必须的量, 而最高浓度是能够保留在溶液中的最大量, 或者是能够保持均匀地悬浮在初始混合物内的最大量。例如, 治疗剂的最小量任选地是能够提供单一治疗有效剂量的量。对于生物活性物质来说, 其最低浓度是在重组过程中具有生物活性所必需的量, 最高浓度是不能够再保持均匀悬浮的点处的浓度。在单剂单位的情况下, 所述量即为单一治疗使用量。通常, 可以预期每种制剂能够包含 1-100 μ g 的蛋白抗原, 任选地为 5-50 μ g 或 5-25 μ g。例如, 缀合物中细菌糖的剂量是 10-20 μ g、5-10 μ g、2.5-5 μ g 或 1-2.5 μ g 糖。

[0140] 通过对所述疫苗进行全身或粘膜途径的给药, 本发明的疫苗制品可以用于保护或治疗易受感染的哺乳动物 (例如人类患者)。所述人类患者任选地是婴儿 (12 个月以下)、初学走路的孩子 (12-24、12-16 或 12-14 个月)、儿童 (2-10、3-8 或 3-5 岁)、青少年 (21-21、14-20 或 15-19 岁) 或成人。这些给药可以包括经由肌内、腹膜内、皮内或皮下路线的注射; 或者通过粘膜给药到达口腔 / 消化系统、呼吸系统、泌尿生殖系统处。疫苗的产期内给药对于治疗肺炎或中耳炎来说是优选的 (因为这样能够更有效地预防鼻咽部携带肺炎球菌, 并因此能够在其最初阶段减少感染)。虽然本发明的疫苗可以作为单剂给药, 但也可以将其各组分一起进行同时或不同时的共同给药 (例如如果疫苗中存在糖, 则可以同时对这些糖进行单独给药, 或者是在给药以细菌蛋白疫苗 1-2 周后再对这些糖进行给药以彼此获得免疫应答的最佳协调)。除了单一的给药途径以外, 还可以使用 2 种不同的给药途径。例如, 可

以对病毒抗原进行 ID(皮内)给药,而对细菌蛋白进行 IM(肌肉)或 IN(产期内)给药。如果存在糖,则可以对它们进行 IM(或 ID)给药,并对细菌蛋白进行 IN(或 ID)给药。此外,对于初种制剂,本发明的疫苗可以用 IM 的方式给药,对于加强制剂可以用 IN 的方式。

[0141] 疫苗制品通常描述于 Vaccine Design(“The subunit and adjuvant approach”(Powell M.F. & Newman M.J. 编辑)(1995) Plenum Press New York) 中。脂质体内的胶囊化描述于 Fullerton, 美国专利 4,235,877 中。

[0142] 本发明进一步的方面是一种用于伴随或顺序给药的免疫试剂盒,其包含两种多价免疫原性组合物以用于在宿主内提供保护作用从而抵抗由百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*)、破伤风杆菌 (*Clostridium tetani*)、白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) 和脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*) 以及任选地流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 引起的疾病。例如,所述试剂盒任选地包含第一容器,所述第一容器中包含一种或多种:

[0143] 破伤风类毒素 (TT),

[0144] 白喉类毒素 (DT), 和

[0145] 全细胞或无细胞百日咳组分

[0146] 和第二容器,所述第二容器中包含:

[0147] 如上所述的本发明免疫原性组合物(例如那些包含 Men 或 HibMen 糖缀合物组合的免疫原性组合物)。

[0148] 本发明进一步的方面是一种用于伴随或连续给药的免疫试剂盒,其包含两种多价免疫原性组合物以用于在宿主内提供保护作用从而抵抗由肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*) 以及任选地流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 引起的疾病。例如,所述试剂盒任选地包含第一容器,所述第一容器中包含:

[0149] 载体蛋白与来自肺炎链球菌的荚膜糖[其中所述荚膜糖任选地来自选自 1,2,3,4,5,6A,6B,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,14,15B,17F,18C,19A,19F,20,22F,23F 和 33F 的肺炎球菌血清型]的一种或多种缀合物。

[0150] 和第二容器,所述第二容器中包含:

[0151] 如上所述的本发明免疫原性组合物(例如那些包含 Men 或 HibMen 糖缀合物组合的免疫原性组合物)。

[0152] Hib 缀合物和脑膜炎奈瑟氏球菌多糖缀合物的例子如上所述。

[0153] 一般地,本发明免疫试剂盒中的(或者任意以上描述的本发明免疫原性组合物中的)肺炎链球菌疫苗包含糖抗原(任选地是缀合的),其中所述糖衍生自选自 1,2,3,4,5,6A,6B,7F,8,9N,9V,10A,11A,12F,14,15B,17F,18C,19A,19F,20,22F,23F 和 33F 的肺炎球菌血清型中的至少四种。任选地,所述的四种血清型包括 6B、14、19F 和 23F。任选地,组合物中包括至少 7 种血清型,例如那些衍生自血清型 4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F 的。任选地,组合物中包括大于 7 种的血清型,例如包括至少 10、11、12、13 或 14 种血清型。例如一个实施方案中的组合物包含衍生自血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 和 23F 和任选地 3(所有均任选地是缀合的)的 10 或 11 荚膜糖。在本发明的一个实施方案中包含了至少 13 种糖抗原(任选地是缀合的),虽然其它的糖抗原,例如 23 元(例如血清型 1,2,3,4,5,6B,

7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 和 33F) 也能够通过本发明预期到。

[0154] 能够将肺炎球菌糖独立地缀合到任何已知的载体蛋白上, 所述载体蛋白例如 CRM197、破伤风类毒素、白喉类毒素、蛋白 D 或以上提到的任何其它载体蛋白。

[0155] 任选地, 本发明的免疫试剂盒还包含第三部分。例如, 所述试剂盒任选地包含第一容器, 所述第一容器内含有一种或多种:

[0156] 破伤风类毒素 (TT),

[0157] 白喉类毒素 (DT), 和

[0158] 全细胞或无细胞百日咳组分

[0159] 和第二容器, 所述第二容器中包含:

[0160] 载体蛋白与来自肺炎链球菌的荚膜糖 [其中所述荚膜糖任选地来自选自 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14, 15B, 17F、18C、19A、19F、20、22F、23F 和 33F 的肺炎球菌血清型] 的一种或多种缀合物。

[0161] 和第三容器, 所述第三容器中包含:

[0162] 如上所述的本发明免疫原性组合物 (例如那些包含 Men 或 HibMen 糖缀合物组合的免疫原性组合物) 。

[0163] 本发明进一步的方面是一种制备本发明免疫原性组合物或疫苗的方法, 其包括混合本发明的糖的步骤, 例如将脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖与药学上可接受的赋形剂进行混合, 所述脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖来自缀合到载体蛋白上的血清群 A、C、W 和 Y 中的至少一种、两种、三种或全部四种。

[0164] 本发明进一步的方面是一种对人类宿主进行免疫以抵抗由细菌所引起的疾病的方法, 例如抵抗脑膜炎奈瑟氏球菌和任选地流感嗜血杆菌感染, 所述方法包括向宿主给药以免疫保护剂量的本发明免疫原性组合物或疫苗或试剂盒, 任选地使用单剂。

[0165] 本发明的一个独立的方面是一种用免疫原性组合物使人类宿主免疫的方法, 所述免疫原性组合物包含至少 2 种选自血清群 A、C、W 和 Y (任选地为 MenA、C、W 和 Y) 的不同的脑膜炎奈瑟氏球菌荚膜糖缀合物, 其中单剂给药 (任选地对少年、成人或孩子) 导致在给药一个月后进行的血液检查中给出在测量对 MenA、MenC、MenW 和 / 或 MenY 的应答水平的 SBA 试验中应答者超过 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的结果。任选地 SBA 试验是如实施例 9 中所描述的, 并如实施例 9 中所描述的那样对应答者进行评价。

[0166] 本发明一个进一步独立的方面是一种包含 MenA、MenC、MenW 和 / 或 MenY 缀合物的免疫原性组合物, 其能够在单剂使用后引发免疫应答, 从而使超过 50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的接种人类受试者 (儿童、少年或成人) 在对接种后一个月时抽取的血液进行的 SBA 试验中能够归为应答者一类 (任选地使用实施例 9 中所描述的标准) 。

[0167] 这样的免疫原性组合物任选地具有本文所描述的进一步的结构特征。

[0168] 本发明的一个进一步的方面是本发明免疫原性组合物在治疗或预防由细菌引起的疾病, 例如脑膜炎奈瑟氏球菌和任选地流感嗜血杆菌感染, 方面的用途。

[0169] 本发明的一个进一步的方面是本发明免疫原性组合物或疫苗或试剂盒在制备用于治疗或预防由细菌引起的疾病的药物方面的用途, 所述疾病例如脑膜炎奈瑟氏球菌和任选地流感嗜血杆菌感染。

