

分割案

公告本

I258374

發明專利分割說明書

(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：92175370 (由第89119231號分割)

※申請日期：89.9.19

※IPC 分類：A61K39/00

原申請案號：○八九一一九二三一

專利證書號數：

壹、發明名稱：(中文/英文)

「包含 HPV 抗原之疫苗

VACCINE COMPRISING HPV ANTIGENS」

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

比利時商史密斯克萊美占生物公司

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.

代表人：(中文/英文)

詹恩 史帝芬 / JEAN STEPHENNE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

比利時利克森沙特市第一學院路 89 號

國籍：(中文/英文)

比利時/ BELGIUM

參、發明人：(共 1 人)

姓名：(中文/英文)

馬汀 安 希西爾 威頓道夫

住居所地址：(中文/英文)

比利時利克森沙特市第一學院路 89 號

國籍：(中文/英文)

比利時/ BELGIUM

肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項 第一款但書或 第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

本案申請前已向下列國家（地區）申請專利：

1. 英國；1999年09月07日；GB992146.8

2.

3.

4.

5.

主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

4.

5.

主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

[技術領域]

本發明係有關新穎疫苗配方，其製法及其用於治療的用途。特別本發明係有關一種投予青春期的組合疫苗。

[先前技術]

乳突瘤病毒(Papillomaviruses)為小型DNA腫瘤病毒，高度具有物種特異性。至目前為止已經敘述超過70種人類乳突瘤病毒(HPV)基因型。HPV通常對皮膚(例如HPV-1及-2)或黏膜表面(例如HPV-6及-11)具有特異性且通常引起良性腫瘤(疣)可持續數月或數年。此種良性腫瘤可能造成個體的擔憂但除了少數例外之外通常不會致命。

某些HPV也與癌症有關。HPV與人類癌症間最強力的正面關聯存在於HPV-16及HPV-18與子宮頸癌間的關聯。子宮頸癌是開發中國家最常見的惡性病，全球每年出現的新病例超過約50萬例。今日在技術上已經可以使用疫苗主動出擊對抗原發性HPV-16感染及甚至已經確立的含HPV-16癌症。有關抗HPV-16之預防性及治療性疫苗接種的展望綜論參考Cason J.，臨床免疫治療學1994；1(4)293-306及Hagenese M.E.，內科感染1997 14(7)555-556，559-564。

其它特別令人感興趣的HPV為血清型31，33及45。

今日已經單離不同類型的HPV且已經藉助於細菌的選殖系統以及更為晚近利用PCR擴增方法特徵化。HPV基因組的分子組織結構已經基於與明確特徵化的牛乳突瘤病毒1型(BPV1)基於比較基礎定義。

雖然確實有微小變異，但所述全部HPV基因組皆至少有7個早期基因E1至E7及兩個晚期基因L1及L2。此外，上游調節區載有調節順序其顯然可控制大半HPV基因組的轉錄事件。

E1及E2基因分別涉及病毒的增生及轉錄控制，且容易受到病毒整合破壞。E6及E7以及更為晚近的證據指出E5也涉及病毒轉形。

涉及子宮頸癌的HPV例如HPV 16及18中，致腫瘤發生過程始於病毒DNA整合之後。整合導致編碼莢膜蛋白質L1及L2的基因失活化，以及導致兩種早期蛋白質E6及E7的連續過度表現，結果將導致正常細胞分化過程漸進喪失而出現癌瘤。

子宮頸癌於女性常見，係經由癌前期中間階段發展成為侵襲性癌，經常導致死亡。疾病的中間階段稱做子宮頸內皮腫瘤，以嚴重程度遞增分成I至III級。

臨床上女性肛門陰道之HPV感染呈現子宮頸扁平濕疣，其特點標記為漏斗狀細胞過多，主要影響子宮頸鱗狀上皮的表淺及中間細胞。

漏斗形細胞係由於病毒造成細胞病變結果，呈現多核細胞而核周圍有一圈透明。上皮增厚伴以異常角化造成病灶的疣狀外觀。

此種扁平濕疣當對HPV 16或18血清型呈陽性反應時，乃演變成子宮頸上皮內腫瘤(CIN)及原位癌(CIS)的高度風險因子，CIN及CIS本身被視為侵襲性子宮頸癌的前驅病灶。

WO 96/19496揭示人類乳突瘤病毒E6及E7蛋白的變異株，特別E6/E7融合蛋白質而於E6及E7蛋白質皆有刪失。此種刪失融合蛋白質據稱具有免疫原性。

基於HPV L1的疫苗揭示於WO94/00152，WO94/20137，WO93/02184及WO94/05792。此種疫苗包含L1抗原作為單體、囊粒或病毒狀粒子。此種粒子額外包含L2蛋白質。基於L2的疫苗述於例如WO93/00436。其它HPV疫苗係基於早期蛋白質例如E7或融合蛋白質如L2-E7。

HSV-2為生殖器疱疹的主要病原因子。HSV-2及HSV-1(純疱疹的病原因子)係以可誘發急性發病且建立潛伏感染主要在神經元神經節細胞感染為其特徵。

生殖器疱疹估計單獨美國即約有5百萬個病人，每年記錄500,000萬個臨床病例(原發及復發感染)。原發感染發生於發身期之後，且以局部出現疼痛皮膚病灶持續2至3週時間為其特徵。於原發感染後的6個月以內，50%病人將復發。於25%病人每年復發10至15次。而免疫不全病人具有高頻率復發率，其統計數字係高於正常病人族群。

HSV-1及HSV-2病毒有多個糖蛋白成分位在病毒表面上。稱做gB，gC，gD及gE等。

需要有效的組合疫苗來預防特別容易發病的青春期。

[發明內容]

本發明提供一種疫苗組合物，包含：

- (a)HPV 16主莢膜蛋白質L1病毒狀粒子；以及
- (b)HPV 18主莢膜蛋白質L1病毒狀粒子

組合一種佐劑，佐劑為TH1細胞反應的偏好刺激劑。

本發明之疫苗組合物投予特別有HPV感染風險的青春期具有極大效果。

選擇性地，本發明之疫苗組合物額外包含下述多種其它疫苗中之一或多者。

發現根據本發明之疫苗組合物出乎意外地顯示不會干擾，換言之，對本發明組合物中各種抗原的免疫反應大致同各種抗原個別結合TH1細胞反應偏好刺激劑的佐劑所得免疫反應。

預防B型肝炎感染的疫苗包含一或多種B型肝炎抗原為眾所周知。例如得自史克美占生物公司之疫苗安澤瑞(Engerix)-B(商品名)用以預防B型肝炎。此種疫苗包含B型肝炎表面抗原(特別226胺基酸S-抗原，由Harford等人述於研究所內科期刊1987，63(補遺2)65-70頁)且使用氫氧化鋁作為佐劑配方。

疫苗哈福瑞(Havrix)(商品名)也得自史克美占生物公司乃可用於預防A型肝炎感染之一例係使用氫氧化鋁作為佐劑配方。此種疫苗包含HM-175 A型肝炎疫苗以甲醛失活化的減毒株；參考Andre等人(研究所內科病毒學，第37期第1-24頁)。

用於此處A型肝炎病毒(HAV)抗原一詞用以表示衍生自A型肝炎病毒或HAV選擇性例如以甲醛失活化的減毒株。若HAV抗原為衍生自A型肝炎病毒的蛋白質，則可選擇性為重組蛋白質。

疫苗吐恩瑞(Twinrix)(商品名)為重組B型肝炎抗原與前述失活化減毒A型肝炎病毒的組合。疫苗可用於同時預防A型肝炎及B型肝炎。

歐洲專利0 339 667 (Chemo Sero)說明組合A型肝炎抗原及B型肝炎抗原製造組合疫苗的一般構想。於該說明書陳述使用的佐劑並無特殊限制：僅須可提升免疫活性至預定程度且不會造成任何副作用即可。陳述可使用鋁凝膠特別氫氧化鋁凝膠及磷酸鋁凝膠。

根據本發明之疫苗組合物除了HPV及HSV抗原外，包含一種HAV抗原或一種HBV抗原或更佳包含HAV及HBV抗原的組合。

此種疫苗投予青春期的特別有效，青春期的罹患HSV及/或HPV感染，及/或HAV感染，及/或HBV感染的風險特別高。

免疫反應可廣義分成兩種極端類別，亦即體液媒介或細胞媒介免疫反應(傳統分別係以抗體及細胞執行子保護機轉特徵化)。此等反應類別稱做TH1-型反應(細胞媒介反應)及TH2-型免疫反應(體液反應)。

極端TH1-型免疫反應可由產生抗原特異性、半抗原型約束胞毒性T淋巴細胞及天然殺手細胞反應特徵化。於小鼠，TH1-型反應常以產生IgG2a亞型抗體特徵化，而人類則相當於IgG1型抗體。TH2-型免疫反應係以產生免疫球蛋白同型包括於小鼠之IgG1特徵化。

