



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201440786 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：103108076 (22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 07 日
(51)Int. Cl. : *A61K39/10 (2006.01)* *A61P37/04 (2006.01)*
(30)優先權：2013/03/08 美國 61/774,993
2013/05/27 歐洲專利局 13169328.5
(71)申請人：庫賽爾荷蘭公司 (荷蘭) CRUCCELL HOLLAND B. V. (NL)
荷蘭
(72)發明人：普爾門 珍 休尼斯 POOLMAN, JAN THEUNIS (NL)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：3 共 46 頁

(54)名稱

無細胞百日咳疫苗

ACELLULAR PERTUSSIS VACCINE

(57)摘要

本發明涉及一種無細胞百日咳(aP)疫苗組合物,包含百日咳博多特氏菌抗原百日咳類毒素(PT)、絲狀血凝素(FHA)、以及 2 型和 3 型菌毛(FIM)、和隨意地百日咳桿菌粘附素(PRN),其中 FIM 係以每一人類劑量 12-100 µg 之量存在。

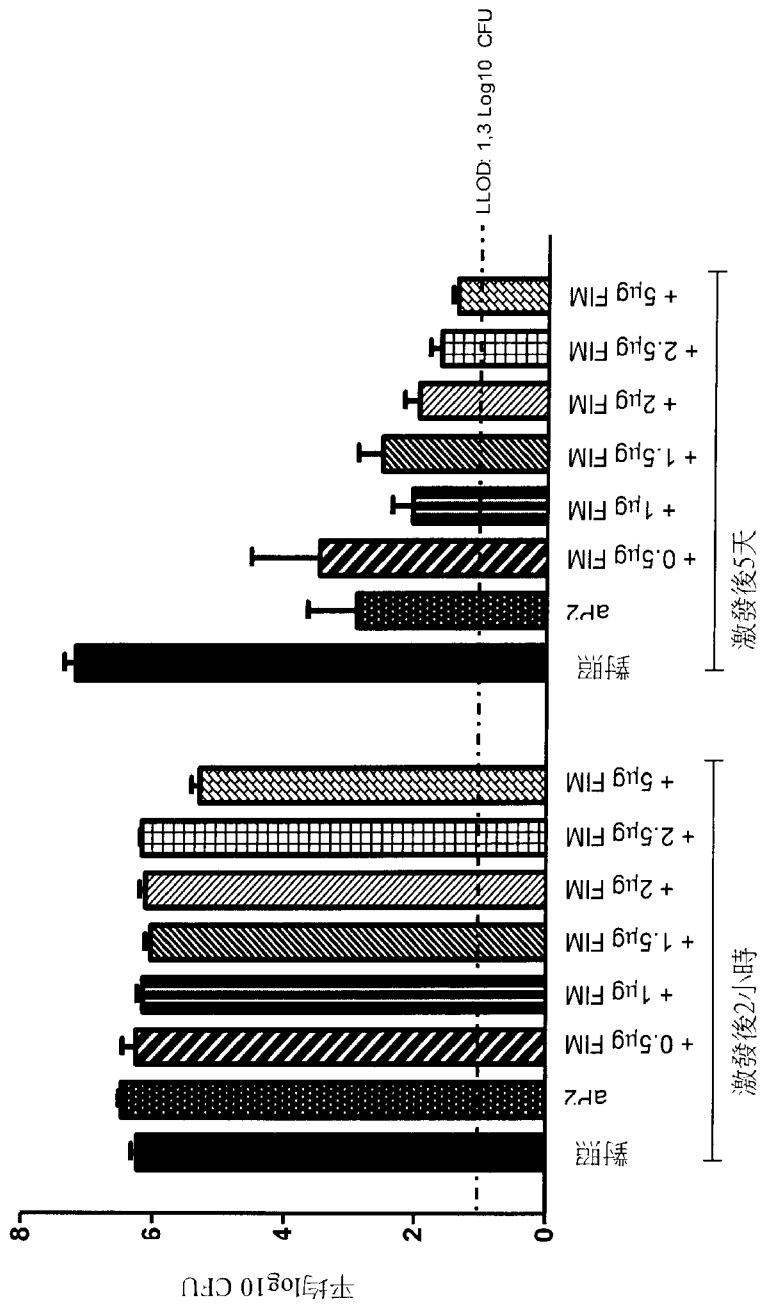


圖 2



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201440786 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：103108076 (22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 03 月 07 日
(51)Int. Cl. : *A61K39/10 (2006.01)* *A61P37/04 (2006.01)*
(30)優先權：2013/03/08 美國 61/774,993
2013/05/27 歐洲專利局 13169328.5
(71)申請人：庫賽爾荷蘭公司 (荷蘭) CRUCCELL HOLLAND B. V. (NL)
荷蘭
(72)發明人：普爾門 珍 休尼斯 POOLMAN, JAN THEUNIS (NL)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：3 共 46 頁

(54)名稱

無細胞百日咳疫苗

ACELLULAR PERTUSSIS VACCINE

(57)摘要

本發明涉及一種無細胞百日咳(aP)疫苗組合物,包含百日咳博多特氏菌抗原百日咳類毒素(PT)、絲狀血凝素(FHA)、以及 2 型和 3 型菌毛(FIM)、和隨意地百日咳桿菌粘附素(PRN),其中 FIM 係以每一人類劑量 12-100 μg 之量存在。

發明摘要

※ 申請案號：103108076

※ 申請日 103. 3. - 7

※IPC 分類：A61K 39/10 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

無細胞百日咳疫苗

ACELLULAR PERTUSSIS VACCINE

【中文】

本發明涉及一種無細胞百日咳 (aP) 疫苗組合物，包含百日咳博多特氏菌抗原百日咳類毒素 (PT)、絲狀血凝素 (FHA)、以及2型和3型菌毛 (FIM) 和隨意地百日咳桿菌粘附素 (PRN)，其中FIM係以每一人類劑量12-100 μ g之量存在。

【英文】

The invention relates to an acellular pertussis (aP) vaccine composition comprising *Bordetella pertussis* antigens pertussis toxoid (PT), filamentous hemagglutinin (FHA), and fimbriae types 2 and 3 (FIM), and optionally pertactin (PRN), wherein FIM is present in an amount of 12-100 μ g per human dose.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

（無元件符號說明）

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

無細胞百日咳疫苗

ACELLULAR PERTUSSIS VACCINE

【發明所屬之技術領域】

本發明涉及健康護理領域。更確切地說，本發明涉及無細胞百日咳 (acellular pertussis) 疫苗領域。

【先前技術】

百日咳博多特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 係百日咳 (whooping cough) 之病原體。在 1940 年代引入已殺死的全細胞百日咳博多特氏菌 (wP) 疫苗已成功降低了兒童和嬰兒因百日咳所導致的發病率和死亡率 [http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/pert.pdf ; 比斯加德 (Bisgard) , K.M. http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pertussisguide/downloads/chapter1.pdf. 2000 ; 愛德華 (Edwards) , K.M.和德克爾 (Decker) , M.D. 百日咳疫苗 (Pertussis vaccines) . 見《疫苗》(*Vaccines*)(編輯普洛特金 (Plotkin) , S.A., 奧倫斯坦 (Orenstein) , W.A.以及奧菲特 (Offit) , P.A.) 愛思唯爾健康科學出版社 (Elsevier Health Sciences) , 2008. 467-517 ; 這一讀本在下文被稱為“《疫苗》，普洛特金 2008”]。儘管如此，在世界範圍內，

百日咳仍為兒童中的重要問題。來自 WHO 的評估表明，在 2008 年發生了約 1,600 萬例百日咳，並且約 195,000 名兒童死于這一疾病。

自 1990 年代以來，wP 疫苗已在大部分高收入國家並且近年來也在一些中等收入國家被無細胞百日咳 (aP) 疫苗替換。無細胞百日咳疫苗與 wP 疫苗相比誘發相對更少的副作用，該等 wP 疫苗與發燒 ($\geq 38^{\circ}\text{C}$)、在注射部位之反應原性以及(儘管程度較小)驚厥和低滲性低應答間期(hypotonic-hypo-responsive episode) 的高風險相關 [張 (Zhang)，科克倫系統綜述數據庫 (*Cochrane Database Syst Rev*) 2011]。

在引入 aP 疫苗後十到二十年，青少年和成人百日咳通報升高已被若干國家報導，包括 US、UK、澳大利亞、挪威以及荷蘭。可能的解釋包括已改善之診斷和監測、循環百日咳博多特氏菌菌株適應成疫苗、和/或與 aP 疫苗相關的免疫性減弱之增加 [田中 (Tanaka)，*《美國醫學會雜誌》* (*Jama*) 2003, 290: 2968-2975 ; 佐藤 (Satoh)，*《比較免疫學、微生物學與傳染病》* (*Comp Immunol Microbiol Infect Dis*) 2010, 33: e81-88 ; 策普 (Zepp)，*《柳葉刀傳染病》* (*Lancet Infect Dis*) 2011 ; 德格裡夫 (De Greeff)，*《第一公共科學圖書館》* (*PLoS One*) 2010, : e14183 ; 談 (Tan)，*《兒科傳染病雜誌》* (*Pediatr Infect Dis J*) 2005, 24 (5 增刊): S10-18]。

目前，所有被許可的 aP 疫苗由最少一種、但多數情況係多種、直到最多五種 (已被脫毒的) 百日咳博多特氏菌毒力因數組成。所有 aP 疫苗含有百日咳類毒素 (PT)。多組分 aP 疫苗至少包括 PT 和百日咳博多特氏菌表面粘附素

絲狀血凝素 (FHA)。在價數增加情況下，另外存在粘附素百日咳桿菌粘附素 (PRN) 和 2 型和 3 型菌毛 (FIM2 和 FIM3，在此合起來稱為 FIM 或 FIM2/3) 中的一種或多種 [愛德華, 見《疫苗》，普洛特金, 2008. 467-517]。

WO 96/34883 描述了每一人類劑量 1-10 μg FIM 之劑量，以 aP 疫苗中每一人類劑量 10 和 5 μg 之劑量為例，而實際上僅測試每一人類劑量 5 μg 之劑量，並且測試疫苗被認為有效。

普遍認為 aP5 疫苗 (具有五種組分 PT、FHA、PRN、FIM2/3 的無細胞百日咳疫苗；DTaP5 為進一步包含破傷風類毒素和白喉類毒素之 aP5 疫苗) 為當前可獲得的最有效 aP 疫苗。可購得的已註冊 aP5 疫苗中存在的 aP 組分之單獨量(以每一人類劑量的微克數為單位) 2.5-20 PT、5-20 FHA、3 PRN 以及 5 FIM。

在 1990 年代中期歐洲進行的若干無細胞百日咳疫苗功效試驗中，嘗試測定單獨 aP 疫苗組分的保護的免疫相關性。使用來自瑞典 DTaP5 (PT+FHA+PRN+FIM2/3) 試驗之數據，證明了臨床保護與暴露前血清中的針對 PRN、FIM2 以及 PT (而不是針對 FHA) 的 IgG 抗體的存在之間的統計學上顯著的相關性 [斯托薩特 (Storsaeter), 《疫苗》1998, 16: 1907-1916]。FIM3 似乎為 DTaP5 內的非保護組分 [波曼 (Poolman), 《疫苗專家評論》(Expert Reviews Vaccines) 2007, 6: 47-56]。