[0170] 根据发明人的意图,在所有情况中,本文中的术语“包含”、“含有”和“包括”是分别与术语“由...组成”、“由...组成的”和“由...组成地”可任选地替换的。

[0171] 本专利说明书中所引用的全部参考文献或专利申请均在此引入作为参考。

[0172] 所附的实施例解释说明了本发明。除另外详细描述的那些以外,以下实施例均是采用标准技术进行的,其对于本领域技术人员来说是熟知的并且是常规的。实施例是解释说明性的,其不用于限定本发明。

[0173] 实施例

[0174] 实施例 1- 多糖缀合物的制备

[0175] 通过由 Chu 等人开发的偶合化学方法 (Infection and Immunity 1983, 40(1); 245-256) 实现流感嗜血杆菌 (Hib) PRP 多糖到 TT 上的共价键合。通过加入 CNBr 并在 pH10.5 下培养 6 分钟对 Hib PRP 多糖进行活化。将 pH 降低到 pH8.75 并加入己二酸二酰肼 (ADH), 继续培养 90 分钟。通过使用 1-乙基-3-(3-二甲基-氨基丙基)碳二亚胺 (EDAC) 的碳二亚胺缩合将活化的 PRP 连接到纯化的破伤风类毒素上。向活化的 PRP 中加入 EDAC 以达到 0.6mg EDAC/mg 活化 PRP 的最终比例。将 pH 调节到 5.0 并加入纯化的破伤风类毒素以达到 2mg TT/mg 活化 PRP。在温和的搅拌下将所产生的溶液放置三天。在通过 0.45 μ m 膜的过滤之后,将缀合物在用在 0.2M NaCl 中平衡过的 sephacryl S500HR (Pharmacia, 瑞典) 柱上进行纯化。

[0176] MenC-TT 缀合物是使用天然多糖 (通过 MALLS 测量超过 150kDa 的) 制备的或者是被轻微微流化过的。MenA-TT 缀合物是用超过 60kDa 的天然多糖或轻微微流化多糖制备的,所述超过 60kDa 是通过实施例 2 中的 MALLS 法测量的。MenW 和 MenY-TT 缀合物是用 100-200kDa 左右的调整过尺寸的多糖制备的,其中所述 100-200kDa 左右是通过 MALLS (参见实施例 2) 测量的。通过使用匀浆器 Emulsiflex C-50 装置的微流化作用来调整尺寸。然后将多糖通过 0.2 μ m 过滤器进行过滤。

[0177] 活化和偶合是如 W096/29094 和 W000/56360 中所描述的那样进行的。简单地说,将 2M NaCl 中的 pH5.5-6.0 且浓度为 10-20mg/ml 的多糖与 CDAP 溶液 (100mg/ml, 在乙醇/WFI, 50/50 中新制备的) 进行混合以达到 0.75/1 或 1.5/1 的最终 CDAP/多糖比例。1.5 分钟后,用氢氧化钠将 pH 升高到 pH10.0。三分钟后,加入破伤风类毒素以达到以下蛋白/多糖比例,所述比例对 MenW 来说为 1.5/1,对 MenY 来说为 1.2/1,对 MenA 来说为 1.5/1 或者对 MenC 来说为 1.5/1。继续反应一到两个小时。

[0178] 偶合步骤之后,加入甘氨酸以达到 7.5/1 的最终甘氨酸/PS (w/w) 比例,并将 pH 调节到 pH9.0。将混合物放置 30 分钟。使用 10 μ m 的 Kleenpak 过滤器澄清缀合物,然后将其装载到 Sephacryl S400HR 柱上,所述柱子使用的洗脱缓冲液是 150mM NaCl、10mM 或 5mM Tris pH7.5。将临床批次在 Opticap 4 灭菌膜上过滤。所产生的缀合物具有 1:1-1:5 (w/w) 的平均糖:蛋白比例。

[0179] 实施例 1a- 本发明 MenA 和 MenC 多糖缀合物的制备

[0180] MenC-TT 缀合物是使用天然多糖 (通过 MALLS 测量超过 150kDa 的) 制备的,或者是被轻微微流化过的。MenA-TT 缀合物是使用超过 60kDa 的天然多糖或轻微微流化过的多糖制备的,其中所述超过 60kDa 是通过实施例 2 中的 MALLS 方法测量的。通过使用匀浆器 Emulsiflex C-50 装置的微流化作用来调整尺寸。然后将多糖通过 0.2 μ m 的过滤器进行过

滤。

[0181] 为了将 MenA 荚膜多糖通过间隔物缀合到破伤风类毒素上,使用了以下的方法。通过偶合化学方法来实现多糖与间隔物 (ADH) 的共价键合,所述偶合化学方法使多糖在控制条件下通过氰基化试剂,1- 氰基 -4- 二甲氨基 - 吡啶四氟硼酸盐 (CDAP) 得到活化。间隔物通过其胍基来与氰基化的 PS 进行反应,从而在间隔物与多糖之间形成稳定的异脲连接。

[0182] 用新制备的 100mg/ml CDAP 的乙腈 / 水 (50/50 (v/v)) 溶液处理 10mg/ml 的 MenA 溶液 (pH6.0) [3.5g] 以获得 0.75 的 CDAP/MenA 比例 (w/w)。1.5 分钟后,将 pH 升高到 pH10.0。三分钟后,加入 ADH 以获得 8.9 的 ADH/MenA 比例。将溶液的 pH 降低到 8.75 并且保持该 pH 继续反应 2 小时 (温度保持在 25°C)。

[0183] 将 PSAAH 溶液浓缩到其初始体积的四分之一,然后使用截点为 10kDa 的 Filtron Omega 膜用 30 体积的 0.2M NaCl 进行渗滤 (diafiltered),过滤滞留物。

[0184] 在缀合 (碳二亚胺缩合) 反应之前,对纯化 TT 溶液和 PSAAH 溶液进行稀释以达到 10mg/ml 的 PSAAH 浓度和 10mg/ml 的 TT 浓度。

[0185] 为了达到 0.9mg EDAC/mg PSAAH 的最终比例,向 PSAH 溶液 (2g 糖) 中加入 EDAC(1- 乙基 -3-(3- 二甲基 - 氨基丙基) 碳二亚胺)。将 pH 调节到 5.0。用蠕动泵 (在 60 分钟内) 加入纯化的破伤风类毒素以达到 2mgTT/mg PSAAH。在 +25°C 在搅拌下将所产生的溶液放置 60 分钟以达到 120 分钟的最终偶合时间。通过加入 pH7.5 的 1M Tris-HCl (最终体积的 1/10) 对溶液进行中和并在 +25°C 下放置 30 分钟,然后在 +2°C 到 +8°C 下放置过夜。

[0186] 使用 10 μ m 的过滤器澄清缀合物,并使用 Sephacryl S400HR 柱 (Pharmacia, 瑞典) 进行纯化。该柱是在 10mM Tris-HCl (pH7.0) 中平衡过的,将 0.075M NaCl 和缀合物 (大约 660mL) 载样到所述柱子上 (+2°C 到 +8°C)。洗脱池 (elution pool) 是作为 280nm 下光密度的函数选择的。当吸光度增加到 0.05 时开始收集。持续收集直到 Kd 达到 0.30。将缀合物在 +20°C 下过滤消毒,然后在 +2°C 到 +8°C 下储存。所产生的缀合物具有 1 : 2-1 : 4 (w/w) 的糖 : 蛋白比例。

[0187] 为了将 MenC 荚膜多糖通过间隔物缀合到破伤风类毒素上,使用了以下的方法。通过偶合化学方法来实现多糖与间隔物 (ADH) 的共价键合,所述偶合化学方法使多糖在控制条件下通过氰基化试剂,1- 氰基 -4- 二甲氨基 - 吡啶四氟硼酸盐 (CDAP) 得到活化。间隔物通过其胍基与氰基化的 PS 进行反应,从而在间隔物与多糖之间形成了稳定的异脲连接。

[0188] 用新制备的 100mg/ml CDAP 的乙腈 / 水 (50/50 (v/v)) 溶液处理 20mg/ml 的 MenC 溶液 (pH6.0) [3.5g] 以获得 (w/w) 1.5 的 CDAP/MenC 比例。1.5 分钟后,将 pH 升高到 pH10.0。在活化过程中加入 pH 5M NaCl 以获得 2M NaCl 的最终浓度。三分钟后,加入 ADH 以获得 8.9 的 ADH/MenC 比例。将溶液的 pH 降低到 8.75 并且保持该 pH 继续反应 2 小时 (温度保持在 25°C)。

[0189] 将 PSCAH 溶液浓缩到 150mL 的最小体积,然后使用截点为 10kDa 的 Filtron Omega 膜用 30 体积的 0.2M NaCl 进行渗滤,过滤滞留物。

