

申請日期： 92.11.06	IPC分類
申請案號： 92131025	A61K38/16

(以上各欄由本局填註)

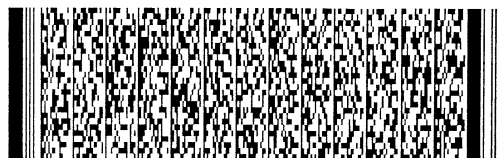
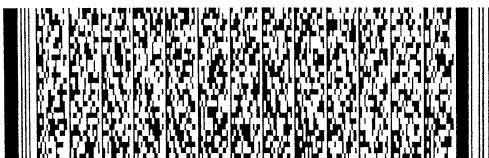
## 發明專利說明書

200418502

一、 發明名稱	中文	治療或預防肺炎球菌感染之組合物與方法
	英文	COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING OR PREVENTING PNEUMOCOCCAL INFECTION

二、 發明人 (共4人)	姓名 (中文)	1. 麥可 C. 陳 2. 邱創究 3. 李忠明
	姓名 (英文)	1. Michael C. Chen 2. Chuang-Jiun Chiou 3. Zhongming Li
	國籍 (中英文)	1. 美國 US 2. 中華民國 TW 3. 美國 US
	住居所 (中文)	1. 美國馬里蘭州20854, 波多馬克市, 蘇格蘭彎路8220號 2. 美國馬里蘭州21046, 哥倫比亞市, 木鄰瓦特巷9020號 3. 美國馬里蘭州20877, 蓋瑟斯城市, 史瓦司摩爾大道311號
	住居所 (英文)	1. 2. 3.

三、 申請人 (共1人)	名稱或姓名 (中文)	1. 新納幾美國公司
	名稱或姓名 (英文)	1. SYNERGY AMERICA, INC.
	國籍 (中英文)	1. 美國 US
	住居所 (營業所) (中文)	1. 美國馬里蘭州20850-3308, 洛克威爾市, 古瑞特塞尼卡大道9700號185室 (本地址與前向貴局申請者相同)
	住居所 (營業所) (英文)	1.
	代表人 (中文)	1. 陳東勝
代表人 (英文)	1. DONG-SHENG CHEN	

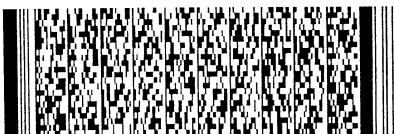


申請日期：	IPC分類
申請案號：	

(以上各欄由本局填註)

## 發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	
	英文	
二、 發明人 (共4人)	姓名 (中文)	4. 陳東聖
	姓名 (英文)	4. Dong-Sheng Chen
	國籍 (中英文)	4. 美國 US
	住居所 (中文)	4. 美國馬里蘭州02854, 波多馬克市, 燭光巷1106號
	住居所 (英文)	4.
三、 申請人 (共1人)	名稱或 姓名 (中文)	
	名稱或 姓名 (英文)	
	國籍 (中英文)	
	住居所 (營業所) (中文)	
	住居所 (營業所) (英文)	
	代表人 (中文)	
	代表人 (英文)	



## 一、本案已向

國家(地區)申請專利	申請日期	案號	主張專利法第二十四條第一項優先權
美國 US	2002/11/07	60/424,497	有

二、主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張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

日期：

四、有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：

無

寄存機構：

寄存日期：

寄存號碼：

有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：

寄存日期：

無

寄存號碼：

熟習該項技術者易於獲得,不須寄存。

## 五、發明說明 (1)

## 【發明所屬之技術領域】

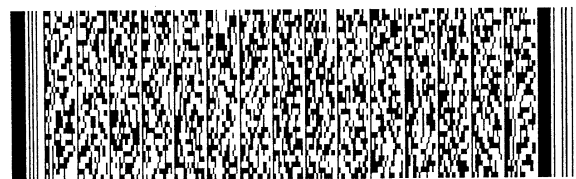
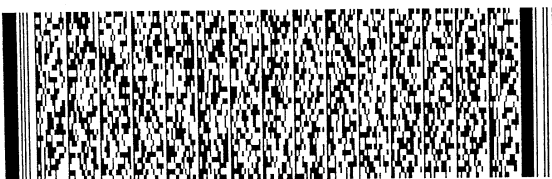
本發明係關於多胜肽、肺炎球菌多醣體-多胜肽共軛物、編碼肺炎球菌多胜肽的表現載體、導入抗肺炎球菌免疫反應之方法、及肺炎球菌感染之治療與預防方法。

## 【先前技術】

肺炎鏈球菌 (*S. pneumoniae*) 為一般導致孩童、老人及免疫缺乏個體感染細菌性肺炎、腦膜炎、中耳炎及菌血症的因素。肺炎鏈球菌 (*S. pneumoniae*) 可根據該菌的外包膜多醣區分為約90種。然而，疾病一般來自於約30種的肺炎鏈球菌 (*S. pneumoniae*)。世界衛生組織估計每年一百萬的兒童死亡歸因於肺炎球菌腦膜炎及敗血症，其中98%的死亡發生在發展中國家。具有抗藥性的肺炎球菌株使抗微生物以外的治療及預防肺炎球菌感染方法，更為需要。

## 【發明內容】

本發明特徵為一種組合物，其含有與肺炎鏈球菌外包膜多醣體共軛的多胜肽，其中該多胜肽含有肺炎鏈球菌肺炎溶素 (pneumolysin) 蛋白質的至少400連續胺基酸之片段，該多胜肽缺乏胺基酸序列KVEND (序列識別號：22) (例如在碳端)，該多胜肽缺乏溶血活性，及該組合物在投予哺乳類時會引起抗肺炎鏈球菌的免疫反應 (如體液免疫反應及/或細胞免疫反應)。此免疫反應可為預防性及/或治療性免疫反應。



## 五、發明說明 (2)

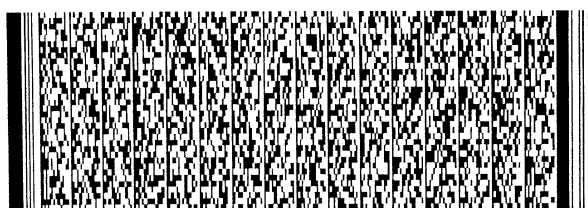
肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質可含有序列識別號：1之胺基酸序列。某些實施例中，該多胜肽含有序列識別號：1之1-460胺基酸。於其他實施例中，該多胜肽含有序列識別號：1之1-464胺基酸、序列識別號：1之1-465胺基酸、序列識別號：1之1-466胺基酸、序列識別號：1之1-469胺基酸、或序列識別號：1之1-470胺基酸。

該多胜肽可選擇性缺乏胺基酸序列EDKVEND(序列識別號：23)或胺基酸序列YPQVEDKVEND(序列識別號：24)。

某些實施例中，該多胜肽由以下所構成：序列識別號：1之1-460胺基酸殘基，序列識別號：1之1-464胺基酸殘基，序列識別號：1之1-465胺基酸殘基，序列識別號：1之1-466胺基酸殘基，序列識別號：1之1-469胺基酸殘基，或序列識別號：1之1-470胺基酸殘基。

某些實施例中，該外包膜多醣體係選自血清型4型、6B型、9V型、14型、18C型、19F型、及23F型所組成之族群。於一實施例中，該外包膜多醣體為血清型14型。於另一實施例中，該外包膜多醣體為血清型18C型。該組合物可選擇性含有複數種不同外包膜多醣體，選自血清型4型、6B型、9V型、14型、18C型、19F型、及23F型所組成之族群。

由該組合物引起的免疫反應可導致直接對抗肺炎鏈球菌外包膜多醣體、對抗肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質、或對抗肺炎鏈球菌外包膜多醣體與對抗肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質。



## 五、發明說明 (3)

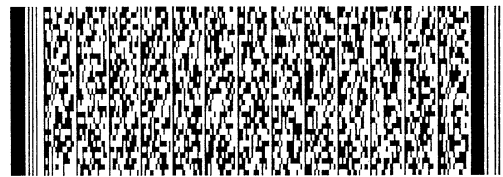
另一方面，本發明特徵為一種哺乳類表現載體，包含一啟動子，可操作地連接於一核苷酸序列，該核苷酸序列含有編碼含肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質至少400連續胺基酸片段的多胜肽，其中該多胜肽缺乏胺基酸序列KVEND(序列識別號：22)(例如在羧基端)，該多胜肽缺乏溶血活性，及該多胜肽在投予哺乳動物表現載體時，會引起抗肺炎鏈球菌的免疫反應(如體液免疫反應及/或細胞免疫反應)。此免疫反應可為預防性及/或治療性免疫反應。

該肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質可含有序列識別號：1之胺基酸序列。某些實施例中，該多胜肽含有序列識別號：1之1-460胺基酸。其他實施例中，該多胜肽含有序列識別號：1之1-464胺基酸、序列識別號：1之1-465胺基酸、序列識別號：1之1-466胺基酸、序列識別號：1之1-469胺基酸、或序列識別號：1之1-470胺基酸。

該編碼的多胜肽可選擇性缺乏胺基酸序列EDKVEND(序列識別號：23)或胺基酸序列YPQVEDKVEND(序列識別號：24)。

某些實施例中，該多胜肽由以下構成，序列識別號：1之1-460胺基酸殘基，序列識別號：1之1-464胺基酸殘基、序列識別號：1之1-465胺基酸殘基、序列識別號：1之1-466胺基酸殘基、序列識別號：1之1-469胺基酸殘基、或序列識別號：1之1-470胺基酸殘基。

由該編碼的多胜肽引起的免疫反應可導致對抗肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質。



## 五、發明說明 (4)

另一方面，本發明特徵為哺乳類表現載體，其含有可操作性連接於核苷酸序列的啟動子，該核苷酸序列含有編碼肺炎鏈球菌自溶素多胜肽的核酸，其中該多胜肽在投予哺乳動物該表現載體時，會引起抗肺炎鏈球菌的免疫反應（如體液免疫反應及/或細胞免疫反應）。此免疫反應可為預防性及/或治療性免疫反應。

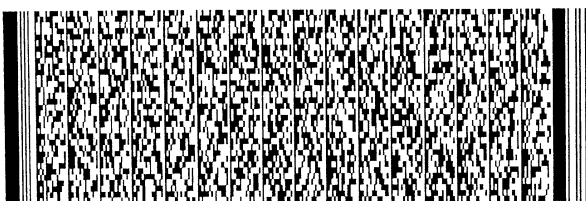
某些實施例中，該編碼的多胜肽含有序列識別號:14之胺基酸序列。其他實施例中，該編碼的多胜肽由序列識別號:14之胺基酸序列所構成。

另一方面，本發明特徵為一哺乳動物表現載體，其含有可操作性連接於核苷酸的啟動子，該核苷酸含有編碼肺炎球菌表面蛋白A多胜肽的核酸，其中該多胜肽在投予哺乳動物該表現載體時，會引起抗肺炎鏈球菌的免疫反應（如體液免疫反應及/或細胞免疫反應）。此免疫反應可為預防性及/或治療性免疫反應。

某些實施例中，該編碼的多胜肽含有序列識別號:18之胺基酸序列。其他實施例中，該編碼的多胜肽由序列識別號:18之胺基酸序列所構成。

另一方面，本發明特徵為一多胜肽，其含有胺基酸序列選自序列識別號:1之1-460胺基酸、序列識別號:1之1-464胺基酸、序列識別號:1之1-465胺基酸、序列識別號:1之1-466胺基酸、及序列識別號:1之1-469胺基酸所組成之族群。

另一方面，本發明特徵為一種於哺乳動物引發免疫反



## 五、發明說明 (5)

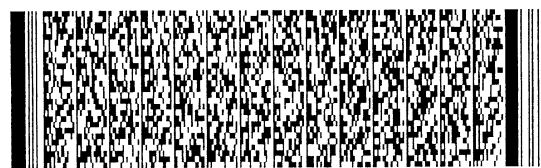
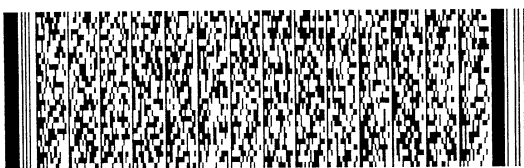
應的方法，其藉由投予哺乳動物一定量的此述組合物，其係有效於引起哺乳動物體內對抗肺炎鏈球菌的免疫反應。此免疫反應可為預防性及/或治療性免疫反應。

某些實施例中，該免疫反應為可交叉反應對抗至少一型肺炎鏈球菌，其差異在該組合物中呈現不同的外包膜多糖體(如血清型7型、6B型、18C型、或23F型)。某些實施例中，該免疫反應為可交叉反應對抗至少一種鏈球菌屬中的非肺炎鏈球菌種。

另一實施例中，本發明特徵為一種於哺乳動物體內引起免疫反應的方法，其藉由投予哺乳動物一定量的此述表現載體(如肺溶素、偽肺溶素、自溶素、或肺炎球菌表面蛋白A表現載體)，其係有效於引起哺乳動物體內對抗肺炎鏈球菌的免疫反應。此免疫反應可為預防性及/或治療性免疫反應。某些實施例中，該免疫反應為可交叉反應對抗至少一種鏈球菌屬中的非肺炎鏈球菌種。

另一方面，本發明特徵為一種哺乳動物體內引起免疫反應的方法，其藉由投予哺乳動物一表現載體，及投予該哺乳動物純化肺炎鏈球菌肺溶素多胜肽或其抗原片段，該表現載體含有可操作地連接於含編碼肺炎鏈球菌肺溶素多胜肽或其抗原片段的核酸之啟動子，其中此結合的投藥引起哺乳動物抗肺炎鏈球菌肺溶素的免疫反應。

某些實施例中，該哺乳動物投藥至少2、3或更多分離劑量的該表現載體。劑量可選擇性分為至少1、2、3、4、5、6、7或更多天數。

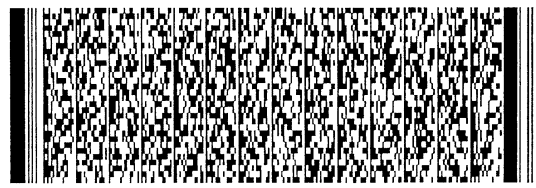
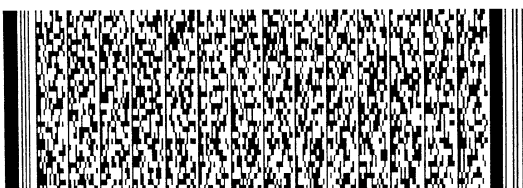


## 五、發明說明 (6)

某些實施例中，肺炎鏈球菌肺溶素多胜肽或其抗原片段的投藥為該表現載體投藥後的至少1、2、3、4、5、6、7或更多天數。

另一方面，本發明特徵為一種組合物，其含一多胜肽與非肺炎鏈球菌細菌多醣體共軛，其中該多胜肽含有肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質的至少400連續胺基酸片段，其中該多胜肽缺乏胺基酸序列KVEND(序列識別號：22)，該多胜肽缺乏溶血活性，及該組合物在投予哺乳動物時，會引起抗非肺炎鏈球菌的免疫反應。某些實施例中，非肺炎鏈球菌選自肺炎球菌；流行性感胃嗜血桿菌流行性感胃b型；腦膜炎球菌A、B、或C群；及B群鏈球菌Ia、Ib、II、III、V、或VIII型。此組合物可用於引起哺乳動物體內免疫反應，藉由投予一定量該組合物，其係有效於引起哺乳動物體內抗非肺炎鏈球菌的免疫反應。

另一方面，本發明特徵為一種純化抗體，其連接(如選擇性連接)此述組合物或多胜肽。例如，一抗體可專一性連接一組合物，該組合物含有與肺炎鏈球菌外包膜多醣體共軛的多胜肽，其中該多胜肽含有肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質的至少400連續胺基酸片段，其中該多胜肽缺乏胺基酸序列KVEND(序列識別號：22)(例如在羧基端)，該多胜肽缺乏溶血活性，及該組合物在投予哺乳動物表現載體時，會引起抗肺炎鏈球菌的免疫反應(如體液免疫反應及/或細胞免疫反應)。此抗體可為如單株或多株抗體。如雜合瘤的細胞株為分泌此抗體而製造。此抗體可藉由投藥遭肺炎



## 五、發明說明 (7)

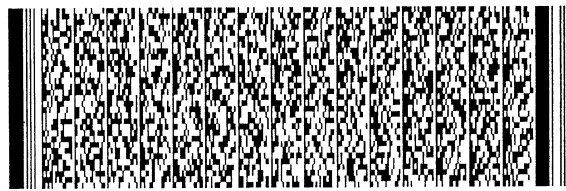
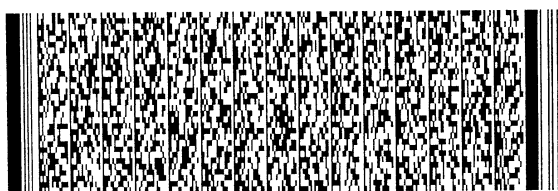
鏈球菌感染的哺乳動物治療或預防上有效量的此純化抗體，予以治療或預防。

本發明之一優點為某些實施例中，第一型肺炎鏈球菌多醣體-多胜肽共軛物可意外地提供交叉保護，對抗肺炎鏈球菌第二型的感染。該交叉保護可增加該共軛物在治療或預防由多於一種肺炎鏈球菌感染的效益。由上所述，在無須提供每一種特定型的共軛物下，本發明可提供對抗肺炎鏈球菌多型性的保護。

本發明的另一優點為某些實施例中，該偽肺溶素多胜肽缺乏溶血活性。因此，該偽肺溶素共軛物及表現載體與含有具溶血活性的天然肺溶素或具部份溶血活性的類毒素肺溶素之組合物相比，為減少或缺乏毒性。

本發明的另一優點為某些實施例中，編碼肺溶素截斷物的表現載體，相反於編碼肺溶素點突變物的核酸，不可能回復，因此編碼具溶血活性的毒性蛋白質。由於該肺溶素截斷物缺乏導致溶血活性的部分肺溶素，在該表現載體核苷酸序列的任何突變應不能在產生該毒性。

除非特別定義，此述所有技術性及科學性術語具有如熟知本發明所屬之技術範圍者所知之相同意義。雖與此述相似或相同的方法及材料可用於本發明的實驗或測試，以下說明適當方法及材料。所有此述的公開文章、專利申請書、專利、及其他參考書目皆為參考範圍。假使術語上有爭議，本說明書將加以限制。而且所述材料及方法皆僅說明，並不侷限。



## 五、發明說明 (8)

本發明其他特徵及優點將由下列詳細說明及申請專利範圍顯見。

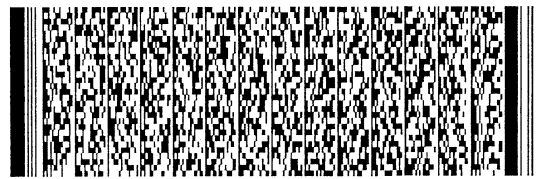
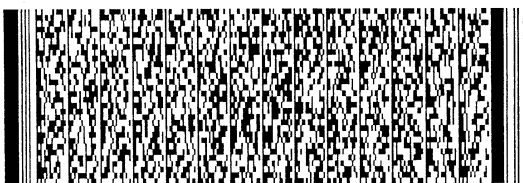
## 【實施方式】

本發明提供組合物及方法以治療或預防肺炎球菌的感染。此述的多胜肽、多醣體-多胜肽共軛物、及表現載體在投予哺乳動物時，會引起抗肺炎球菌免疫反應。此等組合物可預防性作為接種疫苗及/或治療性引起感染個體的治疗免疫反應。

## 多醣體-蛋白質共軛物

多胜肽可與肺炎鏈球菌外包膜多醣體以共價或非共價方式共軛。一般而言，該共軛物的多胜肽部分包含肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質部分或突變的肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質；缺乏胺基酸序列KVEND(序列識別號:22)；及缺乏溶血活性。該多醣體-多胜肽在投予哺乳動物時引起抗肺炎鏈球菌的免疫反應。該免疫反應指向對抗該多胜肽、該多醣體、或該多胜肽與該多醣體的組合物。

該共軛物的多胜肽部分可以重組DNA技術、天然物中純化、或化學合成而製造。一般而言，該多胜肽部分的胺基酸序列與天然生成的肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質不同。肺炎鏈球菌19A型肺溶素多胜肽的序列如序列識別號:1(如實施例1)。實施例中的共軛物之多胜肽部分包含序列識別號:1的胺基酸1-460、1-461、1-462、1-463、1-464、1-465、1-466、1-469、及1-470，但不限於此。



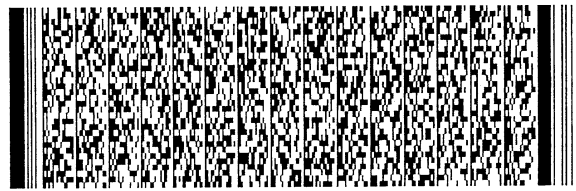
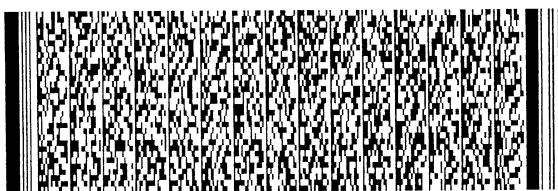
## 五、發明說明 (9)

編碼肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質的截斷型及/或突變型的核酸可經如聚合酶鏈反應(PCR)製造。編碼此等蛋白質的核酸可選擇含有對特定表現系統較適當或較不適當的密碼子。例如，該核酸可為至少1個密碼子改變，較佳為至少10%或20%的密碼子改變，因而使該序列有效表現於大腸桿菌、酵母菌、人、昆蟲或CHO細胞。

編碼肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質的截斷型及/或突變型的核酸可融合於編碼下列物質的核酸序列：(1)其他肺炎球菌蛋白質，如自溶素、表面蛋白A、神經胺酸苷酶、琉璃糖醛鹽溶菌產物、膽鹽連接蛋白A，或(2)來自有機體的非肺炎球菌蛋白質，如流行性感嗜血桿菌流行性感嗜血b、腦膜炎球菌A、B、或C群。編碼此融合蛋白質的核酸在表現系統中表現。

肺溶素的截斷物可作為多醣載體，如宿主可能缺乏對抗載體多醣體的事先存在抗體。肺溶素在肺炎球菌感染中為劇毒因素，在不同型的肺炎球菌中該肺溶素幾乎無抗原差異。

該多醣體-蛋白質共軛物在投予哺乳動物如人時，所引起的免疫反應的強度、形式及/或時間超過僅投予多醣部分所引起的免疫反應。因此，該多肽部分必須有一段長度足以引起該增強的免疫反應。自然產生的肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質片段，其多肽部分至少有8、10、25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、425、450、460、465、460、465，或更長的胺基酸

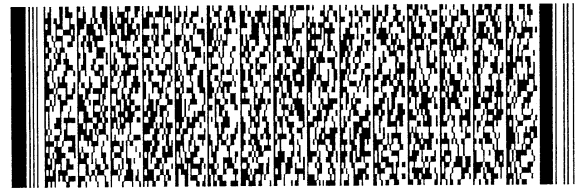
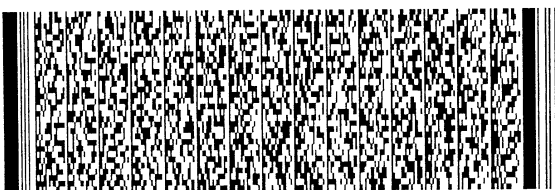


## 五、發明說明 (10)

序列。關於多胜肽，因天然產生的肺炎鏈球菌蛋白質不同而序列也有差異，該多胜肽至少有50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或更多相似於天然產生的肺炎鏈球菌蛋白質，如序列識別號:1。

該多胜肽部分較佳缺乏天然肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質的溶血活性。一般而言，該多胜肽部分顯現較低於天然肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質的溶血活性的30%、20%、10%、5%、1%或更低。溶血活性可詳如實施例3測量。多胜肽的溶血活性一般可經由將該多胜肽與紅血球一起培養，如羊紅血球，及測量由該多胜肽引起的溶血反應，予以確認(如Owen et al. (1994) FEMS Microbiology Letters 121:217-222，見實施例溶血分析說明)。

該共軛物的多醣部分可為任何肺炎鏈球菌外包膜多醣體，包含型1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 19A, 20, 22F, 23A, 23F, 24F, 27, 33F, 或34，但不限於此。某些實施例中，該外包膜多醣體選自型4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 或23F。某些實施例中，該多醣體為血清型14。其他實施例中，該多醣體為血清型18C。一或以上的不同外包膜多醣體可予單一多胜肽或多種多胜肽共軛。例如，多價共軛物可包含至少1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或10種不同外包膜多醣體。多醣體可經由如單體鍵結(僅多醣體的一端與多胜肽連接)與多胜肽共軛，或經由環狀鍵結(單一多胜肽連接在環狀多醣體)或交聯(複數多醣體



## 五、發明說明 (11)

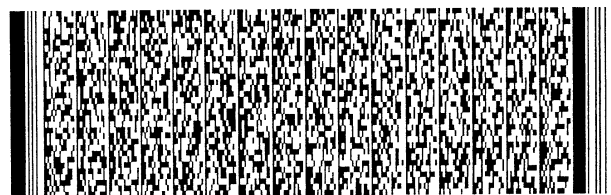
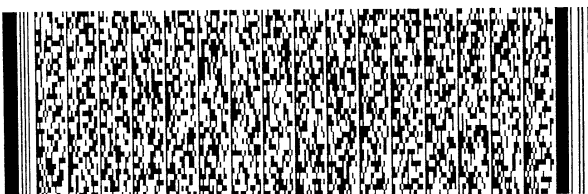
連接至複數多胜肽)。

