



(21)申請案號：113110870

(22)申請日：中華民國 113 (2024) 年 03 月 22 日

(51)Int. Cl. :

C07K14/22 (2006.01)C12N15/31 (2006.01)

A61K39/095 (2006.01)A61P31/04 (2006.01)

A61K39/39 (2006.01)

(30)優先權：2023/03/24 印度 202321021121

(71)申請人：印度商印度血清研究公司 (印度) SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LIMITED (IN)
印度

(72)發明人：皮薩 薩哈吉 PISAL, SAMBHAJI SHANKAR (IN) ； 安南拉朱 達塔特雷 ANNAMRAJU, DATTATREYA SARMA (IN) ； 德赫爾 拉傑夫 DHERE, RAJEEV MHALASAKANT (IN)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：41 項 圖式數：30 共 261 頁

(54)名稱

基於腦膜炎球菌蛋白的疫苗製劑及其製造方法

(57)摘要

本發明提供了具有所需因子 H 結合減少的融合蛋白，特別地本發明提供了用於融合蛋白的優化製造製程以及包含該等融合蛋白的製劑。本發明提供了一種用於製造針對腦膜炎雙球菌的有效疫苗製劑的高效平臺製程，該疫苗製劑滿足多項標準，包括提高的免疫原性、安全性、穩定性及可負擔性。

Present invention provides fusion proteins with desired reduction in factor H binding, particularly the present invention provides optimized manufacturing process for fusion proteins and formulations comprising the fusion proteins. Present invention provides an efficient platform process for manufacturing an effective vaccine formulation against Neisseria meningitidis that meets multiple criterion including improved immunogenicity, safety, stability and affordability.

指定代表圖：

[illegible]

A circular map of the pET-28a HIS MBP TEV V2.19 M6_PorA316-320_exP1.4 plasmid construct, which is 7189 bp in size. The map shows various restriction enzyme sites and features around the circle. Key elements include:

- Origin of Replication (ori)**: Indicated by a thick grey arc at approximately 1000 bp.
- Tetracycline Resistance Gene (tet^r)**: A large grey arc spanning from approximately 1000 bp to 2400 bp.
- MCS1 (Multiple Cloning Site 1)**: Located at approximately 1000 bp, containing sites for XbaI, KpnI, BamHI, SmaI, SalI, PstI, ClaI, BspDI, NruI, and NotI.
- MCS2 (Multiple Cloning Site 2)**: Located at approximately 2400 bp, containing sites for BspSI, BssScl, SspQ, SapI, TspMI, XmaI, SmaI, and BspDI.
- MCS3 (Multiple Cloning Site 3)**: Located at approximately 3400 bp, containing sites for PpuMI, FspI, BglI, HpaI, PshAI, EcoRV, PspOMI, BstEII, MluI, SgrAI, SphI, BsaI, BsmBI, BsuWI, and BmgBI.
- Other Features**: Includes a Shine-Dalgarno sequence (SD), a ribosome binding site (RBS), and a transcription start site (TSS) at approximately 1000 bp.

The following table lists the restriction enzymes and their positions on the plasmid map:

Restriction Enzyme	Position (bp)
PstI	(6302)
BmgBI	(5640)
BsuWI	(5388)
BsaI	(5161)
XbaI	(5030)
SgrAI	(4923)
SphI	(4775)
MluI	(4242)
BstEII	(4060)
ApaI	(4039)
PspOMI	(4025)
EcoRV	(3796)
HpaI	(3740)
PshAI	(3401)
BglI	(3185)
FspI	(3164)
PpuMI	(3136)
BspSI	(1968)
BssScl	(1968)
SspQ	(2258)
SapI	(2258)
TatI	(2337)
AccI	(2373)
BbsI	(2374)
PfFI	(2399)
TonIII	(2399)
AsiSI	(945)
TspMI	(1067)
XmaI	(1067)
SmaI	(1069)
BspDI	(1250)
NruI	(1286)

【第 2 圖】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

基於腦膜炎球菌蛋白的疫苗製劑及其製造方法

【英文發明名稱】

MENINGOCOCCAL PROTEIN BASED VACCINE FORMULATIONS
AND METHODS FOR MANUFACTURING THEREOF

【中文】

本發明提供了具有所需因子H結合減少的融合蛋白，特別地本發明提供了用於融合蛋白的優化製造製程以及包含該等融合蛋白的製劑。本發明提供了一種用於製造針對腦膜炎雙球菌的有效疫苗製劑的高效平臺製程，該疫苗製劑滿足多項標準，包括提高的免疫原性、安全性、穩定性及可負擔性。

【英文】

Present invention provides fusion proteins with desired reduction in factor H binding, particularly the present invention provides optimized manufacturing process for fusion proteins and formulations comprising the fusion proteins. Present invention provides an efficient platform process for manufacturing an effective vaccine formulation against *Neisseria meningitidis* that meets multiple criterion including improved immunogenicity, safety, stability and affordability.

