



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201350129 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：102129217

(22)申請日：中華民國 95 (2006) 年 12 月 20 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/09 (2006.01)

A61K39/116 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

(30)優先權：2005/12/22

英國

0526232.4

2006/04/07

英國

0607087.4

2006/04/07

英國

0607088.2

2006/05/18

英國

0609902.2

2006/10/12

英國

0620336.8

2006/10/12

英國

0620337.6

2006/10/19

英國

0620815.1

2006/10/19

英國

0620816.9

2006/12/12

世界智慧財產權組織

PCT/GB2006/004634

(71)申請人：葛蘭素史密斯克藍生物品公司 (比利時) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S. A.
(BE)

比利時

(72)發明人：比曼斯 洛夫 李昂 BIEMANS, RALPH LEON (BE)；嘉桑 奈特莉 瑪麗 約瑟芬 GARCON, NATHALIE MARIE-JOSEPHE (FR)；何曼德 菲利浦 文生 HERMAND, PHILIPPE VINCENT (BE)；普爾門 珍 POOLMAN, JAN (NL)；麥琪倫 馬席兒 寶麗特 凡 VAN MECHELEN, MARCELLE PAULETTE (BE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：10 共 88 頁

(54)名稱

包含荚膜糖結合物之肺炎鏈球菌免疫原組合物、包含其之疫苗及套組及其用途

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE IMMUNOGENIC COMPOSITION COMPRISING CAPSULAR SACCHARIDE CONJUGATES, VACCINE AND KIT COMPRISING THE SAME AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於肺炎球菌荚膜糖結合物疫苗領域。具體而言，所提供之多價肺炎鏈球菌免疫原組合物具有與 2 種或 2 種以上不同載體蛋白質結合之來自不同肺炎鏈球菌血清型的多種經結合荚膜糖，其中該組合物包含與白喉類毒素(DT)或 CRM197 結合之血清型 19F 荚膜糖，視情況其中 19F 為該組合物中唯一與白喉類毒素(DT)或 CRM197 結合之糖。

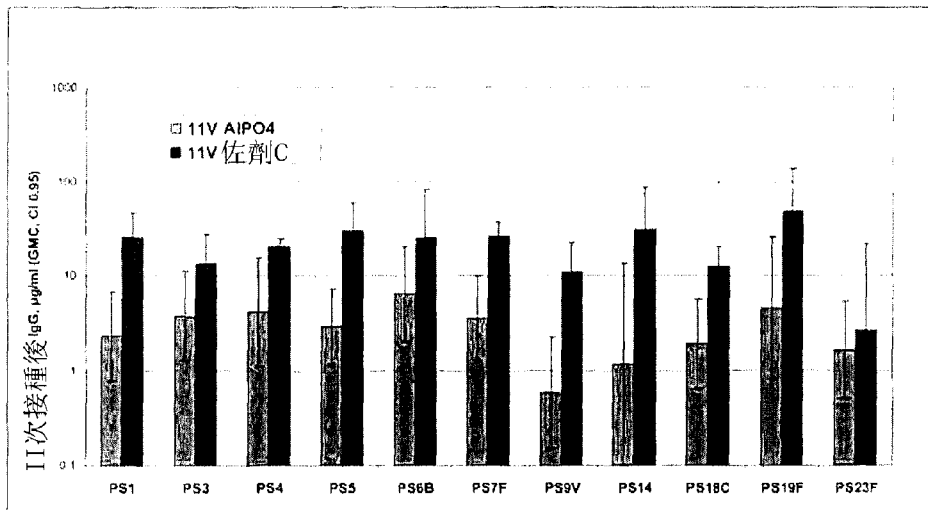


圖 1



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201350129 A

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：102129217

(22)申請日：中華民國 95 (2006) 年 12 月 20 日

(51)Int. Cl.：

A61K39/09 (2006.01)

A61K39/116 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

(30)優先權：2005/12/22

英國

0526232.4

2006/04/07

英國

0607087.4

2006/04/07

英國

0607088.2

2006/05/18

英國

0609902.2

2006/10/12

英國

0620336.8

2006/10/12

英國

0620337.6

2006/10/19

英國

0620815.1

2006/10/19

英國

0620816.9

2006/12/12

世界智慧財產權組織

PCT/GB2006/004634

(71)申請人：葛蘭素史密斯克藍生物品公司 (比利時) GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S. A.
(BE)

比利時

(72)發明人：比曼斯 洛夫 李昂 BIEMANS, RALPH LEON (BE)；嘉桑 奈特莉 瑪麗 約瑟芬 GARCON, NATHALIE MARIE-JOSEPHE (FR)；何曼德 菲利浦 文生 HERMAND, PHILIPPE VINCENT (BE)；普爾門 珍 POOLMAN, JAN (NL)；麥琪倫 馬席兒 寶麗特 凡 VAN MECHELEN, MARCELLE PAULETTE (BE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：16 項 圖式數：10 共 88 頁

(54)名稱

包含荚膜糖結合物之肺炎鏈球菌免疫原組合物、包含其之疫苗及套組及其用途

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE IMMUNOGENIC COMPOSITION COMPRISING CAPSULAR SACCHARIDE CONJUGATES, VACCINE AND KIT COMPRISING THE SAME AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明係關於肺炎球菌荚膜糖結合物疫苗領域。具體而言，所提供之多價肺炎鏈球菌免疫原組合物具有與 2 種或 2 種以上不同載體蛋白質結合之來自不同肺炎鏈球菌血清型的多種經結合荚膜糖，其中該組合物包含與白喉類毒素(DT)或 CRM197 結合之血清型 19F 荚膜糖，視情況其中 19F 為該組合物中唯一與白喉類毒素(DT)或 CRM197 結合之糖。

發明摘要

※ 申請案號：102129217(由95148075分割)

※ 申請日：95-12-20 ※IPC 分類：A61K 39/09 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

【發明名稱】

包含莢膜醣結合物之肺炎鏈球菌免疫原組合物、包含其之疫苗及套組及其用途

【中文】

● 本發明係關於肺炎球菌莢膜醣結合物疫苗領域。具體而言，所提供之多價肺炎鏈球菌免疫原組合物具有與2種或2種以上不同載體蛋白質結合之來自不同肺炎鏈球菌血清型的多種經結合莢膜醣，其中該組合物包含與白喉類毒素(DT)或CRM197結合之血清型19F莢膜醣，視情況其中19F為該組合物中唯一與白喉類毒素(DT)或CRM197結合之醣。

【英文】

無

●

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無元件符號說明）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

包含莢膜醣結合物之肺炎鏈球菌免疫原組合物、包含其之疫苗及套組及其用途

【技術領域】

本發明係關於一種經改良之肺炎鏈球菌疫苗。

【先前技術】

2歲以下的兒童對大部分多醣疫苗不發起免疫反應，因此必須藉由與蛋白質載體化學結合來使得多醣具有免疫原性。使多醣(非T依賴性抗原)與蛋白質(T依賴性抗原)偶合賦予多醣以T依賴性性質，其包括同種型轉換、親和力成熟及記憶誘導。

然而在重複投予多醣-蛋白質結合物或多醣-蛋白質結合物之組合以形成多價疫苗的情況下會產生問題。舉例而言，已報導在根據標準嬰兒疫苗注射時程以(游離)TT及肺炎球菌多醣-TT結合物疫苗進行免疫的情況下，在某一劑量範圍內測試以破傷風類毒素(TT)作為載體蛋白質之B型嗜血性流感桿菌多醣(PRP)疫苗。隨著肺炎球菌疫苗之劑量增加，對Hib結合物疫苗之PRP多醣部分的免疫反應降低，其指示可能經由使用相同的載體蛋白質使多醣之免疫受干擾(Dagan等人，*Infect Immun.* (1998)；66：2093-2098)。

亦已證明載體-蛋白質之劑量對於針對蛋白質本身之體液反應的影響具有多面性。據報導，在人類嬰兒中，四價破傷風類毒素結合物劑量之增加導致對破傷風載體的反應降低(Dagan等人如上所述)。組合疫苗之該等作用的傳統分析描述為由載體誘導之抗原決定基抑制，儘管尚未完全瞭解，但咸信其係源於載體蛋白質之過量(Fattom, *Vaccine*

17:126 (1999))。其似乎導致B細胞與Th細胞競爭載體蛋白質及B細胞與Th細胞競爭多醣。若載體蛋白質與B細胞間之作用佔優勢，則無法得到足夠的Th細胞而提供對於多醣特異之B細胞必要的幫助。然而，所觀察到的免疫學效應不一致，在某些情況下載體蛋白質總量增加免疫反應，而在其他情況下減弱免疫反應。

因此，在將多種多醣結合物組合成單一有效的疫苗調配物時仍存在技術困難。

肺炎鏈球菌為一種革蘭氏陽性細菌(Gram-positive bacterium)，其導致(尤其幼兒及老人)可觀的發病率及死亡率，引起諸如肺炎、菌血症及腦膜炎之侵襲性疾病及諸如急性中耳炎之寄生相關疾病。據估計，在美國60歲以上人之肺炎球菌肺炎比率為每100,000人3至8例。即使在抗生素治療下，在20%的病例中，其導致菌血症及諸如腦膜炎之其他表現形式，且死亡率接近30%。

用賦予其血清型特異性之經化學鍵聯的多醣來將肺炎球菌封入莢膜內。存在90種已知之肺炎球菌血清型，且莢膜為肺炎球菌之主要毒性決定因子，此係由於莢膜不僅保護細菌之內表面使其免受補體作用，且其本身具不良之免疫原性。多醣為非T依賴性抗原，且無法經由T細胞處理或展現於MHC分子上而與T細胞發生相互作用。然而其可經由包括B細胞上之表面受體交聯的替代性機制來刺激免疫系統。

在若干實驗中展示，抵擋侵入性肺炎球菌疾病之保護與對莢膜特異之抗體最強烈相關，且該保護具有血清型特異性。

肺炎鏈球菌為嬰兒及幼童之侵入性細菌疾病及中耳炎的最常見病因。同樣，老年人對肺炎球菌疫苗會產生不良的反應[Roghmann等人，(1987), J. Gerontol. 42: 265-270]，因此導致該群人口中細菌性肺炎發生率之增加[Verghese及Berk, (1983) Medicine (Baltimore) 62: 271-285]。

由肺炎鏈球菌所引起的主要臨床症候群廣泛爲人所瞭解且在所有標準醫學教科書中(Fedson DS, Muscher DM: Plotkin SA, Orenstein WA編, Vaccines, 第4版。Philadelphia WB Saunders Co, 2004a: 529-588)得以論述。舉例而言, 將侵入性肺炎球菌疾病(IPD)定義爲任何其中肺炎鏈球菌自血液或另一正常無菌位點分離的感染(Musher DM. Streptococcus pneumoniae. Mandell GL, Bennett JE Dolin R (編). Principles and Practice of Infectious diseases (第5版). New York Churchill Livingstone, 2001, 第2128-2147頁)。認爲慢性阻塞性肺病(COPD)包涵通常共存的若干病狀(氣道阻塞、慢性支氣管炎、細支氣管炎或細氣管疾病及肺氣腫)。患者遭受通常與增加之氣喘相關之病狀惡化, 且通常具有增加之會產生黏液或膿性痰的咳嗽(Wilson, Eur Respir J 2001 17: 995-1007)。COPD生理上係由患有慢性支氣管炎及/或肺氣腫之患者之不可逆或部分可逆的氣道阻塞之存在而定義(Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. American Thoracic Society. Am J Respir Crit Care Med. 1995年11月; 152 (5 Pt 2): S77-121)。COPD之惡化通常由細菌(例如肺炎球菌)感染引起(Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease (2000年): a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev. 2001年4月; 14(2): 336-63)。

因此, 本發明之一目標爲開發一種改良之多血清型肺炎鏈球菌多醣結合物疫苗之調配物。

【發明內容】

本發明提供一種改良之肺炎鏈球菌疫苗, 其包含與2種或2種以上載體蛋白質結合之不同肺炎鏈球菌血清型的10種或10種以上(例如11、12、13、14或15或15以上)莢膜醣, 其中該疫苗包含與白喉類毒素或CRM197結合之血清型19F莢膜醣, 且其中該疫苗視情況進一步包含

作為游離蛋白質或作為其他載體蛋白質或兩者之嗜血性流感桿菌蛋白D。

出於本發明之目的，"使人類宿主免疫而抵擋COPD之惡化"或"治療或預防COPD之惡化"或"降低COPD惡化之嚴重性"係指在(例如)用本發明之組合物或疫苗免疫之患者群中降低COPD惡化之發生率或比率(例如減少0.1%、0.5%、1%、2%、5%、10%、20%或以上之比率)或降低如上定義之COPD惡化嚴重性。

通常本發明之肺炎鏈球菌疫苗將包含莢膜醣抗原(較佳經結合)，其中該等醣係源於至少十種肺炎鏈球菌血清型。肺炎鏈球菌莢膜醣之數目在10種不同血清型(或"V"，價)至23種不同血清型(23V)範圍內。在一實施例中，存在10、11、12、13、14或15種不同血清型。在本發明之另一實施例中，疫苗可包含經結合之肺炎鏈球菌醣及未經結合之肺炎鏈球菌醣。較佳地，醣血清型之總數小於或等於23。舉例而言，本發明可包含10種經結合之血清型及13種未經結合之醣。類似地，疫苗可分別包含11、12、13、14、15或16種經結合之醣及12、11、10、9、8或7種未經結合之醣。

在一實施例中，本發明之多價肺炎球菌疫苗將選自下列血清型：1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F及33F，但應瞭解，視接受疫苗之接受者年齡及投予疫苗之地理位置而定，一或兩種其他血清型可經取代，例如列表中可包括血清型6A。舉例而言，10價疫苗可包含血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F及23F之多醣。11價疫苗亦可包括血清型3之醣。12價或13價兒科(嬰兒)疫苗亦可包括用血清型6A及19A，或6A及22F，或19A及22F，或6A及15B，或19A及15B，或22F及15B補充之10價或11價調配物，其中13價老人用疫苗可包括以血清型19A及22F、8及12F，或8及15B，或8及19A，或8及22F，或12F及15B，

或12F及19A，或12F及22F，或15B及19A，或15B及22F補充之11價調配物。14價兒科疫苗可包括如上所述之以血清型3、6A、19A及22F；血清型6A、8、19A及22F；血清型6A、12F、19A及22F；血清型6A、15B、19A及22F；血清型3、8、19A及22F；血清型3、12F、19A及22F；血清型3、15B、19A及22F；血清型3、6A、8及22F；血清型3、6A、12F及22F；或血清型3、6A、15B及22F補充的10價調配物。

在一實施例中組合物包括源於血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F及23F之莢膜醣(較佳經結合)。在本發明之另一實施例中，其包括至少11種醣抗原(較佳經結合)，例如源於血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F及23F之莢膜醣。在本發明之另一實施例中，其包括至少12或13種醣抗原，例如疫苗可包含源於血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F及23F之莢膜醣或衍生自血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F及23F之莢膜醣，但其他醣抗原(例如23價)(諸如血清型1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F及33F)亦涵蓋於本發明中。

本發明之疫苗可包含嗜血性流感桿菌之蛋白D(PD)(例如參看EP 0594610)。嗜血性流感桿菌為中耳炎之關鍵致病生物體，且本發明者已展示肺炎鏈球菌疫苗中包括此蛋白將提供一定程度之對嗜血性流感桿菌相關的中耳炎之防護(參看POET公開案)。在一實施例中，疫苗組合物包含蛋白D。在一態樣中PD作為一或多種醣之載體蛋白質存在。在另一態樣中，蛋白D可作為游離蛋白質存在於疫苗組合物中。在其他態樣中，蛋白D作為載體蛋白質與游離蛋白質而存在。蛋白D可作為全長蛋白質或片段使用(WO0056360)。在其他態樣中，蛋白D作為多數醣之載體蛋白質存在，例如6、7、8、9或9個以上醣可與蛋白D結合。在此態樣中，蛋白D亦可作為游離蛋白質存在。

本發明之疫苗包含兩種或兩種以上不同類型之載體蛋白質。各類型之載體蛋白質可充當一種以上醣之載體，其中醣可相同或不同。舉例而言，血清型3及4可與相同載體蛋白質結合，其可與載體蛋白質之相同分子或相同載體蛋白質之不同分子結合。在一實施例中，兩種或兩種以上不同醣可與相同載體蛋白質結合，其可與載體蛋白質之相同分子或相同載體蛋白質之不同分子結合。

各肺炎鏈球菌莢膜醣可與獨立地選自由下列物組成之群的載體蛋白質結合：TT、DT、CRM197、TT之片段C、PhtD、PhtDE融合體(尤其彼等WO 01/98334及WO 03/54007中所述者)、經解毒之肺炎球菌溶血素及蛋白D，而非血清型19F醣，其往往與DT或CRM 197 (較佳DT)結合。以下呈現可用於本發明之結合物中之更完善的蛋白質載體列表。

若組合物中2種或2種以上醣之蛋白質載體相同，則該等醣可與相同蛋白質載體分子(載體分子具有另2種不同的醣與之結合)結合[參看例如WO 04/083251]。或者醣可各自分別地與蛋白質載體的不同分子結合(各蛋白質載體分子僅具有一種類型與之結合的醣)。

與本發明之免疫原組合物中所存在之結合物中的一或多種肺炎鏈球菌莢膜醣結合之載體蛋白質視情況為聚組胺酸三聯體家族(Pht)蛋白、其片段或融合蛋白的成員。PhtA、PhtB、PhtD或PhtE蛋白之胺基酸序列可與WO 00/37105或WO 00/39299所揭示之序列(例如WO 00/37105之PhtD之SEQ ID NO：4胺基酸序列1-838或21-838)共用80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%同一性。舉例而言，融合蛋白包含具有2、3或4個PhtA、PhtB、PhtD、PhtE的全長或片段。融合蛋白之實例為PhtA/B、PhtA/D、PhtA/E、PhtB/A、PhtB/D、PhtB/E、PhtD/A、PhtD/B、PhtD/E、PhtE/A、PhtE/B及PhtE/D，其中蛋白質在首次提及之情況下在N端鍵聯(參看例如WO 01/98334)。

在(單獨或作為部分融合蛋白)使用Pht蛋白片段的情況下，各片段

視情況含有一或多種組胺酸三聯體基元及/或該等多肽之捲曲螺旋區域。組胺酸三聯體基元為具有序列HxxHxH之多肽部分，其中H為組胺酸且x為除組胺酸以外之胺基酸。捲曲螺旋區域為由"螺旋"算法預測之區域，Lupus A等人(1991) Science 252: 1162-1164。在一實施例中，該片段或各片段包括一或多個組胺酸三聯體基元以及至少一個捲曲螺旋區域。在一實施例中，該片段或各片段含有恰好或至少2、3、4或5個組胺酸三聯體基元(視情況其2個或2個以上三聯體之間的天然Pht序列或與天然肺炎球菌內部三聯體Pht序列(例如WO 00/37105之SEQ ID NO:4所示之PhtD內部三聯體序列)具有50%、60%、70%、80%、90%以上或100%之同一性的內部三聯體序列。在一實施例中，該片段或各片段含有恰好或至少2、3或4個捲曲螺旋區域。在一實施例中，本文揭示之Pht蛋白包括附接有信號序列之全長蛋白、移除信號肽(例如N端之20個胺基酸)之成熟全長蛋白、天然出現之Pht蛋白變體及Pht蛋白之免疫原片段(例如如上所述之片段或包含來自WO 00/37105或WO 00/39299中一胺基酸序列之至少15或20個相鄰胺基酸的多肽，其中該多肽能夠引發對WO 00/37105或WO 00/39299中之該胺基酸序列特異的免疫反應)。

具體而言，如本文使用之術語"PhtD"包括附接有信號序列之全長蛋白、移除信號肽(例如N端之20個胺基酸)之成熟全長蛋白、天然出現之PhtD變體及PhtD之免疫原片段(例如如上所述之片段或包含來自WO 00/37105或WO 00/39299中一PhtD胺基酸序列之至少15或20個相鄰胺基酸的多肽，其中該多肽能夠引發對WO 00/37105或WO 00/39299中之該PhtD胺基酸序列(例如WO 00/37105之PhtD的SEQ ID NO:4)特異的免疫反應。

若組合物中2種或2種以上醣之蛋白質載體相同，則該等醣可與相同蛋白質載體分子(載體分子具有另2種不同的醣與之結合)結合[參看

例如WO 04/083251]。或者醣可各自分別地與蛋白質載體的不同分子結合(各蛋白質分子僅具有一種類型與之結合的醣)。

可用於本發明中之載體蛋白質的實例為DT(白喉類毒素)、TT(破傷風毒素)或TT之片段C、DT CRM197(DT突變體)其他DT點突變體，諸如CRM176、CRM228、CRM 45 (Uchida等人J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973); CRM 9、CRM 45、CRM 102、CRM 103及CRM 107及Nicholls及Youle於Genetically Engineered Toxins(Frankel Maecel Dekker Inc編，1992)中所述之其他突變；Glu-148至Asp、Gln或Ser及/或Ala 158至Gly之缺失或突變及US 4709017或US 4950740中揭示之其他突變；至少一或多種殘基Lys 516、Lys 526、Phe 530及/或Lys 534之突變及US 5917017或US 6455673中揭示之其他突變；或US 5843711中揭示之片段、肺炎球菌肺炎球菌溶血素(Kuo等人(1995) Infect Immun 63; 2706-13)，其包括以某種方式解毒之PLY，例如dPLY-GMBS(WO 04081515、PCT/EP2005/010258)或dPLY-甲醛、PhtX，其包括PhtA、PhtB、PhtD、PhtE及Pht蛋白之融合體，例如PhtDE融合體、PhtBE融合體(WO 01/98334及WO 03/54007)、(以下更詳細描述Pht A-E)OMPC(腦膜炎球菌外部膜蛋白-通常萃取自腦膜炎奈瑟氏菌(*N. meningitidis*)血清群B-EP0372501)、PorB(來自腦膜炎奈瑟氏菌)、PD(嗜血性流感桿菌蛋白D-參看例如EP 0 594 610 B)或其免疫功能等價物、合成肽(EP0378881、EP0427347)、熱休克蛋白質(WO 93/17712、WO 94/03208)、百日咳蛋白(WO 98/58668、EP0471177)、細胞因子、淋巴激活素、生長因子或激素(WO 91/01146)、人造蛋白，其包含來自多種病原體衍生之抗原的多種人類CD4+T細胞決定基(Falugi等人(2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824)，諸如N19蛋白(Baraldoi等人(2004) Infect Immun 72; 4884-7)肺炎球菌表面蛋白PspA (WO 02/091998)，鐵攝入蛋白(WO 01/72337)，難養芽胞梭菌(*C. difficile*)之毒素A或B (WO