[0190] 在缀合反应之前,将纯化 TT 溶液和 PSCAH 溶液 (2g 规模的) 在 0.2M NaCl 中进行稀释以达到 15mg/ml 的 PSCAH 浓度和 20mg/ml 的 TT 浓度。

[0191] 为了达到 2mg TT/mg PSCAH,向 PSCAH 溶液中加入纯化的破伤风类毒素。将 pH 调节到 5.0。用蠕动泵 (在 10 分钟内) 加入 EDAC(16.7mg/ml Tris 0.1M pH7.5 中的) 以达

到 0.5mg EDAC/mg PSCAH 的最终比例。在 +25℃, 在搅拌和 pH 调节下将所产生的溶液放置 110 分钟以达到 120 分钟的最终偶合时间。然后通过加入 pH9.0 的 1M Tris-HCl (最终体积的 1/10) 对溶液进行中和并在 +25℃ 下放置 30 分钟, 然后在 +2℃ 到 +8℃ 下放置过夜。

[0192] 使用 10 μm 的过滤器澄清缀合物, 并使用 Sephacryl S400HR 柱 (Pharmacia, 瑞典) 进行纯化。该柱是在 10mM Tris-HCl (pH 7.0) 中平衡过的, 将 0.075M NaCl 和缀合物 (大约 460mL) 载样到所述柱子上 (+2℃ 到 +8℃)。洗脱池是作为 280nm 下光密度的函数选择的。当吸光度增加到 0.05 时开始收集。持续收集直到 Kd 达到 0.20。将缀合物在 +20℃ 下过滤消毒, 然后在 +2℃ 到 +8℃ 下储存。所产生的缀合物具有 1 : 2-1 : 4 (w/w) 的糖 : 蛋白比例。

[0193] 实施例 2- 使用 MALLS 确定分子量

[0194] 将检测器与 HPLC 排阻柱连接, 样品从所述排阻柱中得到洗脱。一方面, 激光散射检测器测量了大分子溶液在 16 度角散射的光强度, 另一方面, 在线设置的干涉测量折光计 (interferometric refractometer) 提供了对洗脱样品的量的测量。由此可以确定溶液中分子的密度、尺寸和形状。

[0195] 重均分子量 (Mw) 的定义是所有物质重量与它们各自分子量的乘积的总和, 再除以所有物质的重量和。

[0196] a) 重均分子量 : -Mw-

$$[0197] \quad M_w = \frac{\sum W_i \cdot M_i}{\sum W_i} = \frac{m_2}{m_1}$$

[0198] b) 数均分子量 : -Mn-

$$[0199] \quad M_n = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} = \frac{m_1}{m_0}$$

[0200] c) 均方根半径 : -Rw- 和 R²w 是如下定义的方根半径 :

[0201]

$$R^2w \text{ 或 } (r^2)w = \frac{\sum m_i \cdot r_i^2}{\sum m_i}$$

[0202] (-m_i- 是散射中心 i 的质量, -r_i- 是散射中心 i 和大分子重心之间的距离)。

[0203] d) 多分散性被定义为 -Mw/Mn- 的比。

[0204] 脑膜炎球菌多糖是用 MALLS 法通过载样到联合使用的两个 HPLC 柱 (TSKG6000 和 5000PWx1) 上进行分析的。将 25 μl 多糖载样到柱子上并用 0.75ml 过滤水进行洗脱。使用光散射检测器 (装有 10mW488nm 氩气激光的 Wyatt Dawn DSP) 和干涉测量折光计 (装有 P100 管和 498nm 红色滤光片的 Wyatt Otilab DSP) 来检测多糖。

[0205] 通过德拜法 (Debye method) 使用 Astra 4.72 软件的多项拟合命令来计算分子量的多分散性和所有样品的回收性。

[0206] 实施例 3- 用 Meningitec 或较大尺寸的 MenC-TT 缀合物免疫的临床试验比较

[0207] 进行 II 期、开放式、控制研究以比较 GSK Biological 的脑膜炎球菌血清群 C 缀合疫苗 (MenC) 和 GSK Biological 的 b 型流感嗜血杆菌 - 脑膜炎球菌血清群 C 缀合疫苗 (Hib-MenC) 或 Meningitec®。每剂 Meningitec® 含有 10 μg 缀合到 15 μg CRM197 上

的脑膜炎球菌血清群 C 低聚糖,并且所述 Meningitec[®] 是由 Wyeth 生产的。GSK MenC 缀合物含有约 200kDa 的缀合到破伤风类毒素 (TT) 上的天然多糖。

[0208] 研究由五个组组成,每个组计划含有 100 名受试者,将受试者如下地分配到两个平行队列中:

[0209] 在本研究中,使两个队列中的所有受试者在 12-15 个月大(第 0 研究月份)时接受五分之一 (1/5) 剂量的 Mencevax[™] ACWY 和伴随剂量的 Infanrix[™] hexa。对所有受试者均收集两份血样(第 0 研究月份的和第 1 研究月份 1 的)。队列 1 由来自初种免疫研究的四个组组成,其中受试者在它们 3、4 和 5 个月大时初种了如下疫苗:

[0210] ● K 组:MenC(10 μ g),无吸附的(non-ads),破伤风类毒素(TT)缀合物和 Infanrix[™] hexa(MenC10-TT+Infanrix[™] hexa)

[0211] ● L 组:Hib(10 μ g)-MenC(10 μ g),无吸附 TT 缀合物和 Infanrix[™] penta(Hib10-MenC10-TT+Infanrix[™] penta)

[0212] ● M 组:Hib(5 μ g)-MenC(5 μ g),无吸附的,TT 缀合物和 Infanrix[™] penta(Hib5-MenC5-TT+Infanrix[™] penta)

[0213] ● N 组:Meningitec[™] 和 Infanrix[™] hexa(Meningitec[™]+Infanrix[™] hexa)

[0214] 在加强免疫研究中使两个 Hib-MenC-TT 疫苗组(L 组和 M 组)保持盲试状态以选出候选疫苗的准确配方。

[0215] 队列 2(0 组)由之前没有接种过脑膜炎球菌血清群 C 疫苗(天然)的年龄匹配的受试者组成,但他们接受过根据 German Permanent Commission on Immunization 的常规儿科疫苗。

[0216] 评价标准:

[0217] 免疫原性:通过杀菌力试验(截点:1:8 的稀释度)确定抗脑膜炎球菌 C 的灭菌抗体滴度(SBA-MenC),用 ELISA 法来测量血样中抗脑膜炎球菌血清群 C(试验截点:0.3 μ g/ml)、Hib 多糖 PRP(试验截点:0.15 μ g/ml)和破伤风类毒素(试验截点:0.1IU/ml)的抗体,其中所述血样是在接种疫苗前和接种疫苗后大约一个月时从所有受试者处获得的。

[0218] 统计方法:

[0219] 人口分布:确定 ATP 和总接种人群的平均年龄,按月计算(包括中值、范围和标方差[SD]),以及种族和性别组成。

[0220] 免疫原性:

[0221] 以用于测量免疫原性的 ATP 人群(为了分析免疫记忆和加强免疫反应)或用于测量安全性的 ATP 人群(为了分析持续性)为基础进行了两个免疫原性分析。其包括:

[0222] 评价对 MenC 的免疫记忆以及对 Hib 和破伤风的加强应答

[0223] (在用 1/5 剂量的普通多糖疫苗给药前或给药一个月后):

[0224] ●测定 95%置信区间内(95% CI)的几何平均滴度和浓度(GMTs 和 GMCs)

[0225] ●测定恰好 95% CI 内的抗体滴度/浓度大于所设定截点的受试者的百分比

[0226] ●使用反向累积曲线研究接种疫苗后的抗体滴度/浓度

[0227] ●对初种组(K、L、M 和 N 组)与未接种组(组 0)之间的血清阳性/血清保护性抗体阳性比值的差进行标准化的趋近 95% CI 的计算

[0228] ●确定 SBA-MenC 滴度比抗 -PSC 浓度单个比例的 95% CI 内的几何平均数

[0229] ●使用 ANOVA 模型测定 K、L、M 组和对照组 N 之间对于抗 -PRP 和抗 -破伤风的以及各初种组 (K、L、M 和 N 组) 和未接种组 (O 组) 之间对于 SBA-MenC 和抗 -PSC 的 95% CI 内的接种后 GMT/C 比

[0230] 结果

[0231] 表 1、加强免疫接种后的 SBA-MenC 滴度和抗 -PSC 抗体浓度

[0232]