【指定代表圖】圖 1
【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

基於腦膜炎球菌蛋白的疫苗製劑及其製造方法

【英文發明名稱】

MENINGOCOCCAL PROTEIN BASED VACCINE FORMULATIONS
AND METHODS FOR MANUFACTURING THEREOF

【技術領域】

【0001】本發明係關於疫苗製劑領域及其製造方法。特定言之，本發明係關於基於腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*)(腦膜炎球菌)血清群B的重組/嵌合蛋白抗原的上游、下游及製劑開發、製備此類基於嵌合蛋白的製劑的方法，以及該等製劑用於預防及/或治療患有腦膜炎雙球菌(腦膜炎球菌)血清群B感染的受試者的用途。

[相關申請之交互參照]

【0002】本申請主張於2023年3月24日提交的IN202321021121的優先權，該申請全文以引用方式併入本文。

[序列表]

【0003】本申請包含名為「SIIPL MEN B 2023_IN202321021121_00112ORDIN」的以電子形式

(ST.26)提交的序列列表。序列列表的內容整體併入本文中。

【先前技術】

【0004】本文中的所有出版物均以引用方式併入，其引用程度如同每個單獨的出版物或專利申請被具體且單獨地指出為以引用方式併入一一般。以下描述包括可能有助於理解本發明的資訊。此既不表示承認本文提供的資訊中的任何為先前技術或與當前主張保護的發明相關，亦不表示任何明確或隱含引用的出版物屬於先前技術。

【0005】腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*)是一種重要的病原體，尤其是在兒童和年輕成人中。敗血症及腦膜炎是侵襲性腦膜炎球菌病(*invasive meningococcal disease, IMD*)的最危及生命的形式。播散性疾病的病死率保持在約10%，而三分之一的腦膜炎球菌病倖存者會遭受嚴重的衰弱和長期後遺症。此病由於其高發病率及死亡率已成為世界性的健康問題。

【0006】基於類毒素的疫苗已在富裕國家幾乎消滅了白喉和破傷風，而基於膠囊的疫苗則已大大減少了由流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)、肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)及一些腦膜炎雙球菌菌株引起的疾病。然而，針對基於類毒素的疫苗及基於膠囊的疫苗不可行的病原體開發疫苗仍面臨挑戰。該等病原體包括無法分型的流感嗜血桿菌和肺炎鏈球菌毒株、無莢膜病原體諸如淋病雙球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)及卡他莫拉菌

(*Moraxella catarrhalis*)以及有莢膜的血清群B腦膜炎雙球菌，對於該等病原體而言基於膠囊的疫苗是不可行的。鑒於多重耐藥細菌的出現，需要新的疫苗開發方法。針對血清群B腦膜炎球菌的疫苗的開發尤其困難，因為多糖莢膜由於與人類神經細胞黏附分子的免疫學相似性而免疫原性較差。此外，病原體多樣性以及與將來自膜包埋表面蛋白的表位呈遞給免疫系統的困難阻礙了生產成功疫苗的策略。

【0007】腦膜炎雙球菌(*N. meningitidis*)是一種革蘭氏陰性細菌，其定殖於人類上呼吸道，並且是世界範圍內零星和週期性流行病爆發的原因，該等流行病爆發中最顯著的是腦膜炎及敗血症。腦膜炎雙球菌通常具有細胞質膜、肽聚糖層、外膜(其與莢膜多糖一起構成細菌壁)、及伸出到外部環境中的菌毛。腦膜炎雙球菌(Nm)仍然是兒童和年輕成人的敗血症及細菌性腦膜炎的主要原因。每年有約500,000例腦膜炎球菌病，其中有約50,000例死亡。在發達國家，此種細菌是兒童死亡的主要原因，在學校和大學爆發期間具有重大的公共衛生影響，並可能導致倖存者嚴重殘疾。腦膜炎雙球菌的帶莢膜毒株是兒童和年輕成人的細菌性腦膜炎及敗血症的主要原因。基於化學上及抗原上不同的多糖莢膜，腦膜炎雙球菌可分類為至少12種血清群(包括血清群A、B、C、H、I、K、L、29E、W135、X、Y及Z)。最常見的血清群是A、B及C，其是全世界疾病的90%的原因。B血清群是歐洲、美國和拉丁美洲的若干國

家的腦膜炎球菌疾病的最常見病因，並且每5-10年就會在撒哈拉以南非洲引發一次流行。腦膜炎球菌是一種毀滅性疾病，儘管有抗生素可用，但其仍能在數小時內殺死兒童和年輕成人。因此，預防性免疫是保護個人免受腦膜炎球菌感染的最佳方式。

【0008】疫苗基於細菌多糖莢膜可用，但是腦膜炎雙球菌血清群B的多糖莢膜免疫原性較差，因為其與人類神經組織中的糖蛋白具有結構同一性並且若用作疫苗可能會誘發自身免疫。因此，血清群B『人源化』擱置了朝向開發針對B群的安全且免疫原性綴合多糖疫苗的早期努力，因為該多糖不會引發血清殺菌抗體，並且體外抗莢膜B抗體會識別胎兒腦組織中的神經細胞黏附分子。