00/61761)。

Nurkka 等人之 *Pediatric Infectious Disease Journal*. 23(11) : 1008-14, 2004年11月描述一種所有血清型均與PD結合之11價肺炎球菌疫苗。然而本發明者已展示，相較19F與PD相結合之結合物，以19F與DT相結合之結合物誘導的抗體調理吞噬活性得以改良。此外，本發明者已展示在19F與DT結合的情況下可見對19A較大之交叉反應性。因此，本發明之組合物的特徵為血清型19F與DT或CRM 197結合。在一態樣中，血清型19F係與DT結合。免疫原組合物之其餘醣血清型均可與一或多種非DT之載體蛋白質結合(亦即僅19F與DT結合)，或可在一或多種非DT之載體蛋白質及DT本身之間劃分。在一實施例中，19F與DT或CRM 197結合，且所有其餘血清型與PD結合。在另一實施例中，19F與DT或CRM 197結合，且其餘血清型在PD及TT或DT或CRM 197之間劃分。在另一實施例中，19F與DT或CRM 197結合，且不超過一種醣與TT結合。在本實施例之一態樣中，該一種醣為18C或12F。在另一實施例中，19F與DT或CRM 197結合且不超過兩種醣與TT結合。在另一實施例中，19F與DT或CRM 197結合，且其餘血清型在PD、TT及DT或CRM 197之間劃分。在另一實施例中，19F與DT或CRM 197結合，且其餘血清型在PD、TT及肺炎球菌溶血素之間劃分。在另一實施例中，19F與DT或CRM 197結合，且其餘血清型在PD、TT及CRM 197之間劃分。在另一實施例中，19F與DT或CRM197結合，且其餘血清型在PD、TT、肺炎球菌溶血素及視情況PhtD或PhtD/E融合蛋白之間劃分。在另一實施例中，19F與DT或CRM 197結合，19A與肺炎球菌溶血素或TT結合，另一種(兩種或三種)醣與TT結合，另一種醣與PhtD或PhtD/E結合，且所有另外的醣與PD結合。在另一實施例中，19F與DT或CRM 197結合，19A與肺炎球菌溶血素結合，另一種(兩種或三種)醣與TT結合，另一種醣與肺炎球菌溶血素結合，另2種醣與PhtD或PhtD/E結合，

且所有另外的醣與PD結合。

在一實施例中，本發明之免疫原組合物包含嗜血性流感桿菌之蛋白D。在此實施例中，若PD並非用於結合除19F以外之任何醣的載體蛋白質之一(例如19F與DT結合而其他血清型與一或多種非PD之不同載體蛋白質結合)，則接著PD將作為游離蛋白質存在於疫苗組合物中。若PD為用於結合除19F以外之醣的載體蛋白質之一，則接著PD可視情況作為游離蛋白質存在於疫苗組合物中。

遍及本說明書之術語"醣"可表示多醣或寡醣且包括兩者。多醣與細菌隔離且可藉由已知方法(參看例如EP497524及EP497525)且較佳藉由微流化在某種程度上對其加以裁切尺寸。可裁切多醣尺寸以便降低多醣樣品之黏度及/或改良經結合產品之可濾性。寡醣具有少量重複單元(通常5-30個重複單元)且通常為經水解之多醣。

肺炎鏈球菌之莢膜多糖包含重複寡醣單元，其可含有至多8個糖殘基。對於關鍵肺炎鏈球菌血清型之寡醣單元的論述參看JONES Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. An. Acad. Bras. Ciênc. 2005年6月，第77卷第2期，第293-324頁。ISSN 0001-3765。在一實施例中，莢膜醣抗原可為全長多醣，然而在其他實施例中，其可為一個寡醣單元或比天然長度短的重複寡醣單元醣鏈。在一實施例中，疫苗中存在之所有醣均為多醣。全長多醣可經"裁切尺寸"，亦即可藉由多種方法來減小其尺寸，諸如酸水解處理、過氧化氫處理、藉由emulsiflex®加以裁切尺寸，隨後過氧化氫處理以產生寡醣片段或微流化。

本發明者亦注意此項技術之焦點為使用寡醣來簡化結合物之生產。本發明者發現，藉由使用天然或經略微裁切尺寸之多醣結合物，可實現一或多種下列有利之處：1)具有高免疫原性之可濾結合物，2)可改變結合物中多醣與蛋白質之比使得可增加結合物中多醣與蛋白質

之比(w/w)(其可對載體之抑制作用起作用)，3)藉由使用較大的醣來結合可使傾向於水解之免疫原結合物穩定。使用較大之多醣會導致與結合物載體更多的交聯且會減少游離醣自結合物之釋放。先前技術中所述之結合物疫苗趨於在多醣結合之前使之解聚以便改良結合。本發明者發現保持較大醣尺寸之醣結合物疫苗可提供良好的抵擋肺炎球菌疾病之免疫反應。

因此本發明之免疫原組合物可包含一或多種醣結合物，其中各醣在結合之前之平均尺寸(例如重量平均分子量；Mw)高於80 kDa、100 kDa、200 kDa、300 kDa、400 kDa、500 kDa或1000 kDa。在一實施例中，本發明之一或多種醣結合物結合前之醣平均尺寸應為50 kDa-1600 kDa、80 kDa-1400 kDa、100 kDa-1000 kDa、150 kDa-500 kDa或200 kDa-400 kDa (請注意，若平均尺寸為Mw，則本文中應以' $\times 10^3$ '替代' kDa '單位)。在一實施例中，結合後之結合物應易於濾過0.2微米之過濾器使得過濾後獲得相較於過濾前樣品50%、60%、70%、80%、90%或95%以上之產率。

出於本發明之目的，"天然多醣"係指未經受以減小醣尺寸為目的之製程(例如後純化)的醣。在常規純化程序期間多醣尺寸可變得略微減小。該醣仍為天然的。僅當多醣已接受裁切尺寸技術時，才認為該多醣為非天然。

出於本發明之目的，"以至多 $\times 2$ 之因數裁切尺寸"意謂使醣經受減小多醣尺寸之製程，但仍使尺寸保持大於天然多醣尺寸之一半。應以相同之方式來理解 $\times 3$ 、 $\times 4$ 等，亦即使醣經受減小多醣尺寸之製程但仍使尺寸保持大於天然多醣尺寸之三分之一、四分之一等。

在本發明之一態樣中，免疫原組合物包含與載體蛋白質結合之至少10種血清型的肺炎鏈球菌醣，其中至少1、2、3、4、5、6、7、8、9種或各肺炎鏈球菌醣均為天然多醣。

在本發明之一態樣中，免疫原組合物包含與載體蛋白質結合之至少10種血清型的肺炎鏈球菌醣，其中至少1、2、3、4、5、6、7、8、9種或各肺炎鏈球菌醣均由至多 $\times 2$ 、 $\times 3$ 、 $\times 4$ 、 $\times 5$ 、 $\times 6$ 、 $\times 7$ 、 $\times 8$ 、 $\times 9$ 或 $\times 10$ 之因數加以裁切尺寸。在此態樣之一實施例中，大多數醣，例如6、7、8或8種以上醣由至多 $\times 2$ 、 $\times 3$ 、 $\times 4$ 、 $\times 5$ 、 $\times 6$ 、 $\times 7$ 、 $\times 8$ 、 $\times 9$ 或 $\times 10$ 之因數加以裁切尺寸。

本文中醣之分子量或平均分子量(或尺寸)係指在結合前量測且藉由MALLS所量測之醣的重量平均分子量(M_w)。

MALLS技術在此項技術中已熟知且通常如實例2中所述來執行。為進行肺炎球菌醣之MALLS分析，可使用組合之兩個柱(TSKG6000及5000PW $\times 1$)，且使醣於水中溶離。使用光散射偵測器(例如配備488 nm 10 mW氬雷射器之Wyatt Dawn DSP)及干涉量測(interferometric)折射器(例如配備P100元件及498 nm紅色濾光片之Wyatt Otilab DSP)來偵測醣。

在一實施例中，肺炎鏈球菌醣為天然多醣或在常規萃取過程期間尺寸減小之天然多醣。

在一實施例中，藉由機械斷裂(例如藉由微流化或超音波處理)來裁切肺炎鏈球菌醣尺寸。微流化及超音波處理具有下列有利之處：其充分減小較大天然多醣之尺寸使得提供可濾結合物。以不超過 $\times 20$ 、 $\times 10$ 、 $\times 8$ 、 $\times 6$ 、 $\times 5$ 、 $\times 4$ 、 $\times 3$ 或 $\times 2$ 之因數進行尺寸裁切。

在一實施例中，免疫原組合物包含由天然多醣與由不超過 $\times 20$ 之因數裁切尺寸之醣的混合物製成的肺炎鏈球菌結合物。在本實施例之一態樣中，大多數醣(例如6、7、8或8種以上醣)係以至多 $\times 2$ 、 $\times 3$ 、 $\times 4$ 、 $\times 5$ 或 $\times 6$ 之因數加以裁切尺寸。

在一實施例中，肺炎鏈球菌醣經由鍵聯劑(例如雙官能鍵聯劑)與載體蛋白質結合。鍵聯劑視情況具有異雙官能度或同雙官能度，其具

有(例如)一反應性胺基及一反應性羧酸基，兩個反應性胺基或兩個反應性羧酸基。鍵聯劑具有(例如)4與20個之間、4與12個之間、5與10個之間的碳原子。一種可能的鍵聯劑為ADH。其他鍵聯劑包括B-丙醯胺基(WO 00/10599)、硝苯乙胺(Gever等人(1979) *Med. Microbiol. Immunol.* 165 ; 171-288)，鹵基烷基鹵化物(US4057685)，糖苷鍵(US4673574, US4808700)，己二胺及6-胺基己酸(US4459286)。在一實施例中，ADH係用作供結合血清型18C之醣的鍵聯劑。在一實施例中，ADH係用作供結合血清型22F之醣的鍵聯劑。

本發明之免疫原組合物中所存在的醣結合物可藉由任何已知之偶合技術製備。結合方法可依靠用1-氰基-4-二甲基胺基吡錠四氟硼酸鹽(CDAP)使醣活化形成氰酸酯。因此，經活化之醣可直接或經由間隔基(鍵聯劑)與載體蛋白質上之胺基偶合。舉例而言，間隔基可為肱胺或半肱胺以得到硫醇化多醣，其可經由與經順丁烯二醯亞胺活化之載體蛋白質(例如使用GMBS)或鹵基乙醯化載體蛋白質(例如使用碘基乙醯亞胺[例如鹽酸乙基碘基乙醯亞胺]或N-琥珀醯亞胺溴乙酸酯或SIAB，或SIA或SBAP)反應後獲得之硫醚鍵與載體偶合。較佳地，氰酸酯(視情況由CDAP化學製備)與己二胺或ADH偶合，且使用碳化二亞胺(例如EDAC或EDC)化學經由蛋白質載體上之羧基使胺基衍化之醣與載體蛋白質結合。該等結合物在PCT公開申請案WO 93/15760 Uniformed Services University及WO 95/08348及WO 96/29094中得以描述。

其他適當之技術使用碳化二亞胺、醯肼、活性酯、降硼烷、對硝基苯甲酸、N-羥基丁二醯亞胺、S-NHS、EDC、TSTU。許多在WO 98/42721中得以描述。結合可涉及羧基鍵聯劑，其可由醣之游離羥基與CDI反應(Bethell等人*J. Biol. Chem.* 1979, 254 ; 2572-4, Hearn等人*J. Chromatogr.* 1981. 218 ; 509-18)隨後與蛋白質反應形成胺基甲酸酯鍵

而形成。其可涉及變旋異構端至伯羥基(primary hydroxyl)之還原、伯羥基與CDI形成CDI胺基甲酸酯中間體及使CDI胺基甲酸酯中間體與蛋白質上之胺基偶合的可選伯羥基保護/去保護反應。

結合物亦可藉由如 US 4365170 (Jennings) 及 US 4673574 (Anderson)中所述之直接還原胺化法來製備。EP-0-161-188, EP-208375 及EP-0-477508中描述其他方法。

其他方法涉及藉由碳化二亞胺縮合(Chu C等人 *Infect. Immunity*, 1983 245 256), 例如使用EDAC使經溴化氰(或CDAP)活化之用己二醯肼(adipic acid dihydrazide (ADH))衍化之醣與蛋白質載體偶合。

在一實施例中, 醣上之羥基(較佳經活化之羥基, 例如經[例如CDAP]活化以製備氰酸酯之羥基)直接或間接(經由鍵聯劑)與蛋白質上之胺基或羧基鍵聯。若存在鍵聯劑, 則醣上之羥基較佳(例如藉由使用CDAP結合)與鍵聯劑上之胺基鍵聯。鍵聯劑中之其他胺基(例如ADH)可(例如藉由使用碳化二亞胺化學, 例如藉由使用EDAC)與蛋白質上之羧酸基結合。在一實施例中, 在鍵聯劑與載體蛋白質結合之前, 肺炎球菌莢膜醣首先與鍵聯劑結合。或者鍵聯劑可在與醣結合前與載體結合。

亦可使用技術組合, 而一些醣-蛋白質結合物由CDAP製備, 且一些藉由還原胺化來製備。

一般而言, 蛋白質上之下列類型的化學基團可用於偶合/結合:

A)羧基(例如經由天冬胺酸或麩胺酸)。在一實施例中, 此基團直接與醣上之胺基鍵聯或經由碳化二亞胺化學(例如經由EDAC)與鍵聯劑上之胺基鍵聯。

B)胺基(例如經由離胺酸)。在一實施例中, 此基團直接與醣上之羧基鍵聯或經由碳化二亞胺化學(例如EDAC)與鍵聯劑上之羧基鍵聯。在另一實施例中, 此基團直接與醣上之經CDAP或CNBr活化之羥

基鍵聯或與鍵聯劑上之該等基團鍵聯；與具有醛基之醣或鍵聯劑鍵聯；與具有丁二醯亞胺酯基之醣或鍵聯劑鍵聯。

C) 巯基(例如經由半胱胺酸)。在一實施例中，此基團經由順丁烯二醯亞胺化學與溴或氯乙醯化醣或鍵聯劑鍵聯。在一實施例中，此基團經雙(重氮聯苯胺)活化/改質。

D) 羥基(例如經由酪胺酸)。在一實施例中，此基團經雙(重氮聯苯胺)活化/改質。

E) 咪唑基(例如經由組胺酸)。在一實施例中，此基團經雙(重氮聯苯胺)活化/改質。

F) 胍基(例如經由精胺酸)。

G) 吡啶基(例如經由色胺酸)。

一般而言，醣上之下列基團可用於偶合：OH、COOH或NH₂。醛基可在技術中已知之不同處理後產生，諸如：過碘酸鹽、酸水解、過氧化氫等。

直接偶合法：

醣-OH+CNBr或CDAP----->氰酸酯+NH₂-Prot---->結合物

醣-醛+NH₂-Prot---->席夫鹼(Schiff base)+NaCNBH₃---->結合物

醣-COOH+NH₂-Prot+EDAC---->結合物

醣-NH₂ +COOH-Prot+EDAC---->結合物

經由間隔基(鍵聯劑)之間接偶合法：

醣 -OH+CNBr 或 CDAP-----> 氰 酸 酯 +NH₂---NH₂-----> 醣
---NH₂+COOH-Prot+EDAC----->結合物

醣 -OH+CNBr 或 CDAP-----> 氰 酸 酯 +NH₂-----SH-----> 醣
----SH+SH-Prot (具有暴露之半胱胺酸的天然蛋白質或藉由(例如)SPDP改質蛋白質之胺基後所獲得的天然蛋白質)----->醣-S-S-Prot

醣-OH+CNBr或CDAP----->氰酸酯+NH₂---SH----->醣--- SH+順丁

烯二醯亞胺-Prot (胺基改質)----->結合物

醣-OH+CNBr或CDAP----->氰酸酯+ NH₂-SH--->醣-SH+鹵基乙醯化-Prot---->結合物

醣 -COOH+EDAC+NH₂-----NH₂----> 醣 -----NH₂+EDAC + COOH-Prot---->結合物

醣 -COOH+EDAC+NH₂---- SH----->醣 ----SH+SH-Prot (具有暴露之半胱胺酸的天然蛋白質或藉由(例如) SPDP改質蛋白質之胺基後所獲得的天然蛋白質)----->醣-S-S-Prot

醣 -COOH+EDAC+NH₂----SH ----->醣 ----SH+順丁烯二醯亞胺-Prot (胺基改質)---->結合物

醣 -COOH+EDAC+NH₂----SH--->醣-SH+鹵基乙醯化-Prot ---->結合物

醣-醛+NH₂----NH₂--->醣-NH₂+EDAC-COOH-Prot----->結合物

請注意：除上述EDAC外，可使用任何合適之碳化二亞胺。

概括而言，一般可用於與醣偶合之蛋白質載體化學基團的類型為(例如離胺酸殘基上之)胺基、(例如天冬胺酸及麩胺酸殘基上之)COOH基及(若可接近)(例如半胱胺酸殘基上之)SH基。

較佳地，載體蛋白質與肺炎鏈球菌醣之比介於1:5及5:1之間；例如1:0.5-4:1、1:1-3.5:1、1.2:1-3:1、1.5:1-2.5:1之間；例如1:2與2.5:1之間；1:1與2:1 (w/w)之間。在一實施例中，大多數結合物，例如6、7、8、9或9種以上結合物之載體蛋白質與醣的比大於1:1，例如1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1或1.6:1。

在一實施例中，至少一種肺炎鏈球菌醣使用CDAP及EDAC經由鍵聯劑與載體蛋白質結合。舉例而言，18C或22F可如上所述使用CDAP及EDAC經由鍵聯劑(例如彼等在其端基處具有兩個胍基者，諸如ADH)與蛋白質結合。若使用鍵聯劑，則CDAP可用於使醣與鍵聯劑結合，且

EDAC可然後用於使鍵聯劑與蛋白質結合，或者EDAC可首先用於使鍵聯劑與蛋白質結合，其後，CDAP可用於使鍵聯劑與醣結合。

一般而言，本發明之免疫原組合物可包含劑量(以醣計)在0.1 μg 與20 μg 、1 μg 與10 μg 或1 μg 與3 μg 之間的各醣結合物。

在一實施例中，本發明之免疫原組合物含有劑量(以醣計)為0.1 μg -20 μg ; 0.5 μg -10 μg ; 0.5 μg -5 μg 或1 μg -3 μg 之各肺炎鏈球菌莢膜醣。在一實施例中，莢膜醣可以不同劑量存在，例如某些莢膜醣可以恰好1 μg 之劑量存在或某些莢膜醣可以恰好3 μg 之劑量存在。在一實施例中，血清型3、18C及19F (或4、18C及19F)之醣以高於其他醣之劑量存在。在本實施例之一態樣中，血清型3、18C及19F (或4、18C及19F)以大約3 μg 或恰好3 μg 之劑量存在，而免疫原組合物中之其他醣以大約1 μg 或恰好1 μg 之劑量存在。

"大約"或"大致"定義為在出於本發明之目的所給出之數字的10%左右內。

在一實施例中，肺炎鏈球菌莢膜醣中之至少一者直接(例如使用上述化學品中之一)與載體蛋白質結合。較佳地肺炎鏈球菌莢膜醣中之至少一者藉由CDAP直接結合。在一實施例中，大部分莢膜醣(例如5、6、7、8、9或9種以上莢膜醣)藉由CDAP直接與載體蛋白質鍵聯(參看WO 95/08348及WO 96/29094)。

免疫原組合物可包含肺炎鏈球菌蛋白質，本文意指本發明之肺炎鏈球菌蛋白質。該等蛋白質可用作載體蛋白質或可作為游離蛋白質存在，或可作為載體蛋白質與游離蛋白質存在。本發明之肺炎鏈球菌蛋白質至少在肺炎球菌之部分生命週期期間表面暴露，或其為由肺炎球菌分泌或釋放之蛋白質。本發明之蛋白質較佳選自下列種類：諸如具有LXXC之II型信號序列基元之蛋白質(其中X為任何胺基酸，例如聚組胺酸三聯體家族(PhtX))，膽鹼結合蛋白質(CbpX)，具有I型信號序列基

元(例如，Sp101)之蛋白質，具有LPXTG基元之蛋白質(其中X為任何胺基酸，例如Sp128、Sp130)及毒素(例如Ply)。該等種類(或基元)中之較佳實例為下列蛋白質或其免疫功能等價物。

在一實施例中，本發明之免疫原組合物包含至少1種選自由下列物組成之群的蛋白質：聚組胺酸三聯體家族(PhtX)、膽鹼結合蛋白質家族(CbpX)、CbpX短截體、LytX家族、LytX短截體、CbpX短截體-LytX短截體嵌合蛋白質(或融合體)、肺炎球菌溶血素(Ply)、PspA、PsaA、Sp128、Sp101、Sp130、Sp125及Sp133。在另一實施例中，免疫原組合物包含2種或2種以上選自由下列物組成之群的蛋白質：聚組胺酸三聯體家族(PhtX)、膽鹼結合蛋白質家族(CbpX)、CbpX短截體、LytX家族、LytX短截體、CbpX短截體-LytX短截體嵌合蛋白質(或融合體)、肺炎球菌溶血素(Ply)、PspA、PsaA及Sp128。在另一實施例中，免疫原組合物包含2種或2種以上選自由下列物組成之群的蛋白質：聚組胺酸三聯體家族(PhtX)、膽鹼結合蛋白質家族(CbpX)、CbpX短截體、LytX家族、LytX短截體、CbpX短截體-LytX短截體嵌合蛋白質(或融合體)、肺炎球菌溶血素(Ply)及Sp128。

Pht (聚組胺酸三聯體)家族包含蛋白質PhtA、PhtB、PhtD及PhtE。該家族之特徵為一脂質化序列，兩個由富含脯胺酸之區域分離之域，及若干可能包含於金屬中或結合核苷或具酶活性之組胺酸三聯體、(3-5)捲曲螺旋區域、一保守N端及一異質C端。其存在於所有測試肺炎球菌菌株中。同源蛋白質亦已於其他鏈球菌及奈瑟菌(*Neisseria*)中發現。在本發明之一實施例中，本發明之Pht蛋白質為PhtD。然而應瞭解，術語Pht A、B、D及E係指具有以下引文中所揭示之序列的蛋白質以及其自然出現(及人造)變體，該等變體具有與參照蛋白質至少90%等同的序列同源性。較佳至少95%等同且最佳97%等同。

關於PhtX蛋白質，PhtA在WO 98/18930中得以揭示，且亦係指

Sp36。如上所述，其為聚組胺酸三聯體族之蛋白質且具有LXXC之II型信號基元。PhtD在WO 00/37105中得以揭示，且亦稱為Sp036D。如上所述，其亦為聚組胺酸三聯體家族之蛋白質，且具有II型LXXC信號基元。PhtB在WO 00/37105中得以揭示，且亦係指Sp036B。PhtB家族之另一成員為C3降解多肽，如WO 00/17370所揭示。此蛋白質亦來自聚組胺酸三聯體家族且具有II型LXXC信號基元。較佳免疫學功能等價物為WO 98/18930中揭示之蛋白質Sp42。WO 99/15675中揭示PhtB短截體(大致79kD)，亦認為其為PhtX家族成員。PhtE在WO00/30299中得以揭示且稱為BVH-3。當本文涉及任何Pht蛋白時，其意謂可使用Pht蛋白之免疫原片段或其融合體。舉例而言，參考PhtX包括任何Pht蛋白之免疫原片段或其融合體。參考PhtD或PhtB亦為參考如(例如)WO0198334中所發現之PhtDE或PhtBE融合體。

