

(21)申請案號：100146325

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 12 月 14 日

(51)Int. Cl. : **C07K14/35 (2006.01)**
A61P31/06 (2006.01)

A61K39/04 (2006.01)

(30)優先權：2010/12/14 美國

61/422,723

(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：立莫里 多彌克 依葛瑞 LEMOINE, DOMINIQUE INGRID (BE)；葛達特 史黛芬尼 安卓 喬治斯 GODART, STEPHANE ANDRE GEORGES (BE)；拉安安 阿密那 LAANAN, AMINA (BE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：57 項 圖式數：10 共 93 頁

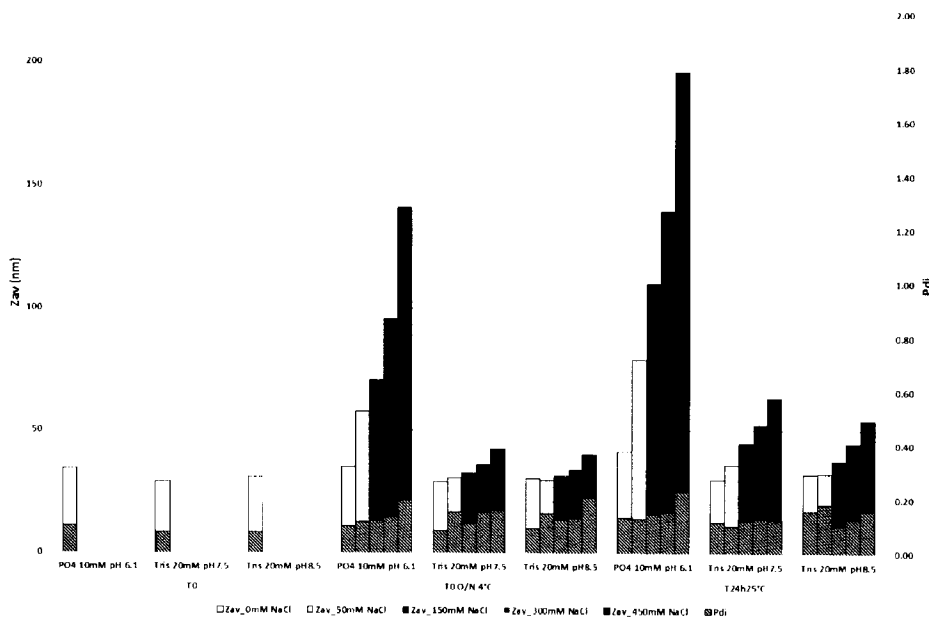
(54)名稱

新穎之組合物

NOVEL COMPOSITIONS

(57)摘要

本發明提供包含 M72 相關抗原之免疫原組合物，其中該組合物之導電率係 13 mS/cm 或更低，或該組合物之鹽濃度係 130 mM 或更低；及該組合物在醫學中之用途。



(21)申請案號：100146325

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 12 月 14 日

(51)Int. Cl. : **C07K14/35 (2006.01)**
A61P31/06 (2006.01)

A61K39/04 (2006.01)

(30)優先權：2010/12/14 美國

61/422,723

(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：立莫里 多彌克 依葛瑞 LEMOINE, DOMINIQUE INGRID (BE)；葛達特 史黛芬尼 安卓 喬治斯 GODART, STEPHANE ANDRE GEORGES (BE)；拉安安 阿密那 LAANAN, AMINA (BE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：57 項 圖式數：10 共 93 頁

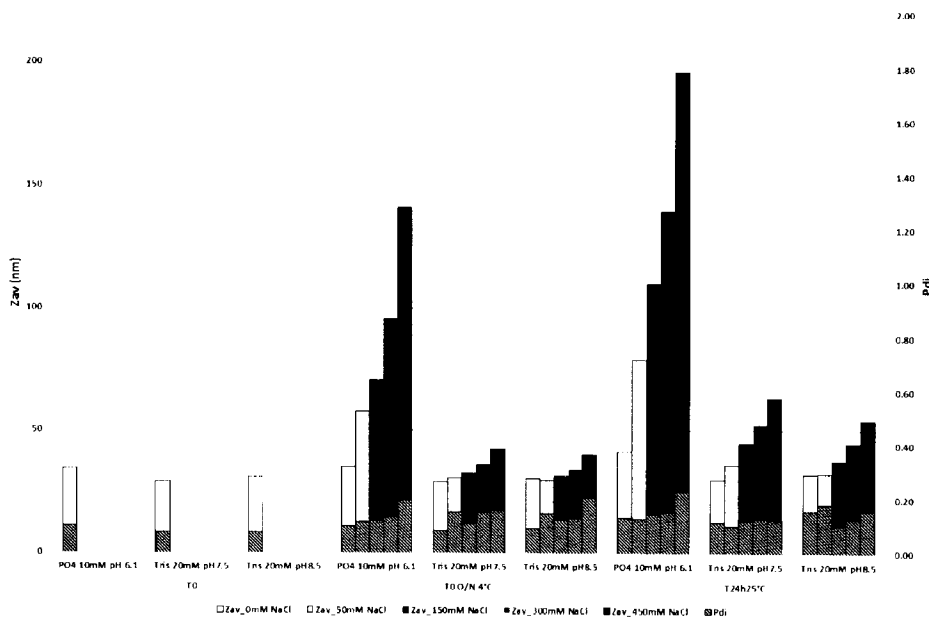
(54)名稱

新穎之組合物

NOVEL COMPOSITIONS

(57)摘要

本發明提供包含 M72 相關抗原之免疫原組合物，其中該組合物之導電率係 13 mS/cm 或更低，或該組合物之鹽濃度係 130 mM 或更低；及該組合物在醫學中之用途。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於包含M72相關抗原且具有低離子強度之免疫原組合物。本發明亦係關於另外包含一或多種免疫刺激劑之該等免疫原組合物。亦提供製備該等免疫原組合物的方法及相關套組。

【先前技術】

結核病(TB)係因結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)及其他分枝桿菌感染引起之慢性傳染病。其在發展中國家係重大疾病，且在世界發達地區係日益嚴重之問題。據信超過20億人感染TB桿菌，其中每年有約940萬TB新病例且有170萬人死亡。彼等感染TB桿菌者中10%將發生活動性TB，患有活動性TB者每人每年平均感染10至15個其他人。儘管在全球範圍內年發病率已達到頂峰，但由於人口增長，死亡及病例之數量仍在上升(World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2010)。

蛋白抗原Mtb72f及M72(闡述於(例如)國際專利申請案WO 2006/117240中)或其片段或衍生物係對結核病之治療或預防潛在有益之蛋白抗原。

為確保維持免疫原性，蛋白抗原之調配物極為重要。有時使用免疫刺激劑以改良針對任一給定抗原產生之免疫反應。然而，將佐劑引入免疫原組合物中會增加製備組份之複雜性以及分配及調配組合物之複雜性。調配者必須考慮每種佐劑組份以及抗原性組份之製備。具體而言，應考慮

抗原性組份與佐劑組份之相容性。凍乾抗原或抗原製劑欲經佐劑製劑復原之情形尤其係如此。在該情況下，重要的是，佐劑製劑之緩衝液適於抗原且抗原之免疫原性或溶解性不受佐劑影響。

【發明內容】

本發明者已首次鑒定，M72相關抗原對鹽之存在尤其敏感。不受限於理論，據信稱作「鹽析」之現象有害地影響M72相關抗原，「鹽析」可定義為蛋白質藉由與鹽(例如氯化鈉)相互作用自其溶液沉澱。本發明者已發現，在低至150 mM之氯化鈉濃度下，該等抗原聚集並沉澱。因此，可藉由降低氯化鈉濃度令人驚奇地改良包含M72相關抗原之免疫原組合物的穩定性。

因此，本發明提供包含M72相關抗原之免疫原組合物，其中該組合物之導電率係13 mS/cm或更低。

另外提供包含M72相關抗原之免疫原組合物，其中該組合物中之鹽濃度係130 mM或更低。

本發明亦提供包含M72相關抗原之免疫原組合物，其中該組合物中之氯化鈉濃度係130 mM或更低。

序列識別符之簡單說明

SEQ ID No: 1 M72蛋白之胺基酸序列

SEQ ID No: 2 編碼M72蛋白之核苷酸序列

SEQ ID No: 3 具有兩個N末端His殘基之M72蛋白的胺基酸序列

SEQ ID No: 4 編碼具有兩個N末端His殘基之M72蛋白的

核苷酸序列

SEQ ID No: 5 Mtb72f蛋白之胺基酸序列

SEQ ID No: 6 編碼Mtb72f蛋白之核苷酸序列

SEQ ID No: 7 具有六個N末端His殘基之Mtb72f蛋白的胺基酸序列

SEQ ID No: 8 編碼具有六個N末端His殘基之Mtb72f蛋白的核苷酸序列

SEQ ID No: 9 CpG寡聚物1 (CpG 1826)之核苷酸序列

SEQ ID No: 10 CpG寡聚物2 (CpG 1758)之核苷酸序列

SEQ ID No: 11 CpG寡聚物3之核苷酸序列

SEQ ID No: 12 CpG寡聚物4 (CpG 2006)之核苷酸序列

SEQ ID No: 13 CpG寡聚物5 (CpG 1686)之核苷酸序列

【實施方式】

在第一態樣中，本發明提供包含M72相關抗原之免疫原組合物，其中該組合物之導電率係13 mS/cm或更低。具體而言，本發明提供包含M72相關抗原之免疫原組合物，其中該免疫原組合物之導電率係12 mS/cm或更低，例如10 mS/cm或更低、8 mS/cm或更低、6 mS/cm或更低、4 mS/cm或更低或3 mS/cm或更低。在一特定實施例中，該免疫原組合物之導電率係2.5 mS/cm或更低，例如2.25 mS/cm或更低或2.0 mS/cm或更低。在又一具體實施例中，該免疫原組合物之導電率係1.5 mS/cm至2.5 mS/cm。

在第二態樣中，本發明提供包含M72相關抗原之免疫原組合物，其中該組合物中之鹽濃度係130 mM或更低。具

體而言，本發明提供包含M72相關抗原之免疫原組合物，其中該組合物中之鹽濃度係100 mM或更低，例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低或40 mM或更低。在一特定實施例中，該組合物中之鹽濃度係35 mM或更低，例如30 mM或更低或25 mM或更低。在又一具體實施例中，該組合物中之鹽濃度係20 mM至40 mM，例如25 mM至35 mM。

在第三態樣中，本發明提供包含M72相關抗原之免疫原組合物，其中氯化鈉濃度係130 mM或更低。具體而言，本發明提供包含M72相關抗原之免疫原組合物，其中氯化鈉濃度係100 mM或更低，例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低、40 mM或更低、30 mM或更低、20 mM或更低或15 mM或更低。在一特定實施例中，免疫原組合物中之氯化鈉濃度係10 mM或更低，例如7.5 mM或更低。適宜地，免疫原組合物中之氯化鈉濃度係5 mM或低於5 mM。在又一具體實施例中，免疫原組合物基本上不含氯化鈉。基本上不含意指氯化鈉濃度為0 mM或極為接近0 mM(例如3 mM或更小、2 mM或更小或1 mM或更小)。

本發明免疫原組合物可為水性製劑。

本發明免疫原組合物之導電率可使用業內已知之技術(例如使用專用導電率計或具有量測導電率之能力之其他儀器)來量測。一種適宜儀器係來自Malvern Instruments (UK)之Zetasizer Nano ZS。

熟習此項技術者可使用已知技術及套組容易地測試鈉離子(Na^+)與氯離子(Cl^-)二者之濃度。舉例而言，鈉離子可使用諸如來自Biosupply之Sodium Enzymatic Assay Kit(目錄號：BQ011EAEL)等套組來測定。氯離子可使用諸如來自Biosupply之Chloride Enzymatic Assay Kit(目錄號：BQ006EAEL)等套組來測定。

結核病(TB)係因結核分枝桿菌及其他分枝桿菌感染引起之慢性傳染病。其在發展中國家係主要疾病，以及在世界發達地區係日益增大之問題。據信超過20億人感染TB桿菌，其中每年約940萬TB新病例及170萬人死亡。10%彼等感染TB桿菌者將發生活動性TB，患有活動性TB之每人每年感染平均10至15個其他人。儘管年發病率已在全球達到頂峰，但由於人口增長，死亡及病例之數量仍上升(World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2010)。

結核分枝桿菌經由呼吸途徑感染個體。肺泡巨噬細胞吞噬細菌，但其能夠藉由抑制吞噬體與酸性溶酶體融合而存活並增殖。發生涉及 CD4^+ 及 CD8^+ T細胞之複雜免疫反應，最終導致形成肉芽腫。結核分枝桿菌作為病原體成功之核心在於以下事實：分離、但並非根除之細菌可持續長時段，使得個體易於稍後發生活動性TB。

在感染後第一年內，少於5%感染個體發生活動性TB。肉芽腫可持續數十年且據信含有在喪失氧及營養成份下呈休眠狀態之活的結核分枝桿菌。然而，最近已表明，呈休眠狀態之絕大多數細菌位於貫穿體內傳播之非巨噬細胞型

中 (Locht 等人, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007 7(11):1665-1677)。在由於(例如)免疫抑制事件宿主之天然免疫性與病原體變化之間達成平衡時, 發生活動性 TB (Anderson P *Trends in Microbiology* 2007 15(1):7-13; Ehlers S *Infection* 2009 37(2):87-95)。

亦已提出闡述潛伏性 TB 與活動性 TB 間之平衡之動態假說 (Cardana P-J *Inflammation & Allergy-Drug Targets* 2006 6:27-39; Cardana P-J *Infection* 2009 37(2):80-86)。

儘管感染可在相當長時間段內無症狀, 但活動性疾病最常見地表現為急性肺發炎, 此導致疲憊、體重減輕、發熱及持續性咳嗽。若不治療, 則通常產生嚴重併發症及死亡。

結核病通常可使用延長抗生素療法加以控制, 但該治療並不足以預防疾病傳播。活動性感染個體可在很大程度上無症狀, 但在一段時間內有傳染性。另外, 儘管與治療方案之順應性至關重要, 但難以監測患者行為。一些患者未完成治療過程, 此可導致無效治療及形成藥物抗性。

耐多重藥物性 TB (MDR-TB) 係對一線藥劑無反應之形式。所有 TB 病例之 3.3% 係 MDR-TB, 其中估計每年出現 440,000 例新 MDR-TB 病例。在除耐一線藥劑性外亦發生耐二線藥劑性時, 出現廣泛耐藥物性 TB (XDR-TB)。已在 58 個國家中確認實質上不可治療之 XDR-TB (World Health Organisation *Tuberculosis Facts* 2010)。

即使完成抗生素治療之全部過程, 結核分枝桿菌感染亦

不可自感染個體根除且可保留為可再活化之潛伏性感染。為控制結核病傳播，有效疫苗接種程序及疾病之精確早期診斷極為重要。

當前，利用活細菌之疫苗接種係用於誘導保護性免疫之最廣泛使用之方法。用於此目的之最常見分枝桿菌係卡介苗 (*Bacillus Calmette-Guerin*) (BCG)，其係在60多年前首次研發出之牛型分枝桿菌 (*M. bovis*) 的無毒性菌株。然而，BCG之安全及功效係爭論之來源-儘管保護抗兒童中之嚴重疾病表現，但BCG並不預防成人生命中之潛伏性TB之建立或肺病之再活化。另外，諸如美國等一些國家並不對普通大眾接種此藥劑。

已顯示，在分枝桿菌感染早期期間強烈表現之若干蛋白質可在動物疫苗接種模型中提供保護功效。然而，利用在感染早期期間高度表現之抗原的疫苗接種不可為處理晚期感染提供最佳免疫反應。潛伏性感染期間之充分控制可能需要對此時表現之特定抗原具有特異性之T細胞。直接靶向休眠持久性細菌之暴露後疫苗可有助於抵抗TB再活化，由此增強TB控制，或甚至能夠清除感染。因此，靶向潛伏性TB之疫苗可顯著且經濟地降低全球TB感染率。

基於晚期抗原之亞單位疫苗亦可與早期抗原組合使用以提供多相疫苗。或者，早期及/或晚期抗原可用於完善並改良BCG疫苗接種(藉由加強BCG反應或經由研發先進重組BCG菌株)。

蛋白抗原 Mtb72f及 M72係對結核病之治療或預防潛在有

益之蛋白抗原。已顯示Mtb72f在許多動物模型中提供保護(例如, 參見: Brandt等人, *Infect. Immun.* 2004 72(11): 6622-6632; Skeiky等人, *J. Immunol.* 2004 172:7618-7628; Tsenova等人, *Infect. Immun.* 2006 74(4):2392-2401; Reed等人, *PNAS* 2009 106(7):2301-2306)。Mtb72f亦為臨床研究之目標(Von Eschen等人, 2009 *Human Vaccines* 5(7):475-482)。M72係相對於Mtb72f將單一絲胺酸納入丙胺酸突變從而產生改良穩定特性之經改良抗原。亦已顯示M72相關抗原在潛伏性TB模型中具有價值(國際專利申請案WO 2006/117240)。

本文所用術語「M72相關抗原」係指以SEQ ID No: 1提供之M72蛋白或其免疫原衍生物。本文所用術語「衍生物」係指相對於參考序列經修飾之抗原。免疫原衍生物與參考序列足夠相似以保留參考序列之免疫原性質並仍能夠提高抗參考序列之免疫反應。衍生物可(例如)包含參考序列之經修飾形式或另一選擇為可由參考序列之經修飾形式組成。

T細胞表位係由T細胞(例如CD4+或CD8+ T細胞)識別之一段較短相鄰胺基酸。可經由熟習此項技術者已知之表位測繪實驗(例如, 參見Paul, *Fundamental Immunology*, 第3版, 243-247 (1993); Beißbarth等人 *Bioinformatics* 2005 21(增刊1): i29-i37)鑑別T細胞表位。在不同遠親雜交群體(例如人類)中, 不同HLA類型意指並非群體之所有成員皆可識別特定表位。由於T細胞反應在結核病中起至關重要

之作用，故為了使識別程度及免疫反應之等級最大化，M72之免疫原衍生物合意地係含有大多數(或適宜地所有)完整T細胞表位者。

熟習此項技術者應認識到，M72蛋白中改變、添加或剔除單一胺基酸或較小百分比之胺基酸之個別取代、剔除或添加係「免疫原衍生物」，其中該(等)改變導致用胺基酸取代功能相似之胺基酸或取代/剔除/添加實質上不影響免疫原功能之殘基。

提供功能相似胺基酸之保守取代表為業內所熟知。一般而言，該等保守取代將屬於下文指定之胺基酸群組中之一者，但在一些情況下，其他取代可為可能的而實質上不會影響抗原之免疫原性質。以下8組各自含有通常彼此保守取代之胺基酸：

- 1) 丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；
- 2) 天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；
- 3) 天冬醯胺(N)、麩醯胺酸(Q)；
- 4) 精胺酸(R)、離胺酸(K)；
- 5) 異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、纈胺酸(V)；
- 6) 苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)；
- 7) 絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；及
- 8) 半胱胺酸(C)、甲硫胺酸(M)