【0009】目前已經有兩種主要方法用於開發針對血清群B腦膜炎雙球菌的疫苗：外膜囊泡疫苗(outer membrane vesicle vaccine, OMVV)及重組蛋白亞單位疫苗。OMVV是首次在20世紀80年代開發的。腦膜炎球菌OMVV中的免疫優勢抗原是PorA，一種具有八個暴露在表面的環的豐富外膜孔蛋白。第一環及第四環分別被稱為可變區1及可變區2(VR1及VR2)，因為它們會產生免疫應答並且會經受抗原變異。VR2環主導由OMVV引發的PorA特異性免疫，其對表現具有不同VR2的PorA的毒株提供有限的交叉保護或沒有交叉保護。當對更長的隨訪期進行評定時，包括在智利研究了20個月的OMV疫苗，其有效率下降到50%，表明反應持續時間較短(A.L. Wilkins, M.D. Snape等人 2017)。

【0010】為了擴大覆蓋範圍，已經開發出了包含多種PorA的OMVV，並根據循環毒株中PorA序列的流行性進行選擇。然而，OMVV存在複雜的製造及監管問題。先前技術疫苗往往利用所謂「水泡」的純化，該等水泡代表從感興趣的特定生物體的細胞表面脫落的囊泡。然而，此類粗產物亦存在很多問題。例如，該等水泡的組成存在很大差異。目前沒有控制哪些蛋白質被納入該等水泡或排除在該等水泡之外的可靠方式。該等水泡可能包含或可能不包含感興趣的生物體的多糖包衣元件。無法可靠地確定水泡的各個組分與彼此的比例。該等水泡的組成很難輕易確定或控制。

【0011】Bexsero®(GSK Vaccines)中的OMV是高度反應原性的，因此該疫苗通常與對乙醯胺基酚一起給予，由於此父母變得擔心副作用(Prymula, R. 2014)。Bexsero®提供不確定的覆蓋範圍，因為1)抗原來源於單一腦膜炎球菌毒株(Tan, L.等人 2010)；2)大多數免疫原性研究都是按照3+1方案而不是英國計劃的2+1方案(分別在2個月、4個月和12個月時按劑量投配)進行的；3)間接而非直接的保護相關性主要在13個月大時進行量測，而不是在風險最大的嬰兒中進行量測。

【0012】基於外膜囊泡(Outer membrane vesicle, OMV)的腦膜炎雙球菌血清群B疫苗已成功用於預防流行病(最近一次是在新西蘭)，但僅能提供針對表現與OMV中相同的PorA變體(一種外膜孔蛋白)的毒株的保護。OMV作為

免疫原並不受歡迎，因為製造期間的一致性及毒性可能是成問題的。例如，OMV可能含有有毒的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。

【0013】PorA是最豐富的腦膜炎球菌外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)，其亦會引發SBA，並且是已成功用於疫情的OMV疫苗引發的免疫應答的主要靶標。PorA變體在其可變區(variable region, VR)方面有所不同，該等可變區係作為免疫應答的靶標的表面暴露的環。值得注意的是，VR2是OMV疫苗引發的大多數SBA的原因。然而，PorA是一種具有多個疏水結構域的完整OMP。此使得PorA難以以其天然構象作為重組蛋白生產，從而限制了其作為亞單位疫苗抗原的用途。

【0014】因子H結合蛋白(factor H binding protein, fHbp)亦是一種抗原，其在免疫個體中引發血清殺菌抗體反應並且是用於預防目前正在臨床試驗中進行評估的腦膜炎球菌病，特別是血清群B疾病的試驗性疫苗的關鍵組分。因子H結合蛋白(fHbp，在本領域中亦稱為脂蛋白2086(Fletcher等人 (2004) Infect Immun 72:2088-2100)、基因組衍生的奈瑟氏球菌抗原(Genome-derived Neisserial antigen, GNA) 1870 (Maignani等人 (2003) J Exp Med 197:789-99或「741」)是在腦膜炎雙球菌中表現的表面暴露脂蛋白。基於核苷酸及所預測的胺基酸序列的差異，來自不同腦膜炎雙球菌菌株的fHbp可以使用若干種方案進行分類。該等包括兩個亞家族(A及B)(Murphy E等人(2009)

The Journal of Infectious Diseases 200: 379-389)或三種變異群 (V1、V2、及 V3)(Masignani V 等人 (2003) The Journal of Experimental Medicine 197:789-799)，其中亞家族 A 對應於 V2 及 V3，並且亞家族 B 對應於 V1(其係最豐富的)。

【0015】重組亞單位疫苗 Bexsero®(GSK vaccines)及 Trumenba®(Wyeth Pharmaceuticals)含有重要的腦膜炎球菌抗原，因子 H 結合蛋白 (fHbp)，其是一種由緊密結合人補體因子 H (complement factor H, CFH) 的結構域 6 及 7 的兩個 β 桶構成的脂蛋白。fHbp 是抗原可變的；基因組序列的資料庫包含多於 900 種不同的 fHbp 胜肽，該等 fHbp 胜肽落入三種變體群或兩種亞家族：V1(亞家族 B)、V2 及 V3(均為亞家族 A)。一般而言，用特定 fHbp 進行免疫會誘導針對表現屬於相同而不是不同變體群的 fHbp 的毒株的交叉保護，儘管 fHbp 變體群 2 及 3(亞家族 A)之間可以存在交叉保護。Bexsero® 含有單個 fHbp 胜肽 (V1.1) 以及另外兩種重組抗原及 OMV，而 Trumenba® 僅由兩個 fHbp 胜肽 (V1.55 及 V3.45) 構成。迄今為止，尚無任何疫苗研究包括 V2 fHbp，儘管表現此種變體的菌株占有所有分離株的約 20-30%(占英國病例的 38%)。沒有具有 v2 fHbp 的疫苗，因為此是一種固有不穩定的抗原。腦膜炎雙球菌上的 fHbp 是一種由藉由短胺基酸接頭接合的兩個 β 桶 (N 末端桶及 C 末端桶) 組成的 27 KDa 脂蛋白。目前許可的疫苗中缺乏 V2 fHbp 的原因在於其 N 末端 β -桶的不穩定性 (Prymula, R. 2014; Johnson, S