肺炎球菌溶血素為具有獨特溶細胞性(溶血性)及補體活化活性的多功能毒素(Rubins等人，*Am. Respi. Cit Care Med*, 153 : 1339-1346 (1996))。毒素並非由肺炎球菌分泌但其在肺炎球菌於自溶素影響下溶解後釋放。其作用包括(例如)刺激人類單核細胞之發炎細胞因子產生、抑制人類呼吸道上皮之纖毛擺動並降低殺菌活性及嗜中性粒細胞遷移。肺炎球菌溶血素最明顯的影響在於紅血球之溶解，其涉及與膽固醇結合。由於其為毒素，因此在其可投予活體內之前須進行解毒(亦即當以適於防護之劑量提供時對人類無毒)。野生型或天然肺炎球菌溶血素之表達及選殖在此項技術中已知。例如參看Walker等人(*Infect Immun*, 55 : 1184-1189 (1987)), Mitchell等人(*Biochim Biophys Acta*, 1007:67-72 (1989)及Mitchell等人(*NAR*, 18 : 4010 (1990))。ply之解毒可藉由化學法來進行，例如經受甲醛液或戊二醛處理或兩者之組合(WO 04081515, PCT/EP2005/010258)。技術中已熟知多種毒素之該等方法或者，ply可以遺傳方式解毒。因此，本發明包涵肺炎球菌蛋白之

衍生物，其可為(例如)經突變之蛋白。本文所使用之術語"經突變"意謂使用供定點突變之熟知技術或任何其他習知方法經歷缺失、添加或取代一個或一個以上胺基酸的分子。舉例而言，如上所述，可改變突變體ply蛋白使得其生物學上非活性，而仍保持其免疫原決定基，參看(例如) WO 90/06951, Berry 等人(*Infect Immun*, 67:981-985 (1999))及 WO99/03884。

應瞭解，如本文所使用之術語"Ply"係指適用於醫學用途(亦即無毒)之經突變或解毒之肺炎球菌溶血素。

關於膽鹼結合蛋白家族(CbpX)，彼家族之成員最初確定為可藉由膽鹼親和性層析法來純化之肺炎球菌蛋白。所有膽鹼結合蛋白均與細胞壁磷壁酸及膜相關脂磷壁酸的磷酸膽鹼部分非共價鍵合。儘管蛋白之確切性質(胺基酸序列、長度等)可變，但就結構而言，其在整個家族上具有若干共有區域。一般而言，膽鹼結合蛋白包含N端基區域(N)，保守重複區域(R1及/或R2)、富含脯胺酸區域(P)及保守膽鹼結合區域(C)，其由包含大致一半蛋白之多個重複組成。如本申請案中所使用之術語"膽鹼結合蛋白家族(CbpX)"係選自由如WO97/41151中所確定之膽鹼結合蛋白組成之群：PbcA、SpsA、PspC、CbpA、CbpD及CbpG。WO97/41151中揭示CbpA。WO00/29434中揭示CbpD及CbpG。WO97/09994中揭示PspC。WO98/21337中揭示PbcA。SpsA為WO98/39450中揭示之膽鹼結合蛋白。較佳地，膽鹼結合蛋白係選自由CbpA、PbcA、SpsA及PspC組成之群。

另一較佳實施例為CbpX短截體，其中"CbpX"如上定義，且"短截體"係指缺少50%或以上膽鹼結合區域(C)之CbpX蛋白。較佳該等蛋白缺少整個膽鹼結合區域。更佳該等蛋白短截體缺少(i)膽鹼結合區域及(ii)蛋白之N端半部分，但仍保留至少一個重複區域(R1或R2)。亦更佳地，短截體具有2個重複區域(R1及R2)該等較佳實施例之實例為如

WO99/51266或WO99/51188中所說明之NR1xR2及R1xR2，然而本發明之範疇中亦涵蓋缺少類似膽鹼結合區域的其他膽鹼結合蛋白。

LytX家族為與細胞溶解作用相關之膜相關蛋白。N端域包含膽鹼結合域，然而LytX家族並不具有如上所述之CbpA家族中所發現的所有特徵，且因此對於本發明而言，認為LytX家族與CbpX家族不同。與CbpX族相反，C端域含有LytX蛋白族之催化域。該家族包含LytA、B及C。關於LytX家族，LytA在Ronda等人之Eur J Biochem, 164: 621-624 (1987)中得以揭示。LytB在WO 98/18930中得以揭示且亦稱為Sp46。LytC在WO 98/18930中得以揭示且亦稱為Sp91。彼家族之較佳成員為LytC。

另一較佳實施例為LytX短截體，其中"LytX"如上定義，且"短截體"係指缺少50%或以上膽鹼結合區域的LytX蛋白。較佳該等蛋白缺少整個膽鹼結合區域。本發明之另一較佳實施例為CbpX短截體-LytX短截體嵌合蛋白(或融合體)。較佳其包含CbpX之NR1xR2 (或R1xR2)及LytX之C端部分(Cterm，亦即缺少膽鹼結合域)(例如LytCCterm或Sp91Cterm)。更佳地CbpX係選自由CbpA、PbcA、SpsA及PspC組成之群。亦更佳地，其為CbpA。較佳地，LytX為LytC (亦稱為Sp91)。本發明之另一實施例為缺少膽鹼結合域(C)且表達為與LytX之融合蛋白的PspA或PsaA。較佳地，LytX為LytC。

關於PsaA及PspA，兩者在此項技術中皆已知。舉例而言，PsaA及其跨膜缺失變體已藉由Berry及Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64 (12): 5255-62加以描述。PspA及其跨膜缺失變體已在例如US 5804193、WO 92/14488及WO 99/53940中得以揭示。

WO00/76540中揭示Sp128及Sp130。Sp125為具有LPXTG細胞壁錨固基元之肺炎球菌表面蛋白的實例(其中X為任何胺基酸)。已發現此類具有此基元之肺炎球菌表面蛋白內的任何蛋白在本發明之內容中為適

用的，且因此視為本發明之其他蛋白。WO 98/18930中揭示Sp125其本身，且亦稱為ZmpB-鋅金屬蛋白酶。Sp101在WO 98/06734中得以揭示(其中其參考號為y85993)。其特徵為I型信號序列。Sp133在WO 98/06734中得以揭示(其中其參考號為y85992)。其特徵亦為I型信號序列。

可歸入組合疫苗(尤其用於預防中耳炎之疫苗)中之較佳卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)蛋白抗原之實例為：OMP106 [WO 97/41731 (Antex)及WO 96/34960 (PMC)]; OMP21或其片段(WO 0018910); LbpA及/或LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; TbpA及/或TbpB[WO 97/13785及WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME等人(1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1及/或UspA2 [WO 93/03761 (University of Texas)]; OmpCD; HasR (PCT/EP99/03824); PilQ (PCT/EP99/03823); OMP85 (PCT/EP00/01468) ; lipo06 (GB 9917977.2); lipo10 (GB 9918208.1); lipo11 (GB 9918302.2); lipo18 (GB 9918038.2); P6 (PCT/EP99/03038); D15 (PCT/EP99/03822); OmpA1 (PCT/EP99/06781); Hly3 (PCT/EP99/03257)及OmpE。可歸入組合疫苗(尤其用於預防中耳炎之疫苗)中之非可分型嗜血性流感桿菌抗原或其片段的實例包括：絲束蛋白[(US 5766608-Ohio State Research Foundation)]及包含由此而得之肽的融合體[例如LB1(f)肽融合體；US 5843464(OSU)或WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (State University of New York)]; TbpA及/或TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (WO 94/12641); P2; 及P5 (WO 94/26304)。

本發明之蛋白質亦可有益地組合。組合意謂免疫原組合物包含下列組合範圍內之作為載體蛋白質或游離蛋白質或兩者之混合物的所有蛋白。舉例而言，在如下文所述之兩種蛋白質之組合中，兩種蛋白均

可用作載體蛋白質，或兩種蛋白均可作為游離蛋白質存在，或兩者均可作為載體及游離蛋白質存在，或一者可作為載體蛋白質及游離蛋白質存在而另一者僅作為載體蛋白質或僅作為游離蛋白質存在，或一者可作為載體蛋白質存在且另一者作為游離蛋白質存在。若給出三種蛋白質之組合，則存在類似的可能性。較佳組合包括(但不限於)PhtD+NR1xR2、PhtD+NR1xR2-Sp91Cterm嵌合或融合蛋白、PhtD+Ply、PhtD+Sp128、PhtD+PsaA、PhtD+PspA、PhtA+NR1xR2、PhtA+NR1xR2-Sp91Cterm嵌合或融合蛋白、PhtA+Ply、PhtA+Sp128、PhtA+PsaA、PhtA+PspA、NR1xR2+LytC、NR1xR2+PspA、NR1xR2+PsaA、NR1xR2+Sp128、R1xR2+LytC、R1xR2+PspA、R1xR2+PsaA、R1xR2+Sp128、R1xR2+PhtD、R1xR2+PhtA。較佳地，NR1xR2 (或R1xR2)來自CbpA或PspC。更佳地，其來自CbpA。其他組合包括3種蛋白之組合，諸如PhtD+NR1xR2+Ply及PhtA+NR1xR2+PhtD。在一實施例中，疫苗組合物包含經解毒之肺炎球菌溶血素及作為載體蛋白質之PhtD或PhtDE。在另一實施例中，疫苗組合物包含經解毒之肺炎球菌溶血素及作為游離蛋白質之PhtD或PhtDE。

本發明進一步提供一種疫苗，其含有本發明之免疫原組合物及醫藥學上可接受之賦形劑。

本發明之疫苗尤其當意欲用於老年人口群中以及用於嬰兒人口群中時可經佐劑輔佐。合適之佐劑包括諸如氫氧化鋁凝膠或磷酸鋁或明礬之鋁鹽，但亦可為鈣、鎂、鐵或鋅之鹽，或可為醯化酪胺酸或醯化糖、陽離子或陰離子衍化醣或聚磷腈之不可溶懸浮液。

較佳該佐劑經選擇為TH1型反應的優先誘導物。該高含量之Th1型細胞因子趨於促進誘導對給定抗原之經細胞介導的免疫反應，而高含量之Th2型細胞因子趨於促進誘導對抗原之體液免疫反應。

Th1與Th2型免疫反應之區別並非絕對。實際上，個體將支持描述為Th1佔優勢或Th2佔優勢之免疫反應。然而通常便利地根據Mosmann及Coffman (Mosmann, T.R.及Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, 第145-173頁)之以鼠類CD4+ve T細胞株所述者來考慮細胞因子家族。傳統上，Th1型反應與藉由T-淋巴細胞之INF- γ 及IL-2細胞因子的產生相關。通常直接與誘導Th1型免疫反應相關的其他細胞因子並非藉由T細胞產生，諸如IL-12。相反，Th2型反應與IL-4、IL-5、IL-6、IL-10之分泌相關。促進Th1反應佔優勢之合適的佐劑系統包括：單磷醯基脂質A或其衍生物，尤其3-O-脫醯化單磷醯基脂質A(3D-MPL)(其製備參看GB 2220211 A)；及單磷醯基脂質A、較佳3-O-脫醯化單磷醯基脂質A連同鋁鹽(例如磷酸鋁或氫氧化鋁)或水包油型乳液之組合。在該等組合中，抗原及3D-MPL含於相同微粒結構中，其使得更有效地傳遞抗原及免疫刺激信號。研究顯示3D-MPL能夠進一步增強經明礬吸附之抗原的免疫原性[Thoelen等人Vaccine (1998)16:708-14; EP 689454-B1]。

增強之系統包括單磷醯基脂質A與皂角苷衍生物之組合，尤其如WO 94/00153中所述之QS21與3D-MPL的組合，或較小反應原性之組合物，其中如WO 96/33739所述，用膽固醇來抑制QS21。WO 95/17210中描述尤其有效之佐劑調配物，其包括於水包油型乳液中之QS21、3D-MPL及生育酚。在一實施例中，免疫原組合物另外包含皂角苷，其可為QS21。調配物亦可包含水包油型乳液及生育酚(WO 95/17210)。含未甲醇化CpG之寡聚核苷酸(WO 96/02555)及其他免疫調節寡聚核苷酸(WO0226757及WO03507822)亦為TH1反應之優先誘導物，且適用於本發明中。

特定佐劑為彼等選自下列物之群者：金屬鹽、水包油型乳液、Toll

樣受體激動劑(尤其Toll樣受體2激動劑、Toll樣受體3激動劑、Toll樣受體4激動劑、Toll樣受體7激動劑、Toll樣受體8激動劑及Toll樣受體9激動劑)、皂角苷或其組合。

可隨同本發明之疫苗組合物使用的佐劑為得自革蘭氏陰性菌株之胞或外部膜囊製劑，諸如彼等由WO 02/09746所教示者-尤其腦膜炎奈瑟菌胞。胞之佐劑性質可藉由使LOS (脂質寡醣(lipooligosaccharide))保持於其表面上(例如經由低濃度之清潔劑[例如0%-0.1%之脫氧膽酸酯]萃取)而得以改良。LOS可經由WO02/09746中所述之msbB(-)或htrB (-)突變加以解毒。佐劑性質亦可藉由保持得自腦膜炎球菌胞之PorB(及視情況移除PorA)而得以改良。佐劑性質亦可藉由截短腦膜炎球菌胞上之LOS外部核醣結構--例如經由WO2004/014417中所述之lgtB(-)突變加以改良。或者前述(例如自msbB(-)及/或lgtB(-)菌株分離之)LOS可經純化並用作本發明之組合物中的佐劑。

可隨同本發明之組合物使用的其他佐劑可選自下列群：皂角苷、脂質A或其衍生物、免疫刺激性寡聚核苷酸、烷基葡萄糖胺糖磷酸酯、水包油型乳液或其組合。另一種較佳佐劑為與另一種佐劑組合之金屬鹽。較佳地，佐劑為Toll類受體激動劑，尤其Toll類受體2、3、4、7、8或9之激動劑或皂角苷，尤其Qs21。更佳地，佐劑系統包含以上列表中之兩種或兩種以上佐劑。該等組合尤其較佳含有皂角苷(尤其Qs21)佐劑及/或Toll類受體9激動劑，諸如含CpG之免疫刺激性寡聚核苷酸。其他較佳組合包含皂角苷(尤其QS21)及Toll類受體4激動劑，諸如單磷酸基脂質A或其3去磷酸化衍生物，3D-MPL或皂角苷(尤其QS21)及Toll類受體4配位基，諸如烷基葡萄糖胺糖磷酸酯。

尤其較佳佐劑為3D-MPL與QS21之組合(EP 0 671 948 B1)，包含3D-MPL及QS21之水包油型乳液(WO 95/17210、WO 98/56414)或與其

他載體調配之3D-MPL (EP 0 689 454 B1)。其他較佳佐劑系統包含如US6558670、US6544518中所述之3D MPL、QS21及CpG寡聚核苷酸組合。

在一實施例中，佐劑為(或包含) Toll類受體(TLR)4配位基，較佳為諸如脂質A衍生物，尤其單磷醯基脂質A，或尤其更佳為3去醯化單磷醯基脂質A(3D-MPL)的激動劑。

3D-MPL可自GlaxoSmithKline Biologicals North America購得且主要促進具有IFN- γ (Th1)表型之CD4⁺T細胞反應。其可根據GB 2 220 211 A中所揭示之方法來產生。就化學上而言，其為3-去醯化單磷醯基脂質A與3、4、5或6醯化鏈之混合物。在本發明之組合物中較佳使用小顆粒3D-MPL。小顆粒3D-MPL之粒徑使得其可無菌濾過0.22 μ m過濾器。國際專利申請案第WO 94/21292號中描述該等製劑。已知脂質A之合成衍生物且認為其為TLR 4激動劑，其包括(但不限於)：

OM174 (2-脫氧-6-鄰[2-脫氧-2-[(R)-3-十二醯氧基十四醯基胺基]-4-鄰磷醯基- β -D-葡萄呋喃糖]-2-[(R)-3-羥基十四醯基胺基]- α -D-葡萄呋喃糖磷酸二氫酯)，(WO 95/14026)；

OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-十二醯氧基十四醯基胺基]-4-側氧基-5-氮雜-9(R)-[(R)-3-羥基十四醯基胺基]癸-1,10-二醇，1,10-雙(磷酸二氫酯)(WO99 /64301及WO 00/0462)；

OM 197 MP-Ac DP (3S, 9R)-3-[(R)-十二醯氧基十四醯基胺基]-4-側氧基-5-氮雜-9-[(R)-3-羥基十四醯基胺基]癸-1,10-二醇，1-(磷酸二氫酯)10-(6-胺基己酸酯)(WO 01/46127)。

可使用之其他TLR4配位基為諸如彼等WO9850399或US6303347(亦揭示AGP之製備方法)中所揭示之烷基葡萄胺糖磷酸酯(AGP)或如US6764840中所揭示之AGP醫藥學上可接受之鹽。一些AGP為TLR4激動劑，且一些為TLR4拮抗劑。認為兩者均適用作佐劑。

本發明中使用之另一種較佳免疫刺激劑為Quil A及其衍生物。Quil A為自南美洲樹石鹼木(*Quilaja Saponaria Molina*)分離之皂角苷製劑，且Dalsgaard等人於1974年("Saponin adjuvants", *Archiv. für die gesamte Virusforschung*，第44卷，Springer Verlag, Berlin，第243-254頁)首次描述其具有佐劑活性。已藉由HPLC來分離經純化之Quil A片段，其保持佐劑活性而無Quil A相關毒性(EP 0 362 278)，例如QS7及QS21(亦稱為QA7及QA21)。QS-21為衍生自石鹼木樹皮之天然皂角苷，其誘導CD8⁺細胞毒性T細胞(CTL)、Th1細胞及顯著之IgG2a抗體反應，且為本發明內容中之較佳皂角苷。

已描述尤其較佳之QS21之特定調配物，該等調配物進一步包含固醇(WO96/33739)。可以下列形式來分離本發明之皂角苷形成部分：以微胞、(優先但非獨占地與膽汁鹽混合之)混合微胞形式或可以ISCOM基質形式(EP 0 109 942 B1)，諸如蠕蟲狀或環狀多聚錯合物之脂質體或相關膠狀結構，當與膽固醇及類脂調配之脂質/層狀結構及薄層，或以水包油型乳液形式(例如WO 95/17210)。皂角苷可較佳與諸如氫氧化鋁或磷酸鋁之金屬鹽相關(WO 98/15287)。

較佳地皂角苷以脂質體、ISCOM或水包油型乳液形式存在。

增強之系統包括單磷醯基脂質A(或經解毒之脂質A)與皂角苷衍生物之組合，尤其如WO 94/00153中所述之QS21與3D-MPL的組合，或較小反應原性之組合物，其中如WO 96/33739所述，用膽固醇來抑制QS21。WO 95/17210中描述尤其有效之佐劑調配物，其包括水包油型乳液中具有或不具有QS21及/或3D-MPL的生育酚。在一實施例中，免疫原組合物另外包含皂角苷，其可為QS21。

亦可使用免疫刺激性寡聚核苷酸或任何其他Toll類受體(TLR)9激動劑。用於本發明之佐劑或疫苗中之較佳寡聚核苷酸為含CpG的寡聚核苷酸，較佳含兩種或兩種以上由至少三種，更佳至少六種或六種以

上核苷酸分離之二核苷酸CpG基元者。CpG基元為其後為鳥苷酸之胞嘧啶核苷酸。本發明之CpG寡聚核苷酸通常為脫氧核苷酸。在較佳實施例中寡聚核苷酸中之核苷酸間物(internucleotide)為二硫代磷酸酯，或更佳為硫代磷酸酯鍵，但磷酸二酯及其他核苷酸間鍵屬於本發明之範疇內。本發明之範疇內亦包括具有混合核苷酸間鍵合之寡聚核苷酸。產生硫代磷酸酯寡聚核苷酸或二硫代磷酸酯的方法描述於US5,666,153、US5,278,302及WO95/26204。

較佳寡聚核苷酸之實例具有下列序列。該等序列較佳含有經硫代磷酸酯改質之核苷酸間鍵合。

OLIGO 1(SEQ ID NO:1): TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEQ ID NO:2): TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3(SEQ ID NO:3): ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEQ ID NO:4): TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEQ ID NO:5): TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

OLIGO 6 (SEQ ID NO:6): TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456)

由於替代性CpG寡聚核苷酸具有於其不合理之缺失或添加，因此其可包含以上較佳序列。

本發明中所利用之CpG寡聚核苷酸可藉由技術中已知之任何方法來合成(例如參看EP 468520)。便利地，該等寡聚核苷酸可利用自動合成器來合成。

佐劑可爲水包油型乳液或可包含與其他佐劑組合之水包油型乳液。乳液系統之油相較佳包含可代謝油。術語可代謝油之含義在此項技術中熟知。可代謝可定義爲"能夠藉由代謝轉化" (Dorland's Illustrated Medical Dictionary, W.B. Sanders Company, 第25版(1974))。油可爲任何植物油、魚油、動物或合成油，其對接受者無毒且可藉由代謝轉化。堅果、種子及穀粒爲植物油之常規來源。合成油亦爲本發明之部分，且可包括諸如NEOBEE®之市售油及其他。角鯊烯(2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-廿四碳六烯)爲於鯊魚肝油中大量發現，及橄欖油、麥胚油、米糠油及酵母中較少量發現之不飽和油，且爲用於本發明中之尤其較佳油。由於角鯊烯爲膽固醇生物合成中之中間體的事實，角鯊烯爲可代謝油(Merck index, 第10版，登記號第8619號)。

油乳液佐劑中亦通常使用母育酚(例如維生素E)(EP 0 382 271 B1; US5667784; WO 95/17210)。用於本發明中之油乳液(較佳水包油型乳液)中的母育酚可如EP 0 382 271 B1中所述加以調配，就此而言，母育酚可爲直徑較佳小於1微米之母育酚液滴分散液(其視情況包含乳化劑)。或者母育酚可在與另一種油組合的情況下用以形成油乳液之油相。本文描述可與母育酚組合使用之油乳液的實例，諸如如上所述之可代謝油。

已暗示水包油型乳液佐劑本身適用作佐劑組合物(EP 0 399 843B)，且亦已描述水包油型乳液與其他活性劑之組合適用作疫苗佐劑(WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241)。已描述其他油乳液佐劑，諸如油包水乳液(US 5,422,109; EP 0 480 982 B2)及水包油包水乳液(US 5,424,067; EP 0 480 981 B)。所有者均形成較佳油乳液系統(尤其在合併母育酚時)以形成本發明之佐劑及組合物。

最佳油乳液(例如水包油型乳液)進一步包含諸如TWEEN 80之乳

化劑及/或諸如膽固醇之固醇。

較佳油乳液(較佳水包油型乳液)包含可代謝無毒油，諸如角鯊烷、角鯊烯或諸如 α 生育酚之生育酚(且較佳角鯊烯與 α 生育酚兩者)及視情況諸如Tween 80之乳化劑(或界面活性劑)。亦可為包括固醇(較佳膽固醇)。