考慮發展出此二類型免疫反應背後的驅動力乃細胞激素(cytokines)。高濃度TH1-型細胞激素有利於對指定抗原引

發細胞媒介免疫反應，而高濃度TH2-型細胞激素有利於對抗原引發體液免疫反應。

TH1與TH2-型免疫反應的區別並非絕對。實際上個體將支持一種免疫反應，主要為TH1或主要為TH2。但經常方便地以Mosmann及Coffman於鼠CD4+ve T細胞來考慮細胞激素族群(Mosmann, T.R.及Coffman, R.L.(1989)TH1及TH2細胞：分泌不同類型細胞激素結果導致不同功能性質。免疫學年報，7，145-173頁)。傳統上，TH1-型反應關聯T淋巴細胞產生INF- γ 細胞激素。其它經常直接關聯誘發TH1-型免疫反應的細胞激素並非由T細胞產生，例如IL-12。相反地，TH2-型反應關聯分泌IL-4，IL-5，IL-6，IL-10及腫瘤壞死因子- β (TNF- β)。

已知某些疫苗佐劑特別適合刺激TH1或TH2-型細胞激素反應。傳統上於疫苗接種或感染後TH1：TH2免疫反應平衡的最佳指標包括直接量測試管試驗中，再度使用抗原刺激後T淋巴細胞產生的TH1或TH2細胞激素，及/或(至少一小鼠)量測抗原特異性抗體反應之IgG1：IgG2a比。

如此，TH1-型佐劑為當於試管試驗再度使用抗原刺激時可刺激離體T細胞族群產生高濃度TH1-型細胞激素，以及誘發關聯形成於同型之抗原特異性免疫球蛋白反應的佐劑。

偏好刺激TH1細胞反應的佐劑述於國際專利申請案第WO 94/00153及WO 95/17209號。

3去-O-醯化一磷醯基脂質A(3D-MPL)屬於此種佐劑。由GB 2220211(Ribi)為已知。於化學上其為3去-O-醯化一磷醯

基脂質 A 與 4、5 或 6 醯化鏈之混合物且由蒙大拿州 Ribic 免疫化學公司製造。3 去-O-醯化一磷醯基脂質 A 揭示於歐洲專利 0 689 454 B1(史克美占生物公司)。

較佳 3D-MPL 的粒子夠小而可經 0.22 微米膜(述於歐洲專利第 0 689 454 號)無菌過濾。3D-MPL 係以每劑 10 微克-100 微克較佳 25-50 微克之範圍存在，其中抗原之典型存在範圍為每劑 2-50 微克。

另一種較佳佐劑包含 QS21，為衍生自石鹼樹(Quillaja Saponaria Molina)樹皮的 Hplc 純化無毒部份。此部份可選擇性混合 3 去-O-醯化一磷醯基脂質 A(3D-MPL)選擇性連同載劑混合。

QS21 之製法揭示於美國專利第 5,057,540 號。

含 QS21 之無反應原性佐劑配方先前曾經說明(WO 96/33739)。此種包含 QS21 及膽固醇的配方當連同抗原調配時顯示為成功的 TH1 刺激佐劑。如此形成本發明之一部份之疫苗組合物包括 QS21 及膽固醇的組合。

TH1 細胞反應之偏好刺激劑的進一步佐劑包括免疫調理寡核苷酸，例如非甲基化 CpG 序列揭示於 WO 96/02555。

不同 TH1 刺激佐劑例如前述組合預期也可提供 TH1 細胞反應偏好刺激劑的佐劑。例如 QS21 可連同 3D-MPL 配方。QS21：3D-MPL 之比典型為約 1：10 至 10：1，較佳 1：5 至 5：1 及常見實質為 1：1。最適當協同效果之範圍較佳為 2.5：1 至 1：1 3D-MPL：QS21。

較佳載劑也存在於根據本發明之疫苗組合物。載劑可為

水包油乳液或鋁鹽如磷酸鋁或氫氧化鋁。

較佳水包油乳液包含可代謝油類例如角鯊烯， α 生育酚及吞恩(Tween)80。其它水包油乳液可含史班(span)85及/或卵磷脂及/或三癸酸甘油酯。

於特佳特徵，根據本發明之疫苗組合物之抗原可組合3D-MPL及礬土。

典型供人類投藥，QS21及3D-MPL係以每劑1微克-200微克，較佳10-100微克，更佳10-50微克之範圍存在於疫苗。典型水包油包含2至10%角鯊烯，2至10% α 生育酚及0.3至3%吞恩80。較佳角鯊烯： α 生育酚之比係等於或小於1，原因在於如此可提供更穩定的乳液。史班85也可以1%濃度存在。某些案例較佳本發明之疫苗進一步含有安定劑。

無毒水包油乳液較佳含有無毒油如角鯊烷或角鯊烯，乳化劑例如吞恩80於水性載劑。水性載劑例如為磷酸鹽緩衝食鹽水。

特別強力佐劑配方包括QS21、3D-MPL及生育酚於水包油乳液述於WO 95/17210。

本發明組合物之HPV抗原較佳衍生自HPV 16及/或18以及衍生自HPV 6及/或11或HPV 31、33或45。

較佳具體實施例中，根據本發明之疫苗組合物之HPV抗原包含HPV之主莖膜蛋白質L1以及選擇性L2蛋白質，特別得自HPV 16及/或HPV 18。本具體實施例中，L1蛋白質之較佳形式為截頭L1蛋白質。較佳L1，選擇性L1-L2融合蛋白質係呈病毒狀粒子(VLP)形式。L1蛋白質可融合至另一種

HPV蛋白質特別E7而形成L1-E7融合體。以包含L1-E或L1-L2-E之嵌合體VLP為特佳。

另一較佳具體實施例中，本發明組合物之HPV抗原係衍生自E6或E7蛋白質，特別E6或E7連結至具有T細胞抗原決定部位的免疫融合相對部份。

本發明具體實施例之較佳形式中，免疫融合相對部份係衍生自流行性感冒嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)B的蛋白質D。較佳蛋白質D衍生物約含蛋白質的前1/3，特別約為第一N-端100-110胺基酸。

本發明之具體實施例之較佳融合蛋白質包含得自HPV 16的蛋白質D-E6，得自HPV 16的蛋白質D-E7，得自HPV 18的蛋白質D-E7及得自HPV 18的蛋白質D-E6。蛋白質D部份構成蛋白質D的前1/3。

又另一本發明之具體實施例中，HPV抗原係呈L2-E7融合蛋白質形式，特別得自HPV 6及/或HPV 11。

本發明之蛋白質較佳係於大腸桿菌表現。較佳具體實施例中，蛋白質係使用包含約5至9及較佳6組胺酸殘基的組胺酸尾端表現。如此有助於純化。此種蛋白質之製造說明完整述於同在審查中之英國專利申請案第GB 9717953.5號。

疫苗組合物之HPV抗原可吸附於氫氧化鋁上。

本發明組合物之HSV抗原較佳衍生自HSV-2，典型為糖蛋白質D。糖蛋白質D係位在病毒膜上，也出現於感染細胞的胞質(Eisenberg R.J.等人；病毒學期刊1980，35，428-435)。包含393胺基酸包括一個信號肽，分子量約60千道耳吞。全部

HSV套膜糖蛋白中以此種被最佳決定特徵(CoHen等人病毒學期刊, 60, 157-166)。於活體試驗已知對病毒附著於細胞膜扮演關鍵要角。此外, 糖蛋白D可於活體試驗提引出中和抗體(Eing等人, 內科病毒學期刊127: 59-65)。但潛伏HSV-2病毒仍可被再度活化而誘使疾病復發, 儘管病原血清存在有高中和抗體力價亦如此。

本發明之較佳具體實施例中, HSV抗原為308胺基酸截頭HSV-2糖蛋白D, 包含天然胺基酸1至306糖蛋白加成天冬醯胺及麩胺於截頭蛋白質之C端而不含膜錨定區。此型蛋白質包括信號肽, 信號肽被割裂而獲得成熟283胺基酸蛋白質。於中國倉鼠卵巢細胞產生此種蛋白質述於基因技術(Genentech's)公司的歐洲專利EP-B-139 417。

重組成熟HSV-2糖蛋白D截頭部份較佳用於本發明之疫苗配方且標示為rgD2t。

此種HSV-2抗原組合佐劑3D-MPL的組合述於WO 92/16231。

當B型肝炎病毒(HBV)抗原涵括於本發明之組合物時, 典型為B型肝炎表面抗原。

B型肝炎表面抗原(HBsAg)的製備已經有明確文獻記載。例如參考Harford等人, 發展生物學標準54期125頁(1983年), Gregg等人, 生物技術第5期479頁(1987年), EP-A-0 226 846, EP-A-0 299 108及其中引述的參考文獻。

用於此處, 「B型肝炎表面抗原」的表示法於此處縮寫為「HBsAg」或「HBS」包括具有HBV表面抗原的抗原性的任

何B型肝炎表面抗原或其片段。須了解除了HBsAg S抗原的226胺基酸序列(參考Tiollais等人，自然，317，489(1985)及其中引述的參考文獻)外，若有所需此處所述HBsAg可含有前文參考文獻及EP-A-0 278 940所述全部或部份pre-S序列。HBsAg用於此處也表示變異株，例如WO 91/14703所述「脫逃突變株」。進一步，HBsAg可含歐洲專利申請案第 0 414 374號稱做L*的蛋白質，亦即一種蛋白質，其胺基酸順序係由B型肝炎病毒大(L)蛋白質(ad或ay亞型)的胺基酸順序部份組成，其特徵在於蛋白質之胺基酸順序係由下列組成：