2012)。此外，蛋白質穩定性在疫苗製造期間是重要的，因為它會影響產量，並且是質量控制的重要問題。此外，Bexsero®及Trumenba®中的抗原分別與目前在英國傳播的血清群B腦膜炎雙球菌分離株的36%和4.8%具有精確序列匹配，從而導致人們擔心它們是否有能力針對抗原多樣化的病原體提供廣泛的覆蓋範圍。進一步，亦已經揭示了與野生型V2 fHbp相比穩定性增加的經修飾V2 fHbp，其中經修飾的V2 fHbp包含Ser35、Asp107、Val112、Leu114、Ser137及Gly138處的至少六個突變。由於單一fHbp不提供針對腦膜炎球菌病的普遍保護，因此使用包含來自VI、V2及V3三種變體中的每一者的代表的疫苗進行免疫是廣譜腦膜炎雙球菌血清群B保護所必須的。

【0016】Bexsero®及Trumenba®疫苗都是在人們認識到補體因子H (Complement factor H, CFH)經由fHbp與腦膜炎球菌高親和力結合，並且此種結合可能損害免疫反應之前開發的(Schneider, M 2009)。儘管已證明fHbp是一種重要的保護性抗原，但目前尚不清楚fHbp在免疫時與fH相互作用的程度，以及任何fHbp-fH相互作用是否會影響fHbp在人體中的整體免疫原性。對hfH轉基因小鼠和嬰兒恆河獼猴(rhesus macaques)的研究，後者具有允許與fHbp的高或低結合的fH基因多態性(Konar M 2015)，已表明fH與fHbp的結合會降低fHbp的免疫原性(Beemink PT 2011)(Costa 2014)(Giuntini S 2015)(Granoff DM 2015)(Rossi R 2013)。

【0017】進一步，上游、下游及製劑開發往往可係生物製藥早期引入市場和滿足群體需求的限速步驟。

【0018】上游製程開發包括將發酵製程成比例擴大以確保大規模生產的產品產量及品質與小規模生產的產品產量及品質相似。各種培養參數，諸如培養基組成、pH、攪動、通氣、溫度、細胞密度、誘導劑濃度、誘導時間及進料策略都會影響蛋白質表現位準，具體取決於表現系統。因此，評估用於每種重組蛋白的表現及有效生物製程的開發的培養條件至關重要。

【0019】由於以下原因，大腸桿菌(*Escherichia coli*)係用於生產重組蛋白的最廣泛使用的細菌宿主：(1)在優化條件下其生長速率很快，一代時間只需20 min(Clark and Maaløe, 1967)；(2)分子操縱工具十分發達並且有對其生物學的深入瞭解；並且(3)能夠使用廉價的培養試劑實現高細胞密度。但在實踐中，必須克服沿著管線遇到的許多障礙物。該等障礙物包括宿主菌株生長不良、蛋白質不穩定性或毒性、聚集和包涵體形成、環境條件不適宜(溫度、pH、鹽濃度等)以及甚至根本沒有擴增表現。當無法偵測到感興趣的蛋白質或偵測到感興趣的蛋白質但位準非常低(小於微克/升培養物)時，此可能是由於生長速率較慢、最終細胞密度低以及死亡。大腸桿菌不能執行翻譯後修飾，限制了此種宿主生物體中可以以可溶性和活性形式產生的產物的範圍。此外，大腸桿菌不能分泌重組蛋白。因此，需要破壞重組大腸桿菌細胞才能獲取細胞內產物，然後通

常藉由若干步過濾來純化該細胞內產物。

【0020】此外，重組蛋白在大腸桿菌中的高位準表現導致所表現的蛋白聚集到包涵體(inclusion body, IB)中。此對於在工業規模上生產具有適當生物功能的可溶性重組蛋白提出了嚴峻的挑戰，因為其需要大量的加工，涉及從細胞分離、溶解、重折疊及純化以產生生物活性蛋白。改變培養條件通常是減少大腸桿菌中IB形成的最簡單的解決方案。然而，有利於可溶性蛋白質生產的培養條件可能取決於所涉及的感興趣的蛋白質和所使用的大腸桿菌宿主菌株而異，並且因此需要實驗優化。諸如表現菌株、發酵培養基及操作條件的因素都在製程擴大規模以維持或提高更大規模時的產量並最終在工業規模上經由經濟高效、商業上可行的製造製程提供大量蛋白質中發揮著重要作用。因此，確定將對特定製程至關重要的適當參數或參數集是重要的。