產生水包油乳液之方法為熟習此項技術者所熟知。通常該方法包含使含母育酚之油相與諸如PBS/TWEEN80™溶液之界面活性劑混合，隨後使用均質器均化，熟習此項技術者應明瞭包含使混合物穿經注射針兩次之方法適合均化少量液體。同樣，熟習此項技術者可調適微流化床裝置(M110S微流體機(Microfluidics machine)，在6 bar之最大入口壓力下歷時2分鐘的時間最多穿過50次(出口壓力約850 bar))中之乳化過程以產生較少量或較大量之乳液。該調適可藉由常規實驗達成，其包含量測所得乳液直至達成具有所需直徑之油滴的製劑。

在水包油型乳液中，油及乳化劑應於水性載體中。水性載體可為(例如)磷酸鹽緩衝鹽水。

如藉由光子相關光譜技術量測，發現穩定水包油型乳液中之油滴尺寸較佳小於1微米，其可大體上在30 nm-600 nm範圍內，較佳直徑大體上約30 nm-500 nm，且最佳直徑大體上150 nm-500 nm，且尤其直徑約150 nm。就此而言，80%之油滴數應歸於較佳範圍內，更佳為90%以上，且最佳95%以上之油滴數均屬於界定之尺寸範圍內。習知地，本發明之油乳液中所存在之組份的量為0.5%-20%或2%至10%範圍內諸如角鯊烯之油(以總劑量體積計)；且若存在，2%至10% α 生育酚；及0.3%至3%界面活性劑，諸如聚氧化乙烯單油酸山梨糖醇酐酯。較佳地，油(較佳角鯊烯)：母育酚(較佳 α 生育酚)之比等於或小於1，以此方式提供更為穩定之乳液。諸如Tween80或Span 85之乳化劑亦可以約1%之含量存在。在某些情況下，本發明之疫苗進一步含有穩定劑可為

有利的。

WO 95/17210、WO 99/11241及WO 99/12565中描述較佳乳液系統之實例，其揭示基於角鯊烯、 α 生育酚及TWEEN 80，視情況與免疫刺激劑QS21及/或3D-MPL調配之乳液佐劑。

因此，在本發明之尤其較佳實施例中，本發明之佐劑可另外包含其他免疫刺激劑，諸如LPS或其衍生物及/或皂角苷。本文及"Vaccine Design-The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, 第6卷Powell, M.F.及Newman, M.J.編，Plenum Press, New York及London, ISBN 0-306-44867-X中描述其他免疫刺激劑之實例。

在一較佳態樣中，根據本發明之佐劑及免疫原組合物包含於如上所述之油乳液中的皂角苷(較佳QS21)及/或LPS衍生物(較佳3D-MPL)，視情況具有固醇(較佳膽固醇)。此外，油乳液(較佳水包油型乳液)可含有司盤(span)85及/或卵磷脂及/或三辛精。WO 99/12565中描述包含水包油型乳液、固醇及皂角苷之佐劑。

通常對於人類投藥而言，皂角苷(較佳QS21)及/或LPS衍生物(較佳3D-MPL)將占免疫原組合物人用劑量之每劑量1 μ g -200 μ g (諸如10 μ g-100 μ g，較佳10 μ g-50 μ g)範圍內。通常油乳液(較佳水包油型乳液)將包含2%至10%可代謝油。較佳地其將包含2%至10%角鯊烯，2%至10% α 生育酚及0.3%至3% (較佳0.4%-2%)乳化劑(較佳tween 80 [聚氧化乙烯單油酸山梨糖醇酐酯])。若存在角鯊烯與 α 生育酚兩者，則角鯊烯： α 生育酚之比等於或小於1，以此方式提供更為穩定的乳液。Span 85 (去水山梨糖醇三油酸酯)亦可以0.5%至1%之含量存在於本發明中所使用的乳液中。在某些情況下，本發明之免疫原組合物及疫苗進一步含有穩定劑，例如其他乳化劑/界面活性劑(包括辛酸(merck index第10版，登記號第1739號)，其中三辛精尤其較佳)可為有利的。

若包括角鯊烯及皂角苷(較佳QS21)，則調配物亦包括固醇(較佳膽固醇)有益，以此方式使得乳液中總的油含量減少。其使得降低製造成本，改良接種之整體舒適性，且亦定性並定量地改良所得之免疫反應，諸如改良之IFN- γ 產生。因此，本發明之佐劑系統通常包含可代謝油：皂角苷之200:1至300:1(w/w)範圍內的比，本發明亦可以"低油(low oil)"形式使用，其較佳範圍為1:1至200:1，較佳20:1至100:1且最佳大體上48:1，此疫苗保持所有組份有益之佐劑性質而反應原性分佈大幅減少。因此，尤其較佳實施例之皂角苷：QS21(w/w)之比率在1:1至250:1範圍內，20:1至200:1之範圍亦較佳，較佳20:1至100:1，且最佳大體上48:1。較佳地，亦包括以如本文所述之皂角苷：固醇的比率存在的固醇(最佳膽固醇)。

本發明之乳液系統較佳具有亞微米範圍內之小油滴尺寸。最佳油滴尺寸將在120 nm至750 nm範圍內，且最佳直徑為120 nm-600 nm。

如WO 95/17210或WO 99/12565中所述，尤其有效之佐劑調配物(在本發明之免疫原組合物中最終與AlPO₄組合)包括皂角苷(較佳QS21)、LPS衍生物(較佳3D-MPL)及油乳液(較佳水包油型乳液中之角鯊烯及 α 生育酚)，(尤其表1之實例2中的佐劑調配物11)。

TLR 2激動劑之實例包括肽聚糖或脂蛋白。咪唑并喹啉，諸如咪喹莫特(Imiquimod)及Resiquimod (咪喹莫特之衍生物)為已知之TLR7激動劑。單股RNA亦為已知之TLR激動劑(人類中之TLR8及小鼠中之TLR7)，其中雙股RNA及聚IC(聚肌苷酸-聚胞苷酸-一種市售病毒RNA之合成模擬物)為TLR 3激動劑之實例。3D-MPL為TLR4激動劑之實例，而CPG為TLR9激動劑之實例。

免疫原組合物可包含吸附於金屬鹽上之抗原及免疫刺激劑。EP 0 576 478 B1、EP 0 689 454 B1及EP 0 633 784 B1中描述其中抗原及免疫刺激劑3-O-脫氧醯化單磷醯基脂質A (3D-MPL)吸附於相同顆粒上的鋁

基疫苗調配物。在該等情況下，接著抗原首先吸附於鋁鹽上，隨後免疫刺激劑3D-MPL吸附於相同鋁鹽顆粒上。該等過程首先包括藉由水浴中超音波處理直至顆粒尺寸達80 nm與500 nm之間而使3D-MPL懸浮。在攪拌下，抗原通常於室溫下歷時1小時吸附於鋁鹽上。接著將3D-MPL懸浮液添加至吸附之抗原中，且於室溫下培養調配物1小時，且接著保持於4°C下直至使用。

在另一過程中，如EP 1126876中所述免疫刺激劑及抗原係位於分開之金屬顆粒上。改良之過程包含使免疫刺激劑吸附於一金屬鹽顆粒上，隨後使抗原吸附於另一金屬鹽顆粒上，隨後混合離散的金屬顆粒而形成疫苗。本發明中所使用之佐劑可為包含吸附於金屬鹽顆粒上之免疫刺激劑的佐劑組合物，其特徵為該金屬鹽顆粒上大體上無其他抗原。此外，疫苗由本發明提供且其特徵為免疫刺激劑吸附於大體上無其他抗原之金屬鹽顆粒上，且特徵為吸附抗原之金屬鹽顆粒大體上無其他免疫刺激劑。

因此，本發明提供一種佐劑調配物，其包含已吸附於金屬鹽顆粒上之免疫刺激劑，該組合物之特徵為大體上無其他抗原。此外，若使用該佐劑，則此佐劑調配物可為製造疫苗所需之中間體。因此，提供一種製造疫苗的方法，其包含使一或多種免疫刺激劑吸附於金屬顆粒上的佐劑組合物與抗原混雜。較佳該抗原已預先吸附於金屬鹽上。該金屬鹽可與吸附免疫刺激劑之金屬鹽相同或類似。較佳地，該金屬鹽為例如磷酸鋁或氫氧化鋁之鋁鹽。

本發明進一步提供一種疫苗組合物，其包含吸附於第一金屬鹽顆粒上之免疫刺激劑及吸附於金屬鹽上之抗原，其特徵在於第一及第二金屬鹽顆粒為分開之顆粒。

本文所述之LPS或LOS衍生物或突變體或脂質A衍生物經設計比天然脂多醣的毒性低(例如3D-MPL)，且關於本文所述之該等部分之任

何用途為可互換等價物。其可為如上所述之TLR4配位基。WO020786737、WO9850399、WO0134617、WO0212258、WO03065806中描述其他該等衍生物。

在一實施例中，用於本發明之組合物的佐劑包含脂質體載體(藉由已知之技術自磷脂(諸如二油醯基磷脂醯膽鹼[DOPC])及視情況固醇[諸如膽固醇]來製備)。該等脂質體載體可攜帶脂質A衍生物[諸如3D-MPL-參看上文]及/或皂角苷(諸如QS21-參看上文)。在一實施例中，佐劑包含(每0.5 mL劑量) 0.1 mg-10 mg、0.2 mg-7 mg、0.3 mg-5 mg、0.4 mg-2 mg或0.5-1 mg (例如0.4 mg-0.6 mg、0.9 mg-1.1 mg、0.5 mg或1 mg)磷脂(例如DOPC)，0.025 mg-2.5 mg、0.05 mg -1.5 mg、0.075 mg-0.75 mg、0.1 mg-0.3 mg或0.125-0.25 mg (例如0.2 mg-0.3 mg、0.1 mg-0.15 mg、0.25 mg或0.125 mg)固醇(例如膽固醇)，5 μ g-60 μ g、10 μ g-50 μ g或20 μ g-30 μ g (例如5 μ g-15 μ g、40 μ g-50 μ g、10 μ g、20 μ g、30 μ g、40 μ g或50 μ g)脂質A衍生物(例如3D-MPL)，及5 μ g-60 μ g、10 μ g -50 μ g或20 μ g-30 μ g(例如5 μ g-15 μ g、40 μ g-50 μ g、10 μ g、20 μ g、30 μ g、40 μ g或50 μ g)皂角苷(例如QS21)。

此佐劑尤其適合於老年人疫苗調配物。在一實施例中，包含此佐劑之疫苗組合物包含衍生自至少所有下列血清型之醣結合物：4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F (且亦可包含血清型3、6A、19A及22F中之一或多種)，其中在人類接種者中所誘導之抵擋一或多種(或所有)疫苗組份4、6B、9V、14、18C、19F及23F 之GMC抗體滴度並非顯著低於由Prevnar®疫苗所誘導者。

在一實施例中，用於本發明之組合物之佐劑包含由可代謝油(諸如角鯊烯)、乳化劑(諸如Tween 80)及視情況母育酚(諸如 α 生育酚)所製備之水包油型乳液。在一實施例中，佐劑包含(每0.5 mL劑量) 0.5 mg-15

mg、1 mg-13 mg、2 mg-11 mg、4 mg-8 mg或5 mg-6 mg (例如2 mg-3 mg、5 mg-6 mg、或10 mg-11 mg)可代謝油(諸如角鯊烯)，0.1 mg-10 mg、0.3 mg-8 mg、0.6 mg-6 mg、0.9 mg-5 mg、1 mg-4 mg或2 mg-3 mg (例如0.9 mg-1.1 mg、2 mg-3 mg或4 mg-5 mg)乳化劑(諸如Tween 80)及視情況0.5 mg-20 mg、1 mg-15 mg、2 mg-12 mg、4 mg-10 mg、5 mg-7 mg (例如11 mg-13 mg、5 mg-6 mg或2mg-3 mg)母育酚(諸如 α 生育酚)。

此佐劑視情況可進一步包含5 μ g-60 μ g、10 μ g-50 μ g或20 μ g-30 μ g (例如5 μ g-15 μ g、40 μ g-50 μ g、10 μ g、20 μ g、30 μ g、40 μ g或50 μ g)脂質A衍生物(例如3D-MPL)。

該等佐劑尤其適合於嬰兒或老人疫苗調配物。在一實施例中，包含此佐劑之疫苗組合物包含衍生自至少所有下列血清型之醣結合物：4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(且亦可包含血清型3、6A、19A及22F中之一或多者)，其中在人類接種者中所誘導之抵擋一或多種(或所有)疫苗組份4、6B、9V、14、18C、19F及23F之GMC抗體滴度並非顯著低於由Prevnar®疫苗所誘導者。

此佐劑視情況可含有0.025 mg-2.5 mg、0.05 mg-1.5 mg、0.075 mg-0.75 mg、0.1 mg-0.3 mg或0.125mg-0.25 mg (例如0.2 mg-0.3 mg、0.1mg-0.15mg、0.25 mg或0.125 mg)固醇(例如膽固醇)，5 μ g-60 μ g、10 μ g-50 μ g、或20 μ g-30 μ g (例如5 μ g-15 μ g、40 μ g-50 μ g、10 μ g、20 μ g、30 μ g、40 μ g或50 μ g)脂質A衍生物(例如3D-MPL)及5 μ g-60 μ g、10 μ g-50 μ g或20 μ g-30 μ g (例如5 μ g-15 μ g、40 μ g-50 μ g、10 μ g、20 μ g、30 μ g、40 μ g或50 μ g)皂角苷(例如QS21)。

此佐劑尤其適合於老人疫苗調配物。在一實施例中，包含此佐劑之疫苗組合物包含衍生自至少所有下列血清型之醣結合物：4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(且亦可包含血清型3、6A、19A

及22F中之一或多者)，其中在人類接種者中所誘導之抵擋一或多種(或所有)疫苗組份4、6B、9V、14、18C、19F及23F之GMC抗體滴度並非顯著低於由Pprevnar®疫苗所誘導者。

在一實施例中，用於本發明之組合物之佐劑包含磷酸鋁及脂質A衍生物(諸如3D-MPL)。此佐劑可包含(每0.5 mL劑量) 100 μ g-750 μ g、200 μ g-500 μ g或300 μ g-400 μ g如磷酸鋁之Al及5 μ g-60 μ g、10 μ g-50 μ g或20 μ g-30 μ g (例如5 μ g-15 μ g、40 μ g-50 μ g、10 μ g、20 μ g、30 μ g、40 μ g或50 μ g)脂質A衍生物(例如3D-MPL)。

此佐劑尤其適合於嬰兒或老年人疫苗調配物。在一實施例中，包含此佐劑之疫苗組合物包含衍生自至少所有下列血清型之醣結合物：4、6B、9V、14、18C、19F、23F、1、5、7F(且亦可包含血清型3、6A、19A及22F中之一或多者)，其中在人類接種者中所誘導之抵擋一或多種(或所有)疫苗組份4、6B、9V、14、18C、19F及23F之GMC抗體滴度並非顯著低於由Pprevnar®疫苗所誘導者。

含有本發明之免疫原組合物的疫苗製劑可用於藉由經全身或黏膜途徑投予該疫苗來保護或治療易受感染的哺乳動物。該等投藥可包括經由肌肉內、腹膜內、皮內或皮下注射途徑，或經黏膜投予口/食道、呼吸道、泌尿生殖道。對於治療肺炎或中耳炎而言，鼻內投予疫苗較佳(使得可更有效預防肺炎球菌經鼻咽攜帶，因此在其最初階段削弱感染)。儘管本發明之疫苗可作為單一劑量投藥，然而其組份亦可在同時或不同時刻共同投藥(例如肺炎球菌醣結合物可分別在投予疫苗之任何細菌蛋白組份同時或1-2週後投藥，使免疫反應關於彼此最佳配合)。就共同投藥而言，可選Th1佐劑可存在於任何或所有不同投藥中。除單一投藥途徑外，可使用2個不同投藥途徑。舉例而言，醣或醣結合物可IM(或ID)投藥且細菌蛋白可IN(或ID)投藥。此外本發明之疫苗可IM投藥用以起動劑量(priming dose)，且IN投藥用以加強劑量(booster

dose)。

疫苗中蛋白質抗原的含量通常在 $1\ \mu\text{g}$ - $100\ \mu\text{g}$ ，較佳 $5\ \mu\text{g}$ - $50\ \mu\text{g}$ 範圍內，最通常在 $5\ \mu\text{g}$ - $25\ \mu\text{g}$ 範圍內。繼啓始接種後，受試者可接受充分間隔之一或若干次加強免疫。

在疫苗設計(Vaccine Design)中一般描述疫苗之製備("The subunit and adjuvant approach"(Powell M.F.及Newman M.J.編)(1995) Plenum Press New York)。Fullerton之美國專利第4,235,877號中描述脂質體內之莢膜封閉。

本發明之疫苗可儲存於溶液中或凍乾儲存。較佳該溶液在諸如蔗糖或乳糖之糖的存在下凍乾。更佳地，其經凍乾並在使用前臨時復原。在存在3D-MPL及不存在鋁基佐劑的情況下，凍乾可產生更為穩定的組合物(疫苗)且可能產生更高的抗體滴度。

在本發明之一態樣中，提供疫苗套組，其包含一含有本發明之免疫原組合物(視情況凍乾形式)的瓶，且進一步包含一含有如本文所述之佐劑的瓶。預期在本發明之此態樣中，佐劑將用於使凍乾免疫原組合物復原。

儘管本發明之疫苗可藉由任何途徑投藥，然而將所述疫苗投予皮膚中(ID)形成本發明之一實施例。人類皮膚包含覆蓋表皮之外部"角質"皮，稱為角質層。此表皮以下為稱為真皮之層，其隨後覆蓋皮下組織。研究者展示將疫苗注射入皮膚(且尤其真皮中)刺激免疫反應，其亦可與多種其他有利之處相關。以本文所述之疫苗經皮內接種形成本發明之較佳特徵。

皮內注射之習知技術，"孟陀式(mantoux)程序"包含下列步驟，清潔皮膚，且接著用一隻手張緊皮膚，且在窄規(narrow gauge)針(26-31號)之斜面面向上的情況下以 10° - 15° 之間的角度插入針。在針之斜面插入後，使針筒下降並在提供輕微壓力的情況下進一步推進以使其於

皮膚下抬高。接著非常緩慢地將液體注入，藉此在皮膚表面上形成疣或凸塊，隨後緩慢抽出針。

近來，已描述經特別設計以將液體藥劑投予皮膚中或穿過皮膚投藥的裝置，例如WO 99/34850及EP 1092444中所述之裝置，及(例如)WO 01/13977; US 5,480,381、US 5,599,302、US 5,334,144、US 5,993,412、US 5,649,912、US 5,569,189、US 5,704,911、US 5,383,851、US 5,893,397、US 5,466,220、US 5,339,163、US 5,312,335、US 5,503,627、US 5,064,413、US 5,520,639、US 4,596,556、US 4,790,824、US 4,941,880、US 4,940,460、WO 97/37705及WO 97/13537中所述之噴射注射裝置。皮內投予疫苗製劑的替代性方法可包括習知之注射器及針，或供彈道式遞送固體疫苗設計之裝置(WO 99/27961)，或經皮貼片(WO 97/48440; WO 98/28037)；或施加至皮膚表面(經皮遞送，WO 98/20734; WO 98/28037)。

當本發明之疫苗待投予皮膚中或更特定而言投予真皮中時，疫苗具有低液體體積，尤其約0.05 ml與0.2 ml之間的體積。

本發明之皮膚中或皮內疫苗中抗原的含量可類似於肌肉內疫苗中發現的習知劑量(參看上文)。然而，皮膚或皮內疫苗之特徵為調配物可為"低劑量"。因此，"低劑量"疫苗中之蛋白抗原較佳以少達每劑量0.1 μg 至10 μg 、較佳0.1 μg 至5 μg 存在；且醣(較佳經結合)抗原可以每劑量醣0.01 μg -1 μg ，且較佳0.01 μg 至0.5 μg 之間的範圍存在。

如本文所使用之術語"皮內遞送"意謂將疫苗遞送至皮膚中之真皮區域中。然而，疫苗不必僅位於真皮中。真皮為位於距離人皮膚表面約1.0 mm與約2.0 mm之間的皮膚層，但個體之間及身體之不同部分之間存在一定量的差異。一般而言，可預期進入皮膚表面1.5 mm以下達到真皮。真皮位於表面角質層及表皮與下部之皮下層之間。視遞送方

式而定，最終疫苗可完全或主要位於真皮內或最終其可分配於表皮及真皮內。

本發明進一步提供一種改良疫苗，其藉由添加嗜血性流感桿菌蛋白(例如游離或經結合形式之蛋白D)來預防或改善由嗜血性流感桿菌引起之中耳炎。此外，本發明進一步提供一種改良之疫苗，其依靠將以游離或經結合蛋白形式之一或兩種肺炎球菌蛋白添加至本發明之肺炎鏈球菌結合物組合物中來預防或改善嬰兒之肺炎球菌感染(例如中耳炎)。該等肺炎球菌游離蛋白可與用作載體蛋白質之任何肺炎鏈球菌蛋白相同或不同。組合疫苗中亦可包括游離或經結合形式之一或多種卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)蛋白抗原。因此，本發明為引發抵擋嬰兒中耳炎之(防護性)免疫反應的改良方法。

在另一實施例中，本發明為藉由投予安全且有效量之本發明疫苗[兒科疫苗]來引發嬰兒(本發明之內容中定義為0-2歲)(防護性)免疫反應的改良方法。本發明之其他實施例包括提供本發明之供醫療使用之抗原肺炎鏈球菌結合物組合物及本發明之肺炎鏈球菌結合物於製造預防(或治療)肺炎球菌疾病之藥劑的用途。

在另一實施例中，本發明為藉由投予安全且有效劑量之本發明疫苗，較佳連同一或兩種以游離或經結合蛋白存在之肺炎鏈球菌蛋白(其中游離肺炎鏈球菌蛋白可與任何用作載體蛋白質之肺炎鏈球菌蛋白相同或不同)來引發老年人口群(本發明內容中若患者年齡為50歲或以上，通常55歲以上，且更一般而言60歲以上者，則認為其為老年人)(防護性)免疫反應的改良方法。