(a)該L蛋白質之殘基12-52，接著殘基133-145，接著殘基175-400；或

(b)該L蛋白質之殘基12，接著殘基14-52，接著殘基133-145，接著殘基175-400。

HBsAg也稱做多肽，述於EP 0 198 474或EP 0 304 578。

通常HBsAg為粒子形式。單獨包含S蛋白質，或可呈複體粒子例如(L*，S)，這種L*定義如前而S表示B型肝炎表面抗原的S蛋白質。

HBsAg如WO93/24148所述可吸附於磷酸鋁上。

較佳本發明配方使用的B型肝炎(HBV)抗原為商品安澤瑞-B(商品名；史克美占生物公司)使用的HBsAg S抗原。

包含B型肝炎表面抗原結合3D-MPL的疫苗述於歐洲專利申請案0 633 784。

現在說明可涵括於本發明組合物之得自額外病原之抗原

實例。

伊普斯坦巴爾病毒(Epstein Barr Virus)(EBV)屬於疱疹病毒的一員引發傳染性單核細胞增多乃人類的重大疾病。主要感染兒童或年輕人。平均成人族群中有多於90%感染EBV而終生維持於周邊B-淋巴細胞。病毒係終身由腮腺產生且主要由交換潛藏有病毒的個體唾液傳播。感染EBV的兒童大半無症狀，或有極為輕微的症狀，感染的青春期及成人典型出現傳染性單核細胞增多，其特徵為發燒、咽炎及腺體病變。感染病人可維持抗EBV抗體終生因而對進一步感染免疫。

除了EBV的感染性質外，EBV也可轉形淋巴細胞變成快速分裂的細胞，因此可能引起不同的淋巴瘤包括非洲布吉特氏淋巴瘤(African Burkitt's lymphoma)(BL)。EBV也牽涉引起鼻咽癌(NPC)。全球估計有約80,000例鼻咽癌病例較常見於中華民族。傳染性單核細胞增多係由於感染EBV的主要後果。若未存在有其它風險因子則非致命性疾病。

曾經說明四種組成所謂的膜抗原複體的EBV病毒套膜蛋白。通常稱做gp 220/350或gp 250/350或簡稱gp 250或350(參考EP-A-151079)。有相當證據證實gp 350及gp 250可誘發產生中和抗體，對抗gp 350及gp 250的抗體具有中和能力。如此此等蛋白質為EBV疫苗的可能候選者。有關gp 250/350應用於預防及治療EBV關聯疾病的進一步資訊可參考EP 0 173 254。

主要EBV表面糖蛋白gp 350/220係經由與細胞膜蛋白質

CD21交互作用而感染人類目標細胞。gp 350/220為人類EBV中和抗體的主要目標，某些形式的gp 350/220顯示可保護不患EBV關聯病。較佳本發明之疫苗組合物包含EBV之gp 350，但也可使用其它保護性抗體。

於較佳特徵方面，本發明之疫苗組合物額外包含帶狀疱疹病毒抗原(VZV抗原)。涵括於疫苗配方的適當VZV抗原包括gpI-V述於Longnecker等人美國國家學術科學會議事錄84，4303-4307(1987)。

較佳具體實施例係使用gpI(參考Ellis等人，美國專利4,769,239)。也參考歐洲專利案第0 405 867 B1號。

另一較佳特徵方面，本發明之疫苗組合物額外包含人類細胞巨病毒(HCMV)抗原。HCMV為屬於疱疹病毒科的一種人類DNA病毒。HCMV流行於全世界大半地區。有兩種族群感染HCMV造成嚴重醫療情況。HCMV為新生兒先天缺陷的主要起因。第二風險族群是免疫受損病人例如由於HIV感染以及接受移植病人。臨床疾病引發多種症狀包括發燒、肝炎、肺炎及傳染性單核細胞增多。用於對抗HCMV疫苗的較佳抗原為gB685**述於WO 95/31555。用於HCMV疫苗的免疫原也由pp65提供，pp65為HCMV基體蛋白質述於WO 94/00150(希望城)。

於較佳特徵方面，本發明之疫苗組合物額外包含VZV及HCMV抗原，特別前述抗原。

另一較佳特徵方面，本發明之疫苗組合物額外包含非洲弓漿蟲抗原。非洲弓漿蟲是一種專性胞內原生動物寄生蟲

造成溫血動物包括人類的弓漿蟲病。雖然通常於健康人體無臨床症狀，但弓漿蟲病可能對孕婦及免疫不全病人造成嚴重併發症。較佳用於抗非洲弓漿蟲的疫苗的抗原為SAG1 (也稱做P30)述於WO96/02654或Tg34述於WO92/11366。

於較佳特徵方面，本發明之疫苗組合物額外包含VZV抗原或HCMV抗原組合非洲弓漿蟲抗原特別前述抗原。

於較佳特徵方面，本發明之疫苗組合物為多價疫苗例如四價或五價疫苗。

本發明之配方用於提引出保護性免疫力極有效，甚至使用極低劑量抗原(例如低抵5微克rgD2t)也有效。

提供對原發性感染以及刺激特異性體液(中和性抗體)以及執行子細胞媒介(DTH)免疫反應具有絕佳保護效果。

於又一特徵方面，本發明提供此處所述疫苗配方用於醫療，特別用於治療或預防人類乳突瘤病毒感染及單純疱疹病毒感染。

本發明之疫苗含有免疫保護量的抗原而可藉習知技術製備。

疫苗的製備概略述於醫藥生物技術第61期疫苗設計-亞單位及佐劑辦法，Powell及Newman編輯，Plenurn出版社1995年；疫苗新趨勢及發展，Voller等人編輯，大學公園出版社，馬里蘭州巴爾地摩1978年。包囊於微脂粒例如由Fullerton述於美國專利4,235,877。蛋白質接合巨分子例如揭示於Likhite美國專利4,372,945及Armor等人美國專利4,474,757。

蛋白質於各疫苗的用量係選擇可於典型疫苗被接種人引出免疫保護反應而不會造成顯著不良副作用。此種量隨使用的特定免疫原而定。通常預期每劑包含1-1000微克蛋白質，較佳2-100微克，最佳4-40微克。特定疫苗之最適量可由標準研究確定，涉及觀察個體的抗體力價及其它反應。初步疫苗接種後，個體可在約4週後接受追加接種。

除了疫苗接種對HPV或HSV感染的易感性個體外，本發明之醫藥組合物可用於患有該種病毒感染的免疫治療。

本發明之又一特徵方面，提供一種此處所述之製法，其中該方法包含混合人類乳突瘤病毒抗原及單純疱疹病毒抗原與TH-1提引佐劑例如3D-MPL及較佳載劑例如礬土。

若有所需可以任一種方便順序加入其它抗原而提供此處所述的多價疫苗組合物。

[實施方式]

下列實例係供舉例說明而非限制本發明。

實例1：HPV Ags/HBs/gD於使用AS04調配的單價或組合疫苗的免疫原性比較。

引言

免疫原性研究係使用四種不同的抗原於Balb/C小鼠進行：

- 1.HPV16 L1病毒狀粒子(VLP-16)
- 2.HPV18 L1病毒狀粒子(VLP-18)
- 3.HSV-2之gD抗原
- 4.HBsAg

使用抗原或3D-MPL事先吸附於 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 或 AlPO_4 的單一本體調配巽土/3D-MPL(AS04)。

3D-MPL/ $\text{Al}(\text{OH})_3$ 配方於此處稱做AS04D，而基於3D-MPL/ AlPO_4 的配方稱做AS04C。

評估下列疫苗：

1.VLP16+VLP18 AS04D；

2.gD AS04D；

3.HBs AS04C。

及評估此等疫苗組合的可能。

本實驗目標係比較由下列製成的兩種不同AS04組合的免疫原性：

1.VLP16+VLP18及gD。

2.VLP16+VLP18及gD及HBs Ag。

實驗性方案完整述於材料與方法乙節。

要言之，每組10頭小鼠間隔3週使用多種基於抗原的配方做肌肉免疫接種兩次。由疫苗接種提引出對VLPs、gD及HBs Ag的抗體反應以及同型的反應係於接種II後14日藉ELISA監視。同時於使用VLPs、gD或HBs抗原於試管試驗再度刺激脾臟細胞後分析細胞激素的產量($\text{IFN}\gamma/\text{IL5}$)。

材料及方法

配方

配方組合物

VLP16、VLP18、gD及HBs係使用3D-MPL於鋁鹽配方。

使用成分

| 成分 | 濃度 | 緩衝液 |
|------------|-------------|-------------------------|
| HPV 16 VLP | 560 微克/毫升 | Tris 20 mM/NaCl 500 mM |
| HPV 18 VLP | 550 微克/毫升 | NaCl 500 mM/NaPO4 20 mM |
| AL(OH)3 | 10380 微克/毫升 | H2O |
| HBs | 1219 微克/毫升 | PO4 10 mM/NaCl 150 mM |
| gD | 443 微克/毫升 | PBS pH 7.4 |
| 3D-MPL | 1170 微克/毫升 | 注射用水 |
| AlPO4 | 5 微克/毫升 | NaCl 150 mM |