純化多胜肽的方法，如實施例中所述偽肺溶素多胜肽，及實施例4所述多醣體與多胜肽的共軛。關於多胜肽或多醣體純化及共軛過程的額外細節說明於如美國專利號4,242,501; 4,686,102; 5,623,057; 及 5,565,204。

此述該共軛物或多胜肽可投予哺乳動物，引起對肺炎鏈球菌的免疫反應(預防及/或治療免疫反應)。含有共軛物或多胜肽的醫藥組合物可以適合作為疫苗的醫藥可接受載體、緩衝液、或防腐劑傳遞，如生理食鹽水或其他可注射液體，但不限於此。亦可為疫苗內的添加物慣例，例如穩定劑如乳糖或山梨糖醇；及輔劑促進免疫原性反應，如磷酸鋁、氫氧化鋁、或硫酸鋁及硬脂酪胺酸。疫苗製造亦可作為多價疫苗的一部分，該多價疫苗為對抗多種感染源引起的免疫反應。

該組合物可以任何已知方法投予，如口服、肌肉內、靜脈內、動脈內、椎管內、皮內、腹膜內、鼻內、肺內、眼內、陰道內、直腸內、或皮下投予。其可投入腸胃道或呼吸道中，例如經吸入含該共軛物的溶液或粉末。某些實施例中，該組合物可經皮膚貼片投藥。

醫藥組合物(如疫苗)以一定量投予，使足以引起抗體產生，成為免疫原性反應的一部分。任何病人的投藥劑量由許多因素決定，包含病人體積、一般健康狀況、性別、身體表面積、年齡、投予的特定藥物、投藥時間及路徑、及同時投予的其他藥物。理想劑量在習知醫藥技術者的醫



## 五、發明說明 (12)

藥能力內皆可。

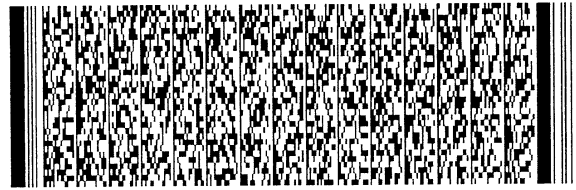
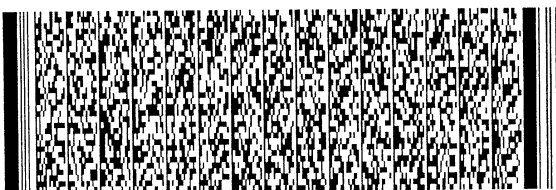
組合物引起宿主免疫反應的能力可經習知的免疫反應測量方法分析。例如，殺手T細胞的產生可由<sup>51</sup>Cr釋放分析方法確認，或經由測量細胞內細胞激素表現或分泌得知，或使用主要組織相容複合體(MHC)四合體。標準分析，如酵素連接免疫吸收分析(ELISA)或酵素連接免疫斑(ELISPOT)，可用於測量因T細胞活化的細胞激素情形。T細胞增殖可以<sup>3</sup>H-胸苷吸收分析及其他習知分析測量。B細胞反應可使用習知辨識分析如ELISA測量。亦可使用其他方法評估致病原相關損害或其他致病原程度上該共軛物的效果(如經該共軛物處理的小鼠中肺炎球菌的清除率)。

此述組合物可使用於醫藥物的製造，以預防或治療肺炎鏈球菌的感染或該感染相關的情況。

## 抗體

對抗多醣體、肺溶素或其組合物的抗體可用於預防或治療施用，以使第一個體到第二個體產生免疫能力(如放大第二個體對肺炎鏈球菌的免疫反應或當地二個體為免疫相容病人時提供反應)。對抗多醣體、肺溶素或其組合物的抗體可在免疫相容宿主體中產生(如經由投予該免疫相容病人此述共軛物)，由宿主中收集，灌輸至需要治療或預防的接受者，因此給予接受者抵抗力對抗該肺溶素毒素及肺炎鏈球菌以及其他連接由該共軛物引起的抗體的其他可能細菌(如該共軛物的多醣部分)。

由此述組合物引起的抗體可調配如醫藥組合物，及給



## 五、發明說明 (13)

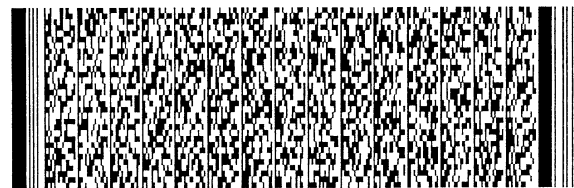
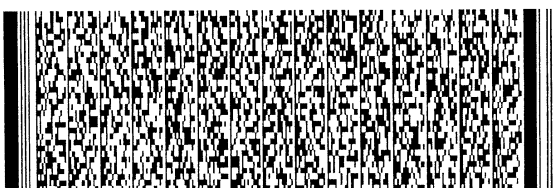
予個體預防或治療的免疫反應。醫藥組合物的適當組成部分及投藥方法如此述。關於引起的被動免疫，該醫藥組合物可含有多株抗體或單株抗體或其片段的衍生物。如標準臨床技術所確認，醫藥組合物含有預防性或治療性有效劑量的抗體、片段或衍生物。

## 編碼肺炎球菌多胜肽的核酸

編碼肺炎球菌多胜肽或其片段或變異體的核酸可投藥至哺乳動物(如人)，以產生預防及/或治療的免疫反應。該免疫反應可為抗肺炎球菌血清及/或細胞免疫反應。

由該核酸編碼的多胜肽包含此述共軛物的多胜肽、實施例所述偽肺溶素多胜肽、以及自溶素及肺炎球菌表面蛋白A及其片段及變異體。而且，核酸可編碼二或以上的多胜肽、片段或變異體的組合物。

核酸表現物可經由標準重組DNA方法製造。可包含固定的基本要素以加速編碼該多胜肽的核酸表現。此等基本要素包含在人或其他哺乳動物中增進表現的序列，如啟動子、RNA穩定序列5'及/或3'至編碼序列，插入序列(可放置於該編碼序列內或外的任何位置上)、聚(A)添加位、以及複製起點及一或以上編碼可選擇指標的基因，該可選擇的指標使該架構物複製及在原核及/或真核宿主中被選擇出。T7聚合酶啟動子或其他形式啟動子(如組織專一性啟動子或細胞專一性啟動子如肌肉專一性啟動子)選擇性表現在該編碼序列的5'端，編碼FLAG或其他mAb決定因素的序列選擇性表現於該編碼序列的3'端。該架構物亦可包含



## 五、發明說明 (14)

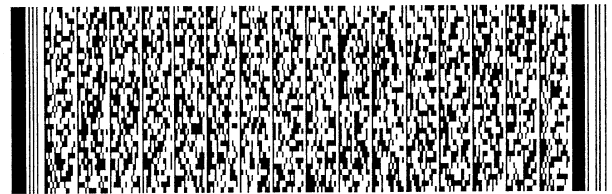
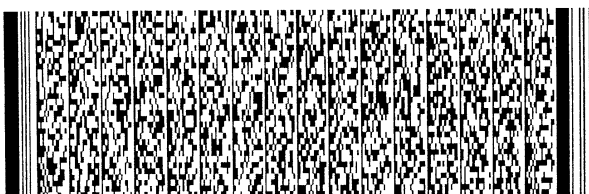
其他轉錄及轉譯訊號，如Kozak序列。

該架構物可額外包含編碼目標訊號的序列，該目標序列將該編碼多胜肽導向所欲的細胞內間隔，連接於該多胜肽。目標訊號可使該編碼多胜肽導向內質網(ER)、高基氏體、核、微溶體、II級胜肽負擔間隔、或內溶胞，以及包含訊號胜肽、ER保留胜肽、及微溶體目標胜肽。

該核酸可用於任何可在哺乳動物細胞內表現的載體(vector)。該載體可為非病毒載體如質體或細菌載體、整合病毒載體、或非整合病毒載體。適當載體例如其PCR產物可直接快速無性繁殖的pcDNA哺乳動物表現載體族(Invitrogen)。

各種傳遞系統可用於傳遞編碼多胜肽的核酸至適當細胞中。編碼該多胜肽的核酸可於醫藥可接受載體傳遞，如生理食鹽水，或為有稀釋劑或無稀釋劑的膠狀懸浮液或粉末。核酸可裸露或予傳遞載體相關，並以習知傳遞系統傳遞，如脂質、微脂體、微球體、微顆粒、或微膠囊、金顆粒、ISCOMS、奈米顆粒、聚合物、濃縮劑、多醣體、聚胺基酸、樹突體、植物皂素、QS21、吸收促進材料、輔藥、或脂肪酸。核酸亦可傳遞至細胞中，如使用電穿孔法在生體內或生體外傳遞至骨骼肌肉細胞中。

該核酸可使用標準方法投藥，如Donnelly等人，J. Immunol. Methods 176:145, 1994, 及 Vitiello 等人，J. Clin. Invest. 95:341, 1995中所述，可以習知方法傳遞至個體中，如口服、肌肉內、靜脈內、動脈內、椎管



## 五、發明說明 (15)

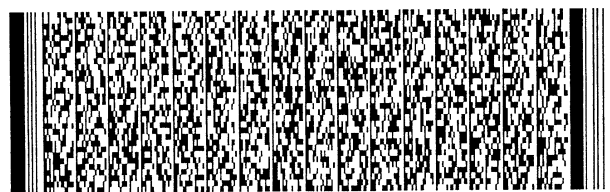
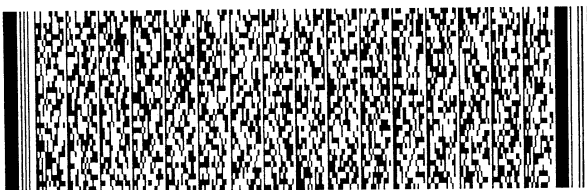
內、皮內、腹膜內、鼻內、肺內、眼內、陰道內、直腸內、或皮下投予。其可投入腸胃道或呼吸道中，例如經吸入含該共軛物的溶液或粉末。投藥可為局部或全身性。

預期約100-2000  $\mu\text{g}$  核酸的劑量投予一個體。當病人為成人時，疫苗治療方法可如以微顆粒傳遞時，肌肉內、皮內、吸入或皮下投藥10-1000  $\mu\text{g}$  質體DNA；或肌肉內或皮內投予裸露質體DNA約10-2500  $\mu\text{g}$ ，如100-2000，或500-1000  $\mu\text{g}$ ，重複3-6次。如同醫學習知，任何病人的劑量投予因許多因素而異，包含病人體積、一般健康狀況、性別、身體表面積、年齡、投予的特定藥物、投藥時間及路徑、及同時投予的其他藥物。理想劑量在習知醫藥技術者的醫藥能力內皆可。

亦可使用其他標準傳遞方法，如生物彈轉移 (biolistic transfer) 或體外生體治療 (*ex vivo*)。體外生體治療 (*ex vivo*) 中，抗原表現細胞 (APCs) 如樹突細胞、週邊血液單核細胞或骨髓細胞可獲自病人或適當捐贈者，且與該核酸一起體外生體 (*ex vivo*) 活化，然後植入或再灌入病人中。

該核酸可單獨投藥或與其他習知治療組合投藥，如抗微生物劑。而且，該核酸可與其他設計增進免疫反應的治療組合投藥，如習知方法與輔藥、細胞激素 (或編碼細胞激素的核酸)、或 CpG 寡核苷酸共同投藥。

核酸引起宿主哺乳動物免疫反應的能力可以習知測量免疫反應的方法分析。例如，殺手 T 細胞的產生可以標



## 五、發明說明 (16)

準<sup>51</sup>Cr 釋放分析確認，或經由測量細胞內細胞激素表現或分泌得知，或使用MHC 四合體。標準分析，如ELISA 或 ELISPOT，可用於測量因T細胞活化的細胞激素情形。T細胞增殖可以<sup>3</sup>H-胸苷吸收分析及其他習知分析測量。B細胞反應可使用習知辨識分析如ELISA測量。亦可使用其他方法評估致病原相關損害或其他致病原程度上該共軛物的效果(如經該共軛物處理的小鼠中肺炎球菌的清除率)。

此述核酸可用於醫藥的製造以預防或治療肺炎鏈球菌的感染或該感染的相關情況。

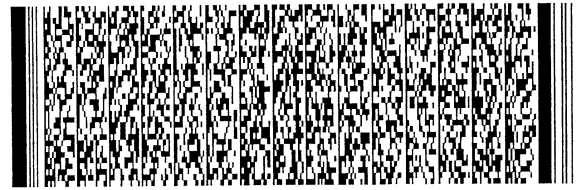
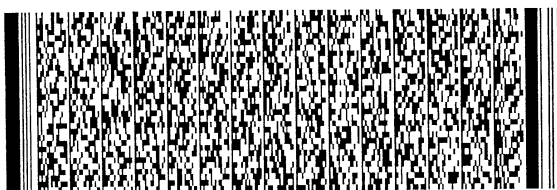
本發明可於下列實施例進一步說明，以下實施例並非用以限定本發明申請專利之範圍。

## 實施例

## 實施例1：偽肺溶素表現載體的構築

表現肺溶素多胜肽截斷型的載體描述於實施例 1A-1E。該編碼的截斷多胜肽稱為'偽肺溶素'多胜肽，可與肺溶素多醣體共軛，製造該共軛物疫苗。而且，編碼肺溶素多胜肽的核酸可投予個體，以產生抗該編碼的多胜肽之免疫反應。

PCR以肺炎鏈球菌19A型染色體DNA為鑄模進行，放大該肺溶素基因的各种片段。PCR反應使用的意義股引子黏接於轉譯起始密碼子的正上游之肺溶素基因的編碼序列，與一特定的限制酶位合作。該意義股引子為LYSN-1(5' GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'；序列識別號:2)



## 五、發明說明 (17)

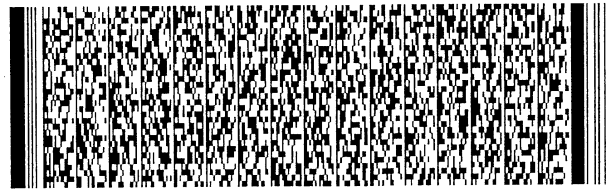
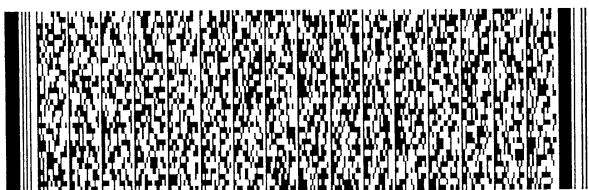
，與肺溶素基因5'端的1-24核苷酸互補。其反意義股引子為LYSN-3(5'

CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC-3'；序列識別號：3)

，與肺溶素基因3'端的1396-1413肺溶素核苷酸互補。該引子放大編碼肺溶素蛋白質全長471個胺基酸的1413bp的DNA。以下是肺炎鏈球菌19A型肺溶素蛋白質的胺基酸序列：

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKK  
RSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYS  
IDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNVPARMQY  
EKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYY  
TVSVDVAVKNPGDVFQDTVTVEDLKQRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKL  
ETTSKSDEVEAAFEALIKGVKVAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGA  
RVVTGKVDMMVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTSFRLDNVVATFQNSTDY  
VETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTTPKAWDRN  
GQDLTAHFTTSSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWRTVYEKTDLPLVRK  
RTISIWGTTLYPQVEDKVEND(序列識別號:1)

PCR一般進行如下：第1回94℃、4分鐘；隨後30回為94℃、1分鐘，55℃、1分鐘，72℃、1.5分鐘；及最後1回72℃、10分鐘。該PCR合成的DNA片段以NdeI及BamHI限制酶切割，黏接至pET11b表現載體(形成pSA-14)。將此重組DNA轉形至大腸桿菌DE3細胞中。篩選抗安比西林(Ampicillin)的轉形體。由NdeI及BamHI限制酶確認該DNA



## 五、發明說明 (18)

片段是否插入。

相較於野生株基因序列，該放大的DNA片段3'端缺乏核苷酸。由此種修飾核酸所編碼的偽肺溶素多胜肽為非溶血性及非細胞毒性，但仍保留免疫原性能力。

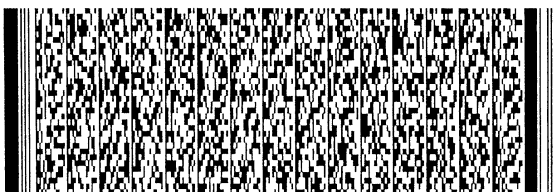
## A. pSA-1 表現載體的構築

pSA-1 表現載體編碼由肺溶素蛋白質序列識別號:1的1-460 胺基酸所構成的多胜肽。PCR以肺炎鏈球菌19A型染色體DNA進行，使用LSYN-1(5' GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'；序列識別號:2)及LSYN-4(5' GACTGGATCCTTACTAGAGAGTTGTTCCCAAATAG-3'；序列識別號:5)引子放大1380bp DNA。

該PCR合成的DNA片段以NdeI及BamHI限制酶切割，黏接至pET11b表現載體的NdeI及BamHI限制酶位，形成pSA-1。將此重組DNA轉形至大腸桿菌DE3細胞中。篩選抗安比西林(Ampicillin)的轉形體。由NdeI及BamHI限制酶確認該DNA片段是否插入，並進一步由DNA序列分析確定。

該編碼的460胺基酸多胜肽較野生型肺溶素蛋白質的羧基端缺乏11個胺基酸，其具有下列下列序列：

```
MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKK
RSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYS
IDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNVPARMQY
EKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYY
TVSVDVAVKNPGDVFQDTVTVEDLKQRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKL
```



## 五、發明說明 (19)

ETTSKSDEVEAAFEALIKGVKVAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGA  
 RVVTGKVDMEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTTSFLRDNVVATFQNSTDY  
 VETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAWDRN  
 GQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWRTVYEKTDLPLVRK  
 RTISIWGTTL(序列識別號:1的胺基酸1-460)

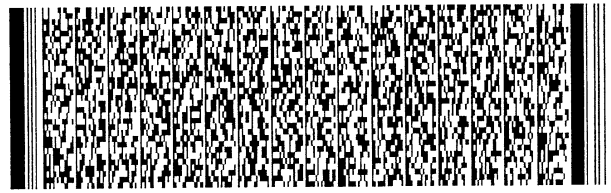
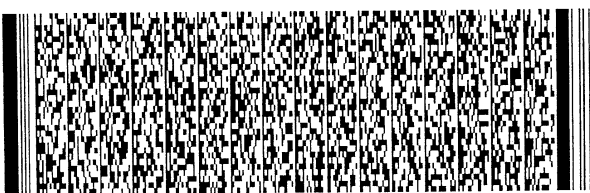
## B. pSA-49表現載體的構築

pSA-49表現載體編碼由肺溶素蛋白質序列識別號:1的  
 1-464胺基酸所構成的多胜肽。PCR以肺炎鏈球菌19A型染  
 色體DNA進行,使用LSYN-1(5'  
 GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3';序列識  
 別號:2)及LSYN-54(5'  
 CTGAGGATCCTTACTATACCTGAGGATAGAGAGTTGTTC 3';序列識  
 別號:25)引子放大1392bp DNA。

該PCR合成的DNA片段以NdeI及BamHI限制酶切割,黏  
 接至pET11b表現載體的NdeI及BamHI限制酶位,形成  
 pSA-49。將此重組DNA轉形至大腸桿菌DE3細胞中。篩選抗  
 安比西林(Ampicillin)的轉形體。由NdeI及BamHI限制酶  
 確認該DNA片段是否插入,並進一步由DNA序列分析確定。

該編碼的464胺基酸多胜肽較野生型肺溶素蛋白質的  
 羧基端缺乏7個胺基酸,其具有下列下列序列:

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKK  
 RSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYS  
 IDLPGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNVPAARMQY  
 EKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYY



## 五、發明說明 (20)

TVSVDAVKNP GDV FQDTVTVEDLKQRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSSKSDEVEAAFEALIKGVKVAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVD MVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTT SFLRDNVVATFQNSTDYVETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLT PKAWDRNGQDLTAHFTT SIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWRTVYEKTDLPLVRKRTISIWGTTLYPQV(序列識別號:1的胺基酸1-464)。

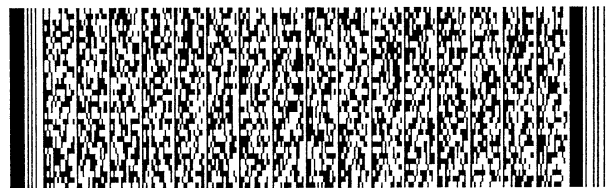
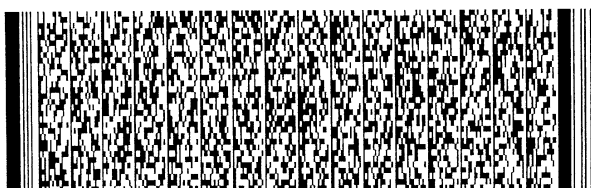
## C. pSA-11 表現載體的構築

pSA-11 表現載體編碼由肺溶素蛋白質序列識別號:1的1-466 胺基酸所構成的多胜肽。PCR以肺炎鏈球菌19A型染色體DNA進行,使用LSYN-1(5' GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; 序列識別號:2)及LSYN-17(5' GACTGGATCCTTACTAATCTTCTACCTGAGGATAG-3'; 序列識別號:6)引子放大1398bp DNA。

該PCR合成的DNA片段以NdeI及BamHI限制酶切割,黏接至pET11b表現載體的NdeI及BamHI限制酶位,形成pSA-11。將此重組DNA轉形至大腸桿菌DE3細胞中。篩選抗安比西林(Ampicillin)的轉形體。由NdeI及BamHI限制酶確認該DNA片段是否插入,並進一步由DNA序列分析確定。

該編碼的466胺基酸多胜肽較野生型肺溶素蛋白質的羧基端缺乏5個胺基酸,其具有下列下列序列:

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKK  
RSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYS  
IDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGVNNV PARMQY



## 五、發明說明 (21)

EKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYY  
 TVSVDAVKNPGDVFQDTVTVEDLKQRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKL  
 ETTSKSDEVEAAFEALIKGVKVAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGA  
 RVVTGKVD MVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTT SFLRDNVVATFQNSTDY  
 VETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAWDRN  
 GQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWRTVYEKTDLPLVRK  
 RTISIWGTTLYPQVED(序列識別號:1的胺基酸1-466)。

## D. pSA-32 表現載體的構築

pSA-32 表現載體編碼由肺溶素蛋白質序列識別號:1的  
 1-469 胺基酸所構成的多胜肽。PCR 以肺炎鏈球菌19A型染  
 色體DNA進行,使用(5'

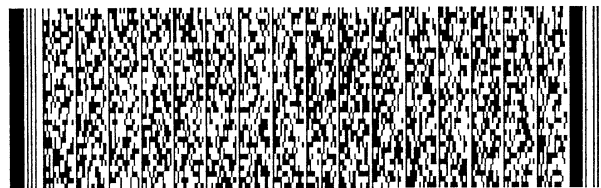
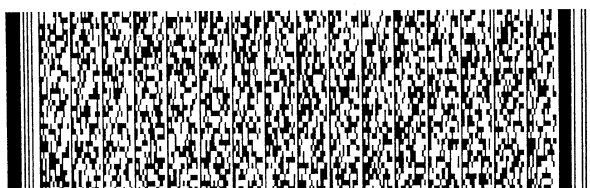
GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; 序列識  
 別號:2)及LSYN 37(5'

GACTGGATCCTTACTATTCTACCTTATCTTCTACCTGAG 3'; 序列識  
 別號:7)引子放大1407bp DNA。

該PCR合成的DNA片段以NdeI及BamHI限制酶切割,黏  
 接至pET11b表現載體的NdeI及BamHI限制酶位,形成  
 pSA-32。將此重組DNA轉形至大腸桿菌DE3細胞中。篩選抗  
 安比西林(Ampicillin)的轉形體。由NdeI及BamHI限制酶  
 確認該DNA片段是否插入,並進一步由DNA序列分析確定。

該編碼的469胺基酸多胜肽較野生型肺溶素蛋白質的  
 羧基端缺乏2個胺基酸,其具有下列下列序列:

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKK  
 RSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYS



## 五、發明說明 (22)

IDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNVPARMQY  
 EKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYY  
 TVSVDAVKNP GDV FQDTVTVEDLKQRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKL  
 ETTSKSDEVEAAFEALIKGVKVAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGA  
 RVVTGKVD MVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTT SFLRDNVVATFQNSTDY  
 VETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLT PKAWDRN  
 GQDLTAHFTT SIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAW EWWRTVYEKTDLPLVRK  
 RTISIWGTTLYPQVEDKVE(序列識別號:1的胺基酸1-469)

## E. pSA-31 表現載體的構築

pSA-31 表現載體編碼由肺溶素蛋白質序列識別號:1的  
 1-470 胺基酸所構成的多胜肽。PCR 以肺炎鏈球菌19A型染  
 色體DNA進行,使用LSYN-1(5'