在德國從來自疫苗試驗的受試者所採集的血清允許評估與保護相關的針對 PT、FHA、PRN 以及 FIM2 的抗體之具體水平，它顯示僅針對 PRN 和 PT 的抗體與保護顯著相關 [斯蒂爾 (Stehr), 1998, 《兒科學》(Pediatrics) 101:

1-11 ; 徹麗 (Cherry), 1998, 《疫苗》 16: 1901-1906]。此外，臨床前研究已顯示，添加 PRN 增強了在鼠類鼻內感染模型中由含有 PT 和 FHA 的疫苗所賦予的保護水平 [吉索 (Guiso), 1999, 《疫苗》 17: 2366-2376 ; 德諾埃 (DeNoel), 2005, 《疫苗》 23: 5333-5341] 並且針對 PRN 的抗體係調理吞噬百日咳博多特氏菌的關鍵 [赫爾維希 (Hellwig), 2003, 《傳染病雜誌》(*JID*) 188: 738-742]。該等數據合起來表明 PT 和 PRN 為當前無細胞百日咳疫苗的主要保護性抗原。

作為前瞻性 aP 疫苗功效試驗的一部分，歷經 18 個月時間，測量了從參與者獲得的連續血清樣品中的針對 PT、FHA、PRN 以及 FIM2/3 的保護性 IgG。歷經 18 個月，針對 PT 的 IgG 衰減之百分比最強 (幾何平均 IgG 效價減少 73%) 並且顯著高於針對 PRN、FHA 以及 FIM 的抗體減少的百分比。相比之下，針對 PRN 的 IgG 抗體具有最低衰減率 (幾何平均 IgG 效價減少 56%) [萊 (Le), 2004, 《傳染病雜誌》, 190: 535-544]。

組合 1) PT 和 PRN 為 aP 疫苗中的主要保護性抗原和 2) 針對 PT 的抗體具有比針對 PRN 的抗體顯著更高的衰減率這兩個觀察結果，突出了抗 PRN 抗體為提供 aP 介導的針對百日咳博多特氏菌感染的長期保護的關鍵。

然而，在過去幾年中，已在全世界觀察到不表達 PRN 的百日咳博多特氏菌菌株之出現，例如在法國、日本、荷蘭、USA、芬蘭、挪威以及瑞典 [布歇 (Bouchez), 2009, 《疫苗》 27: 6034-41 ; 黑格勒 (Hegerle), 2012, 《臨床微生物學和感染》(*Clin. Microbiol. Infect.*) 18: E340-346 ; 大塚 (Otsuka), 2012, 《第一公共科學圖書館》 7: e31985 ; 阿德瓦尼 (Advani), 2013, 《臨床微生物

學雜誌》(*J. Clin. Micro*) 51: 422-428]。美國最近一項研究顯示，在 2011 年和 2012 年間由來自在費城就醫的兒童的樣本所培養的百日咳博多特氏菌的 12 種分離株中的 11 種事實上為 PRN 陰性 [昆南 (Queenan), 2013, 《新英格蘭醫學雜誌》(*N Engl J Med.*) 368: 583-4]。目前不瞭解此菌株適應是否主要為疫苗推動的。有可能該等 PRN 陰性菌株可以避開疫苗誘發之免疫性，尤其在抗 PT 效價已衰退時，並且這已造成所觀察到的百日咳博多特氏菌疾病增加。

目前已被許可並銷售的 aP 疫苗因此似乎不夠有效，尤其針對新近出現的 PRN 陰性菌株。仍需要其他 aP 疫苗，該等 aP 疫苗具有特別是針對該等 PRN 陰性百日咳博多特氏菌菌株之改善功效。

【發明內容】

我們已意外發現包含高劑量 FIM2/3 的 aP 疫苗顯示顯著改善的抵抗 PRN 陰性百日咳博多特氏菌菌株之保護。本發明提供一種無細胞百日咳 (aP) 疫苗組合物，該疫苗組合物包含百日咳博多特氏菌抗原百日咳類毒素 (PT)、絲狀血凝素 (FHA) 以及 2 型和 3 型菌毛 (FIM) 和隨意地百日咳桿菌粘附素 (PRN)，其中 FIM 係以每一人類劑量 12-100 μg 之量存在。

在某些實施方式中，FIM 係以每一人類劑量 15-80、15-60、20-60、或 12-50、15-50、20-50、20-30、20-25、或 12-30、或 12-25、或約 13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 μg 之量存在。

在較佳的實施方式中，本發明之 aP 疫苗包含百日咳桿菌粘附素 (PRN)。

在某些實施方式中，PT 被基因地脫毒。

在某些實施方式中，本發明之組合物進一步包含來自除百日咳博多特氏菌以外的一種或多種病原體之抗原。

在其某些實施方式中，該等組合物包含以下一者或多者：

a) 破傷風類毒素；b) 白喉類毒素；c) b 型流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*) (Hib) 寡糖或多糖結合物；d) B 型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)；以及 e) 失活的脊髓灰質炎病毒 (IPV)。在某些實施方式中，本發明之組合物包含據本發明的無細胞百日咳疫苗組合物、破傷風類毒素以及白喉類毒素。

在某些實施方式中，根據本發明之組合物進一步包含一佐劑。在某些實施方式中，該佐劑包含鋁鹽，如磷酸鋁、氫氧化鋁、或磷酸鋁和氫氧化鋁兩者。

本發明還提供了一種在受試者中誘發抵抗百日咳博多特氏菌的免疫反應或對該受試者進行疫苗接種以抵抗百日咳博多特氏菌之方法，該方法包括給予該受試者根據本發明之組合物。

本發明還提供了一種保護受試者免受由百日咳博多特氏菌的 PRN 陰性菌株感染所引起的百日咳之方法，該方法包括給予該受試者根據本發明之組合物。

本發明還提供了根據本發明之組合物，用於藉由給予受試者該組合物在受試者中誘發抵抗百日咳博多特氏菌的免疫反應或對該受試者進行疫苗接種以抵抗百日咳博多特氏菌。本發明還提供了根據本發明之組合物，用於製備藉由給予受試者該組合物在受試者中誘發抵抗百日咳博多特氏菌的免疫反應或對

該受試者進行疫苗接種以抵抗百日咳博多特氏菌的藥劑。在某些實施方式中，需要免疫反應來抵抗的百日咳博多特氏菌包括 PRN 陰性菌株。

本發明還提供了一種對人類受試者進行疫苗接種以抵抗百日咳博多特氏菌、隨意地百日咳博多特氏菌的 PRN 陰性菌株之方法，該方法包括給予該受試者以下百日咳博多特氏菌抗原：百日咳類毒素 (PT)、絲狀血凝素 (FHA) 以及 2 型和 3 型菌毛 (FIM)、和隨意地百日咳桿菌粘附素 (PRN)，其中 FIM 係以 12-100 μg 的量給予。

【圖式簡單說明】

圖 1. 接種 DTaP5 疫苗 (aP5) 或 aP5 + FIM 之小鼠在鼻內激發後第 0 天、第 2 天、第 5 天以及第 8 天每一個肺的百日咳博多特氏菌的平均 \log_{10} CFU。小鼠在 4 周和 7 周齡時進行疫苗接種並且在 9 周時用不同的百日咳博多特氏菌菌株經鼻內激發：WHO 18323 (圖 1A)、一臨床 PRN 陰性分離株 PRN-STOP (圖 1B) 以及一臨床 PRN 陰性分離株 PRN-IS (圖 1C)。

* $p < 0.05$ 使用威爾科克森精確檢驗 (Wilcoxon Exact Test)，比較在接種 aP5 和 aP5 + FIM 後在每一特定時間點的平均 \log_{10} CFU 計數。

$p < 0.01$ 使用協方差分析，比較接種 aP5 和 aP5 + FIM 後從第 0 天到第 8 天的 \log_{10} CFU 反應-時間概況。

圖 2. 在 4 周和 7 周齡時接種 1/10 人類劑量的 aP2 疫苗外加漸增量的 FIM 後，在第 9 周用 PRN 陰性百日咳博多特氏菌菌株 I195 激發的小鼠的肺的平均

Log₁₀ CFU 計數。關於詳情，參見實例 2。

圖 3. 在 4 周和 7 周齡時接種添加或未添加 5 µg FIM 的 1/10 人類劑量的 aP5 疫苗後，在第 9 周用 4 種百日咳博多特氏菌菌株激發後 5 天的小鼠的肺的平均 Log₁₀ CFU 計數。關於詳情，參見實例 3。

發明之詳細說明

本發明涉及組合物，該等組合物包含已脫毒的百日咳博多特氏菌毒力因數，特別是百日咳類毒素(PT)、絲狀血凝素(FHA)以及 2 型和 3 型菌毛(FIM)，和隨意地百日咳桿菌粘附素 (PRN)，其中 FIM 係以每一人類劑量 12-100 µg 之量存在。該等組合物可被用作無細胞百日咳 (aP) 疫苗，並且在此被證明意外地比當前可獲得的業界最好 aP5 疫苗更有效。

具體來說，增加劑量的 FIM 與這一組分先前描述和推薦的劑量相比，產生與已銷售的 aP5 疫苗和其他已銷售的 aP 疫苗相比改善的針對新近出現的百日咳博多特氏菌 PRN 陰性菌株的疫苗效力。這是非常令人驚訝的，因為先前技術並未提供增加每一人類劑量的 FIM 的量超過推薦量 5 µg 之任何建議，並且該技術實際上提供了增加這一組分的量並不產生改善功效的建議。

已例如在人類和動物模型中研究增加疫苗中 FIM 的劑量的作用。在 17-19 個月大的嬰兒中，顯示出在具有 10 µg PT、5 µg FHA、3 µg PRN 以及 5 µg FIM2/3 或包括兩倍量的所有該等抗原的兩種 5 組分 aP 疫苗之間不存在不良反應頻率、抗體效價或免疫後平均倍數效價升高之差異 (哈爾珀林 (Halperin)，*《兒童和*

青少年醫學文獻》(*Arch Pedi Adol Med*) 1994, 148: 1220-1224)。

在動物模型中，發現當小鼠接種三個種類的含有不同量 FIM 的百日咳疫苗時，體重、脾臟重量、外周白細胞計數以及肺的百日咳博多特氏菌之清除率不存在差異 (諸熊 (Morokuma) , 《生物學標準化的發展》(*Devel Biol Stand*) 1991, 73: 223-232)。

另一研究顯示，接受高劑量(20 μg)或低劑量(4 μg)的重組 FIM2 或 FIM3 的小鼠之間的 IgG 抗體水平不存在差異。鼻內激發七天后，對照小鼠、接種 FIM2 的小鼠或接種 FIM3 的小鼠的肺的細菌接種量不存在差異 (徐 (Xu) , 《BMC 微生物學》(*BMC Microbiology*) 2009, 9:274-281)。

我們關於在小鼠鼻咽激發模型中使用高劑量 FIM 接種的功效增加之發現因此非常令人驚訝。

因此，先前技術中不存在增加 aP 疫苗中 FIM 的量超過常用量會產生針對新近出現的 PRN 陰性突變體菌株的改善功效之指示或建議。

如在此使用的“人類劑量”(有時稱為“單次人類劑量”) 意思指在單次給藥中給予人類的疫苗之量。典型地，這一量係以 0.1-2 ml，例如 0.2-1 ml，典型地 0.5 ml 的體積存在。指定量可因此例如以每 0.5 ml 原液疫苗的微克數的濃度存在。在某些實施方式中，(單次) 人類劑量因此等於 0.5 ml。