吸附

a)VLP 吸附

VLP 16及VLP 18的純化成分添加至氫氧化鋁獲得2微克VLP/10微克氫氧化鋁比例。混合物至最終配方前係儲存於2-8°C。

b)gD 吸附

2微克gD混合10微克氫氧化鋁。混合物至最終配方前係儲存於2-8°C。

c)HBs 吸附

2微克HBs混合10微克磷酸鋁。混合物至最終配方前係儲存於2-8°C。

d)3D-MPL 吸附

5微克3D-MPL混合10微克氫氧化鋁。混合物至最終配方前係儲存於2-8°C。

5微克3D-MPL混合10微克磷酸鋁。混合物至最終配方前係儲存於2-8°C。

配方

混合水及氯化鈉(10倍濃縮)於室溫攪動10分鐘後加入不同成分：吸附抗原，吸附3D-MPL及氫氧化鋁(參考下表)。

於室溫振搖10分鐘及於注射前係儲存於4°C。

| 組別 | 抗原 | | 免疫刺激劑 | | 媒劑 | |
|----|-------|----|--------|----|---------------------|----|
| | 類別 | 微克 | 類別 | 微克 | 類別 | 微克 |
| A | gD | 2 | 3D-MPL | 5 | Al(OH) ₃ | 10 |
| | VLP16 | 2 | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| | VLP18 | 2 | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| | | | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| | | | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| B | gD | 2 | 3D-MPL | 5 | Al(OH) ₃ | 10 |
| | VLP16 | 2 | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| | VLP18 | 2 | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| | HBs | 2 | | | AlPO ₄ | 10 |
| | | | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| C | gD | 2 | 3D-MPL | 5 | Al(OH) ₃ | 10 |
| | | | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| | | | | | Al(OH) ₃ | 30 |
| D | VLP16 | 2 | 3D-MPL | 5 | Al(OH) ₃ | 10 |
| | VLP18 | 2 | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| | | | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| | | | | | Al(OH) ₃ | 20 |
| E | HBs | 2 | 3D-MPL | 5 | AlPO ₄ | 10 |
| | | | | | Al(OH) ₃ | 10 |
| | | | | | Al(OH) ₃ | 30 |

小鼠血清學

抗 VLP-16 及 抗 VLP-18 血清學

抗 VLP16 及 抗 VLP18 抗體的定量係使用 VLP16 503/1(20/12/99)及 VLP18 504/2(25/10/99F)作為塗布抗原藉 ELISA 進行。每孔使用 50 微升抗原及抗體溶液。抗原以終濃度 0.5 微克/毫升稀釋於 PBS，且於 4°C 吸附於 96 孔微力價平板(美希索柏免疫平板(Maxisorb Immuno-plate)，丹麥挪克)的各孔隔夜。平板於 37°C 與含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 共同培育 1 小時。血清(始於 1/400 稀釋)於飽和緩衝液的兩倍稀釋液添加至 VLP 塗布平板上且於 37°C 培育 1 小時 30 分鐘。平板使用 PBS 0.1% 吞恩 20 洗 4 次，生物素接合抗小鼠 Ig(阿莫參(Amersham)公司，英國)稀釋 1/1500 於飽和緩衝液添加至各孔且於 37°C 培育 1 小時 30 分。洗滌步驟後於飽和緩衝液稀釋 1/1000 的鏈絲菌抗生物素-生物素化過氧化酶複體(阿莫參公司，英國)添加至其中又於 37°C 培育 30 分鐘。平板如前述洗滌且與鄰伸苯基二胺(希格瑪公司)0.04%，過氧化氫 0.03% 於 0.1% 吞恩 20，0.05 M 磷酸鹽緩衝液 pH 4.5 之溶液培育 20 分鐘。反應藉 2 N 硫酸中止且於 490/630 毫微米讀取。ELISA 力價係藉梭福馬斯普(SoftmaxPro)(使用四參數方程式)由參考品算出且以 EU/毫升表示。

抗 gD 反應：

使用 gD(gD 43B318)作為塗布抗原，藉 ELISA 進行抗 gD 抗體的定量。抗原及抗體溶液每孔使用 50 微升。抗原以終濃度 1 微克/毫升稀釋於 PBS 且於 4°C 吸附於 96 孔微力價平板

(美希索柏免疫平板，丹麥挪克)各孔隔夜。然後平板於37°C與含1%牛血清白蛋白及0.1%吞恩20(飽和緩衝液；100微升/孔)的PBS共同培育1小時。血清(始於1/100稀釋)於飽和緩衝液的兩倍稀釋液添加至gD塗布平板且於37°C培育1小時30分。平板使用PBS 0.1%吞恩20洗4次，生物素接合抗小鼠IgG1，IgG2a，IgG2b或Ig(英國阿莫參公司)於飽和緩衝液稀釋1/1000添加至各孔且於37°C培育1小時30分。洗滌步驟後於飽和緩衝液稀釋1/1000的鏈絲菌抗生物素-生物素化過氧化酶複體(英國阿莫參公司)添加於其中又於37°C培育30分鐘。平板如前述洗滌且使用鄰伸苯基二胺(希格瑪公司)0.04%，過氧化氫0.03%於0.1%吞恩20，0.05 M磷酸鹽緩衝液pH 4.5溶液共同培育20分鐘。反應藉2 N硫酸中止且於490/630毫微米讀取。藉梭福馬斯普(使用四參數方程式)由參考品計算ELISA力價且以EU/毫升表示。

抗HBs血清學

抗HBs抗體的定量係藉ELISA使用HBs(Hep 286)作為塗布抗原進行。抗原及抗體溶液每孔使用50微升。抗原以終濃度1微克/毫升稀釋於PBS且於4°C吸附於96孔微力價平板(美希索柏免疫平板，丹麥挪克)各孔隔夜。然後平板於37°C與含1%牛血清白蛋白及0.1%吞恩20(飽和緩衝液)的PBS共同培育1小時。血清(始於1/100稀釋)於飽和緩衝液的兩倍稀釋液添加至HBs塗布平板且於37°C培育1小時30分。平板使用PBS 0.1%吞恩20洗4次，及生物素接合抗小鼠Ig(英國阿莫參公司)稀釋1/1500或IgG1，IgG2a，IgG2b(美國英泰克

(IMTECH)公司)分別於飽和緩衝液稀釋1/4000, 1/8000, 1/4000添加至各孔且於37°C培育1小時30分。洗滌步驟後於飽和緩衝液稀釋1/1000的鏈絲菌抗生物素-生物素化過氧化酶複體(英國阿莫參公司)添加於其中又於37°C培育30分鐘。平板如前述洗滌且使用鄰伸苯基二胺(希格瑪公司)0.04%, 過氧化氫0.03%於0.1%吞恩20, 0.05 M磷酸鹽緩衝液pH 4.5溶液共同培育20分鐘。反應藉2 N硫酸中止且於490/630毫微米讀取。藉梭福馬斯普(使用四參數方程式)由參考品計算ELISA力價且以EU/毫升表示。

細胞激素的製造

第二次免疫接種後兩週殺死小鼠, 以無菌方式取出脾臟且匯集。於RPMI 1640培養基(GIBCO)製備細胞懸浮液, RPMI含有2 mM L-麩胺, 抗生素, 5×10^{-5} M 2-巰乙醇, 及5%胎牛血清。細胞以終濃度 5×10^6 細胞/毫升以每平底24孔平板1毫升與各不同濃度(10-1微克/毫升)抗原(VLPs, gD或HBs抗原)共同培育。96小時後收穫上清液且冷凍至藉ELISA測試存在有IFN γ 及IL5為止。

IFN γ (金載恩(Genzyme)公司)

IFN γ 的定量係使用得自金載恩公司的試劑藉ELISA進行。試樣及抗體溶液每孔使用50微升。96孔微力價平板(美希索柏免疫平板, 丹麥挪克)於4°C與50微升倉鼠抗小鼠IFN γ 以1.5微克/毫升稀釋於碳酸鹽緩衝液pH 9.5塗層隔夜。然後平板於37°C與含1%牛血清白蛋白及0.1%吞恩20(飽和緩衝液)的100微升PBS共同培育。得自試管試驗刺激(始

於1/2)上清液於飽和緩衝液的兩倍稀釋液添加至抗IFN γ 塗層平板且於37°C培育1小時30分。平板使用PBS吞恩0.1%(洗滌緩衝液)洗4次，生物素接合山羊抗小鼠IFN γ 於飽和緩衝液稀釋為終濃度0.5微克/毫升添加至各孔且於37°C培育1小時。洗滌步驟後於37°C加入安德士(AMDEX)接合物(阿莫參公司)於飽和緩衝液稀釋1/10000歷30分鐘。平板如前述洗滌且與50微升TMB(百歐德(Biorad)公司)共同培育10分鐘。反應藉0.4 N硫酸中止且於450/630毫微米讀取。濃度係藉梭福馬斯普(四參數方程式)使用標準曲線(小鼠IFN γ 標準品)計算且以微微克/毫升表示。

IL5(法明真(Pharmingen)公司)

IL5的定量係使用得自法明真公司的試劑藉ELISA進行。試樣及抗體溶液每孔使用50微升。96孔微力價平板(美希索柏免疫平板，丹麥挪克)於4°C與50微升倉鼠抗小於IL5以1微克/毫升稀釋於碳酸鹽緩衝液pH 9.5塗層隔夜。然後平板於37°C與含1%牛血清白蛋白及0.1%吞恩20(飽和緩衝液)的100微升PBS共同培育。得自試管試驗刺激(始於1/2)上清液於飽和緩衝液的兩倍稀釋液添加至抗IL5塗層平板且於37°C培育1小時30分。平板使用PBS吞恩0.1%(洗滌緩衝液)洗4次，生物素接合大鼠抗小鼠IL5於飽和緩衝液稀釋為終濃度1微克/毫升添加至各孔且於37°C培育1小時。洗滌步驟後於37°C加入安德士(AMDEX)接合物(阿莫參公司)於飽和緩衝液稀釋1/10000歷30分鐘。平板如前述洗滌且與50微升TMB(百歐德(Biorad)公司)共同培育15分鐘。反應藉0.4 N硫

