

公告本

發明專利說明書

107年6月21日修正本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96128983

C07K 14/315 (2006.01)

※申請日期：96.8.7

※IPC 分類：

C07K 14/32 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

C12R 1/17 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

蛋白質疫苗以及該疫苗的製造與使用方法 / C12R 1/46 (2006.01)

PROTEIN MATRIX VACCINES AND METHODS OF MAKING AND
ADMINISTERING SUCH VACCINES

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文) 哈佛大學校長及研究員協會/

PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE

代表人：(中文/英文)

珍娜 馬赫 / JANET MAHER

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國麻薩諸塞州 02138, 岡布里奇昆斯街 17 號

國籍：(中文/英文)

美國 / U.S.A.

三、發明人：(共1人)

姓名：(中文/英文)

約翰 J. 梅克蘭諾斯 / MEKALANOS, JOHN J.

國籍：(中文/英文)

美國 / U.S.A.



四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國、2006/8/7、60/835,944

2. 美國、2007/6/8、60/933,764

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明有關於疫苗組成物，其具有載體蛋白及包合在複合物中所要之抗原的，以及該疫苗的製造與使用方法。

六、英文發明摘要：

The invention relates to vaccine compositions having a carrier protein and an antigen of interest entrapped in a complex, methods of making such vaccines, and methods of vaccine administration.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(3)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

九、發明說明：

聯邦政府出資研究聲明

本發明榮獲美國國家衛生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 之支持，編號 U54AI057159。美國政府並擁有本發明特定權利。

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於疫苗組成物，以及該疫苗的製造與使用方法

【先前技術】

很多抗原，特別是那些與病原莢膜層有關的，因刺激少或無免疫反應，使製造抗這些抗原過於複雜。莢膜為微生物表面構成要素，一般由有機化合物之聚合物所組成，如碳水化合物、胺基酸或乙醇。莢膜在化學上是十分多變。製成莢膜之單體(如碳水化合物)可與各種分子構型連結一起，且尚可以磷、氮、硫及其它化學修飾取代。這些化學變異使得莢膜在微生物表面上呈現許多的抗原標的，因而可逃避針對這些標的之宿主免疫系統。莢膜亦可為毒性因子，以制止微生物不讓宿主巨噬細胞或多型核白血球 (polymorphoneuclear leukocyte) 吞噬或殺死。對抗莢膜之抗體具對抗莢膜型生物體強有力的防護，係藉補體附著於微生物表面，造成它們溶解或它們調理作用 (Opsonization)、吸收，及為噬菌宿主免疫細胞所殺死。

對抗莢膜之大部份高效抗體為 IgG 抗體。無法誘導 IgG 顯著水準之莢膜稱之 T-細胞依靠型抗原 (T-dependent antigen)。蛋白質對莢膜之共價結合使得它們為 “T-細胞依靠型”，而這抗原可引起 IgG 反應。

有鑑於此，亟需一種安全、合成可得、成本低並對莢膜及不引起強大免疫反應或 IgG 抗體之其它非 T-細胞依靠型抗原 (T-independent antigen) 的疫苗。這疫苗須可保護對抗各種感染疾病，如炭疽菌 (anthrax)、肺炎球菌 (pneumococcus)、B 型嗜血桿菌 (influenzae Type B)、腦膜炎雙球菌 (meningococcus) 及鏈球菌 (streptococcus) 所感染。

【發明內容】

本發明有關於疫苗組成物，該組成物包括在一複合物中載體蛋白包含所要之抗原，以及該疫苗的製造與使用方法。

在本發明第一形態中，該組成物包括所要之抗原及載體蛋白，其中 (i) 不超過 50% 所要抗原與該載體蛋白交聯，且 (ii) 該抗原為該載體蛋白所包含形成複合物。

本發明第一形態最佳實施例中，該複合物具有介於 10nm 及 100 μ m 間之直徑。更佳地，本發明第一形態最佳實施例中，該複合物具有約 100nm 至 100 μ m 之直徑。又更佳地，本發明第一形態最佳實施例中，該複合物具有約 100nm 至 10 μ m 之直徑。

在本發明第一形態另一最佳實施例中，投予哺乳動物時，該複合物引起哺乳動物 T-細胞決定性免疫反應 (T-cell dependent immune response)。

在本發明第一形態又一最佳實施例中，該抗原及該載體蛋白之摩耳數比介於 1 至 10 及 10 至 1 間。該載體蛋白最佳為多聚體 (multimer)，如包括至少 5 個次單體 (subunit) 之多聚體。另一最佳實施例，該多聚體為同型多聚體 (homomultimer)。

在本發明第一形態另一最佳實施例中，該載體蛋白共價鍵結至至少一另載體蛋白。較佳地，該共價鍵結包括含離胺酸 (lysine) 支鏈初級胺基及天冬胺酸 (aspartate) 或麩胺酸 (glutamate) 支鏈羧基間之胜肽鍵。另一最佳實施例中，該共價鍵結包括化學式 $R_n-\overset{\text{CHO}}{\text{C}}-\text{CHO}$ 之化合物，其中 R_n 為 1 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈烷基、1 至 12 個原子之直鏈或支鏈雜烷基、2 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈烯、2 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈炔、5 至 10 個碳原子之芳香殘基 (aromatic residue)、3 至 10 個原子之環狀系統、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 其中 q 為 1 至 4 或鍵結兩個醛基之化學鍵。又一最佳實施例中，該共價鍵結包括戊二醛 (glutaraldehyde)、順丁烯酰胺苯甲酸-N-琥珀酸酯 (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, MBS)、碳二亞胺 (carbodiimide) 或雙-二氮化聯苯胺 (bis-biazotized benzidine)。又另一最佳實施例中，該共價鍵結包括雙功能交聯劑 (bifunctional

cross-linker)。較佳地，該雙功能交聯劑為戊二醛、辛二酸雙磺基琥珀醯亞胺酯 (bis [sulfosuccinimidyl] suberate) 或己二(亞胺)酸二甲酯 (dimethyl adipimidate)。

在本發明第一形態另一最佳實施例中，該載體蛋白非共價鍵結。最佳實施例中，該非共價鍵結包括疏水性作用 (hydrophobic interaction)、離子作用、凡得瓦耳力 (van der Waals) 或氫鍵。

在本發明第一形態又一最佳實施例中，該載體蛋白為白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 或其突變物、白喉類毒素 (diphtheria toxoid)、破傷風毒素 (tetanus toxin) 或其突變物、破傷風桿菌類毒素、綠膿桿菌外毒素 A (*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A) 或其突變物、霍亂毒素次單元 B (cholera toxin B subunit)、破傷風毒素 C 端片段 (tetanus toxin fragment C, TTFC)、細菌鞭毛蛋白 (bacterial flagellin) (如霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 鞭毛蛋白)、肺炎球菌溶血素 (pneumolysin)、腦膜炎雙球菌 (*Neisseria meningitidis*) 外膜蛋白、綠膿桿菌 Hcp1 蛋白、大腸桿菌不耐熱腸毒素 (*Escherichia coli* heat labile enterotoxin)、類志賀氏毒素 (shiga-like toxin, SLT) (如志賀氏桿菌 (*Shigella*) SltB2 蛋白)、人類 LTB 蛋白、肺炎球菌溶血素 (pneumolysin)、李斯特溶解素 O (listeriolysin O) (或相關蛋白)、整個細菌細胞 (如綠膿桿菌或鏈球菌細胞) 萃取之蛋白、炭疽桿菌 (*Bacillus*

anthracis)顯著抑制型(dominant-negative mutant)(DNI)保護性抗原(Protective antigen, PA)或大腸桿菌 β 半乳糖苷酶(beta-galactosidase)。最佳實施例中，特別地，該載體蛋白為肺炎球菌溶血素、李斯特溶解素 O、白喉毒素、白喉類毒素、破傷風毒素或破傷風類毒素。

在本發明第一形態另一最佳實施例中，該所要之抗原為多醣、多元醇或聚胺基酸。較佳地，該多醣包含至少 18 個殘基。另一最佳實施例中，該多醣為肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*, SP)多醣、土拉倫法式菌(*Francisella tularensis*)多醣、炭疽桿菌多醣、流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)多醣、傷寒桿菌(*Salmonella typhi*)多醣、沙門氏桿菌屬(*Salmonella*)多醣、志賀氏桿菌多醣或腦膜炎雙球菌多醣。最佳實施例中，特別地，該肺炎鏈球菌多醣為第 3、4、6B、7A、7B、7C、7F、9A、9L、9N、9V、12A、12B、12F、14、15A、15B、15C、15F、17、18B、18C、19F、23F、25A、25F、33F、35、37、38、44 或 46 型莢膜。另一最佳實施例中，特別地，該土拉倫法式菌多醣為 O 抗原。

在本發明第一形態又一最佳實施例中，該所要抗原為微生物莢膜聚合。較佳地，該微生物莢膜聚合物為炭疽桿菌聚之 γ -D-麩胺酸(poly-gamma-D-glutamic acid)。

在本發明第一形態另一最佳實施例中，該所要抗原為由具至少三個原子之單體所組成之有機聚合物，其中每一原子獨立地擇自於碳、氧、氫、磷、氮及硫。較佳地，該

有機聚合物衍生自微生物。另一最佳實施例中，該有機聚合物非自然界所存在。

又另一最佳實施例中，該疫苗組成物更包括一第二所要抗原。較佳地，該疫苗組成物更包括第三所要抗原。

在本發明第二形態特載製造疫苗組成物之方法。該方法包括(i)將所要抗原與載體蛋白混合以形成該抗原及該載體蛋白之混合物；以及(ii)以該載體蛋白包含該所要抗原，其中在該疫苗組成物中，該所要抗原不超過 50%與該載體蛋白交聯。

在本發明第二形態最佳實施例中，該疫苗組成物更包括藥學上可接受之賦形劑。

在本發明第二形態另一最佳實施例中，該包含(entrapping)包括使該抗原及該載體蛋白從混合物沈澱。較佳地，該沈澱包括該混合物 pH 改變、添加三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)或硫酸銨(ammonium sulfate)至該混合物、藉提升或降低該混合物無機鹽濃度改變該混合物離子強度、加熱該混合物引起該載體蛋白和/或該抗原共軛或以足夠通量之游離輻射照射處理該混合物引起交聯。

在本發明第二形態最佳實施例中，在該疫苗組成物中，該抗原及該載體蛋白之摩耳數比介於 1 至 10 及 9 至 1 間。

在本發明第二形態又一最佳實施例中，該載體蛋白為多聚體。較佳地，該多聚體包括至少 5 個次單體。另一最

佳實施例，該多聚體為同型多聚體。

在本發明第二形態又另一最佳實施例中，該載體蛋白非共價鍵結。較佳地，該非共價鍵結包括疏水性作用、離子作用、凡得瓦耳力或氫鍵。

在本發明第二形態又一最佳實施例中，該載體蛋白為白喉毒素或其突變物、白喉類毒素、破傷風毒素或其突變物、破傷風桿菌類毒素、綠膿桿菌外毒素 A 或其突變物、霍亂毒素次單元 B、破傷風毒素 C 端片段、細菌鞭毛蛋白（如霍亂弧菌鞭毛蛋白）、肺炎球菌溶血素、李斯特溶解素 O、腦膜炎雙球菌外膜蛋白、綠膿桿菌 Hcp1 蛋白、大腸桿菌不耐熱腸毒素、類志賀氏毒素（志賀氏桿菌 SltB2 蛋白）、人類 LTB 蛋白、整個細菌細胞（如綠膿桿菌或鏈球菌細胞）萃取之蛋白、炭疽桿菌顯著抑制型（DNI）保護性抗原或大腸桿菌 β 半乳糖苷酶。最佳實施例中，特別地，該載體蛋白為肺炎球菌溶血素、李斯特溶解素 O、白喉毒素、白喉類毒素、破傷風毒素或破傷風類毒素。

在本發明第二形態另一最佳實施例中，該所要抗原為多醣、多元醇或聚胺基酸。較佳地，該多醣包含至少 18 個殘基。另一最佳實施例中，該多醣為肺炎鏈球菌多醣、土拉倫法式菌多醣、炭疽桿菌多醣、流感嗜血桿菌多醣、傷寒桿菌多醣、沙門氏桿菌屬多醣、志賀氏桿菌多醣或腦膜炎雙球菌多醣。最佳實施例中，特別地，該肺炎鏈球菌多醣為第 3、4、6B、7A、7B、7C、7F、9A、9L、9N、9V、12A、12B、12F、14、15A、15B、15C、15F、17、18B、18C、19F、

23F、25A、25F、33F、35、37、38、44 或 46 型荚膜。另一最佳實施例中，特別地，該土拉倫法式菌多醣為 O 抗原。

在本發明第二形態又另一最佳實施例中，該所要抗原為微生物荚膜聚合物。較佳地，該微生物荚膜聚合物為炭疽桿菌聚之 γ -D-麩胺酸。

在本發明第二形態又另一最佳實施例中，該所要抗原為由具至少三個原子之單體所組成之有機聚合物，其中每一原子獨立地擇自於碳、氧、氫、磷、氮及硫。較佳地，該有機聚合物衍生自微生物。另一最佳實施例中，該有機聚合物非自然界所存在。

在本發明第二形態又另一最佳實施例中，步驟(i)混合包括第二所要抗原或甚至第三所要抗原。

在本發明第三形態特載製造疫苗組成物之另一方法。該方法包括(i)將所要抗原與載體蛋白混合；以及(ii)添加交聯該載體蛋白之連接劑(linker)，其中在該疫苗組成物中，該所要抗原不超過 50%與該該載體蛋白交聯。

在本發明第三形態最佳實施例中，該疫苗組成物更包括藥學上可接受之賦形劑。本發明第三形態另一最佳實施例中，在該疫苗組成物中，該抗原及該載體蛋白摩耳數比介於 1 至 10 及 10 至 1 間。本發明第三形態又一最佳實施例中，該載體蛋白為多聚體。較佳地，該多聚體包括至少 5 個次單體。另一最佳實施例，該多聚體為同型多聚體。

在本發明第三形態又一最佳實施例中，該方法包括還原載體蛋白中的希夫鹼。在本發明第三形態再又一最佳實

施例中，該載體蛋白共價鍵結至至少一另載體蛋白。較佳地，該共價鍵結包括含離胺酸支鏈初級胺基及天冬胺酸或麩胺酸支鏈羧基間之胜肽鍵。另一最佳實施例中，包括雙功能交聯劑。較佳地，該雙功能交聯劑為戊二醛、辛二酸雙磺基琥珀醯亞胺酯或己二(亞胺)酸二甲酯。