本發明之另一態樣為一種使人類宿主對由肺炎鏈球菌及視情況嗜血性流感桿菌感染引起之疾病免疫的方法，其包含投予該宿主免疫防護劑量之本發明之免疫原組合物或疫苗或套組。

本發明之另一態樣為本發明之用於治療或預防由肺炎鏈球菌及

視情況嗜血性流感桿菌感染引起之疾病的免疫原組合物。

本發明之另一態樣為本發明之免疫原組合物或疫苗或套組於製造用於治療或預防由肺炎鏈球菌及視情況嗜血性流感桿菌感染引起之疾病的藥劑中的用途。

發明者意欲本文中術語"包含"在每次出現時視情況分別可用"由…組成"來替代。

本文中與本發明之"疫苗組合物"相關的實施例亦適用於與本發明之"免疫原組合物"相關的實施例，且反之亦然。

本專利說明書中所引用的所有參考或專利申請案均以引用的方式併入本文中。

為使更好地理解本發明，陳述下列實例。該等實例僅出於說明之目的，且不應理解為以任何方式限制本發明之範疇。

【圖式簡單說明】

圖1展示老年恆河猴中11價結合物免疫原性的直方圖。較淺色之條柱表示用磷酸鋁佐劑中之11價結合物兩次接種後的GMC。較淺色之條柱表示用磷酸鋁佐劑中之11價結合物兩次接種後的GMC。較深暗色之條柱表示用佐劑C中之11價結合物兩次接種後的GMC。

圖2展示用佐劑C或磷酸鋁佐劑中之11價結合物接種後PS3之記憶B細胞的直方圖。

圖3展示Balb/C小鼠中4價普通多醣及4價dPly結合物之抗多醣19F免疫原性的直方圖。

圖4展示Balb/C小鼠中4價普通多醣及4價PhtD結合物之抗多醣22F免疫原性的直方圖。

圖5展示Balb/C小鼠中抗22F IgG反應之直方圖。

圖6展示Balb/C小鼠中抗22F調理吞噬(opsono-phagocytosis)滴度的直方圖。

圖7比較幼年C57B1小鼠在以調配於不同佐劑中之13價結合物疫苗免疫後誘導之IgG反應直方圖。

圖8展示猴之肺炎模型中不同疫苗組合防護效果之直方圖。

圖9 Balb/C小鼠經22F-PhtD或22F-AH-PhtD結合物免疫後抗PhtD IgG反應之直方圖。

圖10小鼠經22F-PhtD或22F-AH-PhtD免疫後抵擋4型肺炎球菌攻擊之保護。

【實施方式】

實例

實例1：蛋白D之表達

嗜血性流感桿菌蛋白D

蛋白D表達之遺傳構造

起始物質

編碼蛋白D之DNA

在所有血清型及非可分型菌株之嗜血性流感桿菌間蛋白D高度保守。含編碼整個蛋白D基因之DNA序列的載體pHIC348已由Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmö General Hospital, Malmö, Sweden獲得。蛋白D之DNA序列已由Janson等人(1991)Infect. Immun. 59：119-125公開。

表達載體pMG1

表達載體pMG1為pBR322之衍生物(Gross等人，1985)，其中引入用於轉錄及轉譯外源插入基因之噬菌體 λ 衍生之控制元素(Shatzman等人，1983)。此外，抗胺苄青黴素(Ampicillin)基因與抗卡那黴素(Kanamycin)基因交換。

大腸桿菌菌株AR58

大腸桿菌菌株AR58係經由先前生長於SA500衍生物上之P1噬菌

體原種(stock)轉導N99產生(*galE::TN10*, λ -*Kil⁻cI857 Δ H1*)。N99及SA500為來源於國家健康學會(National Institute of Health)之Dr. Martin Rosenberg實驗室的大腸桿菌K12菌株。

表達載體pMG1

為產生蛋白D，將編碼蛋白之DNA選殖於表達載體pMG1中。此質體利用來自 λ 噬菌體DNA之信號來驅動插入之外源基因的轉錄及轉譯。載體含有啟動子PL、操縱子OL及兩個利用位點(NutL及NutR)以當提供N蛋白時減輕轉錄極化效應(Gross等人，1985)。將含PL啟動子之載體引入大腸桿菌溶原性宿主中以使質體DNA穩定。溶原性宿主菌株含有併入基因體中之複製缺陷 λ 噬菌體DNA(Shatzman等人，1983)。染色體 λ 噬菌體DNA引導cI阻遏蛋白之合成，該阻遏蛋白與載體之OL阻遏物結合且防止RNA聚合酶與PL啟動子結合且藉此防止插入基因之轉錄。表達菌株AR58之cI基因含有溫度敏感性突變體，使得可藉由溫度變化來調節PL引導之轉錄，亦即培養溫度之增加使阻遏物鈍化並啟動外源蛋白之合成。此表達系統使外源蛋白尤其彼等可能對細胞具有毒性者之合成受控(Shimataka及Rosenberg, 1981)。

大腸桿菌菌株AR58

用於產生蛋白D載體之AR58溶原性大腸桿菌菌株為標準NIH大腸桿菌K12菌株N99的衍生物(*F⁻ su⁻ galK2, lacZ⁻ thr⁻*)。其含有缺陷溶原性 λ 噬菌體(*galE::TN10*, λ -*Kil⁻ cI857 Δ H1*)。*Kil⁻*表型防止宿主高分子合成之中斷。*cI857*突變賦予cI阻遏物以溫度敏感性損害。 Δ H1缺失移除 λ 噬菌體右操縱子及宿主*bio*、*uvr3*及*chlA* loci。AR58菌株係經由先前生長於SA500衍生物上之P1噬菌體原種轉導N99產生(*galE::TN10*, λ -*Kil⁻cI857 Δ H1*)。由於相鄰*galE*基因中存在編碼抗四環素性之TN10轉座子，因此用四環素來選擇缺失性溶源於N99中之引入。

載體pMGMDPPrD之構造

使用含有編碼流行感冒病毒(pMGNSI)之非結構S1蛋白之基因的pMG 1載體來構造pMGMDPPrD。藉由PCR自pHIC348載體擴增蛋白D基因(Janson等人, 1991 Infect. Immun. 59:119-125)而PCR引子在5'及3'端分別含有NcoI及XbaI限制性位點。接著將NcoI/XbaI片段引入NcoI與XbaI之間的pMGNS1中, 因此產生含NS1蛋白隨後PD蛋白之N端81胺基酸的融合蛋白。此載體標記為pMGNS1PrD。

根據上述構造，產生蛋白D表達之最終構造。自pMGNS1PrD移除BamHI/BamHI片段。此DNA水解移除除前三個N端殘基以外的NS1編碼區域。載體再配接後，產生具有下列N端胺基酸序列之編碼融合蛋白之基因：

-----MDP SSHSSNMANT-----

NS1 蛋白D

蛋白D不含通常類脂鏈附接於其之前導肽或N端半胱胺酸。因此蛋白既不排泄入周質中亦不富含脂質，而以可溶形式保持於細胞質中。

藉由37°C下之熱休克將最終構造pMG-MDPPrD引入AR58宿主菌株中。含有質體之細菌在卡那黴素存在下選擇。藉由用經選擇之核酸內切酶消化分離之質體DNA證實存在編碼蛋白D之DNA插入物。重組大腸桿菌菌株稱為ECD4。

蛋白D之表達受到 λ P_L啟動子/O_L操縱子之控制。宿主菌株AR58在基因體中含有溫度敏感性cI基因，其在低溫下藉由與O_L結合阻擋自 λ P_L表達。當升溫後，cI自O_L釋放且蛋白D得以表達。

小規模製備

醱酵結束時濃縮並冷凍細胞。

如下進行自所得細胞之萃取及蛋白D之純化。將冷凍細胞培養丸粒解凍並再懸浮於細胞破壞溶液(檸檬酸鹽緩衝液pH 6.0)中至最終OD₆₅₀=60。在P=1000 bar下使懸浮液穿經高壓均質器兩次。藉由離心

使細胞培養勻漿澄清且藉由過濾移除細胞碎片。在第一純化步驟中，將經過濾之溶菌液施加於陽離子交換層析柱(SP瓊脂糖凝膠Fast Flow)中。PD藉由離子相互作用與凝膠基質結合並藉由溶離緩衝液之離子強度的逐步增加而溶離。

在第二純化步驟中，雜質保留於陰離子交換基質上(Q瓊脂糖凝膠Fast Flow)。PD並非與凝膠結合，且可於滲流(flow through)中收集。

在兩個柱層析步驟中，餾分之收集受OD監控。藉由超濾來濃縮含純化蛋白D之陰離子交換柱層析的滲流。

含蛋白D之超濾保留物最後穿經0.2 μ m膜。

大規模製備

如下進行自所得細胞之萃取及蛋白D之純化。使所得肉湯冷卻並直接穿經約800 bar壓力之高壓均質器兩次。

在第一純化步驟中細胞培養勻漿經稀釋並施加至陽離子交換層析柱(SP瓊脂糖凝膠Big beads)。PD藉由離子相互作用與凝膠基質結合並藉由溶離緩衝液之離子強度的逐步增加而溶離且過濾。

在第二純化步驟中，雜質保留於陰離子交換基質上(Q瓊脂糖凝膠Fast Flow)。PD並非與凝膠結合，且可於滲流中收集。

在兩個柱層析步驟中，餾分之收集受OD監控。藉由超濾來濃縮並透濾含純化蛋白D之陰離子交換柱層析的滲流。

含蛋白D之超濾保留物最後穿經0.2 μ m膜。

實例1b: PhtD之表達

PhtD蛋白為肺炎球菌組胺酸-三聯體(Pht)蛋白家族之成員，其特徵為存在組胺酸-三聯體(HXXHXXH基元)。PhtD為838 aa分子且攜帶5種組胺酸三聯體(參看MedImmune WO00/37105胺基酸序列SEQ ID NO:4及DNA序列SEQ ID NO:5)。PhtD中間(胺基酸位置348-380)亦含有富含脯胺酸之區域。PhtD具有20個具有LXXC基元之aa-N端信號序列。

遺傳構造

使用攜帶p λ 啟動子之內部pTCMP14載體將成熟MedImmune PhtD蛋白之基因序列(aa 21至aa 838)以重組方式傳遞至大腸桿菌。大腸桿菌宿主菌株為AR58，其攜帶cI857熱敏性阻遏物以允許熱誘導啟動子。

實現聚合酶鏈反應以自MedImmune質體(攜帶來自肺炎鏈球菌菌株Norway 4(血清型4)之phtD基因-SEQ ID NO:5，如WO 00/37105中所述)擴增phtD基因。使用僅對phtD基因特異之引子在兩個片段中擴增phtD基因。引子攜帶NdeI及KpnI或KpnI及XbaI限制位點。該等引子並不與載體之任何核苷酸雜交而僅與phtD特異性基因序列雜交。使用攜帶NdeI限制位點之第一引子來插入人造ATG起始密碼子。接著將所產生之PCR產物插入pGEM-T選殖載體(Promega)中，並確定DNA序列。接著使用標準技術實現TCMP14表達載體中之片段次選殖(Subcloning)並使載體轉化成AR58大腸桿菌。

PhtD純化

如下達成PhtD純化：

在卡那黴素存在下大腸桿菌細胞之生長：30℃下生長30小時接著於39.5℃下誘導18小時。

在作為蛋白酶抑制劑之EDTA 5 mM及PMSF 2 mM存在下於OD₆₀₀±115下破壞整個培養物之大腸桿菌細胞：Rannie，2代，1000 bar。

在室溫下(20℃)，以膨脹床式流線型Q XL層析截獲抗原並移除細胞碎片；柱用NaCl 150 mM+Empigen 0.25% (pH 6.5)洗滌並用於25 mM磷酸鉀緩衝液(pH 7.4)中之NaCl 400 mM+Empigen 0.25%溶離。

於Sartobran 150濾筒(0.45+0.2 μ m)上過濾

在4℃，5 mM咪唑存在下，抗原在pH 7.4下結合於Zn⁺⁺螯合瓊脂糖凝膠FF IMAC層析上；柱用咪唑5 mM及Empigen 1%洗滌並用50 mM咪唑溶離，兩者均於25 mM磷酸鉀緩衝液中(pH 8.0)。

在4°C，pH 8.0(25 mM磷酸鉀)下，Fractogel EMD DEAE上陽性模式之弱陰離子交換層析；柱用140 mM NaCl洗滌並用200 mM NaCl溶離，而雜質(蛋白及DNA)仍吸附於交換劑上。

在50 kDa膜上用2 mM Na/K磷酸酯(pH 7.15)濃縮並超濾。

於Millipak 20之0.2 μ m濾筒上無菌過濾經純化之物料。

實例1c：肺炎球菌溶血素之表達

如WO 2004/081515及WO 2006/032499中所述製備肺炎球菌肺炎球菌溶血素並對其加以解毒。

實例2：

結合物之製備

在此項技術中已熟知如何製備經純化之肺炎球菌多醣。出於該等實例之目的，基本上如EP072513所述或藉由密切相關之方法來製備多醣。在結合前可藉由如下所述之微流化來裁切多醣尺寸。

活化及偶合條件對各多醣為特定的。表1中給出該等條件。將經裁切尺寸之多醣(除PS5、6B及23F外)溶解於NaCl 2M、NaCl 0.2M或供注射用之水(WFI)中。估算所有血清型之最佳多醣濃度。如下詳述，除血清型18C外之所有血清型均直接與載體蛋白質結合。製備兩種替代性血清型22F結合物，一種直接結合，一種經由ADH鍵聯劑結合。

自於乙腈或乙腈/水50%/50%溶液中之100 mg/ml原種溶液將CDAP (CDAP/PS之比為0.5-1.5 mg/mg PS)添加至多醣溶液中。1.5分鐘後，添加0.2M-0.3M NaOH以獲得特定活化pH。在此pH, 25°C下之3分鐘期間進行多醣之活化。將經純化之蛋白(蛋白D、PhtD、肺炎球菌溶血素或DT)(其量視啓始PS/載體蛋白質之比而定)添加至經活化之多醣並在特定pH下歷時多至2小時(視血清型而定)在pH調節下進行偶合反應。為使抑制未經反應的氰酸酯基，接著將2M甘胺酸溶液添加至混合物中。調節pH值至中止pH值(pH 9.0)。在25°C下攪拌溶液30分鐘接著

於2°C -8°C 下連續緩慢攪拌隔夜。

18C之製備：

18C經由鍵聯劑-己二醯肼(ADH)與載體蛋白質鍵聯。多醣血清型18C在結合前經微流化。

用EDAC使破傷風類毒素衍生

為使破傷風類毒素衍生，將經純化之TT以25 mg/ml稀釋於0.2M NaCl中，並添加ADH間隔基以達到0.2M之最終濃度。當完成間隔基之溶解時調節pH值至6.2。接著添加EDAC(1-乙基-3-(3-二甲基-胺丙基)碳化二亞胺)以達到0.02M之最終濃度並在pH調節下攪拌混合物1小時。在25°C下藉由將pH值增加至多至9.0歷時至少30分鐘使縮合反應停止。

接著透濾經衍生之TT(10 kDa CO膜)以便移除殘餘ADH及EDAC試劑。

最後將TTAH物料無菌過濾直至偶合步驟並於-70°C下儲存。

TT_{AH}與PS 18C之化學偶合

結合參數之細節可於表1中發現。

將2公克微流化PS以規定濃度稀釋於水中並藉由添加NaCl粉末調節至2M NaCl。

添加CDAP溶液(100 mg/ml於50/50 v/v乙腈/WFI中之新鮮製備)以達到合適的CDAP/PS比。

藉由添加0.3M NaOH使pH值升高至活化pH 9.0並在此pH值下穩定直至添加TTAH。

3分鐘後，添加衍生之TTAH(20 mg/ml於0.2 M NaCl中)達到TTAH/PS之比為2；調節pH值至偶合pH 9.0。在pH調節下將溶液放置1小時。

為使反應中止，將2M甘胺酸溶液添加至混合物PS/TTAH/CDAP

中。

調節pH值至中止pH值(pH 9.0)。

在25℃下攪拌溶液30分鐘，且接著2℃-8℃下，在不間斷緩慢攪拌下隔夜放置。

PS22F_{AH}-PhtD結合物

在此醣之第二結合方法中(第一為表1所示至直接PS22 -PhtD結合法)，22F經由鍵聯劑-己二醯肼(ADH)與載體蛋白質鍵聯。多醣血清型22F在結合前經微流化。

PS 22F之衍生

在控溫水浴中在25℃之連續攪拌下進行活化及偶合。

稀釋微流化PS22F以獲得於0.2M NaCl中6 mg/ml之最終PS濃度，且用0.1N HCl調節溶液pH值為 6.05 ± 0.2 。

添加CDAP溶液(100 mg/ml於50/50 v/v乙腈/WFI中之新鮮製備)以達到合適的CDAP/PS比(1.5/1 w/w)。

藉由添加0.5M NaOH使pH值升高至活化pH 9.00 ± 0.05 並在此pH值下穩定直至添加ADH。

3分鐘後，添加ADH以達到合適之ADH/PS比(8.9/1 w/w)；將pH調節至偶合pH 9.0。在pH調節下將溶液放置1小時。

濃縮並透濾PSAH衍生物。

偶合

將於0.2M NaCl中之10 mg/ml PhtD添加至PS22FAH衍生物中以便達到PhtD/PS22FAH之比為4/1(w/w)。用HCl調節pH值至 5.0 ± 0.05 。在10分鐘(250 μ l/min)內手動添加EDAC溶液(20 mg/ml於0.1M Tris-HCl中，pH 7.5)以達到1 mg EDAC/mg PS22F_{AH}。將所得溶液在攪拌及pH調節下25℃培養150分鐘(但亦可使用60分鐘)。溶液藉由添加1M Tris-HCl pH 7.5 (最終體積之1/10)來中和並於25℃下放置30分鐘。

在Sephacryl S400HR溶離之前，使用5 μm Minisart過濾器使結合物澄清。

所得結合物之最終PhtD/PS比為4/1(w/w)，游離PS含量低於1%且抗原性(α -PS/ α -PS)為36.3%且抗PhtD抗原性為7.4%。

結合物之純化：

使用以0.15 M NaCl平衡之Sephacryl S400HR凝膠過濾柱(18C之S500HR)藉由凝膠過濾來純化結合物以移除小分子(包括DMAP)及未經結合之PS及蛋白。基於反應物組份之不同分子尺寸，PS-PD、PS-TT、PS-PhtD、PS-肺炎球菌溶血素或PS-DT結合物首先經溶離，隨後為游離PS，接著游離PD或游離DT，且最後為DMAP及其他鹽(NaCl、甘胺酸)。

藉由UV_{280 nm}偵測含結合物之餾份。餾分根據其Kd混合、無菌過濾(0.22 μm)並於+2-8℃下儲存。測定結合物製劑中PS/蛋白之比。

PS肺炎鏈球菌-蛋白D/TT/DT/PhtD/Ply結合物之特定活化/偶合/抑制條件。

若列首出現"微流體"，則其指示醣在結合前藉由微流化裁切尺寸。表2給出微流化後之醣的尺寸。

表1 PS肺炎鏈球菌-蛋白D/TT/DT/PhtD/Ply結合物之特定活化/偶合/抑制條件。

血清型	1 微流體	4 微流體	5	6A	6B	7F 微流體
PS濃度 (mg/ml)	2.5	2.5	7.1	5.0	5.0	5.0
PS溶解	WFI	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD濃度 (mg/ml)	10.0	10.0	5.0	5.0	5.0	10.0
啓始PD/PS比 (w/w)	1.5/1	1.5/1	1/1	1/1	1.1/1	1.2/1
CDAP濃度 (mg/mg PS)	0.50	0.50	0.79	0.83	0.83	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0

血清型	9V 微流體	14 微流體	18C 微流體	19A 微流體	19F 微流體	22F 微流體	23F
PS濃度 (mg/ml)	5.0	5.0	4.5	15.0	9.0	6.0	2.38
PS溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 0.2M	NaCl 2M
載體蛋白質 濃度(mg/ml)	10.0	10.0	20.0 (TT)	10.0 (Ply)	20.0 (DT)	10.0 (PhtD)	5.0
啓始載體蛋 白質 /PS 比 (w/w)	1.2/1	1.2/1	2/1	2.5/1	1.5/1	3/1	1/1
CDAP濃度 (mg/mg PS)	0.50	0.75	0.75	1.5	1.5	1.5	0.79
pH _a =pH _c =pH _q	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0

註釋pH_a、pH_c、pH_q分別相應於活化、偶合及抑制pH值。

表徵：

各結合物得以表徵並符合表2中所述之要求。藉由間苯二酚測試來量測多醣之含量 (μg/ml) 且藉由 Lowry 測試來量測蛋白質含量 (μg/ml)。藉由濃度之比來測定最終PS/PD之比(w/w)。

游離多醣含量(%)：

用 α -載體蛋白質抗體及飽和硫酸銨培養隨後離心後所獲得的清液測定4℃下保存或37℃下儲存7天之結合物的游離多醣含量。

使用 α -PS/ α -PS ELISA來確定清液中游離多醣之量。結合物之缺乏亦由 α -載體蛋白質/ α -PS ELISA來控制。

抗原性：

在夾層型ELISA中分析相同結合物之抗原性，其中截獲及偵測之抗體分別為 α -PS及 α -蛋白。

游離蛋白質含量(%)：

在純化步驟期間可將未經結合之載體蛋白質與結合物分離。使用尺寸排阻層析(TSK 5000-PWXL)隨後UV偵測(214 nm)來確定游離殘餘蛋白之含量。溶離條件使得將游離載體蛋白質與結合物分離。接著對照校正曲線來確定結合物物料中之游離蛋白質含量(0 μg/ml至50 μg/ml載體蛋白質)。如下獲得以%計之游離載體蛋白質：游離載體%=(游離載體(μg/ml))/(藉由Lowry量測之相應載體蛋白質總濃度

(μ g/ml) $\times$ 100%)。

穩定性：

以 HPLC-SEC 凝膠過濾 (TSK 5000-PWXL) 量測於 4℃ 下保存及 37℃ 下儲存 7 天之結合物的分子量分佈 (K_{av}) 及穩定性。

表 2 給出 10/11/13/14 價表徵 (參看其下之註釋)

蛋白結合物可吸附於磷酸鋁上並混合形成最終疫苗。

結論：

產生免疫原結合物，其經證明為有前景之疫苗的組份。

表 2- 結合物之表徵

結合物	PS 尺寸 (Da $\times$ 10 ³)	載體/PS 比	游離 PS (Elisa)	游離載體	PS 抗原性 (Elisa)	結合物尺寸 (kDa)
PS1-PD	349-382*	1.5-1.6	1.0%-1.2%	3.9%-4.8%	87%-95%	1499 - 1715
PS4-PD	93-100*	1.5-1.6	4.7-6.5%	3.2%-4.0%	90%-96%	1303 - 1606
PS5-PD***	367-443	0.80	8.7-11.2%	2.2%-3.8%	93%-108%	1998-2352
PS6A-PD	1100-1540	0.61	4.5%	未表徵	45.9%	未表徵
PS6B-PD***	1069-1391	0.7-0.8	1.3-1.6%	<2.0%	68%-75%	4778-5235
PS7F-PD	255-264*	1.1-1.2	<1%	<1.4%	58%	3907-4452
PS9V-PD	258-280*	1.3-1.5	<1%	<1.3%	67%-69%	9073-9572
PS14-PD	232-241*	1.4	<1%	<1.5%	70%	3430-3779
PS18C-TT"	89-97*	2.2-2.4	1.5-2.2%	<4%	46%-56%	5464-6133
PS19A-Ply*	151	3.2	<1%		29%	
PS19F-DT	133-143*	1.4-1.5	4.1%-5.9%	<1.2%-<1.3%	82%-88%	2059-2335
PS22F-PhtD*	159-167	2.17	5.8	未表徵	37%	未表徵
PS22F-AHPhtD*	159-167	3.66-4.34	<1%	未表徵	28-31%	未表徵
PS23F-PD***	914-980	0.5	1.4-1.9%	3.7%-4.9%	137%-154%	2933-3152