正在銷售或已銷售的若干 aP 疫苗的組分描述於“《疫苗》第 5 版. S. 普洛特金, W. 奧倫斯坦, P. 奧菲特, 2008, 第 2 部分, 第 21 章 “百日咳疫苗”, K.M. 愛德華和 M.D. 德克爾. 第 467-517 頁的表 21-3 和 21-4 中，該文獻係藉由引用

結合在此。本發明之 aP 疫苗組合物包含 PT、FHA 以及 FIM2/3，且較佳的是 PRN。該等組分係多種已銷售 aP 疫苗的標準組分，並且可購自不同製造商(參見例如《疫苗》，普洛特金 2008 的第 21 章的表 21-3)，並且例如可購自李斯特生物實驗室公司 (List Biological Laboratories, Inc) (加利福尼亞州坎貝爾 (Campbell, California))。本發明之組合物包含已脫毒的百日咳毒素，也稱為百日咳類毒素 (PT)。PT 可被化學地或基因地脫毒。化學地脫毒可例如藉由多種常規化學脫毒方法中的任一種來進行，如用甲醛、過氧化氫、四硝基甲烷或戊二醛處理。舉例來說，脫毒可如 WO 96/34883 第 17 頁和實例 3 所述來進行，該文獻係藉由引用結合在此。在某些較佳的實施方式中，PT 被基因地脫毒。這可藉由在百日咳毒素基因中進行突變以使百日咳毒素的催化亞單位 S1 的酶促活性失活來完成，並且已例如被描述於 US 7,144,576、US 7,666,436 以及 US 7,427,404 中。使百日咳毒素脫毒的特別有利的突變被例如提供於 US 7,427,404 中，該文獻係藉由引用結合在此。一特別有利的實施方式係一種百日咳毒素，其中 S1 亞單位中百日咳全毒素胺基酸序列中的胺基酸殘基 Glu129 被 Gly 取代 (E129G) 並且 Arg9 被 Lys 取代 (R9K) (美國專利 7,427,404 ; 布斯裡 (Buasri), 《BMC 微生物學》 2012, 12 : 61)。該等被基因地脫毒的 PT (E129G、R9K) 還可便利地從被基因工程改造的顯示這一 PT 生產增強的菌株中分離出 [布斯裡, 2012, 同上]。使用被基因地脫毒的突變體的優勢為不使用或較少使用脫毒所需的危險化學品、改善 PT 抗原的抗原決定基的保存並且因此與其他的免疫反應更好、和/或可用於疫苗的抗原之量降低。在其他實施方式中，PT 被化學地脫

毒。被化學地或基因地脫毒的 PT 被廣泛用於 aP 疫苗中(參見例如《疫苗》，普洛特金 2008 的第 21 章的表 21-3)。PT 可例如如 WO 96/34883 的第 16 頁和實例 2 中所述來獲得並且純化，該文獻係藉由引用結合在此。PT 還可使用如例如 US5085862、WO96/34623、US4705868、EP0336736、WO9115505、EP0306318、EP0322533、EP0396964、EP0275689、WO91/12020、EP0427462、WO9819702 以及 US4784589 中所述的方法來獲得，該等文獻各自是藉由引用結合在此。

被化學地或基因地脫毒的 PT 可購自多種商業來源。在某些實施方式中，根據本發明的疫苗中 PT 的量為每一人類劑量(典型地為 0.5 ml)2-50 μg 、5-40 μg 、10-30 μg 或 20-25 μg 。

根據本發明之組合物在某些實施方式中包含百日咳桿菌粘附素 (PRN)，百日咳博多特氏菌的 69 kD 外膜蛋白 (因此有時也稱為 69K 抗原)。PRN 可例如如 WO 96/34883 的第 18-19 頁和實例 2 中所述來獲得並且純化，該文獻係藉由引用結合在此。它還可例如如 EP0162639、EP0484621、US6444211、US5276142、US5101014、EP0336736、WO96/34623、WO90/16651 以及 WO90/56076 中所述來獲得，該等文獻都是藉由引用結合在此。PRN 也可便利地從已被基因工程改造以表達高水平的 PRN 的百日咳博多特氏菌菌株中分離出，如例如 [布斯裡, 2012, 同上] 中所述。

在某些實施方式中，根據本發明的疫苗中 PRN 的量為每一人類劑量 (典型地為 0.5 ml)0.5-100 μg 、1-50 μg 、2-20 μg 、3-30 μg 、5-20 μg 或 6-10 μg [參見例如 EP 0928198]。

根據本發明之組合物包含絲狀血凝素 (FHA)；百日咳博多特氏菌的一重要的 230-kDa 粘附素，該粘附素對於百日咳博多特氏菌粘附於呼吸道宿主睫狀上皮細胞來說是重要的；以及已銷售的多價 aP 疫苗中的一確定組分。FHA 可例如如 WO 96/34883 的第 17-18 頁和實例 2 中所述來獲得並且純化，該文獻係藉由引用結合在此。FHA 還可例如如 WO9013313、EP0484621、WO9634623、EP0336736、WO9115505、US4784589 以及 WO9004641 中所述來獲得，該等文獻都是藉由引用結合在此。

在某些實施方式中，根據本發明的疫苗中 FHA 的量為每一人類劑量 (典型地為 0.5 ml) 2-50 μg 、5-40 μg 、10-30 μg 或 20-25 μg 。

根據本發明之組合物包含菌毛凝集原 2 和 3，也稱為菌毛 2 和 3 或凝集原 2 和 3 或 Agg 2 和 3 (在此稱為 FIM2 和 FIM3，或“FIM”或“FIM2/3”，它係呈混合物形式的 FIM2 和 FIM3 的一組合)。典型地，在根據本發明之組合物中，FIM 2 與 FIM 3 的重量比係從約 1:3 到約 3:1，例如從約 1:1 到約 3:1，例如從約 1.5:1 到約 2:1。FIM 的製備被詳細描述於 WO 96/34883 的第 12-13 頁和實例 2 中，該文獻係藉由引用結合在此。FIM 還可例如如 WO9634623、US4784589、US6475754、EP0555894、WO9858668 以及 WO0207764 中所述來獲得，該等文獻都是藉由引用結合在此。

根據本發明的疫苗中 FIM 的量為每一人類劑量 (典型地為 0.5 ml) 12-100 μg 。在某些實施方式中，這一量為每一人類劑量 (典型地為 0.5 ml) 12-50 μg 或 12-30 μg 。在本發明的較佳的實施方式中，FIM 的量為每一人類劑量 (典型

地為 0.5 ml) 至少 15 μg 。在某些實施方式中，這一量為每一人類劑量 (典型地為 0.5 ml) 15-100 μg 、15-80 μg 、15-60 μg 、15-50 μg 、15-30 μg 或 15-25 μg 。在本發明的其他較佳的實施方式中，FIM 的量為每一人類劑量 (典型地為 0.5 ml) 至少 20 μg 。在某些實施方式中，這一量為每一人類劑量 (典型地為 0.5 ml) 20-100 μg 、20-80 μg 、20-60 μg 、20-50 μg 、20-30 μg 、20-25 μg 或 25-50 μg 。

FIM 可從百日咳博多特氏菌中分離出，或可重組產生，或例如可購自李斯特生物實驗室公司 (加利福尼亞州坎貝爾；<http://www.listlabs.com>，線上目錄中的產品號 186)。

在某些較佳的實施方式中，根據本發明的疫苗組合物包含每一人類劑量 (或每 0.5 ml 原液疫苗) :10-25 μg PT、10-25 μg FHA、3-8 μg PRN 以及 12-50 μg FIM。在某些較佳的實施方式中，根據本發明的疫苗組合物包含每一人類劑量 (或每 0.5 ml 原液疫苗) :20-25 μg PT、20-25 μg FHA、3-8 μg PRN 以及 12-50 μg FIM。在某些較佳的實施方式中，根據本發明的疫苗組合物包含每一人類劑量 (或每 0.5 ml 原液疫苗) :20-25 μg PT、20-25 μg FHA、3-8 μg PRN 以及 12-25 μg FIM。在某一實施方式中，本發明提供一種疫苗，該疫苗包含每一人類劑量 (或每 0.5 ml 原液疫苗) :約 20 μg PT、約 20 μg FHA、約 3 μg PRN 以及約 15-20 μg FIM。

製備根據本發明的疫苗的一簡單方式係向一可購得的 aP5 疫苗中添加可購得的 FIM。本發明的疫苗還可簡單地藉由向一可購得的包含 PT 和 FHA 但還沒有 FIM 的 aP 疫苗 (aP2) 或一可購得的包含 PT、FHA 以及 PRN 但還沒有 FIM

的 aP 疫苗 (aP3) 中添加 FIM 來製備。在某些實施方式中，FIM 可首先被吸附於佐劑 (如果需要這樣的話)，例如氫氧化鋁和/或磷酸鋁，隨後添加到其他組分。在其他實施方式中，FIM 在沒有預先吸附到佐劑的情況下被添加到其他組分。

如本揭露中所用的關於數值的術語‘約’意思指值 $\pm 10\%$ 。

在某些實施方式中，本發明之組合物還可包含非百日咳蛋白質組分，例如以便獲得組合疫苗 [德克爾, M.D., 愛德華, K.M. 以及柏格茨 (Bogaerts), H.H. 組合疫苗 (Combination vaccines) 見《疫苗》編輯普洛特金, S., 奧倫斯坦, W.A. 以及奧菲特, P.A.) 愛思唯爾健康科學出版社, 2008. 1069-1101]。在某些實施方式中，根據本發明之組合物可因此進一步包含來源於除百日咳博多特氏菌以外的一種或多種病原體之抗原。在某些實施方式中，根據本發明之組合物包含以下一者或多者：破傷風類毒素 (TT)、白喉類毒素 (DT)、b 型流感嗜血桿菌寡糖或多糖結合物 (Hib)、B 型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、失活的脊髓灰質炎病毒 (IPV)。

aP 與該等非百日咳組分的組合疫苗係已知並且被廣泛使用的。組合疫苗的製備已例如被描述在 WO2010/046935、US6013264、WO2007/054820、WO98/000167 以及 EP1946769 中，該等文獻都是藉由引用結合。

在某些實施方式中，根據本發明的 aP5 (或 aP4 : PT、FHA、FIM2/3) 在進一步包含 DT 和 TT 的一組合物中，從而提供根據本發明之 DTaP5 (或 DTaP4) 疫苗。DTaP5 疫苗被廣泛用於預防白喉、破傷風以及百日咳。根據本發明之疫

苗具有比之前描述的 DTaP5 疫苗更高量的 FIM，並且比常規 DTaP5 疫苗更有效針對 PRN 陰性百日咳博多特氏菌菌株。

用於使 DT 分離、純化以及脫毒的一種方式被描述在 WO 96/34883 的第 33-34 頁，該文獻係藉由引用結合在此。DT 還可例如如 US4709017、US5843711、US5601827、US5917017 以及 WO96/34623 中所述來獲得，該等文獻都是藉由引用結合。

用於使 TT 分離、純化以及脫毒的一種方式被描述在 WO 96/34883 的第 34-36 頁，該文獻係藉由引用結合在此。TT 還可例如如 EP0209281、EP0478602 以及 WO96/34623 中所述來獲得，該等文獻都是藉由引用結合。