本發明第三形態又一最佳實施例中，該連接劑為化學式 $\begin{matrix} \text{CHO} \\ | \\ \text{R}_n-\text{CHO} \end{matrix}$ 之化合物，其中 R_n 為 1 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈烷基、1 至 12 個原子之直鏈或支鏈雜烷基、2 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈烯、2 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈炔、5 至 10 個碳原子之芳香殘基、3 至 10 個原子之環狀系統、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 其中 q 為 1 至 4 或鍵結兩個醛基之化學鍵。

在本發明第三形態另一最佳實施例中，該連接劑為戊二醛、順丁烯酰胺苯甲酸-N-琥珀酸酯、碳二亞胺或雙-二氮化聯苯胺。

在本發明第三形態又一最佳實施例中，該載體蛋白為白喉毒素或其突變物、白喉類毒素、破傷風毒素或其突變物、破傷風桿菌類毒素、綠膿桿菌外毒素 A 或其突變物、霍亂毒素次單元 B、破傷風毒素 C 端片段、細菌鞭毛蛋白(如霍亂弧菌鞭毛蛋白)、肺炎球菌溶血素、李斯特溶解素 O、腦膜炎雙球菌外膜蛋白、綠膿桿菌 Hcp1 蛋白、大腸桿菌不耐熱腸毒素、類志賀氏毒素(志賀氏桿菌 SltB2 蛋白)、人類 LTB 蛋白、整個細菌細胞(如綠膿桿菌或鏈球菌細胞)萃取之蛋白、炭疽桿菌顯著抑制型(DNI)保護性抗原或大腸桿

菌 β 半乳糖苷酶。

本發明第三形態又一最佳實施例中，該所要抗原為多醣、多元醇或聚胺基酸。較佳地，該多醣包含至少 18 個殘基。另一最佳實施例中，該多醣為肺炎鏈球菌多醣、土拉倫法式菌多醣、炭疽桿菌多醣、流感嗜血桿菌多醣、傷寒桿菌多醣、沙門氏桿菌屬多醣、志賀氏桿菌多醣或腦膜炎雙球菌多醣。最佳實施例中，特別地，該肺炎鏈球菌多醣為第 3、4、6B、7A、7B、7C、7F、9A、9L、9N、9V、12A、12B、12F、14、15A、15B、15C、15F、17、18B、18C、19F、23F、25A、25F、33F、35、37、38、44 或 46 型莢膜。另一最佳實施例中，特別地，該土拉倫法式菌多醣為 O 抗原。

在本發明第三形態另一最佳實施例中，該所要抗原為微生物莢膜聚合。較佳地，該微生物莢膜聚合物為炭疽桿菌聚之 γ -D-麩胺酸。

在本發明第二形態又另一最佳實施例中，該所要抗原為由具至少三個原子之單體所組成之有機聚合物，其中每一原子獨立地擇自於碳、氧、氫、磷、氮及硫。較佳地，該有機聚合物衍生自微生物。另一最佳實施例中，該有機聚合物非自然界所存在。

在本發明第二形態又另一最佳實施例中，步驟(i)混合包括第二所要抗原或甚至第三所要抗原。

在本發明第四形態特載受試者接種抗致病因子疫苗之方法。該方法包括投予受試者一足夠量之本發明第一形態疫苗組成物，以誘導受試者體內抗體產生。本發明第四形

態最佳實施例中，該方法包括第二投藥步驟，再投予受試者足夠量本發明第一形態之疫苗組成物，以補強(boost)受試者體內抗體產生。較佳地，本發明第四形態中，該抗體產生為 T-細胞決定性。本發明第四形態另一最佳實施例中，該抗體產生足以預防或降低該受試者因致病因子感染。較佳地，該致病因子為肺炎球菌、腦膜炎雙球菌、B 型流感嗜血桿菌、綠膿桿菌、土拉倫法式菌、志賀氏桿菌屬、沙門氏桿菌屬、不動桿菌屬 (*Acinetobacter species*)、伯克氏菌屬 (*Burkholderia species*) 或大腸桿菌。

在本發明第四形態另一最佳實施例中，該方法包括第二投藥步驟，再投予受試者足夠量包含所要抗原第二疫苗組成物，以補強受試者體內抗體產生。較佳地，抗體產生足以預防或降低該受試者因第二致病因子感染。

在本發明第四形態最佳實施例中，該抗體為 IgG 抗體。本發明第四形態又一最佳實施例中，該受試者為人類。
定義

本處結合疫苗所用「投藥、給藥(administering)」意謂提供受試者一足以誘導受試者免疫反應之劑量的疫苗，其中該免疫反應導致抗體產生，該抗體專一鍵結該疫苗中抗原。較佳地，投藥包括肌肉(intramuscular injection)注射、皮內注射(intradermal injection)或經皮注射(transcutaneous injection)，較佳地，包括適當免疫佐劑(adjuvant)給藥。投藥可包括疫苗單一給藥或多劑疫苗

給藥。較佳地，第二給藥設計為補強受試者體內抗體產生，以避免因致病因子感染。疫苗劑量之頻率及數量取決於該疫苗之專一活性且可經由例行試驗判斷。

「交聯(cross-link)」意謂兩分子、大分子或分子組合，如載體蛋白間共價鍵形成。該鍵形成為直接、使用「零長度(zero-length)」連接劑或以第三分子，化學連接劑，其具有兩個官能基，每一個可與兩個個別分子之一形成共價鍵或在同一分子中兩個個別官能基間形成共價鍵(即這些將形成亦可包圍於該聚合物之圈環)。連接劑例子包括可交聯兩載體蛋白之雙功能交聯劑。交聯亦可發生於抗原與載體蛋白間。

本處所用「抗原(antigen)」意謂抗體或抗體片段專一結合之任何分子或分子組合。

本處所用「雙功能交聯劑(bifunctional linker)」意謂具兩官能基之化合物，每一官能基個別可於兩個別分子、原子或分子組合形成共價鍵。雙功能交聯劑例子如 G. T. Hermanson(Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996)及 Dick 與 Beurret(Conjugate Vaccines. Contribu. Microbiol. Immunol., Karger, Basal 10:48-114, 1989)所述。較佳地，雙功能交聯劑為戊二醛、辛二酸雙磺基琥珀醯亞胺酯或己二(亞胺)酸二甲酯。

本處所用「連接劑(linker)」意謂共價結合兩或多分子之化合物或化學鍵。較佳地，連接劑為戊二醛或化學式

$$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ | \\ \text{R}_n\text{-CHO} \end{array}$$

之化合物，其中 R_n 為 1 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈

烷基、1 至 12 個原子之直鏈或支鏈雜烷基、2 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈烯、2 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈炔、5 至 10 個碳原子之芳香殘基(aromatic residue)、3 至 10 個原子之環狀系統、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 其中 q 為 1 至 4 或鍵結兩個醛基之化學鍵。連接可直接無使用連接分子。舉例來說，蛋白質羧基可用碳二亞胺化學或用催化這種交聯之轉麩胺酸酶(transglutaminase)酵素性直接連接至它的胺基。

「補強抗體產生(boost the production of antibodies)」意謂第二次暴露抗原發生之記憶 B-細胞活化，稱之增幅反應(booster response)，且表明長期存在次發性(second)記憶免疫反應抗原，導致抗體產生長期存在。

「載體蛋白(carrier protein)」意謂用於疫苗之蛋白質，該疫苗對它自己和/或具載體蛋白之抗原複合物引起免疫反應。較佳地，該抗原以載體蛋白包合成複合物，與非載體蛋白共價鍵結。但是，該抗原及該載體蛋白亦可彼此共價鍵結。較佳地，該載體蛋白包含 T-辨識之抗原決定位(epitope)。載體蛋白定義亦包括分支肽之多抗原肽(MAP)。較佳地，MAP 包括離胺酸。最好載體蛋白例子包括毒素及類毒素(化學或基因)，可為突變的。較佳地，載體蛋白為白喉毒素(diphtheria toxin, DT)或其突變物、白喉類毒素(diphtheria toxoid)、破傷風毒素(tetanus toxin)或其突變物、破傷風桿菌類毒素、綠膿桿菌外毒素

A(*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A)或其突變物、霍亂毒素次單元 B(cholera toxin B subunit)、破傷風毒素 C 端片段(tetanus toxin fragment C, TTFC)、細菌鞭毛蛋白(bacterial flagellin)、肺炎球菌溶血素(pneumolysin, Pn)、李斯特溶解素 O(listeriolysin O)(或相關分子)、腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*)外膜蛋白、綠膿桿菌 Hcp1 蛋白、大腸桿菌不耐熱腸毒素(*Escherichia coli* heat labile enterotoxin)、類志賀氏毒素(shiga-like toxin, SLT)、人類 LTB 蛋白、整個細菌細胞萃取之蛋白、炭疽桿菌(*Bacillus anthracis*)顯著抑制型(dominant-negative mutant)(DNI)保護性抗原(protective antigen, PA)或大腸桿菌 β 半乳糖苷酶(beta-galactosidase)或任何可為連接劑所交聯之蛋白。

「DNI」意謂顯著抑制型突變(dominant negative mutant, DNI)蛋白，為炭疽桿菌保護性抗原(PA)突變型，如 Benson et al. (Biochemistry 37:3941-3948, 1998)所述。

參照抗原，本處所用「包含(entrapped)」意謂在生理條件下，將抗原以載體蛋白保持在複合物。較佳地，該抗原以載體蛋白於缺少該抗體及載體蛋白間顯著共價鍵結包含於複合物。本處所用缺少顯著共價鍵結意謂不超過 50% 抗原共價鍵結至載體蛋白。較佳地，不超過 40%、30%、10% 或 5% 抗原共價鍵結至載體蛋白。

「感染(infection)」意謂受試者遭微生物，如細菌、

真菌、寄生蟲或病毒入侵。該感染可包括，如正常存在受試者身體中或上之微生物過量增殖或非正常存在受試者身體中或上之微生物增殖。存在受試者身體中或上之微生物族群過量或微生物族群存在危害細胞或引起該受試者組織病症，則受試者罹患微生物感染。

「致病因子(infectious agent)」意謂引起感染之微生物。

「致免疫性(immunogenic)」意謂誘導受試者免疫反應之化合物。較佳地，該免疫反應為牽涉 IgG 抗體產生之 T-細胞決定性免疫反應。

「微生物(microbe)」意謂可引起受試者感染之細菌、真菌、寄生蟲或病毒。

「微生物莢膜聚合物(microbial capsular polymer)」意謂微生物莢膜層中或上之聚合物。較佳地，微生物莢膜聚合物為有機聚合物，如多醣、磷酸化多醣、具 N-乙醯取代之胺基糖的多醣、含磺醯化糖(sulfanylated sugar)、另一硫酸修飾糖或磷酸修飾糖、多元醇、聚胺基酸、磷壁酸(teichoic acid)、脂多醣之 O 支鏈的多醣。

「單體(monomer)」意謂與同樣單體可形成二或三鍵結之分子結構，為聚合體之部分時，通常產生重複單體次結構之鏈或一連串分支、連接鏈。

「有機聚合物(organic polymer)」意謂由共價鍵結之單體所組成之聚合物，其中每一單體具三或多個下列原子：碳、氧、氫、磷、氮及硫。較佳地，有機聚合物為多

醣、磷酸化多醣、具 N-乙醯取代之胺基糖的多醣、含磺醯化糖 (sulfanylated sugar)、另一硫酸修飾糖或磷酸修飾糖、糖、多元醇、聚胺基酸、磷壁酸 (teichoic acid)、脂多醣之 O 支鏈的多醣。

「多元醇 (polyalcohol)」意謂碳水化合物氫化形式，其中羰基已還原一級或二級羥基。多元醇例子為聚亞烷基氧化物 (polyalkylene oxide, PAO)，如聚烯烴基二醇 (polyalkylene glycol, PAG)，包括聚甲二醇、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、甲氧基聚乙二醇 (methoxypolyethylene glycol, mPEG) 及聚丙二醇；聚乙烯醇 (poly-vinyl alcohol, PVA)；聚乙二烯馬來酸酐共聚物 (polyethylene-co-maleic acid anhydride)；聚苯乙烯馬來酸酐共聚物 (polystyrene-co-malic acid anhydride)；葡聚醣 (dextran)，包括羧甲基葡聚醣；纖維素，包括甲基纖維素、羧甲基纖維素、乙基纖維素、羥乙基纖維素、羧乙基纖維素及羥丙基纖維素；水解甲殼素；澱粉，如羥乙基澱粉及羥丙基澱粉；肝醣；洋菜 (agarose) 及其衍生物；瓜爾膠 (guar gum)；普魯蘭多醣 (pullulan)；菊糖 (inulin)；黃原膠 (xanthan gum)；鹿角菜膠 (carrageenan)；果膠 (pectin)；水解藻酸 (alginic acid hydrolysate)；山梨糖醇 (sorbitol)；葡萄糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖、古羅糖 (gulose)、木糖、蘇丁糖 (threose)、山梨糖、果糖、甘油、麥芽糖、纖維雙糖、蔗糖、直鏈澱粉、支鏈澱粉之酒精或單丙二醇 (mono

propylene glycol, MPG)。

「聚胺基酸(poly amino acid)」意謂至少兩個胺基酸以肽鍵(peptide bond)鍵結。較佳地，聚胺基酸為含重複胺基酸序列或相同胺基酸之鏈(即均聚物(homopolymer))的胜肽。

「還原希夫鹼(reducing a Schiff base)」意謂使甲亞胺或化學式 $R_1R_2C=N-R_3$ (其中 R_1 、 R_2 及 R_3 為化學次結構，一般含碳原子)之化合物暴露於還原劑，該還原劑使該希夫鹼雙鍵以氫原子飽和。還原方法為熟悉該項技術者所知悉。

參照抗體或其片段，本處所用「專一鍵結(specifically binds)」意謂對特定蛋白質，如抗原，之抗體或抗體片段增加之親和力，相對於其它任何蛋白質等量之親和力。較佳地，抗體或抗體片段具它的抗原親和力為至少 2-倍、5-倍、10-倍、30-倍或 100-倍超過其它任何蛋白質等量之親和力，包括相關抗原，該親和力以標準方法判斷，如酵素聯結免疫分析(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。

「受試者(subject)」意謂可受微生物感染之動物。較佳地，受試者為哺乳動物，如人類、猴子、狗、貓、大鼠、小鼠、牛、綿羊、山羊或馬。最佳實施例中，該受試者為人類，如人類小孩。較佳地，該受試者為人類嬰兒、學步的小孩或青春期前孩童。

「非 T-細胞依靠型抗原(T-cell independent

antigen)」意謂無需 T 淋巴細胞參與，就能產生抗體之抗原。較佳地，非 T-細胞依靠型抗原無需 T 淋巴細胞參與，直接刺激 B 淋巴細胞。較佳地，非 T-細胞依靠型抗原例子包括莢膜抗原聚 γ -D-麩胺酸 (poly-gamma-D-glutamic acid, PGA)、藻酸 (alginic acid 或 algenate)、葡聚糖、多醣 (polysaccharides, PS)、聚胺基酸、多元醇及核酸。優勢