【0021】重組蛋白的高位準生產隨後將需要工業規模上的高效純化過程，因為其有助於供人類使用的治療產品的批准。細胞破碎是回收作為細胞內IB表現的所需蛋白質所必需的。細胞破碎在小規模工作中可能非常有效；然而，擴大規模的效果卻很差。由於雜訊，超聲波處理具有高能量需求，以及嚴重的健康及安全性問題。其不是連續的。化學細胞裂解對使用者構成重大的健康及安全性風險，並且大規模生產所需的大量試劑的使用成本可能過高。此外，鹽及去汙劑的存在可能與蛋白質測定不兼容。

其亦可能影響下游應用(例如，質譜分析)的結果。因此，需要考慮適當的細胞裂解方法以在擴大規模期間獲得最佳結果。

【0022】眾所周知的是上游製程中產物濃度的提高會導致較大的層析樹脂體積及較高的緩衝液需求。宿主細胞蛋白(host cell protein, HCP)及DNA是雜質的主要來源，並且各個製程的HCP彼此在其分子量、電荷、疏水性及結構方面存在很大差異。因此，它們對層析純化提出了挑戰。

【0023】在需要純化的可溶性活性重組蛋白的情況下，擁有以下手段是非常有價值的：(i)在表現及純化方案中偵測該純化的可溶性活性重組蛋白；(ii)達到最大溶解度；以及(iii)輕鬆地從大腸桿菌細胞環境中純化該純化的可溶性活性重組蛋白。表現與所需蛋白質串聯的一段胺基酸(胜肽標籤)或一段較大的多胜肽(融合伴侶)以形成嵌合蛋白可以允許直接實現該三個目標。由於胜肽標籤較小，因此與蛋白質融合時不太可能產生干擾。然而，在一些情況下，該等胜肽標籤可能會對融合嵌合蛋白的三級結構或生物活性產生負面影響。因此，胜肽標籤亦應該被移除，因為其可影響蛋白質構象，妨礙與伴侶分子的相互作用或降低生物活性。事實上，當該等標籤被移除時，所需產物的最終溶解度是不可預測的。在藉由酶消化移除標籤的情況下，表現載體具有編碼標籤編碼基因下游的蛋白酶切割位點的序列。在不同的蛋白酶之間進行選擇基於特異性、成本、切割後蛋白質中剩餘的胺基酸的數量以及消化後移

除的容易度，其中來自煙草蝕紋病毒(Tobacco Etch Virus, TEV)的C型半胱胺酸蛋白酶是最廣泛使用的蛋白酶之一。然而，TEV蛋白酶在大腸桿菌中的表現在工業規模上面臨著關於蛋白質產量(產品產量降低)或蛋白質溶解度低的困難，此意謂有效切割需要大體積及往往較長的孵育時間。

【0024】基於重組蛋白抗原的疫苗通常需要佐劑來實現針對相關聯的疾病的保護。鋁鹽是美國食品藥物管理局批准用於人類使用的疫苗中最普遍的佐劑。佐劑的零電荷點(point of zero charge, PZC)是淨表面電荷為零的點；羥基氧化鋁的PZC為約11，而磷酸鋁的PZC為約4-5.5。當蛋白質的淨電荷符號與佐劑表面的淨電荷符號相反時，蛋白質至佐劑表面的吸附通常最大化，從而允許靜電吸引。因此，蛋白質疫苗製劑被配製為具有吸附緩衝液以改善對表面的吸附。然而，當蛋白質與液固界面結合時，蛋白質構象可發生變化。此外，與佐劑結合所誘導的構象變化可能會改變長期儲存期間的蛋白質穩定性。例如，若吸附基本上完成，則不太可能發生經由本體溶液中發生的途徑進行的聚集。相反，結合時解折疊可能會將通常埋藏的殘基暴露於溶劑中，從而促進降解過程，諸如氧化。(J Pharm Sci. 2009年9月; 98(9): 2970-2993)。

【0025】吸附到佐劑表面的重組蛋白抗原在長期儲存時的實體及共價穩定化是人們關注的基本問題，因為降解可能會對重組蛋白抗原的免疫原性、毒性機功效有影響。

【0026】有很多影響重組蛋白抗原的穩定性的因素，

其包括有助於儲存穩定性的抗原至佐劑表面的吸附百分比、 ζ 電位、黏度、溶質濃度、pH變化、及溫度。

【0027】 ζ 電位就是一種此類實體特性，其對於優化懸浮液、乳液及蛋白質溶液的製劑以及預測與表面的相互作用至關重要。懸浮液中的任何粒子、大分子或材料表面都會表現出 ζ 電位。瞭解 ζ 電位可以減少生產試驗製劑所需的時間。其亦可以用作預測長期穩定性的輔助。在某些情況下，分散體中的粒子可能會相互黏附並形成大小不斷增加的聚集體，該等聚集體可能會在重力影響下沉降。進一步可以看出 ζ 電位取決於所用緩衝液的性質。

【0028】有很多影響 ζ 電位的因素，其包括製劑中所使用的賦形劑、賦形劑兼容性、製劑組分的濃度、pH及電導率。

【0029】pH變化會影響靜電力，而凡德瓦爾力對於給定系統保持恆定。在接近等電點的pH下，中性分子之間的電荷-電荷排斥力最小並且吸引力占主導，從而導致絮凝體系、高黏度、並且最容易發生聚集。Liu等人及Chari等人在抗體溶液中觀察到了此種pH效應。