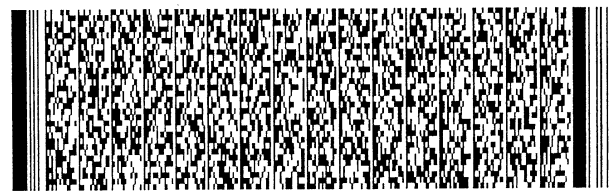
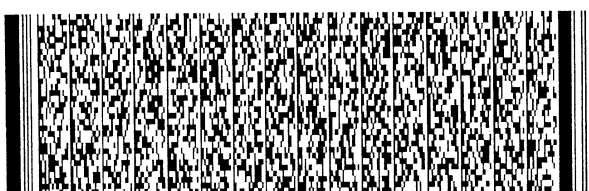
GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; 序列識  
 別號:2)及LSYN-38(5'

GACTGGATCCTTACTAATTTTCTACCTTATCTTCTACCTGAG-3'; 序  
 列識別號:8)引子放大1410bp DNA。

該PCR合成的DNA片段以NdeI及BamHI限制酶切割,黏  
 接至pET11b表現載體的NdeI及BamHI限制酶位,形成  
 pSA-31。將此重組DNA轉形至大腸桿菌DE3細胞中。篩選抗  
 安比西林(Ampicillin)的轉形體。由NdeI及BamHI限制酶  
 確認該DNA片段是否插入,並進一步由DNA序列分析確定。

該編碼的470胺基酸多胜肽較野生型肺溶素蛋白質的  
 羧基端缺乏1個胺基酸,其具有下列下列序列:

MANKAVNDFILAMNYDKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVI ERKK



## 五、發明說明 (23)

RSLSTNTSDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYS  
 IDLPGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNVPARMQY  
 EKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYY  
 TVSVDAVKNPGDVFQDTVTVEDLKQRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKL  
 ETTSKSDEVEAAFEALIKGVKVAPQTEWKQILDNTEVKAVILGGDPSSGA  
 RVVTGKVDMEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTSFRLRDNVVATFQNSTDY  
 VETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAWDRN  
 GQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWRTVYEKTDLPLVRK  
 RTISIWGTTLYPQVEDKVEN(序列識別號:1的胺基酸1-470)。

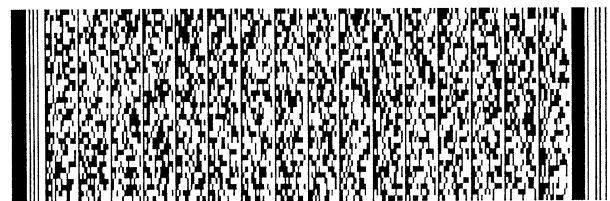
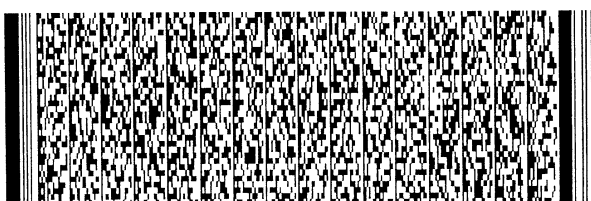
## 實施例2：重組偽肺溶素多胜肽的表現、純化及特性

選殖PCR產物於pET表現載體如實施例1所述。重組DNA轉形至大腸桿菌，該轉形體在含有抗生素的培養盤中篩選。插入的DNA序列以DNA序列分析確認。重組的大腸桿菌生長於37°C過夜，加入異丙基硫-β-D-半乳糖酶(IPTG)作為誘導劑，該細胞繼續生長3小時。該表現的重組多胜肽以SDS-聚丙醯醯胺膠電泳(SDS-PAGE)評估，經考馬斯藍(Coomassie blue)染色。使用親和性層析法純化重組多胜肽，其溶血活性經羊或人紅血球的溶血分析測試(詳如實施例3)。

## 實施例3：偽肺溶素多胜肽的溶血活性確認

該編碼多胜肽的溶血活性如下步驟確認。

- 1) 準備人或羊的紅血球2%懸浮液。將0.2mL新鮮紅血球加入10mL PBS(pH7.2)。旋轉該懸浮液3000rpm、30秒，再懸浮其沉澱顆粒於10mL PBS三次。



## 五、發明說明 (24)

- 2) 加入1  $\mu$ g 多胜肽於0.5mL PBS(pH7.2)，與0.5mL 清洗過的2% RBC 懸浮液混合。
- 3) 37°C 培養該混合物1小時，然後在小管(Eppendorf)微離心機中離心10,000rpm、2分鐘。
- 4) 在吸光度(OD)541nm下測量。溶血活性測量如OD吸收百分比，相較全長的肺溶素多胜肽。

如表1所示，肺溶素截斷物缺乏碳端的7、6、2、或1個胺基酸，而缺乏溶血活性。缺乏碳端5個胺基酸的截斷物宣稱其溶血活性部份喪失。

表1：全長肺溶素及偽肺溶素的溶血活性

構築體	肺溶素部分(a)	%溶血活性(b)
pSA-14	1-471(全長偽肺溶素)	100
pSA-49	1-464(-7 胺基酸偽肺溶素)	0
pSA-48	1-465(-6 胺基酸偽肺溶素)	0.2
pSA-11	1-466(-5 胺基酸偽肺溶素)	17
pSA-34	1-467(-4 胺基酸偽肺溶素)	100
pSA-33	1-468(-3 胺基酸偽肺溶素)	100
pSA-32	1-469(-1 胺基酸偽肺溶素)	0
pSA-31	1-470(-1 胺基酸偽肺溶素)	1.8

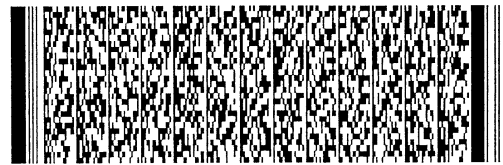
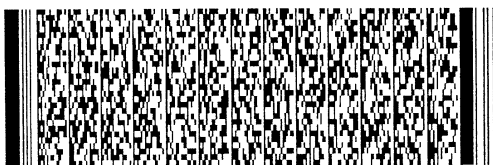
(a)數字表示原始肺溶素多胜肽所有的胺基酸(aa)，但不存在於碳端截斷物中。

(b)碳端截斷物的溶血活性以全長構築體 pSA-14 的百分比表示。

## 實施例4：多醣體-蛋白質共軛物的製造

## A. 多醣體的氧化

肺炎球菌外包膜多醣體，如4，6B，9V，14，18，19F，及23F型，係購自美國型式培養公司(American Type Culture Collection; Manassas, VA)。將10mg多醣體溶



## 五、發明說明 (25)

於1mL蒸餾水中，4℃過夜。隔天加入1mL的0.2M PBS(pH7.2)。多醣體與2mM的過碘酸鈉(MW: 213.9, Sigma)室溫下黑暗中反應10分鐘，而予以氧化。多餘的過碘酸鈉與終濃度為25mM的乙二醇(MW: 62.07)反應，予以清除。該含有多醣體的反應混合物以1000mL的0.1M PBS(pH7.2)大量透析3倍。

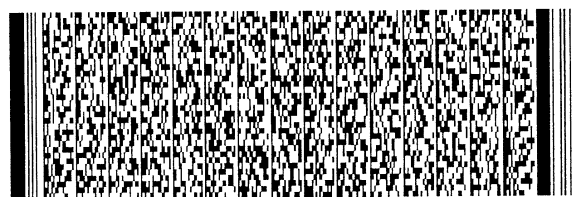
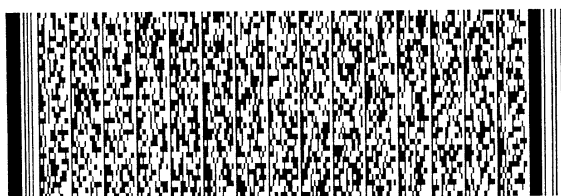
## B. 免疫-親和性柱的製造

## (i) 全長His-標記的肺溶素的純化

使大腸桿菌(pET24b含C-His-標記的肺溶素)生長於含40  $\mu$ L的20%蔗糖及4  $\mu$ L的50mg/mL康黴素之LB培養基，並於持續160rpm晃動下培養於37℃隔夜。將3mL的過夜培養物轉移至含1  $\mu$ L的20%蔗糖及100  $\mu$ L的50mg/mL康黴素之100mL LB培養基，並於持續160rpm晃動下培養於37℃，直到OD600值到達0.4-0.5。在100mL培養物中加入400  $\mu$ L的1M IPTG，使終濃度為4mM IPTG。引起基因表現後的3小時，以4000rpm離心5分鐘收集細胞。根據實驗手冊(ProBond Purification System; Invitrogen; Carlsbad, CA)純化全長的His-標記肺溶素。

## (ii) 抗His-標記肺溶素的多株抗體的製造

注射每隻紐西蘭白兔4劑25  $\mu$ g劑量於4處不同乳化His-標記肺溶素及TiterMax輔藥(400  $\mu$ L的1mg/mL His-標記的肺溶素及400  $\mu$ L TiterMax輔藥)處，一處在每一大腿肌肉(i.m.)上，一處在背部縱肌上脊椎兩側的皮下(s.c.)。14天後，收集該兔耳靜脈5mL血液。



## 五、發明說明 (26)

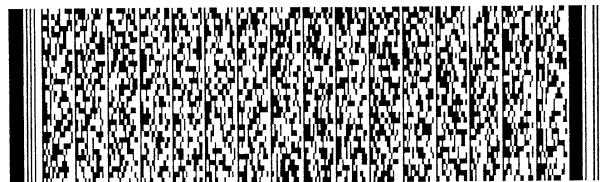
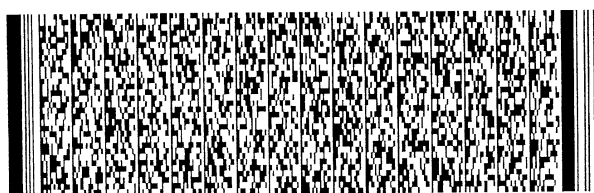
如果血清中抗體力價達到1:3000稀釋程度，該動物會完全放血。如果抗體力價低於1:3000，注射第二劑抗體，一星期後測試該動物(第二劑後7天)。重複此步驟，直到達到適當力價為止。

## (iii) 使用親和性膠蛋白A 洋菜膠純化兔IgG

將受His-標記肺溶素免疫的兔血清加入親和性膠蛋白A柱，以10mM磷酸鈉及150mM NaCl(pH8.2)平衡。以10倍體積清洗後，免疫球蛋白以2-5倍體積的100mM檸檬酸鈉(pH3.0)洗提。收集該IgG，並測量其OD<sub>280</sub>值。再加入3ml純化的IgG於10DG柱中，丟棄第一個流出的3ml洗提液。在該柱中加入3.5ml的偶合緩衝液(150mM NaCl及100mM醋酸鈉pH5.5)或0.1M 3-(N-嗎啉基)丙烷磺酸(MOPS)緩衝液。收集3.5ml IgG洗提液，進一步與親和性膠Hz或親和性膠10偶合。

## (iv) 使用IgG自由偶合於親和性膠10的免疫親和性柱的製造

親和性膠10為衍生的交叉鍵結洋菜膠株支持體的N-羥基琥珀亞醯胺酯，以一級胺與所有配位體偶合。為了與IgG偶合，將親和性膠10移至15ml管中，並以冷DDH<sub>2</sub>O清洗3次及冷0.1M MOPS緩衝液(pH7.0)清洗兩次。將純化的IgG加入含事先清洗的親和性膠10的15ml管中，4°C下端對端旋轉4小時。剩餘的親和性膠10活性酯經100mM Tris HCl pH8.0在4°C下再反應0.5小時，予以終止。將該膠移至1.5 x 9.0cm柱中。收集該柱的洗提液並測量其OD<sub>280</sub>值。以10倍



## 五、發明說明 (27)

體積的0.5M NaCl及25mM Tris HCl(pH8.0)清洗親和性膠10免疫親和性柱。再收集該柱洗提液並測量其OD<sub>280</sub>值。根據所有IgG的濃度與未偶合的IgG的濃度，計算偶合率。

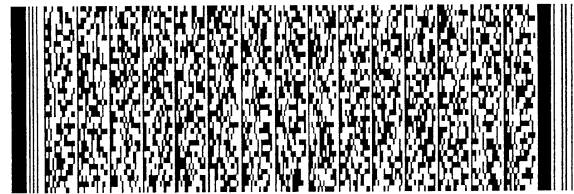
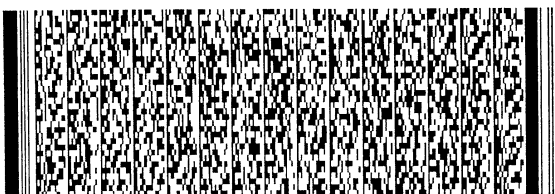
## (v) 免疫親和性柱的檢查

為了測試免疫親和性柱，DEAE-瓊脂糖(Sepharose)層析法中偽肺溶素部分加入25mM Tris HCl(pH8.0)、0.5M NaCl及0.5% Triton X-100中。將樣本加入6.5ml親和性膠10柱(1.5 x 12cm)，以0.5M NaCl及25mM Tris HCl(pH8.0)在流速1mL/2分鐘下平衡。收集經分層的流液。以15mL的0.5M NaCl及25mM Tris HCl(pH8.0)清洗該柱2-3次。再以5mL的4M尿素清洗該柱。該黏接的偽肺溶素蛋白質以7mL的4M尿素洗提2次。第一次7mL的4M尿素分層的蛋白質樣本以9% SDS-PAGE分析，並以考馬斯藍(Coomassie)R-20染色，使可目視。

## C. 重組偽肺溶素蛋白質的製造

經表現載體pSA-49(編碼碳端缺乏7個胺基酸肺溶素的多胜肽)轉形的細菌生長於含30mL LB培養基及100 μg/ml安比西林的50mL管中37°C隔夜。次日早上，將13ml的該過夜培養物與含100 μg/mL安比西林及0.2%蔗糖的400mL LB培養基於37°C搖晃下培養於1L燒瓶。在細胞密度相對為0.5的A600，加入2或4mM IPTG 3小時引起偽肺溶素蛋白質的表現。

在500mL離心管以6,500rpm離心細菌10分鐘。將該細菌沉澱顆粒再懸浮於含100 μg/mL溶菌酶的40mL Tris HCl

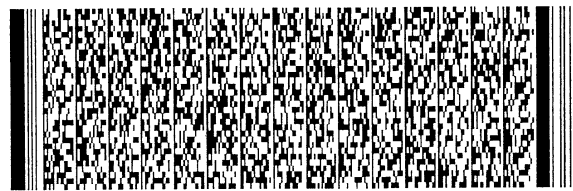
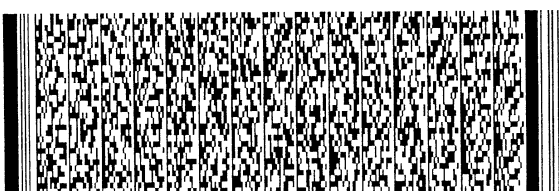


## 五、發明說明 (28)

buffer(pH8.0)中，在冰上培養15分鐘，及超音波3次與10秒突然放在冰上。將該溶菌產物冷凍於 $-80^{\circ}\text{C}$  10分鐘，在 $37^{\circ}\text{C}$ 解凍5分鐘。此細胞溶菌產物經超音波-冷凍-解凍處理2次以上。不能溶解的細胞碎片經6,000rpm離心20分鐘而移除。將上層溶菌產物經過 $0.8\ \mu\text{M}$ 過濾器。流經蛋白質的液體由9% SDS PAGE分析，並以考馬斯藍(Coomassie)R-250染色，使可目視。原始的溶菌產物再進一步由DEAE-瓊脂糖(Sepharose)層析法純化。

將20ml原始細菌溶菌產物加入含有以25mM Tris-HCl(pH8.0)平衡的DEAE-瓊脂糖(Sepharose)之柱(5 x 12cm)。收集第一次流出的液體後，將10ml的25mM Tri-HCl加入該柱中。收集10ml的流出液，與第一次流出液加在一起(分層1)。然後，加入35mL的25mM Tris-HCl(pH8.0)，收集流出液(分層2)。加入另一35mL的25mM Tris-HCl(pH8.0)，收集流出液(分層3)。以4M NaCl及25mM Tris HCl洗提該黏著的細菌蛋白質(分層4)。以280nm的OD測量每一分層的蛋白質濃度。蛋白質樣本由9% SDS-聚丙稀醯胺膠電泳(SDS PAGE)分析，並以考馬斯藍(Coomassie)R-20染色，使可目視。含有偽肺溶素的流出液(分層1及2)再進一步由免疫親和性層析法純化。

DEAE-瓊脂糖(Sepharose)層析法後，將25mM Tris HCl(pH8.0)、0.5M NaCl及0.5% Triton X-100加入含有偽肺溶素的分層。該樣本以流速1mL/2分鐘加入與兔抗肺溶素IgG偶合的6.5mL親和性膠10柱(1.5 x 12cm)，其以0.5M



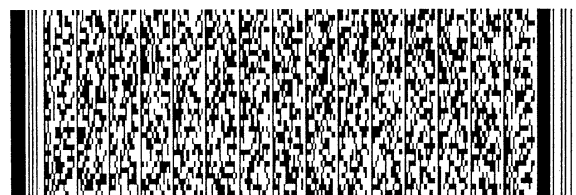
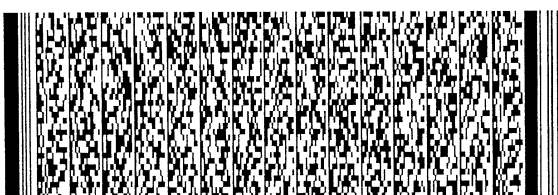
## 五、發明說明 (29)

NaCl 及 25mM Tris HCl (pH8.0) 平衡。收集流出液。以 15mL 的 0.5M NaCl 及 25mM Tris HCl (pH8.0) 清洗該柱 3 次。再以 5mL 的 4M 尿素清洗該柱。以 7mL 的 4M 尿素洗提該黏著的偽肺溶素蛋白質 2 次。以 SDS-PAGE 分析未黏著於及黏著於分層的蛋白質樣本，並以考馬斯藍 (Coomassie) R-20 染色，使可目視。

免疫親和性層析法後，由 4M 尿素洗提的含偽肺溶素分層再以 10DG 層析法純化，去除尿素。在 10DG 柱 (1.5 x 12cm) 中加入 3.0ml 樣本，該 10DG 柱經 1 x PBS 緩衝液平衡。丟棄第一次流出液 3ml。該柱中加入 3.9mL 的 1 x PBS 緩衝液。測量從柱中收集的該 3.9ml 分層的 OD<sub>280</sub> 值，並收集該蛋白質分層。蛋白質的純度以 9% SDS-聚丙稀醯胺膠電泳分析。

## D. 多醣體-蛋白質共軛物的製造

使用還原胺化作用分析，使 2mg 的肺炎鏈球菌多醣體 18C 與偽肺溶素蛋白質 (詳述於上述 C.) 直接共軛。在該氧化的多醣體反應混合物中加入溶於 0.1M PBS 的 10mg 偽肺溶素，室溫下輕微攪拌培養 30 分鐘。加入氫化氰硼鈉使終濃度為 20mM (如 750  $\mu$ L 的 100mM 氫化氰硼鈉加入 3ml 的氧化多醣體及偽肺溶素混合物中) 將該混合物於室溫下輕微攪拌培養 5 天。將該共軛物於 9,000rpm 沉澱 10 分鐘，然後溶於 1-2mL 0.1M PBS, pH7.2。將該混合物層析於經 1 x PBS, pH7.2 平衡的瓊脂糖 (Sephacrose) CL-4B 柱 (1.5 x 100cm) 中。將含有蛋白質及多醣體的分層倒在一起，以 Amicon

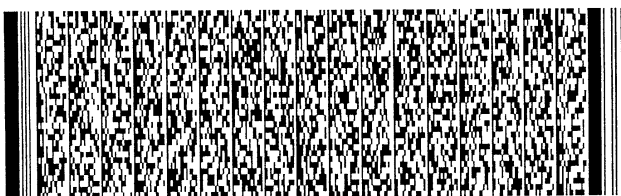


## 五、發明說明 (30)

Centricon-30 濃縮(分離點為分子量30,000)，然後分析蛋白質及多醣體含量。

實施例5：小鼠體中對多醣體-蛋白質共軛物的抗體反應

如實施例4所製造的肺炎鏈球菌14, 18C, 19F, 23F, 4, 6B及9V型多醣體-偽肺溶素蛋白質共軛物，測試其引起小鼠體內抗多醣體及肺溶素的抗體之能力。將每劑0.3、1、3  $\mu$ g的多醣體與氫氧化鋁輔藥(每劑0.1mg)的混合物之該共軛物，腹膜內注射於雌NIH瑞士小鼠群。某些實驗中，第二群小鼠接受1  $\mu$ g多醣體，及/或第三群小鼠接受1  $\mu$ g偽肺溶素。小鼠兩次注射間以2星期為間隔。最後依次注射後的7天，測量抗多醣體的抗體血清濃度及抗肺溶素的抗體血清濃度。表2整理投予的特定共軛物及第1-14圖中所示實驗所測量的免疫反應。



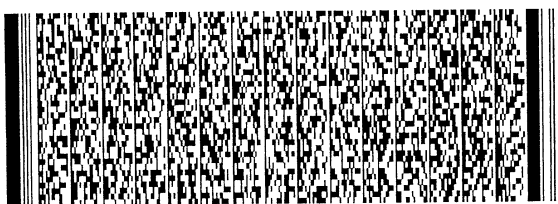
## 五、發明說明 (31)

表 2：小鼠免疫試驗中投予的共軛物與偵測的抗體之總表

圖示編號	共軛物中肺炎鏈球菌多醣體血清型成分	測量的抗體反應
1	14	抗肺溶素 IgG 抗體
2	14	抗 14 型多醣體 IgG 抗體
3	18C	抗肺溶素 IgG 抗體
4	18C	抗 18C 型多醣體 IgG 抗體
5	19F	抗肺溶素 IgG 抗體
6	19F	抗 19F 型多醣體 IgG 抗體
7	23F	抗肺溶素 IgG 抗體
8	23F	抗 23F 型多醣體 IgG 抗體
9	4	抗肺溶素 IgG 抗體
10	4	抗 4 型多醣體 IgG 抗體
11	6B	抗肺溶素 IgG 抗體
12	6B	抗 6B 型多醣體 IgG 抗體
13	9V	抗肺溶素 IgG 抗體
14	9V	抗 9V 型多醣體 IgG 抗體

以下縮寫為使用於第1-14圖中：磷酸緩衝液生理食鹽水(PBS)、共軛物(C)、氫氧化鋁輔藥(A)、及偽肺溶素(PPN)。

受該多醣體-偽肺溶素共軛物免疫的小鼠顯示出抗體的引發，該抗體經ELISA與His-標記野生型肺溶素反應。對於所有接受該共軛物及輔藥的小鼠群，其抗肺溶素與抗多醣體的抗體顯著高於僅加入PBS及輔藥的對照組 ( $p < 0.001$ , t-test)。與僅投予PBS的小鼠群相比，投予該共軛物的小鼠血清中顯示無法預期的高滴定度的抗肺溶素抗體及抗多醣體抗體，其血清稀釋因子各為76800及9600。小鼠中觀察到最高的抗肺溶素抗體及抗多醣體抗體



## 五、發明說明 (32)

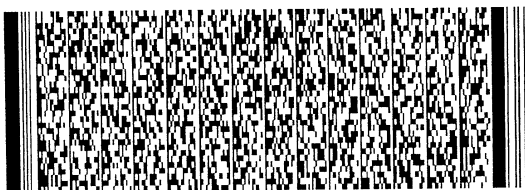
濃度係接受 $3.0 \mu\text{g}$ 的多醣體-偽肺溶素共軛物(第1-14圖)。相較於接受偽肺溶素與輔藥(第3圖)、或僅接受偽肺溶素而無輔藥者(第6圖),接受多醣體-偽肺溶素的共軛物與輔藥的小鼠群有較高的抗肺溶素抗體濃度。

表3及表4顯示接受 $3.0 \mu\text{g}$ 共軛物的小鼠具有最高百分比的反應者。此等結果指出肺炎球菌疫苗的有效性可經由多醣體與偽肺溶素蛋白質的共軛物予以改善。除該抗體反應外,投予該共軛物疫苗的小鼠(實施例8)亦檢測其交叉保護性免疫及細菌清除率。

表3:具有抗18C型多醣體陽性反應的小鼠比例

小鼠群	陽性反應者比例
氫氧化鋁輔藥	0%
$1 \mu\text{g}$ 偽肺溶素(PPN)	0%
$1 \mu\text{g}$ 18C 型多醣體(PS) + 輔藥	0%
$0.3 \mu\text{g}$ 18C (PS)-PPN 共軛物 + 輔藥	60%
$1.0 \mu\text{g}$ 18C (PS)-PPN 共軛物 + 輔藥	75%
$3.0 \mu\text{g}$ 18C (PS)-PPN 共軛物 + 輔藥	100%
$1.0 \mu\text{g}$ 18C (PS)-PPN 共軛物, 但無輔藥	20%

注意:陽性反應者係自所有小鼠的1:100稀釋血清樣本所確認當其A405nm光學讀計高於0.05則顯示為陽性反應。



## 五、發明說明 (33)

表4：具有抗14型多醣體陽性反應的小鼠比例

小鼠群	陽性反應者比例
氫氧化鋁輔藥	0%
1 $\mu$ g 偽肺溶素(PPN)	0%
1 $\mu$ g 14型多醣體(PS) + 輔藥	0%
0.3 $\mu$ g 14 (PS)-PPN 共軛物 + 輔藥	100%
1.0 $\mu$ g 14 (PS)-PPN 共軛物 + 輔藥	100%
3.0 $\mu$ g 14 (PS)-PPN 共軛物 + 輔藥	100%
1.0 $\mu$ g 14 (PS)-PPN 共軛物，但無輔藥	20%