抗体	组	N	GMT/C	95 % CL LL	95 % CL UL
SBA-MenC	K-MenC-TT	71	3508.9	2580.1	4772.2
	L-HibMenC	79	2530.1	1831.7	3494.7
	M-HibMenC	81	5385.4	4425.0	6554.2
	N-Meningitec	85	1552.6	1044.4	2307.9
	O-对照	91	9.3	6.3	13.6
抗-PSC	K-MenC-TT	70	28.10	22.59	34.95
	L-HibMenC	71	30.01	24.09	37.38
	M-HibMenC	76	34.58	29.10	41.09
	N-Meningitec	78	16.59	12.98	21.21
	O-对照	94	3.05	2.36	3.93

[0233] 组 K：用 MenC10-TT+Infanrix.hexa 初种的受试者；L 组：用 Hib10-MenC 10-TT+Infanrix.penta 初种的受试者；M 组：用 Hib5-MenC5-TT+Infanrix.penta 初种的受试者；N 组：用 Meningitec.+Infanrix.hexa 初种的受试者；O 组：对照受试者（即，没有用 MenC 缀合疫苗接种的受试者）

[0234] N：具有有效结果的受试者的数量

[0235] 与 Meningitec 低聚糖缀合疫苗相比，用较大尺寸的 MenC 多糖缀合疫苗进行初种 (K、L 和 M 组) 获得了较高的抗 MenC 抗体滴度和较高的 SBA 滴度。

[0236] 表 2：SBA MenC 滴度 / 抗 -PSC 浓度的几何平均数比

[0237]

组	时间	N	GMR	LL	UL
K	前	70	49.470	34.939	70.044
	后	66	126.138	101.419	156.882
L	前	76	36.528	25.849	51.621
	后	70	90.200	70.153	115.975
M	前	77	51.298	36.478	72.139
	后	74	164.950	139.304	195.318
N	前	84	22.571	16.521	30.837
	后	76	90.168	67.757	119.991
O	前	3	91.634	0.651	12889.8
	后	87	2.708	1.767	4.149

[0238] 在全部四个初种组 (K、L、M 和 N 组) 中，从加强免疫接种前到加强免疫接种后 GMR 存在明显地提高，这表明了抗体成熟和官能性的存在。M 组（用 Hib5-MenC5-T 初种的）中

的 GMR 比 N 组（用 Meningitec™ 初种的）中的高。

[0239] 表 3、在 12-15 个月大刚好在给予加强免疫接种之前时的残余量

终点	组	N	%	组	N	%	差值	值%
SBAMenC ≥ 1:8	K	79	88.6	N	91	80.2	N-K	-8.4
	L	84	93.3	N	91	80.2	N-L	-3.1
	M	85	87.1	N	91	80.2	N-M	-6.8
SBAMenC ≥ 1:128	K	79	65.8	N	91	51.6	N-K	-14.2
	L	84	56.0	N	91	51.6	N-L	-4.3
	M	85	64.7	N	91	51.6	N-M	-13.1
抗- PSC ≥ 0.3μg/ml	K	79	100.0	N	91	100.0	N-K	0.0
	L	84	100.0	N	91	100.0	N-L	0.0
	M	88	98.9	N	91	100.0	N-M	1.1
抗- PSC ≥ 2μg/ml	K	79	72.2	N	91	81.3	N-K	9.2
	L	84	64.3	N	91	81.3	N-L	17.0
	M	88	64.3	N	91	81.3	N-M	8.6
抗- PRP ≥ 0.15μg/ml	K	81	88.9	N	91	85.7	N-K	-3.2
	L	86	96.5	N	91	85.7	N-L	-10.8
	M	90	98.9	N	91	85.7	N-M	-13.2
抗- PRP ≥ 1μg/ml	K	81	33.3	N	91	28.6	N-K	-4.8
	L	86	55.8	N	91	28.6	N-L	-27.2
	M	90	74.4	N	91	28.6	N-M	-45.9
抗-破伤风 ≥ 0.1 IU/ml	K	81	100.0	N	91	96.7	N-K	-3.3
	L	86	100.0	N	91	96.7	N-L	-3.3
	M	90	100.0	N	91	96.7	N-M	-3.3

[0241] 组 K：用 MenC10-TT+Infanrix™ hexa 初种的受试者；L 组：用 Hib10-MenC10-TT+Infanrix™ penta 初种的受试者；M 组：用 Hib5-MenC5-TT+Infanrix™ penta 初种的受试者；N 组：用 Meningitec™+Infanrix™ hexa 初种的受试者；

[0242] N：具有有效结果的受试者的数量

[0243] 与用 MenC- 低聚糖缀合物 Meningitec™ 进行初种相比，用较大尺寸的 MenC 初种（K、L 和 M 组）获得了较高的抗 MenC SBA 滴度。免疫记忆（用于测定免疫原性的 ATP 人群）

[0244] 用 1/5 剂普通多糖 ACWY 疫苗进行的给药在全部四个初种组中均获得了非常高的 SBA-MenC 滴度，其中在用候选疫苗方案初种的受试者中分别有 98.7-100% 和 97.5-100% 的受试者显示出 ≥ 1 : 8 和 ≥ 1 : 128 的滴度。在用 Meningitec™ 方案初种的组中，存在滴度 ≥ 1 : 128 的受试者的百分比较低（91.8%）的趋势。在比较中，17.6% 的未接种的受试者具有 ≥ 1 : 8 和 ≥ 1 : 128 的 SBA MenC 滴度。

[0245] 实施例 4 对与 DTPw-HepB 混合的 HibMenAC-TT 缀合疫苗的 II 期临床试验

[0246] 研究设计：对五个组进行开放式、随机（1 : 1 : 1 : 1 : 1）、单中心的研究。所述的五个组在 6、10 和 14 周大时分别接受了如下的疫苗接种方案。

[0247] ● Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2.5/2.5/2.5：以后被称为 2.5/2.5/2.5

[0248] ● Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 2.5/5/5：以后被称为 2.5/5/5

[0249] ● Tritanrix™-HepB/Hib-MenAC 5/5/5：以后被称为 5/5/5

[0250] ● Tritanrix™-HepB+Hiberix™：以后被称为 Hiberix

[0251] ● Tritanrix-HepB/Hiberix™+Meningitec™：以后被称为 Meningitec

[0252] 在第一剂疫苗时（前）和在第三剂疫苗后的一个月（后 - 剂 3）时采集血样。

[0253] Tritanrix 是 GlaxoSmithKline Biologicals S.A. 上市的一种 DTPw 疫苗。

[0254] 五个组中的每个组中均使用了 105 名受试者,研究中共使用了 525 名受试者。

[0255] 表 4GSK 疫苗制剂的含量

[0256]

每剂 (0.5 ml) 中的组分	2.5/2.5/2.5*	2.5/5/5	5/5/5
缀合到破伤风类毒素 (TT) 上的 Hib 荚膜多糖 PRP	2.5 µg	2.5 µg	5 µg
缀合到 TT 上的脑膜炎奈瑟氏球菌 A 荚膜多糖 (PSA)	2.5 µg	5 µg	5 µg
缀合到 TT 上的脑膜炎奈瑟氏球菌 C 荚膜多糖 (PSC)	2.5 µg	5 µg	5 µg

[0257] *2.5/2.5/2.5 疫苗是 GSK Biologicals 的 Hib-MenAC 5/5/5 疫苗的稀释剂,其含有 2.5 µg 的每种 PRP-TT、MenA-TT 和 MenC-TT。

[0258] 将 Hib-MenAC 疫苗制剂就地与 Tritanrix-HepB 混合。GSK Biologicals 的联合白喉-破伤风-全细胞百日咳杆菌-乙型肝炎 (DTPw-HB) 疫苗 (Tritanrix-HepB) 含有不少于 30 国际单位 (IU) 的白喉类毒素,不少于 60IU 的破伤风类毒素,不少于 4IU 的灭活百日咳杆菌和 10 µg 的重组乙型肝炎表面抗原。

[0259] 参考治疗、剂量、给药方式,批号:

[0260] 接种时间安排/位置:一组在 6、10 和 14 周大时在左股处通过肌肉注射接种了 Tritanrix-HepB 疫苗,在右股处通过肌肉注射接种了 Hiberix 疫苗。另一组在 6、10 和 14 周大时在左股处通过肌肉注射接种了 Tritanrix-HepB/Hiberix 疫苗,在右股处通过肌肉注射接种了 Meningitec 疫苗。

[0261] 疫苗/组成/剂量/批号:所使用的 Tritanrix-HepB 如上所述。

[0262] 一剂 (0.5ml) GSK Biologicals 的 b 型流感嗜血杆菌缀合疫苗:Hiberix™ 含有 10 µg 缀合到破伤风类毒素上的 PRP。在 Hiberix™ 组中,将其与无菌稀释剂混合,而在 Meningitec™ 组中,将其与 Tritanrix™-HepB 混合。

[0263] 一剂 (0.5ml) Wyeth Lederle 的 MENINGITECTM 疫苗,其含有:10 µg 缀合到 15 µg 白喉杆菌 CRM197 蛋白上的脑膜炎球菌群 C 群荚膜低聚糖和铝作为盐。