【0030】pH和溫度對重組蛋白抗原的穩定性及活性的影響受到以下因素影響：重組蛋白抗原特性的可能發變化，包括逐漸聚集、影響實體及化學穩定性兩者的降解過程(諸如氧化)。

【0031】因此，製劑開發對於重組蛋白抗原的長期儲存變得更加重要。已知隨著聚集的增加，可用免疫原的有

效濃度會降低。因此，存在對藉由穩定化重組蛋白以防止聚集來克服聚集問題的製劑及方法的需要。

【0032】因此，需要一種針對腦膜炎雙球菌的疫苗，該疫苗具有重組蛋白抗原至佐劑表面的最大吸附，顯示出低黏度，沒有聚集，在較寬的溫度範圍內具有長期穩定性，具有提高的免疫原性，並且與此同時是便宜且安全的。

【0033】此外，亦需要一種高效平臺製程來製造有效的腦膜炎雙球菌疫苗，該疫苗滿足多項標準，包括提高的免疫原性、安全性及可負擔性，特別是表現出低黏度、沒有聚集並在寬溫度範圍內表現出長期穩定性的改進製劑。

【0034】此外，亦需要製備可溶、高產且穩定的嵌合蛋白，其中所有必需的蛋白質抗原都是免疫原性的。

【0035】為了克服先前技術的上述局限性，申請人提出了基於腦膜炎雙球菌(腦膜炎球菌)血清群B的嵌合蛋白抗原的改進的上游、下游方法及製劑開發，以及製備此類基於嵌合蛋白的製劑的方法。

【發明內容】

【0036】申請人提供了1)針對血清群B腦膜炎雙球菌(MenB)的嵌合抗原(Chimeric antigen, ChA)。ChA利用fHbp(非脂化的)作為分子支架來呈遞表面暴露的PorA VR2環，此是藉由將VR2環(「10-20個胺基酸的」PorA VR2環而不是「整個PorA蛋白」)插入fHbp中的 β 轉角區域中來實

現的。ChA保留了來自fHbp及PorA兩者的表位，並被發現引發針對兩種抗原的功能性免疫應答。VR2環的整合不會改變fHbp的整體架構，並且VR2環會折疊成由殺菌mAb識別的構象。2)可溶且產量高、穩定的嵌合蛋白，其中fHbp及PorA VR2環均是免疫原性的。3)生成由最普遍的fHbp及PorA抗原構成的嵌合體以最大化疫苗覆蓋率，因為嵌合體組成反映了在給定地理區域內循環的普遍的fHbp及PorA抗原。4)在fHbp中的特定位置處插入PorA環以獲得所需的因子H結合減少(與野生型相比減少了至少10%、至少50%；較佳地>70%)並且分子量在20 kDa至40 kDa範圍內，與此同時保留fHbp及PorA兩者的免疫原性表位。

表 1：fHbp-PorA 嵌合體		
嵌合體序號	嵌合體的描述	分子量(kDa)
嵌合體 1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	20-40
嵌合體 2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	20-40
嵌合體 3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	20-40
嵌合體 4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 9)	20-40
嵌合體 5	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 10)	20-40

【 0037 】 5)將一個 PorA 環 插入一個 fHbp(而不是 2 個

PorA 環插入一個 fHbp 上)並且插入麥芽糖結合蛋白(maltose-binding protein, MBP)標籤以及 His 標籤以確保最佳表現、溶解度及穩定性。6)在 His-MBP 標籤與嵌合體之間插入 TEV 切割位點，以便在下游加工期間輕鬆移除標籤並優化受質(帶標籤的重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白)與酶的比率(20:1 而不是 5:1、10:1)、溫度/孵育(30℃，15-18 小時)。7)保留質粒達至少 50 代，亦不需要任何抗生素。8)使用化學裂解及均質機的組合(而不是超聲處理或僅化學裂解)進行大規模細胞裂解(壓力 -1000-1500 巴；3-8 個循環)，考慮到使用均質機的優點包括在 4-15℃ 下破壞細胞壁、有效用於提取中性脂質、易於使用並且體積更小、處理更快、操作可靠、剪切速率恆定、以及完全可擴展。9)由於使用了最佳濃度的誘導劑(IPTG(1 mM 至 10 mM)或乳糖(1 g/L 至 50 g/L))，所以帶標籤的 fHbp 蛋白的產量可為來自 100 克濕細胞質量(收穫物)的至少 700 mg 的純化帶標籤蛋白；使用補充有 L-甲硫胺酸的改良 M9 鹽培養基(化學上確定的培養基)/補料分批模式(與 Luria 肉湯(Luria Broth, LB)培養基(複合培養基)/分批模式相比，將 L-甲硫胺酸濃度維持在 1-10 mM 之間，較佳地 2-5 mM 之間；當 590/600 nm 下的 OD 為約 20-100 時停止葡萄糖進料並開始甘油進料，並藉由在補料分批模式下添加及/或將乳糖維持在 1-50 g/L 來誘導培養。10)使用兩步層析法(離子交換層析之後進行親和層析)代替以前已知的 3 步層析法(多步親和層析、離子交換層析之後進行尺寸排阻層析)。11)藉由取代 N 末端 β 桶