Hib 寡糖或多糖結合物可例如如 WO2007/054820、WO2004/110480、US6333036、WO2010/046935、US4372945、US4474757、WO95/08348、WO2010/046935、US4673574、EP0161188、EP0208375 以及 EP0477508 中所述來獲得，該等文獻都是藉由引用結合。Hib 抗原可例如是 Hib 的莢膜多糖，或該多糖或其衍生寡糖與載體蛋白的結合物，該載體蛋白如 DT、TT 或 CRM₁₉₇ (從白喉棒狀桿菌 (*Corynebacterium diphtheriae*) C7 分離出的白喉毒素的一無毒變異體 (b197))。

HBsAg 可例如如 EP0226846、EP0299108、US6013264、WO2007/054820、WO2010/046935 以及 WO9324148 中所述來獲得，該等文獻都是藉由引用結合。

IPV 可以是單價，含有一種類型的脊髓灰質炎病毒 (1 型、2 型或 3 型)，或二價 (含有兩種類型的脊髓灰質炎病毒，例如 1 型和 2 型、1 型和 3 型或 2

型和 3 型) , 或三價 (含有三種類型的脊髓灰質炎病毒 , 即 1 型、2 型以及 3 型) 。較佳的是 , 根據本發明的 IPV 含有失活的 1 型、2 型以及 3 型脊髓灰質炎病毒。IPV 可例如如 US 4525349 和 WO2011/006823 中所述來獲得 , 該等文獻係藉由引用結合在此。

該等非百日咳組分可從多個製造商獲得。實例被描述在 [《疫苗》 第 5 版. S. 普洛特金, W. 奧倫斯坦, P. 奧菲特, 2008, 第 2 部分, 第 38 章 (《組合疫苗》 , M.D. 德克爾, K.M. 愛德華, H.H. 柏格茨, 第 1069-1101 頁)] 中。

在某些實施方式中 , 根據本發明之組合物包含一組合物 , 該組合物包含根據上述實施方式中的任何一個的百日咳組分 (aP5 或 aP4 疫苗) (即包含每一人類劑量 12-100 μ g FIM , 和 PT、FHA 以及隨意地 PRN ; 下文中稱為“根據本發明之 aP”、或簡稱為“aP5*”) 和 DT。

在某些實施方式中 , 根據本發明之組合物包含根據本發明的 aP , 和 TT。

在某些實施方式中 , 根據本發明之組合物包含根據本發明的 aP , 和 IPV (在此稱為“aP5*-IPV”) 。

在某些實施方式中 , 根據本發明之組合物包含根據本發明的 aP , DT 以及 TT (在此稱為“DTaP5*”) 。

在某些實施方式中 , 根據本發明之組合物包含根據本發明的 aP , DT、TT 以及 Hib (在此稱為“DTaP5*-Hib”) 。

在某些實施方式中 , 根據本發明之組合物包含根據本發明的 aP , DT、TT 以及 IPV (在此稱為“DTaP5*-IPV”) 。

在某些實施方式中，根據本發明之組合物包含根據本發明的 aP，DT、TT 以及 HBSAg (在此稱為“DTaP5*-HepB”)。

在某些實施方式中，根據本發明之組合物包含根據本發明的 aP，DT、TT、Hib 以及 HBSAg (在此稱為“DTaP5*-Hib-HepB”)。

在某些實施方式中，根據本發明之組合物包含根據本發明的 aP，DT、TT、Hib 以及 IPV (在此稱為“DTaP5*-Hib-IPV”)。

在某些實施方式中，根據本發明之組合物包含根據本發明的 aP，DT、TT、HBSAg 以及 IPV (在此稱為“DTaP5*-HepB-IPV”)。

在某些實施方式中，根據本發明之組合物包含根據本發明的 aP，DT、TT、Hib、HBSAg 以及 IPV (在此稱為“DTaP5*-Hib-HepB-IPV”)。

可隨意地添加其他非百日咳組分，例如有時在組合疫苗中與 aP 組合的組分，如來自腦膜炎球菌和/或肺炎雙球菌的抗原。

關於組合疫苗，非百日咳組分的量可變化。一般來講，可根據本發明使用如典型地存在於個別或組合疫苗中的該等組分的量。參見例如《疫苗》第 5 版。S.普洛特金, W.奧倫斯坦, P.奧菲特, 2008,第 2 部分,關於各種組分和組合疫苗；具體地說，第 38 章描述了包含 aP 疫苗與上文提及的組分的組合疫苗 [德克爾, 第 1069-1101 頁] ;第 10 章描述了 DT [維特克(Vitek), 第 139-156 頁] ;第 31 章描述了 TT [瓦希拉克 (Wassilak), 第 805-840 頁] ;第 25 章描述了 IPV 疫苗 [普洛特金, 第 605-630 頁] ;第 11 章描述了 Hib 疫苗 [錢德蘭 (Chandran), 第 157-176 頁] ;以及第 13 章描述了 B 型肝炎疫苗(基於 HBsAg)

[馬斯特 (Mast), 第 205-242 頁], 這些都是藉由引用結合。每一劑量的抗原之合適量 (它也常以 IU 或 Lf (絮凝單位) 形式來表示 DT 和 TT 的量 , 參見例如 [德克爾, 見《疫苗》, 第 1069-1101 頁, 同上], 但此處我們提供微克數) 的非限制性實例將例如為 : 1-100 μg 、例如 2-40 μg 、例如 6-25 μg 、例如 15-25 μg DT ; 1-50 μg 、例如 2-20 μg 、例如 5-10 μg TT ; 每毫升 1-100 μg 、例如 3 到 40 μg HBsAg 蛋白質 ; 0.1-100 μg 、例如 0.2 到 50 μg 、例如 1 到 25 μg 、例如 2-10 μg 呈與載體蛋白的結合物形式的 Hib 莢膜多糖或其寡糖 ; 含有野生型衍生的 IPV 的產物 (wt-IPV) 一般被配製成每一劑量對應地含有 40-8-32 D-Ag 單位的 1 型、2 型以及 3 型脊髓灰質炎病毒。然而, 該等量也可變化, 對於 1 型 IPV 而言例如也可使用更低的量, 如 10-20 D-Ag 單位, 並且也可改變 2 型和 3 型 IPV 的量 (參見例如 EP 2066344)。量也可根據預定用途而改變, 例如加強疫苗可在某些實施方式中含有比初免疫苗更少單位之某些組分。

根據本發明之組合物中的蛋白質組分打算在給予合格受試者後誘發免疫反應。技術人員應清楚, 本文中無論哪裡提到蛋白質或其突變體(例如類毒素), 也可使用該等蛋白質的一部分並且該等蛋白質的一部分可具有等效的或在一些情況下較佳的用於誘發免疫反應的性質。另外, 該等蛋白質可含有 (另外) 突變, 如缺失、插入、取代等。因此, 指定蛋白質組分的免疫原性片段和變異體被包括於在此指定的蛋白質的含義內。

根據本發明之組合物可用作無細胞百日咳疫苗, 或用作組合疫苗的組分, 該等組合物在給予合格的受試者後引起針對該等組合物中的一個或多個組分

的免疫反應。免疫反應可包括細胞反應和/或體液反應。該等免疫反應較佳的是賦予抵抗病原體感染或抵抗疾病的保護，或至少降低由衍生出相應組分的病原體所引起的症狀之嚴重程度（即在任何情況下較佳的是抵抗百日咳博多特氏菌，並且也較佳的是抵抗其 PRN 陰性突變體）。根據本發明之組合物可因此合適地稱為疫苗。疫苗的劑量係在單次給藥中給予受試者的量。受試者可合適地為動物或人類，並且在某些較佳的實施方式中，該受試者為人類。許多疫苗合適地並且實際上較佳的是在足夠的時間間隔下給予同一個體一次以上以便在該個體中獲得加強作用，例如給藥之間相隔至少四周、到若干年以至約二十年。多次免疫通常給予未處理的嬰兒（naive infant）。根據本發明之組合物也可被給予一次以上，例如在一非限制性實施方式中，兩次或三次或更多次，而每次給藥之間相隔至少 4 周，例如相隔一個月或兩個月的時間。一個非限制性實例係根據 EPI 時間表在 6 周、10 周以及 14 周齡時給藥。另一療程將在 2 個月、4 個月、6 個月齡時。在某些實施方式中，加強疫苗接種係在 10-20 年後，例如在青春期的時候給予。可給予其他十年一次的加強疫苗接種。在某些實施方式中，根據本發明的 aP 在生命第一年被給予兩次或三次，另一加強在生命第二年被給予，並且另一加強在四到五歲時被給予，之後在約十二歲時給予青春期加強。接下來也可以是 Td（被給予青少年的含有 TT-DT 的疫苗）加強劑建議，即每十年一次並且用 Tdap 替換 Td，其中該無細胞百日咳組分係根據本發明之 aP。然而，技術人員應清楚，根據本發明之 aP 疫苗的疫苗接種方案可被適當地改變，這從不同國家管理機構的已銷售 aP 疫苗的廣泛多樣的免疫時間表（療

程) 中清楚地看出 (例如《疫苗》第 5 版. S. 普洛特金, W. 奧倫斯坦, P. 奧菲特, 2008, 第 2 部分, 第 21 章“百日咳疫苗”, K.M. 愛德華和 M.D. 德克爾 第 467-517 頁的表 21-5)。

根據本發明之組合物還可合適地用作先前已接種其他疫苗的群體的加強疫苗, 該等其他疫苗係那些具有與本發明之疫苗不同組成的 wP 或 aP 疫苗或具有與本發明的疫苗不同組成的包含 wP 或 aP 的組合疫苗。該等加強劑可例如被用於已未接種抵抗百日咳博多特氏菌的疫苗超過十年的成人或老年人的疫苗接種。重複該等加強劑疫苗接種 (例如約每五年、十年或十五年一次) 可為有用的。也已建議在每次懷孕時給予孕婦破傷風類毒素、減少的白喉類毒素以及無細胞百日咳疫苗 (Tdap) 而不考慮先前 Tdap 史。在某些實施方式中, 根據本發明之 aP 被給予嬰兒、兒童、青少年、成人、老年人或孕婦, 例如以 aP 形式或以 Tdap 形式。

根據本發明之組合物為藥物組合物。該等組合物包含根據本發明之組合物和典型地藥學上可接受的載體或賦形劑。在本發明上下文中, 術語“藥學上可接受的”意思指載體或賦形劑在所用劑量和濃度下不會在給予它們的受試者中造成不希望有的或有害的影響。該等藥學上可接受的載體和賦形劑在本領域中眾所周知 [雷明頓(Remington). 《藥學科學和實踐》(The Science and Practise of Pharmacy), 麥克出版公司 (Mack Publishing Company) 1990 ; 福羅加爾 (Frokjaer), S.和霍夫高 (Hovgaard), L. 《肽和蛋白質的藥物製劑開發》(Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins), 2000 ; 《藥