(例如，參見Creighton, *Proteins* 1984)。

適宜地，該等取代並不發生於表位之區域中，且因此不

會對抗原之免疫原性質具有顯著影響。

免疫原衍生物亦可包括彼等與參考序列相比插入額外胺基酸者。適宜地，該等插入並不發生於表位之區域中，且因此不會對抗原之免疫原性質具有顯著影響。插入之一個實例包括一段較短組胺酸殘基(例如2-6個殘基)以幫助所述抗原之表現及/或純化。

免疫原衍生物包括彼等與參考序列相比剔除胺基酸者。適宜地，該等剔除並不發生於表位之區域中，且因此不會對抗原之免疫原性質具有顯著影響。

熟習此項技術者應認識到，特定免疫原衍生物可包含取代、剔除及添加(或其任一組合)。

術語「一致的」或「一致性」百分比在兩個或更多個多肽序列之上下文中係指當在比較窗口或指定區域內比較及比對以獲得最大對應時，如使用以下序列比較算法中之一者或藉由人工比對及目測所量測，兩個或更多個序列或子序列相同或具有指定百分比之相同胺基酸殘基(即在指定區域內具有70%一致性，視情況75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%一致性)。此定義亦涉及測試序列的互補體。視情況，一致性存於長度為至少500個胺基酸(例如600個胺基酸或700個胺基酸)之區域內。適宜地，在對應於參考序列(與衍生序列不同)之全長的窗內實施比較。

就序列比較而言，一個序列作為參考序列與測試序列進行比較。當採用序列比較算法時，將測試序列及參考序列輸入電腦中，必要時指定子序列坐標，並指定序列算法程

序參數。可採用缺省程序參數，或可指定替代性參數。隨後，序列比較算法將基於程序參數計算測試序列相對於參考序列之序列一致性百分比。

本文所用「比較窗」係指序列可與具有相同數量之相鄰位置之參考序列在兩個序列經過最佳比對後進行比較的區段。用於比較之序列比對方法為業內所熟知。用於比較之最佳序列比對可藉由以下實施：例如，Smith及Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)之局部同源性算法、Needleman及Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)之同源性比對算法、Pearson及Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)之相似方法研究、該等算法之電腦化實施(GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA，在Wisconsin遺傳學軟體包，Genetics Computer Group，575 Science Dr.，Madison，WI中)或人工比對及目測(例如，參見*Current Protocols in Molecular Biology*(Ausubel等人編輯，(1995年增刊))。

有用算法之一個實例係PILEUP。PILEUP使用漸進式成對比對自一組相關序列產生多重序列比對以顯示關係及序列一致性百分比。其亦繪製顯示用於產生比對之成簇關係的樹或樹狀圖。PILEUP使用Feng及Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35:351-360 (1987)之漸進式比對方法的簡化。所用方法與Higgins及Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989)所述之方法相似。該程序可比對最多300個序列，每一者之最大長度為5,000個核苷酸或胺基酸。多重比對程序開始於兩個最

相似序列之成對比對，從而產生兩個比對序列之簇。隨後比對此簇與下一最相關序列或比對序列之簇。藉由簡單延伸兩個個別序列之成對比對來比對兩個序列簇。藉由一系列漸進式成對比對達成最終比對。藉由指定用於序列比較之區域的特定序列及其胺基酸坐標及藉由指定程序參數運行該程序。使用 PILEUP 比較參考序列與其他測試序列以使用以下參數測定序列一致性百分比關係：缺省空位權重 (3.00)、缺省空位長度權重 (0.10) 及加重末端空位。PILEUP 可自 GCG 序列分析軟體包 (例如 7.0 版 (Devereaux 等 *Nuc. Acids Res.*) 12:387-395 (1984)) 獲得。

適於測定序列一致性及序列相似性百分比之算法的另一實例係 BLAST 及 BLAST 2.0 算法，其分別闡述於 Altschul 等人，*Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) 及 Altschul 等人，*J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990) 中。用於實施 BLAST 分析之軟體可通過國家生物技術資訊中心 (網址為 www.ncbi.nlm.nih.gov/) 公開獲得。此算法首先涉及藉由識別詢問序列中之代碼長度縮寫 W 來識別高分值序列對 (HSP)，當代碼與一個資料庫序列中具有相同長度的代碼進行比對時，其將與某一正閾值分值 T 相匹配或滿足其條件。T 係指相鄰代碼分值閾值 (Altschul 等人，見上文)。該等初始相鄰重複代碼將作為引子以啟動發現含有其之更長 HSP 的搜索。將重複代碼沿每一序列之兩個方向延伸，儘量能夠使累積比對分值增加。對於核苷酸序列，累積分值係使用參數 M (匹配殘基對之獎勵分值；始終大於 0) 及 N (不

匹配殘基之懲罰分值；始終小於0)來計算。對於胺基酸序列，使用分值矩陣來計算累積分值。重複代碼在每一方向上之延伸在以下時候將停止：累積比對分值自其所達成之最大值降低了X數量；由於一或多個負分值殘基比對累加而使累積分值變為零或負值；或達到任一序列之端點。BLAST算法參數W、T及X確定比對的靈敏度及速度。BLASTN程序(對於核苷酸序列)使用的缺省值有代碼長度(W) 11、預期值(E) 10、M=5、N=-4及兩條鏈之比較值。對於胺基酸序列，該BLASTN程式使用的缺省值有代碼長度3及預期值(E) 10及BLOSUM62分值矩陣(參見Henikoff及Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915(1989))比對(B) 50、預期值(E) 10、M=5、N=-4及兩條鏈之比較值。

該BLAST算法亦對兩個序列間之相似性實施統計學分析(例如，參見，Karlin及Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993))。該BLAST算法提供之一種相似性量測係最小和概率(P(N))，其用於指示兩個核苷酸或胺基酸序列之間偶然發生匹配之概率。舉例而言，若在測試核酸與參考核酸之比較中最小和概率小於約0.2，更佳小於約0.01，且最佳小於約0.001，則認為該核酸與參考序列相似。

在任一事件中，多肽序列之免疫原衍生物將具有與參考序列基本上相同之活性。基本上相同之活性意指在具有特定抗原之PBMC或全血的活體外再刺激分析(例如再刺激若干小時至最多兩週之時段，例如最多1天、1天至1週或1至

2週)中具有參考序列之至少50%、適宜地至少75%且尤其至少90%之活性，該活體外再刺激分析經由以下來量測細胞之活化：淋巴組織增殖，培養物上清液中之細胞因子的產生(藉由ELISA、CBA等量測)，或藉由細胞內及細胞外染色(例如使用對免疫標記(例如CD3、CD4、CD8、IL2、TNF- α 、IFN- γ 、CD40L、CD69等)具有特異性之抗體)及之後之流式細胞計數器分析來表徵T細胞及B細胞反應。適宜地，基本上相同之活性意指在T細胞增殖及/或IFN- γ 產生分析中具有參考序列之至少50%、適宜地至少75%且尤其至少90%之活性。

M72蛋白之特定衍生物包括彼等在N末端具有額外His殘基(例如兩個His殘基，如SEQ ID No: 3中所提供；或5個或尤其6個His殘基之聚組胺酸標籤，其可用於鎳親和純化)者。含有初始絲胺酸殘基且在M72中突變之Mtb72f (SEQ ID No: 5)係M72之又一衍生物，在N末端具有額外His殘基(例如兩個His殘基；或5個或尤其6個His殘基之聚組胺酸標籤，其可用於鎳親和純化)之Mtb72f蛋白亦係如此。

適宜地，M72相關抗原將包含與M72具有至少70%一致性(例如至少80%、具體而言至少90%、尤其至少95%(例如至少99%))之序列，例如由其組成。視情況，M72相關抗原將包含與M72具有至少98%一致性之序列，例如由其組成。

典型M72相關抗原將包含具有較小數量之剔除、插入及/或取代的SEQ ID No: 1或3之免疫原衍生物，例如由其組

成。實例係彼等在0-5位處剔除最多5個殘基、在0-5之5個位置處插入最多5個殘基及取代最多20個殘基者。

M72之其他免疫原衍生物係彼等包含SEQ ID No: 1或3之片段(例如由其組成)者，其長度為至少500個胺基酸，例如長度為至少600個胺基酸或長度為至少700個胺基酸。

M72相關抗原可藉由先前所述(WO 2006/117240)、彼等提供於實例中之方法或其類似方法製得。

免疫原組合物可包含一或多種其他抗原性組份。該等額外抗原性組份本身不需對組合物中鹽之存在敏感。

額外抗原性組份可意欲在結核病預防及治療領域中增強或完善由M72相關抗原誘發之免疫反應或額外抗原可與其他病原體相關且出於方便之原因意欲與M72相關抗原一起投與。若調配物中存在大量抗原性組份，則該等抗原性組份可以個別多肽或融合蛋白之形式提供。在一些情況下，額外抗原性組份可以一或多種多核苷酸形式提供。

已熟知，對於非經腸投與而言，溶液應具有醫藥上可接受之滲透壓以避免細胞變形或裂解。醫藥上可接受之滲透壓通常意指溶液之滲透壓近似等滲或輕度高滲。適宜地，本發明免疫原組合物之滲透壓將在250 mOsm/kg至750 mOsm/kg範圍內，例如，該滲透壓可在250 mOsm/kg至550 mOsm/kg範圍內，例如在280 mOsm/kg至500 mOsm/kg範圍內。

可根據業內已知之技術，例如藉由使用市售滲透壓計(例如Advanced® 2020型，購自Advanced Instruments公司

(USA))量測滲透壓。

「等滲劑」係生理上耐受且賦予調配物適宜張力以防止水跨越細胞膜淨流的化合物，該等細胞膜與調配物接觸。

通常使用氯化鈉(NaCl)作為張力劑。本發明者已首次顯示，M72相關抗原對「鹽析」尤其敏感，「鹽析」係在存於含有高濃度鹽之溶液中時藉此溶液中之蛋白質聚集或凝結的過程。因此，提供替代方式以確保本發明免疫原組合物具有醫藥上可接受之滲透壓。

在一特定實施例中，提供另外包含非離子型張力劑之免疫原組合物。用於免疫原組合物中之非離子型張力劑本身需要醫藥上可接受，例如適用於人類，以及與M72相關抗原相容且另外與諸如免疫刺激劑等其他組份相容。

在本發明之一個實施例中，適宜非離子型張力劑係多元醇、糖(具體而言蔗糖、果糖、右旋糖或葡萄糖)或胺基酸(例如甘胺酸)。在一個實施例中，多元醇係糖醇，尤其C3-6糖醇。例示性糖醇包括甘油、赤蘚糖醇、蘇糖醇、阿糖醇、木糖醇、核糖醇、山梨醇、甘露醇、衛矛醇及艾杜糖醇。在此實施例之具體實例中，適宜非離子型張力劑係山梨醇。熟習此項技術者應認識到，可經由使用不同張力劑之混合物獲得適當滲透壓。在本發明之一特定實施例中，本發明組合物中之非離子型張力劑納入蔗糖及/或山梨醇。

在一個實施例中，多元醇於免疫原組合物中之適宜濃度介於約2.5%與約15% (w/v)之間，尤其介於約2.5%與約10%

(w/v)之間，例如介於約3%與約7% (w/v)之間，例如介於約4%與約6% (w/v)之間。在此實施例之具體實例中，多元醇係山梨醇。

在另一實施例中，免疫原組合物包含蔗糖及山梨醇。在該等情況下，免疫原組合物可適宜地含有介於約2.5%與約15% (w/v)之間之蔗糖及介於約2.5%與約15% (w/v)之間之山梨醇，尤其介於約2.5%與約10% (w/v)之間之蔗糖及介於約2.5%與約10% (w/v)之間之山梨醇，例如介於約3%與約7% (w/v)之間之蔗糖及介於約3%與約7% (w/v)之間之山梨醇，例如介於約4%與約6% (w/v)之間之蔗糖及介於約4%與約6% (w/v)之間之山梨醇。

免疫原組合物之pH應適於非經腸投與。pH通常在6.0至9.0範圍內。適宜地，pH在7.0至9.0、尤其7.25至8.75(例如7.5至8.5)範圍內，具體而言pH為7.75至8.25。約8.0之pH尤其令人感興趣。

可藉由使用緩衝液(包括(例如)Tris或磷酸鹽緩衝液)控制pH。

在本發明之一特定實施例中，免疫原組合物包含一或多種免疫刺激劑。

在一個實施例中，免疫刺激劑可為皂苷。尤其適用於本發明中之皂苷係Quil A及其衍生物。Quil A係分離自南美樹石鹼木(*Quillaja saponaria* Molina)之皂苷製劑，且首次由Dalsgaard等人於1974(「Saponin adjuvants」, Archiv. für die gesamte Virusforschung, 第44卷, Springer Verlag,

Berlin，第243-254頁)中闡述為具有佐劑活性。已藉由HPLC分離Quil A之純化部分，其保留佐劑活性而無Quil A相關之毒性(WO 88/09336)，例如QS7及QS21(亦稱作QA7及QA21)。QS21係源自石鹼木之樹皮的天然皂苷，其誘導CD8⁺細胞毒性T細胞(CTLs)、Th1細胞及顯著IgG2a抗體反應。在本發明中，QS21係較佳皂苷。

在本發明之適宜形式中，免疫原組合物內之皂苷佐劑係石鹼木Quil A之衍生物，特別是Quil A之免疫活性部分，諸如QS17或QS21，適宜地QS21。

期望地，QS21提供於反應原性(reactogenic)較弱之組合物中，其中其以外源性固醇(例如膽固醇)淬火。存在若干特定形式之反應原性較弱之組合物，其中QS21用膽固醇淬火。在一特定實施例中，皂苷/固醇係呈脂質體結構之形式(例如闡述於WO 96/33739之實例1中)。在此實施例中，脂質體適宜地含有中性脂質，例如磷脂醯膽鹼，其於室溫適宜地係非晶體，例如蛋黃磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯膽鹼(DOPC)或二月桂基磷脂醯膽鹼。脂質體亦可含有帶電脂質，其增加由飽和脂質構成之脂質體的脂質體-QS21結構之穩定性。在該等情形下，帶電脂質之量適宜地為1-20% w/w，例如5-10%。固醇與磷脂之比率係1-50% (mol/mol)，適宜地20-25%。

適宜固醇包括 β -麥固醇、豆固醇、麥角固醇、維生素D2及膽固醇。在一個特定實施例中，免疫原組合物包含膽固醇作為固醇。該等固醇已為業內所熟知，例如膽固醇於

Merck Index第11版第341頁中揭示為動物脂肪中發現之天然存在之固醇。

若活性皂苷部分係QS21，則QS21:固醇之比率通常為1:100至1:1 (w/w)，適宜介於1:10與1:1 (w/w)之間，尤其1:5至1:1 (w/w)。適宜存在過量固醇，QS21:固醇之比率為至少1:2 (w/w)。在一個實施例中，QS21:固醇之比率為1:5 (w/w)。固醇適宜為膽固醇。

在另一實施例中，免疫原組合物包含免疫刺激劑，其係類鐸(Toll-like)受體4 (TLR4)激動劑。「TLR激動劑」意指一種作為直接配體或間接地經由產生內源性或外源性配體而能夠經由TLR信號傳導途徑引起信號傳導反應的組份(Sabroe等人，J Immunol 2003，第1630-5頁)。TLR4激動劑能夠經由TLR-4信號傳導途徑引起信號傳導反應。TLR4激動劑之適宜實例係脂多糖，適宜係脂質A之無毒性衍生物，尤其單磷醯脂質A，或更尤其為3-去氧-醯基化單磷醯脂質A (3D-MPL)。

3D-MPL係由GlaxoSmithKline Biologicals N.A.以MPL名稱銷售，且在整個文件中稱作MPL或3D-MPL，參見例如美國專利第4,436,727號；第4,877,611號；第4,866,034號及第4,912,094號。3D-MPL主要利用IFN- γ (Th1)表型促進CD4⁺ T細胞反應。3D-MPL可根據GB 2220211A中所揭示之方法產生。在化學上，其係具有3個、4個、5個或6個醯基化鏈之3-去氧-醯基化單磷醯脂質A的混合物。在本發明組合物中，可使用小粒子3D-MPL製備免疫原組合物。小

粒子3D-MPL之粒徑使其可經由0.22 μm 濾器滅菌過濾。該等製劑闡述於WO 94/21292中。適宜地，使用粉末化3D-MPL製備本發明免疫原組合物。

可使用之其他TLR4激動劑係胺基葡萄糖苷磷酸烷基酯(AGPs)，如揭示於WO 98/50399或美國專利第6,303,347號(亦揭示AGPs之製備方法)中者，適宜為RC527或RC529或AGPs之醫藥上可接受之鹽，如揭示於美國專利第6,764,840號中。一些AGPs係TLR4激動劑，且一些係TLR4拮抗劑。

其他適宜TLR4激動劑揭示於WO 2003/011223及WO 2003/099195中，例如WO 2003/011223第4-5頁或WO 2003/099195第3-4頁所揭示之化合物I、化合物II或化合物III，尤其WO 2003/011223中揭示為ER803022、ER803058、ER803732、ER804053、ER804057、ER804058、ER804059、ER804442、ER804680及ER804764之化合物。舉例而言，一種適宜TLR-4激動劑係ER804057。

在一特定實施例中，免疫原組合物包含皂苷及TLR4激動劑二者。在一具體實例中，免疫原組合物包含QS21及3D-MPL。

TLR-4激動劑(例如脂多糖，例如3D-MPL)可以介於1 μg 與100 μg /免疫原組合物之人類劑量間之量使用。3D-MPL可以約50 μg (例如介於40 μg 與60 μg 之間，適宜介於45 μg 與55 μg 之間，或介於49 μg 與51 μg 之間，或50 μg)之量使用。在又一實施例中，免疫原組合物之人類劑量包含3D-

MPL之量為約25 μg (例如介於20 μg 與30 μg 之間，適宜介於21 μg 與29 μg 之間，或介於22 μg 與28 μg 之間，或介於23 μg 與27 μg 之間，或介於24 μg 與26 μg 之間，或25 μg)。

皂苷(例如QS21)可以介於1 μg 與100 μg /免疫原組合物之人類劑量間之量使用。QS21可以約50 μg (例如介於40 μg 與60 μg 之間，適宜介於45 μg 與55 μg 之間，或介於49 μg 與51 μg 之間，或50 μg)之量使用。在又一實施例中，免疫原組合物之人類劑量包含QS21之量為約25 μg (例如介於20 μg 與30 μg 之間，適宜介於21 μg 與29 μg 之間，或介於22 μg 與28 μg 之間，或介於23 μg 與27 μg 之間，或介於24 μg 與26 μg 之間，或25 μg)。

若免疫原組合物中存在TLR4激動劑及皂苷二者，則TLR4激動劑與皂苷之重量比適宜地介於1:5與5:1之間，適宜地介於1:2與2:1之間，例如約1:1。舉例而言，若3D-MPL係以50 μg 或25 μg 之量存在，則QS21亦可適宜地分別以50 μg 或25 μg /免疫原組合物之人類劑量的量存在。本發明之某些免疫原組合物包含各自介於1 μg 與100 μg /人類劑量間之量(例如各自介於10 μg 與75 μg /人類劑量間之量)的QS21及3D-MPL。本發明免疫原組合物可適宜地包含各自介於15 μg 與35 μg /人類劑量間之量(例如各自介於20 μg 與30 μg /人類劑量間之量)的QS21及3D-MPL。

在一個實施例中，免疫刺激劑係TLR9激動劑，例如如WO 2008/142133中所述。在具體實例中，該TLR9激動劑係免疫刺激性寡核苷酸，具體而言含有未甲基化CpG基元