* 天然 PS 微流化後之 PS 尺寸。

藉由混合血清型 1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F 及 23F 結合物 (例如以每人類劑量分別 1 μ g、3 μ g、1 μ g、1 μ g、1 μ g、1 μ g、1 μ g、3 μ g、3 μ g、1 μ g 劑量之醣) 來製備 10 價疫苗。藉由進一步添加表 5 中之血清型 3 結合物 (例如以每人類劑量 1 μ g 之醣) 來製備 11 價疫苗。藉由進一步添加以上血清型 19A 及 22F 結合物 (22F 直接與 PhtD 鍵聯或經由 ADH 鍵聯劑鍵聯) [例如以每人類劑量 3 μ g 劑量之各醣] 來製備 13 價疫苗。可藉由進一步添加以上血清型 6A 結合物 (例如以每人類劑量

1 μ g醣)來製備14價疫苗。

實例3：本發明之免疫原組合物中包含嗜血性流感桿菌蛋白D可提供抵擋急性中耳炎(AOM)之改良保護的證據。

研究設計

該研究使用11Pn-PD疫苗-其包含各自與嗜血性流感桿菌之蛋白D結合的血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F及23F(參考實例4中表5)。將受試者隨機分成兩組以在大致3、4、5及12-15個月的月齡下接受四劑量之11Pn-PD疫苗或Havrix。所有受試者在3、4及5個月的月齡下同時接受GSK Biological之嬰萬護(Infanrix-hexa)(DTPa-HBV-IPV/Hib)疫苗。嬰萬護為Pediarix與Hib投藥前混合之組合。用於"根據協定"分析之效果追蹤調查開始於投予第三疫苗劑量後2週，且延續至24-27個月之月齡。估測經選擇之受試者子組中肺炎鏈球菌及嗜血性流感桿菌之鼻咽部攜帶。

建議父母若其孩子嘔吐、耳痛、自發性鼓膜穿破或自發性耳分泌則諮詢研究員。若研究員懷疑其為AOM發作，則應使孩子立即求助於耳、鼻及喉(ENT)專家以確診。

AOM之臨床診斷係基於鼓膜之外觀(亦即紅、腫脹、無光反射)或存在中耳流體滲出物(如藉由簡單或氣動式耳鏡檢查或藉由顯微法加以證實)。此外，必須存在至少兩種下列跡象或症狀：耳痛、耳分泌、聽力喪失、發燒、嗜睡、興奮增盛、厭食、嘔吐或腹瀉。若ENT專家證實臨床診斷，則藉由鼓膜穿刺抽水收集中耳流體樣本以供細菌測試。

對於重複遭受病痛侵襲之受試者而言，若自上次發作開始算起已超過30天，則認為係引發新的AOM發作。此外，無論兩次連續發作間相隔的時間為何，只要分離之細菌 /血清型與前述分離物不同，則認為該AOM發作為新細菌引起之發作。

試驗結果

招募共4968個嬰兒，2489個為11Pn-PD組，而2479為對照組。兩組之間不存在較大的人口特徵或風險因數差異。

臨床發作及AOM病案定義

在根據協定追蹤調查期間，11Pn-PD組中記錄共333個臨床AOM發作，且對照組499個。

表3表示11Pn-PD疫苗，及先前Finland (Eskola等人 *N Engl J Med* 2001; 344:403-409及Kilpi等人 *Clin Infect Dis* 2003 37: 1155-64)測試之兩種7價疫苗抵擋任何AOM發作及由不同肺炎球菌血清型、嗜血性流感桿菌、NTHi及卡他莫拉菌引起之AOM的防護效果。

不論病因為何，藉由11Pn-PD可使所有AOM疾病負荷達成統計學上顯著的減輕及使臨床相關症狀減少33.6% (表3)。

歸功於11Pn-PD疫苗中所含之11種肺炎球菌血清型之任一種之抵擋AOM發作作用之總體效果為57.6% (表3)。

當前研究中之另一重要發現為11Pn-PD疫苗在抵擋由嗜血性流感桿菌引起之AOM上提供35.6%的保護(尤其NTHi提供35.3%的保護)。既然在肺炎球菌結合物疫苗時代，嗜血性流感桿菌成為AOM之主要原因而重要性大為增加，因此該發現具有重要的臨床意義。在2歲時給予追加劑量之11Pn-PD疫苗後，與抵擋AOM之保護作用一樣，鼻咽所攜帶之嗜血性流感桿菌量亦減少。該等發現與前述Finland之觀察相反，Finland觀察到就兩種7價肺炎球菌結合物疫苗而言，歸因於嗜血性流感桿菌之AOM發作增加(Eskola等人及Kilpi等人)，此顯示致病物發生替換。

抵擋歸因於Hi之AOM發作的保護作用與抵擋載體蛋白質D之抗體含量之間無法建立明確的關係，此係由於在效果追蹤調查期間，無Hi AOM發作之11Pn-PD接種者於首次接種後之抗PD IgG抗體濃度基本上與在發生至少一次Hi AOM發作之11Pn-PD接種者中所量測到的首次接

種後抗PD IgG抗體量相同。然而，儘管疫苗之生物影響與首次接種抗PD IgG後之免疫原性之間無法建立相關性，然而可以合理地推定在嗜血性流感桿菌菌株之間具有高度保守性的PD載體蛋白質在誘導抵擋Hi之保護作用上貢獻良多。

對AOM疾病之作用伴隨對鼻咽攜帶量之作用，其中疫苗血清型肺炎球菌及嗜血性流感桿菌具有類似的量值(圖1)。該PD結合物接種者中嗜血性流感桿菌之鼻咽攜帶之此減少支持下列假設：即使防護效果與ELISA所量測到之抗PD IgG免疫反應不相關，PD結合物疫苗仍具有抵擋嗜血性流感桿菌之直接防護效果。

在下列實驗中，使用具有來自用本實例之11價調配物或實例2之10價疫苗免疫之嬰兒的混合血清的栗鼠中耳炎模型(亦見表1及2及以下註釋)。對比免疫前混合血清，兩種混合血清均誘導患有中耳炎之動物百分比顯著減少。10價與11價免疫混合血清之間不存在顯著差異。其證實兩種疫苗具有誘導抵擋此模型之由非可分型嗜血性流感桿菌引起之中耳炎保護的類似潛力。

表 3

AOM發作類型	11Pn-PD				FinOM中之Pneumonia(Eskola等)				FinOM中之7v-OMP (Kilip 等)			
	n		VE		n		VE		n		VE	
	11Pn-PD	對照	%	95%CI	7v-	CRM	對照	%	7v-	OMP	對照	%
	PD			LL UL								95%CI LL UL
N	2455	2452			786	794			805	794		
任何AOM	333	499	33.6	20.8 44.3	1251	1345	6	-4 16	1364	1345	-1	-12 10
具有MEF之任何AOM	322	474	32.4	19.0 43.6	1177	1267	7	-5 17	1279	1267	0	-12 10
經培養證實之肺炎球菌	92	189	51.5	36.8 62.9	271	414	34	21 45	314	414	25	11 37
疫苗肺炎球菌血清型(*)	60	141	57.6	41.4 69.3	107	250	57	44 67	110	250	56	44 66
其他細菌病原體												
嗜血性流感桿菌	44	68	35.6	3.8 57.0	315	287	-11	-34 8	315	287	-9	-32 10
非可分型嗜血性流感桿菌(NTHi)	41	63	35.3	1.8 57.4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NC	NP NP
卡他莫拉菌	31	34	9.4	-52.5 46.1	379	381	-1	-19 15	444	381	-16	-36 2

NP=未公開；N=ATP效果同齡組中受試者數目；n=發作數

*疫苗肺炎球菌血清型：11Pn-PD=11血清型Pneumonia及7v-OMP=7血清型

MEF=中耳流體

實例 4：**血清型 19F 之載體蛋白質選擇****使用 ELISA 檢定**

22F 抑制 ELISA 方法基本上係基於 Concepcion 及 Frasch 於 2001 提議，且由 Henckaerts 等人 (2006, *Clinical and Vaccine Immunology* 13:356-360) 報導之檢定。簡言之，經純化之肺炎球菌多糖與甲基化人血清白蛋白混合且在 4°C 下吸附於 Nunc Maxisorp™ (Roskilde, DK) 高結合微量滴定盤上隔夜。在室溫下在攪拌下用 10% 於 PBS 中之胎牛血清 (FBS) 封閉盤 1 小時。將血清樣品稀釋於含 10% FBS、10 µg/mL 細胞壁多醣 (SSI) 及 2 µg/mL 之血清型 22F 肺炎球菌多醣 (ATCC) 的 PBS 中，且進一步用相同緩衝液稀釋於微量滴定盤上。使用於 89-SF 中之血清型特異性 IgG 濃縮物參照標準血清 89-SF 校正之內參比經相同方式處理並包括於所有盤上。洗滌之後，使用稀釋於 10% FBS (PBS 中) 中之經過氧化物酶結合之抗人類 IgG 單株抗體 (Stratech Scientific Ltd., Soham, UK) 來偵測結合抗體，並在室溫下經攪拌將其培養 1 小時。在室溫下，於暗處使用備用之單組份四甲基聯苯胺過氧化物酶酶免疫檢定基板套組 (BioRad, Hercules, CA, US) 顯影顏色。用 H₂SO₄ 0.18 M 停止反應，並於 450 nm 處讀取光密度。藉由參考內參比血清曲線界限內之光密度點來計算樣品中之血清型特異性 IgG 濃度 (µg/mL)，該曲線藉由用 SoftMax Pro™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 軟體計算之 4-參數對數 log 方程式來模擬。對所有考慮偵測極限及量化極限的血清型而言，ELISA 之取捨點為 0.05 µg/mL IgG。

調理吞噬檢定 (opsonophagocytosis assay, OPA)

在 2003 年 6 月之 WHO 磋商會中，推薦使用如 Romero-Steiner 等人 *Clin Diagn Lab Immunol* 2003 10(6)：第 1019-1024 頁中所述之 OPA 檢定。此協定係用於在下列測試中測試血清型之 OPA 活性。

結合物之製備

在研究中包括11Pn-PD與Di-001及11Pn-PD與Di-007，三種11價疫苗調配物(表4)，其中3 µg之19F多醣與白喉類毒素結合(19F-DT)而非1 µg多醣與蛋白D結合(19F-PD)。表5、6及7中分別揭示供研究之11 Pn-PD、11 Pn-PD與Di-001及11 Pn-PD與Di-007之結合參數。

表8及9分別展示經由該等19F-DT調配物首次接種後一個月對血清型19F之抗肺炎球菌抗體反應及OPA活性。

表10展示23價普通多醣加強劑接種前後22F-ELISA抗體濃度及達0.2 µg/mL臨界值之受試者之百分比。

該等19F-DT調配物所誘導之抗體的調理吞噬活性明顯增加，此可由首次接種後一個月血清陽性比率(調理吞噬作用滴度 $\geq 1:8$)及OPA GMT較高而證實(表9)。在23價普通多醣加強劑接種後一個月，首次經19F-DT接種之兒童的19F抗體之調理吞噬活性仍顯著較佳(表11)。

表12呈現先前首次用19F-DT或19F-PD結合物接種之學步童在給予11Pn-PD加強劑量後之免疫原性數據，並與給予第四次連續Pneumovax®劑量者的免疫原性數據比較。既然在美國引進Pneumovax® (美國)後曾報導發生「免疫後發病(breakthrough)」之病例，而與DT載體蛋白質結合時對血清型19F之調理吞噬活性得以改良，因此11Pn-PD利於作為候選的疫苗。

表13提供19F-DT結合物對於交叉反應性血清型19A之作用之ELISA及OPA數據。發現19F-DT所誘導之抵擋19A的OPA活性雖低，但有顯著性(significant)。

表4臨床研究中所使用之肺炎球菌結合物疫苗調配物

調配物	肺炎球菌血清型μg/載體蛋白質											Al ³⁺ mg
	1	3	4	5	6B	7F	9V	14	18C	19F	23F	
11Pn-PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	1/PD	<0.8
19F-DT形式1	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	10/D	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/D	5/D	≤0.35
19F-DT形式2	3/PD	2/PD	2/PD	3/PD	5/D	3/PD	2/PD	2/PD	2/PD	3/D	5/D	≤0.35
19F-DT形式3	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/PD	3/D	3/PD	=0.5

表5 PS肺炎鏈球菌-蛋白D/TT/D

T結合物之特定活化/偶合

/抑制條件

血清型	1 天然	3 微流體	4 天然	5 天然	6B 天然	7F 天然
PS濃度(mg/ml)	1.5	2	2.0	7.5	5.5	3.0
PS溶解	NaCl 150mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD濃度(mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
啓始PS/PD比 (w/w)	1/0.7	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP濃度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0
偶合時間	60分鐘	60分鐘	45分鐘	40分鐘	60分鐘	60分鐘

血清型	9V 天然	14 天然	18C 天然	19F 天然	23F 天然
PS濃度 (mg/ml)	1.75	2.5	1.75	4.0	2.5
PS溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD濃度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
啓始PS/PD比 (w/w)	1/0.75	1/0.75	1/1.2	1/1	1/1
CDAP濃度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0
偶合時間	60分鐘	60分鐘	45分鐘	30分鐘	60分鐘



表6用於11 Pn-PD及Di-001研究之PS肺炎鏈球菌-蛋白D/DT結合
物的特定活化/偶合/抑制條件

血清型	1 微流體	3 微流體	4 微流體	5 微流體	6B 微流體	7F 天然
PS濃度 (mg/ml)	4	2.0	2.5	7.5	10	3.0
PS溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
PD濃度 (mg/ml)	10.0	5.0	5.0	5.0 NaCl 2M	20 (DT) NaCl 2M	5.0
啓始PD/PS比 (w/w)	1.2/1	1/1	1/1	1/1	1.5/1	1/1
CDAP濃度 (mg/mg PS)	1.50	0.75	1.5	2	1.5	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9/9/9
偶合時間	60分鐘	60分鐘	60分鐘	60分鐘	60分鐘	60分鐘

血清型	9V 天然	14 天然	18C 微流體	19F 微流體	23F 微流體
PS濃度 (mg/ml)	1.75	2.5	5.0	9.0	10
PS溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
載體蛋白質 濃度(mg/ml)	5.0	5.0	5.0	20 (DT)	10 (DT)
啓始載體蛋 白質/PS比 (w/w)	0.75/1	0.75/1	1.2/1	1.5/1	1.5/1
CDAP濃度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	1.5	1.5	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
偶合時間	60分鐘	60分鐘	30分鐘	60分鐘	60分鐘

表7用於11 Pn-PD及Di-007研究之PS肺炎鏈球菌-蛋白D/DT結合
物的特定活化/偶合/抑制條件

血清型	1 天然	3 微流體	4 天然	5 天然	6B 天然	7F 微流體
PS濃度 (mg/ml)	1.5	2.0	2	7.5	5.5	5.0
PS溶解	NaCl 150 mM	NaCl 2M	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M
PD濃度 (mg/ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5	10
啓始PD/PS比 (w/w)	0.7/1	1/1	1	1/1	1/1	1.2/1
CDAP濃度 (mg/mg PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	8.8/8.8/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5./9.5/9
偶合時間	60分鐘	60分鐘	45分鐘	40分鐘	60分鐘	60分鐘

血清型	9V 微流體	14 微流體	18C 天然	19F 微流體	19F 微流體	23F 微流體
PS濃度 (mg/ml)	5.0	5.0	1.75	9.0	10.0	9.5
PS溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
載體蛋白質濃 度(mg/ml)	10	10.0	5.0	20 (DT)	5.0 (PD)	10
啓始載體蛋白 質/PS比(w/w)	1.2/1	1.2/1	1.2/1	1.5/1	1.2/1	1/1
CDAP濃度 (mg/mg PS)	0.5	0.75	0.75	1.5	0.75	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0
偶合時間	60分鐘	60分鐘	45分鐘	120分鐘	120分鐘	60分鐘

表8在1 µg 19F- PD、3 µg 19F-DT或Pprevnar(2 µg 19F-CRM)首次接種後，19F抗體濃度≥0.20 µg/mL及19F抗體幾何平均抗體濃度(GMC爲95% CI; µg/mL)下之受試者百分比(總同齡組)

組	11Pn-PD及Di-001 (22F-ELISA)			11Pn-PD及Di-007 (22F-ELISA)		
	N	%≥0.20 µg/mL (95% CI)	GMC (µg/mL) (95% CI)	N	%≥0.20 µg/mL (95% CI)	GMC (µg/mL) (95% CI)
11Pn-PD	152	98.7 (95.3-99.8)	1.93 (1.67-2.22)	50	100 (92.9-100)	2.78 (2.31-3.36)
19F-DT形式1 ^r	146	99.3 (96.2-100)	2.88 (2.45-3.38)	-	-	-
19F-DT形式2 ^r	150	96.0 (91.5-98.5)	2.43 (2.01-2.94)	-	-	-
19F-DT形式3 ^r	-	-	-	50	96.0 (86.3-99.5)	3.70 (2.58-5.30)
<i>Pprevnar</i>	148	98.6 (95.2-99.8)	2.98 (2.60-3.41)	41	97.6 (87.1-99.9)	2.91 (2.15-3.94)

^r表4中提供不同調配物之組合物

表9在用1 µg 19F-PD、3 µg 19F-DT或Pprevnar (2 µg 19F-CRM)首次接種後一個月，19F OPA滴度≥1:8及19F OPA GMT下之受試者百分比(總同齡組)

組	11Pn-PD及Di-001			11Pn-PD及Di-007		
	N	≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)	N	≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	136	84.6 (77.4-90.2)	77.8 (58.1-104.4)	46	95.7 (85.2-99.5)	167.8 (118.1-238.6)
19F-DT形式1 ^r	137	95.6 (90.7-98.4)	263.2 (209.4-330.7)	-	-	-
19F-DT形式2 ^r	139	92.1 (86.3-96.0)	218.9 (166.5-287.9)	-	-	-
19F-DT形式3 ^r	-	-	-	49	91.8 (80.4-97.7)	403.1 (225.7-719.9)
<i>Pprevnar</i>	131	86.3 (79.2-91.6)	82.6 (61.1-111.6)	38	81.6 (65.7-92.3)	65.0 (37.7-112.2)

^r表4中提供不同調配物之組合物

表10首次用1 µg 19F-PD、3 µg 19F-DT或Pprevnar (2 µg 19F-CRM)接種之兒童在23價普通多醣加強劑前及後一個月，19F抗體濃度≥0.20 µg/mL及19F抗體GMC (µg/mL)下之受試者百分比(總同齡組)

首次接種組	11Pn-PD及Di-002 (22F ELISA)					
	加強劑接種前			23價PS加強劑一個月後		
	N	%≥0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/ml) (95% CI)	N	%≥0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/ml) (95% CI)
11Pn-PD	70	77.1 (65.6-86.3)	0.67 (0.45-0.98)	67	94.0 (85.4-98.3)	11.50 (7.76-17.03)
19F-DT形式1 [†]	68	91.2 (81.8-96.7)	0.71 (0.54-0.94)	69	98.6 (92.2-100)	14.50 (10.47-20.07)
19F-DT形式2 [†]	74	81.1 (70.3-89.3)	0.59 (0.43-0.80)	72	95.8 (88.3-99.1)	9.90 (6.74-14.54)
<i>Prevnar</i>	65	64.6 (51.8-76.1)	0.40 (0.27-0.60)	67	100 (94.6-100)	9.40 (6.95-12.71)

[†]表4中提供不同調配物之組合物

表11在首次用1 μg 19F- PD、3 μg 19F - DT或Prevnar(2 μg 19F-CRM)接種之兒童在23價普通多醣加強劑前及後一個月，在19F OPA滴度≥1:8及19F OPA GMT下受試者之百分比(總同齡組)

首次接種組	11Pn-PD及Di-002					
	加強劑接種前			23價PS加強劑一個月後		
	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)	N	% ≥ 1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	29	27.6 (12.7-47.2)	10.9 (5.0-23.7)	28	82.1 (63.1-93.9)	408.0 (157.3-1058.3)
19F-DT形式1 [†]	19	47.4 (24.4-71.1)	18.1 (7.2-45.7)	18	94.4 (72.7-99.9)	1063.8 (386.6-2927.5)
19F-DT形式2 [†]	27	33.3 (16.5-54.0)	8.5 (4.7-15.3)	28	100 (87.7-100)	957.6 (552.8-1659.0)
<i>Prevnar</i>	24	12.5 (2.7-32.4)	8.1 (3.4-19.6)	23	82.6 (61.2-95.0)	380.9 (133.2-1089.5)

[†]表4中提供不同調配物之組合物

表12在首次用1 μg 19F-PD、3 μg 19F-DT或Prevnar(2 μg 19F-CRM)接種之兒童中11Pn PD或Prevnar加強劑後一個月，抗體濃度≥0.20 μg/mL, OPA≥1:8及抵擋19F肺炎球菌之GMC/GMT下受試者百分比(總同齡組)

首次接種組	11Pn-PD及Di-002					
	22F-ELISA檢定			OPA檢定		
	N	%≥0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/ml) (95% CI)	N	%≥1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	70	100 (94.9-100)	4.52 (3.7-5.5)	21	100 (83.9-100)	255.6 (135.5-481.9)
19F-DT形式1 ^r	66	98.5 (91.8-100)	3.45 (2.8-4.3)	23	95.7 (78.1-99.9)	374.0 (192.6-726.2)
19F-DT形式2 ^r	70	98.6 (92.3-100)	3.80 (2.9-4.9)	29	96.6 (82.2-99.9)	249.1 (144.7-428.7)
<i>Pprevnar</i>	69	97.1 (89.9-99.6)	2.56 (2.0-3.3)	31	96.8 (83.3-99.9)	528.7 (319.4-875.2)

「表4中提供不同調配物之組合物

表13在用1 μg 19F- PD、3 μg 19F-DT或Pprevnar (2 μg 19F-CRM)首次接種後一個月，抗體濃度≥0.2 μg/mL, OPA ≥1:8及抵擋19A肺炎球菌之GMC/GMT下的受試者百分比(總同齡組)

組	11Pn-PD及Di-001					
	22F-ELISA檢定			OPA檢定		
	N	%≥0.20 μg/mL (95% CI)	GMC (μg/mL) (95% CI)	N	%≥1:8 (95% CI)	GMT (95% CI)
11Pn-PD	45	28.9 (16.4-44.3)	0.09 (0.07-0.11)	52	7.7 (2.1-18.5)	5.2 (4.0-6.8)
19F-DT形式2 ^r	51	29.4 (17.5-43.8)	0.11 (0.08-0.16)	59	27.1 (16.4-40.3)	12.4 (7.6-20.3)
<i>Pprevnar</i>	55	18.2 (9.1-30.9)	0.10 (0.08-0.12)	61	3.3 (0.4-11.3)	4.6 (3.8-5.6)