注意：陽性反應者係自所有小鼠的1:300稀釋血清樣本所確認當其A405nm光學讀計高於0.12則顯示為陽性反應。

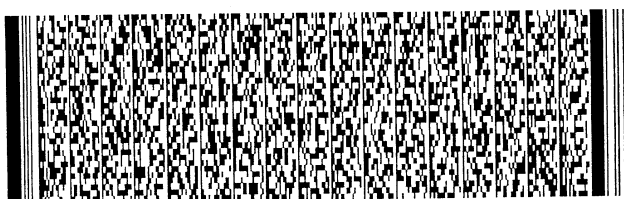
第15圖顯示小鼠在第3次注射14型多醣體-偽肺溶素共軛物後7天，對14型多醣體的抗體反應。第15圖中，G1、G2、及G3各為每隻注射0.3  $\mu$ g、1.0  $\mu$ g、及3.0  $\mu$ g該共軛物疫苗的小鼠群。G4為僅注射1.0  $\mu$ g的14型多醣體的小鼠群。G5及G6各為僅注射1.0及3.0  $\mu$ g偽肺溶素的小鼠群。G7為注射1.0  $\mu$ g的14型多醣體-偽肺溶素共軛物疫苗而無輔藥的小鼠群。G4、G5、G6群中觀察到有幾乎沒有對抗多醣體的抗體反應。

實施例6：偽肺溶素、肺炎球菌自溶素及肺炎球菌表面蛋白質DNA疫苗的表現載體之構築

## A. DNA疫苗構築的pVAX1載體

pVAX1載體(Invitrogen)為特定設計為DNA疫苗發展的載體。其構成符合美國食品藥物局文件'考量質體DNA疫苗之重點，作為預防傳染疾病指示'，出版於1996年12月22日。

## B. 偽肺溶素的選殖及表現



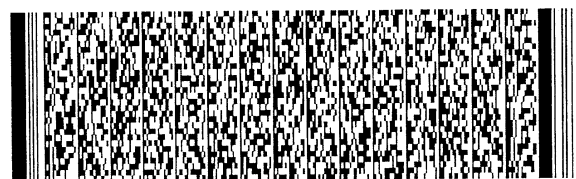
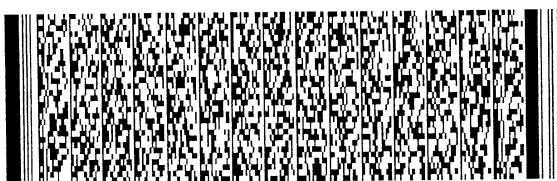
## 五、發明說明 (34)

以含有肺炎球菌19A型染色體DNA的引子及鑄模的即可使用PCR珠(Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ)進行PCR反應。PCR以第一週期為94°C、4分鐘；隨後30週期為94°C、1分鐘；55°C、1分鐘；72°C、1.5分鐘；最後一週期為72°C、10分鐘。

該放大的PCR產物以限制酶切割，黏接至pVAX1載體的該限制酶位，形成pSA-8，pSA-45，pSA-12，pSA-42，及pSA-41。將該重組DNA轉形導入大腸桿菌DH5 $\alpha$ 細胞，再以限制酶檢查。該插入的基因以DNA序列分析予以分析。生體外的轉錄及轉譯根據TnT套組的操作手冊(Promega, Madison, WI)進行以確認該插入基因的表現。

pSA-8表現載體編碼肺溶素蛋白質序列編號序列識別號:1的1-460胺基酸之多胜肽。上述之插入部分係使用LSYN-15引子(5' GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'；序列識別號:4)及LSYN-4引子(5'-GACTGGATCCTTACTAGAGAGTTGTTCCCAAATAG-3'；序列識別號:5)，放大1380bp DNA。此1380bp的PCR產物隨後經NheI及BamHI切割，黏接至pVAX1載體的NheI及BamHI位，形成pSA-8。

pSA-45表現載體編碼肺溶素蛋白質序列識別號:1的1-464胺基酸之多胜肽。上述之插入部分係使用LSYN-15(5' GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'；序列識



## 五、發明說明 (35)

別號:4)及

LSYN-105(GACTGGATCCCTATACCTGAGGATAGAGAGTTG ; 序列識別號:27), 放大1392bp DNA, 隨後經NheI及BamHI切割, 黏接至pVAX1載體的NheI及BamHI位, 形成pSA-45。

pSA-12表現載體編碼肺溶素蛋白質序列編號序列識別號:1的1-466胺基酸之多胜肽。上述之插入部分係使用

LSYN-15引子(5'

GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列識

別號:4)及LSYN-17引子

(5'-GACTGGATCCTTACTAATCTTCTACCTGAGGATAG-3' ; 序列識別號:6), 放大1398bp DNA。此1398bp的PCR產物隨後經NheI及BamHI切割, 黏接至pVAX1載體的NheI及BamHI位, 形成pSA-12。

pSA-42表現載體編碼肺溶素蛋白質序列編號序列識別號:1的1-469胺基酸之多胜肽。上述之插入部分係使用

LSYN-15引子(5'

GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列識

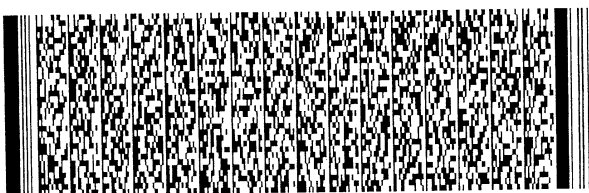
別號:4)及LSYN-37引子(5'

GACTGGATCCTTACTATTCTACCTTATCTTCTACCTGAG-3' ; 序列識

別號:7), 放大1407bp DNA。此1407bp的PCR產物隨後經

NheI及BamHI切割, 黏接至pVAX1載體的NheI及BamHI位, 形成pSA-42。

pSA-41表現載體編碼肺溶素蛋白質序列編號序列識別號:1的1-470胺基酸之多胜肽。上述之插入部分係使用



## 五、發明說明 (36)

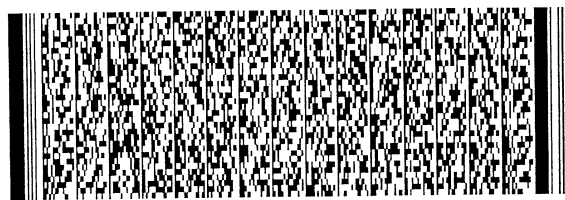
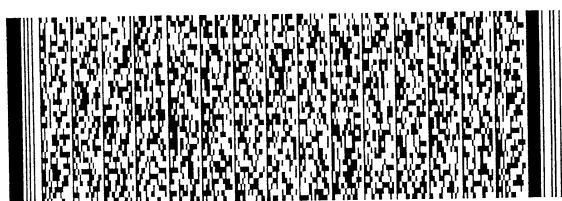
LSYN-15 引子(5'

GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列識別號:4) 及LSYN-38 引子(5'

GACTGGATCCTTACTAATTTTCTACCTTATCTTCTACCTGAG-3' ; 序列識別號:8) , 放大1410bp DNA。此1410bp的PCR產物隨後經NheI及BamHI切割, 黏接至pVAX1載體的NheI及BamHI位, 形成pSA-41。

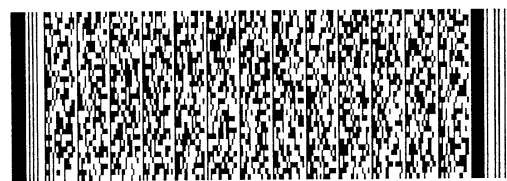
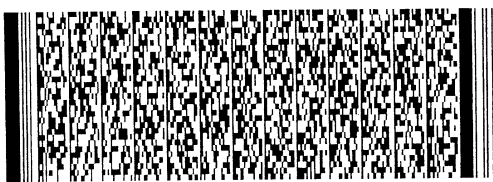
含有特定序列或型式的未甲基化胞嘧啶-鳥嘌呤("CpG")雙核苷酸之核酸可能為生體外數種免疫細胞的刺激物。含CpG型式的合成寡核苷酸可直接活化天賦免疫系統, 該天賦免疫系統係由刺激B細胞以增殖及分泌免疫球蛋白、IL-6及IL-10、NK細胞而產生IFN- $\gamma$ 、及單核球及樹突細胞而產生IL-6, IL-12, IL-18、TNF- $\alpha$ 及IFN- $\alpha$ 。由未甲基化CpG雙核苷酸構成的DNA型式, 由兩個5' 嘧啶及兩個3' 嘧啶側面繞過, 刺激B細胞產生IL-6及IL-12, 以及刺激CD4+T細胞產生IL-6及IFN- $\gamma$ 。

肺溶素的結構-功能分析確認, 該多胜肽碳端的一區域(位於胺基酸427-437)含有半胱胺酸, 為細胞毒性的關鍵區。此半胱胺酸型式在其他硫活化的細胞溶素族中高度保留。在此區中的數種單一胺基酸取代物顯著降低肺溶素的細胞毒性。以下核酸構築體經由插入GAGCGTT於肺溶素核苷酸1272-1274間(經由導向突變位置), 使CpG型式取代半胱胺酸型式。含有GAGCGTT免疫刺激序列的突變核酸如下:



## 五、發明說明 (37)

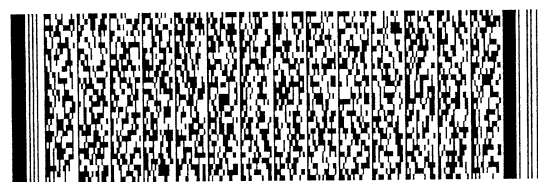
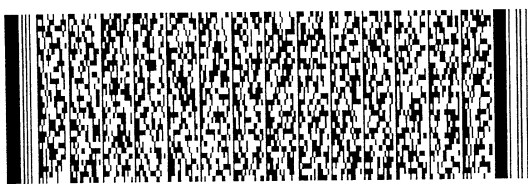
ATGGCAAATAAAGCAGTAAATGACTTTATACTAGCTATGAATTACGATAA  
AAAGAAACTCTTGACCCATCAGGGAGAAAGTATTGAAAATCGTTTCATCA  
AAGAGGGTAATCAGCTACCCGATGAGTTTGTGTTATCGAAAGAAAGAAG  
CGGAGCTTGTCGACAAATACAAGTGATATTTCTGTAACAGCTACCAACGA  
CAGTCGCCTCTATCCTGGAGCACTTCTCGTAGTGGATGAGACCTTGTTAG  
AGAATAATCCCCTCTTCTTGCGGTCGATCGTGCTCCGATGACTTATAGT  
ATTGATTTGCCTGGTTTGGCAAGTAGCGATAGCTTTCTCCAAGTGGAAGA  
CCCCAGCAATTCAAGTGTTTCGCGGAGCGGTAAACGATTTGTTGGCTAAGT  
GGCATCAAGATTATGGTCAGGTCAATAATGTCCCAGCTAGAATGCAGTAT  
GAAAAAATCACGGCTCACAGCATGGAACAACCTCAAGGTCAAGTTTGGTTC  
TGACTTTGAAAAGACAGGGAATTCTCTTGATATTGATTTTAACTCTGTCC  
ATTCAGGCGAAAAGCAGATTCAGATTGTTAATTTTAAGCAGATTTATTAT  
ACAGTCAGCGTAGATGCTGTTAAAAATCCAGGAGATGTGTTTCAAGATAC  
TGTAACGGTAGAGGATTTAAAACAGAGAGGAATTTCTGCAGAGCGTCCTT  
TGGTCTATATTTTCGAGTGTTGCTTATGGGCGCCAAGTCTATCTCAAGTTG  
GAAACCACGAGTAAGAGTGATGAAGTAGAGGCTGCTTTTGAAGCTTTGAT  
AAAAGGAGTCAAGGTAGCTCCTCAGACAGAGTGGAAACAGATTTTGGACA  
ATACAGAAGTGAAGGCGGTTATTTTAGGGGGCGACCCAAGTTCGGGTGCC  
CGAGTTGTAACAGGCAAGGTGGATATGGTAGAGGACTTGATTCAAGAAGG  
CAGTCGCTTTACAGCAGATCATCCAGGCTTGCCGATTTCTTATACAACCTT  
CTTTTTTACGTGACAATGTAGTTGCGACCTTTCAAATAGTACAGACTAT  
GTTGAGACTAAGGTTACAGCTTACAGAAACGGAGATTTACTGCTGGATCA  
TAGTGGTGCCTATGTTGCCCAATATTATATTACTTGGAATGAATTATCCT  
ATGATCATCAAGGTAAGGAAGTCTTGACTCCTAAGGCTTGGGACAGAAAT



## 五、發明說明 (38)

GGGCAGGATTTAACGGCTCACTTTACCACTAGTATTCCTTTAAAAGGGAA  
 TGTTTCGTAATCTCTCTGTCAAATTAGAGAGCGTTCCGGGCTTGCCTGGG  
 AATGGTGGCGTACGGTTTATGAAAAAACCGATTTGCCACTAGTGCGTAAG  
 CGGACGATTTCTATTTGGGGAACAACCTCTCTATCCTCAGGTAGAAGATAA  
 GGTAGAAAATGAC(序列識別號:9)。

另一實施例中，該免疫刺激DNA序列GAGCGTT插入於碳  
 端有33個核苷酸缺失的肺溶素的核苷酸位置1272-1274(經  
 由導向突變位置)。該位肺溶素DNA與該免疫刺激序列如下  
 ATGGCAAATAAAGCAGTAAATGACTTTATACTAGCTATGAATTACGATAA  
 AAAGAACTCTTGACCCATCAGGGAGAAAGTATTGAAAATCGTTTCATCA  
 AAGAGGGTAATCAGCTACCCGATGAGTTTGTGTTATCGAAAGAAAGAAG  
 CGGAGCTTGTGACAAATACAAGTGATATTTCTGTAACAGCTACCAACGA  
 CAGTCGCCTCTATCCTGGAGCACTTCTCGTAGTGGATGAGACCTTGTTAG  
 AGAATAATCCCACTCTTCTTGCGGTCGATCGTGCTCCGATGACTTATAGT  
 ATTGATTTGCCTGGTTTGGCAAGTAGCGATAGCTTTCTCCAAGTGGAAGA  
 CCCAGCAATTCAAGTGTTGCGGAGCGGTAAACGATTTGTTGGCTAAGT  
 GGCATCAAGATTATGGTCAGGTCAATAATGTCCCAGCTAGAATGCAGTAT  
 GAAAAATCACGGCTCACAGCATGGAACAACCTCAAGGTCAAGTTTGGTTC  
 TGACTTTGAAAAGACAGGGAATTCTCTTGATATTGATTTTAACTCTGTCC  
 ATTCAGGCGAAAAGCAGATTCAGATTGTTAATTTAAGCAGATTTATTAT  
 ACAGTCAGCGTAGATGCTGTTAAAAATCCAGGAGATGTGTTTCAAGATAC  
 TGTAACGGTAGAGGATTTAAAACAGAGAGGAATTTCTGCAGAGCGTCCTT  
 TGGTCTATATTTGAGTGTTGCTTATGGGCGCCAAGTCTATCTCAAGTTG  
 GAAACCACGAGTAAGAGTGATGAAGTAGAGGCTGCTTTTGAAGCTTTGAT



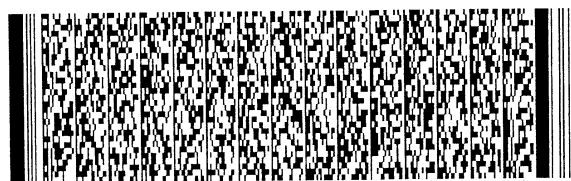
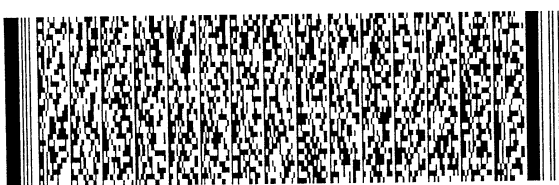
## 五、發明說明 (39)

AAAAGGAGTCAAGGTAGCTCCTCAGACAGAGTGGAAACAGATTTTGGACA  
 ATACAGAAGTGAAGGCGGTTATTTTAGGGGGCGACCCAAGTTCGGGTGCC  
 CGAGTTGTAACAGGCAAGGTGGATATGGTAGAGGACTTGATTCAAGAAGG  
 CAGTCGCTTTACAGCAGATCATCCAGGCTTGCCGATTTCTATACAACTT  
 CTTTTTTACGTGACAATGTAGTTGCGACCTTTCAAATAGTACAGACTAT  
 GTTGAGACTAAGGTTACAGCTTACAGAAACGGAGATTTACTGCTGGATCA  
 TAGTGGTGCCTATGTTGCCCAATATTATATTACTTGGAATGAATTATCCT  
 ATGATCATCAAGGTAAGGAAGTCTTGACTCCTAAGGCTTGGGACAGAAAT  
 GGGCAGGATTTAACGGCTCACTTTACCACTAGTATTCCTTTAAAAGGGAA  
 TGTTTCGTAATCTCTCTGTCAAATTAGAGAGCGTTCGGGGCTTGCCTGGG  
 AATGGTGGCGTACGGTTTATGAAAAAACCGATTTGCCACTAGTGCGTAAG  
 CGGACGATTTCTATTTGGGGAACAACCTCTC(序列識別號:10)。

## D. 肺炎球菌自溶素基因的選殖及表現

pSA-59 表現載體編碼316個胺基酸自溶素(Aly)多胜肽。19A型Aly基因係由PCR反應放大，使用含有肺炎球菌19A染色體DNA的即可使用PCR珠。PCR以第一週期為94℃、4分鐘；隨後30週期為94℃、1分鐘；50℃、1分鐘；72℃、1分鐘15秒；最後一週期為72℃、10分鐘。該插入部分使用LSYN 74引子(5' GACTAAGCTTGCCACCATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAG-3'；序列識別號:11)及LSYN-89引子(5' CTGACTCGAGTTATTTTACTGTAATCAAGCCATC-3'；序列識別號:12)，放大948bp DNA。

此PCR產物隨後經HindIII及XhoI切割，黏接至pVAX1

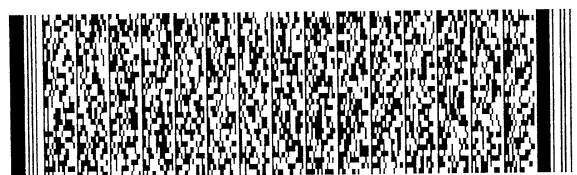
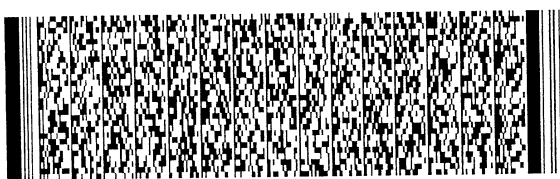


## 五、發明說明 (40)

載體的HindIII及XhoI位，形成pSA-59(Aly)。將該重組DNA轉形導入大腸桿菌DH5 $\alpha$ 細胞，再以HindIII及XhoI限制酶檢查。該Aly插入基因以DNA序列分析予以分析。生體外的轉錄及轉譯根據TnT套組的操作手冊(Promega, Madison, WI)進行以確認pSA-59的表現。

pSA-59 Aly插入部分的核酸序列如下：

```
ATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTGCCTCAAGTTGGCGT
GCAACCATATAGGCAAGTACACGCACACTCAACTGGGAATCCGCATTCAA
CCGTACAGAATGAAGCGGATTATCATTGGCGGAAAGACCCAGAATTAGGT
TTTTTCTCGCACATTGTTGGGAACGGATGCATCATGCAGGTAGGACCTGT
TAATAATGGTGCCTGGGACGTTGGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTATG
CAGCGGTTGAACTGATTGAAAGCCATTCAACTAAAGAAGAGTTCATGACG
GACTACCGCCTTTATATCGAACTCTTACGCAATCTAGCAGATGAAGCAGG
TTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAGTTTAGCTGGAATTTAAAACGCACG
AGTATTGCACGAATAACCAACCAACAACCACTCAGACCATGTGGATCCA
TACCCTTACTTGGCAAAATGGGGCATTAGCCGTGAGCAGTTTAAGCATGA
TATTGAGAACGGCTTGACGATTGAAACAGGCTGGCAGAAGAATGACACTG
GCTACTGGTACGTACATTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAG
AAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCTTGC
AGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAATTGGTACTACTTTGACCAAT
CAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGAGAAGTGGTACTAT
TTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACAC
TTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCAATGGTATCAAATGCCTTTA
TCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACA
```



## 五、發明說明 (41)

CTGGCAGACAAGCCAGAATTCACAGTAGAGCCAGATGGCTTGATTACAGT  
AAAA(序列識別號:13)。

編碼pSA-59 Aly插入部分的胺基酸序列如下：

MEINVSKLRTDLPQVGVPYRQVHAHSTGNPHSTVQNEADYHWRKDPELG  
FFSHIVGNGCIMQVGPVNNGAWDVGGGWNAETYAAVELIESHSTKEEFMT  
DYRLYIELLRNLADEAGLPKTLDTGSLAGIKTHEYCTNNQPNNHSDHVP  
YPYLAKWGISREQFKHDIENGLTIETGWQKNDTGYWYVHSDGSYPKDKFE  
KINGTWYYFDSSGYMLADRWRKHTDGNWYYFDQSGEMATGWKKIAEKWYY  
FNEEGAMKTGWVKYKDTWYYLDAKEGAMVSNAFIQSADGTGWYYLKPDTG  
LADKPEFTVEPDGLITVK(序列識別號:14)。

## E. 氣端肺炎球菌表面蛋白A(PspA)基因的選殖及表現

pSA-60表現載體編碼459個胺基酸PspA多胜肽。19A型  
PspA基因係由PCR反應放大，使用含有肺炎球菌19A染色體  
DNA的即可使用PCR珠。PCR以第一週期為94℃、4分鐘；隨  
後30週期為94℃、1分鐘；50℃、1分鐘；72℃、1分鐘15  
秒；最後一週期為72℃、10分鐘。該插入部分使用

LSYN-90(5'-GACTAAGCTTGCCACCATGGAA

GAAGCTCCCGTAGCTAGTCAG-3'；序列識別號:15)與LSYN-78

引子(5' GACTCTCGAGCTATCCATCAGGGCCTAACTCATTAAG-3'；

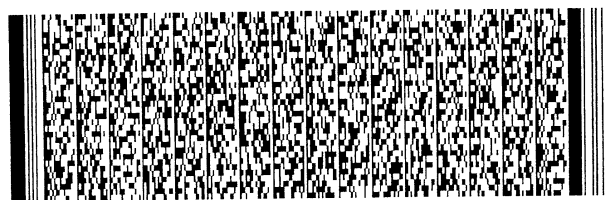
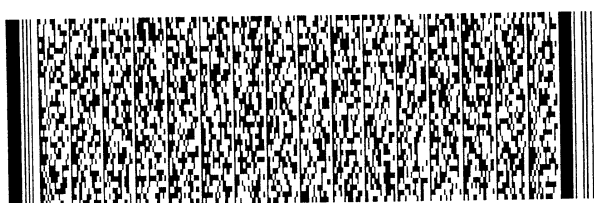
序列識別號:16)，放大1377bp DNA。此PCR產物隨後經

HindIII及XhoI切割，黏接至pVAX1載體的HindIII及XhoI

位，形成pSA-60(PspA)。將該重組DNA轉形導入大腸桿菌

DH5  $\alpha$ 細胞，再以HindIII及XhoI限制酶檢查。該PspA插入

基因以DNA序列分析予以分析。生體外的轉錄及轉譯根據



## 五、發明說明 (42)

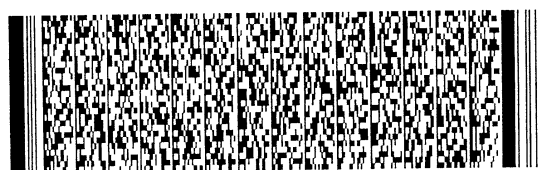
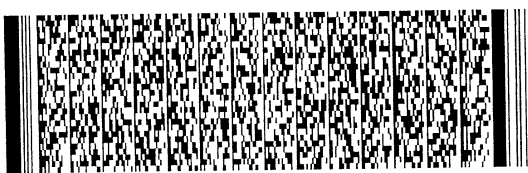
TnT 套組的操作手冊(Promega, Madison, WI) 進行以確認 pSA-60 的表現。

pSA-60 PspA 插入部分的核酸序列如下：

```

ATGGAAGAAGCTCCCGTAGCTAGTCAGTCTAAAGCTGAGAAAGACTATGA
TGCAGCAGTGAAAAAATCTGAAGCTGCTAAGAAGGCTTACGAAGAAGCTA
AAAAGAAAGCAGAAGACGCTCAGAAAAAATATGATGAGGATCAGAAGAAA
ACTGAGGCAAAGCGGATAAGGAAGCAAAGCATCTGCGGAAATAGATAA
AGCCACGTTTGCTGTACAAAGTGCGTATGTAAAATTTTTAAATGTCCAAT
CTAATCGTCAAATTTTCGGAGAATGAACGAAAAAACAATTAGCAGAAATA
GATAAAGAGATAGAGAATGCTAAACAAAATTTACAGAATAAACAGGAAGA
ATTTAATAAGGTTAGAGCAGAAGTAATTCCTGAAGCAAAGGGGTTAGCTG
TTACTAAACAAAAAGCGGAAGAAGCTAAAAAAGAAGCAGAAGTAGCTAAG
AGAAAATATGATTATGCAACTCTAAAGGTAGCACTAGCGAAGAAAGAAGT
AGAGGCTAAGGAACTTGAAATTGAAAACTTCAATATGAAATTTCTACTT
TGGAACAAGAAGTTGCTATTGCTCAACATCAAGTAGATAATTTGAAAAAA
CTTCTTGCTGGTGCGGATCCTGATGATGGCACAAAAGTTATAGAAGCTAA
ATTAAACAAAGGAGAAGCTGAGCTAAACGCTAAACAAGCTGAGTTAGCAA
AAAAACAAACAGAACTTGAAAAACTTCTTGACAGCCTTGATCCTGAAGGT
AAGACTCAGGATGAATTAGATAAAGAAGCTGCTGAAGCTGAGTTGGATAA
AAAAGCTGATGAACTTCAAATAAAGTTGCTGATTTAGAAAAAGGAATTG
CTCCTTATCAAATCAAAGTCGCTGAATTAATAAAGAAATTGCTAGACTT
CAAAGCGATTTAAAAGATGCTGAAGAAAATAATGTAGAAGACTATATTAA
AGAAGGTTTLAGAGCAAGCTATCGCTGATAAAAAAGCTGAATTAGCTACAA
CTCAACAAAACATAGATAAAACTCAAAAAGATTTAGAGGATGCTGAATTA