[0264] 结果-对 Hib、MenA 和 MenC 产生的免疫应答

[0265] 表 5a 抗-PRP (µg/ml)

[0266]

组	2.5/2.5/2.5			2.5/5/5			5/5/5			Hiberix™			Meningitec™		
	%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL		%	95%CL	
	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL	GMC/T	LL	UL
%≥0.15	100	96.5	100	99.0	94.8	100	100	96.5	100	100	96.5	100	100	96.5	100
GMC	20.80	15.96	27.10	22.62	17.72	28.88	19.36	15.33	24.46	38.55	29.93	49.64	10.94	8.62	13.88

[0267] 表 5b SBA-MenC

[0268]

组	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	Hiberix™	Meningitec™
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥1:8	99 94.7 100	100 96.5 100	100 96.5 100	2.9 0.6 8.4	100 96.5 100
GMT	3132 2497 3930	4206 3409 5189	3697 3118 4384	4.7 3.9 5.6	4501 3904 5180

[0269] 表 5c SBA MenA

[0270]

组	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	Hiberix™	Meningitec™
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥1:8	99.7 91.9 99.7	100 95.8 100	100 96.2 100	6.8 2.5 14.3	9.1 4.0 17.1
GMT	316.7 251.4 398.9	418.5 358.6 488.5	363 310.5 424.4	5.6 4.3 7.4	5.6 4.4 7.2

[0271] 表 5d 抗 -PSP (μg/ml)

[0272]

组	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	Hiberix™	Meningitec™
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥0.3	100 96.5 100	100 96.4 100	100 96.5 100	8.2 3.6 15.6	100 96.5 100
GMC	49.03 43.24 55.59	71.11 62.49 80.92	61.62 54.88 69.20	0.17 0.15 0.19	58.02 51.42 65.46

[0273] 表 5e 抗 -PSA (μg/ml)

[0274]

组	2.5/2.5/2.5	2.5/5/5	5/5/5	Hiberix™	Meningitec™
	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL	% 95%CL GMC/T LL UL
%≥0.3	100 96.4 100	100 96.5 100	99.0 94.8 100	1.0 0.0 5.4	5.9 2.2 12.5
GMC	18.10 15.34 21.35	26.51 22.93 30.79	23.40 20.05 27.30	0.15 0.15 0.15	0.17 0.15 0.18

[0275] 结论

[0276] 比较通过使用低聚糖 MenC-CRM197 缀合疫苗和含有多糖 MenA-TT 和 MenC-TT 缀合物的三种 GSK 制剂所获得的免疫结果,比较结果显示,多糖 Men 缀合物能够产生与使用低聚糖缀合物疫苗 Meningitec 所获得的免疫应答相似的良好免疫应答。所有试验制剂均在 100% 的患者中给出了对 MenC 的应答。

[0277] 实施例 5-按照 2、3 和 4 个月的时间安排进行伴随有 Infanrix penta 的 Hib MenCY 给药 II 期临床试验

[0278] 研究设计:对 5 个组进行 II 期、开放式(部分地双盲*)随机的受控多中心研究,所述 5 个组接受了三剂使用如下疫苗进行的初种计划:

[0279] Hib-MenCY 2.5/5/5 组:Hib-MenCY(2.5/5/5)+Infanrix™ penta

[0280] Hib-MenCY 5/10/10 组:Hib-MenCY(5/10/10)+Infanrix™ penta

[0281] Hib-MenCY 5/5/5 组:Hib-MenCY(5/5/5)+Infanrix™ penta

[0282] Hib-MenC 组:Hib-MenC(5/5)+Infanrix™ penta

[0283] Menjugate 组:Menjugate™**+Infanrix™ hexa(对照)

[0284] *Hib-MenCY 2.5/5/5、Hib-MenCY 5/10/10 和 Hib-MenC 是以双盲的方式给药的,而 Hib-MenCY 5/5/5 组和 Menjugate 组是开放式的。Hib-MenCY 的 2.5/5/5、5/10/10 和 5/5/5 制剂含有 MenC 天然多糖和微流化的 MenY 多糖。

[0285] **Menjugate™ 每剂含有 10 μg 的缀合到 12.5-25 μg CRM197 上的 MenC 低聚糖,并且其是由 Chiron 制造的。

[0286] 在 +/-2、3、4 个月大(第 0 研究月份、第 1 研究月份和第 2 研究月份)时接种疫苗,在初种之前和初种后一个月时(第 0 研究月份和第 3 研究月份)采集所有受试者的血样(3.5ml)

[0287] 研究的疫苗、剂量、给药方式、批号:如下所示,在大约 2、3 和 4 个月大时以一个月为间隔肌肉注射三剂:

[0288] 表 6:给予的疫苗(研究和对照)、组、时间安排/位置和剂量

[0289]

组	时间 安排 (月龄)	给予的疫苗的剂量 位置 - 左上股	给予的伴随疫苗 位置 - 右上股
Hib-MenCY 2.5/5/5 组	2、3 和 4	Hib (2.5 μg)-MenC-TT (5 μg)-MenY-TT (5 μg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/10/10	2、3 和 4	Hib (5 μg)-MenC-TT (10 μg)-MenY-TT (10 μg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenCY 5/5/5	2、3 和 4	Hib (5 μg)-MenC-TT (5 μg)-MenY-TT (5 μg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Hib-MenC	2、3 和 4	Hib (5 μg)-Men C (5 μg)	DTPa-HBV-IPV (Infanrix™ penta)
Menjugate™	2、3 和 4	Menjugate™	DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix™ hexa)

[0290] 免疫原性:测量对每种疫苗抗原的抗体滴度/浓度:

[0291] 在第一剂(第 0 月份)前和第三剂后大约一个月(第 3 月份)时在对于:SBA-MenC 和 SBA-MenY、抗-PSC 和抗-PSY、抗-PRP、抗-T、抗-FHA、抗-PRN 和抗-PT 的所有受试者中。利用对脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 C 和 Y(SBA-MenC 和 SBA-MenY 截点:1:8 和 1:128)的血清灭菌活性;进行 ELISA 试验,试验的截点:对于抗-脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 C 和 Y 多糖(抗-PSC 1gG 和抗-PSY 1gG)为 $\geq 0.3 \mu\text{g/ml}$ 和 $\geq 2 \mu\text{g/ml}$;对于 Hib 多糖磷酸聚核糖基核糖醇(抗-PRP 1gG)为 $\geq 0.15 \mu\text{g/ml}$ 和 $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$;对于抗-FHA、抗-PRN、抗-PT 为 5EL.U/ml;对于抗破伤风类毒素(抗-TT)为 $\geq 0.1 \text{IU/ml}$ 。仅在第三剂后的一个月时(第 3 月份)对于:抗-D、抗-HBs 和抗-脊髓灰质炎 1、2 和 3 的所有受试者中。使用 ELISA 试验,试验的截止点:对于抗-白喉(抗-D)为 0.1IU/ml;对于抗乙型肝炎(抗-HBs)为 $\geq 10 \text{mIU/ml}$;和微量中和试验,截止点为:对于抗-脊髓灰质炎 1、2 和 3 型(抗-脊髓灰质炎 1、2 和 3)为 1:8。

[0292] 统计方法：

[0293] 对于 SBA-MenC、抗 -PSC、SBA-MenY、抗 -PSY、抗 -PRP、抗 -破伤风、抗 -PT、抗 -FHA 和抗 -PRN 在接种疫苗前以及在接种疫苗后一个月时；对于抗 -白喉、抗 -HBs、抗 -脊髓灰质炎 1、抗 -脊髓灰质炎 2 和抗 -脊髓灰质炎 3 在接种疫苗后一个月时计算每组的 95% 的置信区间 (95% CI) 内的血清保护性抗体阳性 / 血清阳性比和几何平均数浓度 / 滴度 (GMCs / GMTs)。对抗 -PT、抗 -PRN 和抗 -FHA 的 95% CI 内的免疫应答 (在最初为血清阴性的受试者中出现抗体, 或者至少在最初为血清阳性的受试者中保持了抗体的浓度) 也是在接种疫苗后一个月时计算的。还提供了每个抗体在第 3 月份时的反向累积曲线。对除 SBA-MenY 和抗 -PSY 以外的每种抗体均以探索性的方式评价了与 Menjugate™ 对照组相比, Hib-MenCY 组和 Hib-MenC 组之间的差异, 评价的依据是 (1) 用 Menjugate™ 组中超过指定截点或在其标准渐进 95% CI 内具有免疫应答的受试者的百分比 (减去) Hib-MenCY 组和 Hib-MenC 组中的上述受试者的百分比, 所得结果之间的差异, (2) 在它们的 95% CI 内, Menjugate™ 组比 Hib-MenCY 组和 Hib-MenC 组的 GMC 或 GMT 比。对于抗 -PRP、SBA-MenC、抗 -PSC、SBA-MenY、抗 -PSY 和抗 -TT 抗体进行了同样的比较以评价每对 Hib-MenCY 制剂之间的差异。