相較存在疫苗技術，本發明疫苗製造簡單、較少化學問題、較少免疫問題、不貴、更適合不同所要抗原及載體蛋白勝於共軛技術 (conjugate technology) 及更彈性創造多價疫苗 (保護性抗多種抗原之疫苗)。

本發明疫苗於載體蛋白及預期引起免疫反應之抗體間不需共價鍵結，因此相較於共軛疫苗技術，簡化製造方法，並降低製備成本。多醣 (PS)-蛋白共軛疫苗在開發中國家製造及銷售費用過分昂貴，而傳統共軛疫苗難以便宜製造，因為每一疫苗須高度專門化學及 PS 與載體蛋白兩者生產及純化成本。

本發明疫苗亦滿足可安全誘導抗先前頑強的抗原之免疫力的疫苗之需求。這疫苗可為單價 (具誘導一免疫反應之單一抗原) 或多價 (具誘導多種免疫反應之多抗原)。包含類鐸受體 (Toll-like receptor, TLR) 配體 (ligand) 之疫苗已顯示對其它頑強的抗原引起免疫反應，但有不安全之疑慮，因 TLR 配體常易引起發炎、甚至少劑量就有毒性、不良反應，且相較於本發明疫苗可能引起不良症狀。

本發明其它特徵及優點由下列詳細說明、申請專利範圍及圖示即為明顯清楚。

【實施方式】

本發明特載疫苗組成物及該組成物的製造與使用方法，以提供抗非 T-細胞依靠型抗原或正常引起弱免疫反應之抗原，如多醣(PS)、多元醇、聚胺基酸及其它有機聚合物。本發明疫苗具典型 PS-蛋白共軛疫苗之有效能免疫特性，但較佳地，不同於共軛疫苗，因為無顯著共價原子鍵結被需要去鍵結所要的抗原，如 PS 或莢膜有機聚合物，至該載體蛋白。更確切地說，所要的抗原，如 PS 或莢膜有機聚合物，為該載體蛋白所包含。舉例來說，蛋白基質可於可於可溶抗原，如 PS 或莢膜有機聚合物，以共價交聯載體蛋白分子至它們而形成：這些疫苗視作為蛋白基質疫苗。彼此高度交聯之載體蛋白可形成可捕捉抗原之基質且促進該抗原之吸收及刺激免疫細胞之抗體產生。該載體蛋白基質可為包圍該抗原之網狀物或連續串珠形式，其中連續串珠中，比擬該抗原為串線，而該蛋白或交聯蛋白複合物為珠。該抗原以該載體蛋白包含，假如該載體蛋白包圍該抗原，形成珠圍繞於該抗原或三維網狀物將該抗體纏結於中。此外，該載體及該抗原可為交聯，如以該抗原鏈及該載體蛋白鏈間交聯。最佳實施例中，該抗原及該載體蛋白為非共價鍵結。這非共價鍵結可包括疏水性作用、離子作用、凡得瓦耳作用或氫鍵。非共價鍵結可包括抗原與蛋白

複合物之非共價結合之物理幾何構型(參閱上述比擬之「串珠(bead on a string)」)。

該載體蛋白不需自我交聯以包合抗原。抗原亦可以下列包合，如將該載體蛋白及該抗原於液態溶液中混合，使該載體蛋白沉澱，俾使該抗原與該蛋白共沉澱。抗原亦可以載體蛋白包合，其藉由從抗原及載體蛋白混合物中，沈澱化合物(如六偏磷酸鈉(sodium hexametaphosphate)、聚磷腈(polyphosphazene)或對蛋白質藉疏水性作用或離子作用具親合力之其它聚合物)達成。沈澱蛋白質方法為該技術領域之標準，包括如(1)改變該混合物之 pH；(2)藉增加或減少該混合物無機鹽濃度，改變該溶液之離子強度；或(3)添加三氯醋酸(trichloroacetic acid, TCA)或硫酸銨(ammonium sulfate)至該混合物；(4)加熱該混合物以引起蛋白質結合(即形成沉澱物或膠體)；(5)在某種程度上化學修飾該混合物中該蛋白質，使它成為不可溶；及(6)以足量游離輻射(紫外線輻射、伽瑪射線或貝它射線)照射該蛋白質，以便引起該蛋白質交聯和/或沉澱。

使用病原體莢膜蛋白時，這疫苗稱之為蛋白莢膜基質疫苗(protein capsular matrix vaccine, PCMV)。實施例中所述，生產 PCMV，包括以典型非 T-細胞依靠型莢膜抗原、聚 γ -D-麩胺酸(PGA)、藻酸及葡聚糖以及示範的載體蛋白，DNI 為基礎的那些。該 PGA PCMV 簡易量產製造，且發現誘導 PGA-蛋白共軛疫苗代表性免疫反應。在任何所要抗原存在下，本發明疫苗可使用任何可能之連接劑與任何

可能之載體蛋白交聯而製備。案例及較佳連接劑、載體蛋白及所要抗原於此處討論。

多醣(PS)為醣(糖)之聚合物。衍生自莢膜之 PS 為初級抗原成分，參與抗莢膜細菌病原體之保護性免疫力(protective immunity)，該病原體如腦膜炎雙球菌、肺炎鏈球菌、傷寒桿菌及 B 型流感嗜血桿菌。青少年及成人接種以微生物 PS 為基礎的疫苗，已成功地減少疾病負擔，但對於嬰兒及幼童(即年齡低於 24 個月之孩童)較無有力提供保護性免疫力。幼童尚未發展出成熟的適應性免疫族群，在這年輕疫苗接受者，非 T-細胞依靠型抗原，如莢膜 PS，產生免疫性不足且不引起長期保護性免疫反應(即免疫記憶反應)。

非 T-細胞依靠型抗原，如 PS，可藉由 PS 對蛋白質化學耦合轉換成 T-細胞依靠型抗原，這過程稱之「共軛(conjugation)」，牽涉 PS 結構中原子與載體蛋白中胺基酸支鏈原子間共價鍵形成。這樣「共軛疫苗(conjugate vaccines)」更有效促使誘導 B-細胞成熟及同種型轉變(isotype switching)，產生更多具正確抗-PS 保護性變化之抗體。保護性抗體對它們的 PS 抗原具高親和力，通常它們為免疫球蛋白 G(IgG)亞群，具補體附著且調理作用細胞活性之長壽抗體。

第 1 圖顯示非限定途徑，PS 及該載體蛋白破傷風桿菌類毒間產生共軛之共軛疫苗誘導抗-PS IgG 免疫反應。在這模式中，只有 B-細胞結合該 PS-蛋白共軛物，而該 B-細

胞顯露出辨識 PS 之抗體受體。因此，該載體蛋白結合至顯露出正確 PS 結合專一性之 B-細胞表面。該蛋白-PS 複合物被這些 B-細胞吸收進胞內液泡隔間，該處該載體蛋白遭蛋白質水解。衍生自該載體蛋白之胜肽被轉送並進入該 MHC II 型受體(MHC-II)呈現結合槽(presentation groove)。這 MHC-II-載體胜肽複合物展露在該 B-細胞表面。一旦 T-細胞受體(T-cell receptor, TCR)辨識 MHC-II-胜肽複合物，T-細胞變為活化並分泌細胞激素(cytokine)，以協助誘導 B-細胞分化。B-細胞拓殖並分化成「漿細胞(plasma cells)」，該漿細胞現分泌抗體。最初免疫球蛋白 M(IgM)由漿細胞產生，但最終該 T-細胞協助使該漿細胞成型轉換(class switch)並產生其它同種型抗體，如 IgG。這過程持續使漿細胞變種導致對該 PS-蛋白共軛物甚至還更高親合力之抗體產生。當抗原清除，只有較高親和力之漿細胞被繼續存在循環之殘留 PS-蛋白共軛物活化。漿細胞之 T-細胞依靠型成熟過程持續，導致產生高親合力 IgG 型抗體之漿細胞族群擴增。該擴增可輕易藉由測量免疫受試者，如人類，血清中抗-PS IgG 抗體之含量所監控。

最後，該成熟及轉換過程導致壽命長且對該 PS 專一性的記憶 B-細胞(memory B-cell)產生。記憶 B-細胞具有獨特特性，暴露於 PS 它們可立即活化。活化使記憶 B-細胞增殖並快速產生抗-PS IgG。發生於第二次暴露於 PS 期間之記憶 B-細胞活化稱之「增幅反應(booster response)」，表示壽命長「次發性(second)」記憶免疫反應。初級免疫

(primary immunization)可刺激 IgM 抗體及一些 IgG 抗體產生。一旦次發性免疫發生，即該「增幅反應」啟動，經第一免疫設定之記憶細胞被刺激產生大量 IgG，記憶免疫反應。

非 T-細胞依靠型抗原通常不刺激持久的免疫力，即產生 IgG 抗體，但可刺激較低效能及更短暫 IgM 抗體之產生。如此，PS 抗原單獨通常不產生 IgG 增幅反應。然而，假如以 PS-蛋白共軛物引起初級免疫，PS 的確產生增幅反應，因為被該共軛物誘導之記憶細胞已被設定生產 IgG。甚至，在接種動物或人類之增幅反應被認為為擬似由於暴露顯露出 PS 微生物引起保護性反應，這長期記憶對於疫苗執行保護接種共軛疫苗後多年之免疫受試者是重要的。因此，PS-蛋白共軛物對於(1)誘導高含量元 PS 抗原之 IgG 的能力；以及(2)誘導對抗 PS 抗原之記憶免疫反應的能力是有價值的。PS 抗原通常不顯露這些特質，因此為較差的抗原。合成共軛疫苗困難度及生產成本使得對於很多細菌性疾病之共軛疫苗發展緩慢，其中對於 PS 之免疫反應可為保護性的。

其它非 T-細胞依靠型抗原包括胺基酸同聚物，如聚 γ -D-麩胺酸 (PGA)，及多元醇。大部份生物聚合物為非 T-細胞依靠型抗原。聚合物可與 B-細胞上免疫球蛋白 (Ig) 受體交聯，該受體因它們化學結構重複性質 (及抗原決定位) 而辨識。因此，聚合物可活化 B-細胞，與多醣相同方式生產抗-聚合物 IgM。舉例來說，胺基酸均聚物，炭疽桿菌聚

γ -D-麩胺酸 (PGA)，為致免疫性不佳，且為非 T-細胞依靠型抗原之莢膜聚合物。由與蛋白載體結合之 PGA 組成之疫苗為致免疫性高，可誘導抗-PGA IgG 及對 PGA 免疫記憶。因此，在致免疫性方面而論，大部份聚合物反應像，因為在 MHC-II 下，它們不能被處理且表現，因此不能獲得 T-細胞協助。例外為發現在一些天然存在之聚合物，該聚合物與其它類型名為類鐸受體 (TLR) 之受體交互作用。一旦活化，TLR 可誘導宿主細胞產生細胞激素，且在適應性免疫反應中產生改變。一些 PS 為共價鍵結至 TLR 配體或含有這些配體。例如，脂多醣 (lipopolysaccharides, LPS) 為致免疫性高且誘導 IgG 及記憶反應之 PS，；LPS 之脂質 A 根為 TLR 配體且負責免疫特性。

另一實施例中，少數肺炎球菌 PS 已發現顯示一些共軛疫苗免疫特性，它們誘導同種型轉變成 IgG，即使它們未鍵合至蛋白載體。最近，市售多醣疫苗，肺炎鏈球菌 23 價多醣體疫苗 (Pneumovax-23)，及來自各種肺炎鏈球菌菌株之個別 PS 發現含有 TLR 配體 (Sen et al., *J. Immunol.* 175:3084-3091, 2005)。這發現可解釋為何這些 PS 製劑可在缺少蛋白共軛下誘導同種型轉變成 IgG。這些肺炎球菌 PS 誘導巨噬細胞分泌 IL-6 及 TNF- α 。然而，以酚萃取進一步純化 PS 清除巨噬細胞分泌之細胞激素。在免疫研究中，酚萃取之 PS 致免疫性不佳，且不再誘導抗-PS IgG。因此，酚萃取移除不純分子，該不純分子負責這 PS 製劑的這些不尋常致免疫特性。該不純分子似乎為 TLR 配體，而

給予活化巨噬細胞中 TLR-依賴型細胞激素反應之能力。以酚萃取進一步純化 PS 移除該不純之 TLR 配體，使 PS 成為完全非 T-細胞依靠型。

該上述案例說明無蛋白對碳水化合物之共價鍵結下，PS 抗原可作用如共軛 PS-蛋白抗原。不幸地，TLR 配體通常促使發炎(proinflammatory)。舉例來說，LPS 甚至少量就有毒性。因此，當 TLR 配體與 PS 混合可加大對於該 PS 免疫反應，這方法亦可能產生起反應且可能引起疫苗接受者副症狀之疫苗。共軛疫苗技術提供生產具所要致免疫性及安全範圍之 PS 疫苗替代方法。

PS-蛋白共軛疫苗發展已大大降低細菌病原侵入引起孩童疾病負擔。少數這樣疫苗，包括抗 B 型流感嗜血桿菌及腦膜炎雙球菌與鏈球菌特定菌株之疫苗，在已開發國家為商業可獲得。這些 PS-蛋白共軛疫苗在開發中國家生產及銷售是過份地昂貴。舉例來說，市售 7-價肺炎球菌共軛疫苗每劑約 58 美金(2006 年)，需注射四劑。這花費使這疫苗在開發中國家拿不到，該疾病造成負擔。

因為參與化學及製造成本及 PS 與載體蛋白純化造成傳統共軛疫苗便宜製造困難。共軛化學執行前，為獲得合理偶合效率(coupling efficiency)，通常兩者須十分純。一般來說，偶合化學必需對各種 PS 有好的結果，就是對於該 PS 與經篩選之載體蛋白之化學是獨特的。這偶合化學導入 PS 上官能基，然後可連接至載體蛋白，一般來說是透過離胺酸殘基之 ϵ 胺基支鏈。PS 導入這樣偶合基團之化學

修飾可破壞該 PS 上抗原決定位，引出新的抗原決定位（如，使連接劑或修飾的醣基團結合），這些重大事只可藉由小心免疫分析評估。再者，對於傳統 PS-蛋白共軛疫苗，PS 大小、結合至每一蛋白載體分子之 PS 分子數目、篩選之載體本質及連接化學之種類都可影響該共軛疫苗致免疫性。例如，每個肺炎球菌疾病 90+ 已知血清型皆有不同的 PS 結構 (Bentley et al., PLOS Genetics 2(3):e31262-269, 2006)，一個單一共軛方法不適用所有血清型。具可再現的免疫特性之可再現地合成共軛疫苗需要注意管控該 PS 大小、結合至每一蛋白載體分子之 PS 分子數目、篩選之載體本質及連接化學之種類，而這依次劇幅增加共軛疫苗製造成本。