```



## 五、發明說明 (43)

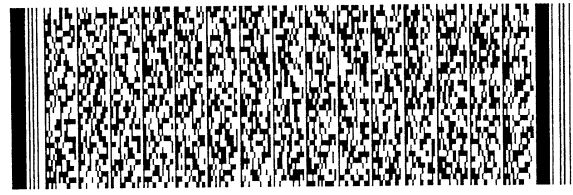
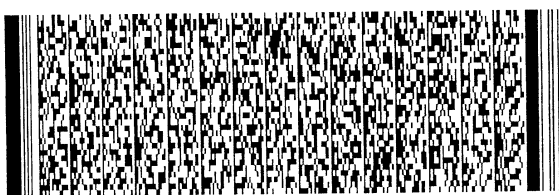
GAACTTGAAAAAGTATTAGCTACATTAGACCCTGAAGGTAAAACTCAAGA  
 TGAATTAGATAAAGAAGCTGCAGAAGATGCTAATATTGAAGCTCTTCAAA  
 ACAAAGTTGCTGATCTAGAAAACAAGGTTGCTGAATTAGATAAAGAAGTT  
 ACTAGACTTCAAAGCGATTTAAAAGATGCTGAAGAAAACAATGTAGAAGA  
 CTACGTTAAAGAAGGCTTAGATAAAGCTCTTACTGATAAAAAAGTTGAAT  
 TAAATAATACTCAAAAAGCATTAGATACTGCTCAAAAAGCATTAGATACT  
 GCTCTTAATGAGTTAGGCCCTGATGGA(序列識別號:17)。

編碼pSA-60 PspA插入部分的胺基酸序列如下：

MEEAPVASQSKAEKDYDAAVKKSEAAKKAYEEAKKKAEDAQKKYDEDQKK  
 TEAKADKEAKASAEIDKATFAVQSAYVKFLNVQSNRQISENERKKQLAEI  
 DKEIENAKQNLQNKQEEFNKVRAEVIPEAKGLAVTKQKAEEAKKEAEVAK  
 RKYDYATLKVALAKKEVEAKELEIEKLQYEISTLEQEVAlAQHQVDNLKK  
 LLAGADPDDGTKVIEAKLNKGEAELNAKQAELAKKQTELEKLLDSLDP  
 EGKTQDEL DKEAAEAELDKKADELQNKVADLEKGIAPYQIKVAELNKEIARL  
 QSDLKDAEENVEDYIKEGLEQAIADKKAELATTQQNIDKTQKDLEDAEL  
 ELEKVLATLDPEGKTQDEL DKEAAEDANIEALQNKVADLENKVAELDKEV  
 TRLQSDLKDAEENVEDYVKEGLDKALTDKKVELNNTQKALDTAQAALDT  
 ALNELGPDG(序列識別號:18)。

## 實施例7：DNA疫苗的免疫原性

質體載體pSA-7編碼全長的肺溶素蛋白質。19A型Ply  
 基因係由PCR反應放大，使用含有肺炎球菌19A染色體  
 DNA的即可使用PCR珠。PCR以第一週期為94℃、4分鐘；隨  
 後30週期為94℃、1分鐘；55℃、1分鐘；72℃、1.5分  
 鐘；最後一週期為72℃、10分鐘。該插入部分使用

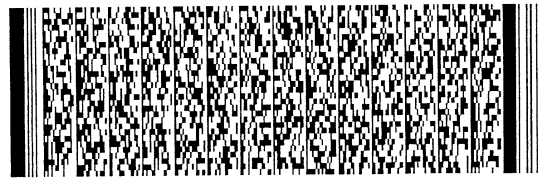
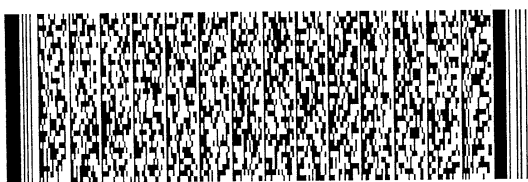


## 五、發明說明 (44)

LSYN-15 引子(5'

GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列識別號:4) 互補於Ply的5'端核苷酸1-24, 以及LSYN-3引子(5' CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC-3' ; 序列識別號:3) 互補於Ply的3'端核苷酸1396-1413, 放大1413bp DNA, 編碼全長471胺基酸的野生型Ply蛋白質。此PCR合成DNA片段隨後經NheI及BamHI切割, 黏接至pVAX1載體的NheI及BamHI位, 形成pSA-7。將該重組DNA轉形導入大腸桿菌DH5  $\alpha$ 細胞, 再以NheI及BamHI限制酶檢查。該插入19A型野生型Ply基因以DNA序列分析予以分析。

質體載體pSA-10編碼碳端截斷的肺溶素蛋白質(Ply碳端上缺乏114個胺基酸)。19A型Ply基因係由PCR反應放大, 使用含有肺炎球菌19A染色體DNA的即可使用PCR珠。PCR以第一週期為94°C、4分鐘; 隨後30週期為94°C、1分鐘; 55°C、1分鐘; 72°C、1.5分鐘; 最後一週期為72°C、10分鐘。該插入部分使用LSYN-15引子(5' GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列識別號:4) 互補於Ply的5'端核苷酸1-24, 以及LSYN-6引子(5' -CTGAGGATCCTTACTAAGCTGTAACCTTAGTCTC-3' ; 序列識別號:19) 互補於Ply的3'端核苷酸1054-1071, 放大1071bp DNA, 編碼全長357胺基酸多胜肽。此PCR合成DNA片段隨後經NheI及BamHI切割, 黏接至pVAX1載體的NheI及BamHI位, 形成pSA-10。將該重組DNA轉形導入大腸桿菌DH5  $\alpha$ 細胞, 再以NheI及BamHI限制酶檢查。該插入19A型偽肺溶素



## 五、發明說明 (45)

基因以DNA序列分析予以分析。

質體載體pSA-26編碼具有CpG型式的全長肺溶素。PCR引子LSYN-34及LSYN-33為PCR1及PCR2的引子，含有兩個在3'端具有CpG型式的互補寡核苷酸。第二引子LSYN-15及LSYN-3各互補於肺溶素氮端及碳端序列。分別放大反應中，第一PCR產物為PCR1(1.2kb)及PCR2(150bp)，係由引子LSYN-15與-34(PCR1)以及LSYN-33與-3(PCR2)、含全長肺溶素基因的鑄模pSA7所構成的即可使用PCR珠所生成。將第一PCR產物混合、變性，作為第二PCR產物的鑄模，第二PCR產物的引子適用第二組的引子LSYN-15及-3。該第二PCR產物經NheI及BamHI切割，黏接至pVAX1載體的NheI及BamHI位，形成pSA-26。PCR以第一週期為94℃、4分鐘；隨後30週期為94℃、1分鐘；55℃、1分鐘；72℃、1.5分鐘；最後一週期為72℃、8分鐘。

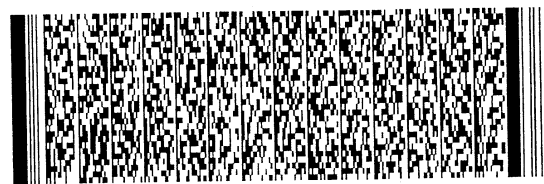
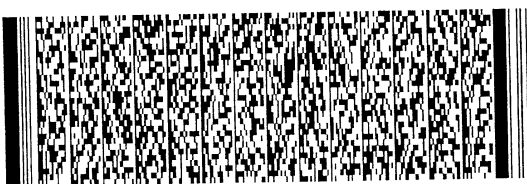
引子LSYN-3、LSYN-15、LSYN-33及LSYN-34序列如下：

LSYN-3引子(5' CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC  
3'；序列識別號:3)；

LSYN-15引子(5'  
GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'；序列識  
別號:4)；

LSYN-33引子(5'  
CAAATTAGAGAACGTTCCGGGCTTGCCTGGGAATGG-3'；序列識別  
號:20)；

LSYN-34引子(5'



## 五、發明說明 (46)

GCCCCGGAACGTTCTCTAATTTTGACAGAGAGATTACG-3' ; 序列識別號:21)。

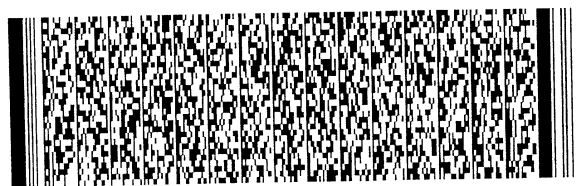
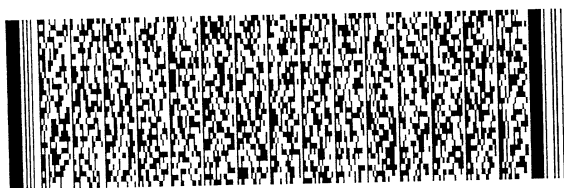
將該重組DNA轉形導入大腸桿菌DH5  $\alpha$  細胞，再以NheI及BamHI限制酶檢查。該含有CpG型式的插入19A型野生型Ply基因以DNA序列分析予以分析。

質體載體pSA-27編碼具有CpG型式的肺溶素碳端截斷物(11個胺基酸缺失)。PCR引子LSYN-34及LSYN-33為PCR1及PCR2的引子，含有兩個在3'端具有CpG型式的互補寡核苷酸。第二引子LSYN-15及LSYN-3各互補於肺溶素氮端及碳端序列。分別放大反應中，第一PCR產物為PCR1(1.2kb)及PCR2(150bp)，係由引子LSYN-15與-34(PCR1)以及LSYN-33與-3(PCR2)、含全長肺溶素基因的鑄模pSA7所構成的即可使用PCR珠所生成。

將第一PCR產物混合、變性，作為第二PCR產物的鑄模，第二PCR產物的引子適用第二組的引子LSYN-15及-4。該第二PCR產物經NheI及BamHI切割，與pVAX1載體的NheI及BamHI位一起培養，形成pSA-27。PCR以第一週期為94°C、4分鐘；隨後30週期為94°C、1分鐘；55°C、1分鐘；72°C、1分鐘；最後一週期為72°C、8分鐘。該寡核苷酸引子LSYN-3、LSYN-4、LSYN-15、LSYN-33及LSYN-34序列如下：

LSYN-3引子(5' CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC  
3' ; 序列識別號:3) ;

LSYN-4引子(5'



## 五、發明說明 (47)

GACTGGATCCTTACTAGAGAGTTGTTCCCCAAATAG-3' ; 序列識別號:5) ;

LSYN-15 引子(5'

GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3' ; 序列識別號:4) ;

LSYN-33 引子(5'

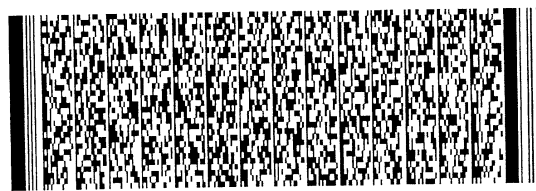
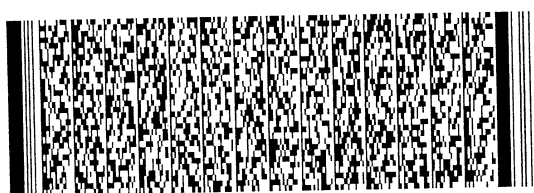
CAA AATTAGAGAACGTTCCGGGCTTGCCTGGGAATGG-3' ; 序列識別號:20) ;

LSYN-34 引子(5'

GCCCGGAACGTTCTCTAATTTTGACAGAGAGATTACG-3' ; 序列識別號:21) 。將該重組DNA轉形導入大腸桿菌DH5  $\alpha$  細胞，再以NheI及BamHI限制酶檢查。該含有CpG型式的插入19A型偽肺溶素基因以DNA序列分析予以分析。

疫苗過程必須有DNA載體引起及大量產生蛋白質，導致高濃度專一性免疫的產生，以及在某些實施例上，對於目前疫苗發展有極大問題的感染源，提供保護作用。此實驗中，兔經由3次肺溶素DNA載體引發，並在無輔藥下大量生成肺溶素蛋白質。

第16圖顯示使用上述偽肺溶素DNA疫苗的引起-大量產生策略的兔體內抗肺溶素的抗體反應。第1、2、3柱條為第一(1)、第二(2)、第三(3)肌肉內注射偽肺溶素DNA疫苗後7天的免疫反應。第4柱條為蛋白質大量生成(200  $\mu$  肺溶素)後10天的免疫反應。第5柱條為注射200  $\mu$  肺溶素蛋白質與TiterMax輔藥後10天的抗體反應。此結果確定DNA的3



## 五、發明說明 (48)

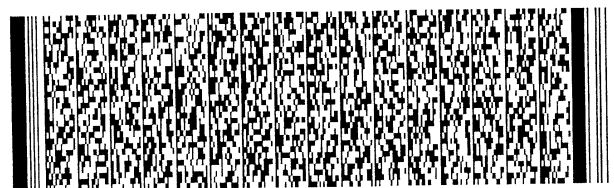
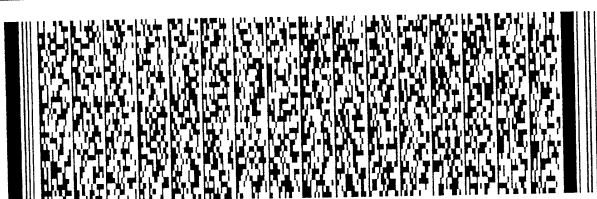
次注射與蛋白質的量生產，相較於使用輔藥的傳統蛋白質免疫方法，導致較高的抗體反應。

將皆為 $100\ \mu\text{g}$ 的DNA疫苗pSA-59、及pSA-60、與一個載體控制的質體DNA於總體積 $0.1\text{ml}$ 的 $1\times\text{PBS}$ 肌肉內注射於Balb/C小鼠的四頭肌或後肢。注射小鼠4劑 $100\ \mu\text{g}$  DNA疫苗，每次注射間隔2星期。最後一次注射後的第7天，以ELISA測量IgG抗體的血清濃度。接受4劑DNA疫苗注射的小鼠較對照組產生多於9600倍的IgG抗體。此結果指出質體DNA可於生體內表現自溶素或肺炎球菌表面蛋白A抗原，並刺激小鼠免疫系統以產生高濃度的專一性IgG抗體。

第17圖為注射第4劑PspA DNA疫苗後7天的對肺炎球菌表面蛋白A的抗體反應。第18圖為注射第4劑自溶素DNA疫苗後7天的對肺炎球菌自溶素的抗體反應。

實施例8：對致命肺炎球菌的異質型之保護性免疫及交叉保護作用

腹膜內注射小鼠3劑 $2.5\ \mu\text{g}$ 的14型多醣體-偽肺溶素(缺少7個胺基酸)共軛物，注射間隔為2星期。對照組以PBS取代該共軛物。第三次注射後8天，該免疫小鼠腹膜內注射每 $0.1$ 毫升 $1\times 10^5$ 至 $1\times 10^6\text{CFU}$ (菌叢形成單位)肺炎球菌。注射的每毫升確實CFU數由羊血洋菜膠盤上的菌斑計算得知。在感染後1、3、5小時，取每隻小鼠的 $5\ \mu\text{l}$ 及 $20\ \mu\text{l}$ 血液樣本塗布於羊血洋菜膠盤，培養 $37^\circ\text{C}$ 隔夜。根據共軛免疫鼠的血液樣本的細菌清除率與對照組的比較，有顯著差異。



## 五、發明說明 (49)

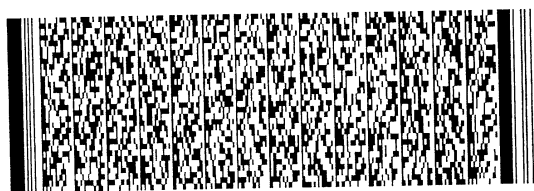
第19圖顯示在14型肺炎球菌感染時，14型多醣體-偽肺溶素共軛物免疫鼠的血液之細菌清除率。在感染後1、3、5小時的該共軛物處理組與PBS處理組有顯著的CFU差異( $P < 0.01$ )。

第20圖顯示在7型肺炎球菌感染時，14型多醣體-偽肺溶素共軛物免疫鼠的血液之細菌清除率。在感染後1、3、5小時的該共軛物處理組與PBS處理組有顯著的CFU差異( $P < 0.01$ )。此等數據亦指出經該共軛物免疫的小鼠具有對異質型肺炎球菌感染的交叉保護作用。

第21圖顯示在6B型肺炎球菌感染時，14型多醣體-偽肺溶素共軛物免疫鼠的血液之細菌清除率。在感染後1、3、5小時的該共軛物處理組與PBS處理組有顯著的CFU差異( $P < 0.05$ )。此等數據亦指出經該共軛物免疫的小鼠具有對異質型肺炎球菌感染的交叉保護作用。

第22圖顯示在18C型肺炎球菌感染時，14型多醣體-偽肺溶素共軛物免疫鼠的血液之細菌清除率。在感染後1、3、5小時的該共軛物處理組與PBS處理組有顯著的CFU差異( $P < 0.01$ )。此等數據亦指出經該共軛物免疫的小鼠具有對異質型肺炎球菌感染的交叉保護作用。

第23-25圖顯示在23F型肺炎球菌感染時，14型多醣體-偽肺溶素共軛物免疫鼠的血液之細菌清除率。在感染後1小時(第23圖)、3小時(第24圖)、5小時(第25圖)的該共軛物處理組與PBS處理組有顯著的CFU差異( $P < 0.01$ )。此等數據亦指出經該共軛物免疫的小鼠具有對異質型肺炎球菌感



## 五、發明說明 (50)

染的交叉保護作用。

## 實施例9：調理素性噬細胞作用分析

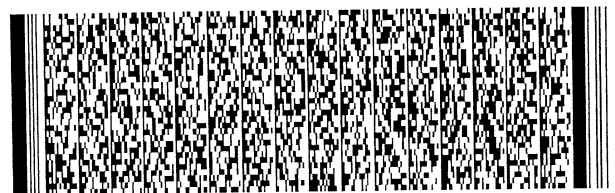
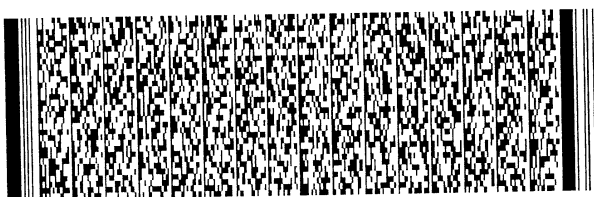
## A. 調理素性噬細胞作用分析

抗血清型14型肺炎球菌多醣體的抗體功能活性係使用人多形核白血球(PMNL)的調理素性噬細胞作用分析予以測量。系列性稀釋(兩倍)抗血清，使每一20  $\mu$ l血清樣本與20  $\mu$ l細菌懸浮液混合，培養於37°C 15分鐘，該細菌懸浮液含有約200CFU於腦心泡製的培養基。培養完後，加入10  $\mu$ l嬰兒兔補體及40  $\mu$ l的PMNL( $4 \times 10^5$ 細胞)。將此混合物培養於37°C、5% CO<sub>2</sub>氣氛60分鐘。為獲得可目視的細胞計數，每樣本中的20  $\mu$ l部分(aliquot)接種於三倍血膠培養基中，維持37°C過夜。補體控制包含所有測試試劑，除對抗肺炎球菌的抗體。調理素性噬細胞作用力價計算為>50%殺菌的最高血清稀釋量的倒數，相較於補體中所生長者。

## B. 吞噬細胞

使用葡聚糖沉澱物及菲可(ficoll; ICN Biomedical Company, #16-922-54 Lymphocyte Separation Medium)分離單核球與PMNL，將新鮮PMNL自健康成人自願者的周邊血液分離。以ACK溶胞緩衝液(BioFluids, Catalog number p304-100)溶解紅血球。調整細胞的終濃度為 $1 \times 10^7$ 細胞/mL於BME(Life Technologies GIBCO BRL, Basal Medium Eagle)中。每樣本中使用40  $\mu$ L的PMNL  $2-4 \times 10^5$ 細胞。

## C. 小鼠血清與細菌



## 五、發明說明 (51)

對抗14型多醣體的小鼠抗血清系列稀釋於腦心泡製的培養基(兩倍, 1:2至1:256), 將每20  $\mu$ L血清樣本與20ul細菌懸浮液(200CFU的肺炎鏈球菌14型)37 $^{\circ}$ C混合15分鐘。

肺炎鏈球菌14型培養於37 $^{\circ}$ C腦心泡製培養基10小時。系列稀釋10倍以確認本實驗使用的細菌數。將100ul樣本加入盤中。10CFU為使用1:10<sup>7</sup>稀釋樣本, 91CFU為使用1:10<sup>6</sup>稀釋樣本。因此本試驗使用的細菌濃度確認為約1 x 10<sup>9</sup>CFU/mL。14型肺炎鏈球菌1 x 10<sup>9</sup>CFU/Ml稀釋至1 x 10<sup>4</sup>CFU/mL。每樣本為200CFU/20  $\mu$ L。

## D. 補體與PMNL

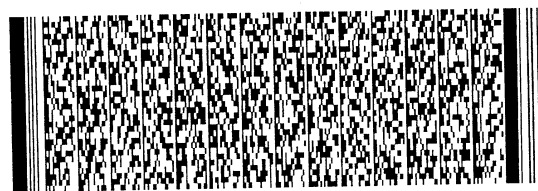
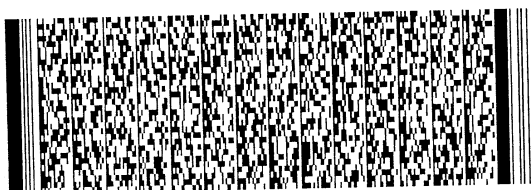
培養後, 加入10  $\mu$ L嬰兒兔補體(新鮮收集的年輕兔血清的部分, 使用前儲存於-80 $^{\circ}$ C)及40  $\mu$ L的PMNL 2.8 x 10<sup>5</sup>細胞。將該混合物培養於37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>氣氛60分鐘。

## E. CFU計算

為獲得可目視的細胞計算, 將兩稀釋液的20  $\mu$ l部分(aliquot)(每樣本的1:10及1:100)接種於三倍血膠培養基中, 維持37 $^{\circ}$ C過夜。補體對照組包含所有試劑, 除對抗肺炎球菌的抗體外。

## F. 調理素性噬細胞作用活性

調理素性噬細胞作用力價計算為>50%殺菌的最高血清稀釋量的倒數, 相較於補體中所生長者。



## 五、發明說明 (52)

表 5：對抗 14 型多醣體的小鼠抗體受調理素作用活性  
血清稀釋

小鼠編號#	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	對照組
疫苗									
1, CFU	12	20	22	25	28	32	45		81
殺菌%	85%	76%	73%	69%	65%	60%	44%		
2, CFU	17	18	17	17	32	50	51		81
殺菌%	79%	78%	79%	79%	60%	38%	37%		
3, CFU	19	27	31	31	32	44	56		81
殺菌%	77%	67%	62%	62%	60%	46%	31%		
4, CFU	15	22	23	19	33	36	40		81
殺菌%	81%	73%	72%	77%	59%	56%	51%		
5, CFU	22	26	34	27	33	43	51		81
殺菌%	73%	68%	58%	67%	59%	47%	37%		
6, CFU	22	17	19	28	43	51	57		81
殺菌%	73%	79%	77%	65%	47%	37%	30%		
7, CFU	22	29	29	26	28	29	57		81
殺菌%	73%	64%	64%	68%	65%	64%	30%		
8, CFU	31	23	31	35	48	63	63		81
殺菌%	62%	72%	62%	57%	41%	22%	22%		

小鼠血清滴定以測量受調理素作用活性

#1, 128 #2, 64 #3, 64 #4, 256 #5, 128 #6, 32 #7, 128 #8, 32

表 6：對抗血清型 14 型多醣體(PS)及偽肺溶素(PPN)的抗體(Ab)反應

小鼠#	抗 PS 抗體		抗 PPN 抗體	
	力價	OD <sub>405</sub> (1:300)	力價	OD <sub>405</sub> (1:300)
1	76800	0.735	9600	0.454
2	76800	0.520	9600	0.360
3	76800	0.738	9600	0.285
4	19200	0.677	9600	0.266
5	19200	0.684	9600	0.381
6	4800	0.518	4800	0.261
7	76800	0.815	9600	0.348
8	4800	0.585	1200	0.125