酸中止且於450/630毫微米讀取。濃度係藉梭福馬斯普(四參數方程式)使用標準曲線(重組小鼠IL5)計算且以微微克/毫升表示。

組別

每組10頭Balb/C小鼠使用下列配方做肌肉免疫接種：

表1：組別及配方

| 組別 | 配 方 |
|----|--|
| A | VLP16 2 微克/VLP18 2 微克/gD 2 微克/3D-MPL 5 微克/A1(OH) ₃ 50 微克 |
| B | VLP16 2 微克/VLP18 2 微克/HBs 2 微克/gD 2 微克/3D-MPL 5 微克/A1(OH) ₃ 40 微克/A1PO ₄ 10 微克 |
| C | gD 2 微克/3D-MPL 5 微克/A1(OH) ₃ 50 微克 |
| D | VLP16 2 微克/VLP18 2 微克/3D-MPL 5 微克/A1(OH) ₃ 50 微克 |
| E | HBs 2 微克/3D-MPL 5 微克/A1PO ₄ 10 微克/A1(OH) ₃ 40 微克 |

配方細節述於前文材料及方法乙節。

結果

1.血清學：

a)抗VLP16反應：

體液反應(Ig)係以使用VLP16 503-1(20/12/99)作為塗布抗原藉ELISA測量。分析II後14日血清。

圖1顯示於II後14日對各血清測量抗VLP16 Ig抗體反應。

使用VLPs、gD及HBs Ag(B組)的組合免疫接種後所得抗

VLP16力價略低於VLPs及gD的組合(A組)或一價VLPs配方(D組)(GMT分別為27578比48105 EU/毫升比44448 EU/毫升)。於統計分析前，對資料排除的各族群應用T-格拉柏(T-Grubbs)試驗。A及D組的兩種無反應小鼠不接受分析。

各組間觀察得的差異使用學生紐曼克氏試驗顯示於統計上無意義。

b)抗VLP18反應：

體液反應(Ig)係藉ELISA使用VLP18 504-2(25/10/99)作為塗布抗原測量。分析II後14日血清。

圖2顯示於個別II後14日血清測量的抗VLP18 Ig抗體反應。

使用VLPs、gD及HBs Ag的組合(B組)免疫接種後所得抗VLP18力價與使用VLPs及gD組合(A組)或一價VLPs配方(D組)所得力價相當(GMT分別為56078比88786 EU/毫升比76991 EU/毫升)。

統計分析前對各族群應用T-格拉柏試驗做資料排除。A及D組的兩種未反應小鼠排除不做分析。

使用變因試驗的單向分析，觀察得的差異顯示於統計上無意義。

c)抗gD反應：

藉ELISA使用gD作為塗布抗原測量體液反應(Ig及同型)。分析II後14日血清。

圖3顯示於II後14日對各血清測量所得抗gD抗體反應：

有關抗gD反應，使用VLPs/gD/HBs組合(B組)所得GMT比

較單獨使用 gD(C組)或 VLPs/gD組合(A組)觀察得略減(GMT分別為18631比32675比27058 EU/毫升)。

統計分析前對各族群應用T-格拉柏試驗做資料排除。A組兩頭無反應小鼠排除不接受分析。

變因的單向分析係於II後資料接受對數轉換之後的抗gD力價進行。三種配方未見統計上的顯著差異。

對匯集血清進行同型再分配分析如下：

| | 同型再分配(%) | | |
|-----|----------|-------|-------|
| | IgG1 | IgG2a | IgG2b |
| A 組 | 96 | 3 | 2 |
| B 組 | 96 | 3 | 2 |
| C 組 | 97 | 1 | 1 |

由三種配方提引出的同型未觀察得差異：於下表報告3組主要提引出IgG1反應(96-97% IgG1)。

d)抗HBs反應

體液反應(Ig及同型)係使用HBsAg(Hep286)作為塗布抗原藉ELISA測量。分析II後14日血清。

圖4顯示於II後14日對各血清測量得的抗HBs抗體反應。

於含VLPs、gD及HBs抗原的B組組合觀察得的比單獨HBs(E組)之抗HBs抗體反應略低(GMT為28996 EU/毫升相對於20536 EU/毫升)。

變因單向分析係於對數轉換II後資料後對抗HBs力價進行分析。使用學生紐曼克氏試驗，B組(VLP/HBs/gD)與E組(HBs AS04)間未觀察得統計上有意義的差異。

對匯集血清做同型重新分配分析如下，顯示兩組間並無顯著差異，一定比例的IgG2a保留於組合疫苗。

| | 同型再分配(%) | | |
|-----|----------|-------|-------|
| | IgG1 | IgG2a | IgG2b |
| B 組 | 54 | 24 | 21 |
| E 組 | 56 | 23 | 21 |

2. 細胞媒介免疫反應

細胞媒介免疫反應(IFN γ /IL5產量)係於使用VLPs、gD或HBs抗原於試管試驗再度刺激脾臟細胞後於II後14日評估。對各組小鼠組成5種器官的匯集物。實驗程序完整敘述於材料及方法乙節。

3. 細胞激素的製造

a) 使用VLP16及VLP18做試管試驗再度刺激

圖5顯示於試管試驗使用VLP16再度刺激後96小時於脾細胞監視得的細胞激素產量。

圖6顯示於試管試驗使用VLP18再度刺激後96小時於脾細胞監視得的細胞激素產量。

使用10微克及1微克抗原劑量對使用VLP抗原對兩種細胞激素產量再度刺激未見明顯劑量範圍的影響。

全部配方皆觀察得清晰TH1側面圖。

表2：於試管試驗再度使用VLP16及VLP18刺激後的IFN- γ /IL-5之比。

| IFN/IL-5 比 | A 組 | B 組 | D 組 |
|----------------|------|------|------|
| VLP16 10 微克/毫升 | 5.2 | 8.9 | 11.8 |
| VLP16 1 微克/毫升 | 15.1 | 14.3 | 16.5 |

| IFN/IL-5 比 | A 組 | B 組 | D 組 |
|----------------|------|------|------|
| VLP18 10 微克/毫升 | 19.6 | 11.1 | 16.1 |
| VLP18 1 微克/毫升 | 23.2 | 14.3 | 18.2 |

b) 於試管試驗再度 gD 刺激

圖 7 顯示於試管試驗再度使用 gD 抗原刺激後 96 小時於脾臟細胞監視得的細胞激素產量。

比較 10 及 1 微克抗原劑量用於再度刺激未見明顯劑量範圍影響。

IFN- γ 比較 IL-5 產生濃度遠更高(表 3)，指示評估各組皆有清晰 TH-1 免疫反應側面圖(一價相對於組合)。

表 3：於試管試驗再度使用 gD 刺激後的 IFN- γ /IL-5 比。

| IFN/IL-5 比 | A 組 | B 組 | C 組 |
|-------------|-----|------|-----|
| gD 10 微克/毫升 | 6.2 | 7.2 | 3.1 |
| gD 1 微克/毫升 | 6.2 | 11.2 | 2.3 |

c) 於試管試驗再度使用 HBs 刺激

圖 8 顯示於試管試驗再度使用 HBs 刺激後 96 小時於脾臟細胞監視得的細胞激素產量。

B 組觀察得 IFN- γ 具有顯著的濃度而未產生 IL-5。如表 2 所示，E 組比 B 組觀察得 IFN- γ 產量較高。但相對於不含抗原做再度刺激的對照組，E 組(HBs 單價)觀察得 IFN- γ 背景值高。使用一價疫苗觀察得 IFN- γ /IL-5 比極高，指示提引出強力 TH-1 反應。同理，使用組合疫苗測量高 IFN- γ /IL-5 比，證實

此種配方也可提引出TH-1反應。

表4：於試管試驗再度使用HBs刺激後的IFN- γ /IL-5比。

| IFN/IL-5 比 | B 組 | E 組 |
|--------------|------|------|
| HBs 10 微克/毫升 | 15.8 | 65.3 |
| HBs 1 微克/毫升 | 7.6 | 67.6 |

結論

於AS04調配的VLPs/gD或VLPs/gD/HBs Ag抗原組合對免疫原性的影響係於Balb/C小鼠觀察。

有關血清分析，對抗VLPs、抗gD及抗HBs血清學未見抗原組合造成的干擾。

組合VLPs及gD或VLPs、gD及HBs抗原不會干擾gD及HBs一價疫苗表現出的抗體反應的同型側面圖。

評估細胞激素時，使用各一價疫苗觀察得 TH-1 側面圖 (IFN- γ /IL-5 比)證實各組組合疫苗。

[圖式簡單說明]

圖1顯示於II後14日對個別血清量測得之抗VLP16 Ig抗體反應。

圖2顯示於II後14日對個別血清量測得之抗VLP18 Ig抗體反應。

圖3顯示於II後14日對個別血清量測得之抗gD抗體反應。

圖4顯示於II後14日對個別血清量測得之抗HBs抗體反應。

圖5顯示於試管試驗再度使用VLP16刺激96小時後於脾臟細胞監測得之細胞激素產量。

圖 6 顯示於試管試驗再度使用 VLP18 刺激 96 小時後於脾臟細胞監測得之細胞激素產量。

圖 7 顯示於試管試驗再度使用 gD 抗原刺激 96 小時後於脾臟細胞監測得之細胞激素產量。

圖 8 顯示於試管試驗再度使用 HBs 刺激 96 小時後於脾臟細胞監測得之細胞激素產量。

伍、中文發明摘要：

本發明提供新穎組合疫苗組合物，包含 HPV 16 L1 VLP 及 HPV 18 L1 VLP 以及選擇性一或多種下列成分：HSV 抗原，EBV 抗原，A 型肝炎抗原或失活化減毒病毒，B 型肝炎病毒抗原，VZV 抗原，HCMV 抗原，非洲弓漿蟲 (*Toxoplasma gondii*) 抗原。疫苗組合物係與一種佐劑調配，該佐劑為 TH1 細胞反應的偏好刺激劑例如 3D-MPL 及 QS21。

陸、英文發明摘要：

Novel combined vaccine compositions are provided, comprising an HPV 16 L1 VLP and an HPV 18 L1 VLP and optionally in addition one or more of the following: an HSV antigen, an EBV antigen, a hepatitis A antigen or inactivated attenuated virus, a hepatitis B viral antigen, a VZV antigen, a HCMV antigen, a *Toxoplasma gondii* antigen. The vaccine compositions are formulated with an adjuvant which is a preferential stimulator of TH1 cell response such as 3D-MPL and QS21.