之寡核苷酸。該等寡核苷酸已眾所周知且闡述於(例如)WO 96/02555、WO 99/33488及US 5,865,462中。適用於本文所述免疫原組合物中之TLR9激動劑係含有寡核苷酸、視情況含有兩個或更多個由至少三個、適宜地至少六個或更多個核苷酸隔開之二核苷酸CpG基元之CpG。CpG基元係緊跟有鳥嘌呤核苷酸之胞嘧啶核苷酸。

在一個實施例中，寡核苷酸中之核苷酸間鍵係二硫代磷酸酯鍵或可能為硫代磷酸酯鍵，但亦可使用磷酸二酯鍵及其他核苷酸間鍵，包括具有混合核苷酸間鍵聯基之寡核苷酸。製造硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯之方法闡述於US 5,666,153、US 5,278,302及WO 95/26204中。涵蓋包含不同核苷酸間鍵聯之寡核苷酸，例如混合硫代磷酸酯磷酸二酯。可使用穩定寡核苷酸之其他核苷酸間鍵。

適於納入本文所述免疫原組合物中之CpG寡核苷酸的實例具有以下序列。在一個實施例中，該等序列含有經硫代磷酸酯修飾之核苷酸間鍵聯基。

寡聚物1 (SEQ ID No: 9): TCC ATG ACG TTC CTG
ACG TT (CpG 1826)

寡聚物2 (SEQ ID No: 10): TCT CCC AGC GTG CGC
CAT (CpG 1758)

寡聚物3 (SEQ ID No: 11): ACC GAT GAC GTC GCC
GGT GAC GGC ACC ACG

寡聚物4 (SEQ ID No: 12): TCG TCG TTT TGT CGT
TTT GTC GTT (CpG 2006)

寡聚物 5 (SEQ ID No: 13): TCC ATG ACG TTC CTG
ATG CT (CpG 1668)

替代性 CpG 寡核苷酸可包含上述序列，因為該等序列內具有不連貫剔除或添加。

在一個實施例中，免疫刺激劑係母育酚。母育酚已為業內所熟知且闡述於 EP 0382271 中。在一特定實施例中，母育酚係 α -生育酚或其衍生物，例如琥珀酸 α -生育酚(亦稱作琥珀酸維他命 E)。

本發明亦提供製造本發明免疫原組合物之方法，該方法包含以下步驟：

- a. 凍乾 M72 相關抗原；及
- b. 用水溶液復原步驟 a) 之經凍乾 M72 相關抗原，其中該溶液之導電率係 13 mS/cm 或更低。

在某些實施例中，水溶液之導電率係 12 mS/cm 或更低，例如 10 mS/cm 或更低、8 mS/cm 或更低、6 mS/cm 或更低、4 mS/cm 或更低或 3 mS/cm 或更低。在一特定實施例中，水溶液之導電率係 2.5 mS/cm 或更低，例如 2.25 mS/cm 或更低或 2.0 mS/cm 或更低。

適宜地，水溶液之導電率應使得在復原凍乾抗原時，所得溶液之導電率為 13 mS/cm 或更低，例如 12 mS/cm 或更低，例如 10 mS/cm 或更低、8 mS/cm 或更低、6 mS/cm 或更低、4 mS/cm 或更低或 3 mS/cm 或更低。在一特定實施例中，所得溶液之導電率係 2.5 mS/cm 或更低，例如 2.25 mS/cm 或更低或 2.0 mS/cm 或更低。

另外提供製造本發明免疫原組合物之方法，該方法包含以下步驟：

- a. 凍乾M72相關抗原；及
- b. 用水溶液復原步驟a)之經凍乾M72相關抗原，其中該溶液中之鹽濃度係130 mM或更低。

在某些實施例中，該水溶液中之鹽濃度係100 mM或更低，例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低或40 mM或更低。在一特定實施例中，該水溶液中之鹽濃度係35 mM或更低，例如30 mM或更低或25 mM或更低。

適宜地，該水溶液中之鹽濃度應使得在復原凍乾抗原時，所得溶液之鹽濃度為130 mM或更低，例如100 mM或更低，例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低或40 mM或更低。在一特定實施例中，所得溶液中之鹽濃度係35 mM或更低，例如30 mM或更低或25 mM或更低。

另外提供製造本發明免疫原組合物之方法，該方法包含以下步驟：

- a. 凍乾M72相關抗原；及
- b. 用水溶液復原步驟a)之經凍乾M72相關抗原，其中該溶液中之氯化鈉濃度係130 mM或更低。

在某些實施例中，該水溶液中之氯化鈉濃度係100 mM或更低，例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低或40 mM或更低。在一

特定實施例中，該水溶液中之鹽濃度係35 mM或更低，例如30 mM或更低、20 mM或更低或15 mM或更低。適宜地，水溶液中之氯化鈉濃度係5 mM或低於5 mM。

適宜地，該水溶液中之氯化鈉濃度應使得在復原凍乾抗原時，所得溶液之氯化鈉濃度為130 mM或更低，例如100 mM或更低，例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低或40 mM或更低。在一特定實施例中，所得溶液中之氯化鈉濃度係35 mM或更低，例如30 mM或更低或25 mM或更低。

在一個實施例中，步驟b)(上文)之水溶液包含皂苷及/或TLR4激動劑，例如QS21及/或3D-MPL。在又一實施例中，皂苷及/或TLR4激動劑存於脂質體調配物中。在一個實施例中，水溶液包含存於脂質體調配物中之TLR4激動劑及皂苷及如本文所述非離子型張力劑(例如多元醇)。具體而言，水溶液可包含山梨醇。

亦提供包含以下之套組：

a. 經凍乾M72相關抗原；及

b. 水溶液，其中該溶液之導電率係13 mS/cm或更低。

在某些實施例中，水溶液之導電率係12 mS/cm或更低，例如10 mS/cm或更低、8 mS/cm或更低、6 mS/cm或更低、4 mS/cm或更低或3 mS/cm或更低。在一特定實施例中，水溶液之導電率係2.5 mS/cm或更低，例如2.25 mS/cm或更低或2.0 mS/cm或更低。

適宜地，水溶液之導電率應使得在復原凍乾抗原時，所

得溶液之導電率為13 mS/cm或更低，例如12 mS/cm或更低，例如10 mS/cm或更低、8 mS/cm或更低、6 mS/cm或更低、4 mS/cm或更低或3 mS/cm或更低。在一特定實施例中，所得溶液之導電率係2.5 mS/cm或更低，例如2.25 mS/cm或更低或2.0 mS/cm或更低。

另外提供包含以下之套組：

- a. 經凍乾M72相關抗原；及
- b. 水溶液，其中該溶液中之鹽濃度係130 mM或更低。

在某些實施例中，該水溶液中之鹽濃度係100 mM或更低，例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低或40 mM或更低。在一特定實施例中，該水溶液中之鹽濃度係35 mM或更低，例如30 mM或更低或25 mM或更低。

適宜地，該水溶液中之鹽濃度應使得在復原凍乾抗原時，所得溶液之鹽濃度為130 mM或更低，例如100 mM或更低，例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低或40 mM或更低。在一特定實施例中，所得溶液中之鹽濃度係35 mM或更低，例如30 mM或更低或25 mM或更低。

另外，提供包含以下之套組：

- a. 經凍乾M72相關抗原；及
- b. 水溶液，其中該溶液中之氯化鈉濃度係130 mM或更低。

在某些實施例中，該水溶液中之氯化鈉濃度係100 mM或更低，例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低或40 mM或更低。在一特定實施例中，該水溶液中之鹽濃度係35 mM或更低，例如30 mM或更低、20 mM或更低或15 mM或更低。適宜地，該溶液中之氯化鈉濃度係5 mM或低於5 mM。

適宜地，該水溶液中之氯化鈉濃度應使得在復原凍乾抗原時，所得溶液之氯化鈉濃度為130 mM或更低，例如100 mM或更低，例如90 mM或更低、80 mM或更低、70 mM或更低、60 mM或更低、50 mM或更低或40 mM或更低。在一特定實施例中，所得溶液中之氯化鈉濃度係35 mM或更低，例如30 mM或更低或25 mM或更低。

套組可經調適以提供免疫原組合物之單一劑量(例如單一人類劑量)、或免疫原組合物之多重劑量。

本發明之套組所用之水溶液可為如本文所定義之水溶液中之任一者。在本發明之一具體實施例中，水溶液包含呈脂質體形式之TLR4激動劑及/或皂苷。在一特定實施例中，TLR4激動劑係3D-MPL且皂苷係QS21。本文所用之水溶液可包含張力劑，例如多元醇，諸如山梨醇。

關於上述套組及產生本發明免疫原組合物之方法，可注意，免疫刺激劑及張力劑若存在可與抗原共凍乾或視需要包含於水溶液中。水溶液可僅為注射用水且免疫原組合物之所有其他組份與抗原共凍乾。通常，在水溶液中提供至少一些免疫刺激劑及張力劑，若某些組份(例如脂質體)與

凍乾之相容性較差，則此為尤其適當的。在一個實施例中，水溶液包含免疫刺激劑。在第二實施例中，水溶液包含張力劑，例如非離子型張力劑，例如多元醇，具體而言山梨醇。在第三實施例中，水溶液包含免疫刺激劑及張力劑，例如多元醇，具體而言山梨醇。

套組可另外包含指導使用水溶液復原經凍乾M72相關抗原之說明書。

本發明免疫原組合物可用於醫學中，具體而言用於預防、治療或改善分枝桿菌感染，例如結核分枝桿菌感染。免疫原組合物通常將提供用於投與人類，但其亦可在獸醫學中具有價值(例如投與牛)。

提供本發明免疫原組合物之用途，其用於製造藥劑，具體而言用於預防、治療或改善分枝桿菌感染、例如結核分枝桿菌感染的藥劑。

亦提供預防、治療或改善分枝桿菌感染、例如結核分枝桿菌感染的方法，其包含投與安全且有效量之本發明免疫原組合物。

可出於以下目的提供免疫原組合物：

- 治療活動性結核病；
- 藉由(例如)向未感染之個體或另一選擇為具有潛伏性感染之個體投與來預防活動性結核病；
- 治療潛伏性結核病；
- 藉由(例如)向未感染個體投與來預防潛伏性結核病；或

- 預防或延遲結核病再活化，尤其延遲TB再活化達(例如)數月、數年之時段或甚至無限期。

術語「活動性感染」係指具有表現疾病症狀及/或損傷、適宜地具有表現疾病症狀之感染，例如結核分枝桿菌感染。

術語「非活動性感染」、「休眠感染」或「潛伏性感染」係指無表現疾病症狀及/或損傷、適宜地無表現疾病症狀之感染，例如結核分枝桿菌感染。具有潛伏性感染之個體適宜地為藉由(例如)基於PPD或T細胞之分析測試呈感染陽性、但尚未展示與活動性感染相關之疾病症狀及/或損傷者。

術語「原發性結核病」係指(例如)在感染(例如結核分枝桿菌感染)後立即表現疾病症狀之臨床疾病。參見 *Harrison's Principles of Internal Medicine*，第150章，第953-966頁(第16版，Braunwald等人編輯，2005)。

術語「繼發性結核病」或「原發後結核病」係指休眠、非活動性或潛伏性感染(例如結核分枝桿菌感染)再活化。參見 *Harrison's Principles of Internal Medicine*，第150章，第953-966頁(第16版，Braunwald等人編輯，2005)。

術語「結核病再活化」係指在感染測試中(例如，在結核菌素皮膚測試中，適宜地在基於T細胞之活體外測試中)測試為陽性但不具有顯性疾病症狀的個體中，疾病症狀之稍後表現。適宜地，個體將不會再暴露於感染。陽性診斷測試指示個體受感染，然而，個體可具有或可不具有先前

表現之活動性疾病症狀，該等症狀已經充分治療以使結核病呈非活動性或潛伏性狀態。

適宜地，向未感染個體或具有分枝桿菌之潛伏性感染、例如結核分枝桿菌感染的個體投與免疫原組合物。

所投與免疫原組合物之體積可端視許多其他因素(例如具體遞送路徑，例如肌內、皮下或皮內)而有所變化。通常，人類之單次注射(單位劑量)中的投與體積將在50 μ l至1 ml範圍內，例如100 μ l至750 μ l，尤其400 μ l至600 μ l，例如約500 μ l。

包含於單一劑量內之M72相關抗原的量端視臨床需要而定但單一人類劑量通常將在1 μ g至100 μ g範圍內，例如5 μ g至50 μ g，例如5 μ g至20 μ g。單一人類劑量可含有約10 μ g M72相關抗原。

適宜地，本發明之組合物將穩定，此意指在25°C下達24小時時段之儲存期間，如藉由本文所述技術量測之抗原性仍為儲存之前之抗原性的至少80%。期望地，於25°C下儲存24小時後，抗原性仍為至少85%，例如至少90%且具體而言至少95%。對於尤其感興趣之組合物而言，在30°C下儲存24小時後，保留該組合物之抗原性的至少80%，例如至少85%、至少90%且尤其至少95%。

現將借助以下非限制性實例進一步闡述本發明。

實例

實例1：佐劑組合物ASA(山梨醇)之製備

使用山梨醇作為張力劑製備包含存於脂質體調配物中之

3-去氧-醯基化單磷醯脂質A及QS21的佐劑組合物。此佐劑組合物係如下製備：

A. 脂質體之製備方法：

在真空下將脂質(DOPC)、膽固醇及3-去氧-醯基化單磷醯脂質A存於有機溶劑中之混合物完全弄乾。隨後添加水溶液(磷酸鹽緩衝鹽水[100 mM NaCl、50 mM磷酸鹽，pH 6.1])並攪拌容器直至所有脂質均懸浮為止。隨後將此懸浮液利用高剪切混合器預均質化且隨後高壓均質化直至脂質體大小降至藉由DLS測得為約90 nm ± 10 nm為止。隨後無菌過濾脂質體。

B. ASA調配物：

步驟1：濃縮脂質體之稀釋

將100 mM Na₂/K磷酸鹽緩衝液(pH 6.1)(在稀釋10倍時)添加至注射用水中以在最終調配物中獲得10 mM磷酸鹽緩衝液濃度。隨後添加存於注射用水(WFI)中之30% (w/v)山梨醇溶液以在最終調配物中獲得4.7%之濃度-將此溶液於室溫下攪拌15至45分鐘。

隨後向混合物中添加濃縮脂質體(由分別40 mg/ml、10 mg/ml及2 mg/ml之DOPC、膽固醇及3D-MPL製得)以在最終調配物中獲得100 µg/ml濃度之3D-MPL。

隨後於室溫下將混合物攪拌15至45分鐘。

步驟2：QS21添加

使用蠕動幫浦在磁力攪拌下向經稀釋脂質體中添加QS21散存料以在最終調配物中獲得100 µg/ml濃度。將混

合物攪拌15至45分鐘。

最終ASA(山梨醇)調配物含有2 mg DOPC、500 μ g膽固醇、100 μ g 3D-MPL/ml及100 μ g QS21/ml、4.7%山梨醇及5 mM氯化鈉及10 mM磷酸鹽。

步驟3：pH經檢查為 6.1 ± 0.1

步驟4：無菌過濾

使用來自PALL公司之聚醚砜(PES)濾膜實施無菌過濾。

步驟5：於 $+2^{\circ}\text{C}$ 至 $+8^{\circ}\text{C}$ 下儲存。

隨後於 4°C 下儲存所得包含存於脂質體調配物中之3-去氧-醯基化MPL及QS21且含有作為張力劑之山梨醇(指定ASA(山梨醇))的佐劑組合物。

實例2：佐劑組合物ASA (150 mM NaCl)之製備

使用氯化鈉作為張力劑製備包含存於脂質體調配物中之3-去氧-醯基化單磷醯脂質A及QS21的佐劑組合物。

A. 脂質體之製備方法：

在真空下將脂質(DOPC)、膽固醇及3-去氧-醯基化單磷醯脂質A (3D-MPL)存於有機溶劑中之混合物完全弄乾。隨後添加磷酸鹽緩衝鹽水(100 mM NaCl、50 mM磷酸鹽，pH 6.1)並攪拌容器直至所有脂質均懸浮為止。隨後將此懸浮液利用高剪切混合器預均質化且隨後高壓均質化直至脂質體大小降至藉由DLS測得為約 $90\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$ 為止。隨後在 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ PES膜上無菌過濾脂質體。

B. ASA調配物：

步驟1：濃縮脂質體之稀釋

將 100 mM Na₂/K 磷酸鹽緩衝液 (pH 6.45) (在稀釋 10 倍時) 及 1.5 M NaCl 添加至注射用水中以在最終調配物中分別獲得 10 mM 磷酸鹽及 150 mM NaCl 濃度。在室溫下將此混合物攪拌 5 分鐘。隨後向混合物中添加濃縮脂質體 (由分別 40 mg/ml、10 mg/ml 及 2 mg/ml 之 DOPC、膽固醇及 3D-MPL 製得) 以在最終調配物中獲得 100 µg/ml 濃度之 3D-MPL。隨後於室溫下將混合物攪拌 5 至 15 分鐘。

步驟 2：QS21 添加

在磁力攪拌下向經稀釋脂質體中添加 QS21 散存料以在最終調配物中獲得 100 µg/ml 濃度。在室溫下攪拌混合物。

步驟 3：pH 經檢查為 6.1 ± 0.1 。

步驟 4：無菌過濾

使用來自 PALL 公司之聚醚砜 (PES) 濾膜實施無菌過濾。

步驟 5：於 +2°C 至 +8°C 下儲存

ASA (150 mM NaCl) 之最終組成係 2 mg DOPC、500 µg 膽固醇、100 µg 3-去氧-醯基化 MPL、100 µg QS21/1 ml、與 10 mM 磷酸鹽及 150 mM NaCl。

實例 3：QS21 裂解活性

已知 QS21 可使紅血球 (RBC) 裂解。測試如實例 1 製備之 ASA (山梨醇) 佐劑組合物以確保以與利用包含 150 mM NaCl 之等效佐劑組合物 (ASA (150 mM NaCl)) 觀察到之相同之方式淬滅 QS21 裂解活性。

藉由使用雞紅血球 (RBC) 之紅血球溶解量測 QS21 裂解活性。於 4°C 下以 550 g 離心 RBC。丟棄上清液。將沉澱物小

心再懸浮於PBS緩衝液中以獲得初始體積並重複相同操作直至上清液不再為紅色為止(通常3次)。沉澱物若不直接使用，則將其於4℃下儲存最多3至4天(且在其使用當天再次洗滌)，或若同一天使用則將其於緩衝液中稀釋約10倍。

在ASA緩衝液中(根據所測試ASA試樣，在鹽中或在山梨醇緩衝液中)當場製備QS21劑量範圍曲線且製備佐劑試樣(含有50 µg或90 µg當量之QS21，意指500 µl或900 µl當量之ASA)。在標準物及具有適當緩衝液(隨所測試試樣之緩衝液而變，含有或不含山梨醇)之試樣中將最終體積調節至900 µl。ASA因其乳光會干擾光密度(OD)。由此製備ASA「空白」且自ASA測試試樣之OD減去其OD。彼等空白對應於與試樣中所測試之體積相同的ASA體積，但用緩衝液調節至1 ml。不向該等空白中添加RBC。隨後於室溫下(RT)將標準物及試樣與RBC(100 µl經稀釋RBC，添加至900 µl標準物及試樣中)一起培育30分鐘。隨後將試樣以900 g離心5分鐘。離心後量測540 nm下之光密度。