如表 5 及表 6 所示，具較高抗 14 型多醣體與偽肺溶素的抗體反應之小鼠(小鼠編號 1, 2, 3, 4, 5, 及 7)顯現較高的受調理素作用活性，其中具較低抗 14 型多醣體與偽肺溶素的抗體反應之小鼠(小鼠編號 6 與 8)顯現較低的受調理素



## 五、發明說明 (53)

作用活性，無受調理素作用活性顯示於PBS處理的小鼠。

## 其他實施例

本發明已以前述實施方法詳細說明，前述僅係用以作為說明本發明相關發明，並非用以限制本發明之範疇。本發明的其他方面、優點及修飾皆包含於以下申請專利範圍。



## 圖式簡單說明

第1圖為小鼠在血清型14型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗肺溶素IgG抗體產生。

第2圖為小鼠在血清型14型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗多醣體IgG抗體產生。

第3圖為小鼠在血清型18C型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗肺溶素IgG抗體產生。

第4圖為小鼠在血清型18C型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗多醣體IgG抗體產生。

第5圖為小鼠在血清型19F型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗肺溶素IgG抗體產生。

第6圖為小鼠在血清型19F型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗多醣體IgG抗體產生。

第7圖為小鼠在血清型23F型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗肺溶素IgG抗體產生。

第8圖為小鼠在血清型23F型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗多醣體IgG抗體產生。

第9圖為小鼠在血清型4型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗肺溶素IgG抗體產生。

第10圖為小鼠在血清型4型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗多醣體IgG抗體產生。

第11圖為小鼠在血清型6B型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗肺溶素IgG抗體產生。

第12圖為小鼠在血清型6B型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗多醣體IgG抗體產生。



## 圖式簡單說明

第13圖為小鼠在血清型9V型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗肺溶素IgG抗體產生。

第14圖為小鼠在血清型9V型多糖偽肺溶素共軛物免疫後所引起的抗多醣體IgG抗體產生。

第15圖為肺炎鏈球菌血清型14型多糖偽肺溶素共軛物第3次注射後，對肺炎鏈球菌血清型14型多糖的抗體反應。

第16圖以偽肺溶素DNA疫苗的初級促進(prime-boost)策略，產生的兔體內對抗肺溶素的抗體反應。

第17圖為注射編碼肺炎球菌表面蛋白A的DNA疫苗的表現載體後的抗體反應。

第18圖為注射編碼自溶素DNA疫苗的表現載體後的抗體反應。

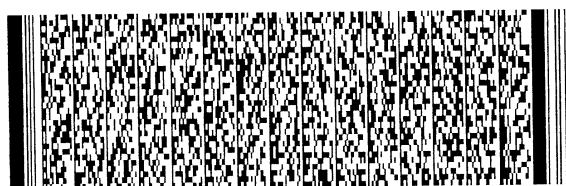
第19圖為小鼠在血清型14型多醣體偽肺溶素共軛物免疫後，與肺炎鏈球菌血清型14型對抗後的細菌清除率。

第20圖為小鼠在血清型14型多醣體偽肺溶素共軛物免疫後，與肺炎鏈球菌血清型7型對抗後的細菌清除率。

第21圖為小鼠在血清型14型多醣體偽肺溶素共軛物免疫後，與肺炎鏈球菌血清型6B型對抗後的細菌清除率。

第22圖為小鼠在血清型14型多醣體偽肺溶素共軛物免疫後，與肺炎鏈球菌血清型18C型對抗後的細菌清除率。

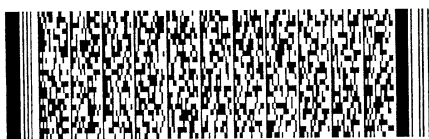
第23圖為小鼠在血清型14型多醣體偽肺溶素共軛物免疫後，與肺炎鏈球菌血清型23F型對抗後1小時的細菌清除率。



## 圖式簡單說明

第24圖為小鼠在血清型14型多醣體偽肺溶素共軛物免疫後，與肺炎鏈球菌血清型23F型對抗後3小時的細菌清除率。

第25圖為小鼠在血清型14型多醣體偽肺溶素共軛物免疫後，與肺炎鏈球菌血清型23F型對抗後5小時的細菌清除率。



## 序列表

&lt;110&gt; 新納幾美國公司

&lt;120&gt; 治療或預防肺炎球菌感染之組合物與方法

&lt;140&gt; 092131025

&lt;141&gt; 民國 92 年 11 月 6 日

&lt;150&gt; US 60/424,497

&lt;151&gt; 2002/11/07

&lt;160&gt; 25

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 460

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Streptococcus pneumoniae

&lt;400&gt; 1

```

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

```

Ala Pro Gln Thr Glu Trp Lys Gln Ile Leu Asp Asn Thr Glu Val Lys  
 275 280 285  
 Ala Val Ile Leu Gly Gly Asp Pro Ser Ser Gly Ala Arg Val Val Thr  
 290 295 300  
 Gly Lys Val Asp Met Val Glu Asp Leu Ile Gln Glu Gly Ser Arg Phe  
 305 310 315 320  
 Thr Ala Asp His Pro Gly Leu Pro Ile Ser Tyr Thr Thr Ser Phe Leu  
 325 330 335  
 Arg Asp Asn Val Val Ala Thr Phe Gln Asn Ser Thr Asp Tyr Val Glu  
 340 345 350  
 Thr Lys Val Thr Ala Tyr Arg Asn Gly Asp Leu Leu Leu Asp His Ser  
 355 360 365  
 Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Tyr Ile Thr Trp Asn Glu Leu Ser Tyr  
 370 375 380  
 Asp His Gln Gly Lys Glu Val Leu Thr Pro Lys Ala Trp Asp Arg Asn  
 385 390 395 400  
 Gly Gln Asp Leu Thr Ala His Phe Thr Thr Ser Ile Pro Leu Lys Gly  
 405 410 415  
 Asn Val Arg Asn Leu Ser Val Lys Ile Arg Glu Cys Thr Gly Leu Ala  
 420 425 430  
 Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Tyr Glu Lys Thr Asp Leu Pro Leu Val  
 435 440 445  
 Arg Lys Arg Thr Ile Ser Ile Trp Gly Thr Thr Leu  
 450 455 460

<210> 2  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 2  
 gactagatct ccatatggca aataaagcag taaatgac

38

<210> 3  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 3  
 cagtggatcc ttactagtca ttttctacct tatc

34

<210> 4  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 4  
 gactgctagc caccatggca aataaagcag taaatgac

38

<210> 5  
 <211> 36  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

gactggatcc ttactagaga gttggtcccc aaatag

36

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

gactggatcc ttactaatct tctacctgag gatag

35

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

gactggatcc ttactattct accttatctt ctacctgag

39

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

gactggatcc ttactaatth tctaccttat ottctacctg ag

42

<210> 9

<211> 1413

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated oligonucleotide

<400> 9

atggcaaata aagcagtaaa tgactttata ctagctatga attacgataa aaagaaactc	60
ttgacccatc agggagaaag tattgaaaat cgtttcatca aagagggtaa tcagctacc	120
gatgagtttg ttggtatcga aagaaagaag cggagcttgt cgacaaatac aagtgatatt	180
tctgtaacag ctaccaacga cagtcgcctc tatcctggag cacttctcgt agtggatgag	240
acctgttag agaataatcc cactcttctt gcggtcgatc gtgctccgat gacttatagt	300
attgatttgc ctggtttggc aagtagcgat agctttctcc aagtggaaga ccccagcaat	360
tcaagtgttc gcggagcggg aaacgatttg ttggctaagt ggcatacaaga ttatggtcag	420
gtcaataatg tcccagctag aatgcagtat gaaaaaatca cggctcacag catggaacaa	480
ctcaaggcca agtttgggtc tgactttgaa aagacagggga attctcttga tattgatttt	540
aactctgtcc attcaggcga aaagcagatt cagattgtta atttfaagca gatttattat	600
acagtcagcg tagatgctgt taaaaatcca ggagatgtgt ttcaagatac tgtaacggta	660

gaggatttaa	aacagagagg	aatttctgca	gagcgtcctt	tggtctatat	ttcgagtgtt	720
gcttatgggc	gccaaagtcta	tctcaagttg	gaaaccaacga	gtaagagtga	tgaagtagag	780
gctgcttttg	aagctttgat	aaaaggagtc	aaggtagctc	ctcagacaga	gtggaaacag	840
attttgacaca	atacagaagt	gaaggcgggt	attttagggg	gcgaccaag	ttcgggtgcc	900
cgagttgtaa	caggcaaggt	ggatatggta	gaggacttga	ttcaagaagg	cagtcgcttt	960
acagcagatc	atccaggctt	gccgatttcc	tatacaactt	cttttttacg	tgacaatgta	1020
gttgcgacct	ttcaaaatag	tacagactat	gttgagacta	aggttacagc	ttacagaaac	1080
ggagatttac	tgctggatca	tagtgggtgcc	tatggtgcc	aatattatat	tacttggaaat	1140
gaattatcct	atgatcatca	aggtaaggaa	gtcttgactc	ctaaggcttg	ggacagaaat	1200
gggcaggatt	taacggctca	ctttaccact	agtattcctt	taaaagggaa	tgttcgtaat	1260
ctctctgtca	aaattagaga	gcgttccggg	cttgctggg	aatgggtggc	tacggtttat	1320
gaaaaaaccc	atgtgccact	agtgcgtaag	cggacgattt	ctatttgggg	aacaactctc	1380
tatcctcagg	tagaagataa	ggtagaaaat	gac			1413

<210> 10

<211> 1380

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetically generated oligonucleotide

<400> 10

atggcaaata	aagcagtaaa	tgactttata	ctagctatga	attacgataa	aaagaaactc	60
ttgaccatc	aggagaaaag	tattgaaaat	cgtttcatca	aagagggtaa	tcagctaccc	120
gatgagttt	ttgttatcga	aagaaagaag	cggagcttgt	cgacaaatac	aagtgatatt	180
tctgtaacag	ctaccaacga	cagtcgcctc	tatcctggag	cacttctcgt	agtggatgag	240
accttgtag	agaataatcc	cactcttctt	gcggtcgatc	gtgctccgat	gacttatagt	300
attgatttgc	ctggtttggc	aagtagcgat	agctttctcc	aagtggaaga	ccccagcaat	360
tcaagtgttc	gcggagcgg	aaacgatttg	ttggctaagt	ggcatcaaga	ttatggtcag	420
gtcaataatg	tcccagctag	aatgcagtat	gaaaaaatca	cggctcacag	catggaacaa	480
ctcaaggtca	agtttgggtc	tgactttgaa	aagacagggg	attctcttga	tattgatttt	540
aactctgtcc	atccaggcga	aaagcagatt	cagattgtta	attttaagca	gatttattat	600
acagtcagcg	tagatgctgt	taaaaatcca	ggagatgtgt	ttcaagatac	tgtaacggta	660
gaggatttaa	aacagagagg	aatttctgca	gagcgtcctt	tggtctatat	ttcgagtgtt	720
gcttatgggc	gccaaagtcta	tctcaagttg	gaaaccaacga	gtaagagtga	tgaagtagag	780
gctgcttttg	aagctttgat	aaaaggagtc	aaggtagctc	ctcagacaga	gtggaaacag	840
attttgacaca	atacagaagt	gaaggcgggt	attttagggg	gcgaccaag	ttcgggtgcc	900
cgagttgtaa	caggcaaggt	ggatatggta	gaggacttga	ttcaagaagg	cagtcgcttt	960
acagcagatc	atccaggctt	gccgatttcc	tatacaactt	cttttttacg	tgacaatgta	1020
gttgcgacct	ttcaaaatag	tacagactat	gttgagacta	aggttacagc	ttacagaaac	1080
ggagatttac	tgctggatca	tagtgggtgcc	tatggtgcc	aatattatat	tacttggaaat	1140
gaattatcct	atgatcatca	aggtaaggaa	gtcttgactc	ctaaggcttg	ggacagaaat	1200
gggcaggatt	taacggctca	ctttaccact	agtattcctt	taaaagggaa	tgttcgtaat	1260
ctctctgtca	aaattagaga	gcgttccggg	cttgctggg	aatgggtggc	tacggtttat	1320
gaaaaaaccc	atgtgccact	agtgcgtaag	cggacgattt	ctatttgggg	aacaactctc	1380

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

gactaagctt gccacatgg aaattaatgt gagtaaatta ag

42

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

ctgactcgag ttatcttact gtaatcaagc catc

34

<210> 13

<211> 954

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 13

atggaaatta	atgtgagtaa	attaagaaca	gatttgcctc	aagttggcgt	gcaaccatat	60
aggcaagtac	acgcacactc	aactgggaat	cgcattcaa	ccgtacagaa	tgaagcggat	120
tatcattggc	ggaaagaccc	agaattaggt	ttttctcgc	acattgttgg	gaacggatgc	180
atcatgcagg	taggacctgt	taataatggt	gcctgggacg	ttgggggagg	ttggaatgct	240
gagacctatg	cagcggttga	actgattgaa	agccattcaa	ctaaagaaga	gttcatgacg	300
gactaccgcc	tttatatcga	actcttacgc	aatctagcag	atgaagcagg	tttgccgaaa	360
acgcttgata	cagggagttt	agctggaatt	aaaacgcacg	agtattgcac	gaataaccaa	420
ccaaacaacc	actcagacca	tgtggatcca	tacccttact	tggcaaaatg	gggcattagc	480
cgtgagcagt	ttaagcatga	tattgagaac	ggcttgacga	ttgaaacagg	ctggcagaag	540
aatgacactg	gctactggta	cgtaacattc	gacggctctt	atccaaaaga	caagtttgag	600
aaaatcaatg	gcacttggta	ctactttgac	agttcaggct	atatgcttgc	agaccgctgg	660
aggaagcaca	cagacggcaa	ttggtactac	tttgaccaat	caggcgaat	ggctacaggg	720
tggaagaaaa	tcgctgagaa	gtggtactat	ttcaacgaag	aaggtgccat	gaagacaggg	780
tgggtcaagt	acaaggacac	ttggtactac	ttagacgcta	aagaaggcgc	aatgggtatca	840
aatgccttta	tccagtcagc	ggacggaaca	ggctggta	acctcaaacc	agacggaaca	900
ctggcagaca	agccagaatt	cacagtagag	ccagatggct	tgattacagt	aaaa	954

<210> 14

<211> 318

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 14

Met	Glu	Ile	Asn	Val	Ser	Lys	Leu	Arg	Thr	Asp	Leu	Pro	Gln	Val	Gly	
1				5					10					15		
Val	Gln	Pro	Tyr	Arg	Gln	Val	His	Ala	His	Ser	Thr	Gly	Asn	Pro	His	
			20					25					30			
Ser	Thr	Val	Gln	Asn	Glu	Ala	Asp	Tyr	His	Trp	Arg	Lys	Asp	Pro	Glu	
		35					40					45				
Leu	Gly	Phe	Phe	Ser	His	Ile	Val	Gly	Asn	Gly	Cys	Ile	Met	Gln	Val	
	50					55					60					
Gly	Pro	Val	Asn	Asn	Gly	Ala	Trp	Asp	Val	Gly	Gly	Gly	Trp	Asn	Ala	
65					70					75					80	
Glu	Thr	Tyr	Ala	Ala	Val	Glu	Leu	Ile	Glu	Ser	His	Ser	Thr	Lys	Glu	
				85					90					95		
Glu	Phe	Met	Thr	Asp	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Ile	Glu	Leu	Leu	Arg	Asn	Leu	
			100					105					110			
Ala	Asp	Glu	Ala	Gly	Leu	Pro	Lys	Thr	Leu	Asp	Thr	Gly	Ser	Leu	Ala	
		115					120					125				
Gly	Ile	Lys	Thr	His	Glu	Tyr	Cys	Thr	Asn	Asn	Gln	Pro	Asn	Asn	His	
	130					135					140					
Ser	Asp	His	Val	Asp	Pro	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Ala	Lys	Trp	Gly	Ile	Ser	
145					150					155					160	
Arg	Glu	Gln	Phe	Lys	His	Asp	Ile	Glu	Asn	Gly	Leu	Thr	Ile	Glu	Thr	
				165					170					175		
Gly	Trp	Gln	Lys	Asn	Asp	Thr	Gly	Tyr	Trp	Tyr	Val	His	Ser	Asp	Gly	
			180					185						190		

Ser Tyr Pro Lys Asp Lys Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr  
 195 200 205  
 Phe Asp Ser Ser Gly Tyr Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr  
 210 215 220  
 Asp Gly Asn Trp Tyr Tyr Phe Asp Gln Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Trp Lys Lys Ile Ala Glu Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala  
 245 250 255  
 Met Lys Thr Gly Trp Val Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp  
 260 265 270  
 Ala Lys Glu Gly Ala Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp  
 275 280 285  
 Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Lys  
 290 295 300  
 Pro Glu Phe Thr Val Glu Pro Asp Gly Leu Ile Thr Val Lys  
 305 310 315

<210> 15  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 15  
 gactaagctt gccaccatgg aagaagctcc cgtagctagt cag

43

<210> 16  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Primer

<400> 16  
 gactctcgag ctatccatca gggcctaact cattaag

37

<210> 17  
 <211> 1377  
 <212> DNA  
 <213> Streptococcus pneumoniae

<400> 17  
 atggaagaag ctcccgtagc tagtcagtct aaagotgaga aagactatga tgcagcagtg 60  
 aaaaaatctg aagctgctaa gaaggcttac gaagaagcta aaaagaaagc agaagacgct 120  
 cagaaaaaat atgatgagga tcagaagaaa actgaggcaa aagcggataa ggaagcaaaa 180  
 gcatctgogg aaatagataa agccacgttt gctgtacaaa gtgctgatgt aaaattttta 240  
 aatgtccaat ctaatcgtca aatttcggag aatgaacgaa aaaaacaatt agcagaaata 300  
 gataaagaga tagagaatgc taaacaaaat ttacagaata aacaggaaga atttaataag 360  
 gttagagcag aagtaattcc tgaagcaaag gggtttagctg ttactaaaca aaaagcggaa 420  
 gaagctaaaa aagaagcaga agtagctaag agaaaatatg attatgcaac tctaaaggta 480  
 gcactagcga agaaagaagt agaggctaag gaacttgaaa ttgaaaaact tcaatatgaa 540  
 atttctactt tggaacaaga agttgctatt gctcaacatc aagtagataa tttgaaaaaa 600  
 cttcttgctg gtgctggatcc tgatgatggc acaaaagtta tagaagctaa attaaacaaa 660  
 ggagaagctg agctaaacgc taaacaagct gagttagcaa aaaaacaaac agaacttgaa 720  
 aaacttcttg acagccttga tcctgaaggt aagactcagg atgaattaga taaagaagct 780  
 gctgaagctg agttggataa aaaagctgat gaacttcaaa ataaagttgc tgatttagaa 840  
 aaaggaattg ctcttatca aatcaaagtc gctgaattaa ataaagaaat tgctagactt 900  
 caaagcgatt taaaagatgc tgaagaaaat aatgtagaag actatattaa agaaggttta 960

```

gagcaagcta togctgataa aaaagctgaa ttagctacaa ctcaacaaaa catagataaa 1020
actcaaaaaag atttagagga tgctgaatta gaacttgaaa aagtattagc tacattagac 1080
cctgaaggta aaactcaaga tgaattagat aaagaagctg cagaagatgc taatattgaa 1140
gctcttcaaaa acaaagttgc tgatctagaa aacaaggttg ctgaattaga taaagaagtt 1200
actagaacttc aaagcgattht aaaagatgct gaagaaaaca atgtagaaga ctacgttaaa 1260
gaaggcttag ataaagctct tactgataaa aaagttgaat taaataatac tcaaaaagca 1320
ttagatactg ctcaaaaagc attagatact gctcttaatg agttaggcco tgatgga 1377

```

<210> 18

<211> 459

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 18

```

Met Glu Glu Ala Pro Val Ala Ser Gln Ser Lys Ala Glu Lys Asp Tyr
 1                    5                    10                    15
Asp Ala Ala Val Lys Lys Ser Glu Ala Ala Lys Lys Ala Tyr Glu Glu
    20                    25                    30
Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Ala Gln Lys Lys Tyr Asp Glu Asp Gln
    35                    40                    45
Lys Lys Thr Glu Ala Lys Ala Asp Lys Glu Ala Lys Ala Ser Ala Glu
    50                    55                    60
Ile Asp Lys Ala Thr Phe Ala Val Gln Ser Ala Tyr Val Lys Phe Leu
    65                    70                    75                    80
Asn Val Gln Ser Asn Arg Gln Ile Ser Glu Asn Glu Arg Lys Lys Gln
    85                    90                    95
Leu Ala Glu Ile Asp Lys Glu Ile Glu Asn Ala Lys Gln Asn Leu Gln
    100                   105                   110
Asn Lys Gln Glu Glu Phe Asn Lys Val Arg Ala Glu Val Ile Pro Glu
    115                   120                   125
Ala Lys Gly Leu Ala Val Thr Lys Gln Lys Ala Glu Glu Ala Lys Lys
    130                   135                   140
Glu Ala Glu Val Ala Lys Arg Lys Tyr Asp Tyr Ala Thr Leu Lys Val
    145                   150                   155                   160
Ala Leu Ala Lys Lys Glu Val Glu Ala Lys Glu Leu Glu Ile Glu Lys
    165                   170                   175
Leu Gln Tyr Glu Ile Ser Thr Leu Glu Gln Glu Val Ala Ile Ala Gln
    180                   185                   190
His Gln Val Asp Asn Leu Lys Lys Leu Leu Ala Gly Ala Asp Pro Asp
    195                   200                   205
Asp Gly Thr Lys Val Ile Glu Ala Lys Leu Asn Lys Gly Glu Ala Glu
    210                   215                   220
Leu Asn Ala Lys Gln Ala Glu Leu Ala Lys Lys Gln Thr Glu Leu Glu
    225                   230                   235                   240
Lys Leu Leu Asp Ser Leu Asp Pro Glu Gly Lys Thr Gln Asp Glu Leu
    245                   250                   255
Asp Lys Glu Ala Ala Glu Ala Glu Leu Asp Lys Lys Ala Asp Glu Leu
    260                   265                   270
Gln Asn Lys Val Ala Asp Leu Glu Lys Gly Ile Ala Pro Tyr Gln Ile
    275                   280                   285
Lys Val Ala Glu Leu Asn Lys Glu Ile Ala Arg Leu Gln Ser Asp Leu
    290                   295                   300
Lys Asp Ala Glu Glu Asn Asn Val Glu Asp Tyr Ile Lys Glu Gly Leu
    305                   310                   315                   320
Glu Gln Ala Ile Ala Asp Lys Lys Ala Glu Leu Ala Thr Thr Gln Gln
    325                   330                   335
Asn Ile Asp Lys Thr Gln Lys Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Glu Leu
    340                   345                   350
Glu Lys Val Leu Ala Thr Leu Asp Pro Glu Gly Lys Thr Gln Asp Glu
    355                   360                   365
Leu Asp Lys Glu Ala Ala Glu Asp Ala Asn Ile Glu Ala Leu Gln Asn

```

```

          370                375                380
Lys Val Ala Asp Leu Glu Asn Lys Val Ala Glu Leu Asp Lys Glu Val
385                390                395                400
Thr Arg Leu Gln Ser Asp Leu Lys Asp Ala Glu Glu Asn Asn Val Glu
          405                410                415
Asp Tyr Val Lys Glu Gly Leu Asp Lys Ala Leu Thr Asp Lys Lys Val
          420                425                430
Glu Leu Asn Asn Thr Gln Lys Ala Leu Asp Thr Ala Gln Lys Ala Leu
          435                440                445
Asp Thr Ala Leu Asn Glu Leu Gly Pro Asp Gly
          450                455

```

```

<210> 19
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Primer

```

```

<400> 19
ctgaggatcc ttactaagct gtaaccttag tctc

```

34

```

<210> 20
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Primer

```

```

<400> 20
caaaattaga gaacgttccg ggcttgctg ggaatgg

```

37

```

<210> 21
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Primer

```

```

<400> 21
gcccggaacg ttctctaatt ttgacagaga gattacg

```

37

```

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

```

```

<400> 22
Lys Val Glu Asn Asp
  1                5

```

```

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

```

```

<400> 23
Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp

```

1

5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 24

Tyr Pro Gln Val Glu Asp Lys Val Glu Asn Asp

1

5

10

<210> 25

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

ctgaggatcc ttactatacc tgaggataga gagttgttc

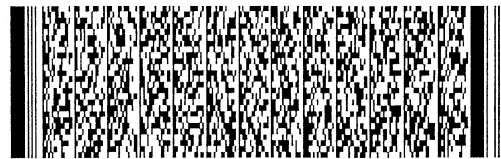
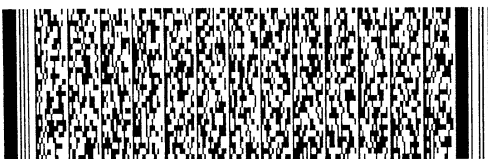
## 四、中文發明摘要 (發明名稱：治療或預防肺炎球菌感染之組合物與方法)

本發明提供用以治療或預防肺炎球菌感染的多胜肽、多醣體-多胜肽共軛物、以及表現載體。該組合物在投予哺乳動物時會引起抗肺炎球菌的免疫反應。該組合物可預防性作為接種個體的疫苗及/或治療性在感染的個體內引起治療性的免疫反應。

本案若有化學式，請揭示最能顯示發明特徵的化學式  
無

## 五、英文發明摘要 (發明名稱：COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING OR PREVENTING PNEUMOCOCCAL INFECTION)

The invention provides polypeptides, polysaccharide-polypeptide conjugates, and expression vectors for treating or preventing pneumococcal infection. The compositions induce an anti-pneumococcal immune response when administered to a mammal. The compositions can be used prophylactically to vaccinate an individual and/or therapeutically to induce a therapeutic immune



四、中文發明摘要 (發明名稱：治療或預防肺炎球菌感染之組合物與方法)

五、英文發明摘要 (發明名稱：COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING OR PREVENTING PNEUMOCOCCAL INFECTION)

response in an infected individual.