拾、申請專利範圍：

1. 一種疫苗，包含 HPV 16 L1 VLP、HPV 18 L1 VLP、氫氧化鋁及 3D-MPL。
2. 如申請專利範圍第 1 項之疫苗，其中利用事先吸附於氫氧化鋁上之抗原或 3D-MPL 單一本體調配該等 VLPs。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之疫苗，其中將 VLP 16 及 VLP 18 之經純化本體添加至氫氧化鋁以得到 2g VLP/10g Al (OH)₃ 之比例。
4. 一種疫苗，其係由 HPV 16 L1 VLP、HPV 18 L1 VLP、氫氧化鋁及 3D-MPL 所組成。
5. 一種 HPV 16 L1 VLP，其係利用事先吸附於氫氧化鋁或 A1P04 上之抗原或 3D-MPL 單一本體（礬土/3D-MPL）調配。
6. 一種 HPV 18 L1 VLP，其係利用事先吸附於氫氧化鋁或 A1P04 上之抗原或 3D-MPL 單一本體（礬土/3D-MPL）調配。



拾壹、圖式：

圖1：II後14日之抗VLP16反應
個別血清結果(EU/毫升)

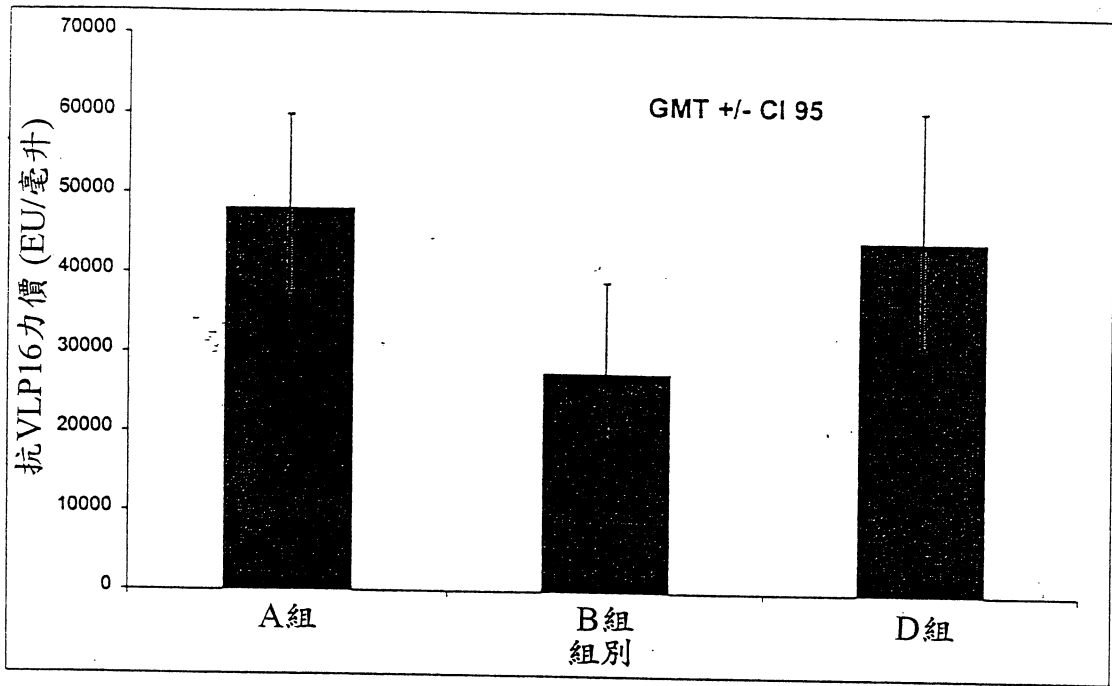


圖2：II後14日之抗VLP18反應

個別血清結果(EU/毫升)

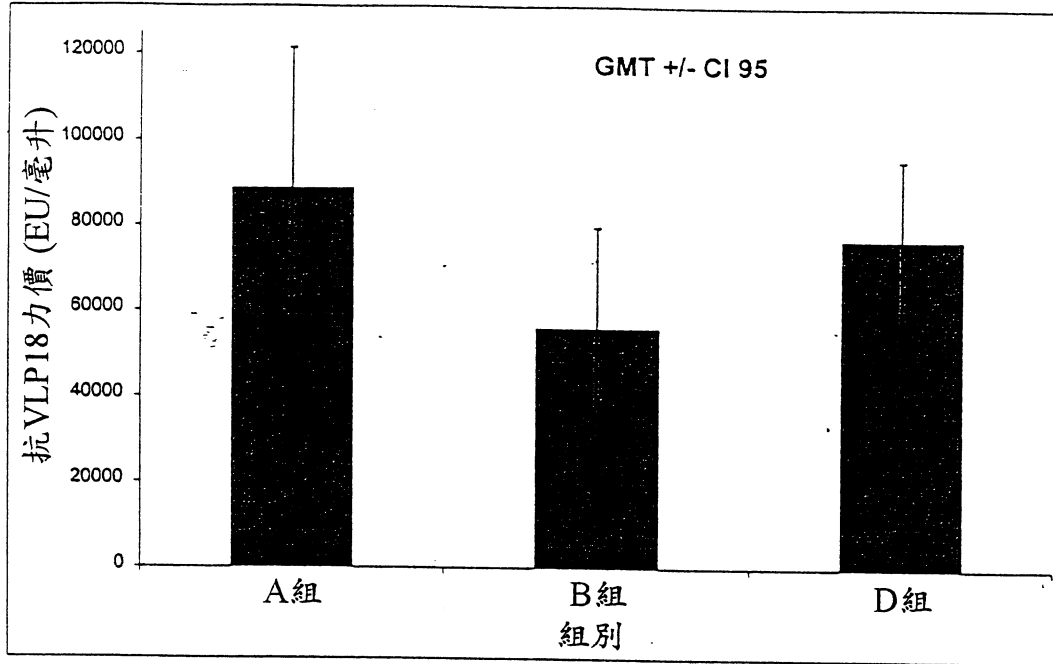


圖3：II後14日抗gD反應
個別血清結果(EU/毫升)

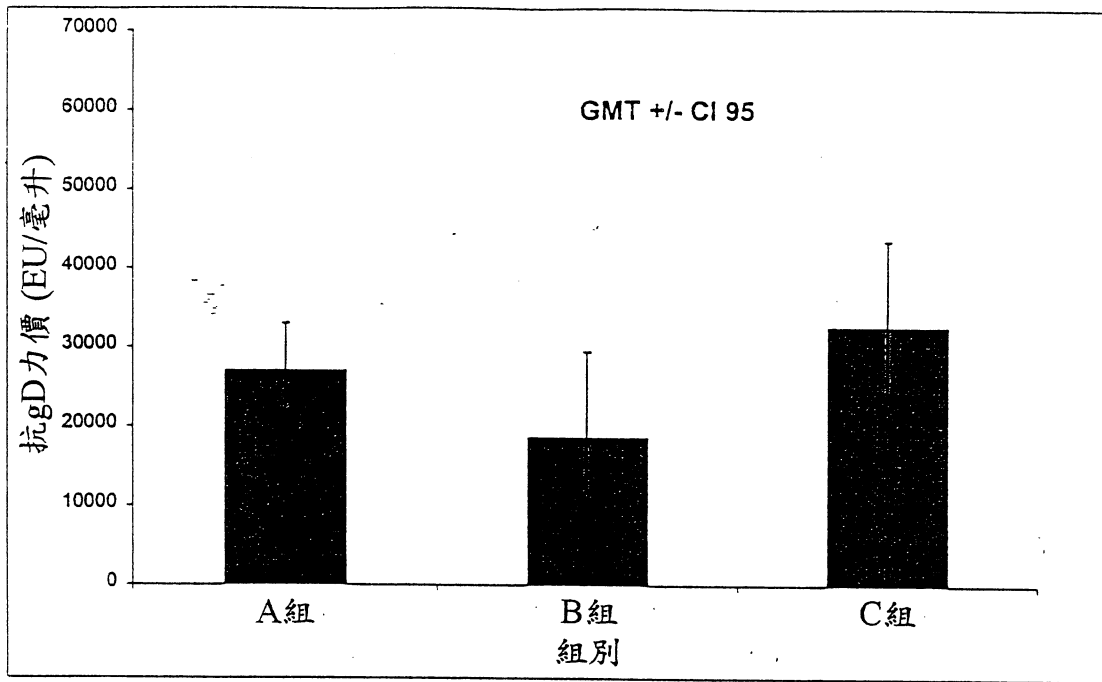


圖4：II後14日抗HBs反應
個別血清結果(EU/毫升)