抗生素抗藥性之浮現突顯發展安全及有效疫苗之緊迫。製造大量疫苗，特別是在開發中國家，需要疫苗製造亦要符合成本效益。對抗來自一或多種菌種不同血清型之多種多醣抗原的聯合共軛疫苗導入孩童免疫策略 (immunization regimen) 將簡化在高風險族群中疫苗使用。然而，最近共軛疫苗技術並不符合成本效益，因此，聯合共軛疫苗實際上在開發中國家使用是不可能。甚至在有強大已建立市場之已開發國家，惠氏 (Wyeth) 7-價共軛肺炎球菌疫苗最近供應短缺顯示它是如何困難在於生產及儲備需要複合物共軛疫苗合成技術之疫苗。

最佳實施例中，本發明疫苗為多價莢膜基質疫苗 (PCMV)，一或多種細菌莢膜成份包合在多價載體蛋白基質

內。PCMV 可輕易製造，因為需作為起始物所要抗原，如英膜，只需中度純淨。舉例來說，味丹(Vedan)聚 γ -D-麩胺酸(PGA)並非不攙雜的(它帶有對 DNI 活性之蛋白酶)，如本發明所述，它正好地運作如期望之非 T-細胞依賴型抗原(實施例 1)。將 PGA 併入 PCMV 已成功在不同蛋白對 PGA 比例超過 7 倍範圍之三種 PCMV 製劑進行。

因為製造本發明疫苗之方法不需任何所要抗原，如英膜多醣，之化學知識，所以該方法不需再發展所要抗原與載體蛋白化學相容之交聯化學。一些抗原可能仍然與該連接劑交互作用，這應該不會降低該疫苗之功效，因為該所要抗原及該載體蛋白非刻意之交聯期望具有致免疫性特質。本發明疫苗中，所要抗原對該載體蛋白之交聯對於該疫苗為有效是不需要。這跟傳統共軛疫苗是很明顯之對比，而這阻礙它們製造及發展。本發明疫苗較佳地至少，如 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98% 或甚至 100% 之交聯的載體蛋白，以及不超過如 1%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90% 交聯至該載體蛋白之所要抗原。較佳地，不超過 10% 抗原交聯至該載體蛋白及至少 50% 載體蛋白經交聯。

製造本發明所述疫苗之方法並不引起所要抗原，如英膜聚合物，之過度修飾。具可能之修飾，如對於 PS 英膜攜帶該聚合物鏈末端之這樣基團之還原糖還的抗原通常維持在相同之狀態。這樣小修飾是不可能影響大部分膜英 PS 之致免疫力，因為末端糖較聚合物中內部殘基不豐富

100-1000X。相對上，對於傳統共軛疫苗它通常需要引進連接劑基團至該抗原，如莢膜聚合物，作為該載體蛋白共價鍵結之點。需使用連接劑，因為很多抗原，如莢膜聚合物，不具有反應基團，如羧基或胺基基團作為它們結構之部分。舉例來說，導入連接劑化學至 PS 可引起莢膜抗原決定位之破壞，並產生新的抗原決定位，該新的抗原決定為可能在疫苗產品中不是最好，因為與宿主本身抗原決定位未知免疫交叉反應產生。

製造本發明所述疫苗之方法較共軛疫苗技術不複雜，因為它的化學僅依靠該載體蛋白(如，DNI、霍亂毒素次單元 B、白喉毒素、破傷風毒素 C 端片段或大腸桿菌 β 半乳糖苷酶)交聯化學。舉例來說，混合 DNI 時，該莢膜聚合物影響交聯之比例，但它並不影響交聯之形態或程度，該交聯多受控於所用之蛋白、它的濃度及添加交聯劑(如，戊二醛)之濃度。這些參數可容易地調整，因此減少製造該疫苗之時間及努力，且省成本。

製造本發明所述 PCMV 疫苗之方法可用任何抗原，如任何莢膜聚合物或具少數任何胺基基團之任何聚合物及任何可交聯之載體蛋白，如不具有重要抗原決定位之載體蛋白，該抗原決定位可為氫硼化物還原破壞。用於本發明之方法的載體蛋白較佳地有至少 2 個離胺酸殘基或其他未被阻隔且可經化學修飾交聯之殘基。破傷風桿菌類毒素為可能之載體蛋白。這毒素以甲醛試劑與該蛋白胺基反應去除毒性。其它最好載體蛋白包括霍亂毒素次單元 B(購自 SBL

Vaccin AB)、白喉毒素、破傷風毒素 C 端片段(購自 Sigma Aldrich)、DNI 或大腸桿菌 β 半乳糖苷酶(購自 Sigma Aldrich)。

最近多價共軛疫苗首先經由個別共軛疫苗合成，再混合成「雞尾酒」共軛疫苗(如，惠氏七價肺炎球菌疫苗，Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphtheria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.))製成。製造疫苗本發明之方法可藉由下列方式以製造多價疫苗：於該載體蛋白交聯前，與如戊二醛混合化學上不同抗原，如莢膜有機聚合物，一起；或混合特別本發明疫苗，而該疫苗為各自合成。這彈性對於製造多價疫苗本發明方法提供顯著好處。

實施例中討論之本發明疫苗例子，PCMV 疫苗 #1-3，表現像共軛疫苗，儘管這些疫苗經由非預料產生該 PGA 分子及 DNI 蛋白上原子間任何共價鍵之方法合成。戊二醛專門地與蛋白胺基支鏈反應，代表為離胺酸殘基 ϵ 胺基基團。該 PGA 聚合物不含自由胺基基團，只有不與戊二醛反應之羧基支鏈。因此，PCMV 產生此類似共軛免疫反應，表示長 PGA 分子為分子上包含在 DNI 蛋白分子交聯基質內。

按非限定之模式，該包含可攜帶 DNI 蛋白及 PGA 至 B-細胞中，該細胞以免疫辨識 PGA 之 Ig 受體結合此基質。一旦吸收進 B 細胞內，此基質與傳統共軛疫苗相似方式降解以產生 DNI-衍生胜肽，顯露在相對應 B-細胞之 MHC-II 分子上。輔助 T-細胞誘導此 B 細胞增殖及成熟以形成對 PGA

專一之 t IgG 生產漿及記憶細胞。因此，按非限定之模式，PCMV 免疫上運作像蛋白-共軛莢膜疫苗但是有區別的，因為 PCMV 於該載體蛋白及莢膜聚合物間缺少顯著共價鍵結。

本發明疫苗，包括 PCMV，可與如孩童疫苗併用。此外，本發明疫苗可用以接種對抗如，肺炎球菌感染、鏈球菌(A 群及 B 群)感染、B 型流感嗜血桿菌(“HiB”)感染、腦膜炎雙球菌(如腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*))感染及可從革蘭陰性細菌用作為 O 抗原疫苗(如綠膿桿菌、土拉倫法式菌(Thirumalapura et al., J. Med. Microbiol. 54:693-695, 2005; Vinogradov and Perry, Carbohydr. Res. 339:1643-1648, 2004; Vinogradov et al., Carbohydr. Res. 214:289-297, 1991)、志賀氏桿菌屬、沙門氏桿菌屬、不動桿菌屬(*Acinetobacter*)、伯克氏菌屬及大腸桿菌)。

本發明疫苗可使用如本處所述那些的任何連接劑製造，在如本處所述那些的一或多個所要抗原存在下，連接劑與如本處所述那些的任何載體蛋白交聯。若採用一種所要抗原，本發明蛋白基質疫苗說為單價。若採用多於一種所要抗原，本發明蛋白基質疫苗說為多價。若微生物莢膜聚合物為所要抗原，本發明蛋白基質疫苗說為蛋白莢膜基質疫苗(PCMV)。

連接劑

交聯載體蛋白為熟悉該項技術者所熟知，包括戊二醛、順丁烯酰胺苯甲酸-N-琥珀酸酯

(*m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester, MBS)、碳二亞胺(carbodiimide)及雙-二氯化聯苯胺(bis-biazotized benzidine)。

對於直接交聯載體蛋白一般方法及部份，使用同雙功能或異雙功能連接劑述說於如，G. T. Hermanson(Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996)及 Dick 與 Beurret(Conjugate Vaccines. Contribu. Microbiol. Immunol., Karger, Basel 10:48-114, 1989)。舉例來說，載體蛋白具有 n 個離胺酸根，理論上有 $n+1$ 一級胺(包括該末端胺)可用以與例子相交-連接劑之羧基反應。因此，採用這直接共軛方法，該產品限制具有 $n+1$ 醯胺鍵形成。

本發明最佳實施例中，該連接劑最簡單為連結兩個載體蛋白之化學鍵。該連接劑可為線性、環狀或分支分子骨架，具有共價鍵結兩載體蛋白(A)及(B)之懸掛基團(pendant group)。任何給定載體蛋白可連接至超過一個載體蛋白，以便創造交聯連接載體蛋白基質，而抗原可包含於內。

該術語「連接基團(linkage group)」指連接劑(L)與(A)或(B)官能基反應根產生結合之共價鍵。連接基團例子包括但不限定於酯、氨基甲酸鹽(carbamate)、硫酯、亞胺(imine)、二硫化物(disulfide)、醯胺(amide)、醚、硫醚、磺醯胺、異脲、異硫脲、醯亞胺酯(imidoester)、脒(amidine)、氨基磷酸酯(phosphoramidate)、磷酸雙酯、

硫醚(thioether)及脞(hydrazone)。

(A)與(B)連接藉由共價方式達成，包括一或多個(A)及(B)上官能基鍵(連接基團)形成。實施例可用於這目的之化學上反應官能基例子包括但不限定，胺基、羥基、硫氫基(sulfhydryl)、羧基、羰基(carbonyl)、硫醚、guanidinyl、咪唑基(imidazolyl)及酚基(phenolic group)，所有都出現在載體蛋白中自然存在之胺基酸。

因此，(A)與(B)共價連接可受到使用連接劑(L)影響，該連接劑含有能與(A)與(B)上這樣的官能基反應之反應根。這反應之產物為連接基團，該基團含有最新形成鍵結，連接(L)與(A)及(L)與(B)。舉例來說，(A)之羥基可與(L)羧酸基團或活化之其衍生物反應，引起酯連接基團形成。

能與硫氫基反應之化學根例子包括 XCH_2CO- (其中 $X=Br$ 、 Cl 或 I) 類型之 α -鹵代乙醯類化合物，其顯示對硫氫基有特殊之反應活性，但亦可用於修飾咪唑基、硫醚、酚及胺基基團，如文獻所述：如，Gurd, Methods Enzymol. 11:532, 1967。N-順丁烯二酰亞胺衍生物亦可視作對硫氫基有選擇性，但可另用於在特定條件下偶合至胺基基團。試劑，如 2-巯醇亞胺(2-iminothiolane)(Traut et al., Biochemistry 12:3266, 1973)，透過胺基基團轉換導入硫基，假如經由雙硫鍵形成發生連接，該試劑可視作為硫氫基試劑。

能與胺基基團反應之反應根例子包括，如烷化劑(alkylating agent)及醯化劑。代表性烷化劑包括：

(i) α -鹵代乙醯類化合物，在無反應硫基顯示對於胺基基團專一性， XCH_2CO- (其中 $X=Cl, Br$ 或 I)類型，敘述如 Wong(Biochemistry 24:5337, 1979)；

(ii) N-順丁烯二酰亞胺衍生物，不是透過萬可式(Michael-type)加成反應就是透過添加至環羰基之醯化與胺基基團反應，敘述如 Smyth et al.(J. Am. Chem. Soc. 82:4600, 1960 and Biochem. J. 91:589, 1964)；

(iii) 芳香基鹵化物(aryl halide)，如反應性硝基鹵代芳香基(nitrohaloaromatic)化合物；

(iv) 鹵烷類，敘述如 McKenzie et al.(J. Protein Chem. 7:581, 1988)；

(v) 能與胺基基團形成希夫鹼之醛或酮，透過還原給定穩定的胺，加合物形成通常為穩定的；

(vi) 環氧化物衍生，如表氯醇(epichlorohydrin)及雙環氧乙烷(bisoxirane)，可與胺基、硫氫基或酚羥基反應；

(vii) s-三嗪(s-triazine)之含氯衍生物，對於親核物，如胺基、硫氫基或羥基具非常反應性；

(viii) 上述所詳述以氮丙啶(aziridine)為基礎之 s-三嗪化合物，敘述如 Ross(J. Adv. Cancer Res. 2:1, 1954)，與親核物，如胺基基團藉由開環與之反應；

(ix) 方酸二乙酯(squaric acid diethyl ester)，敘述如 Tietze(Chem. Ber. 124:1215, 1991)；以及

(x) α -鹵烷醚(α -haloalkyl ether)，為更具反應性之烷化劑勝於一般之鹵烷類，此與醚氧原子引起之活化有

關，敘述如 Benneche 等 (Eur. J. Med. Chem. 28:463, 1993)。

代表性胺基-反應烷化劑包括：

(i) 異氰酸 (isocyanate) 及異硫氰酸，特別地芳香基衍生物，各自形成穩定之脲及硫脲衍生物；

(ii) 苯磺醯氯 (sulfonyl chloride)，已敘述如 Herzig 等 (Biopolymers 2:349, 1964)；

(iii) 醯鹵 (acid halide)；

(iv) 活性酯，如硝基苯酯 (nitrophenylester) 或 N-羥基琥珀醯亞胺酯 (N-hydroxysuccinimidyl ester)；

(v) 酸酐，如混合、對稱的或 N-羧酸酐 (N-carboxyanhydride)；

(vi) 用以形成醯胺鍵之其它有用試劑，敘述如 M. Bodansky (Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, 1984)；

(vii) 疊氮 (acylazide)，如其中疊氮基產生自使用亞硝酸鈉 (sodium nitrite) 完成醯肼 (hydrazide) 衍生物，可參照 Wetz 等 (Anal. Biochem. 58:347, 1974) 所述；以及

(viii) 醯亞胺酯 (imidoester)，一旦與胺基基團反應形成穩定脒，敘述如 Hunter 及 Ludwig (J. Am. Chem. Soc. 84:3491, 1962)。

醛，如戊二醛，及酮可與胺反應以形成希夫鹼，透過還原性胺化可有助穩定性。烷氧胺基根容易與酮及醛反應產生穩定之烷氧胺，敘述如 Webb 等 (Bioconjugate Chem.