「表4中提供不同調配物之組合物

實例5：臨床前模型中之佐劑實驗:對老年恆河猴中之肺炎球菌11價多醣結合物的免疫原性影響

為使老年人口群中對結合物肺炎球菌疫苗引發之反應最佳，GSK使11價多醣(PS)結合物疫苗與新穎佐劑佐劑C調配-參看下文。

5隻老年恆河猴(14歲至28歲)組在第0天及第28天用500 μl吸附於315 μg AlPO4上之11價PS結合物或與佐劑C混雜之11價PS結合物肌內注射(IM)免疫。

在兩種疫苗調配物中，11價PS結合物各包含下列結合物PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-PD、

PS19F-PD、PS23F-DT及PS6B-DT。所用疫苗爲人用劑量1/5劑量(除6B [10 μ g]外，每人劑量5 μ g之各醣)之根據表6之條件(實例4)結合的疫苗，除了19F根據下列CDAP過程條件來製備：9 mg/ml經裁切尺寸之醣、5 mg/ml PD、啓始PD/PS比爲1.2/1，CDAP濃度爲0.75 mg/mg PS，pHa=pHc=pHq 9.0/9.0/9.0，且偶合時間爲60分鐘。

在第42天收集之血清中計量抗PS ELISA IgG含量及調理吞噬滴度。藉由Elispot自第42天收集之周血細胞來量測抗PS3記憶B細胞頻率。

根據以下所示之結果，相對與AIPO4之結合物，佐劑C顯著改良老年猴之11價PS結合物的免疫原性。新穎佐劑增強對PS之IgG反應(圖1)及調理吞噬抗體滴度(表14)亦存在支持性證據證明藉由使用佐劑C增加PS3特異性記憶B細胞之頻率(圖2)。

表14，老年恆河猴中之結合物免疫原性(II次接種後調理吞噬滴度)

		PS1	PS3	PS4	PS5	PS6B	PS7F	PS9V	PS14	PS18C	PS19F	PS23F
11-價 AIPO4	免疫前	<8	5	<8	5	<8	16	<8	<8	<8	<8	<8
	II次接種後14天	8	181	64	49	64	4096	42	37	169	64	<64
11 價 佐劑-C	免疫前	5	9	<8	5	8	37	<8	<8	<8	<8	<8
	II次接種後14天	776	1351	891	676	6208	16384	111	161	7132	2048	<64

B細胞Elispot

檢定原理依賴於記憶B細胞用CpG培養5天後成長爲活體外漿細胞之事實。活體外產生之抗原特異性漿細胞可易於偵測且因此使用B細胞elispot檢定進行計數。特異漿細胞之數目反映培養開始時記憶B細胞之頻率。

簡言之，在塗覆有抗原之培養皿中培養活體外產生之漿細胞。抗原特異漿細胞形成抗體/抗原斑點，其藉由習知之免疫酶促程序偵測並如記憶B細胞進行計數。



在本研究中，已使用多醣來塗覆培養皿以便計算各別記憶B細胞之數目。結果表示為一百萬記憶B細胞中PS特異記憶B細胞之頻率。

本研究展示佐劑C能夠緩解已知之PS3可加強性之問題(參看第五屆肺炎球菌及肺炎球菌疾病研討會，2006年4月2日-6日，Alice Springs, Central Australia. Specificities of immune responses against a serotype 3 pneumococcal conjugate. Schuerman L, Prymula R, Poolman J. Abstract book第245頁，PO10.06)。

實例6，經解毒之肺炎球菌溶血素(dPly)作為蛋白質載體對增強幼年Balb/c小鼠之PS 19F免疫原性的有效性

40隻雌性Balb/c小鼠(週齡為4週)組在第0天、第14天及第28天用50 µl 4價普通PS或4價dPly結合PS (兩者均與佐劑C混雜)IM免疫。

兩種疫苗調配物均包含0.1 µg (醣之量)以下PS中之每一者：PS8、PS12F、PS19F及PS22F。

在第42天收集之血清中計量抗PS ELISA IgG含量。

如圖3中之實例所示，相比於用普通PS免疫的小鼠，給予4價dPly結合物之小鼠的抗PS19F反應大大增強。對於抗PS8、12F及22F IgG反應觀察到同樣的改良(數據未圖示)。

實例7，肺炎球菌組胺酸三聯體蛋白D(PhtD)作為蛋白質載體於增強幼年Balb/c小鼠之PS 22F免疫原性的有效性。

40隻雌性Balb/c小鼠(週齡為4週)組在第0天、第14天及第28天用50 µl 4價普通PS或4價PhtD結合PS (兩者均與佐劑C混雜)IM免疫。

兩種疫苗調配物均包含0.1 µg (醣之量)以下PS中之每一者：PS8、PS12F、PS19F及PS22F。

在第42天收集之血清中計量抗PS ELISA IgG含量。

如圖4中之實例所示，相比於用普通PS免疫的小鼠，給予4價PhtD結合物之小鼠的抗PS22F反應大大增強。對於抗PS8、12F及19F IgG反

應觀察到同樣的改良(數據未圖示)。

實例 8，含 19A-dPly 及 22F-PhtD 之 13 價 PS 結合物的老年 C57Bl 小鼠之免疫原性

30 隻老年 C57Bl 小鼠(週齡>69 週)組在第 0 天、第 14 天及第 28 天用 50 µl 11 價 PS 結合物或 13 價 PS 結合物(兩者均與佐劑 C 混雜)IM 免疫(參看下文)。

該 11 價疫苗調配物包含 0.1 µg 下列結合物中之每一者的醣：PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT 及 PS23F-PD (參看表 1 及表 2 下方對 11 價疫苗所述之註釋)。13 價疫苗調配物另外含有 0.1 µg PS19A-dPly 及 PS22F-PhtD 結合物(參看表 1 及表 2 下方對 13 價疫苗所述之註釋[使用直接結合之 22F])。在組 2 及 4 中肺炎球菌溶血素載體經 GMBS 處理解毒，在組 3 及 5 中經甲醛處理。在組 2 及 3 中，使用 PhtD 結合 PS 22F，在組 4 及 5 中使用 PhtD_E 融合體(WO 03/054007 之構造 VP147)。在組 6 中，19A 與白喉類毒素結合，且 22F 與蛋白 D 結合。

在第 42 天收集之個體血清中計量抗 PS19A 及 22F ELISA IgG 含量。於混合血清中量測對其他 PS 產生之 ELISA IgG 反應。

在老年 C57Bl 小鼠中，於 13 價結合物疫苗調配物內投藥之 19A-dPly 及 22F-PhtD 展示具有免疫原性(表 15)。相比於用 11 價調配物免疫之小鼠，彼等給予 13 價調配物者對其他 PS 誘導之免疫反應未受到負面影響。

表 15，老年 C57Bl 小鼠之 PS 免疫原性(III 次接種後 IgG 含量)

老年 C57 黑色小鼠						
ELISA	組1	組2	組3	組4	組5	組6
	11V	11V 19A-dPly gmbS 22F-PhtD	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD	11V 19A-dPly gmbS 22F-PhtD-E	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD-E	11V 19A-DT 22F-PD
	0.1µg/50µl	0.1µg/50µl	0.1µg/50µl	0.1µg/50µl	0.1µg/50µl	0.1µg/50µl

		佐劑C	佐劑C	佐劑C	佐劑C	佐劑C	佐劑C
1	平均混合	19.30	20.20	24.40	12.80	12.10	13.60
3	平均混合	6.32	4.84	5.21	6.74	2.38	2.54
4	平均混合	60.9	67.1	51.4	47.4	45.5	41.1
5	平均混合	1.34	3.81	3.06	2.75	1.26	1.23
6B	平均混合	4.41	4.12	5.88	1.58	2.31	5.64
7F	平均混合	0.83	0.81	1.65	1.98	0.89	0.99
9V	平均混合	13.8	23.7	20.0	13.1	15.5	9.6
14	平均混合	25.73	42.96	34.12	32.53	23.97	15.60
18C	平均混合	13.4	20.1	11.9	9.1	8.3	8.4
19F	平均混合	57.5	90.0	63.8	36.5	47.0	69.1
23F	平均混合	NR	NR	NR	NR	NR	NR
19A	GMC IC %血清	0.06 0.04-0.1 33%	0.09 0.05-0.14 47%	0.25 0.15-0.41 83%	0.08 0.06-0.12 53%	0.23 0.14-0.38 80%	0.19 0.09-0.3 73%
22F	GMC IC %血清	NR 0%	5.81 3.2-10.6 97%	3.76 1.8-7.9 90%	0.54 0.3-1.1 77%	0.85 0.4-1.7 87%	2.02 1.2-3.4 97%

實例9，含19A-dPly及22F-PhtD之13價PS結合物的幼年Balb/c小鼠之免疫原性

30隻幼年的Balb/c小鼠(週齡4週)組在第0天、第14天及第28天用50 µl 11價PS結合物或13價PS結合物(兩者均與佐劑C混雜)IM免疫(參看下文)。

該11價疫苗調配物包含0.1 µg下列結合物中之每一者的醣：
PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、

PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT及PS23F-PD (參看表1及表2下方對11價疫苗所述之註釋)。13價疫苗調配物另外含有0.1 µg PS19A-dPly及PS22F-PhtD結合物(參看表1及表2下方對13價疫苗所述之註釋[使用直接結合之22F])。在組2及4中肺炎球菌溶血素載體經GMBS處理解毒，在組3及5中其經甲醛處理。在組2及3中，使用PhtD結合PS 22F，在組4及5中使用PhtD_E融合體(WO 03/054007之構造VP147)。在組6中，19A與白喉類毒素結合，且22F與蛋白D結合。

在第42天收集之個體血清中計量抗PS19A及22F ELISA IgG含量。於混合血清中量測對其他PS產生之ELISA IgG反應。

在幼年 Balb/c 小鼠中，於13價結合物疫苗調配物內投藥之19A-dPly及22F-PhtD展示具有免疫原性(表16)。相比於用11價調配物免疫之小鼠，彼等給予13價調配物者對其他PS誘導之免疫反應未受到負面影響。

表16，幼年Balb/c小鼠之PS免疫原性(III次接種後IgG含量)

BalbC小鼠						
ELISA	組1	組2	組3	組4	組5	組6
	11V 0.1μg/50μl 佐劑C	11V 19A-dPly g mbs 22F-PhtD 0.1μg/50μl 佐劑C	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD 0.1μg/50μl 佐劑C	11V 19A-dPly gmb 22F-PhtD-E 0.1μg/50μl 佐劑C	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD-E 0.1μg/50μl 佐劑C	11V 19A-DT 22F-PD 0.1μg/50μl 佐劑C
1 平均混合	131.70	101.20	83.00	82.40	67.90	85.50
3 平均混合	21.85	10.38	12.53	8.83	8.73	14.98
4 平均混合	147.4	127.0	104.4	95.0	113.6	114.2
5 平均混合	21.38	20.29	18.26	18.95	18.02	23.04
6B 平均混合	1.97	4.76	3.72	2.35	1.43	1.05
7F 平均混合	7.69	4.58	4.77	4.24	3.92	3.94
9V 平均混合	30.1	30.7	26.5	21.4	23.4	28.3
14 平均混合	28.78	27.67	26.23	21.54	24.34	13.73
18C 平均混合	53.4	52.37	46.5	57.8	47.8	75.8
19F 平均混合	186.6	157.7	169.3	178.9	181.9	223.2
23F 平均混合	4.98	3.9	5.11	0.57	3.13	4.57
19A GMC IC %血清	0.4 0.2-0.6 93%	32.8 26.4-40.7 100%	25.1 20.6-30.6 100%	21.6 17.5-26.7 100%	18.9 15.1-23.5 100%	23.5 19.5-28.5 100%
22F GMC IC %血清	NR 0%	3.99 1.9-8.42 93%	3.76 1.8-8 100%	6.27 3.8-10.4 100%	8.70 5.4-13.9 100%	18.76 15.2-23.1 100%

實例10，含19A-dPly及22F-PhtD之13價PS結合物的豚鼠之免疫原性

20隻幼年的豚鼠(哈氏天竺鼠種；週齡5週)組在第0天、第14天及第28天用125 μl 11價PS結合物或13價PS結合物(兩者均與佐劑C混雜)IM免疫(參看下文)。

該11價疫苗調配物包含0.25 μg下列結合物中之每一者的醣：PS1-PD、PS3-PD、PS4-PD、PS5-PD、PS6B-PD、PS7F-PD、PS9V-PD、PS14-PD、PS18C-TT、PS19F-DT及PS23F-PD (參看表1及表2下方對11價疫苗所述之註釋)。13價疫苗調配物另外含有0.1 μg PS19A-dPly及PS22F-PhtD結合物(參看表1及表2下方對13價疫苗所述之註釋[使用直接結合之22F])。在組2及4中肺炎球菌溶血素載體經GMBS處理解毒，在組3及5中其經甲醛處理。在組2及3中，使用PhtD結合PS 22F，在組4及5中使用PhtD_E融合體(WO 03/054007之構造VP147)。在組6中，19A與白喉類毒素結合，且22F與蛋白D結合。

在第42天收集之個體血清中計量抗PS19A及22F ELISA IgG含量。於混合血清中量測對其他PS產生之ELISA IgG反應。

表 17， 幼年 Balb/c 小鼠之 PS 免疫原性 (III 次接種後 IgG 含量)

豚鼠						
ELISA	組1	組2	組3	組4	組5	組6
	11V 0.1μg/50μl 佐劑C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD 0.1μg/50μl 佐劑C	11V 19A-dPly 甲醛 22F-PhtD 0.1μg/50μl 佐劑C	11V 19A-dPly gmbs 22F-PhtD-E 0.1μg/50μl 佐劑C	11V 19A-dPly 甲 醛 22F-PhtD-E 0.1μg/50μl 佐劑C	11V 19A-DT 22F-PD 0.1μg/50μl 佐劑C
1 平均混合	78.00	77.21	76.15	68.77	68.59	81.04
3 平均混合	7.75	9.31	12.73	7.94	4.75	9.59
4 平均混合	130.7	94.4	132.6	166.8	85.0	101.3
5 平均混合	109.10	117.10	110.70	158.40	74.10	100.40

6B	平均混合	3.14	4.26	14.4	7.63	6.3	7.52
7F	平均混合	154.2	216.0	240.0	181.0	142.0	179.1
9V	平均混合	90.69	105.45	98.20	93.45	54.12	73.05
14	平均混合	71.19	77.18	46.53	59.67	38.47	53.69
18C	平均混合	109.4	122.3	137.1	79.9	73.7	83.1
19F	平均混合	73.9	102.5	112.2	75.5	62.3	72.1
23F	平均混合	19.19	30.74	29.44	31.52	19.13	24.94
19A	GMC	0.4	25.58	41.49	14.25	27.49	6.74
	IC	0.24-0.68	12-54.5	24.4-70.5	5.9-34.6	16.6-45.4	4-11.3
	%血清	75%	100%	100%	100%	100%	100%
22F	GMC	0.12	2.51	3.67	45.74	30.68	96.38
	IC	0.09-0.16	0.94-6.73	1.59-8.42	29.3-71.4	17-53.3	73.5-126.4
	%血清	10%	95%	95%	100%	100%	100%

實例11：正經製備及測試之調配物

a)製備下列調配物(使用表1之13價疫苗及表5之血清型3-參看表2
下方對14價疫苗所述之註釋-[使用直接結合之22F或經由ADH鍵聯
劑])。如下所示，醣經磷酸鋁及3D-MPL調配。

14V 25µg MPL BAC鋁含量之和 -> FF 每劑量:						14V 10µg MPL BAC鋁含量之和 -> FF 每劑量:					
PS	載體	µg PS	µg MPL	比率 PS/AI 1/x	µg AI	PS	載體	µg PS	µg MPL	比率 PS/AI 1/x	µg AI
1	PD	1		10	10	1	PD	1		10	10
3	PD	1		10	10	3	PD	1		10	10
4	PD	3		10	30	4	PD	3		10	30
5	PD	1		10	10	5	PD	1		10	10
6A	PD	1		10	10	6A	PD	1		10	10
6B	PD	1		10	10	6B	PD	1		10	10
7F	PD	1		10	10	7F	PD	1		10	10
9V	PD	1		10	10	9V	PD	1		10	10
14	PD	1		10	10	14	PD	1		10	10
18C	TT _{AB}	3		15	45	18C	TT _{AB}	3		15	45
19A	dPly	3		10	30	19A	dPly	3		10	30
19F	DT	3		10	30	19F	DT	3		10	30
22F	PhID	3		10	30	22F	PhID	3		10	30
23F	PD	1		10	10	23F	PD	1		10	10
BAC MPL 50/200			25	4	100	BAC MPL 50/200			10	4	40
FF 鋁含量				和 =	355	FF 鋁含量				和 =	295

b)相同的醣調配物經下列佐劑中之每一者輔佐：
-下表中展示每500 µl劑量乳液組份之濃度。

	佐劑 A1	佐劑 A2	佐劑 A3
成份	250µl o/w乳液	125µl o/w乳液	50µl o/w乳液
α生育酚	11.88mg	5.94mg	2.38mg
角鯊烯	10.7mg	5.35mg	2.14mg
Tween 80	4.85mg	2.43mg	0.97mg

	佐劑 A4	佐劑 A5	佐劑 A6	佐劑 A7
成份	250µl o/w乳液	250µl o/w乳液	125µl o/w乳液	50µl o/w乳液
α生育酚	11.88mg	11.88mg	5.94mg	2.38mg
角鯊烯	10.7mg	10.7mg	5.35mg	2.14mg
Tween 80	4.85mg	4.85mg	2.43mg	0.97mg
3D-MPL	50µg	25µg	25µg	10µg

c) 醣亦經兩種脂質體基佐劑來調配

佐劑 B1之組合物

定性定量(每 0.5 mL劑量)

脂質體：

- DOPC 1 mg
- 膽固醇0.25 mg
- 3DMPL 50 µg
- QS21 50 µg
- KH₂PO₄ 3.124 mg緩衝液
- Na₂HPO₄ 0.290 mg緩衝液
- NaCl 2.922 mg
- (100 mM)
- WFI q.s. ad 0.5 ml溶劑
- pH 6.1
- 1.總PO₄濃度=50 mM

佐劑 B2之組合物

定性定量(每 0.5 mL劑量)

脂質體：

-DOPC 0.5 mg

-膽固醇 0.125 mg

3DMPL 25 µg

QS21 25 µg

KH₂PO₄ 3.124 mg緩衝液

Na₂HPO₄ 0.290 mg緩衝液

NaCl 2.922 mg

(100 mM)

WFI q.s. ad 0.5 ml溶劑

pH 6.1

d) 醣亦經佐劑C調配(參看上文其中已使用此佐劑之其他組合物)：

定性定量(每0.5 mL劑量)

水包油乳液：50 µl

-角鯊烯 2.136 mg

-生育酚 2.372 mg

-Tween 80 0.97 mg

-膽固醇 0.1 mg

3DMPL 50 µg

QS21 50 µg

KH₂PO₄ 0.470 mg緩衝液

Na₂HPO₄ 0.219 mg緩衝液

NaCl 4.003 mg

(137 mM)

KCl 0.101 mg

(2.7 mM)

WFI q.s. ad 0.5 ml溶劑

pH 6.8

實例12，結合物化學性質對Balb/c小鼠之22F-PhtD結合物免疫原性的影響

30隻雌性Balb/c小鼠組在第0天、第14天及第28天藉由肌肉(IM)途徑用含PS 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F及23F之13價PS調配物免疫(劑量：0.3 μg 醣/PS 4、18C、19A、19F及22F之PS及0.1 μg 醣/其他PS之PS)

使PS 18C與破傷風類毒素結合，19F與白喉類毒素結合，19A與經甲醛解毒之Ply結合，22F與PhtD結合且其他PS與PD結合。

比較由藉由直接CDAP化學製備之22F-PhtD或22F-AH-PhtD (ADH衍生之PS)組成的兩種調配物。參看實例2，表1及表2下對經由22F直接結合或經由ADH間隔基製備之13價疫苗特徵的註釋。疫苗調配物用佐劑C來補充。

在第42天收集之血清中量測抗PS22F ELISA IgG含量及調理吞噬滴度。

22F-AH-PhtD在IgG含量(圖5)與調理吞噬滴度(圖6)兩方面展示比22F-PhtD更具免疫原性。

實例13，新穎佐劑對肺炎鏈球菌莢膜PS結合物之免疫原性的影響

40隻雌性Balb/c小鼠組在第0天、第14天及第28天藉由IM途徑用含PS 1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、22F及23F之13價PS調配物免疫(劑量：0.3 μg 醣/PS 4, 18C, 19A, 19F及22F之PS及0.1 μg 醣/其他PS之PS)。

使PS 18C與破傷風類毒素結合，19F與白喉類毒素結合，19A與經甲醛解毒之Ply結合，22F與PhtD結合且其他PS與PD結合。參看實例2，表1及表2下對用直接結合之22F製備之13價疫苗特徵的註釋。

比較用AlPO₄、佐劑A1、佐劑A4或佐劑A5補充之四種調配物。

每組在第42天收集並混合之血清中量測抗PS、Ply、PhtD及PD ELISA IgG含量。對各抗原計算以下比率：用新穎測試佐劑誘導之IgG含量/用AlPO₄誘導之IgG含量。

所有新穎測試佐劑相比於常規AlPO₄調配物對13價結合物之免疫反應改良至少2倍(圖7)。

實例14，PhtD/經解毒Ply結合物在肺炎球菌猴肺炎模型中之防護效果。

6隻恆河猴(3歲至8歲)組(選擇彼等預存之抗19F抗體含量最低者)在第0天及第28天用11價PS結合物(亦即1 µg之PS 1、3、5、6B、7F、9V、14及23F及3 µg PS 4、18C及19F)或PhtD (10 µg)+經甲醛解毒Ply(10 µg)或單獨佐劑肌內注射免疫。

PS 18C與破傷風類毒素結合，19F與白喉類毒素結合，且其他PS與PD結合。參看實例2，表1及表2下對11價疫苗特徵之註釋。所有調配物經佐劑C補充。

在第42天將19F型肺炎球菌(5.108 cfu)於右肺中接種。在進攻後第1天、第3天及第7天收集之支氣管肺泡灌洗液中計算菌落數。結果表示為進攻後第7天每組中死亡、肺移生或肺澄清之動物數目。

如圖8所示，(儘管使用少量之動物)相比於單獨佐劑組，在11價結合物及PhtD+dPly結合物情況下獲得接近於統計顯著性之良好保護(p<0.12, Fisher確切測試)。

實例15，結合物化學對於抗PhtD抗體反應的影響及由22F-PhtD結合物誘導之抵擋4型進攻的預防效果

20隻雌性OF1小鼠組藉由肌肉內途徑在第0天及第14天用3 μ g 22F-PhtD(藉由直接CDAP化學製備)或22F-AH-PhtD (ADH衍生之PS)或單獨佐劑來免疫。兩種單價22F結合物均由實例2之過程來製備(亦參看表1及表2)。各調配物經佐劑C補充。