用賦形劑手冊》(Handbook of Pharmaceutical Excipients), 英國醫藥出版社 (Pharmaceutical Press) 2000]。該等組合物較佳的是以無菌溶液形式配製和給予。無菌溶液係藉由無菌過濾或藉由本領域中本身已知的其他方法來製備。該等溶液可接著被凍幹或填充到藥物劑量容器中。溶液 pH 值一般在 pH 3.0 到 9.5 的範圍內, 例如 pH 5.0 到 7.5。組合物之組分典型地在具有合適的藥學上可接受的緩衝劑的溶液中, 並且該溶液還可含有鹽。在某些實施方式中, 清潔劑係存在的。在某些實施方式中, 疫苗可被配製成可注射製劑。該等配製品含有有效量之蛋白質組分, 為無菌液體溶液、液體懸浮液或凍乾版本, 並且隨意地含有穩定劑或賦形劑。用於 aP 疫苗或組合疫苗的儲存和藥物給予的合適配製品的若干實例係已知的 (例如 [《疫苗》第 5 版. S. 普洛特金, 等人, 同上] 中的表 21-3 和 21-4)。合適稀釋劑之實例為 PBS 或生理鹽水。防腐劑可隨意地存在, 例如苯氧乙醇、硫柳汞或對羥基苯甲酸酯。如果存在一防腐劑, 那麼它較佳的是以低水平存在。假如一組合疫苗包含 IPV, 較佳的是避免使用硫柳汞, 因為硫柳汞會導致 IPV 組分效能損失 (參見例如索耶 (Sawyer) LA, 1994, 《疫苗》12 : 851-856 ; EP 2066344)。可隨意地以痕量成分形式存在的其他組分為聚山梨醇酯-80、明膠以及化學毒化的殘餘物 (例如, 如果 PT 被化學地毒化), 如戊二醛、甲醛。

較佳的是, 根據本發明之疫苗被儲存在 2-8°C 之間。

在某些實施方式中, 本發明之組合物包含其他一種或多種佐劑。佐劑係本領域中已知進一步增加對一種已施加的抗原決定簇的免疫反應 (關於對佐劑的

綜述,參見例如蒙特莫利(Montomoli), 2011, 《疫苗專家評論》 10: 1053-1061)。合適佐劑之實例包括鋁鹽, 如氫氧化鋁和/或磷酸鋁; 油-乳液組合物 (或水包油型組合物), 包括角鯊烯-水乳液, 如 MF59 (參見例如 WO 90/14837); 皂素配製品, 如例如 QS21 和免疫刺激複合物 (ISCOMS) (參見例如 US 5,057,540、WO 90/03184、WO 96/11711、WO 2004/004762、WO 2005/002620); Toll 樣受體 (TLR) 促效劑, 例如 TLR7 激動劑 (參見例如 WO 2012/117377, 例如第 15-18 頁), 例如與鋁鹽 (例如可吸附 TLR 激動劑的氫氧化鋁) 組合; 細菌或微生物衍生物, 它們的實例為單磷醯脂質 A (MPL), 3-O-去醯 MPL (3dMPL), 含有 CpG 基序的寡核苷酸、ADP 核糖基化細菌毒素或其突變體, 如大腸桿菌熱不穩定腸毒素 LT、霍亂毒素 CT 等。舉例來說, PT 和破傷風類毒素也具有它們自己的佐劑特性。在某些實施方式中, 本發明之組合物包含鋁作為佐劑, 例如呈氫氧化鋁、磷酸鋁、磷酸鉀鋁或其組合的形式, 濃度為每一劑量 0.05-5 mg (例如 0.075-1.0 mg) 的鋁含量。

在其他實施方式中, 本發明中所用的組合物不包含其他佐劑。

較佳的是, 根據本發明之疫苗組合物包含一佐劑。在某些較佳的實施方式中, 該佐劑為鋁鹽, 如磷酸鋁、氫氧化鋁或其組合。較佳的是, 一個、多個或全部 aP 抗原被吸附到鋁鹽上。其他抗原也可被吸附到鋁鹽上。在某些實施方式中, 一個、多個或全部 aP 抗原 (PT、FHA、FIM、PRN (如果存在的話)) 被吸附到氫氧化鋁上。在某些實施方式中, 一個、多個或全部 aP 抗原 (PT、FHA、FIM、PRN (如果存在的話)) 被吸附到磷酸鋁上。aP 疫苗和 aP 組合疫

苗與鋁鹽的配製品被例如描述在 [德諾爾 (Denoël) , 2002, 《疫苗》 20: 2551-2555]。典型地，個別組分被單獨地吸附到鋁鹽上，並且該等組分此後被混合形成疫苗配製品。這也允許製備某些組分被吸附到第一鋁鹽 [例如 $\text{Al}(\text{PO})_4$]，而其他組分被吸附到第二鋁鹽 [例如 $\text{Al}(\text{OH})_3$] 的疫苗。組合疫苗的其他組分也可被吸附到鋁鹽上，例如 DT 和 TT 可被吸附到氫氧化鋁或磷酸鋁或這些的組合上。DT 和 TT 組分可被吸附到相同或不同的鋁鹽作為 aP 組分。具有增加價數的組合疫苗之其他組分也可被吸附到鋁鹽上，例如 HBsAg、Hib 和/或 IPV 可以或可以不被吸附到鋁鹽上。在其中組合疫苗包含 HBsAg 的某些較佳的實施方式中，HBsAg 被吸附到磷酸鋁上 (參見例如 WO 93/24148)。如果 Hib 被包含在組合疫苗中並且某些其他組分 (如 DT、TT 或 aP 中的一個或多個) 被吸附到氫氧化鋁上，那麼干擾 (降低 Hib 組分的功效) 的風險可例如藉由以下而減小：將 Hib 吸附到磷酸鋁上或使用不被吸附到鋁佐劑上的 Hib，並且藉由同時 (即剛好在給藥之前) 添加該 Hib，或藉由以氫氧化鋁佐劑已被預飽和的方式與已被吸附到氫氧化鋁佐劑上的其他組分混合而使這一 Hib 與其他組分組合，如 WO 99/48525 中所詳細描述。技術人員因此意識到以合適方式配製根據本發明之組合疫苗的多種方式。

在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 PT、FHA、FIM2/3 以及氫氧化鋁，和隨意地 PRN。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 PT、FHA、FIM2/3 以及磷酸鋁，和隨意地 PRN。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 PT、FHA、FIM2/3、氫氧化鋁以及磷酸鋁，和隨意

地 PRN。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 DTaP5*和氫氧化鋁。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 DTaP5*和磷酸鋁。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 DTaP5*、氫氧化鋁以及磷酸鋁。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 aP5*-IPV，和氫氧化鋁或磷酸鋁或氫氧化鋁和磷酸鋁。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 DTaP5*-IPV，和氫氧化鋁或磷酸鋁或氫氧化鋁和磷酸鋁。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 DTaP5*-Hib，和氫氧化鋁或磷酸鋁或氫氧化鋁和磷酸鋁。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 DTaP5*-HepB，和氫氧化鋁或磷酸鋁或氫氧化鋁和磷酸鋁。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 DTaP5*-Hib-HepB，和氫氧化鋁或磷酸鋁或氫氧化鋁和磷酸鋁。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 DTaP5*-Hib-IPV，和氫氧化鋁或磷酸鋁或氫氧化鋁和磷酸鋁。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 DTaP5*-HepB-IPV，和氫氧化鋁或磷酸鋁或氫氧化鋁和磷酸鋁。在某些實施方式中，根據本發明之疫苗組合物包含 DTaP5*-Hib-HepB-IPV，和氫氧化鋁或磷酸鋁或氫氧化鋁和磷酸鋁。

可使用標準給藥途徑進行根據本發明之組合物的給藥。非限制性實施方式包括不經腸給藥，如藉由例如皮內、肌肉內、經皮、鼻內注射等。在一個實施方式中，疫苗係藉由肌肉內注射到大腿中或注射到三角肌中而被給予。技術人員已知給予根據本發明之疫苗以便誘發對該疫苗中的至少一個抗原的免疫反應的多種可能性。一般來講，百日咳疫苗的標準劑量為在前外側大腿或（如果

需要的話)三角肌中肌肉內給予的 0.5 mL。然而，在一次給藥期間提供給患者的組合物中組分的量可如熟練的開業醫師所已知的而變化。也可使佐劑(如果使用的話)適應於遞送系統。

雖然較佳的是具有用於疫苗接種以抵抗百日咳的單一組合物，但技術人員應意識到如在此描述的本發明的作用也可藉由接種 aP 疫苗的組分，即在 12-100 μg 人類劑量下的 PT、FHA、FIM，以及隨意地 PRN 來獲得，其中該等組分不一定都在同一組合物中，例如其中(一部分)FIM 在單獨的組合物中。舉例來說，可購得的 aP 疫苗(具有在每一人類劑量 0-5 μg 之劑量下的 FIM)可藉由以下來補充：以獨立組分形式共給予 FIM 到給予 12-100 μg 、例如 15-80 μg 、20-60 μg 、20-50 μg 或 20-25 μg FIM 的總劑量，例如藉由注射包含 PT、FHA、隨意地 5 μg 劑量的 FIM 以及隨意地 PRN 的第一 aP 疫苗組合物，並且注射包含(其餘部分的)FIM 的一獨立組合物以補充到 12-100 μg 、例如 15-80 μg 、20-60 μg 、20-50 μg 或 20-25 μg FIM 的總劑量。在該等實施方式中，共給予意思指獨立組合物在給藥之間的一小時內、較佳的是幾分鐘內被給予(例如注射)，較佳的是它們基本上同時被給予(例如藉由共注射或藉由連續注射)。可替代地，化合物可剛好在給藥之前被混合，以使得單次注射(在組合物係根據本發明之組合物的情況下)係足夠的。本發明因此還提供了一種用於對人類受試者進行疫苗接種以抵抗百日咳博多特氏菌，隨意地百日咳博多特氏菌的 PRN 陰性菌株之方法，該方法包括給予該受試者以下百日咳博多特氏菌抗原：百日咳類毒素 (PT)、絲狀血凝素 (FHA) 以及 2 型和 3 型菌毛 (FIM)，和隨意地

百日咳桿菌粘附素 (PRN)，其中 FIM 係以 12-100 μg 的量被給予。在較佳的實施方式中，這係藉由給予根據本發明的一單一組合物來完成的。

【實施方式】

本發明進一步用以下實例解釋。該等實例不以任何方式限制本發明。它們僅僅用來闡明本發明。

實例

實例 1. *aP5* 疫苗中高劑量 FIM 改善了抵抗 PRN 陰性百日咳博多特氏菌之保護

方法：

已驗證的與 aP 疫苗臨床功效有關的小鼠百日咳博多特氏菌肺激發模型 (吉索, 1999, 《疫苗》 17; 2366-2376 ; 德諾埃, 2005, 《疫苗》 23:5333-5341 ; 戈弗雷 (Godfroid), 2004, 《國際醫學微生物學雜誌》 (*Int. J. Med. Microbiol.*) 294; 269-276) 被用以測試添加或未添加 2 μg 已純化的 FIM2/3 抗原 (李斯特生物實驗室公司) 的在四分之一人類劑量下的被許可的 5 組分無細胞百日咳疫苗 (ADACEL™, 賽諾菲巴斯德 (Sanofi Pasteur)); 在這一實例中另外稱為 aP5) 的功效。每一 0.5 mL 劑量的 ADACEL™ 含有 5 Lf 破傷風類毒素、2 Lf 白喉類毒素以及 5 種無細胞百日咳抗原 (2.5 μg 已脫毒的百日咳毒素、5 μg 絲狀血凝素、3 μg 百日咳桿菌粘附素以及 5 μg 2 型和 3 型菌毛)。簡單地說，雌性 Balb/c 小鼠在 4 周和 7 周齡時以 1/4 人類劑量皮下接種有或無 FIM2/3 抗原的 aP5。因此，動物接受 1.25 μg FIM2/3 (aP5 組) 或 3.25 μg FIM2/3 (aP5 + FIM 組)，對應地