1:96, 1990)。

能與羧基反應之反應根例包括重氮基(diazo)化合物，如重氮乙酸酯(diazoacetate ester)及重氮乙酸醯胺(diazoacetamide)，高度專一性反應以產生酯基團，敘述如 Herriot(Adv. 蛋白 Chem. 3:169, 1947)。亦可用羧酸修飾劑，如碳二亞胺(carbodiimide)，透過形成 O-醯基尿素(O-acylurea)而反應，再形成醯胺鍵。

(A)及/或(B)上官能基，如有需要，可於反應前轉換成其它官能基，以給予額外反應性或選擇性。用於本目的有用之方法例子包括用試劑如二羧酐將胺轉換成羧酸；用試劑如 N-醯高半胱氨酸硫內酯(N-acetylhomocysteine thiolactone)、S-乙醯基巯基琥珀酸酐(S-acetylmercaptosuccinic anhydride)、2-巯醇亞胺或含硫醇琥珀亞胺衍生物將胺轉換成硫醇；用試劑如 α -鹵醋酸將硫醇轉換成羧酸；用試劑如次乙亞胺(ethylenimine)或 2-溴乙胺將硫醇轉換成胺；用試劑如碳二亞胺再以二胺將羧酸轉換成胺；以及用試劑如甲苯磺醯氯(tosyl chloride)再以硫代乙酸進行交酯化反應及以醋酸鈉水解成硫醇而將乙醇轉換成及硫醇。

所謂「零長度(zero-length)」連接劑，意謂(A)之反應化學基團與(B)之反應化學基團直接共價連接，無引入額外連接物，假如需要，可依照本發明使用。實例包括化合物，其中(L)表示(A)之氧原子連結至(B)上羧基或硫羧基根的化學鍵，而該連接基團為酯或硫酯。舉例來說，胺基基

團(A)可藉用碳二亞胺化學連接至羧基(B)b，產生 A-L-B，其中 L 為醯胺鍵或連接至 N-R 之 R-C=O，其中 R 為衍生自相同或兩種不同蛋白分子之胺基酸支鏈的碳鏈。

大部分，然而，該連接劑包括兩個或多個反應性根團，如上所述，透過間隙物(spacer)連接。這間隙物存在使雙功能連接劑與(A)及(B)內特殊官能基反應，於這兩個化合物間產生共價連結。於連接劑(L)之這反應根團可為相同(同雙功能連接劑)或不同(異雙功能連接劑，或其中幾個相異的反應根團存在，異多功能連接劑)，提供不同潛在試劑，可使(A)及(B)間共價結合。

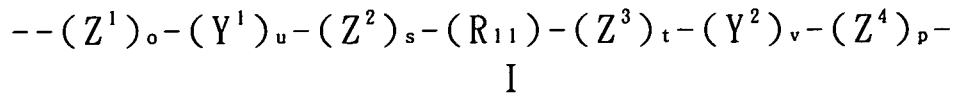
間隙物通常由鏈組成，該鏈藉下列有效分隔(A)及(B)：直線或分支 1 至 10 個碳原子之烷基、直線或分支 1 至 10 個原子異烷基、直線或分支 2 至 10 個碳原子之烯基、直線或分支 2 至 10 個碳原子之炔基、5 至 10 個碳原子之芳香殘基、3 至 10 個原子之環狀系統或 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ，其中 n 為 1 至 4。

藉連接劑引入之外來物質本質可具有對該最終疫苗產物之藥物動力學及/或活性有影響。因此，它最好可引進可切割之連接劑，其含有生物可分解或化學敏感幸或結合酵素切割位置之間隙物。

這些可切割之連接劑，敘述如 PCT 公開號 WO 92/17436(在此併入參考)，輕易於體內分解。在一些情況下，連接基團於酯酶存在下被切割，但在無這樣的酵素存在下是穩定的。因此，(A)及(B)可有利於連結並藉由近疾

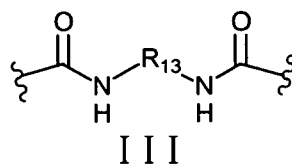
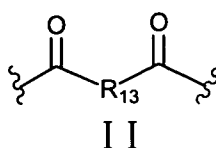
病位置有活性之酵素而緩慢釋放。

連接劑可形成具化學式(I)之生物可分解二酯、二醯胺或二氨基甲酸基團的連接基團：



其中，每一 Z^1 、 Z^2 、 Z^3 及 Z^4 獨自選自 O、S 及 NR_{12} (其中 R_{12} 為氫或烷基)；每一 Y^1 及 Y^2 獨自選自羰基、硫羰基、磺醯基 (sulphonyl)、磷醯基 (phosphoryl) 或相似酸形成基團 (acid-forming group)；o、p、s、t、u 及 v 每一獨自為 0 或 1；以及 R_{11} 為直線或分支 1 至 10 個碳原子之烷基、直線或分支 1 至 10 個原子異烷基、直線或分支 2 至 10 個碳原子之烯基、直線或分支 2 至 10 個碳原子之炔基、5 至 10 個碳原子之芳香殘基、3 至 10 個原子之環狀系統、 $\text{--}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2\text{--}$ ，其中 q 為 1 至 4、或連結 $\text{--}(Z^1)_o\text{--}(Y^1)_u\text{--}(Z^2)_s\text{--}$ 至 $\text{--}(Z^3)_t\text{--}(Y^2)_v\text{--}(Z^4)_p\text{--}$ 之化學鍵。

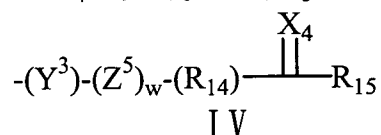
用於本發明之最好連接劑(L)例子可為化學式 II-III 任一者：



其中，該連接劑共價連接(A)之氧原子及(B)之氧原子兩者。據此，化學式 II-III 之連接劑(L)透過二吡喃 (dipyran)、酯或氨基甲酸連接基團鍵結至載體蛋白(A)及(B)。這些實施例中， R_{13} 代表直線或分支 1 至 10 個碳原子之烷基、直線或分支 1 至 10 個原子異烷基、直線或分支

2 至 10 個碳原子之烯基、直線或分支 2 至 10 個碳原子之炔基、5 至 10 個碳原子之芳香殘基、3 至 10 個原子之環狀系統、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ，其中 n 為 1 至 4、或連結兩個氮或兩個羰基之化學鍵。

設計形成脞(hydrazone)連接之連接劑具有化學式 IV:



其中， Z^5 選自 O、S 或 NR_{16} ； R_{16} 為氫或烷基； R_{15} 選自氫、烷基或異烷基； Y^3 選自共價鍵結至(A)之氧原子的羰基、硫羰基、磺醯基、磷醯基(phosphoryl)或相似酸形成基團； w 為 0 或 1； R_{14} 為直線或分支 1 至 10 個碳原子之烷基、直線或分支 1 至 10 個原子異烷基、直線或分支 2 至 10 個碳原子之烯基、直線或分支 2 至 10 個碳原子之炔基、5 至 10 個碳原子之芳香殘基、3 至 10 個原子之環狀系統、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ，其中 n 為 1 至 4、或連接 $-(Y^3)-(Z^5)_w-$ 至 $\overset{\text{X}_4}{\parallel}-R_{15}$ 之化學鍵；且 X_4 為含有醯肼基(hydrazide group)及連接劑 II 前趨物之(B)濃縮反應產生之脞(hydrazone)，其中 X_4 為酮或醛基之氧原子。

載體蛋白

一般而言，於生理條件下，可包含抗原之任何載體蛋白可用於本發明。較佳地，該抗原包含於具載體蛋白之複合物中，而無顯著共價鍵結於該抗原與載體蛋白間。無顯著共價鍵結表示該抗原不超過 50% 共價鍵結於載體蛋白。最佳實施例中，該抗原不超過 40%、30%、10% 或 5% 共價鍵

結於載體蛋白。該抗原/載體蛋白複合物可含有另一化合物，如鋁(alum)，在最佳實施例中，這其它化合物可包含該抗原及載體蛋白。

用於本發明疫苗之載體蛋白較佳地為單獨或與抗原結合之蛋白，引起受試者免疫反應。較佳地，該載體蛋白含有至少一個 T-細胞辨識之抗原決定位。較佳地，該抗原決定位可誘導受試者 T-細胞反應及誘導 B-細胞產生對抗整個所要之抗原的抗體。用作本發明所述之抗原決定位包括任何抗原決定基(determinant)，抗原分子中負責與抗體分子或其片段之特異性交互作用。表位決定基通常由分子，如胺基酸或糖支鏈之化學上活化表面群所組成並具有特異三維結構特性及特異電位特性。為具有致免疫特性，蛋白或多肽通常能刺激 T-細胞。然而，缺少 T-細胞辨識之抗原決定位的載體蛋白亦可具致免疫性。

藉篩選引起強大致免疫性反應之已知載體蛋白，各種族群受試者可以本發明所述之 PCMV 治療。對該疫苗，該載體蛋白較佳地是不足引起強大致免疫性反應。一般來說，該載體蛋白為可將致免疫性給予所要之抗原的分子。最佳實施例中，載體蛋白為天生高度致免疫性的一個。因此，具高程度之致免疫性且能使對該抗原之抗體生產最大化之載體蛋白最好。

本發明各種載體蛋白包括如毒素及類毒素(化學或基因)，可為突變的或非突變的，如炭疽桿菌毒素、PA 及 DNI(PharmAthene 公司)、白喉類毒素(麻薩諸塞州生物實

驗室 (Massachusetts State Biological Labs)；印度血清機構 (Serum Institute of India) 或 CRM 197、破傷風毒素、破傷風桿菌類毒素 (麻薩諸塞州生物實驗室；印度血清機構)、破傷風毒素 Z 端片段、綠膿桿菌外毒素 A 或外毒素 A 突變物、細菌鞭毛蛋白、肺炎球菌溶血素、腦膜炎雙球菌 (美國菌種保藏中心 ((American Type Culture Collection, ATCC) Manassas, VA) 可獲得之菌株) 外膜蛋白、綠膿桿菌 Hcp1 蛋白、大腸桿菌不耐熱腸毒素、類志賀氏毒素、人類 LTB 蛋白、整個細菌細胞萃取之蛋白及可以連接劑交聯之任何其它蛋白。較佳地，該載體蛋白霍亂毒素次單元 B (購自 SBL Vaccin AB)、白喉毒素 (Connaught 公司)、破傷風毒素 C 端片段 (購自 Sigma Aldrich)、DNI 或大腸桿菌 β 半乳糖苷酶 (購自 Sigma Aldrich)。其它最好載體蛋白包括牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、P40 及雞核黃素 (chicken riboflavin) (除非另有所指，該載體蛋白購自 Sigma Aldrich.)。其它載體蛋白例為多-抗原胜肽 (multi-antigenic peptides, MAPs)，為分支之胜肽。藉由使用 MAP，交聯密度最大化，因為有多倍分支之胺基酸殘基。用於形成 MAP 之胺基酸例為但非限定於離胺酸。

當以動物為實驗時，BSA 鑰孔蟲血藍蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 兩者已常用做為疫苗開發之載體。用以製備治療疫苗之載體蛋白包括但不限定於一些病原細菌之毒素及其類毒素。例子包括白喉毒素及破傷風毒

素及其藥物可接受對應之類毒素。其它候選者為蛋白，抗原上相似於作為交互反應物 (cross-reacting materials, CRMs) 之細菌毒素。本發明載體蛋白亦可包括任何非衍生自人類或存在任何人類食物中之蛋白。

本發明最佳實施例中，形成類環結構之蛋白用於 PCMV 生產。這蛋白包括綠膿桿菌 Hcp1 蛋白、無毒性霍亂毒素次單元 B、大腸桿菌不耐熱腸毒素及類志賀氏毒素。這類環蛋白複合物可形成串珠 (bead on a string)，其中線性 PS 鏈穿透於這些環形蛋白複合物至之中心管道。蛋白交聯後，這複合物預期特別穩定。該蛋白結構資料意喻這些中心管道大到足以讓 PS 鏈輕易進入。舉例來說，該 Hcp1 六聚體環 (hexameric ring) 之中心管道為 42 埃，夠寬足以輕易容納幾條寬度為 5.5 埃之多醣鏈 (Mougous et al., Science 312(5779):1526-1530, 2006)。另外，蛋白環可圍繞該 PS (如來自在特定物理化學條件下自然組裝成環狀之單體載體蛋白次單元) 組裝。可組裝成環狀之單體蛋白為該項技術領域熟知，包括如，肺炎球菌溶血素 (Walker 等., Infect. Immun. 55(5):1184-1189, 1987; Kanclerski 及 Mollby, J. Clin. Microbiol. 25(2):222-225, 1987)、菌溶菌素 (listeriolysin O, LLO) (Kayal 及 Charbit, FEMS Microbiol. Rev. 30:514-529, 2006; Mengaud 等., Infect. Immun. 55(12):3225-3227, 1987)、DNI、炭疽桿菌 PA、Hcp1、霍亂毒素次單元 B、志賀氏毒素次單元 B (shiga toxin B subunit)、鞭毛蛋白及許多該項技術領域熟知並由各種

微生物製造之相關分子。

在另一最佳實施例中，類鐸受體(TLR)促進劑(agonist)用作為載體蛋白。類鐸受體(TLR)活化對發展適應性免疫反應是重要的且在抗體反應、同種型轉變及免疫記憶之親合成熟扮演角色。霍亂弧菌鞭毛蛋白(Flagellin, FLA)為 TLR 促進劑。超過 20mg 之 FLA 蛋白由重組大腸桿菌純化出來，在本發明 IL-6 巨噬細胞誘導分析中顯示為有效能的 TLR 活化劑。此外，高度保守肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 蛋白稱之「肺炎球菌溶血素 (pneumolysin, Pn)」亦顯示活化 TLR4，此外為保護性抗原。因此，這蛋白亦可作為 PCMV 載體蛋白。

再者，Merck 製造之 HIB 共軛疫苗中，外膜蛋白 (outer membrane protein, OMP) 混合物 (如腦膜炎雙球菌 (*Neisseria meningitidis*) OMP) 用作為載體蛋白，該蛋白萃取自整個肺炎雙球菌 (*Streptococcal pneumoniae*) 細菌細胞，在動物感染模型中顯示至少部分具保護性。本發明最佳實施例中，這些蛋白混合物為 PCMV 載體蛋白來源。

最佳實施例中，該 PCMV 方法採用具如至少 2 個離胺酸殘基或未被阻隔且可經化學修飾產生交聯之其它殘基的載體蛋白。另一最佳實施例中，該載體蛋白為多聚體 (如含有至少 5 個次單元)。較佳地，該多聚體為同多聚體 (homomultimer)。

另一最佳實施例中，DNI 用作為載體蛋白，因為它無毒性遺留，不需使用前使該蛋白去除毒性。因此，最好使

用 DNI，因為 DNI 除對所要抗原之保護性免疫反應外，亦可誘導對炭疽桿菌 (*B. anthracis*) 保護性免疫反應。此外，DNI 無內部雙硫鍵。這化學鍵易受氫硼化物還原，而將使該蛋白變質，導致誘導炭疽桿菌毒素中和抗體 (neutralizing antibody) 之抗原決定位損失。