## 六、申請專利範圍

1. 一種組合物，其含有與肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 外胞膜多醣體共軛的多胜肽，其中該多胜肽係由肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質的至少400連續胺基酸的片段所構成，其中該多胜肽缺乏胺基酸序列KVEND(序列識別號:22)，該多胜肽缺乏溶血活性，以及該組合物在投予哺乳動物時會引起抗肺炎鏈球菌的免疫反應。
2. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質包含序列識別號:1之胺基酸序列。
3. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-460。
4. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-464。
5. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-465。
6. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-466。
7. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-469。
8. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-470。
9. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽缺乏胺基酸序列EDKVEND(序列識別號:23)。
10. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜



## 六、申請專利範圍

肽缺乏胺基酸序列YPQVEDKVEN(序列識別號:24)。

11. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽由識別號:1的胺基酸殘基1-460所組成。

12. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-464所組成。

13. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-465所組成。

14. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-466所組成。

15. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-469所組成。

16. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-470所組成。

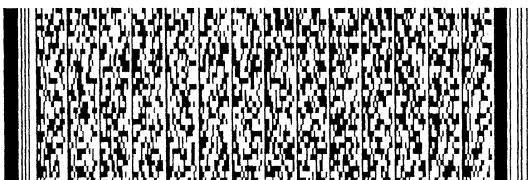
17. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該外胞膜多醣體選自血清型4、6B、9V、14、18C、19F、及23F型。

18. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該外胞膜多醣體為血清型14型。

19. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該外胞膜多醣體為血清型18C型。

20. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該組合物包含複數種不同的外胞膜多醣體，選自血清型4、6B、9V、14、18C、19F、及23F型所組成之族群。

21. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該免疫



## 六、申請專利範圍

反應包含體液免疫反應。

22. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該免疫反應包含細胞免疫反應。

23. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該免疫反應係直接抗肺炎鏈球菌外胞膜多醣體。

24. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該免疫反應係直接抗肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質。

25. 如申請專利範圍第1項所述之組合物，其中該免疫反應係直接抗肺炎鏈球菌外胞膜多醣體及肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質。

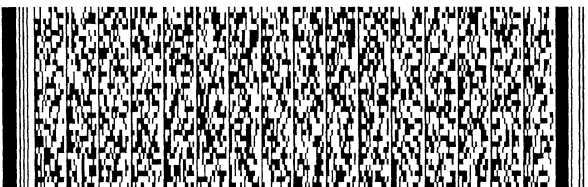
26. 一種哺乳動物表現載體，其包含一可操作性連接於一核苷酸序列的啟動子，該核苷酸序列含有編碼肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質的至少400連續胺基酸片段的多胜肽之核酸，其中該多胜肽缺乏胺基酸序列KVEND(序列識別號:22)，該多胜肽缺乏溶血活性，以及當該表現載體在投予哺乳動物時，該多胜肽會引起抗肺炎鏈球菌的免疫反應。

27. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質包含序列識別號:1。

28. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-460。

29. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-464。

30. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載



## 六、申請專利範圍

體，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-465。

31. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-466。

32. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-469。

33. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽包含序列識別號:1的胺基酸1-470。

34. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽缺乏胺基酸序列EDKVEND(序列識別號:23)。

35. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽缺乏胺基酸序列YPQVEDKVEND(序列識別號:24)。

36. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-460所組成。

37. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-464所組成。

38. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-465所組成。

39. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-466所



## 六、申請專利範圍

組成。

40. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-469所組成。

41. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽由序列識別號:1的胺基酸殘基1-470所組成。

42. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該免疫反應包含體液免疫反應。

43. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該免疫反應包含細胞免疫反應。

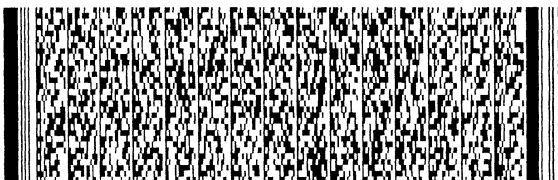
44. 如申請專利範圍第26項所述之哺乳動物表現載體，其中該免疫反應係直接抗肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質。

45. 一種哺乳動物表現載體，其包含一可操作性連接於一核苷酸序列的啟動子，該核苷酸序列含有編碼肺炎鏈球菌自溶素多胜肽的核酸，其中當該表現載體在投予哺乳動物時，該多胜肽會引起抗肺炎鏈球菌的免疫反應。

46. 如申請專利範圍第45項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽包含序列識別號:14。

47. 如申請專利範圍第45項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽係由序列識別號:14之胺基酸序列所構成。

48. 如申請專利範圍第45項所述之哺乳動物表現載體，其中該免疫反應包含體液免疫反應。



## 六、申請專利範圍

49. 如申請專利範圍第45項所述之哺乳動物表現載體，其中該免疫反應包含細胞免疫反應。

50. 一種哺乳動物表現載體，其包含一可操作性連接於一核苷酸序列的啟動子，該核苷酸序列含有編碼肺炎鏈球菌肺炎球菌表面蛋白A多胜肽的核酸，其中當該表現載體在投予哺乳動物時，該多胜肽會引起抗肺炎鏈球菌的免疫反應。

51. 如申請專利範圍第50項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽包含序列識別號:18。

52. 如申請專利範圍第50項所述之哺乳動物表現載體，其中該多胜肽係由序列識別號:18之胺基酸序列所構成。

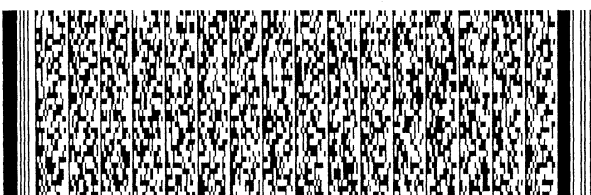
53. 如申請專利範圍第50項所述之哺乳動物表現載體，其中該免疫反應包含體液免疫反應。

54. 如申請專利範圍第50項所述之哺乳動物表現載體，其中該免疫反應包含細胞免疫反應。

55. 一種多胜肽，其係由選自序列識別號:1的胺基酸1-460、序列識別號:1的胺基酸1-464、序列識別號:1的胺基酸1-466以及序列識別號:1的胺基酸1-469的胺基酸序列所構成。

56. 一種引發哺乳動物體內免疫反應的方法，其包含投予哺乳動物一定量的如申請專利範圍第1項所述之組合物，以有效於引起對抗肺炎鏈球菌的免疫反應。

57. 如申請專利範圍第56項所述之方法，其中該免疫



## 六、申請專利範圍

反應為預防性免疫反應。

58. 如申請專利範圍第56項所述之方法，其中該免疫反應為治療性免疫反應。

59. 如申請專利範圍第56項所述之方法，其中該免疫反應為交叉作用對抗至少一種肺炎鏈球菌型，該肺炎鏈球菌型的外胞膜多醣體在該組合物中各不相同。

60. 如申請專利範圍第59項所述之方法，其中該外胞膜多醣體為血清型7型。

61. 如申請專利範圍第59項所述之方法，其中該外胞膜多醣體為血清型6B型。

62. 如申請專利範圍第59項所述之方法，其中該外胞膜多醣體為血清型18C型。

63. 如申請專利範圍第59項所述之方法，其中該外胞膜多醣體為血清型23F型。

64. 如申請專利範圍第56項所述之方法，其中該免疫反應為交叉作用對抗至少一種鏈球菌屬的非肺炎鏈球菌。

65. 一種引發哺乳動物體內免疫反應的方法，其包含投予哺乳動物一定量的如申請專利範圍第26項所述之表現載體，以有效於引起對抗肺炎鏈球菌的免疫反應。

66. 如申請專利範圍第65項所述之方法，其中該免疫反應為交叉作用對抗至少一種鏈球菌屬的非肺炎鏈球菌。

67. 一種引發哺乳動物體內免疫反應的方法，其包含投予哺乳動物一定量的如申請專利範圍第45項所述之表現載體，以有效於引起對抗肺炎鏈球菌的免疫反應。



## 六、申請專利範圍

68. 如申請專利範圍第67項所述之方法，其中該免疫反應為交叉作用對抗至少一種鏈球菌屬的非肺炎鏈球菌。

69. 一種引發哺乳動物體內免疫反應的方法，其包含投予哺乳動物一定量的如申請專利範圍第50項所述之表現載體，以有效於引起對抗肺炎鏈球菌的免疫反應。

70. 如申請專利範圍第69項所述之方法，其中該免疫反應為交叉作用對抗至少一種鏈球菌屬的非肺炎鏈球菌。

71. 一種引發哺乳動物體內免疫反應的方法，其包含投予哺乳動物一哺乳動物表現載體，該表現載體包含一可操作性連接一核苷酸序列的啟動子，該核苷酸序列含有編碼肺炎鏈球菌肺溶素多胜肽或其抗原片段的核酸；及

投予該哺乳動物純化的肺溶素多胜肽或其抗原片段，其中該組合的投藥方式引起該哺乳動物體內對抗肺炎鏈球菌肺溶素的免疫反應。

72. 如申請專利範圍第71項所述之方法，其中該哺乳動物係投予至少兩次分別劑量的該表現載體。

73. 如申請專利範圍第71項所述之方法，其中肺溶素多胜肽或其抗原片段的投予為該表現載體投予後的至少1星期。

74. 一種組合物，其含有與非肺炎鏈球菌 (*non-Streptococcus pneumoniae*) 細菌多醣體共軛的多胜肽，其中該多胜肽包含肺炎鏈球菌肺溶素蛋白質的至少400連續胺基酸的片段所構成，該多胜肽缺乏胺基酸序列KVEND(序列識別號:22)，該多胜肽缺乏溶血活性，以及該組合物在



## 六、申請專利範圍

投予哺乳動物時會引起抗非肺炎鏈球菌的免疫反應。

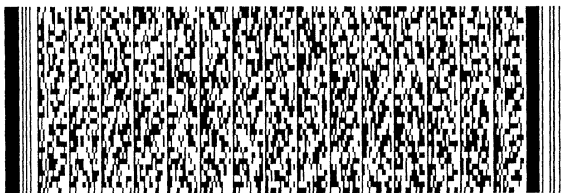
75. 如申請專利範圍第74項所述之組合物，其中該非肺炎鏈球菌選自肺炎球菌；流行性感冒嗜血桿菌b型；腦膜炎球菌A、B、或C群；以及B群鏈球菌Ia、Ib、II、III、V或VIII型所組成之族群。

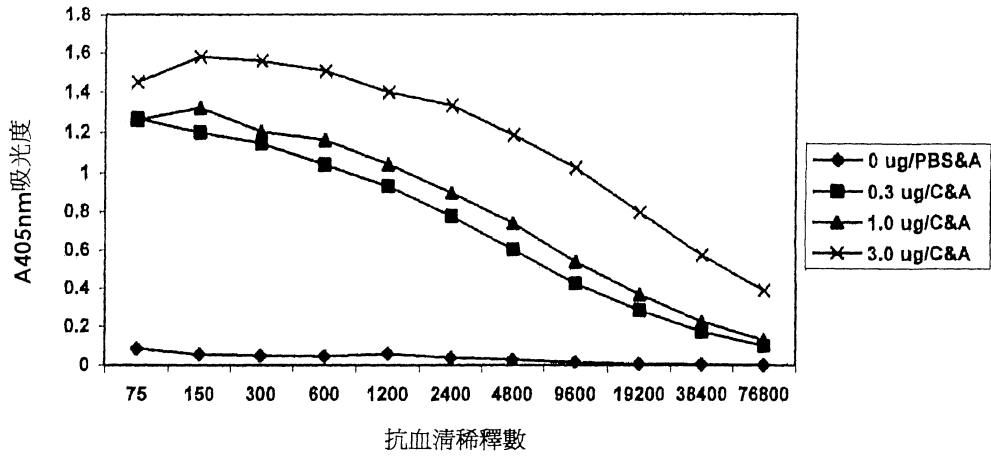
76. 一種引發哺乳動物體內免疫反應的方法，其包含投予哺乳動物一定量的如申請專利範圍第74項所述之組合物，以有效於引起對抗非肺炎鏈球菌的免疫反應。

77. 如申請專利範圍第76項所述之方法，其中該非肺炎鏈球菌選自肺炎球菌；流行性感冒嗜血桿菌b型；腦膜炎球菌A、B、或C群；以及B群鏈球菌Ia、Ib、II、III、V或VIII型所組成之族群。