藉由極限測試測定裂解活性。

1. 檢測極限(LOD)定義為產生OD之QS21的最低濃度：

- 高於基準($OD > 0.1$)
- 係OD緩衝液(「0 µg」 QS21)之約3倍
- 在曲線之上升部分中
- 針對每一測試測定。

2. 若佐劑試樣之OD大於 OD_{LOD} ，則QS21裂解活性在佐劑試樣中保持陽性。

例示性 QS21 曲線

μg QS21	OD	QS21，經淬火
0	0.029	NA
0.5	0.052	< LOD
0.6	0.073	< LOD
0.7	0.091	< LOD
0.8	0.096	< LOD
0.9	0.12	> 98.2%
1	0.195	> 98%
1.1	0.212	> 97.8%
1.2	0.348	> 97.6%
1.3	0.479	> 97.4%
1.4	0.612	> 97.2%
1.5	0.669	> 97%
2	1.139	> 96%
2.5	1.294	> 95%
3	1.391	> 94%
5	1.416	> 90%
佐劑*	0.03	> 98.2 %

*測試 50 μg QS21 當量。150 mM 氯化鈉緩衝液。

上述數據以圖式方式顯示於圖 1 中。

此分析中之檢測極限係 0.9 μg QS21 且 OD 為 0.12。

估計在包含 150 mM 氯化鈉之佐劑組合物中淬火之 QS21 係所測試 50 μg 當量之 QS21 之 98.2% 以上。在所測試 90 μg 當量之情形下，結論係 99% 以上。

隨後將淬火之 QS21 與包含山梨醇及僅 5 mM 氯化鈉之等效佐劑組合物進行比較。在 ASA 於 4°C 下儲存後或在加速穩定(於 37°C 下 7 天)後產生數據。對於山梨醇中之 ASA 而言，在含有山梨醇之緩衝液中實現 QS21 標準曲線。

試樣	時間點	LOD	QS21，經淬火
佐劑組合物(ASA) 150 mM NaCl	T0	< 1.4	> 97.2%
	7天， 37°C	< 0.9	> 98.2%
佐劑組合物(ASA)山梨醇、5 mM NaCl	T0	< 2	> 97.8%
	7天， 37°C	<1	> 96%
	11個月，4°C	<2	> 97.8%*

測試 50 µg 當量之 QS21，只是 *測試 90 µg 當量之 QS21。

推斷在低氯化鈉緩衝液中充分淬滅 QS21。

實例 4：MPL 同類物。

在化學上，3D-MPL 係大部分具有 4 個、5 個或 6 個醯基化鏈之 3-去氧-醯基化單磷醯脂質 A 之混合物。每一分離 3D-MPL 分子稱作同類物。重要的是，同類物組成保持恆定，其中同類物之百分比之間無位移。亦重要的是，所用任何緩衝液使得同類物組成與所用濃縮脂質體中相同來製備佐劑組合物。

如圖 2 上所示，在 3D-MPL 濃縮脂質體 (濃縮脂質體 LIP07-217，圖 2 之第一欄)、包含存於 150 mM NaCl 緩衝液中之 3D-MPL 脂質體及 QS21 之佐劑組合物 (佐劑 150 mM NaCl、或 ASA (150 mM NaCl)，第二欄) 及包含存於山梨醇及 5 mM NaCl 緩衝液中之 3D-MPL 脂質體及 QS21 之佐劑組合物 (佐劑山梨醇、或 ASA(山梨醇，第 3-7 欄) 中檢驗同類物組成。

亦在製備及於 37°C 下維持 0 天及 7 天以確保隨時間流逝而無演變後在兩批 ASA(山梨醇)佐劑中檢驗同類物組成 (參見圖 2 之最後四欄)。

藉由 IP-HPLC-氟檢測(ARD)測定濃縮脂質體或 ASA(山梨醇)試樣中之 MPL 之四-、五-及六-醯基化同類物的相對分佈。利用丹磺醯肼衍化標準物及試樣，該丹磺醯肼在雙糖主鏈上引入氟-活性發色團。在 C18 反相管柱上使用四丁基氫氧化銨(TBAOH)作為離子對試劑分析經衍化試樣。在不同組(四醯基、五醯基及六醯基)中溶析含有相同數量之脂肪醯基之同類物。藉由比較每一組之峰面積與所有 MPL 同類物之總峰面積推導同類物之分佈。

圖 2 顯示每一同類物之百分比。發現佐劑緩衝液間無顯著同類物組成差別，且同類物組成在山梨醇緩衝液中隨時間流逝而一致。

實例 5：佐劑組合物 ASA(山梨醇-2)之製備

使用山梨醇作為張力劑製備包含存於脂質體調配物中且相對於實例 1 減少量之 3-去氧-醯基化單磷醯脂質 A 及 QS21 的佐劑組合物。此佐劑組合物係如下製備：

利用含有 10 mM 磷酸鹽、5 mM NaCl、4.7%山梨醇(pH 6.1)之溶液 1:1 稀釋 ASA(山梨醇)(根據實例 1 製備)製備佐劑。

最終 ASA(山梨醇-2)調配物含有 1 mg DOPC、250 µg 膽固醇、50 µg 3D-MPL/ml 及 50 µg QS21/ml、4.7%山梨醇、5 mM 氯化鈉及 10 mM 磷酸鹽。

實例 6：佐劑組合物 ASA(山梨醇-3)之製備

使用山梨醇作為張力劑製備包含存於脂質體調配物中且相對於實例 1 減少量之 3-去氧-醯基化單磷醯脂質 A 及 QS21

的佐劑組合物。此佐劑組合物係如下製備：

A. 脂質體之製備方法：

在真空下將脂質(DOPC)、膽固醇及3-去氧-醯基化單磷醯脂質A存於有機溶劑中之混合物完全弄乾。隨後添加水溶液(磷酸鹽緩衝鹽水[100 mM NaCl、50 mM磷酸鹽，pH 6.1])並攪拌容器直至所有脂質均懸浮為止。隨後將此懸浮液利用高剪切混合器預均質化且隨後高壓均質化直至脂質體大小降至藉由DLS測得為約90 nm ± 10 nm為止。隨後無菌過濾脂質體。

B. ASA調配物：

步驟1：濃縮脂質體之稀釋

將100 mM Na₂/K磷酸鹽緩衝液(pH 6.1)(在稀釋10倍時)添加至注射用水中以在最終調配物中獲得10 mM磷酸鹽緩衝液濃度。隨後添加存於注射用水(WFI)中之30% (w/v)山梨醇溶液以在最終調配物中獲得4.7%之濃度-將此溶液於室溫下攪拌15至45分鐘。

隨後向混合物中添加濃縮脂質體(由分別40 mg/ml、10 mg/ml及2 mg/ml之DOPC、膽固醇及3D-MPL製得)以在最終調配物中獲得50 µg/ml濃度之3D-MPL。

隨後於室溫下將混合物攪拌15至45分鐘。

步驟2：QS21添加

使用蠕動幫浦在磁力攪拌下向經稀釋脂質體中添加QS21散存料以在最終調配物中獲得50 µg/ml濃度。將混合物攪拌15分鐘。

最終ASA調配物含有 1 mg DOPC、250 μg 膽固醇、50 μg 3D-MPL/ml及 50 μg QS21/ml、4.7%山梨醇及 2.5 mM氯化鈉、10 mM磷酸鹽。

步驟3：pH經檢查為 6.1 ± 0.1

步驟4：無菌過濾

使用來自PALL公司之聚醚砜(PES)濾膜實施無菌過濾。

步驟5：於 $+2^{\circ}\text{C}$ 至 $+8^{\circ}\text{C}$ 下儲存

隨後於 4°C 下儲存所得包含存於脂質體調配物中之3-去氧-醯基化MPL及QS21且含有作為張力劑之山梨醇(指定ASA(山梨醇-3))的佐劑組合物。

實例7：佐劑組合物ASA (150 mM NaCl-2)之製備

使用氯化鈉作為張力劑製備包含存於脂質體調配物中且相對於實例2減少量之3-去氧-醯基化單磷醯脂質A及QS21的佐劑組合物。此佐劑組合物係如下製備：

A. 脂質體之製備方法：

在真空下將脂質(DOPC)、膽固醇及3-去氧-醯基化單磷醯脂質A (3D-MPL)存於有機溶劑中之混合物完全弄乾。隨後添加磷酸鹽緩衝鹽水(100 mM NaCl、50 mM磷酸鹽，pH 6.1)並攪拌容器直至所有脂質均懸浮為止。隨後將此懸浮液利用高剪切混合器預均質化且隨後高壓均質化直至脂質體大小降至藉由DLS測得為約 $90 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ 為止。隨後在 $0.22 \mu\text{m}$ PES膜上無菌過濾脂質體。

B. ASA調配物：

步驟1：濃縮脂質體之稀釋

將 100 mM Na₂/K 磷酸鹽緩衝液 (pH 6.45) (在稀釋 10 倍時) 及 1.5 M NaCl 添加至注射用水中以在最終調配物中分別獲得 10 mM 磷酸鹽及 150 mM NaCl 濃度。在室溫下將此混合物攪拌 5 分鐘。隨後向混合物中添加濃縮脂質體 (由分別 40 mg/ml、10 mg/ml 及 2 mg/ml 之 DOPC、膽固醇及 3D-MPL 製得) 以在最終調配物中獲得 50 µg/ml 濃度之 3D-MPL。隨後於室溫下將混合物攪拌 5 至 15 分鐘。

步驟 2：QS21 添加

在磁力攪拌下向經稀釋脂質體中添加 QS21 散存料以在最終調配物中獲得 50 µg/ml 濃度。在室溫下攪拌混合物。

步驟 3：pH 經檢查為 6.1±0.1。

步驟 4：無菌過濾

使用來自 PALL 公司之聚醚砜 (PES) 濾膜實施無菌過濾。

步驟 5：於 +2°C 至 +8°C 下儲存

ASA (150 mM NaCl-2) 之最終組成係 1 mg DOPC、250 µg 膽固醇、50 µg 3-去氧-醯基化 MPL、50 µg QS21/1 ml、10 mM 磷酸鹽及 150 mM NaCl。

實例 8：蛋白抗原之製備

具有兩個 N 末端 His 殘基之 M72 (SEQ ID No: 3)

M72 表現載體之構造

編碼在 N 末端具有額外 6-His 標籤之 Mtb72f 之胺基酸序列的質粒係藉由以下來產生：依序串聯鍵聯編碼 Mtb32a 之 C 末端片段之開放讀碼框 (ORF) 與 Mtb39a 之全長 ORF，之後在 C 末端鍵聯 Mtb32a 之 N 末端部分。此係藉由以下來完

成：使用含有獨特限制位點(EcoRI及EcoRV)且在C末端無終止密碼子(在Mtb32a及Mtb39a之C末端片段情形下)之序列特異性寡核苷酸來進行結核分枝桿菌菌株H37Rv之基因組DNA的聚合酶鏈反應(PCR)。使用此載體作為模板，藉由定點誘變使Ser706突變為Ala。藉由DNA測序驗證插入物之適當定向及突變Ser706Ala。

為獲得編碼M72之載體(其僅在N末端具有2個His殘基)，利用市售定點誘變系統剔除四個His。在序列驗證後，藉由酶反應自質粒切除M72編碼序列，凝膠純化並連接至pET載體中。隨後驗證重組質粒之序列。此質粒在T7啟動子控制下編碼M72。T7 RNA聚合酶之表現係自表現宿主中之基因組整合體驅動且使用基於lac操縱子之系統(lacI)及IPTG化學誘導信號加以誘導。表現質粒具有卡那黴素(kanamycin)抗性。

使用電穿孔法將在T7啟動子控制下編碼M72融合蛋白之質粒轉變為大腸桿菌之HMS174 (DE3)菌株。在兩條鏈上對M72插入物及側接區域之編碼序列進行測序且發現其與自初始質粒構築體測定之序列一致。

發酵

將造粒工作種子之小瓶於室溫下解凍。藉由混合工作種子與4.9 ml預培養培養基製備預稀釋物。使用1 ml預稀釋物培育液體預培養物，其由補充有50 mg/l硫酸卡那黴素及10 g/l葡萄糖之400 ml預培養培養基組成。

預培養培養基組成

成份	濃度		
KH_2PO_4	14.83 g/l		
K_2HPO_4	1.65 g/l		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.82 g/l		
酵母提取物	6.21 g/l		
甘油87% (w/w)	14.54 ml/l		
金屬及鹽溶液 ⁽¹⁾ ：	9.7 ml/l		
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		3.3 g/l	
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		58 g/l	
-微量元素溶液 ⁽²⁾ ：		116 ml/l	
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$			7.65 g/l
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$			5.28 g/l
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$			1.1 g/l
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			1.1 g/l
- H_3BO_3			0.3 g/l
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			2.64 g/l
- HCl 4N			6.2 ml/l
生物素及 CaCl_2 溶液 ⁽²⁾ ：	0.97 ml/l		
-生物素		0.05 g/l	
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		61.7 g/l	
用NaOH (25%)溶液將培養基之pH調節至6.5			
經由0.22 μm 過濾培養基			

(1) 用HCl (37%)溶液將pH調節至1.50；經由0.22 μm 過濾該溶液

(2) 經由0.22 μm 過濾該溶液

將預培養物於30°C及攪拌(200 RPM)下在2升振盪燒瓶中培育直至 $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 達到介於約2與4之間之值為止(大約培育時間：16小時)。在此階段，將含有補充有34 mg/l硫酸卡那黴素之45升培養基的72升(總體積)發酵罐與52 ml液體預

培養物一起培育。

培養基組成

成份	濃度	
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.63 g/l	
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.056 g/l	
微粒元素溶液 ⁽¹⁾ ：	1.91 ml/l	
- ZnSO ₄ 7H ₂ O		7.65 g/l
- MnSO ₄ H ₂ O		5.28 g/l
- CuSO ₄ 5H ₂ O		1.1 g/l
- CoCl ₂ 6H ₂ O		1.1 g/l
- H ₃ BO ₃		0.3 g/l
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O		2.64 g/l
- HCl 4N		6.2 ml/l
HCl 37%	0.40 mL/L	
酵母提取物	35 g/L	
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.10 g/l	
KH ₂ PO ₄	18.70 g/l	
麩胺酸鈉	2.5 g/l	
甘油87%	0.276 ml/l	
葡萄糖	20 g/l	
生物素溶液 ⁽²⁾ ：	0.22 ml/l	
- 生物素		1 g/l
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0.21 g/l	
經由0.22 μm過濾該溶液		

(1)經由0.22 μm過濾該溶液

(2)用NaOH (25%)溶液將pH調節至11.0；經由0.22 μm過濾該溶液

在生長期期間，藉由定期添加25% (v/v) NH₄OH及25% (v/v) H₃PO₄將pH維持於6.8 ± 0.2下。在30℃下培育16小時後，以進料培養基開始分批進料。

進料培養基組成

成份	濃度	
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.98 g/l	
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.178 g/l	
微粒元素溶液 ⁽¹⁾ ：	6.02 ml/l	
- ZnSO ₄ 7H ₂ O		7.65 g/l
- MnSO ₄ H ₂ O		5.28 g/l
- CuSO ₄ 5H ₂ O		1.1 g/l
- CoCl ₂ 6H ₂ O		1.1 g/l
- H ₃ BO ₃		0.3 g/l
- Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O		2.64 g/l
- HCl 4N		6.2 ml/l
HCl 37%	1.24 ml/l	
麴胺酸鈉	5 g/l	
酵母提取物	40 g/l	
甘油87%	590 ml/l	
生物素溶液 ⁽²⁾ ：	2 ml/l	
- 生物素		1 g/l
CaCl ₂ 2 H ₂ O	0.66 g/l	
經由0.22 µm過濾該溶液		

(1) 經由 0.22 µm 過濾該溶液

(2) 用 NaOH (25%) 溶液將 pH 調節至 11.0；經由 0.22 µm 過濾該溶液

將溫度於 30°C 下再維持 2 小時，隨後升至 37°C 直至發酵結束為止。將氣流連續地設定為 75 l/min 且藉由攪拌及壓力之回饋控制將溶解氧保持於 17% 飽和度下。按需要自動添加少量抗發泡溶液。當 OD_{650nm} 達到 50 (±5) 之值時，添加 1 mM 異丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 以誘導 M72 之表現。自開始誘導之時間點 5 小時後停止發酵。在輕微

攪拌下將細胞培養物冷卻至15℃並離心(於4℃下)以獲得細胞沉澱物，其後將其於-20℃下以等份試樣儲存。

包涵體之分離

將自收穫物收集之細胞沉澱物於室溫下解凍並利用高壓均質器在裂解緩衝液(10 mM Tris、50 mM NaCl, pH 8.0)中分裂。其後使細胞裂解物離心且用含有脲、Tris及NaCl之洗滌緩衝液洗滌所得細胞沉澱物(或包涵體，IB)。利用含有8 M脲之溶解緩衝液溶解IB並經由0.2 μ m膜過濾。首先藉由使用Q瓊脂糖凝膠快速流動(Sepharose Fast Flow)(QSFF)管柱之陰離子交換層析純化此經過濾溶液。利用6 M脲、20 mM bis-Tris丙烷、90 mM NaCl(溶液pH 7.0)溶析M72。

藉由羧基磷灰石層析(HA)進一步純化所收集M72，自HA利用6 M脲、20 mM bis-Tris丙烷、250 mM NaCl(溶液pH 7.0)對其進行溶析。將所收集部分用30 kDa膜盒濃縮並以20 mM Tris(pH 7.5)透析過濾。隨後經由0.22 μ m濾膜對M72進行滅菌。隨後將純化主體分成等份並於-70℃下儲存。

實例9：對包含M72之組合物於pH 6.1、7.5及8.5及不同鹽濃度下之「鹽析」之研究

研究氯化鈉濃度及pH對M72抗原穩定性之影響，如由大小及抗原性所評定。

方法

將化主體抗原(具有兩個N末端His殘基之M72，SEQ ID

No: 3, 如實例8中製備)在含有0 mM、50 mM、150 mM、300 mM及450 mM之最終氯化鈉濃度的三種不同緩衝液(10 mM磷酸鹽緩衝液(pH 6.1)、20 mM Tris緩衝液(pH 7.5)及20 mM Tris緩衝液(pH 8.5))中稀釋至100 µg/ml之濃度。

立刻分析試樣(T0), 在分析之前於4°C下儲存過夜(T0 O/N)或在分析之前於25°C下儲存24小時(T24h25°C)。

使用來自Malvern Instruments (UK)之Malvern Zetasizer Nano ZS實施DLS。使用633 nm之雷射波長及4 mW之功率操作儀器。於22°C之溫度下以173°檢測散射光。藉由儀器軟體計算Z-平均直徑(Zav)及多分散性指數(pI)。

使用購自Thermo Fischer Scientific之Nepheloskan® Ascent實施散射測濁分析。在購自Corning公司(USA)之UV透明Costar®微板中實施分析。

藉由夾心式ELISA對抗原性進行定量, 其中藉由M72特異性兔多株抗體捕獲抗原且隨後藉由M72(Mtb39)特異性小鼠單株抗體實現。所有量測值均係相對於基於用於製備測試調配物之純化主體蛋白的期望抗原性提供。