所要抗原

本發明疫苗組成物以及該疫苗的製造與使用方法可採用任何所要之抗原，如多醣、多元醇或聚胺基酸。較佳地，該所要抗原無攜帶因製造疫苗方法造成化學反應而破壞之一級基團 (primary group)，如受氫硼化物還原破壞抗原雙硫鍵兒引起抗原變質。所要之抗原例包括有機聚合物，如多醣 (如，具至少 18 個殘基之多醣)、磷酸化多醣 (phosphopolysaccharide)、具 N-乙醯取代之胺基糖的多醣、含磺醯化糖 (sulfanylated sugar)、其它硫酸修飾之糖或磷酸修飾之糖、多元醇、聚胺基酸、磷壁酸 (teichoic acid)、脂多醣之 O 支鏈的多醣。所要之抗原例亦包括莢膜有機聚合物，包括微生物所合成那些，微生物如細菌、真菌、寄生蟲及病毒，然後以標準方法從這樣生物資源純化。所要之抗原例包括微生物莢膜有機聚合物，包括由細菌微生物所純化那些，細菌微生物如桿菌屬 (*Bacillus species*) (包括炭疽桿菌 (*B. anthracis*)) (Wang 及 Lucas, *Infect. Immun.* 72(9):5460-5463, 2004)、肺炎雙球菌 (*Streptococcal pneumoniae*) (Bentley 等., *PLoS Genet.* 2(3):e31, Epub 2006; 及 Kolkman 等., *J. Biochemistry*

123:937-945, 1998)、志賀氏桿菌(*Shigella*)(Zhao 等., Carbohydr. Res. 342(9):1275-1279, Epub 2007)、流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)、腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*)、金黃色醱膿葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、傷寒桿菌(*Salmonella typhi*)、化膿性鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)(Zhao 等., Carbohydr. Res. 342(9):1275-1279, Epub 2007)及綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)，以及真菌，如隱球菌屬(*Cryptococcus*)及念珠菌屬(*Candida*)和很多其它微生物(參閱如 Ovodov, Biochemistry (Mosc.) 71(9):937-954, 2006; Lee et al., Adv. Exp. Med. Biol. 491:453-471, 2001; and Lee, Mol. Immunol. 24(10):1005-1019, 1987)。所要之抗原例亦包括不存在於自然且因此起源為非生物性之聚合物。

疫苗組成物

本發明疫苗，包括 PCMV，可與如孩童疫苗併用。此外，本發明疫苗可用以接種對抗如，如肺炎球菌感染、鏈球菌(A 群及 B 群)感染、B 型流感嗜血桿菌(“HiB”)感染、腦膜炎雙球菌(如腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*))感染及可從革蘭陰性細菌用作為 O 抗原疫苗(如綠膿桿菌、土拉倫法式菌、志賀氏桿菌屬、沙門氏桿菌屬、不動桿菌屬(*Acinetobacter*)、伯克氏菌屬及大腸桿菌)。

該疫苗配方較佳地包括至少一種載體蛋白、一或多種所要抗原及藥學上可接受載體或賦形劑(如磷酸鋁、氯化鈉

及無菌水)。疫苗組成物亦可包括用以增強該配方致免疫性之佐劑(adjuvant)系統，如油在水系統及其它該技術領域熟知之系統、或其它藥學上可接受賦形劑。生理條件下不溶之載體/抗原複合物最好給予受試者後，緩慢釋放該抗原。這樣的複合物較佳地以包含藥學上可接受賦形劑之懸浮液傳輸。然而，該載體/抗原複合物在生理條件下為可溶。

該疫苗通常皮下注射量約 0.5mL；肌肉注射量約 0.1mL 或經皮給藥量 0.002-0.02mL。0.5ml 劑量之疫苗可含有約 2-500 μ g 以約 2-500 μ g 載體蛋白包合之抗原。最佳實施例中，0.5ml 劑量中，約 10 μ g 之抗原以約 10 μ g 載體蛋白包合。抗原及載體蛋白摩耳數比介於 1 至 10 間(如，1 份抗原對 2 份載體或 1 份抗原對 3 份載體)及介於 10 至 1 間(如，3 份抗原對 1 份載體或 2 份抗原對 1 份載體)。最佳實施例中，抗原及載體蛋白摩耳數比為 1:1。另外，抗原對載體蛋白乾重比較佳地介於 1 至 10 及 10 至 1 間(如乾重 1:1)。

因為該胜肽或共軛物可於胃中被降解，該疫苗較佳地為非消化道給藥(parenteral)(如皮下注射(subcutaneous, sc)、肌肉注射(intramuscular, im)、靜脈注射(intravenous, iv)或皮內注射(intradermal, id))。給藥時最好為物理穿刺皮層傳輸(如針、氣槍或磨蝕)，而本發明疫苗亦可經皮吸收(transdermal absorption)給藥。

特別地，本發明疫苗投予受試者，如以適當免疫佐劑

肌肉注射、皮內注射或或經皮接種。本發明疫苗可給藥一或多次，通常包含第二次給藥，用以補強受試者抗體產生，以預防致病因子之感染。疫苗劑量之頻率及數量取決於該疫苗比活性(specific activity)及可輕易日常實驗判斷。

舉例來說，對嬰幼兒來說，疫苗療程可為約 4 至 8 週間隔 3 劑，每劑 0.5ml(2 個月大)，隨後約 12 至 15 個月大接種 0.5ml 第 4 劑。對一些疫苗來說，4 及 6 歲間最好可接種第 5 劑。

接種第一劑之年紀一般為 2 個月，疫苗可投予六週大嬰幼兒。對於例行的嬰幼兒接種療程年紀下之孩童，本發明疫苗可依照下列療程例接種。

接種第一劑之年齡	療程劑量
7-11 個月	合計三劑，每劑 0.5ml；前兩劑相隔至少 4 週，第三劑在第二劑後至少 2 個月接種
12-23 個月	合計二劑，每劑 0.5ml，相隔至少 2 個月
24 個月至 9 歲	一劑，每劑 0.5ml

對於成人，0.5ml 二或多劑，2-8 週內，通常足以提供長期保護。補強劑量最好每 10 年對於先前已免疫之成人及七歲以上之孩童接種一次。

該配方可放於單劑量或多劑量容器，如密封之安瓿及小瓶，可存放於冷凍乾燥(凍乾)條件下，使用前立即添加無菌液體載體即可。本發明疫苗可以藥學上可接受載具調製，如氫氧化鋁凝膠、佐劑製劑或鹽，然後投藥，如以適當免疫佐劑肌肉注射、皮內注射或或經皮接種。

本發明亦包括本處所述之疫苗(如，PCMV)的套組。本

發明套組亦可包括本處所述使用該套組接種分法之說明書。

免疫療程藥效可以標準方法測試受體者抗體效價判斷。一般來說，約 $1 \mu\text{g/ml}$ 之平均抗體效價(較佳地為 IgG 效價(titer))被認為表示長期保護。

用以本發明所述之該疫苗組成物中，抗原/載體蛋白複合物直徑較佳地介於 10nm 及 $100 \mu\text{m}$ 間。病毒直徑可為 100nm ，且具致免疫性。整個細菌直徑可為 $1-10 \mu\text{m}$ ，且亦具致免疫性。小叢之細菌直徑可約 $100 \mu\text{m}$ 。特別實施例中，疫苗組成物中，抗原/載體蛋白複合物直徑較佳地介於 100nm 及 $10 \mu\text{m}$ 。這複合物可為可溶或不溶。

本發明將進一步說明下列之具體實施例、實施例及圖式，但非用以侷限本發明如後附之申請專利範圍。

實施例

實施例 1. 疫苗及控制組製備

莢膜聚 γ -D-麩胺酸(PGA)購自味丹公司(台灣)或以 Rhie 等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10925-10930, 2003)方法純化。顯著抑制型突變(DNI)蛋白為炭疽桿菌保護性抗原(PA)之突變型，以 Benson 等(Biochemistry 37:3941-3948, 1998)方法從大腸桿菌製備。PGA 及 DNI 蛋白使用前徹底地以 0.05M 磷酸鈉緩衝液 pH7.4(SP7.4)透析。該 DNI 儲存液(stock solution)相當於 30mg/ml 。該 PGA 儲存液相當於 134mg/ml 。該連接劑戊二醛購買自 Pierce 作為 25%儲存液。蛋白莢膜基質疫苗(protein

capsular matrix vaccine, PCMV)及控制組依照表 1 反應組合。

表一、製造 PCMV 製劑 1-3 及控制組 4 及 5 之反應

反應#	DNI	PGA	dH2O	25%戊二醛	名稱
	ml	ml	ml	ml	
1	20	1	3	0.8	PCMV1
2	12	4	8	0.8	PCMV2
3	16	2	6	0.8	PCMV3
4	16	2	6	0	P+C 控制組
5	16	0	8	0.8	只有 P 控制組

這五種反應於無戊二醛室溫(22°C)。在 T=0，將 0.1ml 之 25%戊二醛(G25)添加至指示之反應。之後每 30 秒添加另一 0.1ml 之 G25，並重複直到每一指示反應添加至總量 0.8ml 之 G25。以該雙功能戊二醛分子交聯 DNI 分子情形可以於放大鏡下觀察產生之各種程度的濁度(turbidity)及像粒子之不可溶膠體，等級依序為：濁度及膠體產生最高，反應為 1>2>3>4，反應 5 則維持完全清澈且溶的。一小時後，添加 2ml 之 1M 硼氫化鈉(於 0.5M 硼酸鈉緩衝液 pH9.3(SBH))至所有六個反應以還原希夫鹼，此希夫鹼形成於該 DNI 分子胺基支鏈及雙功能戊二醛分子間。添加矽基消泡劑(0.01ml)至每一反應以控制這反應期間泡沫形成。該反應存放於 4°C 72 小時。然後，所有反應徹底地以 SP7.4 透析 48 小時。最終產物以離心以去除不溶物質，並存放於 4°C。

牛血清白蛋白(BSA)及 PGA 間之傳統共軛藉由將 BSA 胺基基團以水溶性碳二亞胺，1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳二亞胺(EDAC)(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)，偶合至 PGA 羧基而合成，如下：5ml 之 30mg/ml BSA 於水與 1ml 之 134mg/ml PGA 於 NP7.5 混合。添加 50mg 之 EDAC，於室溫繼續進行 3 小時。此反應於 4°C 以含 1mM 甘胺酸(glycine)之 SP7.4 透析 18 小時，以阻隔活化基團，然後在於 4°C 以純 SP7.4 透析 24 小時。最終產物視為 PGA-BSA 共軛物。

在 PCMV 及控制組製劑合成及透析後，檢測 DNI 蛋白之分子狀態以確認在各種量之 PGA 存在與否，將戊二醛的確分子上交聯至該蛋白。PCMV 及控制組製劑以十二烷基硫酸鈉(sodium dodecyl sulphate, SDS)聚丙稀醯胺(polyacryamide, PAM)膠體電泳及以抗-PA 抗血清西方墨點分析監測交聯。參照第 2 圖，戊二醛交聯前，DNI 蛋白移動至 84kDa。PCVM1-PCMV3(第 1-3 欄)顯示該 DNI 蛋白大量交聯，由亮帶(band)移動至分子量超過 220kDa 可所說。無 PGA 下，單獨交聯之 DNI 蛋白亦顯示相同高分子量(第 5 欄)。相對地，以 PGA 混合但無以戊二醛處理之 DNI 顯示於 DNI 與共移動或較低分子量之亮帶(第 4 欄)。因此，購自味丹(台灣)之 PGA 製劑似乎混雜可分解 DNI 之蛋白酶。味丹 PGA 樣本跑第 6 行，然而未顯示高含量與抗-PA 抗血清反應之混雜蛋白，意喻觀察到亮代為各種反應之 DNI-衍生產物。

此外，在 PCMV 方面，PGA 及作為抗原之一或多種肺炎球菌用以探討 FLA(霍亂弧菌鞭毛蛋白，*Vibrio cholerae* flagellin)是否為較好之載體蛋白勝於 DNI。該載體蛋白效果以測量直接抗 PGA 之 IgG 以這些各種含量 PCMV 接種產生 PS 含量，以及蛋白重量之效力。

PCMV 亦可以下列方法製造，將胺基基團直接交聯至羧基，無須使用雙功能交聯-連接劑。特別地，PCMV 可以碳二亞胺化學交聯載體蛋白胺基及羧基。這化學於離胺酸支鏈之一級胺基基團及天門冬胺酸 (aspartate) 及麩胺酸 (glutamate) 支鏈之羧基間形成胍肽鍵。當福馬林 (formalin) 處理類毒素，大部分胺基基團被阻隔，福馬林完全不與羧基反應。因此，碳二亞胺化學可用以製造以可對抗戊二醛交聯之福馬林類毒素之 PCMV。交聯輕易以 SDS-PAGE 測得。視其添加交聯-連接劑像戊二醛之高分子量蛋白汙點 (smear) 存在表示交聯。

表二、以 SDS-PAGE 分析判斷載體蛋白之交聯。

戊二醛 交聯聚合物	No -PGA	Yes -PGA	Yes +PGA	Yes +PS 6B	Yes +PS 23F
BSA	-	+	+	+	+
白喉毒素	-	+	+	n. d.	n. d.
白喉類毒素	-	-	-	n. d.	n. d.
破傷風桿菌類毒素	-	+	+	n. d.	n. d.