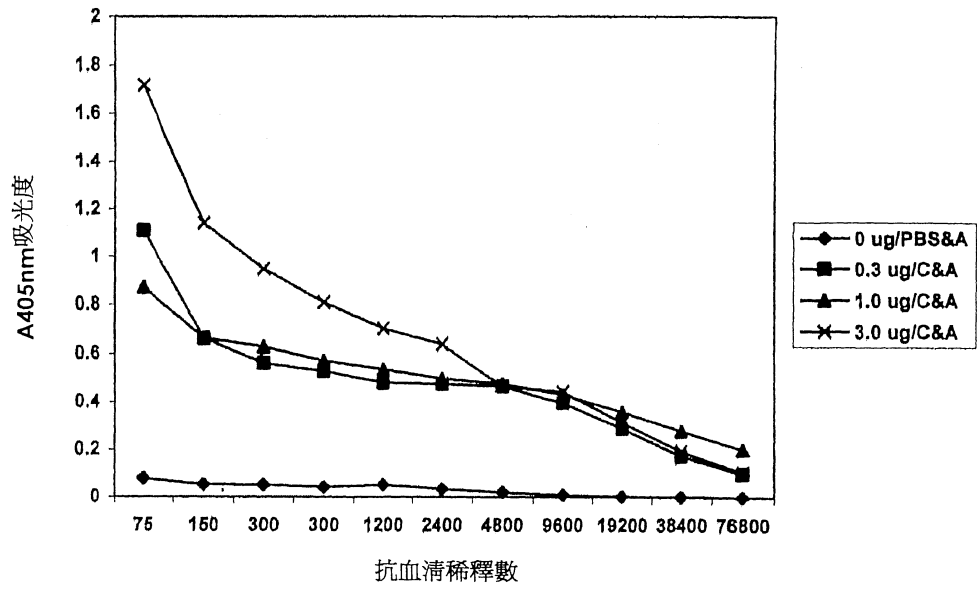
78. 一種純化抗體，其係連接於申請專利範圍第1項所述之組合物上。

79. 一種治療或預防哺乳動物肺炎鏈球菌感染的方法，其包含投予該哺乳動物治療性或預防性有效量的純化抗體，該純化抗體連接於申請專利範圍第1項所述之組合物上。

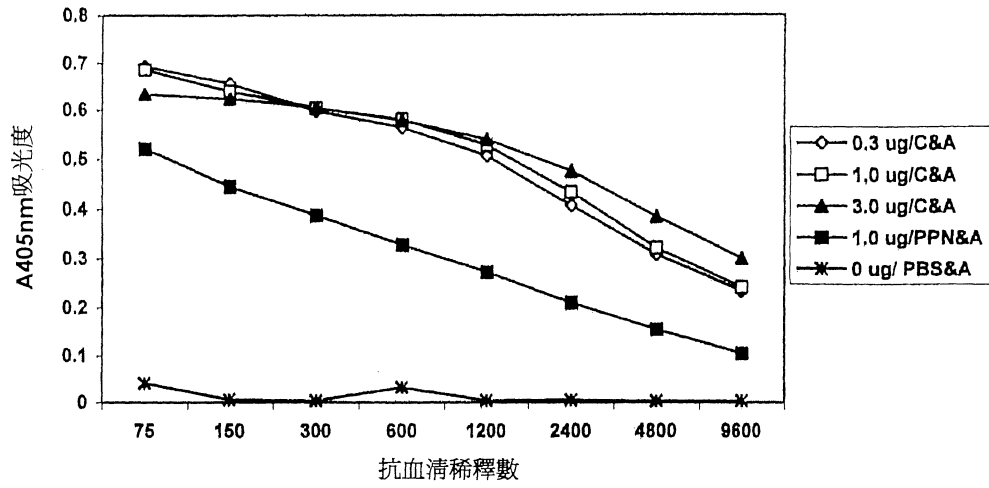




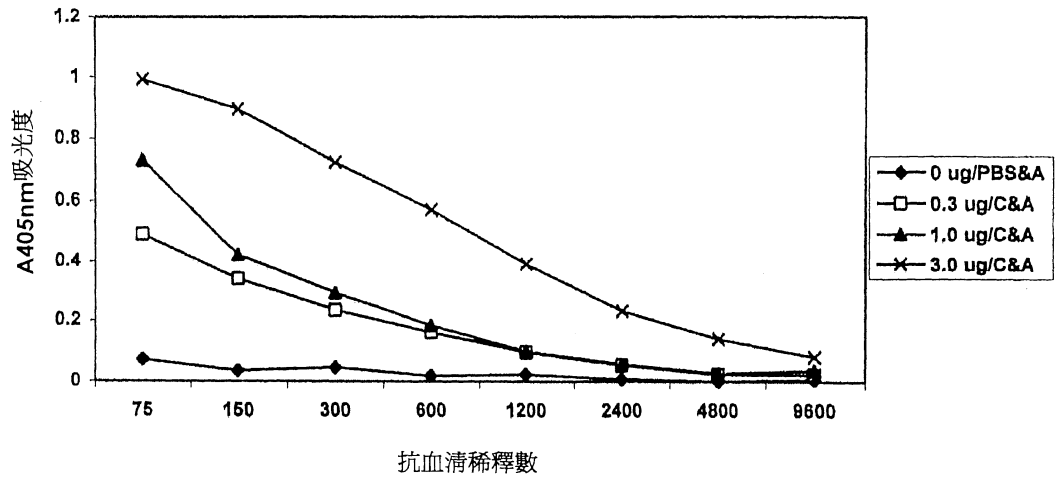
第1圖



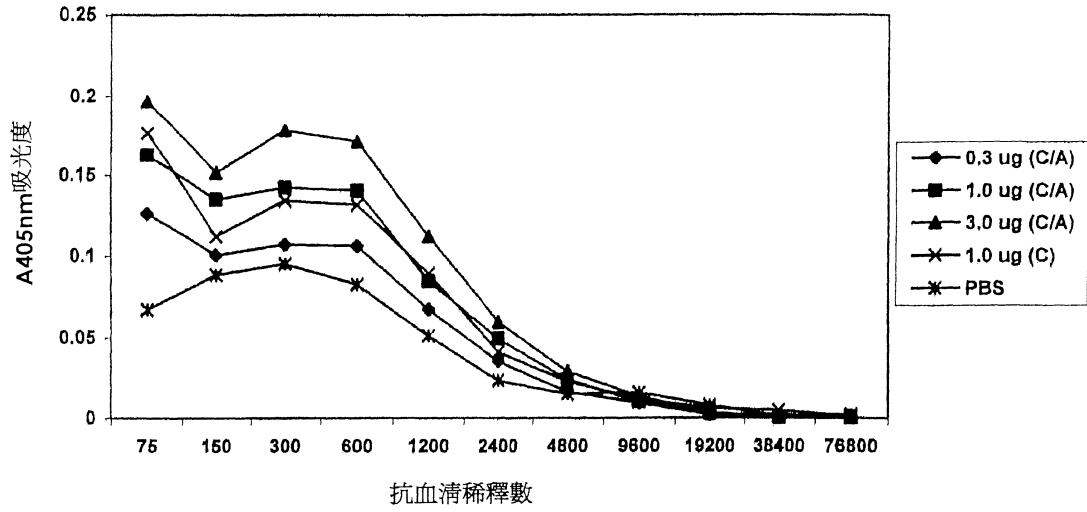
第2圖



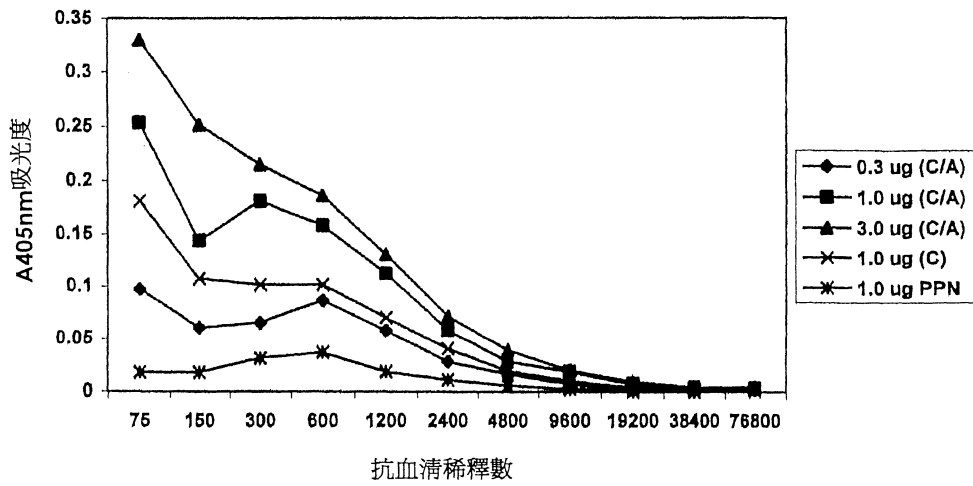
第3圖



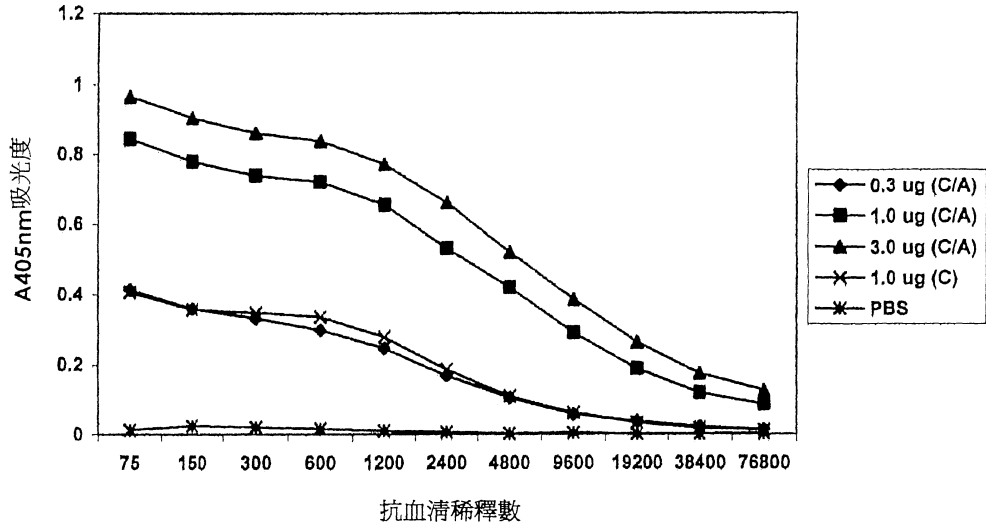
第4圖



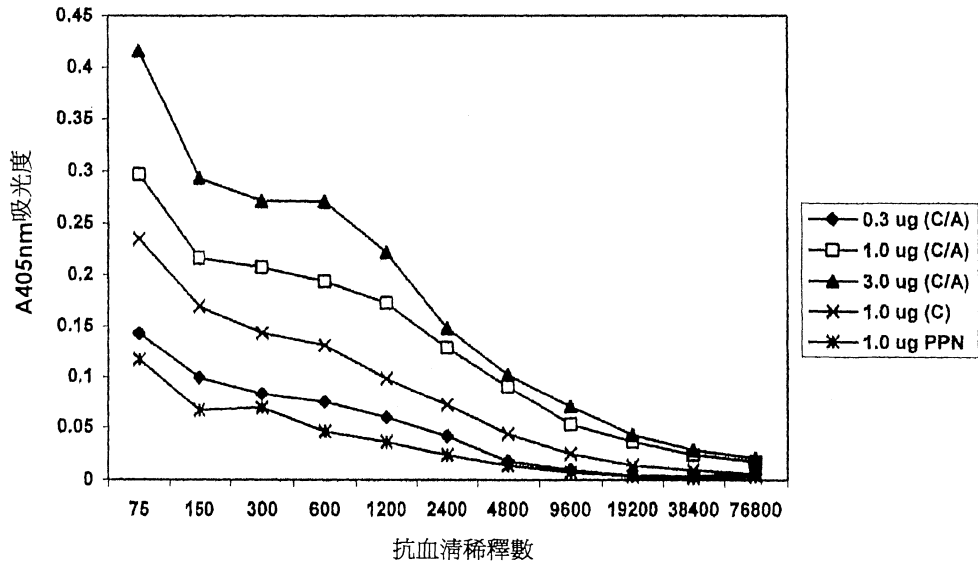
第5圖



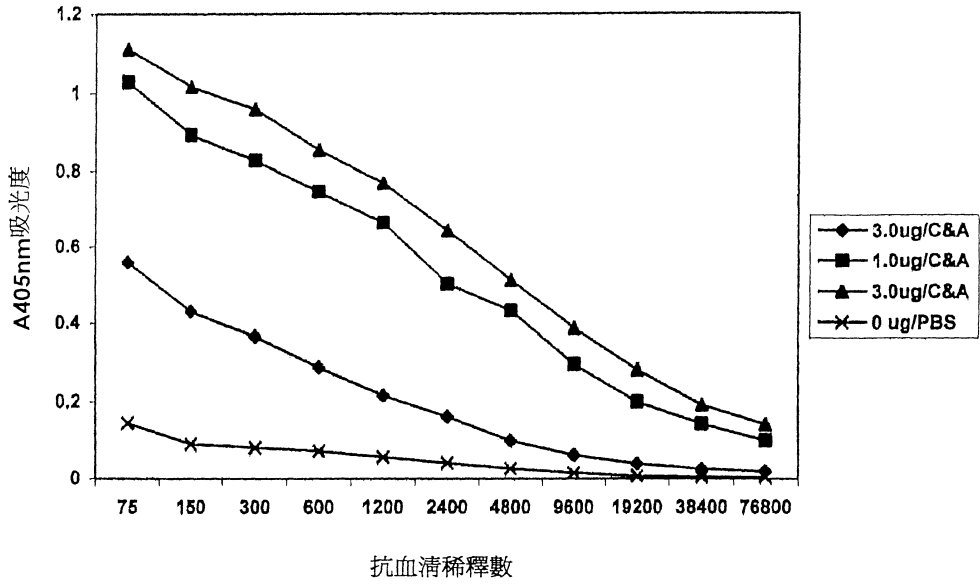
第6圖



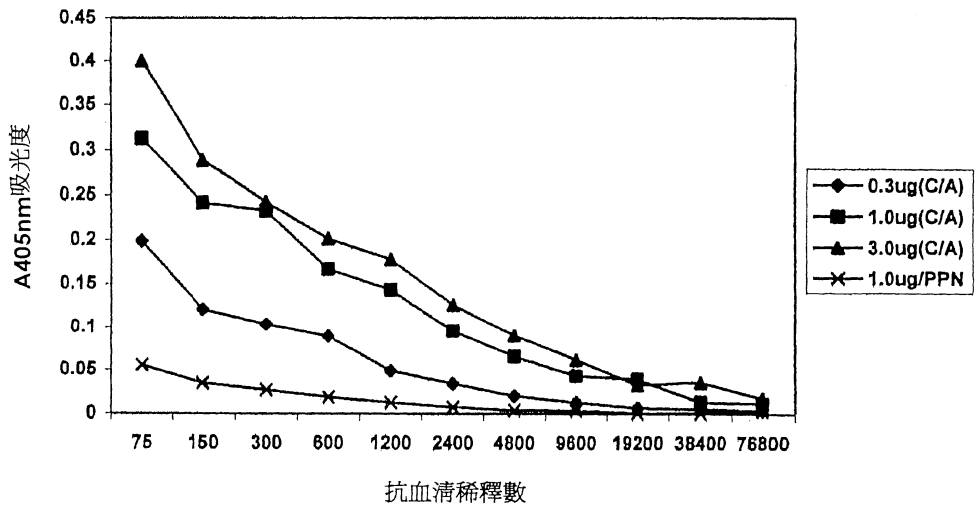
第7圖



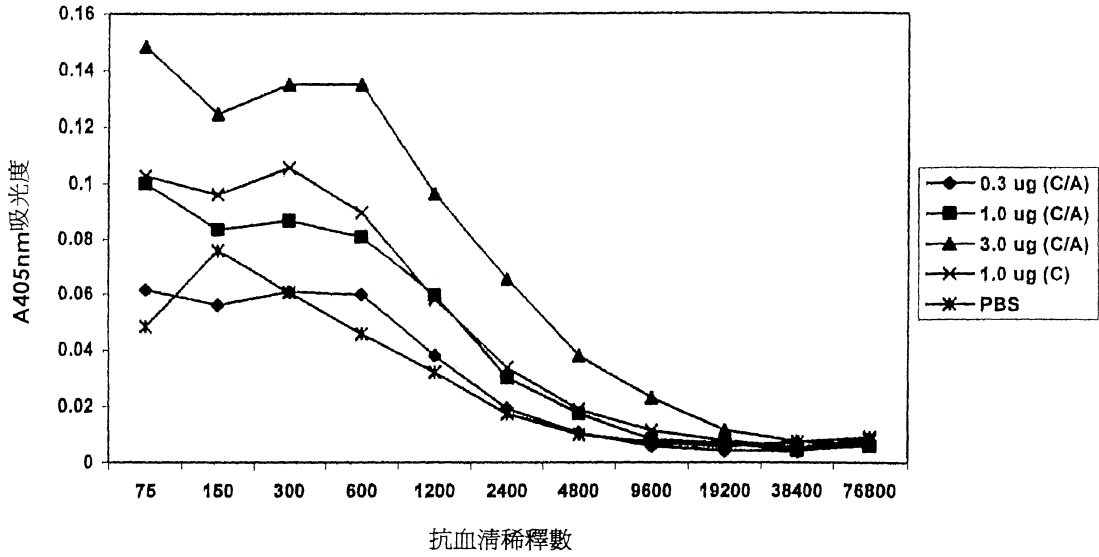
第8圖



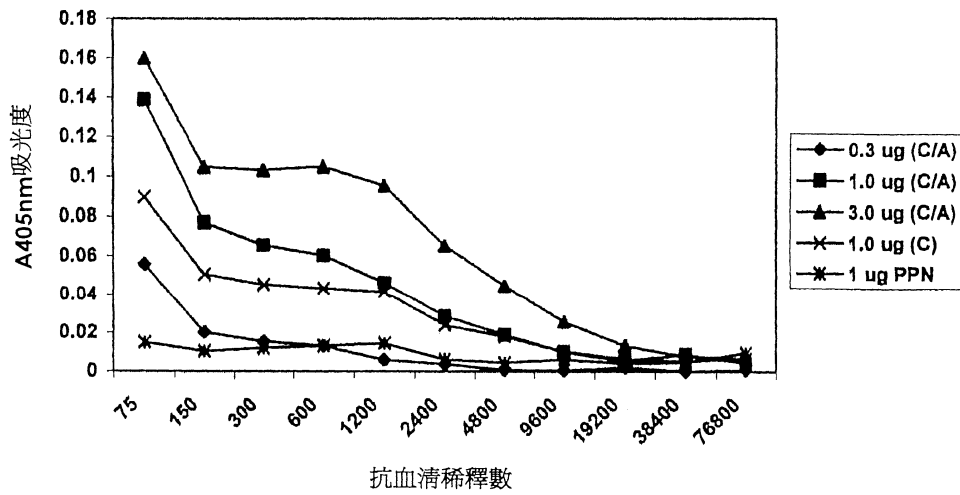
第9圖



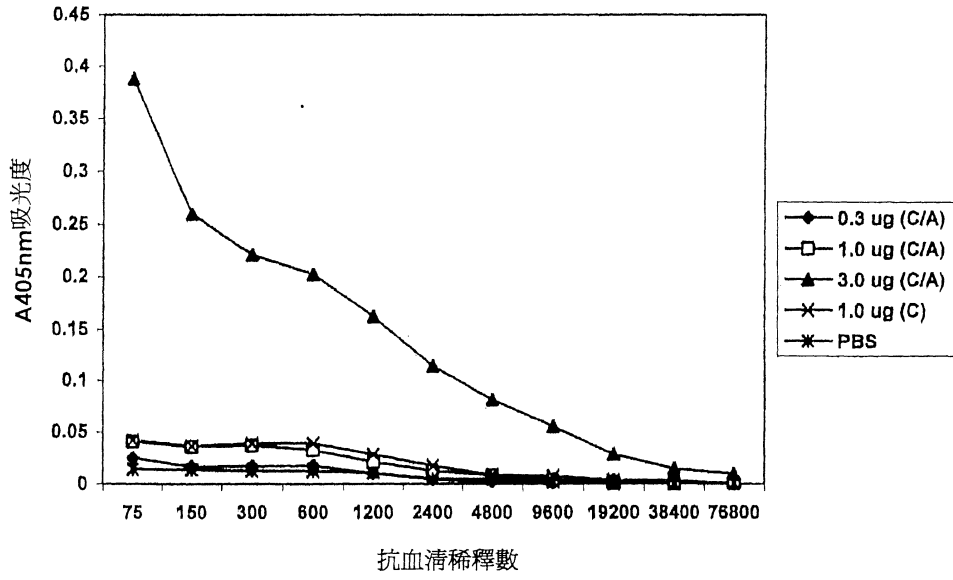
第10圖



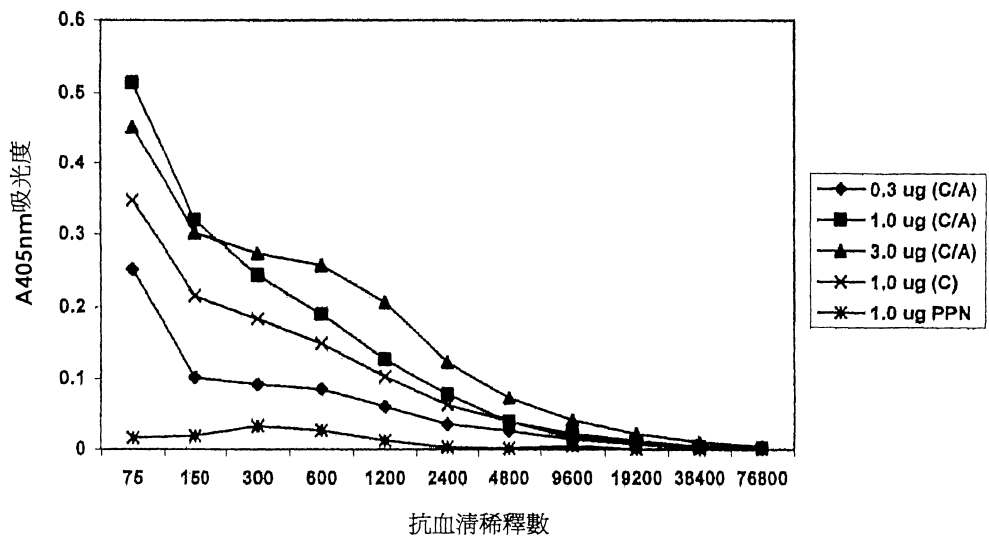
第11圖



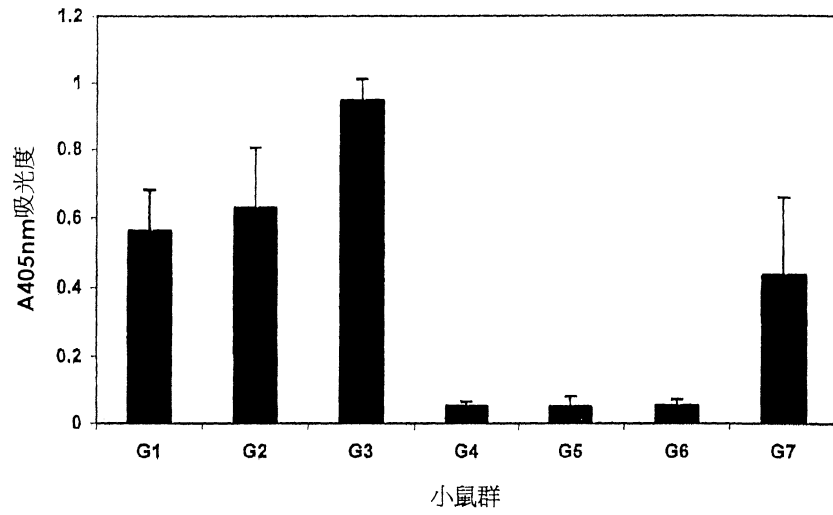
第12圖



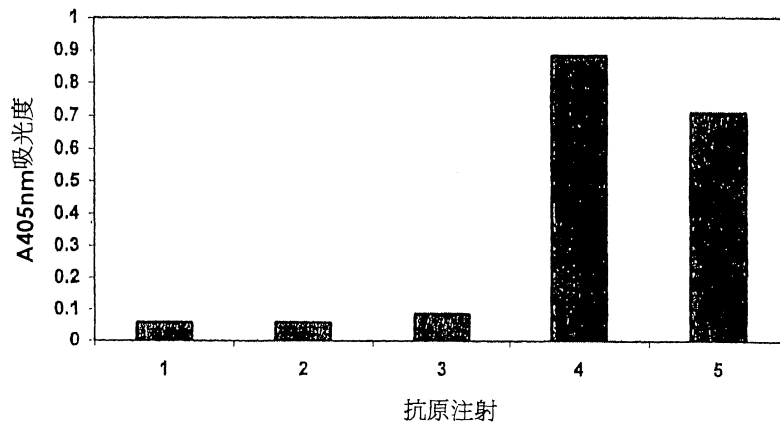
第13圖



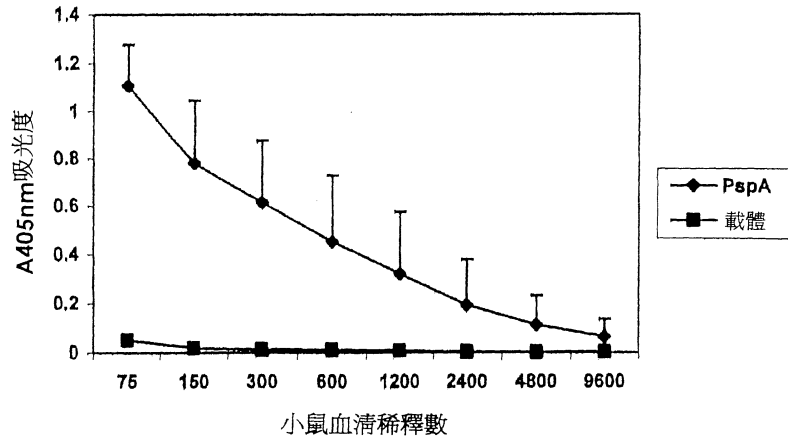
第14圖



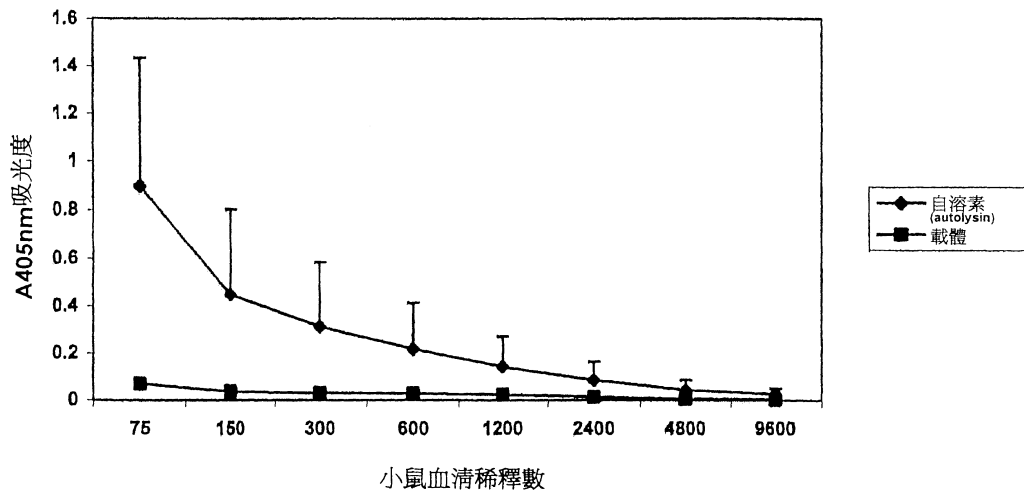
第15圖



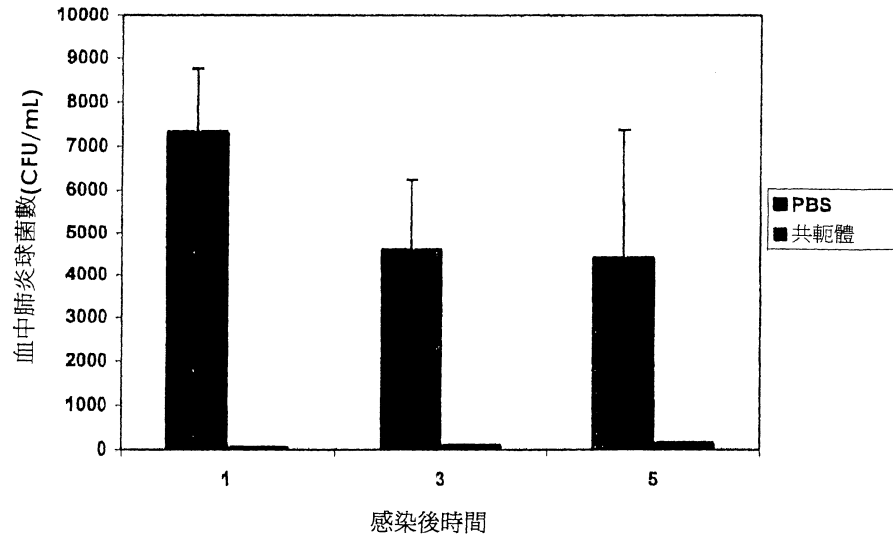
第16圖



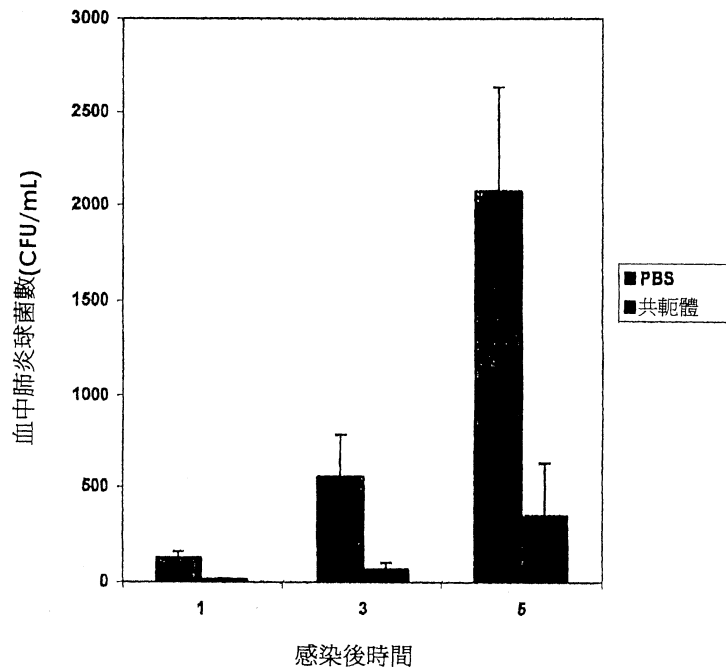
第17圖



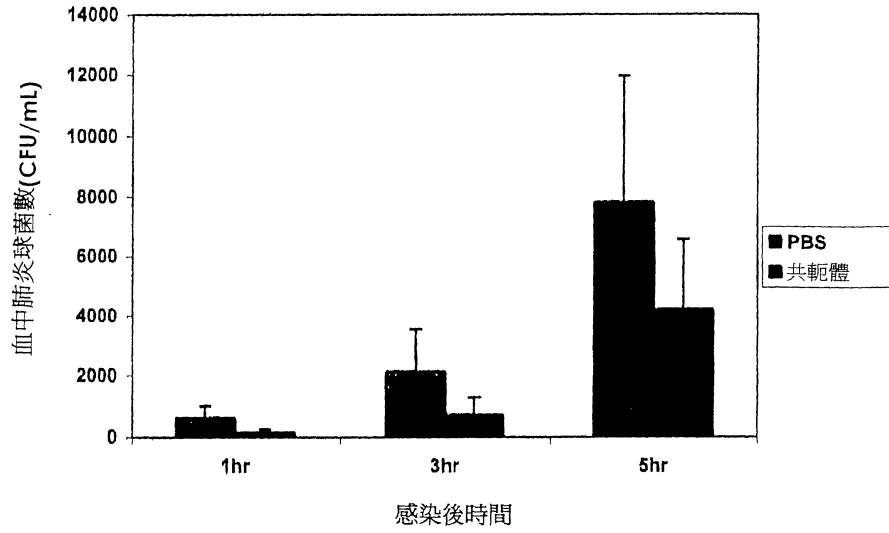
第18圖



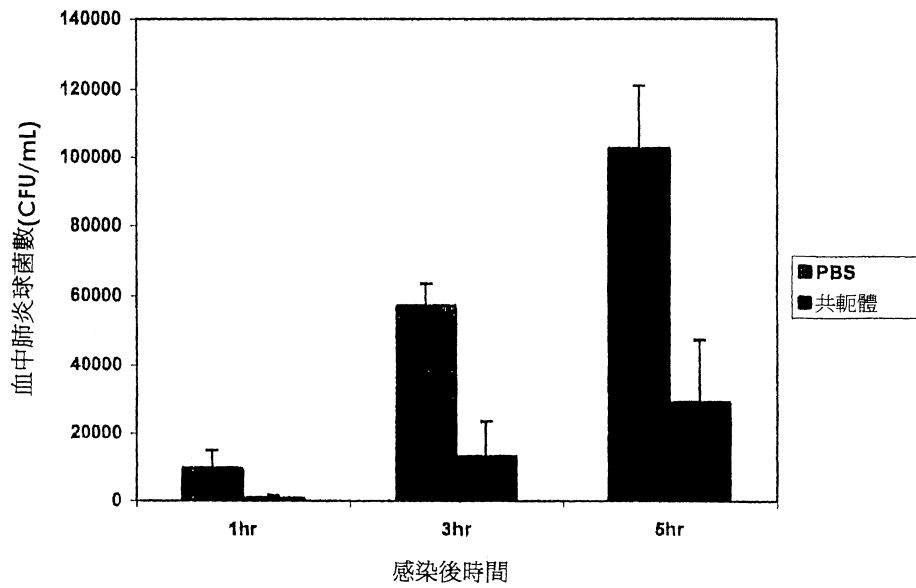
第19圖



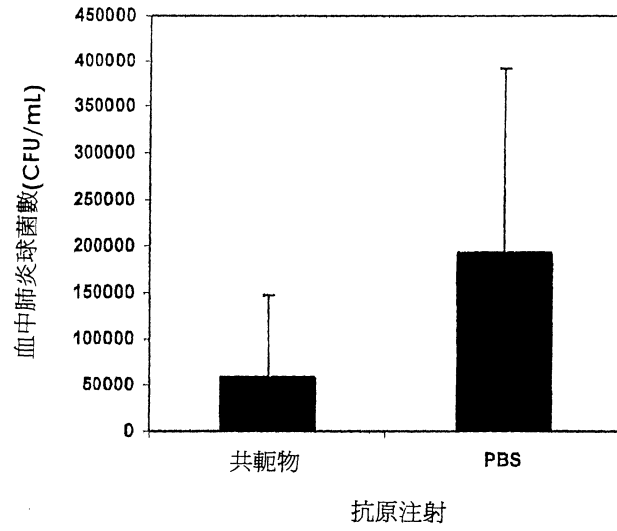
第20圖



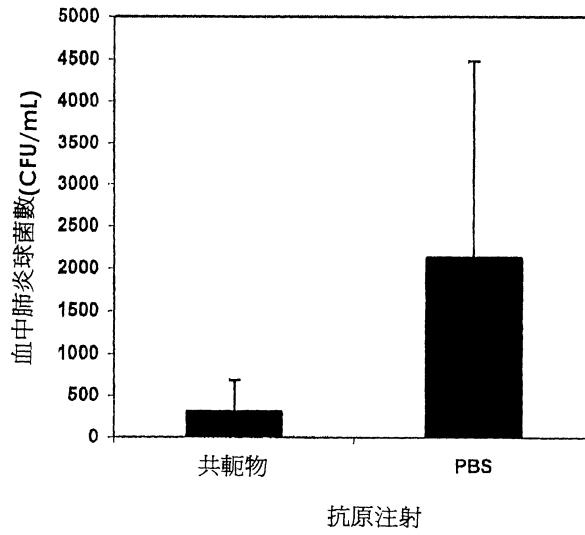
第21圖



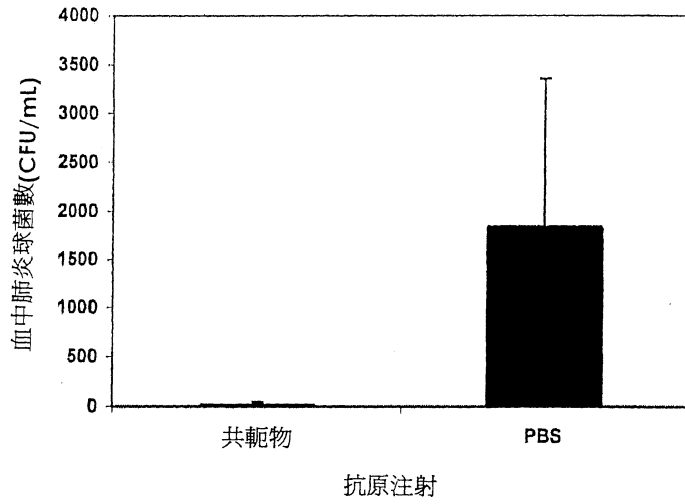
第22圖



第23圖



第24圖



第25圖

六、指定代表圖

(一)、本案代表圖為：第1圖

(二)、本案代表圖之元件代表符號簡單說明：無