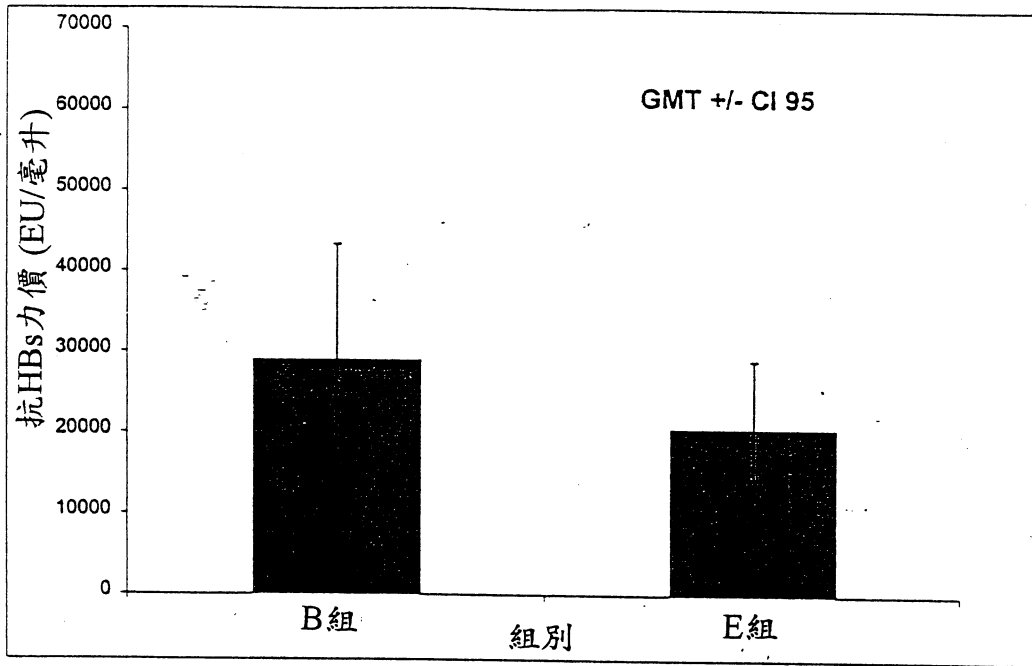
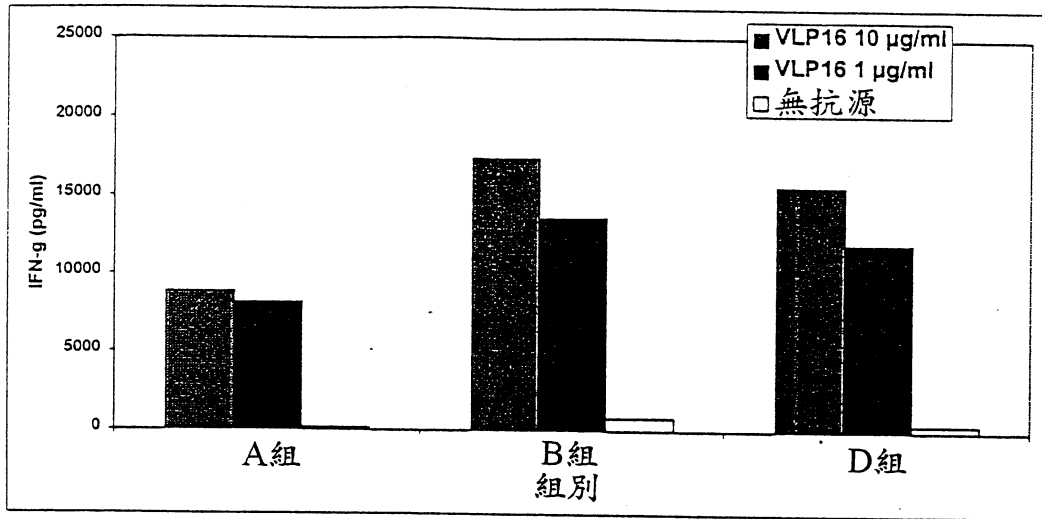


圖5：細胞激素結果-II後14日
於試管試驗以VLP16刺激後的IFN-g產量



於試管試驗以VLP16刺激後的IL-5產量

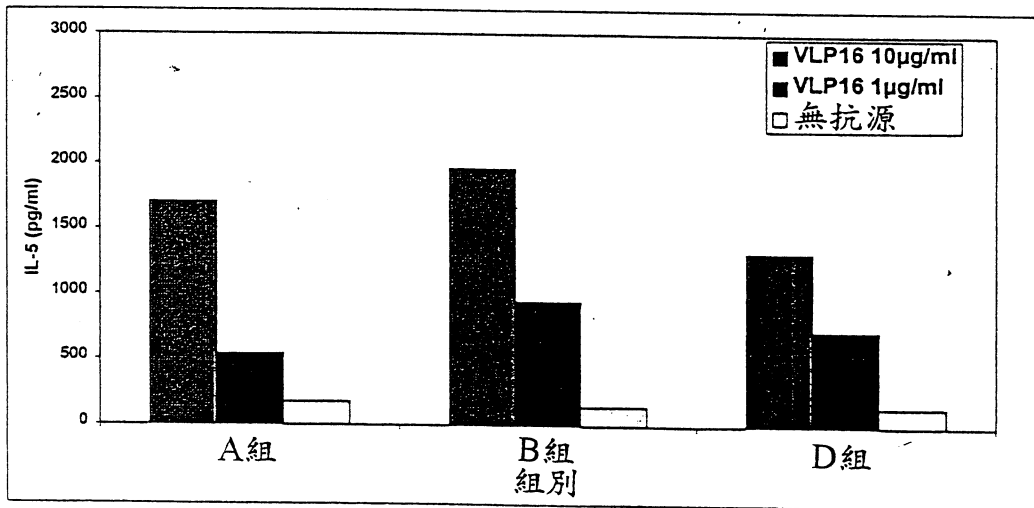
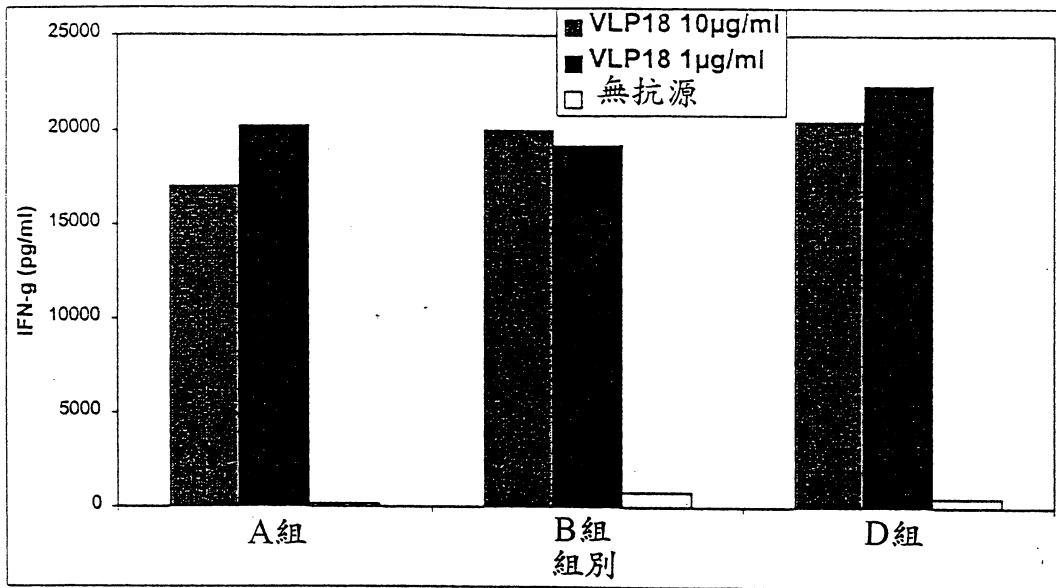