+符號表示經 SDS-PAGE 偵測到交聯；-符號表示蛋白移動未從無戊二醛控制組所見改變。n. d. -未判斷(未做分析)。

表二之實驗為將 200 μ l 於 50mM HEPES pH7.5 下，於室溫下反應 2 小時。該反應以 120mM 氫硼化鈉淬火。戊二醛添加至 64mM；牛血清白蛋白 (BSA) 加入 15mg/ml；白喉毒

素、白喉類毒素及破傷風桿菌類毒素加入約 5mg/ml；PGA 加入 13.4mg/ml；肺炎球菌 PS 6B 型及 23F 型加入 4mg/ml。

如表 2 所示，一些福馬林處理之蛋白(如，白喉類毒素)無法與戊二醛很好交聯，因此需要其它交聯化學用以 PCMV 製劑。其它，如破傷風毒素可為戊二醛交聯，但交聯程度不同於未修飾之蛋白，如白喉毒素及牛血清白蛋白。

實施例 2. 接種抗-DNI 及抗-PGA 及免疫反應分析。

表一所述之 5 種反應可溶性產物調整成基於 280nm 吸收光譜之相同蛋白質濃度。Charles River 繁殖地點所購買到大約 5-7 週大 BALB/c 用第 2 圖所述所有免疫研究。第 0 天，小鼠以劑量 DNI 蛋白 20 μ g 之 PCMV 疫苗 1-3 及抗原製劑控制組 4 及 5 腹腔注射。所有小鼠第 7 天抽血，然後第 10 天以相同劑量抗原製劑補強接種。小鼠第 17 天再次抽血，然後第 20 天以相同劑量抗原製劑補強接種。小鼠第 30 天再次抽血，同時犧牲。凝集發生後收集從血液樣本所得之血清，存於 -20°C。酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 用以分析抗-PGA 及抗-DNI 血清抗體含量。簡言之，Immulon 2HB ELISA (VWR) 微量培養皿以於 0.1M 碳酸鈉緩衝液 pH9.6 之 BSA-PGA 或 DNI 塗覆於體積為 100 μ l/穴加入 0.5 μ g/穴。培育於 4°C 過夜後，塗覆抗原之穴盤以 3% BSA(w/v) (於 TBS-0.1% Tween(TBST) 中) 培育一個小時，室溫過夜。從補強接種後不同時間點之四種小鼠群匯集之血清樣本連續以 TBST 稀釋，將之添加至塗覆抗原之穴盤並培育至少一個小

時。抗-DNI 及抗-PGA 抗體反應以免抗血清抗小鼠 IgG 或 IgM 共軛至鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)(Zymed)測試。受質 p-硝基酚磷酸鹽(p-nitrophenyl phosphate, PNPP)添加至每穴，每一反應以分光光度計於吸收波長 405nm 測量。實驗數值以相對之端點效價表示，定義為最大稀釋而獲得 OD₄₀₅ 讀值，兩標準誤差在負控制組之以上。

以 ELISA 測量於三種 PCMV 製劑 1-3 及兩種抗原控制組製劑 4 及 5 接種之小鼠，其中 IgM 及 IgG 專一抗-DNI 及抗-PGA 的免疫反應(圖 3-5)。參照第 3 圖，除未與戊二醛(無供應過多)交聯之控制組製劑 4，在所有製劑，該 DNI 蛋白具高度致免疫性。然而，這些 DNI-專一免疫反應專門以 IgG 為基礎。甚至接種第 7 天，無抗-DNI IgM 被偵測到，而顯著抗--DNI IgG 反應可於接種 PCMV 製劑之小鼠及接種只有交聯 DNI(製劑 5)那些第 17 天偵測到。於以所有製劑(包括製劑 4)抗 DNI 第 30 天強增幅反應(booster response)被注意到。

抗-PGA IgM 反應顯示典型莢膜聚合物(圖 4)圖案。控制組製劑 4 第 7 天產生可偵測之抗-PGA IgM 反應，但這反應第 17 天或第 30 天並無增強。所有 PCMV 製劑第 17 天誘導抗-PGA IgM 反應，隨後第 17 天或第 30 天甚至專有產生較強抗-PGA IgM 反應。如期望，控制組製劑 5(只有交聯 DNI)不產生 IgM-或 IgG-基礎抗-PGA 反應。明顯對比中，PCMV1-3(製劑 1-3)產生強 IgG-基礎抗-PGA 反應，該反應第 17 天出現，隨後第 30 天明顯增強(圖 5)。對於 PCMV1-3，

IgG-基礎抗-PGA 反應明顯相似與所報導傳統 PGA-DNI 共軛疫苗及 PA-PGA 共軛疫苗對 PGA 之反應，該報導分別為 Aulinger 等 (Infect. Immun. 73:3408-3414, 2005) 及 Rhie 等。(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10925-10930, 2003) 所述。因此，PCMV 疫苗 #1、#2 及 #3 所有表現和傳統共軛 PGA 疫苗誘導對莢膜 PGA 之 IgG 反應一樣好，為已知非 T-依賴型、炭疽桿菌保護性抗原 (Wang et al., Infect. Immun. 72:5460-5463, 2004)。含與 PGA 混合之 DNI(無交聯)之控制組製劑 5 無誘導可偵測之抗 PGA 之 IgG 表示 DNI 並不扮演 TLR 配體，在 PCMV 製劑 1-3 中刺激 IgG 抗-PGA 反應。這結果亦確認文獻上之觀察，除非 PGA 透過共價鍵與蛋白偶合，否則 PGA 為低致免疫力之非 T-細胞依靠型免疫抗原 (immunogen)(Rhie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:10925-10930, 2003)。該 PCMV 方法明顯將 PGA 轉換成 T-細胞依靠型免疫抗原，儘管該方法並不造成該 DNI 蛋白直接對 PGA 分子。

這些資料支持該 PCMV 方法可以產生與傳統共軛疫苗相似特性之免疫抗原。該 PGA PCMV 以本發明所述之方法輕易製得，且發現誘導典型 PGA-蛋白共軛疫苗之免疫反應。表 1 所述小量反應產生足夠 PCMV 使 1000 隻小鼠按第 3 圖所述劑量給藥方案產生免疫。本發明資料支持從 PGA 及 DNI 製得之 PCMV 可用作預防抗炭疽桿菌 (*Bacillus anthracis*) 引起炭疽病之疫苗。

實施例 3、額外 PCMV 產生及特性

該 PCMV 技術可應用於各種結構及離子電荷之莢膜抗原。肺炎鏈球菌 PS 23 種型購自美國菌種保藏中心(ATCC)且 Merck 公司製造。這些 PS 很大差異在於它們分子結構，包括強陰離子、部份陽離子、中性電荷、磷酸化、直線、有分支結過及各種其它方式修飾之 PS。在初步實驗，分析對應於在惠氏產品 Plevnar(4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 及 23F)七種莢膜型之這些 PS 子集對於誘導小鼠巨噬細胞產生 IL-6 之能力。PS 4 型在這分析中具活性；脂多醣(LPS)為控制組作為 TLR 促進劑。亦分析其它 PS(如，3 型)、PGA 及土拉倫法式菌 O 抗原 PS 及 PGA-DNI 製得之 PCMV 疫苗與無交聯之控制組。這實驗顯示肺炎鏈球菌 PS3 型及較小程度 PGA 亦混雜 TLR 促進劑。土拉倫法式菌 PS 及該 PCMV 於分析中同等地乾淨。酚萃取乙醇沉澱兩次連續不斷處理後的可清理(移除殘留不知 TLR 促進劑)肺炎鏈球菌 PS3 型。因此，六種肺炎鏈球菌 PS 及土拉倫法式菌 O 抗原 PS 發現為乾淨用以生產 IL6，而這些已用於本發明所述之實驗探究。

發現乾淨用以生產 IL6 之 7 種 PS 的 PCMV 以類似實施例 1 所述之方法用 DNI 作為載體蛋白合成。初步致免疫力分析建議七種 PCMV 所有具不同程度之致免疫性。肺炎鏈球菌 PS14(14-PCMV)之 DNI-基礎“單價”PCMV(14-PCMV)發現誘導高效價抗-PPS14 IgG，第三次接種顯著增強。明顯地，當 14-PCMV 與其它六種 PCMV 混合成“雞尾酒”免疫抗原，發現有相同免疫反應。因為 Plevnar® (Pneumococcal

7-Valent Conjugate Vaccine [Diphtheria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.) 為經鋁吸收之“佐劑”疫苗，是否檢測該六價 PCMV 雞尾酒亦可吸收至鋁佐劑。暴露於 PCMV 或與 DNI 蛋白混合但無戊二醛交聯之相同 PS 控制組混合物後，定性測量吸收至鋁佐劑之肺炎鏈球菌 PS 量，該免疫分析結果顯示在 PCMV，更多 PS 吸收至鋁佐劑勝過控制組 (PS+未交聯之 DNI 蛋白) (在免疫分析中，對進一步稀釋 PCMV，顯示較高水準免疫反應性 (immunoreactivity))。

小鼠接種免疫用以評估六價 PCMV 有無鋁佐劑吸收之致免疫力。鋁佐劑改善對 PS14 之免疫反應之動力學，第 7 天誘導 IgG 對抗這 PS 7 較無佐劑疫苗快。然而，該六價 PCMV 在無鋁佐劑下較有鋁佐劑存在下無交聯 PS+DNI 組合控制組更具致免疫性。這結果確定該 PCMV 步驟使得 PS 小鼠較具致免疫性，並支持該 PCMV 步驟可用以製造免疫表現像雞尾酒共軛疫苗之雞尾酒抗原。

在額外實驗中，酚萃取乙醇沉澱用以移除 23 肺炎鏈球菌多醣市售製劑中混雜 TLR 促進劑。混雜物移除以經處理之 PS 經標準方法誘導腹膜巨噬細胞生產 IL-6 作測試。缺少 IL-6 誘導活性之 PS 用以生產 PCMV。用以 PCMV 之其它多醣包括土拉倫法式菌 O 抗原 PS 及炭疽桿菌 PGA 英膜。測試總計 25 種英膜類型 (23 種肺炎球菌類型及兔熱病 (tularemia) 及炭疽熱 (anthrax) 類型各一)。25 種英膜類型每一種大體以實施例 1 所述方法用 DNI 蛋白製造 PCMV。

採用 PS 對蛋白 1:1 比例(乾重約 1:1)以製造這些最初 PCMV 製劑。每一製劑以 SDS-PAGE 為特徵，提供蛋白交聯證據，在初步實驗，交聯與各種 PCMV 製劑之致免疫力完全地相關。在一些莢膜類型(如，6B 及 23F)，用其它載體蛋白製造 PCMV。在相同莢膜類型(如，6B 及 23F)可用替代交聯化學。所有顯示蛋白交聯(如，於 SDS-PAGE)證據之 PCMV 製劑測試它們致免疫力。

舉例來說，使用 5 種不同基質蛋白及 2 種不同抗原製造 10 種不同 PCMV 如下。5 種基質蛋白選擇係基於在 FDA-許可疫苗它們最近的用途或允許它們作為追蹤者，用以測量 PCMV 製劑穩定性。使用下列基質蛋白：(1)霍亂毒素次單元 B(購自 SBL Vaccin AB)、(2)白喉毒素、(3)破傷風毒素 C 端片段(Frag C)(購自 Sigma Aldrich)、(4)DNI 及(5)大腸桿菌 β 半乳糖苷酶(購自 Sigma Aldrich)。使用炭疽桿菌莢膜抗原聚 γ -D-麩胺酸及肺炎雙球菌莢膜 14 型(Suarez et al., Appl. Environ. Microbiol. 67:969-971, 2001)。在相對應之 PCMV 中，當用作為基質蛋白之 DNI 時，這莢膜抗原兩者具高度致免疫性。每一莢膜抗原與五種經選擇之基質蛋白結合以生產 10 種不同 PCMV。

PCMV 可測試誘導小鼠中如傳統共軛疫苗所觀察同種型抗體轉變成 IgG 之能力。所有抗原可吸收至鋁佐劑，然後每一 PCMV 製劑處理 5 隻小鼠一組。先測試小鼠餵食前的抗原基本免疫反應。然後，小鼠以標準 IP 注射說明接種三次(第 0、7、14 天)，於初級接種後第 10、20、30 及 60 天收

集血液。小鼠血清以標準 ELISA 分析抗所用之 PS 及載體蛋白之 IgG。在這些實驗中，只接種 PS 之小鼠控制組分析各種 PCMV 製劑誘導抗-PS IgG 之能力，並與應該具差或無致免疫力之非共軛比較。大有可為的 PCMV(即誘導高含量抗 PS 之 IgG)接受更仔細免疫分析，試圖建立小鼠中對於 PCMV 之免疫反應之動力學及劑量反應類型。

另外，大有可為的 PCMV 及它們相對應之控制組可送至商業賣主以生產兔抗血清。執行相似免疫分析以分析兔子中致免疫力、誘導抗體之種類及免疫反應動力學。這些實驗中，該控制組為市售產品 Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.)，為偶合 CRM197(與白喉毒素相關無毒素突變蛋白)之 7 種不同傳統共軛 PS 疫苗的鋁吸收混合物。

可分析以 PCMV 誘導抗體反應之功能。舉例來說，功能可以測量該抗-PS 抗體使莢膜肺炎鏈球菌受調理素作用而造成巨噬細胞吞噬作用(phagocytosis)後殺死細菌之能力。避免動物受肺炎鏈球菌致死攻擊為另一方法說明於 PCMV 接種動物之該疫苗藥效。

實施例 4、PCMV 與 Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.)之比較

測試透過 Merck 由 ATCC 獲得或直接由印度血清機構(SII)獲得之肺炎鏈球菌多醣(pps)6B、14 及 23F 相對潔淨

度。IL-6 表現用作 pps 之潔淨度(cleanliness)而 LPS 作為正“髒”控制組。如第 9A 圖所示，Merck pps6B、14 及 23F 為潔淨，同時，如圖 9B 所示，SII 之 pps 6B 為“髒”的。如第 10 圖所示，處理 2(於 1M NaOH 中 80°C 培育一小時)清除 SII pps 6B。潔淨之 pps 6B 用以比較共軛物及 PCMV 免疫特性。如表 3 所示，該混雜物非 LPS。

表三、多醣之內毒素(Endotoxin)含量分析

多醣	內毒素單位(Endotoxin Units)/mg 多醣
SII pps 6B-無處理	0.75
SII pps 23F-無處理	0.85
SII pps 23F-處理 2	0.24
各種 Merck ppss-無處理	0.1-0.4

圖 11 及 13 顯示 Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.)(為鋁佐劑吸收)誘導抗 pps 6B 之 IgG 抗體，鋁佐劑 PCMV(BSA 及 pps 6B；白喉毒素及 pps 6B；白喉類毒素及 pps 6B；與破傷風毒素及 pps 6B)較好過於 Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.)所觀察之反應。相似地，如第 12 圖所示，對鋁佐劑 PCMV 之 IgM 反應類似 Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.)。

此外，對於 pps 14(Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein],

Wyeth Pharmaceuticals Inc.) 中，最具致免疫性 pps)，如圖 14-16 所示，含白喉類毒素及 pps 14 或破傷風毒素及 pps 14 之鋁佐劑 PCMV 約相當於 Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.) 誘導 IgG 反應。

實施例 5、多價 PCMV

多價免疫抗原採用 PCMV 方法製造，藉由在以戊二醛與 DNI 載體蛋白交聯前，混合化學上不同莢膜有機聚合物一起(一鍋法合成反應(one pot synthetic reaction))。這類三價免疫抗原由三種有機化合物-PGA、藻酸(alginate)及葡聚糖(dextran)，使用 DNI 作為載體蛋白製造而成。這些三價疫苗具致免疫性並產生抗這三種莢膜有機聚合物免疫反應，如圖所示，接種前及 30 天後(圖 6)、接種後 60 天抗原-專一性血清 IgG 抗體效價(圖 7)及接種後 128 天抗-PS 血清抗體效價(圖 8)聚集血清 IgM 分析。亦如圖 6-8 所示，單價藻酸 PCMV 製劑於小鼠中亦產生免疫反應。多價 PCMV 免疫抗原亦可由混合專一性 PCMV 調製，該專一性 PCMV 個別合成，然後最後混合一起製造成“雞尾酒”疫苗。