中的胺基酸(亦即改變此桶的<5%的殘基)來使用穩定化的V2 fHbp。12)由佐劑(氫氧化鋁)、磷酸鹽緩衝液、甘露醇及聚山梨醇酯(聚山梨醇酯20)構成的製劑，從而賦予最佳pH(7-8)、滲透壓(200-500，較佳地200-400 mOsmol/kg)及 ζ 電位(-16至-30 mV)，導致最大吸附並保持嵌合蛋白的完整性/穩定性。13)對於TEV切割，發現以1:20的酶:受質比率孵育18小時是最佳的。

【圖式簡單說明】

【0038】現在將借助附圖來描述本發明，在該等附圖中：

[第1圖至第5圖]圖示了根據本發明的實施例的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的載體圖；

[第6圖]圖示了根據本發明的實施例的TEV蛋白酶的載體圖；

[第7圖]圖示了用於帶標籤fHbp蛋白的生產的10 L規模發酵批次的種子開發的流程圖；

[第8圖]圖示了用於在10 L規模發酵罐中生產帶標籤fHbp蛋白的流程圖；

[第9a圖至第9h圖]圖示了帶標籤fHbp蛋白在10 L規模發酵批次中的生長概況以及SDS PAGE凝膠圖像；

[第10圖]圖示了用於生產TEV蛋白酶的10 L規模發酵批次的種子開發的流程圖；

[第11圖]圖示了在10 L規模發酵罐中生產TEV蛋白

酶；

[第 12a 圖至第 12b 圖]圖示了 TEV 蛋白酶在 10 L 規模發酵批次中的生長概況以及 SDS PAGE 凝膠圖像；

[第 13 圖]圖示了使用均質化獲得的裂解百分比；

[第 14a 圖至第 14b 圖]圖示了使用不同受質:酶比率的 TEV 蛋白酶切割反應的 SDS-PAGE 圖像；

[第 15 圖]圖示了使用不同受質:酶比率的 TEV 蛋白酶切割反應的密度量測分析；

[第 16 圖]圖示了使用不同溫度的 TEV 蛋白酶裂解反應的 SDS-PAGE 圖像；

[第 17 圖]圖示了使用不同溫度的 TEV 蛋白酶裂解反應的密度量測分析；

[第 18 圖]圖示了藉由 Ni-瓊脂糖樹脂 (pH 7.4) 純化 TEV 蛋白酶的流程圖；

[第 19 圖]圖示了藉由 Ni-瓊脂糖樹脂 (pH 8.5) 純化 TEV 蛋白酶的流程圖；

[第 20a 圖至第 20b 圖]分別圖示了 TEV 蛋白酶在 pH 8.5 及 pH 7.4 下的純化概況；

[第 21 圖]圖示了藉由 Ni-瓊脂糖樹脂純化帶標籤蛋白的流程圖；

[第 22 圖]圖示了用於在包涵體中表現的帶標籤蛋白的純化的流程圖；

[第 23 圖]圖示了從純化的蛋白質中移除標籤的流程圖；

[第 24圖]圖示了用於純化重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白的離子交換層析步驟的流程圖；

[第 25圖]圖示了用於純化重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白的親和層析步驟的流程圖；

[第 26圖]圖示了圖形表示，其中突出顯示了每個出血日的個別資料點及 GMT；

[第 27圖]圖示了人類補體因子-H與野生型 fHbp 結合相較於與 Men B 嵌合蛋白結合的代表性資料；

[第 28圖]以 GMT 圖示了 MenFive 血清群在每個時間點(血清出血日)的圖形表示；

[第 29圖]以 GMT 圖示了 MenB 血清群在每個時間點(血清出血日)的圖形表示；

[第 30圖]圖示了使用微量二金雞納酸(Bicinchoninic acid, BCA)法估算蛋白質的標準曲線。

【實施方式】

目的

【0039】本發明的目的中的一些目的(本文中的至少一個實施例滿足該等目的)如下：

【0040】本揭露案的目的係改善先前技術的一或多個問題或者至少提供有用的替代方案。

【0041】本揭露案的目的係提供一種用於製造針對腦膜炎雙球菌的有效疫苗製劑的高效平臺製程，該疫苗製劑滿足多項標準，包括提高的免疫原性、安全性及可負擔

性。

【0042】本揭露案的另一目的是提供一種用於製造有效的疫苗製劑的高效平臺製程，該疫苗製劑包含一或多種來源於腦膜炎雙球菌血清群B的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白以及醫藥學上可接受的載劑或賦形劑。

【0043】本揭露案的另一個目的是開發及優化上游生物製程以針對領先細胞系增加細胞密度及重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的生產力。

【0044】本揭露案的另一目的是開發及優化下游生物製程以便以高產量及高純度生產重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白。

【0045】本揭露案的另一目的是開發及優化包含重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的製劑，該製劑表現出改善的免疫原性、低黏度、無聚集性；跨寬溫度範圍內表現出長期穩定性。

【0046】本揭露案的另一目的是開發及優化包含針對血清群B腦膜炎雙球菌的嵌合抗原(ChA)的製劑。ChA利用fHbp(非脂化的)作為分子支架來呈遞表面暴露的PorA VR2環，此是藉由將VR2環(而不是「整個PorA蛋白」)插入fHbp中的 β 轉角區域中來實現的。ChA保留了來自fHbp及PorA兩者的表位，並被發現引發針對兩種抗原的功能性免疫應答，其中VR2環的整合不會改變fHbp的整體架構，並且VR2環會折疊成由殺菌mAb識別的構象。