[0294] 根据症状类型、其强度和与疫苗接种的关系, 按组计算了局部和全身引发病状的症状总发病率 (所述发病率为在疫苗接种后 8 天内并且在它们的精确 95% CI 内报告具有全身、局部或任何引发病状的症状的受试者的百分比)。计算每组中未引发病状的发生率。对于 3 级症状, 提供了 ≤ 48 小时的发病情况、治疗情况、持续时间、与免疫接种的关系和结果。对严重的不利事件进行了充分地描述。

[0295] 血清保护性抗体阳性 / 血清阳性比 & GMC/Ts (用于检测免疫原性的 ATP 人群)

[0296] 表 7a 抗 -PRP (μg/ml)

组	N	% ≥ 0.15	LL	UL	≥ 1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	67	100.0	94.6	100.0	98.5	92.0	100.0	9.01	7.25	11.21
Hib MenCY 5/10/10	67	100.0	94.6	100.0	98.5	92.0	100.0	9.49	7.72	11.65
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	98.6	92.3	100.0	8.08	6.53	9.98
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	98.6	92.7	100.0	10.44	8.49	12.83
Menjugate™	71	100.0	94.9	100.0	80.3	69.1	88.8	2.60	1.97	3.43

[0298] 表 7b SBA-MenC (滴度)

组	N	% ≥ 1:8	LL	UL	≥ 1:128	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	95.7	88.0	99.1	1005.8	773.5	1308.0
Hib MenCY 5/10/10	67	100.0	94.6	100.0	94.0	85.4	98.3	1029.8	799.7	1326.0
Hib MenCY 5/5/5	71	100.0	94.9	100.0	94.4	86.2	98.4	906.9	691.3	1189.8
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	95.9	88.6	99.2	871.0	677.3	1120.0
Menjugate™	71	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	3557.6	2978.8	4248.8

[0300] 表 7c 抗 -PSC (μg/ml)

[0301]

组	N	% ≥ 0.3	LL	UL	≥ 2	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	69	100.0	94.8	100.0	100.0	94.8	100.0	21.70	18.36	25.65
Hib MenCY 5/10/10	66	100.0	94.6	100.0	100.0	94.6	100.0	27.26	23.26	31.95
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	19.02	16.49	21.93
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	100.0	95.1	100.0	21.08	18.24	24.35
Menjugate™	71	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	38.49	33.64	44.05

[0302] 表 7d SBA-MenY (滴度)

[0303]

组	N	% $\geq 1:8$	LL	UL	$\geq 1:128$	LL	UL	GMT	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	69	97.1	89.9	99.6	92.8	83.9	97.6	470.7	351.1	631.2
Hib MenCY 5/10/10	66	97.0	89.5	99.6	86.4	75.7	93.6	437.1	322.0	593.4
Hib MenCY 5/5/5	71	98.6	92.4	100.0	95.8	88.1	99.1	635.3	501.5	804.8
Hib MenC	74	21.6	12.9	32.7	13.5	6.7	23.5	9.3	6.3	13.7
Menjugate™	71	19.7	11.2	30.9	9.9	4.1	19.3	7.5	5.4	10.4

[0304] 表 7e 抗-PSY ($\mu\text{g/ml}$)

[0305]

组	N	% ≥ 0.3	LL	UL	≥ 2	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	69	100.0	94.8	100.0	100.0	94.8	100.0	26.86	22.86	31.56
Hib MenCY 5/10/10	66	100.0	94.6	100.0	100.0	94.6	100.0	37.02	31.84	43.04
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	100.0	94.9	100.0	23.57	19.94	27.86
Hib MenC	74	8.1	3.0	16.8	4.1	0.8	11.4	0.19	0.15	0.25
Menjugate™	71	5.6	1.6	13.8	1.4	0.0	7.6	0.17	0.15	0.19

[0306] 表 7f 抗-破伤风 (IU/ml)

[0307]

组	N	% ≥ 0.1	LL	UL	GMC	LL	UL
Hib MenCY 2.5/5/5	68	100.0	94.7	100.0	3.06	2.63	3.55
Hib MenCY 5/10/10	67	100.0	94.6	100.0	3.25	2.88	3.68
Hib MenCY 5/5/5	70	100.0	94.9	100.0	2.97	2.59	3.41
Hib MenC	74	100.0	95.1	100.0	3.15	2.73	3.64
Menjugate™	71	100.0	94.9	100.0	1.66	1.39	1.97

[0308] Hib-MenCY 2.5/5/5 组 :Hib-MenCY(2.5/5/5)+Infanrix™ penta

[0309] Hib-MenCY 5/10/10 组 :Hib-MenCY(5/10/10)+Infanrix™ penta

[0310] Hib-MenCY 5/5/5 组 :Hib-MenCY(5/5/5)+Infanrix™ penta

[0311] Hib-MenC 组 :Hib-Men(5/5)+Infanrix™ hexa

[0312] Menjugate 组 :Menjugate™+Infanrix™ penta

[0313] N = 具有有效结果的受试者的数目。% = 浓度 / 滴度在指定范围内的受试者的百分比

[0314] GMC/T : 浓度 / 滴度的几何平均数 95% CI = 95% 的置信区间 ; LL = 最低值 ; UL = 最高值

[0315] 结论

[0316] MenC 和 Y 多糖缀合物在所有受试者中产生了良好的免疫应答, 其中 100% 的受试

者对 MenC 和 MenY 产生了大于 $0.3 \mu\text{g/ml}$ 的应答。

[0317] 实施例 6- 比较三种 MenACWY-TT 制剂与 Meningitec MenC-CRM197 低聚糖 - 缀合疫苗的 II 期临床试验

[0318] 本实施例报导了 II 期、开放式（部分盲试的）、随机、控制剂量 - 范围的研究以评价当向 12-14 个月大的儿童给予一剂时，与 MenC 低聚糖 - CRM197 缀合疫苗 (Meningitec™) 相比, GlaxoSmithKline Biological 的脑膜炎球菌血清群 A、C、W-135、Y 破伤风类毒素缀合 (MenACWY-TT) 疫苗三种不同制剂的免疫原性。

[0319] 临床试验是开放式（部分双盲*）、受控、多中心的研究，其中将 12-14 个月大的合格受试者随机（1 : 1 : 1 : 1）地分配到四个平行组中的一个中，每个组有 50 名受试者，所述受试者在 1 次就诊时如下所示地接受了一剂初种：

[0320] Form 1T : MenACWY-TT, 其剂量为 $2.5 \mu\text{g}$ 缀合到破伤风类毒素 (TT) 上的 MenA 多糖、 $2.5 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenC 多糖、 $2.5 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenW 多糖和 $2.5 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenY 多糖。

[0321] Form 2T : MenACWY-TT, 其剂量为 $5 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenA 多糖、 $5 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenC 多糖、 $5 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenW 多糖和 $5 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenY 多糖。

[0322] Form 3T : MenACWY-TT, 其剂量为 $2.5 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenA 多糖、 $10 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenC 多糖、 $2.5 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenW 多糖和 $2.5 \mu\text{g}$ 缀合到 TT 上的 MenY 多糖。

[0323] Ctrl 1T : $10 \mu\text{g}$ 缀合到 12.5-25 μg CRM197 上的 MenC 低聚糖 (Meningitec)。

[0324] * 三种不同的 MenACWY-TT 制剂是以双盲的方式给药的。

[0325] 疫苗接种时间安排 / 位置 : 在第 1 次就诊时（第 0 研究月）根据随机分配在左三角肌上通过肌肉注射给药以一剂疫苗。所有候选疫苗均以装在一剂小瓶中的冻干丸剂（与所提供的盐水稀释剂混合后为 0.5ml ）的形式提供。

[0326] 免疫原性 : 测定血样中抗脑膜炎球菌疫苗抗原组分抗体的滴度 / 浓度，所述血样是在给予研究疫苗制剂之前和给予研究疫苗制剂后大约一个月时从所有受试者处获得的。通过杀菌力试验（试验截点 : 1 : 8 和 1 : 128 的稀释度）测定抗脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 A、C、W-135 和 Y 的灭菌抗体滴度 (SBA-MenA、SBA-MenC、SBA-MenW 和 SBA-MenY)，通过 ELISA 法测定抗脑膜炎奈瑟氏球菌血清群 A、C、W-135 和 Y 的抗体（抗 -PSA、抗 -PSC、抗 -PSW 和抗 -PSY，试验截点为 $\geq 0.3 \mu\text{g/ml}$ 和 $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ ）和抗破伤风类毒素的抗体（抗 - 破伤风，试验截点为 0.1IU/ml ）。