此處所述或參考於本說明書之所有專利、專利申請案、專利申請公開案及其它公開資料之全部內容結合於此為參考。相同程度地，個別專利、專利申請案、專利申請公開案及其它公開資料特別地與個別地結合於此為參考。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為非限定途徑概要圖，PS 及該載體蛋白破傷風桿菌類毒間產生共軛之共軛疫苗誘導抗-PS IgG 免疫反應。只有 B-細胞結合該 PS-蛋白共軛物，而該 B-細胞顯露出辨識該 PS 之抗體受體。因此，該載體蛋白結合至顯露出正確 PS 結合專一性之 B-細胞表面。

第 2 圖顯示 PCMV 及控制組製劑以 SDS 聚丙烯醯胺膠體電泳及以抗-PA 抗血清西方墨點分析監測交聯之西方墨點分析圖。戊二醛交聯前，DNI 蛋白移動至 84kDa。PCVM1-PCMV3(第 1-3 欄)顯示該 DNI 蛋白大量交聯，由亮帶(band)移動至分子量超過 220kDa 可所說。無 PGA 下，單獨交聯之 DNI 蛋白亦顯示相同高分子量(第 5 欄)。相對地，以 PGA 混合但無以戊二醛處理之 DNI 顯示於 DNI 與共移動或較低分子量之亮帶(第 4 欄)。

第 3 圖顯示用以測量以三種 PCMV 製劑(PCMV1-PCMV3；製劑 1-3)及兩種抗原控制組製劑 4 及 5 接種小鼠中 IgM 及 IgG 專一性抗-DNI 免疫反應之 ELISA 分析結果的圖表。除未與戊二醛(無供應過多)交聯之控制組製劑 4，在所有製劑，該 DNI 蛋白具高度致免疫性。然而，這些 DNI-專一免疫反應專門以 IgG 為基礎。甚至接種第 7 天，無抗-DNI IgM 被偵測到，而顯著抗--DNI IgG 反應可於接種 PCMV 製劑之小鼠及接種只有交聯 DNI(製劑 5)那些第 17 天偵測到。於以所有製劑(包括製劑 4)抗 DNI 第 30 天強增幅反應(booster response)被注意到。

第 4 圖顯示用以測量以三種 PCMV 製劑 (PCMV1-PCMV3；製劑 1-3) 及兩種抗原控制組製劑 4 及 5 接種小鼠中 IgM 專一性抗-PGA 免疫反應之 ELISA 分析結果的圖表。抗-PGA IgM 反應顯示典型莢膜聚合物圖案。控制組製劑 4 第 7 天產生可偵測之抗-PGA IgM 反應，但這反應第 17 天或第 30 天並無增強。所有 PCMV 製劑第 17 天誘導抗-PGA IgM 反應，隨後第 17 天或第 30 天甚至專有產生較強抗-PGA IgM 反應。如期望，控制組製劑 5 (只有交聯 DNI) 不產生 IgM-或 IgG-基礎抗-PGA 反應。

第 5 圖顯示用以測量以三種 PCMV 製劑 (PCMV1-PCMV3；製劑 1-3) 及兩種抗原控制組製劑 4 及 5 接種小鼠中 IgG 專一性抗-PGA 免疫反應之 ELISA 分析結果的圖表。PCMV1-3 (製劑 1-3) 產生強 IgG-基礎抗-PGA 反應，該反應第 17 天出現，隨後第 30 天明顯增強。

第 6 圖顯示接種前，以含 DNI 及藻酸 (DNI-ALG C、DNI ALG A) 及以藻酸 (ALG)、葡聚糖 (DEX) 及 PGA 混合之 DNI “一鍋 (one pot)” 三價 PCMV 接種後 30 天收集血清 IgM 抗體效價之圖表。

第 7 圖顯示以含 DNI 及藻酸 (DNI-ALG C、DNI ALG A) 及以藻酸 (ALG)、葡聚糖 (DEX) 及 PGA 混合之 DNI “一鍋 (one pot)” 三價 PCMV 接種後 60 天抗原-專一性血清 IgM 抗體效價之圖表。

第 8 圖顯示以含 DNI 及藻酸 (DNI-ALG C、DNI ALG A) 及以藻酸 (ALG)、葡聚糖 (DEX) 及 PGA 混合之 DNI “一鍋 (one

pot) ” 三價 PCMV 接種後 128 天抗原-專一性血清 IgG 抗體效價之圖表。

第 9A 及 9B 圖顯示使用自美國菌種保藏中心(ATCC)且 Merck 公司製造或自印度血清機構(SII)肺炎鏈球菌多醣(pss)之 IL-6 分析圖表。

第 10 圖顯示由 SII 獲得之 pss 6B 中混雜物可用處理 2(trt 2; 於 1M NaOH 中 80°C 培育一小時)移除之圖表。處理 1(trt 1)為一系列五次酚萃取由該多醣移除蛋白。

第 11 圖顯示在誘導 IgG 產生有效上, 含 pss 6B 之 PCMV 較 Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.)之圖表。BSA=牛血清白蛋白; DT=白喉毒素; DTx=白喉類毒素; 及 TTx=破傷風毒素。

第 12 圖顯示在誘導 IgM 產生上, 含 pss 6B 之 PCMV 較 Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.)有效之圖表。

第 13 圖顯示含 pss 6B 之 PCMV 較 Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein], Wyeth Pharmaceuticals Inc.)對誘導 IgG 產生有效之圖表。

第 14-16 圖顯示在誘導 IgG 產生上, 含 pss 14 之 PCMV 約等與 Prevnar® (Pneumococcal 7-Valent Conjugate Vaccine [Diphthteria CRM197 Protein], Wyeth

Pharmaceuticals Inc.) 相當 (DTx=白喉類毒素 ; TTx=破傷風毒素)。

【主要元件符號說明】

無。

十、申請專利範圍：

1. 一種疫苗組成物，包括一所要抗原及一載體蛋白基質，其中 (i) 該載體蛋白基質包括共價交聯之多個載體蛋白，(ii) 不超過 50% 之該所要抗原與該些載體蛋白共價交聯，且 (iii) 該抗原被該載體蛋白基質包合形成一複合物。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該複合物的直徑介於 10nm 及 100 μ m 之間。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之疫苗組成物，其中該複合物的直徑介於 100nm 至 100 μ m 之間。

4. 如申請專利範圍第 2 項所述之疫苗組成物，其中該複合物的直徑介於 100nm 至 10 μ m 之間。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該複合物投予哺乳動物時，該複合物引發該哺乳動物 T-細胞決定性免疫反應 (T-cell dependent immune response)。

6. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該抗原與該些載體蛋白之摩耳數比介於 1-10 及 10-1 之間。

7. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該些載體蛋白為一多聚體 (multimer)。

8. 如申請專利範圍第 7 項所述之疫苗組成物，其中該多聚體包括至少 5 個次單體。

9. 如申請專利範圍第 7 項所述之疫苗組成物，其中該多聚體為同型多聚體 (homomultimer)。

10. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該共價交聯包括一離胺酸支鏈初級胺基及天冬胺酸或麩胺酸

支鏈羧基間之胜肽鍵。

11. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該共價交聯包括化學式 $R_n-\overset{\text{CHO}}{\text{C}}-\text{CHO}$ 之化合物，其中 R_n 為 1 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈烷基、1 至 12 個原子之直鏈或支鏈雜烷基、2 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈烯、2 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈炔、5 至 10 個碳原子之芳香殘基 (aromatic residue)、3 至 10 個原子之環狀系統、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 其中 q 為 1 至 4 或鍵結兩個醛基之化學鍵。

12. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該共價交聯包括戊二醛 (glutaraldehyde)、順丁烯酰胺苯甲酸 -N- 琥珀酸酯 (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, MBS)、碳二亞胺 (carbodiimide) 或雙 - 二氮化聯苯胺 (bis-biazotized benzidine)。

13. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該共價交聯包括雙功能交聯劑 (bifunctional cross-linker)。

14. 如申請專利範圍第 13 項所述之疫苗組成物，其中該雙功能交聯劑為戊二醛、辛二酸雙磺基琥珀醯亞胺酯 (bis[sulfosuccinimidyl]suberate) 或己二(亞胺)酸二甲酯 (dimethyl adipimidate)。

15. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該些載體蛋白為白喉毒素 (diphtheria toxin, DT)、白喉類毒素 (diphtheria toxoid)、破傷風毒素 (tetanus toxin)、

破傷風桿菌類毒素、綠膿桿菌外毒素 A (*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A)、霍亂毒素次單元 B (cholera toxin B subunit)、破傷風毒素 C 端片段 (tetanus toxin fragment C, TTFC)、細菌鞭毛蛋白 (bacterial flagellin)、肺炎球菌溶血素 (pneumolysin)、腦膜炎雙球菌 (*Neisseria meningitidis*) 外膜蛋白、綠膿桿菌 Hcp1 蛋白、大腸桿菌不耐熱腸毒素 (*Escherichia coli* heat labile enterotoxin)、類志賀氏毒素 (shiga-like toxin, SLT)、人類 LTB 蛋白、肺炎球菌溶血素 (pneumolysin)、李斯特溶解素 O (listeriolysin O) (或相關蛋白)、整個細菌細胞萃取之蛋白、炭疽桿菌 (*Bacillus anthracis*) 顯著抑制型 (dominant-negative mutant) (DNI) 保護性抗原 (Protective antigen, PA) 或大腸桿菌 β 半乳糖苷酶 (beta-galactosidase)。

16. 如申請專利範圍第 15 項所述之疫苗組成物，其中該整個細菌細胞為綠膿桿菌或鏈球菌細胞。

17. 如申請專利範圍第 15 項所述之疫苗組成物，其中該細菌鞭毛蛋白為霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 鞭毛蛋白。

18. 如申請專利範圍第 15 項所述之疫苗組成物，其中該類志賀氏毒素為志賀氏桿菌 (*Shigella*) SltB2 蛋白。

19. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該所要抗原為一多醣、多元醇或聚胺基酸。

20. 如申請專利範圍第 19 項所述之疫苗組成物，其中該多醣為一肺炎鏈球菌多醣、土拉倫法式菌多醣、炭疽桿

菌多醣、流感嗜血桿菌多醣、傷寒桿菌多醣、沙門氏桿菌屬多醣、志賀氏桿菌多醣或腦膜炎雙球菌多醣。

21. 如申請專利範圍第 20 項所述之疫苗組成物，其中該肺炎鏈球菌多醣為第 3、4、6B、7A、7B、7C、7F、9A、9L、9N、9V、12A、12B、12F、14、15A、15B、15C、15F、17、18B、18C、19F、23F、25A、25F、33F、35、37、38、44、或 46 型莢膜。

22. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該所要抗原為一微生物莢膜聚合物。

23. 如申請專利範圍第 22 項所述之疫苗組成物，其中該微生物莢膜聚合物為炭疽桿菌 (*Bacillus anthracis*) 之聚 γ -D-麩胺酸 (poly- γ -D-glutamic acid)。

24. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該疫苗組成物更包括一第二所要抗原。

25. 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗組成物，其中該疫苗組成物包括多種所要抗原。

26. 一種製造疫苗組成物之方法，包括 (i) 將一所要抗原與多個載體蛋白混合；(ii) 加入一連接劑共價交聯該載體蛋白；以及 (iii) 交聯該些載體蛋白以形成一載體蛋白基質，其中該抗原被該載體蛋白基質包合，其中在該疫苗組成物中，不超過 50% 之該所要抗原與該些載體蛋白共價交聯。

27. 如申請專利範圍第 26 項所述之方法，其中該疫苗組成物更包括一藥學上可接受之賦形劑。

28. 如申請專利範圍第 26 項所述之方法，其中在該疫苗組成物中，該抗原及該載體蛋白之摩耳數比介於 1-10 及 10-1 之間。

29. 如申請專利範圍第 26 項所述之方法，其中該載體蛋白為白喉毒素、白喉類毒素、破傷風毒素、破傷風桿菌類毒素、綠膿桿菌外毒素 A、霍亂毒素次單元 B、破傷風毒素 C 端片段、細菌鞭毛蛋白、肺炎球菌溶血素、李斯特溶解素 O、腦膜炎雙球菌外膜蛋白、綠膿桿菌 Hcp1 蛋白、大腸桿菌不耐熱腸毒素、類志賀氏毒素、人類 LTB 蛋白、整個細菌細胞(萃取之蛋白、炭疽桿菌顯著抑制型(DNI)保護性抗原或大腸桿菌 β 半乳糖苷酶。

30. 如申請專利範圍第 26 項所述之方法，其中該所要抗原為一多醣、多元醇或聚胺基酸。

31. 如申請專利範圍第 30 項所述之方法，其中該多醣為一肺炎鏈球菌多醣、土拉倫法式菌多醣、炭疽桿菌多醣、流感嗜血桿菌多醣、傷寒桿菌多醣、志賀氏桿菌多醣、沙門氏桿菌屬多醣或腦膜炎雙球菌多醣。

32. 如申請專利範圍第 31 項所述之方法，其中該肺炎鏈球菌多醣為第 3、4、6B、7A、7B、7C、7F、9A、9L、9N、9V、12A、12B、12F、14、15A、15B、15C、15F、17、18B、18C、19F、23F、25A、25F、33F、35、37、38、44、或 46 型莢膜。

33. 如申請專利範圍第 26 項所述之方法，其中該所要抗原為一微生物莢膜聚合物。

34. 如申請專利範圍第 33 項所述之方法，其中該微生物莢膜聚合物為炭疽桿菌 (*Bacillus anthracis*) 之聚 γ -D-麩胺酸 (poly-gamma-D-glutamic acid)。

35. 如申請專利範圍第 26 項所述之方法，更包括包合一第二所要抗原。

36. 如申請專利範圍第 35 項所述之方法，其中該載體蛋白包合多種所要抗原。

37. 如申請專利範圍第 26 項所述之方法，其中該共價交聯包括一雙功能交聯劑。

38. 如申請專利範圍第 37 項所述之方法，其中該雙功能交聯劑為戊二醛、辛二酸雙磺基琥珀醯亞胺酯或己二(亞胺)酸二甲酯。

39. 如申請專利範圍第 26 項所述之方法，其中該連接劑為一化學式 $R_n-\overset{\text{CHO}}{\text{C}}$ 之化合物，其中 R_n 為 1 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈烷基、1 至 12 個原子之直鏈或支鏈雜烷基、2 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈烯、2 至 12 個碳原子之直鏈或支鏈炔、5 至 10 個碳原子之芳香殘基、3 至 10 個原子之環狀系統、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_q\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 其中 q 為 1 至 4 或鍵結兩個醛基之化學鍵。

40. 一種申請專利範圍第 1 項之疫苗組成物的用途，其係用於製備用以誘導受試者對抗該所要抗原的免疫反應之藥物。

41. 如申請專利範圍第 40 項所述之用途，其中該免疫反應足以預防或降低該受試者因致病因子之感染。