結果

此實驗之發現提供於圖3至5中。

結果首次證實, 含有M72相關抗原之溶液的穩定性對pH及氯化鈉濃度二者敏感。在pH較低時, 氯化鈉對抗原大小及抗原性之影響愈發顯著。

在pH 6.1下, 即使不存在氯化鈉, 抗原大小及抗原性亦不穩定。添加50 mM氯化鈉(pH 6.1)會導致在25°C下24小時

後大小自 35 nm(在 T0 時 0 mM 氯化鈉)增大至 58 nm (T0)或 79 nm。

在 25℃ 及 pH 7.5 或 8.5 下，尤其不存在氯化鈉或氯化鈉濃度為 50 mM 時，抗原大小及抗原性在 24 小時內相對穩定。然而，將氯化鈉濃度增大至 150 mM 或更大會顯著增大抗原大小並降低抗原性。

實例 10：包含 M72、免疫刺激劑且使用山梨醇作為張力劑之組合物中之「鹽析」的預防

為比較含有 150 mM NaCl 之免疫原組合物與使用山梨醇作為張力劑之組合物的穩定性，多個試樣，且使用 SEC-HPLC 及 ELISA 監測穩定性。

方法

製備三種不同凍乾餅，從而使得在與實例 5 及 7 之適當佐劑調配物組合時，可獲得期望 pH：

(a) 具有兩個 N 末端 His 殘基之 M72-在復原疫苗中之目標 pH 為 8.5

向注射用水中添加 15.75% (w/v) 蔗糖溶液(在注射用水中製備)以獲得 6.3% 之蔗糖濃度。隨後添加 3% (w/v) Tween80 溶液(在注射用水中製備)以獲得 0.025% 之濃度。隨後添加 1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.8)以獲得 50 mM Tris 緩衝液濃度。在室溫下將此混合物磁力攪拌 5 分鐘。隨後添加純化主體抗原(具有兩個 N 末端 His 殘基之 M72，SEQ ID No: 3，如實例 8 中製備)以獲得 25 µg/ml 之蛋白濃度。在室溫下將此混合物磁力攪拌 10 分鐘。檢查 pH 且發現為 8.8。

在 3 ml 玻璃小瓶中填充 0.5 ml 所得混合物，隨後冷凍乾燥。

(b) 具有兩個 N 末端 His 殘基之 M72-在復原疫苗中之目標 pH 為 8.0

向注射用水中添加 15.75% (w/v) 蔗糖溶液(在注射用水中製備)以獲得 6.3% 之蔗糖濃度。隨後添加 3% (w/v) Tween80 溶液(在注射用水中製備)以獲得 0.025% 之濃度。隨後添加 1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.8)以獲得 20 mM Tris 緩衝液濃度。在室溫下將此混合物磁力攪拌 5 分鐘。隨後添加純化主體抗原(具有兩個 N 末端 His 殘基之 M72，SEQ ID No: 3，如實例 8 中製備)以獲得 25 µg/ml 之蛋白濃度。在室溫下將此混合物磁力攪拌 10 分鐘。檢查 pH 且發現為 8.8。

在 3 ml 玻璃小瓶中填充 0.5 ml 所得混合物，隨後冷凍乾燥。

(c) 具有兩個 N 末端 His 殘基之 M72-在復原疫苗中之目標 pH 為 7.5

向注射用水中添加 15.75% (w/v) 蔗糖溶液(在注射用水中製備)以獲得 6.3% 之蔗糖濃度。隨後添加 3% (w/v) Tween80 溶液(在注射用水中製備)以獲得 0.025% 之濃度。隨後添加 1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.8)以獲得 12.5 mM Tris 緩衝液濃度。在室溫下將此混合物磁力攪拌 5 分鐘。隨後添加純化主體抗原(具有兩個 N 末端 His 殘基之 M72，SEQ ID No: 3，如實例 8 中製備)以獲得 25 µg/ml 之蛋白濃度。在室溫下將此混合物磁力攪拌 10 分鐘。檢查 pH 且發現為 8.8。

在 3 ml 玻璃小瓶中填充 0.5 ml 所得混合物，隨後冷凍乾燥。

利用實例 5 及 7 中製備之 625 μ l 佐劑溶液復原上述凍乾餅。在利用佐劑溶液復原後，獲得以下免疫原組合物：

(i) 具有兩個 N 末端 His 殘基之 M72-ASA (150 mM NaCl-2) pH 8.5

10 μ g/ml 抗原

5% w/v 蔗糖

40 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 μ g DOPC

125 μ g 膽固醇

25 μ g 3D-MPL

25 μ g QS21

150 mM NaCl

10 mM 磷酸鹽

pH 8.5

(ii) 具有兩個 N 末端 His 殘基之 M72-ASA (150 mM NaCl-2)

pH 8.0

10 μ g/ml 抗原

5% w/v 蔗糖

16 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 μ g DOPC

125 μg 膽固醇

25 μg 3D-MPL

25 μg QS21

150 mM NaCl

10 mM磷酸鹽

pH 8.0

(iii) 具有兩個N末端His殘基之M72-ASA (150 mM NaCl-

2) pH 7.5

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗原

5% w/v蔗糖

12.5 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 μg DOPC

125 μg 膽固醇

25 μg 3D-MPL

25 μg QS21

150 mM NaCl

10 mM磷酸鹽

pH 7.5

(iv) 具有兩個N末端His殘基之M72-ASA(山梨醇-2)pH 8.5

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗原

5% w/v蔗糖

40 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 μg DOPC

125 μg 膽固醇

25 μg 3D-MPL

25 μg QS21

5 mM NaCl

4.7% w/v山梨醇

10 mM磷酸鹽

pH 8.5

(v) 具有兩個N末端His殘基之M72-ASA(山梨醇-2) pH 8.0

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗原

5% w/v蔗糖

16 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 μg DOPC

125 μg 膽固醇

25 μg 3D-MPL

25 μg QS21

5 mM NaCl

4.7% w/v山梨醇

10 mM磷酸鹽

pH 8.0

(vi) 具有兩個N末端His殘基之M72-ASA(山梨醇-2)pH 7.5

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗原

5% w/v蔗糖

12.5 mM Tris

0.02% w/v Tween80

500 µg DOPC

125 µg膽固醇

25 µg 3D-MPL

25 µg QS21

5 mM NaCl

4.7% w/v山梨醇

10 mM磷酸鹽

pH 7.5

試樣分析

在 25℃ 或 30℃ 下儲存後 (T0、T6h 及 T24h) 表徵上述復原免疫原組合物。

藉由注射於在 20 mM Tris 緩衝液 (pH 8.5) 中平衡之 Supelco TSK-Gel5000Pwx1 (ID 7.8 mm×30 cm) 上，藉由 210 nm 下之 UV 檢測及 0.5 ml/min 之流速實施 SEC-HPLC 分析。

藉由夾心式 ELISA 對抗原性進行定量，其中藉由 M72 特異性兔多株抗體捕獲抗原且隨後藉由 M72(Mtb39) 特異性小鼠單株抗體實現。所有量測值均係相對於基於用於製備測試調配物之純化主體蛋白的期望抗原性提供。

結果

結果顯示於圖 6 及 7 中。

在每一 pH (即 pH 7.5、8.0 及 8.5) 下使用山梨醇作為張力劑在低鹽組合物中復原後，SEC-HPLC 曲線穩定。此可與

含有 150 mM NaCl 之免疫原組合物的 SEC-HPLC 曲線顯著不同，其顯示所得初始曲線與彼等在 25°C 或 30°C 下儲存後之曲線間具有顯著變化。在 150 mM NaCl 組合物之 pH 降低時，此演變變得更強烈。

就抗原性而言可得出相同結論，其中於 30°C 下回收物在每一 pH (即 pH 7.5、8.0 及 8.5) 下使用山梨醇作為張力劑在低鹽組合物中復原後在至多 24 h 內仍大體穩定。

實例 11：本發明免疫原組合物之導電率測定

量測本發明之一系列免疫原組合物的導電率並與對照氯化鈉溶液之導電率及含有習用量之氯化鈉之免疫原組合物進行比較。

方法

自 1500 mM 氯化鈉之儲備溶液藉由於注射用水中稀釋來製備具有 0 mM、75 mM、100 mM、150 mM、250 mM 及 300 mM 之氯化鈉濃度之一系列標準物。

根據實例 8 中提供之程序使用具有兩個 N 末端 His 殘基之 M72 製備免疫原組合物。為研究來自純化主體中之抗原本身及任何殘餘材料的貢獻，亦藉由排除抗原組份製備安慰劑凍乾餅。

使用 Malvern Zetasizer Nano 及摺疊毛細管池中 1.5 ml 每一試樣，施加 30 V 至 150 V 之電壓 (藉由儀器自動測定) 並測定導電率。

結果

氯化鈉標準溶液之導電率

氯化鈉濃度 mM	導電率 mS/cm
0	0.0
75	8.2
100	10.7
150	15.6
250	23.9
300	30.0

基於此數據之標準曲線提供於圖8中。

測試溶液之導電率

說明	氯化鈉濃度 mM	導電率 mS/cm	等效氯化鈉濃度 mM
ASA(山梨醇-2)	5	1.46	9
安慰劑pH 8.0 / ASA(山梨醇-2)	5	1.95	14
M72 pH 8.0 / ASA(山梨醇-2)	5	1.96	14
安慰劑pH 8.5 / ASA(山梨醇-2)	5	2.36	18
M72 pH 8.5 / ASA(山梨醇-2)	5	2.28	17
ASA (150 mM NaCl-2)	150	16	159
安慰劑pH 8.5/ASA (150 mM NaCl-2)	150	14.8	147
M72 pH 8.5/ASA (150 mM NaCl-2)	150	15.3	152

如自上述數據可見，利用150 mM NaCl之溶液之導電率顯著大於最低程度地使用NaCl之溶液的導電率。

純化主體中之抗原及任何組份之影響最小，此乃因安慰劑製劑具有與含有對等部分之其M72相關抗原相當之導電率。

實例12：本發明免疫原組合物之免疫原性測試。

此實例之目的係確定調配物變化來降低本發明免疫原組合物中之鹽之量(目的為改良蛋白質穩定性)是否對活體內

免疫原性具有影響。

方法

評估四種免疫原組合物：

1. 具有兩個N末端His殘基之M72 pH 8.5/ASA (150 mM NaCl-2)
2. 具有兩個N末端His殘基之M72 pH 8.5/ASA(山梨醇-2)
3. 具有兩個N末端His殘基之M72 pH 8/ASA(山梨醇-2)
4. 具有兩個N末端His殘基之M72 pH 7.5/ASA(山梨醇-2)

在C57BL/6小鼠中評估含有該等抗原之組合物的免疫原性。對於四種組合物之每一者而言，在第0、14及28天時對30只C57BL/6小鼠肌肉注射存於50 μ l佐劑溶液中之1 μ g抗原(藉由實例10中提供之程序製備)，共注射3次。在最後一次免疫後第6天量測所引發M72特異性T細胞反應(CD4及CD8二者)(6dPIII)。

對於M72特異性細胞反應之測定而言，收集並彙集來自30只小鼠/組之外周血淋巴細胞(5只小鼠/組，共6組)。在活體外平鋪細胞之前實施紅血球裂解。利用覆蓋M72序列(無N末端His殘基)之重疊肽之庫(具有11個胺基酸重疊之15-mer肽，1 μ g/ml/肽)活體外再刺激細胞。使用保留於培養基中之細胞(無肽刺激)測定背景反應。在與肽庫共培養2小時後，向孔中添加佈雷菲德菌素A(brefeldin A)(用以抑制細胞因子分泌)並將細胞於4°C下儲存過夜。隨後針對以

下標記對細胞染色：CD4、CD8、IL-2、IFN- γ 及TNF- α 。

結果

圖9及10中之每一數據點分別代表在第三次免疫後6天來自5只小鼠之外周血淋巴細胞庫之減去背景之M72特異性CD4或CD8 T細胞反應。該反應表示為因應M72肽庫之刺激產生IFN- γ 及/或IL-2及/或TNF- α 之CD4 T細胞的百分比。條代表每一組之反應的中值。

圖9及10中之結果顯示，在利用測試調配物中之每一者進行三次免疫後，誘導之CD4及CD8 T細胞反應相當。因此，可推斷出，本發明免疫原組合物中存在之鹽之量減少並不損害誘導之T細胞反應。

總之，實例9及10首次證實因pH及NaCl濃度對含有M72相關抗原之免疫原組合物的穩定性具有有害影響。利用非離子型張力劑再調配免疫原組合物可解決抗原穩定性問題。另外，實例3、4及12證實，自免疫原調配物移除實質上所有NaCl及將其用作為張力劑之山梨醇替換並不對T細胞反應之刺激具有有害影響。

在整個本說明書及下文之申請專利範圍中，除非上下文另有要求，否則詞語「包含(comprise)」及變化形式(例如，「comprises」及「comprising」)應理解為暗指包括所述整數、步驟、整數群組或步驟群組，但並不排除任何其他整數、步驟、整數群組或步驟群組。

本文(包括專利及專利申請案)中提及之所有文件之全文皆係以引用方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖 1. QS21 裂解活性曲線；

圖 2. 不同 ASA 調配物中之每一 3D-MPL 同類物的百分比；

圖 3. 具有不同 pH 及 NaCl 濃度之免疫原組合物在儲存後之 DLS；

圖 4. 具有不同 pH 及 NaCl 濃度之免疫原組合物在儲存後之散射測濁分析；

圖 5. 具有不同 pH 及 NaCl 濃度之免疫原組合物在儲存後之抗原穩定性；

圖 6. 具有不同 pH 及 NaCl 濃度之免疫原組合物在儲存後之 SEC-HPLC 分析 (A: ASA (150 mM NaCl-2), pH 7.5; B: ASA (150 mM NaCl-2), pH 8.0; C: ASA (150 mM NaCl-2), pH 8.5; D: ASA(山梨醇-2), pH 7.5、8.0 及 8.5 疊加)；

圖 7. 具有不同 pH 及 NaCl 濃度之免疫原組合物在儲存後之抗原性；

圖 8. NaCl 標準溶液之導電率；

圖 9. 使用本發明免疫原組合物誘導小鼠中之 CD4 T 細胞反應；及

圖 10. 使用本發明免疫原組合物誘導小鼠中之 CD8 T 細胞反應。

序列表

<110> 比利時商葛蘭素史密斯克藍生物物品公司

<120> 新穎之組合物

<130> VB64442

<140> 100146325

<141> 2011-12-14

<150> 61/422,723

<151> 2010-12-14

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 723

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> M72 融合蛋白

<400> 1

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
50 55 60

Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
65 70 75 80

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
85 90 95

Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
100 105 110

Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
115 120 125

Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
130 135 140

Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
145 150 155 160

Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
165 170 175

Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
180 185 190

Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
195 200 205

Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285
 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380
 Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 435 440 445
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val

500 505 510

Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
515 520 525

Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
530 535 540

Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
545 550 555 560

Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
565 570 575

Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
580 585 590

Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
595 600 605

Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
610 615 620

Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
625 630 635 640

Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
645 650 655

Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
660 665 670

Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr
675 680 685

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ala
690 695 700

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
705 710 715 720

Ala Ala Ser

<210> 2
<211> 2172
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> M72 融合物之編碼序列

<400> 2
atgacggccg cgtccgataa cttccagctg tcccaggggtg ggcagggatt cgccattccg 60
atcgggcagg cgaaggcgat cgcgggccag atccgacagg gtgggggggtc acccaccgtt 120
catatcgggc ctaccgcctt cctcggcctg ggtgtgtcg acaacaacgg caacggcgca 180
cgagtccaac gcgtggtcgg gagcgctccg gcggcaagtc tcggcatctc caccggcgac 240

gtgatacccg cggtcgacgg cgctccgata aactcggcca ccgcgatggc ggacgcgctt	300
aacgggcatc atccccgtga cgtcatctcg gtagacctggc aaaccaagtc gggcggcacg	360
cgtacaggga acgtgacat ggccgagggga cccccggccg aattcatggt ggatttcggg	420
gcgttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtacgccg gcccggggtc ggacctcgctg	480
gtggcccgcg ctccagatgt ggacagcgtg gcgagtgacc tgttttcggc cgcgtcgccg	540
tttcagtcgg tggctcgggg tctgacgggt gggtcgtgga taggttcgtc ggccgggtcgtg	600
atgggtggcgg cggcctcgcc gtaigtggcg tggatgagcg tcaccgaggc gcaggccgag	660
cigaccgccg cccagggtccg ggttgcctcg gcggcctacg agacggcgta tgggctgacg	720
gtgccccgcg cggtgatcgc cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac	780
ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcgcg gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg	840
gccaagacg ccgccgcgat gtttggctac gccgcggcga cggcgacggc gacggcgacg	900
ttgctgccgt tcgaggaggc gccggagatg accagcgccg gtagggctcct cgagcaggcc	960
gccgcggctg agggaggcctc cgacaccgcc gcggcgaacc agttgatgaa caatgtgcc	1020
caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgcttcttc caagctgggt	1080
ggcctgtgga agacggcttc gccgcacggt tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc	1140
aacaaccaca tgtcgatgac caactcgggt gtgtcgaiga ccaacacctt gagctcgatg	1200
ttgaagggtt ttgtccggc ggccggccgc caggccgtgc aaaccgcggc gcaaaacggg	1260
gtccggcgga tgagctcgct gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cggtaggggtg	1320
gccgccaact tgggtcgggc ggctcggtc ggttcgttgt cggtgccga ggcttgggc	1380
gcggccaacc aggcagtcac cccggcgccg cggcgctgc cgtgaccag cctgaccagc	1440
gccgcggaaa gaggggcccg gcagatgctg ggccggctgc cggtagggca gatggcgcc	1500
agggccggtg gtgggctcag tgggtgtctg cgtgttccgc cgcgacccta tgtgatgccg	1560
catttcccg cagccggcga tatcgcccc ccggccttgt cgcaggaccg gticgccgac	1620
ttccccgcgc tgcacctcga cccgtccgcg atggtcgcc aagtggggcc acaggtggtc	1680
aacatcaaca ccaaaactgg ctacaacaac gccgtggcg ccgggaccgg catcgtcatc	1740
gatcccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cacgtgatcg cggcgccac cgacatcaat	1800
gcgttcagcg tcggctccgg ccaaacctac ggctcgaig tggtcgggta tgaccgcacc	1860
caggatgtcg cggtgctgca gctgcgggt gccggtggcc tgcctcgcc ggctatcggt	1920
ggcggcgtcg cggttgggtg gccgtcgtc gcgatgggca acagcggtag gcaggcgga	1980
acgccccgtg cggtgccctg cagggtggtc gcgctcgcc aaaccgtgca ggctcggtat	2040
tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag	2100
cccggtgaig cgggcggggc cgtcgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg	2160
gccgcgtcct ag	2172

- <210> 3
- <211> 725
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 具有 2 個額外 his 殘基之 M72 融合物

<400> 3

Met His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly
 1 5 10 15
 Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln
 20 25 30
 Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala
 35 40 45
 Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val
 50 55 60
 Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr
 65 70 75 80
 Gly Asp Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr
 85 90 95
 Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser
 100 105 110
 Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr
 115 120 125
 Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu
 130 135 140
 Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala
 145 150 155 160
 Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu
 165 170 175
 Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val
 180 185 190
 Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser
 195 200 205
 Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr
 210 215 220
 Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly
 225 230 235 240
 Leu Thr Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met
 245 250 255
 Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala
 260 265 270
 Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala
 275 280 285

Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu
 290 295 300
 Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu
 305 310 315 320
 Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln
 325 330 335
 Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr
 340 345 350
 Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val
 355 360 365
 Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn
 370 375 380
 His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser
 385 390 395 400
 Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln
 405 410 415
 Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser
 420 425 430
 Leu Gly Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg
 435 440 445
 Ala Ala Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala
 450 455 460
 Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu
 465 470 475 480
 Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro
 485 490 495
 Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu
 500 505 510
 Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly
 515 520 525
 Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro
 530 535 540
 Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln
 545 550 555 560
 Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala
 565 570 575
 Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn
 580 585 590

His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser
595 600 605

Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp
610 615 620

Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala
625 630 635 640

Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn
645 650 655

Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val
660 665 670

Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu
675 680 685

Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly
690 695 700

Asp Ala Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met
705 710 715 720

Asn Thr Ala Ala Ser
725

<210> 4
<211> 2178
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 2 個額外 his 殘基之 M72 融合物的編碼序列

<400> 4
atgcatcaca cggccgcgtc cgataacttc cagctgtccc aggggtgggca gggattcgcc 60
attccgatcg ggcaggcgat ggcgatcgcg ggcagatcc gatcgggtgg ggggtcaccc 120
accgttcata tcgggcctac cgccttcctc ggcttgggtg ttgtcgacaa caacggcaac 180
ggcgcacgag tccaacgcgt ggtcgggagc gctccggcgg caagtctcgg catctccacc 240
ggcgcacgtga tcaccgcggt cgacggcgct ccgatcaact cggccaccgc gatggcggac 300
gcgcttaacg ggcatcatcc cggtagcgtc atctcggtag cctggcaaac caagtcgggc 360
ggcacgcgta cagggaaagt gacattggcc gagggacccc cggccgaatt catggtggat 420
ttcggggcgt taccaccgga gatcaactcc gcgaggatgt acgccggccc gggttcggcc 480
tcgctgggtg ccgcggctca gatgtgggac agcgtggcga gtgacctgtt ttcggccgcg 540
tcggcggttc agtcgggtgt ctggggcttg acggtggggt cgtggatagg ttcgtcggcg 600
ggctctgatgg tggcggcggc ctgccgtat gtggcgtgga tgagcgtcac cgcggggcag 660
gccgagctga ccgccgccca ggtccgggtt gctcggcggg cctacgagac ggcgtatggg 720
ctgacgggtg ccccgccggt gatcggcgag aaccgtgtg aactgatgat tctgatagcg 780
accaacctct tggggcaaaa caccggcg atcgcggtca acgaggccga atacggcgag 840
atgtgggccc aagacggcg cgcatgttt ggctacgccg cggcgacggc gacggcgacg 900

gcgacgttgc tgccttcga ggaggcgccg gagatgacca gcgcgggtgg gctcctcgag 960
caggccgccc cggtcgagga ggccctccgac accgccgcgg cgaaccagtt gatgaacaat 1020
gtgccccagg cgtcgcaaca gctggcccag ccacgcagg gcaccacgcc ttcttccaag 1080
ctgggtggcc tgtggaagac ggtctcgccg catcggtcgc cgatcagcaa catggtgtcg 1140
atggccaaca accacatgic galgaccaac tcgggtgtgt cgatgaccaa caccttgagc 1200
tcgatgttga agggctttgc tccggcgccg gccgcccagg ccgtgcaaac cgcggcgcaa 1260
aacgggggtcc gggcgatgag ctcgctgggc agctcgctgg gtctctcggg tctgggcggt 1320
ggggtggccg ccaacttggg tcgggcggcc tcggtcgggt cgttgcgggt gccgcaggcc 1380
tgggcgcggg ccaaccaggc agtcaccccg gcgcgcgggg cgctgccgct gaccagcctg 1440
accagcgccg cggaaagagg gcccgggcag atgctgggcg ggctgccggt ggggcagatg 1500
ggcgccaggg ccggtgtgtg gctcagtgtt gtgctcgctg ttccgccgag accctatgtg 1560
atgccgcatt ctccggcagc cggcgatatc gcccgcggg ccttgtcgca ggaccggttc 1620
gccgacttcc ccgcgctgcc cctcgacccg tccgcgatgg tcgccaagt ggggccacag 1680
gtggtcaaca tcaacaccaa actgggctac aacaacgcgg tgggcgcggg gaccggcatc 1740
gtcatcgatc ccaacggtgt cgtgctgacc aacaaccacg tgatcgcggg gccaccgac 1800
atcaatgcgt tcagcgctcg ctccggccaa acctacggcg tcgatgttgt cgggtatgac 1860
cgccccagg atgtcgcggt gctgcagctg cgcggtgccg gtggcctgcc gtcggcggcg 1920
atcggtggcg gcgtcgcggt tggtagagcc gtcgtcgga tgggcaacag cggtaggcag 1980
ggcggaacgc ccggtcggt gcctggcagg gtggtcgcgc tcggccaaac cgtgcaggcg 2040
tcggattcgc tgaccggtgc cgaagagaca ttgaacgggt tgatccagtt cgatgccgcg 2100
atccagcccc gigtgcggg cgggcccgtc gtcaacggcc taggacaggt ggtcggtatg 2160
aacacggccg cgtcctag 2178

<210> 5
<211> 723
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Mtb72f 融合物

<400> 5

Met Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly Gln Gly
1 5 10 15

Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln Ile Arg
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala Phe Leu
35 40 45

Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val Gln Arg
50 55 60

Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr Gly Asp
65 70 75 80

Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr Ala Met
 85 90 95
 Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser Val Thr
 100 105 110
 Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala
 115 120 125
 Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu Pro Pro
 130 135 140
 Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala Ser Leu
 145 150 155 160
 Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu Phe Ser
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val Gly Ser
 180 185 190
 Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser Pro Tyr
 195 200 205
 Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr Ala Ala
 210 215 220
 Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly Leu Thr
 225 230 235 240
 Val Pro Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met Ile Leu
 245 250 255
 Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala Val Asn
 260 265 270
 Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala Met Phe
 275 280 285
 Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu Pro Phe
 290 295 300
 Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln Leu Met
 325 330 335
 Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr Gln Gly
 340 345 350
 Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val Ser Pro
 355 360 365
 His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn His Met
 370 375 380

Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser Ser Met
 385 390 395 400
 Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln Thr Ala
 405 410 415
 Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser Leu Gly
 420 425 430
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Val Ala Ala Asn Leu Gly Arg Ala Ala
 435 440 445
 Ser Val Gly Ser Leu Ser Val Pro Gln Ala Trp Ala Ala Ala Asn Gln
 450 455 460
 Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Leu Thr Ser Leu Thr Ser
 465 470 475 480
 Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu Gly Gly Leu Pro Val Gly
 485 490 495
 Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu Ser Gly Val Leu Arg Val
 500 505 510
 Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser Pro Ala Ala Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe Ala Asp Phe Pro Ala Leu
 530 535 540
 Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln Val Gly Pro Gln Val Val
 545 550 555 560
 Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn Ala Val Gly Ala Gly Thr
 565 570 575
 Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val Leu Thr Asn Asn His Val
 580 585 590
 Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe Ser Val Gly Ser Gly Gln
 595 600 605
 Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp Arg Thr Gln Asp Val Ala
 610 615 620
 Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu Pro Ser Ala Ala Ile Gly
 625 630 635 640
 Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val Ala Met Gly Asn Ser Gly
 645 650 655
 Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro Gly Arg Val Val Ala Leu
 660 665 670
 Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu Thr Gly Ala Glu Glu Thr

675

680

685

Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala Ile Gln Pro Gly Asp Ser
690 695 700

Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln Val Val Gly Met Asn Thr
705 710 715 720

Ala Ala Ser

<210> 6
<211> 2172
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Mtb72f 融合物之編碼序列

<400> 6
atgacggccg cgtccgataa ctccagctg tcccagggtg ggcagggatt cgccattccg 60
atcgggcagg cgatggcgat cgcgggccag atccgacgg gtgggggggtc acccaccgtt 120
catatcgggc ctaccgcctt cctcggcttg ggtgtgtctg acaacaacgg caacggcgca 180
cgagtccaac gcgtggtcgg gagcgctccg gcggcaagtc tcggcatctc caccggcgac 240
gtgatcaccg cggtcgacgg cgtccgac aactcggcca ccgcgatggc ggacgcgctt 300
aacgggcata atcccgggtga cgtcatctcg gtgacctggc aaaccaagtc gggcggcacg 360
cgtacaggga acgtgacatt ggccgaggga ccccgggccg aattcatggt ggatttcggg 420
gcgttaccac cggagatcaa ctccgcgagg atgtacgccg gcccggggtc ggcctcgtg 480
gtggcccgcg ctacagatgt ggacagcgtg gcgagtgacc tgttttcggc cgcgtcggcg 540
tttcagtcgg tggcttgggg tctgacgggt gggctcgtgga taggttcgtc ggcgggtctg 600
atggtggcgg cggcctcggc gtatgtggcg tggatgagcg tcaccgaggg gcaggccgag 660
ctgaccggcg cccagggtccg ggttgctcgg gcggcctacg agacggcgta tgggctgacg 720
gtgcccccg cggtgatcgc cgagaaccgt gctgaactga tgattctgat agcgaccaac 780
ctcttggggc aaaacacccc ggcgatcggc gtcaacgagg ccgaatacgg cgagatgtgg 840
gcccgaagac ccgccgcgat gtttggctac gccgcggcga cggcgacggc gacggcgacg 900
ttgctgccgt tcgaggaggc gccggagatg accagcgcg gggggtcct cgagcaggcc 960
gccgcggctg aggaggcctc cgacaccgcc gcggcgaacc agttgatgaa caatgtgccc 1020
caggcgctgc aacagctggc ccagcccacg cagggcacca cgcttcttc caagctgggt 1080
ggcctgtgga agacggtctc gccgacatcg tcgccgatca gcaacatggt gtcgatggcc 1140
aacaaccaca tgtcgatgac caactcgggt gtgtcgatga ccaacacctt gagctcgatg 1200
ttgaagggtt ttgctccggc ggcgggccgc caggccgtgc aaaccgcggc gcaaacggg 1260
gtccggcgga tgagctcgtt gggcagctcg ctgggttctt cgggtctggg cggtggggtg 1320
gccgccaact tgggtcgggc ggcctcggtc ggttcgttgt cggtgccgca ggcctgggcc 1380
gcggccaacc aggcagtcac cccggcgcg cgggcgctgc cgctgaccag cctgaccagc 1440 ...
gccgcggaaa gagggcccgg gcagatgctg ggcgggctgc cggtggggca gatgggcgcc 1500
agggccgggt gtgggctcag tgggtgtctg cgtgttcggc cgcgacccta tgtgatgccg 1560

cattctccgg cagccggcga tatcgccccg ccggccttgt cgcaggaccg gttcgccgac 1620
ttccccgcgc tgccccicga cccgtccgcg atggtcgccc aagtggggcc acaggtggtc 1680
aacatcaaca ccaaaciggg ctacaacaac gccgtgggcg ccgggaccgg catcgtcatc 1740
gatcccaacg gtgtcgtgct gaccaacaac cactgatcg cgggcgccac cgacatcaat 1800
gcgttcagcg tcggctccgg ccaaacctac ggctcgaig tggtcgggta tgaccgcacc 1860
caggatgtcg cggtgctgca gctgcgcggt gccggtggcc tgccgtcggc ggcgatcggt 1920
ggcggcgctc cggttggtga gcccgtcgtc gcgatgggca acagcggtag gcagggcgga 1980
acgccccgtg cggtgcctgg cagggtggtc gcgctcgcc aaaccgtgca ggcgtcggat 2040
tcgctgaccg gtgccgaaga gacattgaac gggttgatcc agttcgatgc cgcgatccag 2100
cccggtgatt cgggcggggc cgtcgtcaac ggcctaggac aggtggtcgg tatgaacacg 2160
gccgcgtcct ag 2172

<210> 7
<211> 729
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 6 個額外 his 殘基之 Mtb72f 融合物

<400> 7

Met His His His His His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu
1 5 10 15

Ser Gln Gly Gly Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala
20 25 30

Ile Ala Gly Gln Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile
35 40 45

Gly Pro Thr Ala Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn
50 55 60

Gly Ala Arg Val Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu
65 70 75 80

Gly Ile Ser Thr Gly Asp Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile
85 90 95

Asn Ser Ala Thr Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly
100 105 110

Asp Val Ile Ser Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr
115 120 125

Gly Asn Val Thr Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp
130 135 140

Phe Gly Ala Leu Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly
145 150 155 160

Pro Gly Ser Ala Ser Leu Val Ala Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val

Trp Ala Ala Ala Asn Gln Ala Val Thr Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro
465 470 475 480

Leu Thr Ser Leu Thr Ser Ala Ala Glu Arg Gly Pro Gly Gln Met Leu
485 490 495

Gly Gly Leu Pro Val Gly Gln Met Gly Ala Arg Ala Gly Gly Gly Leu
500 505 510

Ser Gly Val Leu Arg Val Pro Pro Arg Pro Tyr Val Met Pro His Ser
515 520 525

Pro Ala Ala Gly Asp Ile Ala Pro Pro Ala Leu Ser Gln Asp Arg Phe
530 535 540

Ala Asp Phe Pro Ala Leu Pro Leu Asp Pro Ser Ala Met Val Ala Gln
545 550 555 560

Val Gly Pro Gln Val Val Asn Ile Asn Thr Lys Leu Gly Tyr Asn Asn
565 570 575

Ala Val Gly Ala Gly Thr Gly Ile Val Ile Asp Pro Asn Gly Val Val
580 585 590

Leu Thr Asn Asn His Val Ile Ala Gly Ala Thr Asp Ile Asn Ala Phe
595 600 605

Ser Val Gly Ser Gly Gln Thr Tyr Gly Val Asp Val Val Gly Tyr Asp
610 615 620

Arg Thr Gln Asp Val Ala Val Leu Gln Leu Arg Gly Ala Gly Gly Leu
625 630 635 640

Pro Ser Ala Ala Ile Gly Gly Gly Val Ala Val Gly Glu Pro Val Val
645 650 655

Ala Met Gly Asn Ser Gly Gly Gln Gly Gly Thr Pro Arg Ala Val Pro
660 665 670

Gly Arg Val Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Gln Ala Ser Asp Ser Leu
675 680 685

Thr Gly Ala Glu Glu Thr Leu Asn Gly Leu Ile Gln Phe Asp Ala Ala
690 695 700

Ile Gln Pro Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Asn Gly Leu Gly Gln
705 710 715 720

Val Val Gly Met Asn Thr Ala Ala Ser
725

- <210> 8
- <211> 2190
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 具有 6 個額外 his 殘基之 M72 融合物的編碼序列

<400> 8
atgcatcacc atcaccatca cacggccgcg tccgataact tccagctgtc ccagggtggg 60
cagggattcg ccattccgat cgggcaggcg atggcgatcg cgggccagat ccgatcgggt 120
gggggggtcac ccaccgttca tatcgggcct accgccitcc tcggcttggg tgttgtcgac 180
aacaacggca acggcgcacg agtccaacgc ggggtcggga gcgctccggc ggcaagtctc 240
ggcatctcca ccggcgacgt gatcaccgcg gtcgacggcg ctccgatcaa ctcgccacc 300
gcgatggcgg acgcgcctaa cgggcatcat cccggtgacg tcattctcgt gacctggcaa 360
accaagtcgg gcggcacgcg tacagggaac gtgacattgg ccgagggacc cccggccgaa 420
ttcatgggtg atttcggggc gttaccaccg gagatcaact ccgcgaggat gtacgccggc 480
ccgggttcgg cctcgcctgt ggccgcggct cagatgtggg acagcgtggc gagtgcctg 540
tttctggccg cgtcggcgtt tcagtcggtg gtcgtgggtc tgacgggtgg gtcgtggata 600
ggttcgtcgg cgggtctgat ggtggcggcg gcctcgcctt atgtggcgtg gatgagcgtc 660
accgcggggc agggcgagct gaccgccgcg cagggtccgg ttgctgcggc ggcttacgag 720
acggcgatg ggctgacggt gccccgcg gtgatcgccg agaaccgtgc tgaactgatg 780
attctgatag cgaccaacct ctggggcaa aacaccccg cgatcgcggt caacgaggcc 840
gaatacggcg agatgtgggc ccaagacgcc gccgcgatgt ttggctacgc cgcgcgacg 900
gcgacggcga cggcgacgtt gctgccgttc gaggaggcgc cggagatgac cagcgcgggt 960
gggctcctcg agcaggccgc cgcggtcgag gaggccctcg acaccgccg ggccaaccag 1020
ttgatgaaca atgtgccccg ggcgtgcaa cagctggccc agcccacgca gggcaccacg 1080
ccttcttcca agctgggtgg cctgtggaag acggtctcgc cgcatcggtc gccgatcagc 1140
aacatgggtg cgatggccaa caaccacatg tcgatgacca actcgggtgt gtcgatgacc 1200
aacaccttga gctcgatgtt gaagggttt gctccggcgg cggccgcccc ggccgtgcaa 1260
accgcggcgc aaaacggggt ccgggcgatg agctcgttgg gcagctcgtt gggttcttcg 1320
ggctcggcgc gtgggggtgg cggcaacttg gtcgggcgg cctcggctcg ttcgttgtcg 1380
gtgccgcagg cctggggcgc ggccaaccag gcagtcaccc cggcgggcgc ggcgtgccg 1440
ctgaccagcc tgaccagcgc cgcggaaaga gggcccgggc agatgctggg cgggctgccg 1500
gtggggcaga tgggcgccag ggccggtggt gggctcagtg gtgtgctgcg tgttccgccg 1560
cgacctatg tgatgccgca ttctccggca gccggcgata tcgccccgcc ggcttgtcg 1620
caggaccggt tcgccgactt ccccgcgctg cccctcgacc cgtcccgat ggtcgcccaa 1680
gtggggccac aggtgggtcaa catcaacacc aaactgggtt acaacaacgc cgtgggcgcc 1740
gggaccggca tcgtcatcga tccaacggt gtcgtgctga ccaacaacca cgtgatcgcg 1800
ggcgccaccg acatcaatgc gttcagcgtc ggtccggcc aaacctacgg cgtcgatgtg 1860
gtcgggtatg accgcaccca ggaigtgcgc gtgctgcagc tgcgcggtgc cggtgccctg 1920
ccgtcggcgg cgatcgggtg cggcgtcgcg gtgggtgagc ccgtcgtcgc gatgggcaac 1980
agcggltggc agggcggaac gcccgtgcg gtgcttgca ggggtggtcg gctcggccaa 2040
accgtgcagg cgtcggattc gctgaccggt gccgaagaga cattgaacgg gttgatccag 2100
ttcgatgccg cgatccagcc cggtgattcg ggcgggcccc tcgtcaacgg cctaggacag 2160
gtggtcggta tgaacacggc cgcgtcctag 2190

<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Cpg 寡聚物 1 – CpG 1826	
<400>	9	
	tccatgacgt tccigacgtt	20
<210>	10	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CpG 寡聚物 2 – CpG 1758	
<400>	10	
	tctcccagcg tgcgccat	18
<210>	11	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CpG 寡聚物 3	
<400>	11	
	accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg	30
<210>	12	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CpG 寡聚物 4 – CpG 2006	
<400>	12	
	tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt	24
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CpG 寡聚物 5 – CpG 1686	
<400>	13	
	tccatgacgt tccigatgct	20

發明專利說明書

(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：160166325

※申請日：

100.12.14

C07K 14/35 (2006.01)

※IPC 分類：A61K 39/04 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

新穎之組合物

NOVEL COMPOSITIONS

二、中文發明摘要：

本發明提供包含M72相關抗原之免疫原組合物，其中該組合物之導電率係13 mS/cm或更低，或該組合物之鹽濃度係130 mM或更低；及該組合物在醫學中之用途。

三、英文發明摘要：

Immunogenic compositions comprising an M72 related antigen, wherein the conductivity of the composition is 13 mS/cm or lower, or the concentration of salts of the composition is 130 mM or lower, and their use in medicine, are provided.