等於人類中的 5 μg 和 13 μg 。在 9 周齡時，小鼠經鼻內用約 10^6 cfu 百日咳博多特氏菌 WHO 18323 (一百日咳桿菌粘附素陽性菌株)、一百日咳桿菌粘附素陰性菌株 PRN-STOP 以及一百日咳桿菌粘附素陰性菌株 PRN-IS 激發 [昆南, 2013, 《新英格蘭醫學雜誌》 368: 583-4]。在激發後 2 小時、2 天、5 天以及 8 天 ($n = 5$ /組)，藉由在塗覆肺勻漿連續稀釋液後計數博-讓二氏瓊脂板 (Bordet-Gengou agar plate) 上生長的百日咳博多特氏菌菌落測定肺清除率。

結果：

在接種添加或未添加 FIM2/3 抗原的 aP5 後的治療反應隨時間推移的概況被描繪在圖 1 中。為了測試在接種 aP5 或 aP5 + FIM 的小鼠之間在第 5 天和第 8 天的平均 \log_{10} CFU 計數之間的統計學顯著差異，使用威斯康辛精確檢驗 (Wilcoxon Exact Test)。此外，治療反應隨時間推移 (從第 0 天到第 8 天) 的概況數據係藉由協方差分析來建模 (米利肯 (Milliken) GA 等人 《協方差分析》，統計學系 (Dept of Statistics)，堪薩斯州州立大學 (Kansas State University)，1989. ;SAS 軟體研究所 (SAS Institute Inc.)，《SAS/STAT 用戶指導》(SAS/STAT User's Guide)，版本 6，第四版，第 2 卷。凱裡 (Cary)，NC: SAS 軟體研究所，1989)。

對於百日咳博多特氏菌 WHO18323 菌株 (一 PRN 陽性菌株，圖 1A)，在第 5 天使用單側威斯康辛精確非參數檢驗的 \log_{10} CFU 計數差異比較顯示，在接種 aP5 + FIM 後的平均 \log_{10} CFU 計數顯著低於 ($p < 0.05$) 僅接種 aP5 後的那些計數。樣品治療反應-時間概況數據由藉由以天數作為斜率項並且以天數

× 天數作為二次曲率項之協方差分析的擬合建模，顯示從第 0 天到第 8 天的治療反應無統計學顯著差異。

在用百日咳博多特氏菌 PRN-STOP 菌株激發後(圖 1B)，在第 5 天使用單側威斯康辛精確非參數檢驗的 \log_{10} CFU 計數差異比較顯示，在接種 aP5 + FIM 後的平均 \log_{10} CFU 計數顯著低於 ($p < 0.02$) 僅激發 aP5 後的那些計數。樣品治療反應-時間概況數據由藉由協方差分析模型的擬合建模顯示，從第 0 天到第 8 天治療反應無統計學顯著差異。

對於百日咳博多特氏菌 PRN-IS 菌株(圖 1C)，使用單側威斯康辛精確非參數檢驗在第 5 天的 \log_{10} CFU 計數的差異比較指示，疫苗治療之間無顯著差異。使用威斯康辛精確非參數檢驗，在第 8 天存在接種 aP5 + FIM 後的平均 \log_{10} CFU 計數與僅接種 aP5 的平均 \log_{10} CFU 計數相比更低 ($P < 0.08$) 的趨勢。威斯康辛精確檢驗的漸近類比顯示出在第 8 天的顯著疫苗差異 ($p < 0.03$)。樣品治療反應-時間概況數據由藉由以天數作為斜率項並且以天數 × 天數 × trt 作為二次曲率項的協方差分析的擬合建模表明了從第 0 天到第 8 天的治療反應差異。

為了檢驗治療作用的差異，從第 0 天到第 8 天治療概況之間的線性對比指示，接種 aP5 + FIM 後的平均 \log_{10} CFU 計數顯著低於 ($p < 0.01$) 僅接種 aP5 後所測量的那些計數。

總而言之，該等結果顯示添加 2 μg FIM2/3 到 1/4 人類劑量的阿得賽 (Adacel) 疫苗顯著增加了這一疫苗在小鼠鼻咽激發模型中針對一 PRN 陰性百

日咳博多特氏菌分離株之功效。這一發現係令人驚訝的，因為先前還沒有任何增加百日咳疫苗中 FIM 的量將增加它的功效之提議。這一結果特別切合目前在全世界出現並且引發疾病的 PRN 陰性菌株的情形。

實例 2. 添加 FIM 後在小鼠激發模型中增加的疫苗功效具有劑量依賴性

方法：

為了研究增加的 FIM 劑量是否與增加的疫苗功效相關（這將表明該作用具有 FIM 特異性），使用如上所述的已驗證的小鼠百日咳博多特氏菌肺激發模型。給動物接種添加或未添加 FIM2/3（李斯特生物實驗室公司；材料另外稱為 FIM）的 1/10 人類劑量的被許可的 2 組分 aP 疫苗（PENTAVAC®，賽諾菲巴斯德 MSD；疫苗在下文稱為 aP2）。每一人類 0.5 mL 劑量的 PENTAVAC® 含有：（至少）40 IU 破傷風類毒素（TT）；（至少）30 IU 白喉類毒素（DT）；對應地為 40、8 以及 32 D-抗原單位的 1 型、2 型以及 3 型失活的脊髓灰質炎病毒（IPV）；10 µg 與 TT 結合的 B 型流感嗜血桿菌多糖（Hib-TT）；以及 2 種無細胞百日咳抗原（25 µg 已脫毒的百日咳毒素（PT）和 25 µg 絲狀血凝素（FHA））。對應地相當於每一人類劑量 5、10、15、20、25 或 50 µg FIM 的 0.5；1.0；1.5；2.0；2.5 或 5.0 µg 量的 FIM 被吸附到氫氧化鋁並且與被許可的 aP2 疫苗共給予（以一獨立的注射形式）（由此類比根據本發明的具有高劑量 FIM 的 aP 疫苗）。在 9 周大時，小鼠經鼻內用約 10^6 cfu 的 PRN 陰性百日咳博多特氏菌菌株（I195）激發。在 2 小時（n = 5/組）和第 5 天（n = 10/組），藉由在塗覆肺勻漿連續稀釋液後計數博-讓二氏瓊脂板上生長的百日咳博多特氏菌菌落測定肺清除率。

結果：

在 FIM 的量增加的情況下，觀察到由已接種小鼠的肺培養的百日咳博多特氏菌菌落的數目呈劑量依賴性減少。類似地，在接種 1/25 稀釋和增加量的 FIM 的小鼠中觀察到，由已接種小鼠的肺培養的百日咳博多特氏菌菌落的數目呈劑量依賴性減少。圖 2 示出了在用百日咳博多特氏菌菌株 I195 激發後 5 天，由在增加量的 FIM 存在下接種 1/10 人類劑量的 aP2 的小鼠的肺獲得的 log₁₀ CFU 計數。表 1 示出了平均 Log₁₀ CFU 計數和使用曼-惠特尼(Mann-Whitney) (繪製醫學圖表(GraphPad Prism))比較在以 1/10 人類劑量接種有或無 FIM 的 aP2 後的平均 log₁₀ CFU 計數所計算的 p 值。在添加 2 μg 或更多 FIM 到 1/10 人類劑量 (人類劑量等於 20 μg) 的 aP2 後，疫苗功效顯著增加。

結論：

增加的 FIM 劑量對於疫苗功效的劑量依賴性作用證明 FIM 的這一作用具有特異性。此外，包含高劑量 FIM 的疫苗比含有目前可購得的 aP5 疫苗中存在的最大量 (每一人類劑量 5 μg) FIM 的疫苗更加有效。這與實例 1 中的發現保持一致，顯示增加 aP 疫苗中 FIM 的劑量超過每一人類劑量 10 μg 改善功效，並且進一步將發現擴展到不同 aP 疫苗和額外的 PRN 陰性百日咳菌株。

實例 3. 觀察到添加有 FIM 的 aP5 疫苗針對多種百日咳博多特氏菌菌株之增加功效

方法：

如上所述已驗證的小鼠百日咳博多特氏菌肺激發模型被用以研究增加劑

量的 FIM 是否改善針對多種百日咳博多特氏菌菌株的疫苗功效。使用 1/10 人類劑量的 ADACEL®(賽諾菲巴斯德 ; 每一人類劑量含有 2.5 µg PT、5 µg FHA、3 µg PRN 以及 5 µg FIM2/3 , 也參見實例 1 ; 在此稱為 aP5) 或 BOOSTRIX® (葛蘭素史克生物製品有限公司 (GlaxoSmithKline Biologicals) ; 每一人類劑量含有 5 Lf 破傷風類毒素、2.5 Lf 白喉類毒素、8 µg PT、8 µg FHA 以及 2.5 µg PRN ; 在此稱為 aP3) , 添加或未添加(以吸附到氫氧化鋁後的獨立注射形式) 5 µg FIM (李斯特生物實驗室公司) , 相當於每一人類劑量 50 µg。在 4 周和 7 周齡時被疫苗接種的動物在 9 周齡時用以下百日咳博多特氏菌菌株中的一種激發 : WHO 18323 (PRN 陽性)、24422 (PRN 陰性)、24421 (PRN 陰性) 或 I195 (PRN 陰性)。在 2 小時 (n = 5/組) 和第 5 天 (n = 10/組) , 藉由在塗覆肺勻漿連續稀釋液後計數博-讓二氏瓊脂板上生長的百日咳博多特氏菌菌落測定肺清除率。

結果 :

添加 5 µg FIM 到 1/10 人類劑量的 aP5 改善了針對所有百日咳博多特氏菌菌株的疫苗功效 , 這達到了針對 3 種所測試的百日咳菌株的統計顯著性(WHO 18323 (p = 0.04)、PRN-24421 (p = 0.03) 以及 PRN-I195 (p = 0.001))(圖 3、表 2)。

這一實驗也使用 aP3 (1/10 人類劑量) 來進行。關於三種激發菌株 (WHO 18323、24422 以及 24421) , 使用這一 aP3 疫苗 (BOOSTRIX®) 在添加 FIM 後並未觀察到減少 , 雖然這可能部分藉由這一特定 aP3 在無 FIM 給予時對於該等激發菌株已經觀察到高功效來解釋。然而 , 當用百日咳博多特氏菌菌株 I195

激發時，在添加 FIM 到這一 aP3 的情況下觀察到 log₁₀ CFU 計數顯著減少。

總的來說，該等數據表明具有高劑量 FIM 的疫苗將具有針對一系列百日咳菌株的改善功效。

結論：

在用高水平 FIM 與可購得的 aP5 疫苗的組合免疫後觀察到的針對一組百日咳博多特氏菌菌株的增加功效表明，所觀察到的高 FIM 劑量的益處也針對不同百日咳菌株。因此，根據本發明的包含高劑量 FIM 的疫苗可有助於降低百日咳疾病率。

實例 4. 添加 FIM 對於目前可購得的不同 aP 疫苗之增加功效

方法：

如上所述已驗證的小鼠百日咳博多特氏菌肺激發模型被用以研究增加劑量的 FIM (李斯特生物實驗室公司) 是否改善 ADACEL® (賽諾菲巴斯德 ; 每一人類劑量含有 2.5 µg PT、5 µg FHA、3 µg PRN 以及 5 µg FIM₂₊₃ 作為 aP 組分)、Pentavac® (賽諾菲巴斯德 MSD ; 每一人類劑量含有 25 µg PT 和 25 µg FHA 作為 aP 組分) 或 Boostrix® (葛蘭素史克生物製品有限公司 ; 每一人類劑量含有 8 µg PT、8 µg FHA 以及 2.5 µg PRN 作為 aP 組分) 的疫苗功效。