[0327] 结果

[0328] 表 8 中以接种疫苗后一个月（初种的终点）时 SBA-MenA、SBA-MenC、SBA-MenW 和 SBA-MenY 应答者的百分比的形式显示了抗体应答。应答被定义为大于或等于 4- 倍的血清阳性受试者的增加或接种疫苗前为血清阴性的受试者的血清转化。

[0329] 表 8 : 接种疫苗后一个月时对 SBA 抗体的疫苗应答

[0330]

抗体	组	N	%	LL	UL
SBA-MenA	Form 1T	42	61.9	45.6	76.4
	Form 2T	39	82.1	66.5	92.5
	Form 3T	40	62.5	45.8	77.3
	Meningitec™	36	11.1	3.1	26.1
SBA-MenC	Form 1T	46	97.8	88.5	99.9
	Form 2T	43	100.0	91.8	100.0
	Form 3T	44	95.5	84.5	99.4
	Meningitec™	49	91.8	80.4	97.7
SBA-MenW	Form 1T	45	100.0	92.1	100.0
	Form 2T	43	97.7	87.7	99.9
	Form 3T	45	100.0	92.1	100.0
	Meningitec™	46	15.2	6.3	28.9
SBA-MenY	Form 1T	47	97.9	88.7	99.9
	Form 2T	44	88.6	75.4	96.2
	Form 3T	45	93.3	81.7	98.6
	Meningitec™	49	4.1	0.5	14.0

[0331] 表 9 显示了所获得的 SBA 滴度超过了 1 : 8 和 1 : 1.28 的截点的受试者的数量和 GMTs。

[0332] 表 9 : 疫苗接种后一个月时 SBA 抗体的血清阳性率和 GMTs

[0333]

	组	N	%	≥1:8 LL	UL	%	≥1:128 LL	UL	GMT
SBA-MenA	Form 1T	46	100	92.3	100	100	92.3	100	1457.3
	Form2T	45	100	92.1	100	97.8	88.2	99.9	1776.9
	Form3T	48	97.9	88.9	99.9	97.9	88.9	99.9	1339.5
	Meningitec™	41	51.2	35.1	67.1	43.9	28.5	60.3	42.8
SBA-MenC	Form 1T	47	97.9	88.7	99.9	78.7	64.3	89.3	281.3
	Form2T	45	100	92.1	100	84.4	70.5	93.5	428.6
	Form3T	47	95.7	85.5	99.5	85.1	71.7	93.8	478.4
	Meningitec™	50	94.0	83.5	98.7	62.0	47.2	75.3	200.1
SBA-MenW	Form 1T	47	100	92.5	100	100	92.5	100	2529.1
	Form2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	2501.6
	Form3T	48	100	92.6	100	97.9	88.9	99.9	2300.2
	Meningitec™	48	27.1	15.3	41.8	6.3	1.3	17.2	9.4
SBA-MenY	Form 1T	47	100	92.5	100	100	92.5	100	1987.4
	Form2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	2464.8
	Form3T	48	100	92.6	100	97.9	88.9	99.9	2033.7
	Meningitec™	49	49.0	34.4	63.7	28.6	16.6	43.3	25.0

[0334] 用 ACWY-T 多糖缀合物的三种制剂进行的疫苗接种全部导致了对 MenA、MenC、MenW 和 MenY 的良好 SBA 应答, 其中 95-100% 的受试者具有大于 1 : 8 的滴度。特别是, 通过滴度大于 1 : 128 的受试者的较高比例和 GMT 读数可以看出, 多糖缀合物的 5/5/5/5 和 2.5/10/2.5/2.5 制剂产生了比 Meningitic™ 疫苗高的抗 MenC 应答。

[0335] 表 10 接种疫苗后一个月时抗多糖抗体的血清阳性率和 GMCs

[0336]

	组	N	%	$\geq 0.3 \mu\text{g}$ /ml LL	UL	%	$\geq 2 \mu\text{g}$ /ml LL	UL	GMC $\mu\text{g/ml}$
抗- MenA	Form 1T	47	93.6	82.5	98.7	68.1	52.9	80.9	2.35
	Form2T	45	100	92.1	100	64.4	48.8	78.1	3.11
	Form3T	48	95.8	85.7	99.5	37.5	24.0	52.6	1.65
	Meningitec™	50	10.0	3.3	21.8	2.0	0.1	10.6	0.18
抗- MenC	Form 1T	47	100	92.5	100	100	92.5	100	9.57
	Form2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	12.53
	Form3T	47	100	92.5	100	97.9	88.7	99.9	19.29
	Meningitec™	49	98.0	89.1	99.9	93.9	83.1	98.7	7.95
抗- Men W	Form 1T	47	100	92.5	100	80.9	66.7	90.9	4.56
	Form2T	45	100	92.1	100	93.3	81.7	98.6	6.83
	Form3T	48	93.8	82.8	98.7	72.9	58.2	84.7	2.88
	Meningitec™	50	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0	7.1	0.15
抗- MenY	Form 1T	47	100	92.5	100	97.9	88.7	99.9	8.90
	Form2T	45	100	92.1	100	100	92.1	100	12.78
	Form3T	47	97.9	88.7	99.9	87.2	74.3	95.2	5.67
	Meningitec™	50	2.0	0.1	10.6	0.0	0.0	7.1	0.15

[0337] ACWY-TT 多糖缀合疫苗的全部三种制剂均产生了抗 MenA、MenC、MenW 和 MenY 的良好免疫应答,其中 93%到 100%的受试者获得了大于 $0.3 \mu\text{g/ml}$ 的滴度。与 Meningitec™ 相比,使用 ACWY-TT 多糖缀合疫苗的 5/5/5/5 和 2/5/10/2.5/2.5 制剂时获得了较高的 GMC 读数。

[0338] 实施例 7- 比较天然的和调整过尺寸的 MenY 多糖缀合物的免疫原性

[0339] 通过皮下途径对小鼠 (6-8 周的雌性 DBA/2) 进行两次 PSY-TT 注射,间隔为 2 周。在第二次注射后的第 14 天采集血样以使用 S195menY 株进行抗 -PSY ELISA 和 SBA。在每次注射中,小鼠均接受了 $1 \mu\text{g}$ 的 PSY-TT (可溶的无吸附制剂)。

[0340] 使用了表 11 中所描述的缀合物。

[0341] 表 11

[0342]

缀合物	ENYTT012	ENYTT014	ENYTT015 bis
PSY 微流化	NO	Yes (40 周期)	Yes (20 周期)
TT/PS 比	1/1	1/1	1/1

[0343] 结果

[0344] 结果 (图 1) 显示用调整过尺寸的 PSY 制备的缀合物倾向于具有较高的免疫原性。图 1A 显示了对抗血清的 ELISA 试验中所获得的 GMC 结果,所述抗血清是为抵抗由天然 MenY (ENYTT012)、微流化 MenY-40 周期 (ENYTT014) 和微流化 MenY-20 周期 (ENYTT015bis) 制成的缀合物而产生的。当 MenY-TT 是由微流化 MenY 制成的时,获得了较高的 GMCs。

[0345] 当通过 SBA 试验 (图 1B) 评价抗血清时也获得了类似的结果。同样当使用由微流化 MenY 制成的缀合物时,获得了较高的 GMT 值。

[0346] 实施例 8- 评价 MenACWY 缀合疫苗中的 MenA 中的连接物的作用的临床试验

[0347] 在一个 1 : 1 : 1 : 1 : 1 的随机试验中,向 15-19 岁的青少年给药以 MenACWY 疫苗不同制剂的单剂,所述青少年被分为 5 个组,每组 25 名受试者。被试验的制剂是:

[0348] F1- 缀合到破伤风类毒素上的 MenACWY,其中 MenA 缀合物含有 AH 间隔物 -5/5/5/5 μ g

[0349] F2- 缀合到破伤风类毒素上的 MenACWY,其中 MenA 缀合物含有 AH 间隔物 -2.5/5/2.5/2.5 μ g

[0350] F3- 缀合到破伤风类毒素上的 MenACWY,其中 MenA 缀合物含有 AH 间隔物 -5/5/2.5/2.5 μ g

[0351] F4- 缀合到破伤风类毒素上的 MenACWY,其中任何缀合物中均没有间隔物 -5/5/5/5 μ g

[0352] 对照组 -Mencevax™ ACWY

[0353] 在接种后的第 30 天,从患者中采集血样。

[0354] 将所述血样用于评价在接种一剂疫苗后一个月时 SBA-MenA、SBA-MenC、SBA-MenW135 和 SBA-MenY 应答者的百分比。疫苗应答被定义为 1) 对于最初为血清阴性的受试者 - 在一个月时的接种后抗体滴度 $\geq 1/32$ 或者 2) 对于最初为血清阳性的受试者 - 抗体滴度 ≥ 4 倍的接种前抗体滴度。