七、申請專利範圍：

1. 一種免疫原組合物，其包含M72相關抗原，其中：
 - (i) 該組合物之導電率係13 mS/cm或更低；及/或
 - (ii) 該組合物中之鹽濃度係130 mM或更低；及/或
 - (iii) 該組合物中之氯化鈉濃度係130 mM或更低。
2. 如請求項1之免疫原組合物，其中該組合物之導電率係10 mS/cm或更低。
3. 如請求項2之免疫原組合物，其中該組合物之導電率係3 mS/cm或更低。
4. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其中該組合物中之鹽濃度係100 mM或更低。
5. 如請求項4之免疫原組合物，其中該組合物中之鹽濃度係40 mM或更低。
6. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其中該組合物中之氯化鈉濃度係100 mM或更低。
7. 如請求項6之免疫原組合物，其中該組合物中之氯化鈉濃度係40 mM或更低。
8. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其進一步包含非離子型張力劑。
9. 如請求項8之免疫原組合物，其中該非離子型張力劑係多元醇。
10. 如請求項9之免疫原組合物，其中該多元醇係山梨醇。
11. 如請求項10之免疫原組合物，其中山梨醇之濃度介於約4%與約6% (w/v)之間。

12. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其中蔗糖之濃度介於約4%與約6% (w/v)之間。
13. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其進一步包含一或多種免疫刺激劑。
14. 如請求項13之免疫原組合物，其中該免疫刺激劑係皂苷及/或TLR4激動劑。
15. 如請求項14之免疫原組合物，其中該(等)免疫刺激劑呈脂質體形式。
16. 如請求項14之免疫原組合物，其中該皂苷係QS21。
17. 如請求項14之免疫原組合物，其中該TLR4激動劑係3-去氧-醯基化單磷醯脂質A。
18. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其中該滲透壓係250 mOsm/kg至750 mOsm/kg。
19. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其中該組合物係以介於50 μ l與1 ml間之單位劑量提供。
20. 如請求項19之免疫原組合物，其中該單位劑量介於100 μ l與750 μ l之間。
21. 如請求項19之免疫原組合物，其中單位劑量含有1 μ g至100 μ g之M72相關蛋白。
22. 如請求項21之免疫原組合物，其中單位劑量含有5 μ g至50 μ g之M72相關蛋白。
23. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其中該組合物之pH在7.0至9.0範圍內。
24. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其中該M72相

關抗原包含與SEQ ID No: 1具有至少70%一致性之序列。

25. 如請求項24之免疫原組合物，其中該M72相關抗原由與SEQ ID No: 1具有至少70%一致性之序列組成。
26. 如請求項25之免疫原組合物，其中該M72相關抗原包含與SEQ ID No: 1具有至少90%一致性之序列。
27. 如請求項26之免疫原組合物，其中該M72相關抗原由與SEQ ID No: 1具有至少90%一致性之序列組成。
28. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其中該M72相關抗原包含胺基酸序列SEQ ID No: 1。
29. 如請求項28之免疫原組合物，其中該M72相關抗原包含胺基酸序列SEQ ID No: 3。
30. 如請求項29之免疫原組合物，其中該M72相關抗原由胺基酸序列SEQ ID No: 1組成。
31. 如請求項29之免疫原組合物，其中該M72相關抗原由胺基酸序列SEQ ID No: 3組成。
32. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其中在25℃儲存24小時之期間後，該免疫原組合物之抗原性保留至少80%。
33. 如請求項1至3中任一項之免疫原組合物，其用於醫學中。
34. 一種如請求項1至32中任一項之免疫原組合物的用途，其用於製造藥劑。
35. 一種如請求項1至32中任一項之免疫原組合物的用途，

其用於製造用於預防、治療或改善分枝桿菌(mycobacteria)感染的藥劑。

36. 如請求項35之用途，其中該分枝桿菌係結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)。

37. 一種製備如請求項1至32中任一項之免疫原組合物的方法，其包含以下步驟：

a) 凍乾M72相關抗原；及

b) 用水溶液復原步驟a)之經凍乾M72相關抗原，其中：

(i) 該溶液之導電率係13 mS/cm或更低；及/或

(ii) 該溶液中之鹽濃度係130 mM或更低；及/或

(iii) 該溶液中之氯化鈉濃度係130 mM或更低。

38. 如請求項37之方法，其中該水溶液包含免疫刺激劑。

39. 如請求項38之方法，其中該水溶液包含皂苷及TLR4激動劑於脂質體調配物中及非離子型張力劑。

40. 如請求項39之方法，其中該非離子型張力劑係山梨醇。

41. 如請求項40之方法，其中山梨醇濃度介於約2.5%與約15% (w/v)之間。

42. 如請求項39至41中任一項之方法，其中該皂苷係QS21。

43. 如請求項39至41中任一項之方法，其中該TLR4激動劑係3-去氧-醯基化單磷醯脂質A。

44. 一種製造如請求項1至32中任一項之穩定免疫原組合物的方法，其包含以下步驟：

a) 凍乾M72相關抗原；及

b) 用水溶液復原步驟a)之經凍乾M72相關抗原，其中：

- (i) 該溶液之導電率係13 mS/cm或更低；及/或
- (ii) 該溶液中之鹽濃度係130 mM或更低；及/或
- (iii) 該溶液中之氯化鈉濃度係130 mM或更低；

其中在25°C儲存24小時之期間後，該免疫原組合物之抗原性保留至少80%。

45. 如請求項44之方法，其中該水溶液包含免疫刺激劑。

46. 如請求項45之方法，其中該水溶液包含皂苷及TLR4激動劑於脂質體調配物中及非離子型張力劑。

47. 如請求項46之方法，其中該非離子型張力劑係山梨醇。

48. 如請求項47之方法，其中山梨醇濃度介於約2.5%與約15% (w/v)之間。

49. 如請求項46至48中任一項之方法，其中該皂苷係QS21。

50. 如請求項46至48中任一項之方法，其中該TLR4激動劑係3-去氧-醯基化單磷醯脂質A。

51. 一種套組，其包含：

a) 經凍乾之M72相關抗原；及

b) 水溶液，其中：

- (i) 該溶液之導電率係13 mS/cm或更低；及/或
- (ii) 該溶液中之鹽濃度係130 mM或更低；及/或
- (iii) 該溶液中之氯化鈉濃度係130 mM或更低。