小鼠在 4 周和 7 周齡時接種 1/10 人類劑量添加或未添加 5 µg FIM 的商業疫苗 (相當於每一人類劑量添加 50 µg FIM)，在 9 周齡時用百日咳博多特氏菌百日咳桿菌粘附素陰性菌株 I195 激發，並且激發後 5 天 (n = 10/組) 藉由計數博-讓二氏瓊脂板上生長的百日咳博多特氏菌菌落來測定肺清除率。

結果：

對於所有三種疫苗，添加 FIM 導致平均 Log₁₀ CFU 計數與僅接種商業疫苗後的平均 Log₁₀ CFU 計數相比顯著更低（表 3）。

結論：

所有三種疫苗的疫苗功效在添加 FIM 後顯著改善。這表明 FIM 的作用可被推廣到含有不同量百日咳抗原和不同量 FIM 的一系列商業 aP 疫苗。已包含 FIM 的疫苗(ADACEL®)或不包含 FIM 的疫苗(PENTAVAC®或 BOOSTRIX®) 的功效改善，顯示不僅 FIM 的存在有助於疫苗功效，而且 FIM 的劑量也是重要的。

實例 5. 在接種高劑量 FIM 後針對各種各樣百日咳菌株之抗 FIM 抗體功能性增加

抗體針對百日咳組分的功能活性已被確定為有待考慮的重要附加參數，特別是在評估含有已知誘發抗體功能活性（對應地如毒素中和與細菌凝集）的 PT 和 FIM 的新配製品時。已建立測量全細胞百日咳博多特氏菌凝集抗體的分析。雖然不存在已被發現與百日咳疫苗的保護性功效直接相關之功能閾值，但儘管如此它們仍是作為新疫苗配製品與已證明那些是安全和有效的的（來自 aP 疫苗的 WHO 草案建議，WHO/BS/2011.2158, 第 C.2.1.2 部分）總體比較的一部分要確定的重要免疫參數。因此，考慮到關於含有 FIM 的 aP 疫苗的該等分析的相關性，我們使用凝集分析來進一步針對多種百日咳博多特氏菌菌株測試本發明的疫苗。

方法：

從在 4 周和 7 周齡時接種添加或未添加 FIM (李斯特生物實驗室公司) 的 1/10 人類劑量的 Pentavac® (賽諾菲巴斯德 MSD ; 每一人類劑量含有 25 µg PT 和 25 µg FHA 作為 aP 抗原 ; 在此稱為 aP2) 的小鼠採集血清。對應地相當於每一人類劑量 5 或 20 µg FIM 的 0.5 或 2.0 µg 量的 FIM 被吸附到氫氧化鋁並且與可購得的 aP2 疫苗共給予 (以獨立注射形式)。在第 9 周，犧牲每一給藥組的 5 只動物，並且集中從末端血液分離的血清用於抗 FIM(功能) 抗體水平之研究。為了評估功能抗體對 FIM 的反應，進行凝集分析。在這一分析中，在測試血清中功能抗體的存在導致在與百日咳博多特氏菌混合時抗原/抗體複合物的形成。陽性凝集被定義為孔中因抗原/抗體複合物的存在而存在不透明溶液。陰性凝集係以所定義的在孔底部的細菌沈降物形式被觀察到。簡單地說，50 µl 測試血清在 PBS 中被連續稀釋並且與 50 µl 的 OD₆₀₀ 為 1.0 的百日咳博多特氏菌懸浮液混合。這一混合物被培育過夜，並且次日使用倒鏡測定存在或不存在細菌沈降物。凝集效價被定義為導致完全凝集的最高稀釋度。

為了研究藉由對小鼠進行疫苗接種所誘發的抗 FIM 抗體是否功能性針對一組百日咳博多特氏菌菌株，測試血清是否具有使 10 種表達 FIM 的不同百日咳博多特氏菌菌株凝集的能力。從一組 30 種最新臨床百日咳博多特氏菌分離株 (由費城聖·克里斯多夫兒童醫院 (St. Christopher's Hospital for Children) 的艾倫埃萬傑利斯塔醫生 (Dr. Alan Evangelista) 好意地提供)，24 種分離株在陽性對照商業抗 FIM 單克隆抗體 (06/128, NIBSC, UK) 下顯示清楚的凝集讀數，

證實該等菌株表達 FIM 抗原。從這組 24 種菌株中選擇 5 種 PRN 陰性菌株和 5 種 PRN 陽性菌株用於測試小鼠血清。

結果：

在 FIM 存在下的疫苗接種誘發功能抗體效價。在 FIM 存在下接種的小鼠的全部 6 個小鼠血清池觀察到針對全部 10 種百日咳博多特氏菌菌株的陽性凝集。未接種的對照組和僅接受 1/10 人類劑量 aP2 (不包含 FIM) 的組不顯示任何凝集(表 4)。雖然在已驗證的小鼠百日咳博多特氏菌肺激發模型中已顯示高劑量的 FIM 比低劑量的 FIM 更加有效(實例 2)，但是不存在明確的 FIM 劑量-反應相關性(未顯示其他 FIM 劑量之數據)，這可能歸因於這一 WHO 標準化分析的局限性，該分析並未敏感到足以檢測到凝集中的小差異。

結論：

在 FIM 存在下接種商業疫苗導致誘發針對一大組百日咳博多特氏菌菌株 (PRN 陰性或 PRN 陽性菌株) 的功能抗體。這一發現表明，包含高劑量 FIM 的疫苗將有效減少由各種各樣的百日咳博多特氏菌菌株所引起的百日咳疾病。

表 1. 添加增加劑量的 FIM 到 aP2 疫苗對保護之影響

	總量 FIM	FIM 等效人類劑量	平均 Log10 CFU	相對僅 aP2 的 P 值
對照	-	-	7.2	0.0002
aP2	-	-	2.9	-
aP2 + 0.5 µg FIM	0.5 µg	5 µg	3.5	0.3418
aP2 + 1.0 µg FIM	1.0 µg	10 µg	2.1	0.0514
aP2 + 1.5 µg FIM	1.5 µg	15 µg	2.5	0.5390
aP2 + 2.0 µg FIM	2.0 µg	20 µg	2.0	0.0164
aP2 + 2.5 µg FIM	2.5 µg	25 µg	1.6	0.0013

aP2 + 5.0 µg FIM	5.0 µg	50 µg	1.4	0.0001
------------------	--------	-------	-----	--------

表 1 :如使用曼-惠特尼 ,比較在 4 周和 7 周齡時在接種添加 FIM 的在 1/10 人類劑量下的 aP2 與僅以 1/10 人類劑量給予的 aP2 後 , 在第 9 周用 PRN 陰性百日咳博多特氏菌菌株 I195 激發的小鼠的肺的平均 Log10 CFU 計數的差異來確定 P 值。關於詳情 , 參見實例 2。

表 2. 添加 FIM 到 aP5 疫苗對針對不同菌株的保護之影響

菌株	aP5			aP5 + FIM			P 值
	總量 FIM (µg)	FIM 等效人類劑量(µg)	平均 Log10 CFU	總量 FIM (µg)	FIM 等效人類劑量(µg)	平均 Log10 CFU	
WHO 18323	0.5	5	4.0	5.5	55	3.3	0.04
24422	0.5	5	4.6	5.5	55	3.6	0.08
24421	0.5	5	4.5	5.5	55	3.8	0.03
I195	0.5	5	5.3	5.5	55	4.0	0.001

表 2 : 在 4 周和 7 周齡時接種添加或未添加 5 µg FIM 的在 1/10 人類劑量下的 aP5 後 , 在第 9 周用 4 種不同百日咳博多特氏菌菌株激發後 5 天的小鼠的肺的平均 Log10 CFU 計數。使用曼-惠特尼確定 P 值。關於詳情 , 參見實例 3。

表 3. 添加 FIM 到不同商業 aP 疫苗之影響

	FIM 的總量 (µg)	FIM 等效人類劑量 (µg)	平均 Log10 CFU	P 值
ADACEL®	0.5	5	5.3	
ADACEL® + FIM	5.5	55	3.94	0.001

PENTAVAC®	0	0	2.89	
PENTAVAC® + FIM	5	50	1.38	0.0001
BOOSTRIX®	0	0	4.1	
BOOSTRIX® + FIM	5	50	2.87	0.004

表 3：在 4 周和 7 周齡時接種添加或未添加 5 µg FIM 的在 1/10 人類劑量下的 3 種被許可的不同 aP 疫苗後，在第 9 周用百日咳博多特氏菌菌株 I195 激發後 5 天，小鼠的肺的平均 Log10 CFU 計數。使用曼-惠特尼確定 P 值。關於詳情，參見實例 4。

表 4. 藉由添加 FIM 到 aP2 疫苗抗體針對多種菌株之功能活性

菌株號	總量 FIM (µg)	FIM 等效人類劑量 (µg)	FIM 抗體水平	針對 PRN 陰性菌株的凝集					針對 PRN 陽性菌株的凝集				
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
對照	-	-	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
aP2	-	-	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
aP2 + 0.5 µg FIM	0.5	5.0	193	480	480	480	480	320	320	200	480	320	320
aP2 + 2.0 µg FIM	2.0	20	285	960	960	960	960	960	960	640	960	640	800

表 4 :如從在 4 周和 7 周齡時接種添加或未添加 FIM 的 1/10 人類劑量 aP2 的每一組 5 只小鼠採集的血清池所測定的抗 FIM 抗體水平和針對一組百日咳博多特氏菌菌株的凝集效價。關於詳情，參見實例 5

< : 低於檢測下限 (LLOD)

申請專利範圍

1. 一種無細胞百日咳 (aP) 疫苗組合物 , 包含百日咳博多特氏菌 (*Bordetella pertussis*) 抗原百日咳類毒素 (PT)、絲狀血凝素 (FHA)、以及 2 型和 3 型菌毛 (FIM), 其中 FIM 係以每一人類劑量 12-100 μg 之量存在。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之 aP 組合物 , 其中 FIM 係以每一人類劑量 15-60 μg 之量存在。
3. 如以上申請專利範圍中任一項所述之 aP 組合物 , 其中 FIM 係以每一人類劑量 20-60 μg 之量存在。
4. 如以上申請專利範圍中任一項所述之 aP 組合物 , 其中 FIM 係以每一人類劑量 20-50 μg 之量存在。
5. 如以上申請專利範圍中任一項所述之 aP 組合物 , 其中 FIM 係以每一人類劑量 20-25 μg 之量存在。
6. 如以上申請專利範圍中任一項所述之 aP 疫苗組合物 , 進一步包含百日咳桿菌粘附素 (PRN)。
7. 如以上申請專利範圍中任一項所述之 aP 疫苗組合物 , 其中 PT 被基因地脫毒。
8. 如以上申請專利範圍中任一項所述之組合物 , 進一步包含除百日咳博多特氏菌以外的一種或多種病原體之抗原。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之組合物 , 包含

破傷風類毒素和白喉類毒素。

10. 如申請專利範圍第 8 或 9 項所述之組合物，包含以下一者或多者：

- a) 流感嗜血桿菌 (*Haemophilus influenzae*) (Hib) 寡糖或多糖結合物；
- b) B 型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)；以及
- c) 失活的脊髓灰質炎病毒 (IPV)。