在第27天收集之血清中量測抗PhtD ELISA IgG含量。

在第28天小鼠經5.106 cfu之4型肺炎球菌(亦即未經測試疫苗調配物中所存在之PS潛在覆蓋的肺炎球菌血清型)經鼻內攻擊。攻擊後10天內監控所誘導之死亡率。

22F-AH-PhtD誘導較22F-PhtD顯著高之抗PhtD IgG反應及抵擋4型攻擊較佳之防護。

申請專利範圍

1. 一種肺炎鏈球菌免疫原組合物，其包含與載體蛋白質結合的來自不同肺炎鏈球菌血清型之10種或10種以上之莢膜醣，及包含3種或3種以上不同載體蛋白質，其中該組合物包含：
 - 與白喉類毒素(DT)結合之血清型19F莢膜醣，
 - 與破傷風類毒素(TT)結合之血清型18C莢膜醣，及
 - 與來自流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)之蛋白質D結合之血清型1、4、5、6B、7F、9V、14及23F。
2. 如請求項1之免疫原組合物，其中19F莢膜醣直接與該載體蛋白質結合。
3. 如請求項1之免疫原組合物，其中19F莢膜醣經由鍵聯劑(linker)與該載體蛋白質結合。
4. 如請求項3之免疫原組合物，其中該鍵聯劑具有雙官能性。
5. 如請求項3或4之免疫原組合物，其中該鍵聯劑為己二醯肼(ADH)。
6. 如請求項3或4之免疫原組合物，其中該鍵聯劑係藉由碳化二亞胺化學，或使用1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺(EDAC)化學而連接至該載體蛋白質。
7. 如請求項1至4中任一項之免疫原組合物，其中該19F醣係使用1-氰基-4-二甲基胺基吡啶四氟硼酸鹽(CDAP)化學與該載體蛋白質結合或與該鍵聯劑結合。
8. 如請求項1至4中任一項之免疫原組合物，其中載體蛋白質與19F醣之比介於5:1與1:5、4:1與1:1、2:1與1:1、或1.5:1與1.4:1(w/w)之間。
9. 如請求項1至4中任一項之免疫原組合物，其中該19F醣之平均尺寸大於100 kDa。

10. 如請求項1至4中任一項之免疫原組合物，其中該19F醣結合物之劑量，以醣計，介於1 μg 與10 μg 、1 μg 與5 μg 、或1 μg 與3 μg 之間。
11. 如請求項1至4中任一項之免疫原組合物，其進一步包含血清型6A及/或15B。
12. 如請求項1至4中任一項之免疫原組合物，其進一步包含血清型19A。
13. 如請求項1至4中任一項之免疫原組合物，其進一步包含血清型22F。
14. 如請求項1至4中任一項之免疫原組合物，其包含呈游離蛋白質或載體蛋白質之肺炎球菌溶血素。
15. 如請求項1至4中任一項之免疫原組合物，其包含呈游離蛋白質或載體蛋白質之PhtX蛋白質、PhtD蛋白質、PhtBD融合蛋白質或PhtDE融合蛋白質。
16. 一種肺炎鏈球菌免疫原組合物之用途，其係用於製備治療或預防由肺炎鏈球菌血清型19A感染所引起之疾病之藥物，其中該組合物包含與2種或2種以上不同載體蛋白質結合的來自不同肺炎鏈球菌血清型之9種或9種以上、10種或10種以上、11種或11種以上、13種或13種以上或14或14種以上之莢膜醣，其中該組合物包含以CDAP化學與CRM197結合之血清型19F莢膜醣，但不包含血清型19A之莢膜醣。

圖式

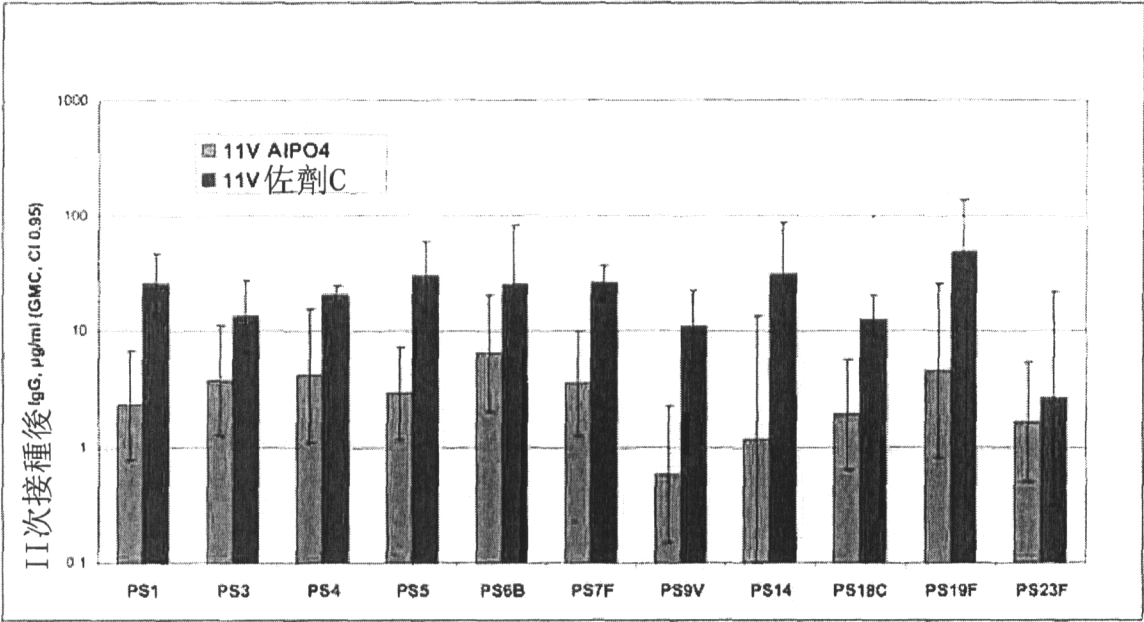


圖 1

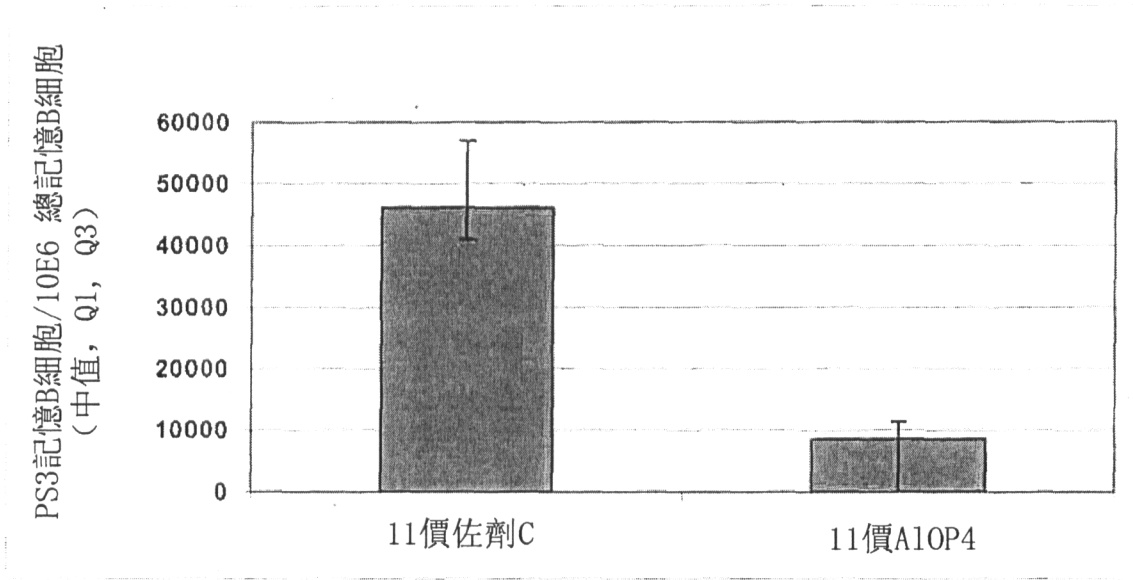


圖 2

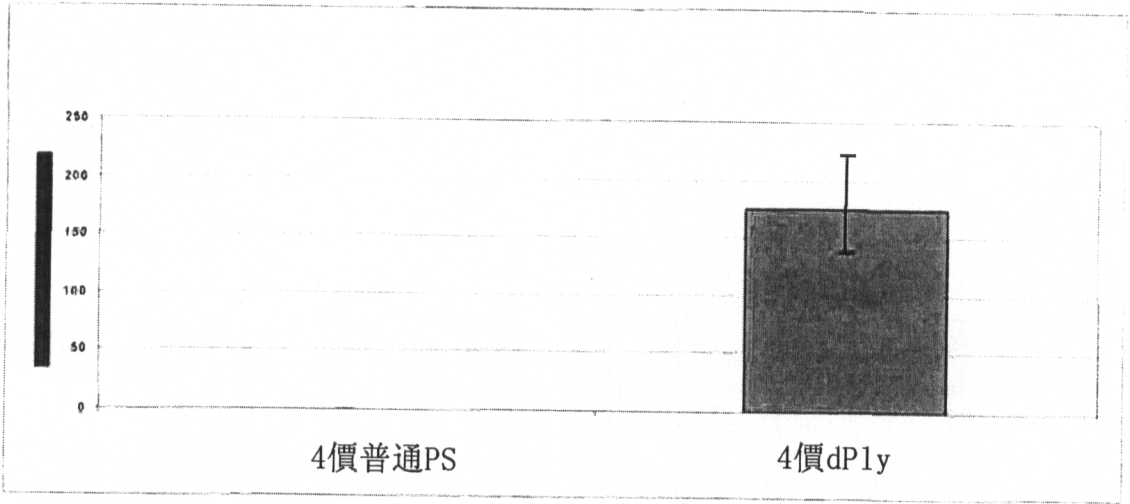


圖 3

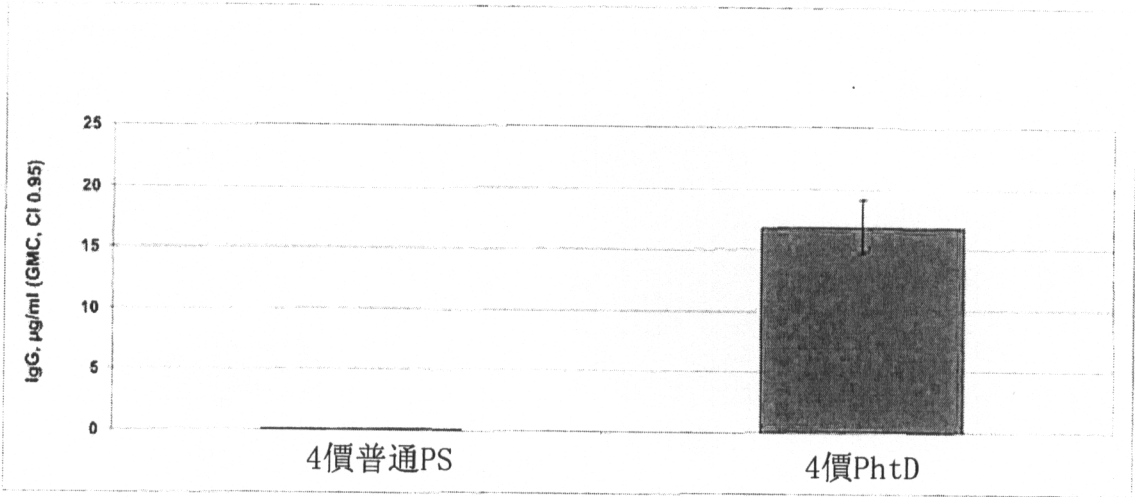


圖 4

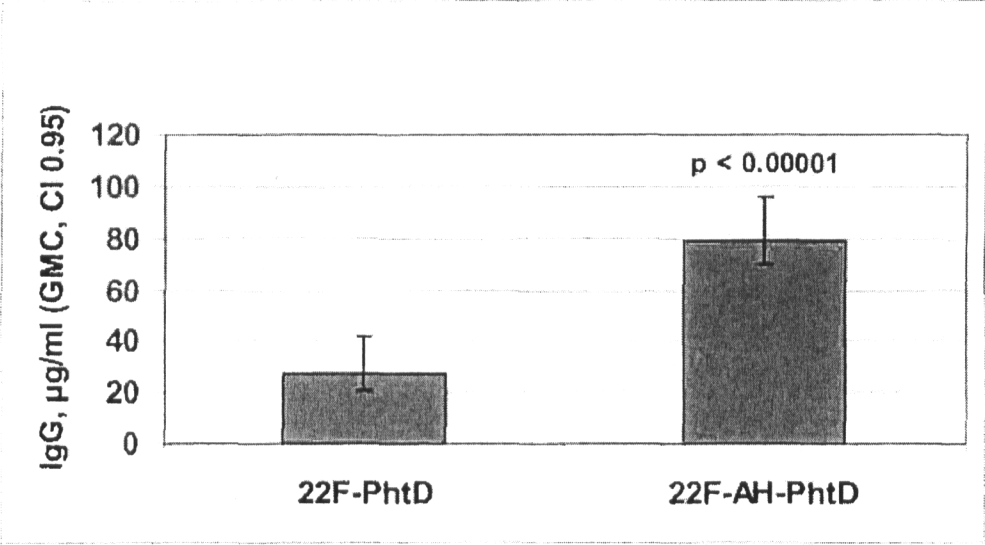


圖 5

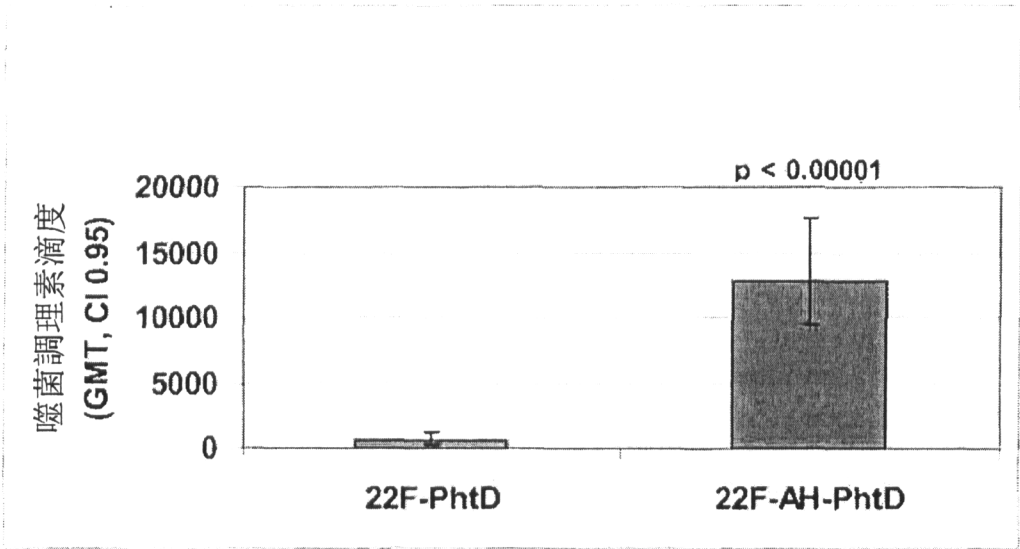


圖 6

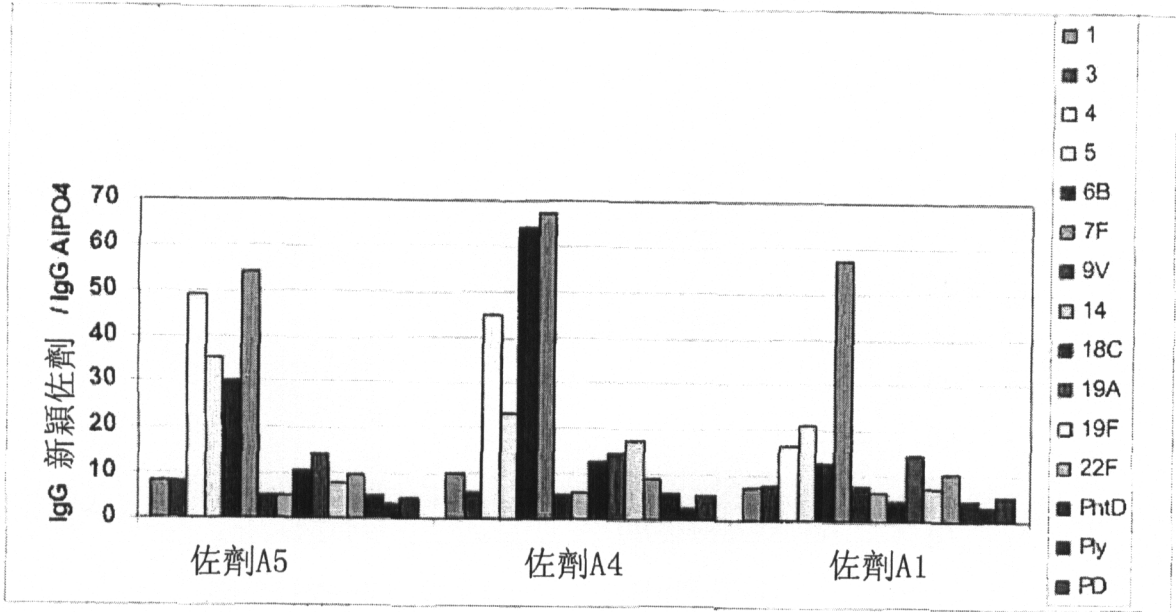


圖 7

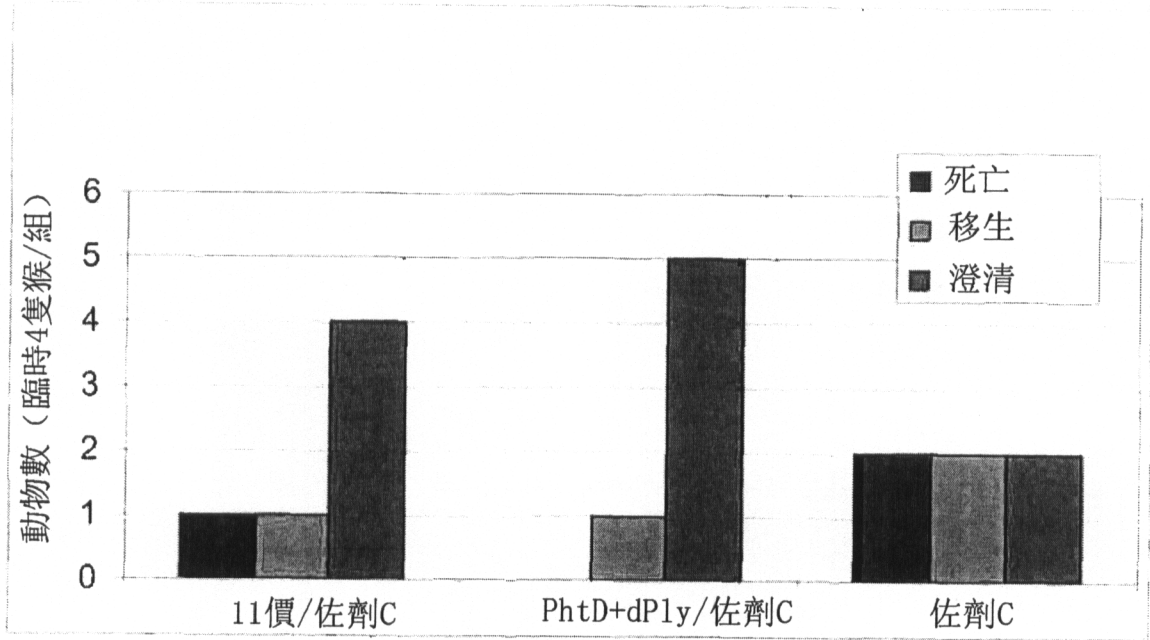


圖 8

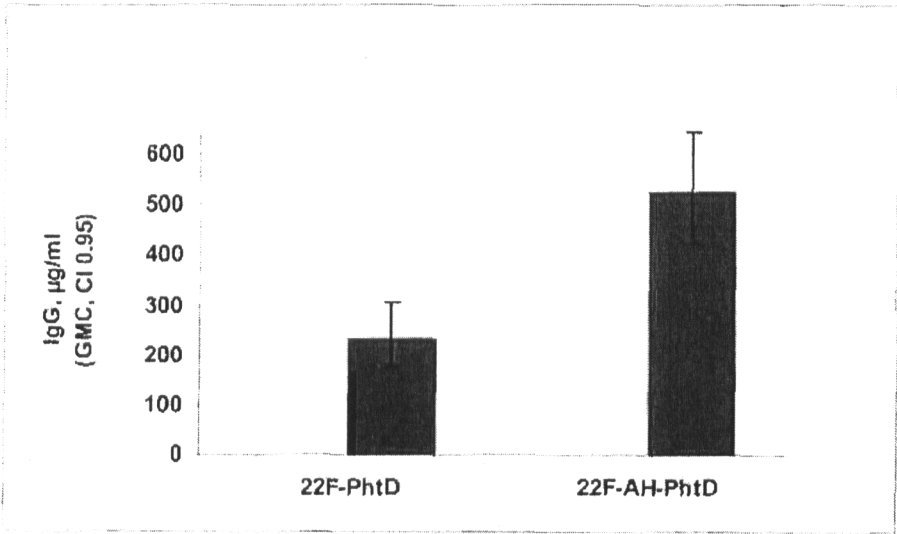


圖 9

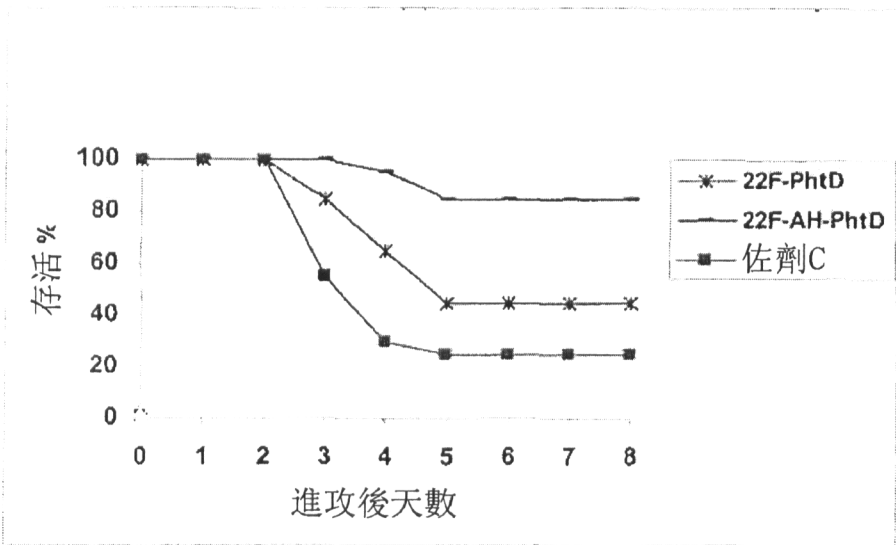


圖 10