52. 如請求項51之套組，其中該水溶液包含免疫刺激劑。

53. 如請求項52之套組，其中該水溶液包含皂苷及TLR4激動

劑於脂質體調配物中及非離子型張力劑。

54. 如請求項53之套組，其中該非離子型張力劑係山梨醇。

55. 如請求項54之套組，其中山梨醇濃度介於約2.5%與約15% (w/v)之間。

56. 如請求項53至55中任一項之套組，其中該皂苷係QS21。

57. 如請求項53至55中任一項之套組，其中該TLR4激動劑係3-去氧-醯基化單磷醯脂質A。

八、圖式：

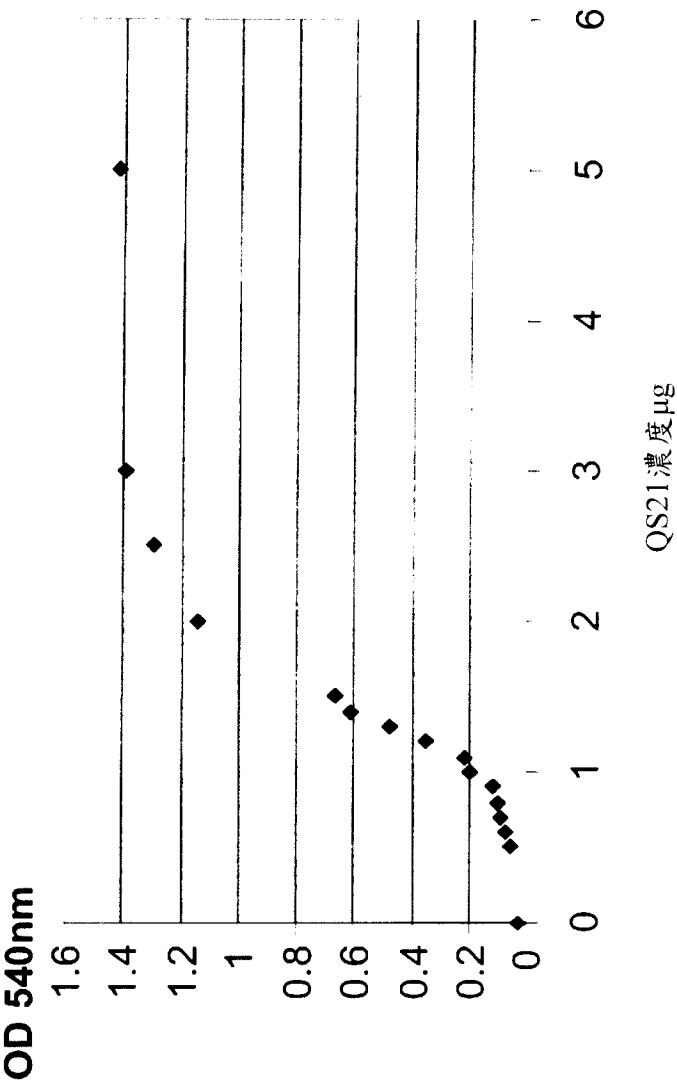


圖1

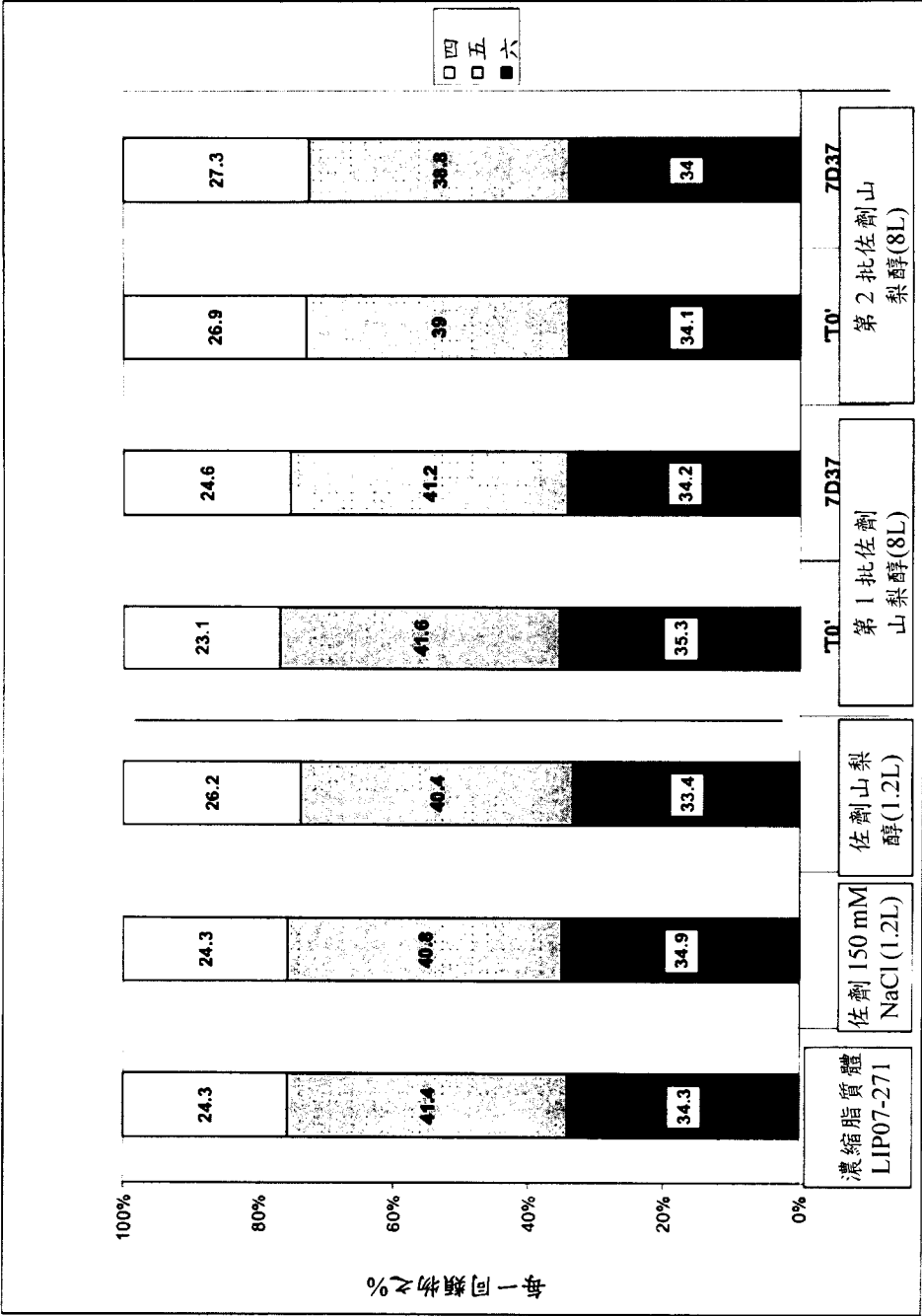


圖2

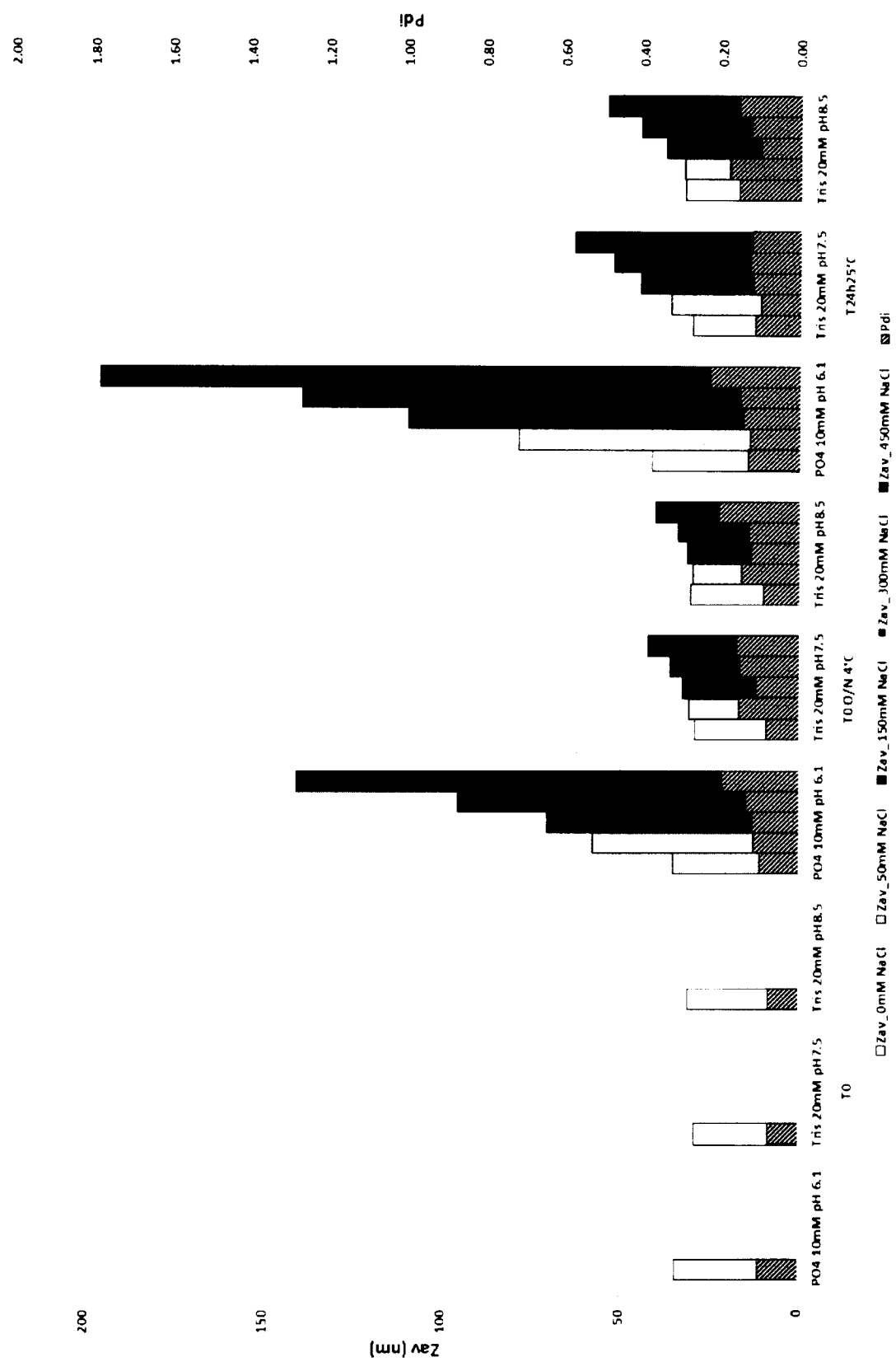


圖 3

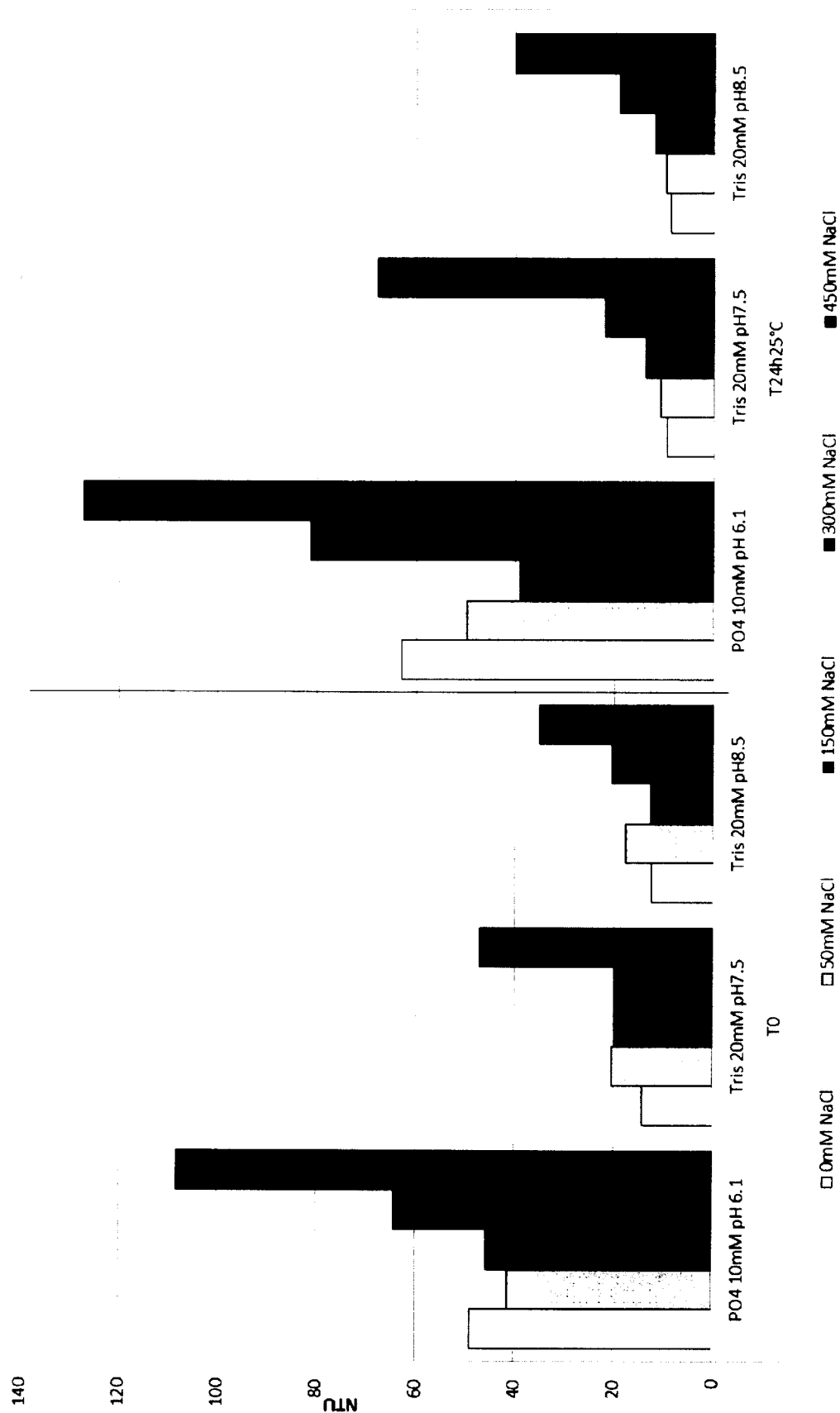


圖 4

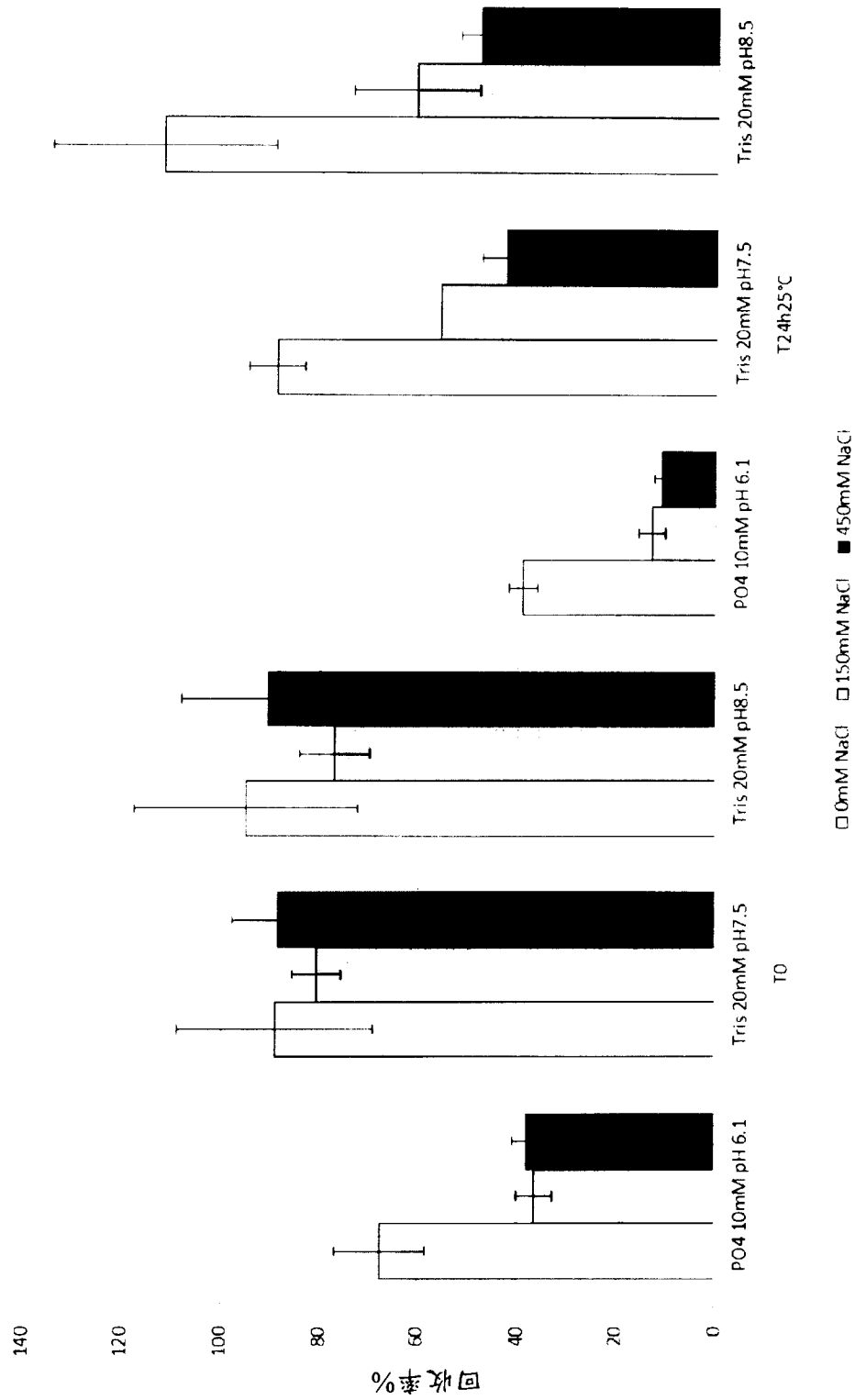


圖5

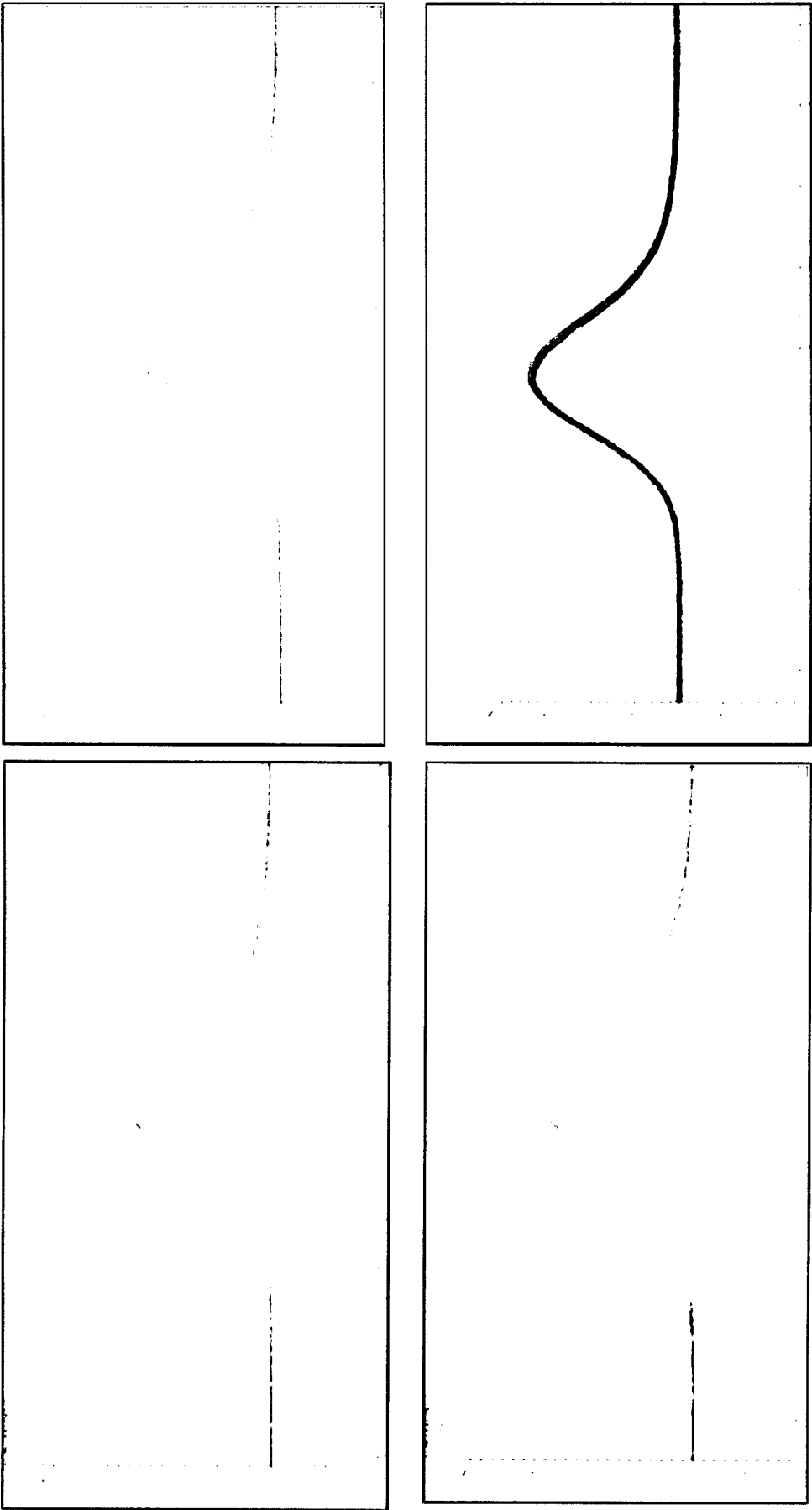


圖6

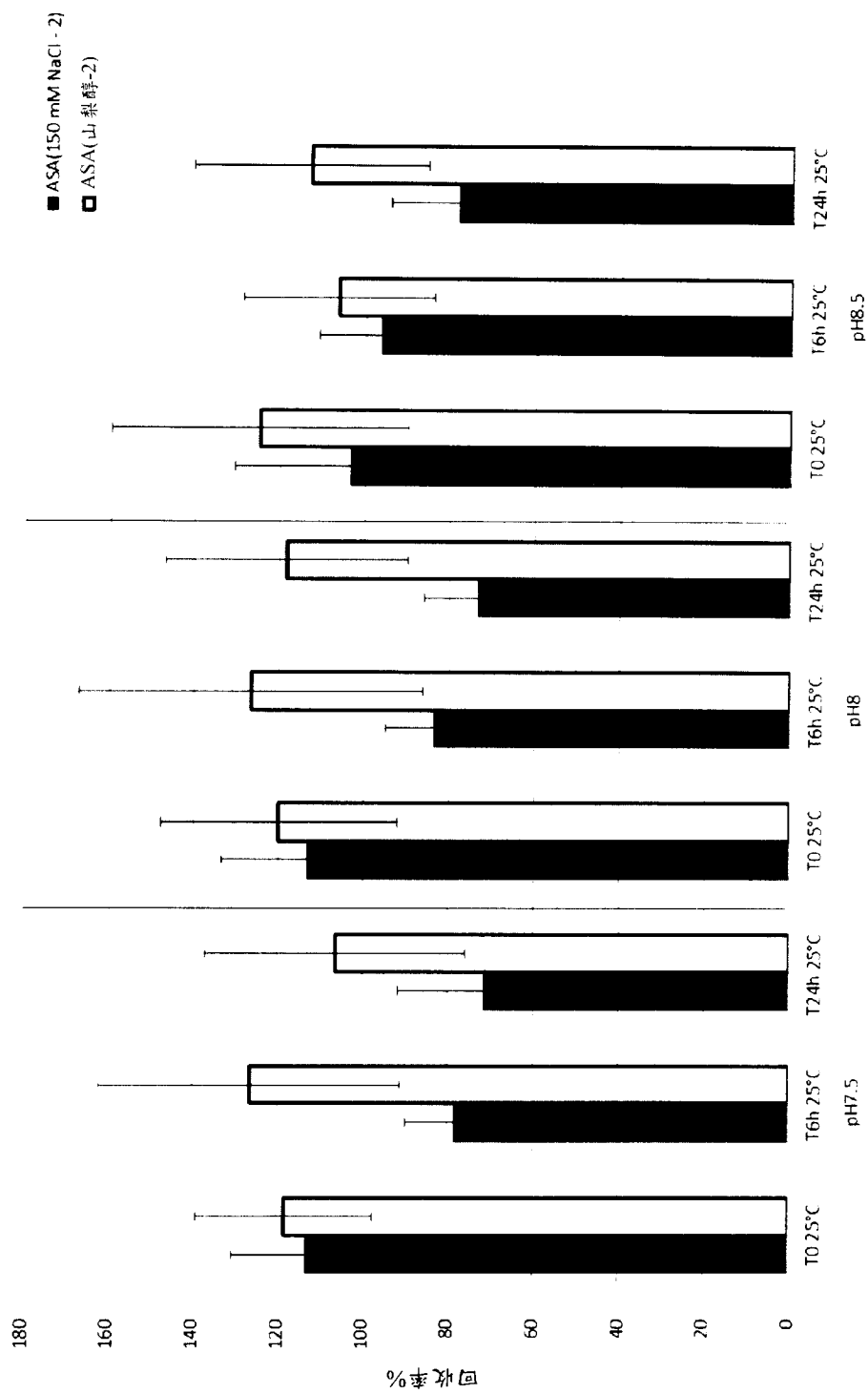


圖7

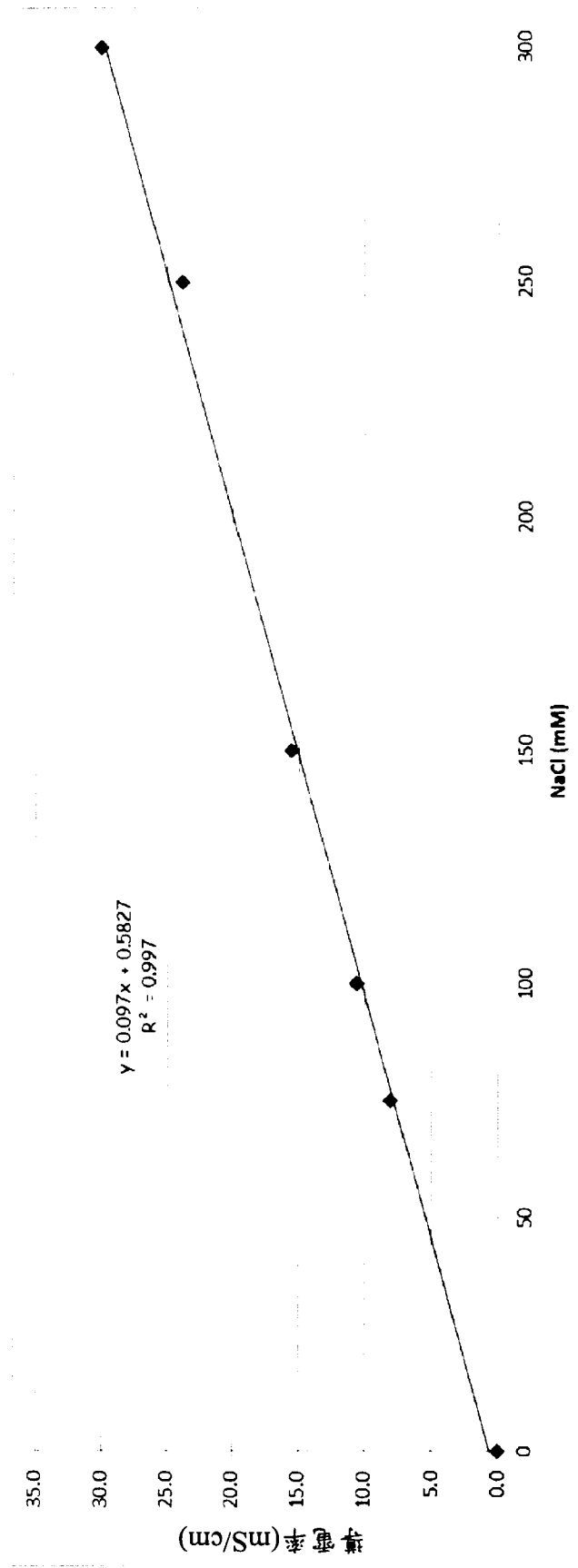


圖8



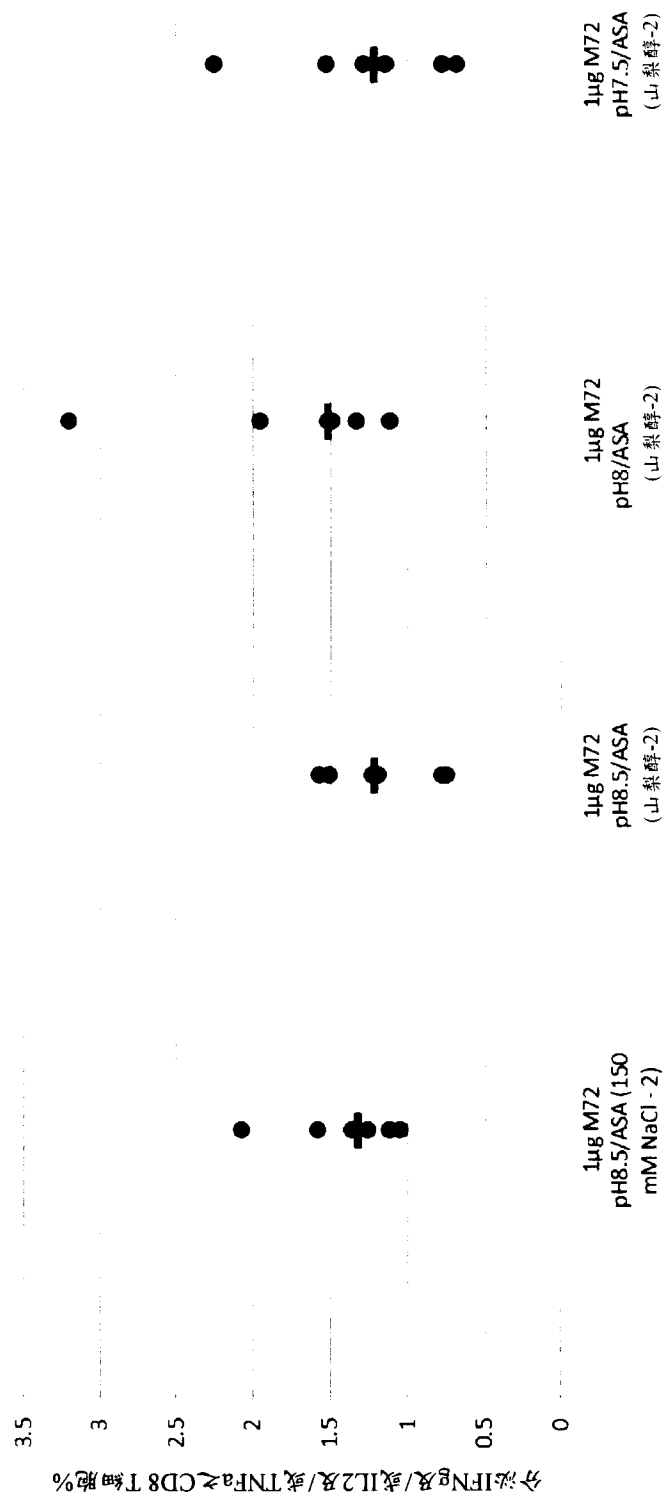


圖10

四、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：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)