11. 如以上申請專利範圍中任一項所述之組合物，進一步包含一佐劑。

12. 如申請專利範圍第 11 項所述之組合物，其中該佐劑包含氫氧化鋁、磷酸鋁或其組合。

13. 一種對受試者進行疫苗接種以抵抗百日咳博多特氏菌之方法，包括給予該受試者如申請專利範圍第 1 到 12 項中任一項所述之組合物。

14. 一種保護受試者免受由百日咳博多特氏菌的一 PRN 陰性菌株感染所引起的百日咳之方法，包含給予該受試者如申請專利範圍第 1 到 12 項中任一項所述之組合物。

15. 一種對人類受試者進行疫苗接種以抵抗百日咳博多特氏菌，隨意地百日咳博多特氏菌的 PRN 陰性菌株之方法，包括給予該受試者以下百日咳博多特氏菌抗原：百日咳類毒素 (PT)、絲狀血凝素 (FHA)、以及 2 型和 3 型菌毛 (FIM)、和隨意地百日咳桿菌粘附素 (PRN)，其中 FIM 係以 12-100 μg 之量給予。

圖式

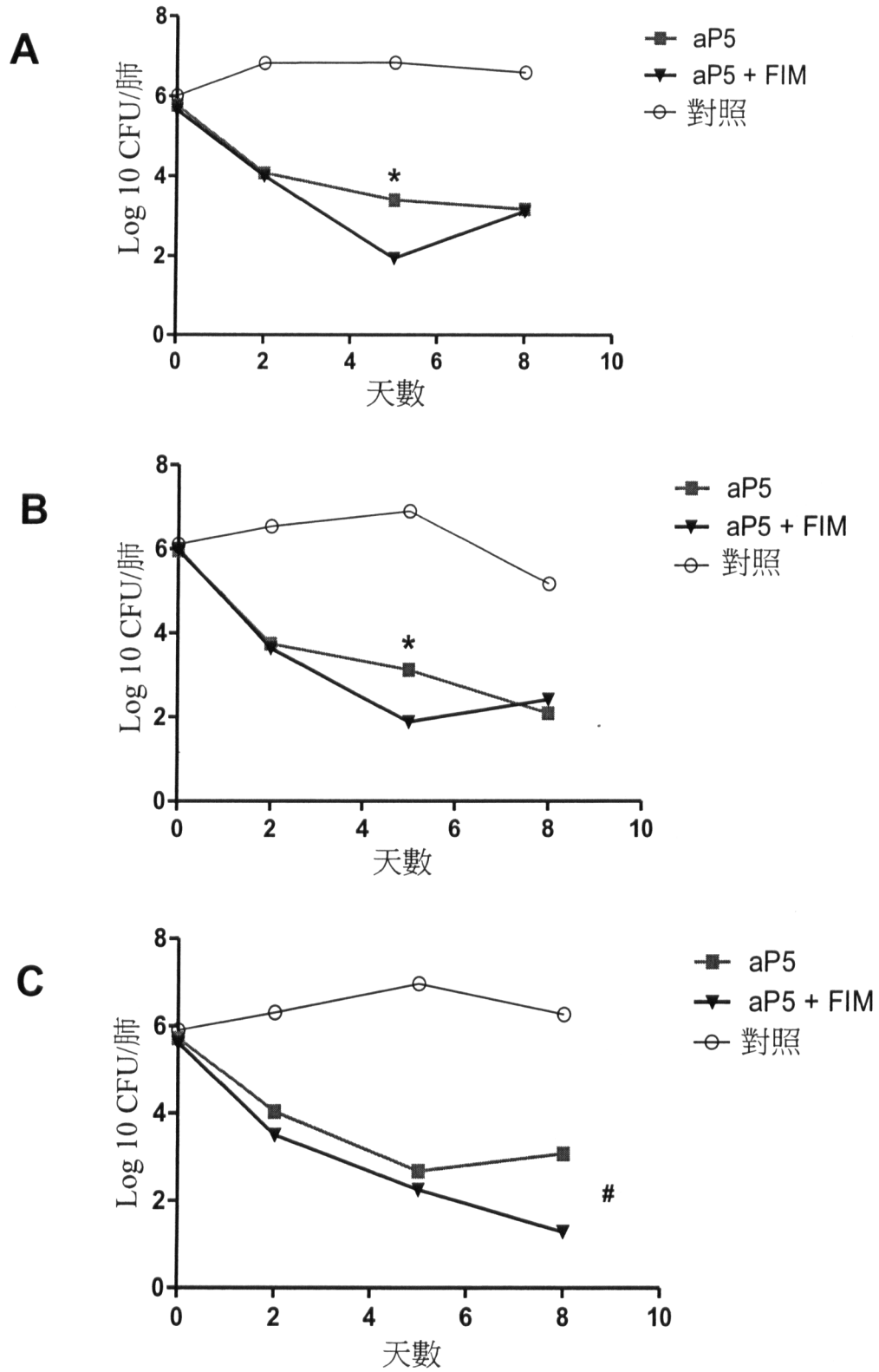


圖 1

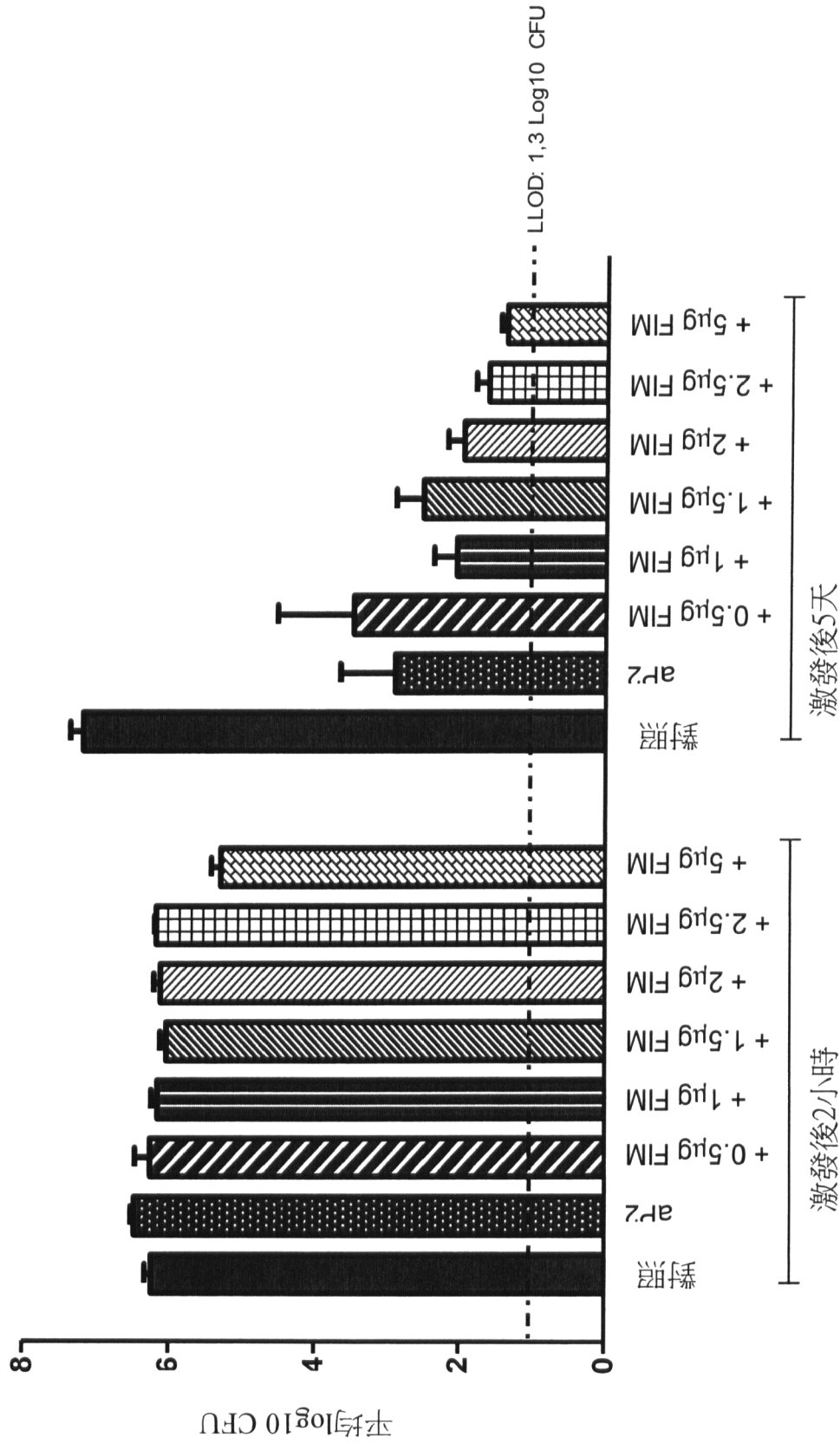


圖 2

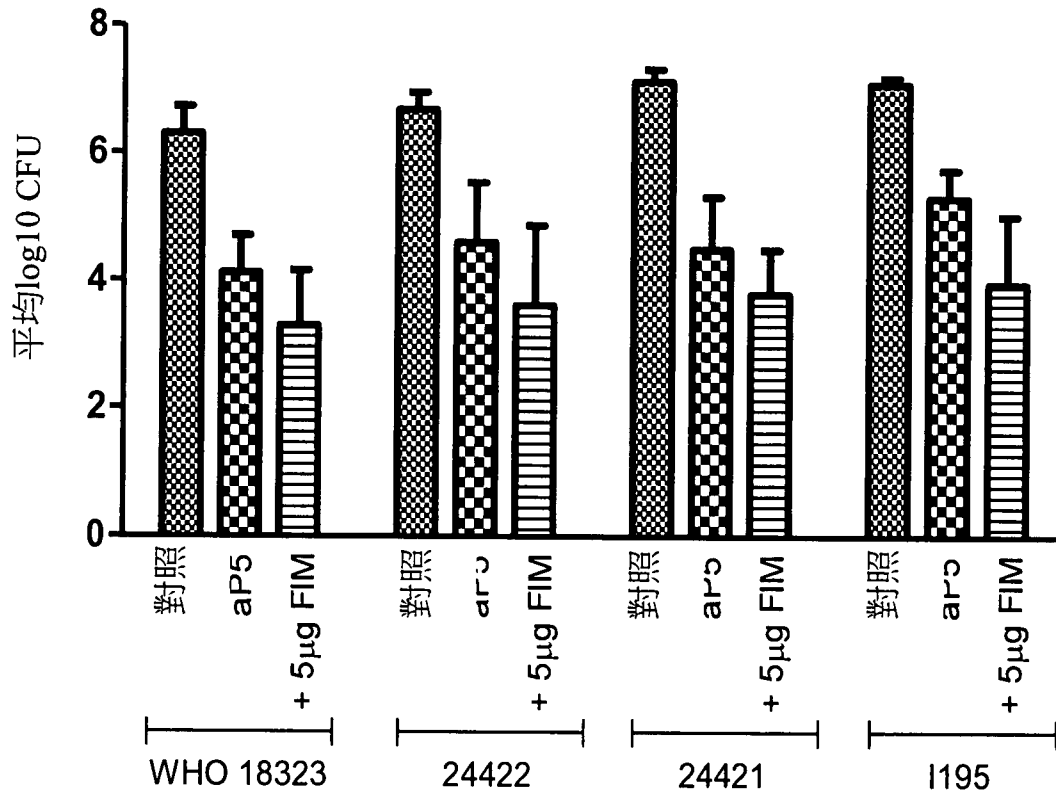


圖 3