圖6：細胞激素結果-II後14日

於試管試驗以VLP18刺激後的IFN-g產量



於試管試驗以VLP18刺激後的IL-5產量

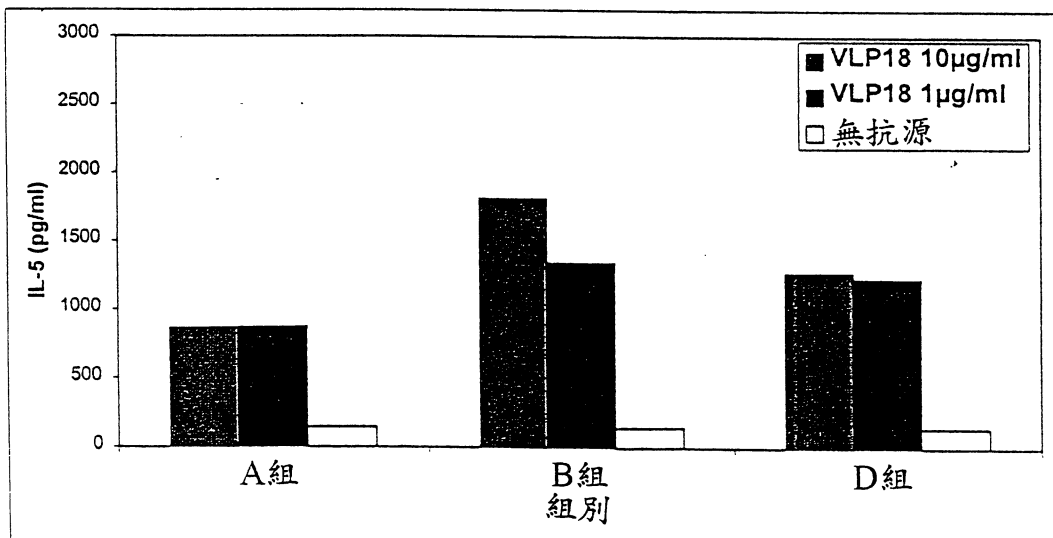
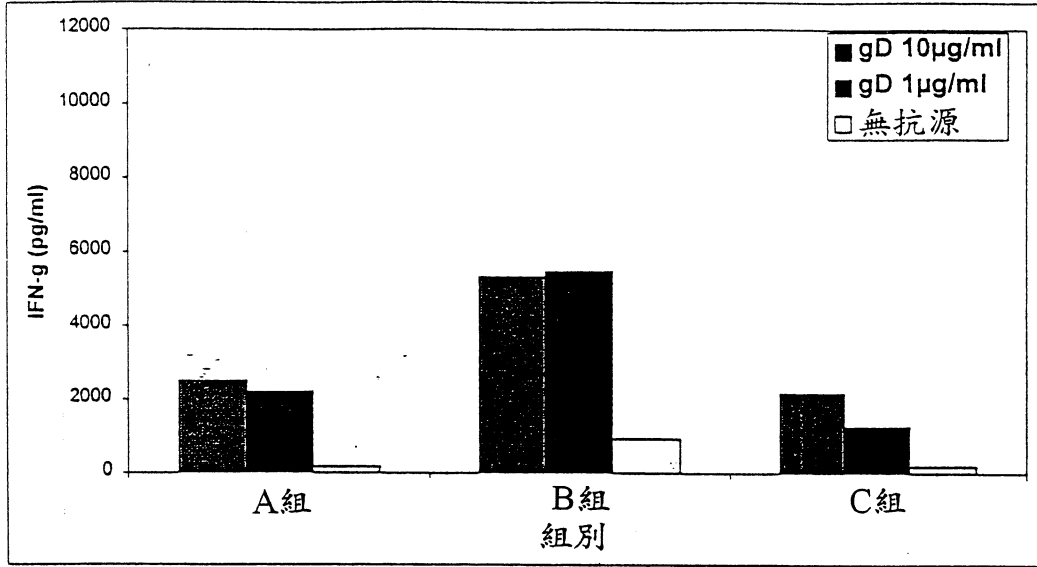


圖7：細胞激素結果-II後14日
於試管試驗以gD刺激後的IFN-g產量



於試管試驗以gD刺激後的IL-5產量

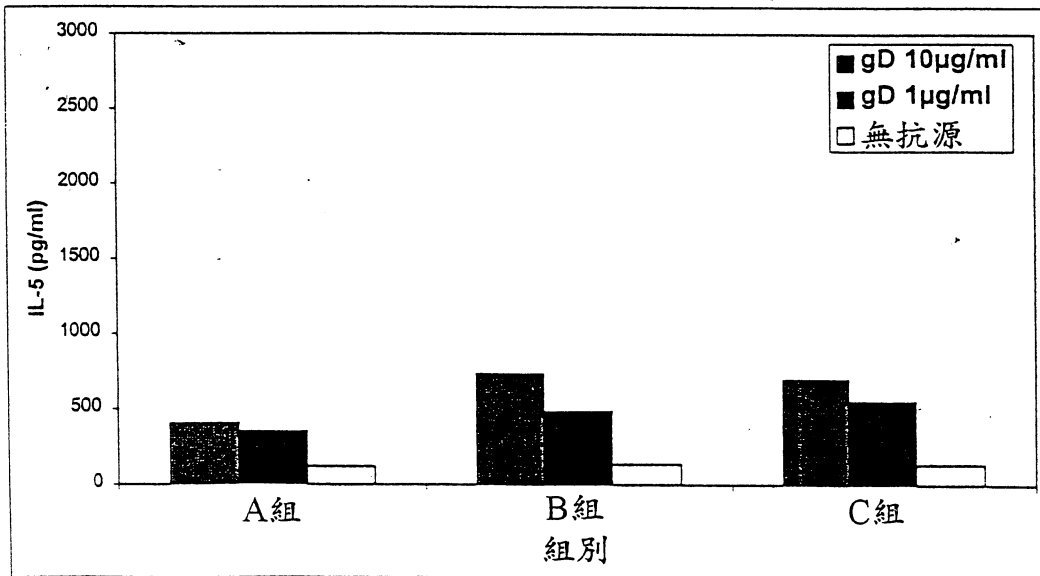
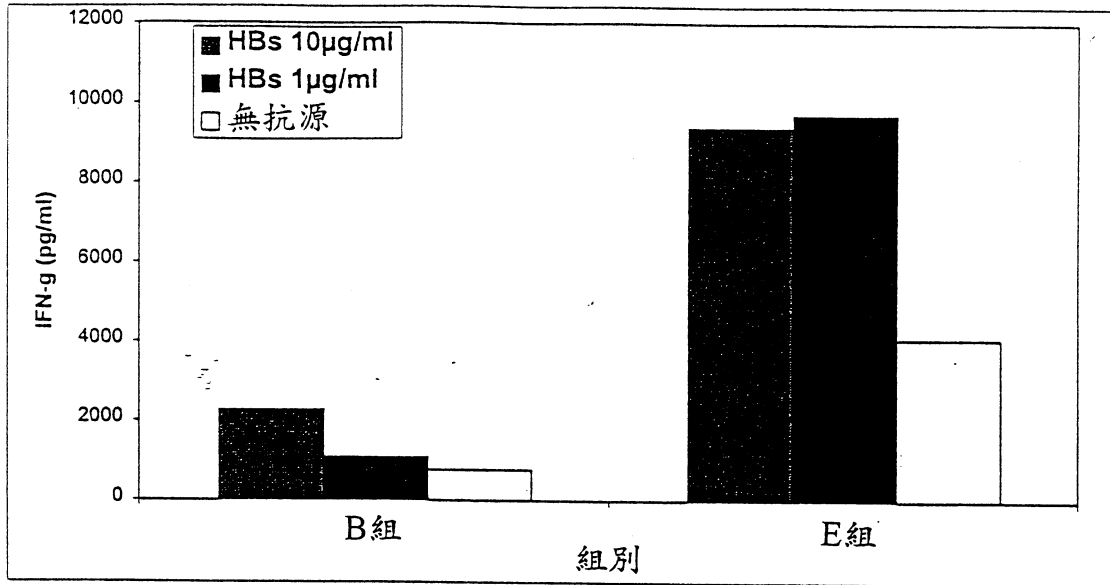
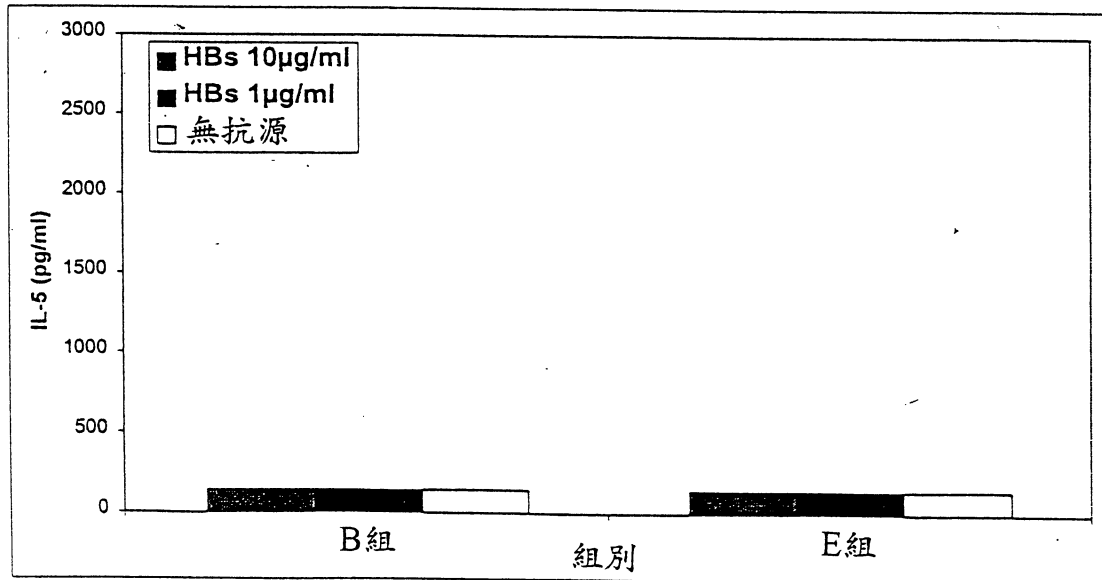


圖8：細胞激素結果-II後14日
於試管試驗以HBs刺激後的IFN-g產量



於試管試驗以HBs刺激後的IL-5產量



柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：