[0355] 结果

[0356] 如表 13 中所显示的,在 MenA 缀合物中使用间隔物导致抗 MenA 的免疫应答的增加。当加入了 AH 间隔物时,应答者所占的百分比由 66% 增加到 90-95%。这反映在 SBA GMT 由 4335 增加到 10000 以及 GMC 从 5 增加到 20-40 上。预想不到的是,AH 间隔物的使用还导致了抗 MenC 的免疫应答的增加,这能够从应答者所占百分比的增加和 SBA GMT 的增加看出。当引入了间隔物时,还能够看到抗 MenY (6742-7122) 和抗 MenW (4621-5418) 的 SBA-GMT 的增加。

[0357] 表 12

[0358]

制剂	% SBA MenA 应答者	SBA-MenA GMT	抗- PSA GMC $\mu\text{g/ml}$ ELISA
F 1 5AH/5/5/5	90.9	9805	20.38
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	75	8517	29.5
F3 5AH/5/2.5/2.5	95.5	10290	47.83
F4 5/5/5/5	66.7	4335	5.46
Mencevax™	85.7	8022	27.39
制剂	% SBA MenC 应答者	SBA-MenC GMT	抗- PSC GMC $\mu\text{g/ml}$ ELISA
F 1 5AH/5/5/5	69.6	3989	12.11
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	81.8	3524	12.78
F3 5AH/5/2.5/2.5	81.8	3608	8.4
F4 5/5/5/5	73.9	2391	8.84
Mencevax™	90.0	5447	38.71
制剂	% SBA MenW 应答者	SBA-MenW GMT	抗- PSW GMC $\mu\text{g/ml}$ ELISA
F 1 5AH/5/5/5	95	5418	9.65
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	85	4469	14.55
F3 5AH/5/2.5/2.5	95.5	4257	6.39
F4 5/5/5/5	95.5	4621	10.7
Mencevax™	86.4	2714	13.57
制剂	% SBY MenY 应答者	SBA-MenY GMT	抗- PSY GMC $\mu\text{g/ml}$ ELISA
F 1 5AH/5/5/5	91.3	7122	16.3
F2 2.5AH/5/2.5/2.5	87.5	5755	12.52
F3 5AH/5/2.5/2.5	80	5928	8.88
F4 5/5/5/5	91.3	6742	13.88
Mencevax™	91.7	4854	21.02

[0359] 实施例 9- 评价 MenACWY 缀合疫苗中的 MenA 和 MenC 中的连接物的作用的临床试验

[0360] 在一个 1 : 1 : 1 : 1 : 1 的随机试验中, 向 15-19 岁的青少年给药 MenACWY 疫苗不同制剂的单剂, 所述青少年被分为 5 个组, 每组 25 名受试者。被试验的制剂是:

[0361] F1- 缀合到破伤风类毒素上的 MenACWY, 其中 MenA 和 MenC 缀合物含有 AH 间隔物 -2.5/2.5/2.5/2.5 μg

[0362] F2- 缀合到破伤风类毒素上的 MenACWY, 其中 MenA 和 MenC 缀合物含有 AH 间隔物 -5/5/2.5/2.5 μg

[0363] F3- 缀合到破伤风类毒素上的 MenACWY, 其中 MenA 和 MenC 缀合物含有 AH 间隔物 -5/5/5/5 μg

[0364] F4- 缀合到破伤风类毒素上的 MenACWY, 其中 MenA 缀合物含有 AH 间隔物 -5/5/5/5 μg

[0365] 对照组 -Mencevax™ ACWY

[0366] 在接种后第 30 天,从患者中采集血样。

[0367] 将所述血样用于评价在接种一剂疫苗后一个月时 SBA-MenA、SBA-MenC、SBA-MenW135 和 SBA-MenY 应答者的百分比。疫苗应答被定义为 1) 对于最初为血清阴性的受试者 - 在 1 个月时的接种后抗体滴度 $\geq 1/32$ 或者 2) 对于最初为血清阳性的受试者 - 抗体滴度 ≥ 4 倍的接种前抗体滴度。

[0368] 结果

[0369] 如表 14 中所显示的,向 MenC 缀合物中引入 AH 间隔物导致对 MenC 的免疫应答的增加。这通过 SBA GMT 由 1943 增加到 4329 以及抗 -PSCGMC 从 7.65 增加到 13.13 得到了证实。保持了对 MenA、MenW 和 MenY 的良好的免疫应答。

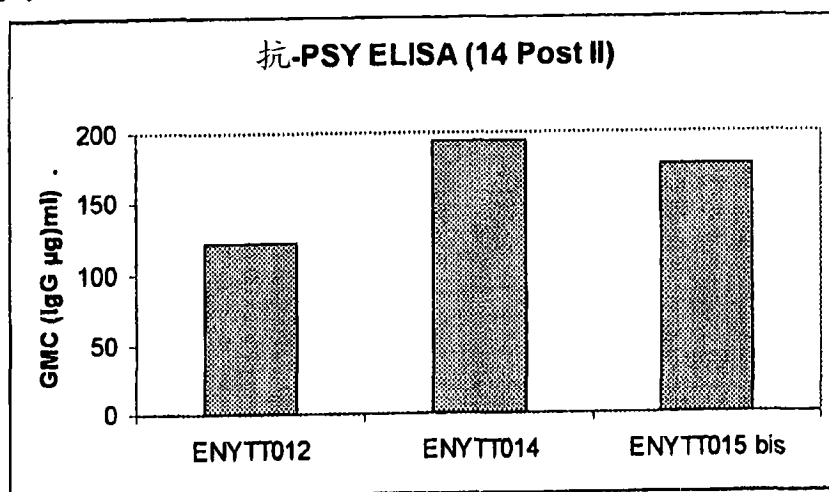
[0370] 表 13

制剂	% SBA MenA 应答者	SBA-MenA GMT	抗- PSA GMC $\mu\text{g/ml}$ ELISA
F 12.5AH/2.5AH/2.5/2.5	75	8417	20.23
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	72	6299	16.07
[0371] F3 5AH/5AH/5/5	87	9264	27.26
F4 5AH/5/5/5	77.3	9632	20.39
Mencevax™	78.3	8284	12.93
制剂	% SBA MenC	SBA-MenC GMT	抗- PSC GMC

[0372]

	应答者		μg/ml ELISA
F 12.5AH/2.5AH/2.5/2.5	88	3619	12.82
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	88	2833	13.32
F3 5AH/5AH/5/5	95.8	4329	13.13
F4 5AH/5/5/5	95.8	1943	7.65
Mencevax™	91.7	1567	16.55
制剂	% SBA MenW 应答者	SBA-MenW GMT	抗- PSW GMC μg/ml ELISA
F 12.5AH/2.5AH/2.5/2.5	100	5656	7
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	96	4679	5.4
F3 5AH/5AH/5/5	91.3	4422	4.45
F4 5AH/5/5/5	88	4947	7.67
Mencevax™	96	3486	11.93
制剂	% SBY MenY 应答者	SBA-MenY GMT	抗- PSY GMC μg/ml ELISA
F 1 2.5AH/2.5AH/2.5/2.5	75	3891	17.81
F2 5AH/5AH/2.5/2.5	92	3968	11.96
F3 5AH/5AH/5/5	79.2	2756	9.51
F4 5AH/5/5/5	80	3914	16.76
Mencevax™	88	3056	21.41

A



B

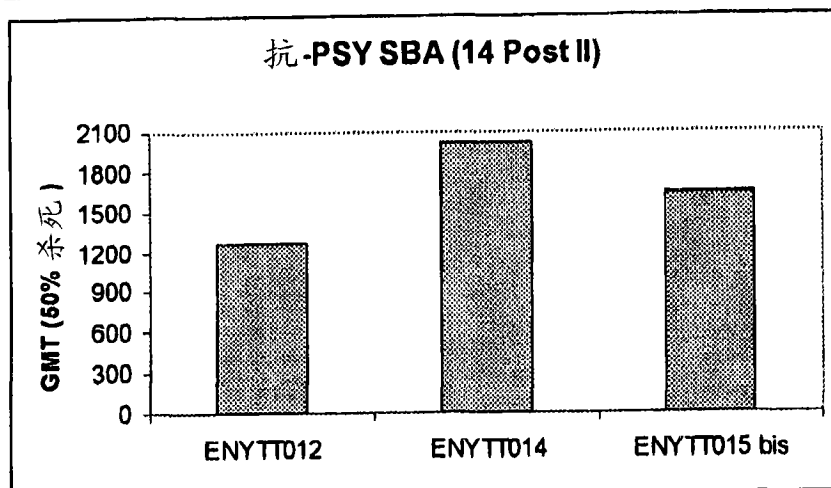


图 1