【0047】本揭露案的另一目的是開發及優化包含嵌合

蛋白的製劑，該等嵌合蛋白是可溶並且高產的、穩定的，其中 fHbp 及 PorA VR2 環均是免疫原性的

【0048】本揭露案的另一目的是開發及優化包含由最普遍的 fHbp 及 PorA 抗原構成的嵌合體的製劑以最大化疫苗覆蓋率

【0049】本揭露案的另一目的是開發及優化包含分子量在 20 kDa 至 40 kDa 範圍內的嵌合蛋白，與此同時保留 fHbp 及 PorA 的免疫原性表位的製劑：

表 2：fHbp-PorA 嵌合體		
嵌合體序號	嵌合體的描述	分子量(kDa)
嵌合體 1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	20-40
嵌合體 2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	20-40
嵌合體 3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	20-40
嵌合體 4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 9)	20-40
嵌合體 5	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 10)	20-40

【0050】本揭露案的另一目的是開發及優化下游，包括在 His-MBP 標籤與嵌合體之間插入 TEV 切割位點，以便在下游加工期間容易地移除標籤並優化受質與酶的比率 / 溫度 / 孵育，保留質粒以實現不需要任何抗生素的最大代數。

【0051】本揭露案的另一目的是使用化學裂解及均質機的組合(使用優化的條件代替超聲處理或僅化學方法)進行大規模細胞裂解

【0052】本揭露案的另一目的是由於以下而開發高產量的嵌合fHbp-PorA蛋白：使用最佳濃度的誘導劑；使用經修飾的M9鹽培養基(化學上確定的培養基)/補充有L-甲硫氨酸的補料分批模式；當達到590/600 nm下的特定OD時停止葡萄糖進料並開始甘油進料，以及藉由添加乳糖或IPTG來誘導培養。

【0053】本揭露案的另一目的是開發兩步層析法來代替先前已知的使用至少3步層析法的方法。

【0054】本揭露案的另一目的是開發及優化包含嵌合蛋白、佐劑(氫氧化鋁)、磷酸鹽緩衝液、甘露醇及聚山梨醇酯(聚山梨醇酯20)的製劑，從而賦予最佳pH、滲透重量莫耳濃度及 ζ 電位，導致最大化的吸附並保持嵌合蛋白的完整性/穩定性。

【0055】本揭露案的仍另一目的是提供一種給宿主接種疫苗的方法。

【0056】本揭露案的其他目的及優點將從以下描述更明顯，但此並不意欲限制本揭露案的範疇。

描述

【0057】在描述本發明的本發明組成物及製劑之前，應理解的是本發明不限於所描述的特定組成物及製劑，因

為此類組成物及製劑當然可以變化。亦應當理解，本文所使用的術語不意欲限制，因為本發明的範疇僅受所附申請專利範圍的限制。

【0058】 儘管本揭露案容可能易受不同態樣及實施例的影響，但在附圖中和隨後的詳細論述中圖示了某些實施例，應理解本揭露案可被視為本揭露案的原理的例證並且不意欲將本揭露案的範疇限制於本說明書中所圖示和揭示的內容。

【0059】 提供態樣及實施例是為了向本領域技藝人士透徹且完整地傳達本揭露案的範疇。為了提供對本揭露案的實施例的完整理解，闡述了與特定部件及製程有關的大量細節。對於本領域技藝人士而言將顯而易見的是實施例中提供的細節不應被理解為限制本揭露案的範疇。在一些實施例中，沒有詳細描述眾所周知的組成物、眾所周知的製程、及眾所周知的技術。

【0060】 本揭露案中使用的術語僅用於解釋特定實施例的目的，並且此類術語不應被視為限制本揭露案的範疇。如在本揭露案中所使用的，除非上下文另有明確暗示，否則形式「一」、「一個」及「該」可能亦意欲包括複數形式。

【0061】 術語「包括」、「包含」、「含有」、及「具有」是開放式過渡短語，並且因此指定所述特徵、整數、步驟、操作、要素、模組、單元及/或部件的存在，但不禁止存在或添加一或多個其他特徵、整數、步驟、操

作、要素、部件及/或其群組。本揭露案的製程中所揭示的步驟的特定順序不應被解釋為一定要求按照所描述或圖示的方式執行。亦應當理解，可以採用額外的或替代的步驟。

【0062】如本文所用的術語「包括」、「包含」及「由...構成」與「含有」或「含有」同義，並且是包含性的或開放式的，並且不排除額外的、未列舉的成員、要素或方法步驟。應當理解的是，如本文所用的術語「包括」、「包含」和「由...構成」包括術語「由...組成」。更特定言之，如本文所用的術語「包括」意謂著請求項涵蓋所有列出的要素或方法步驟，但亦可能包括額外的、未命名的要素或方法步驟。例如，包括步驟a)、b)及c)的方法在最狹義的含義上涵蓋由步驟a)、b)及c)組成的方法。短語「由...組成」意謂組成物(或裝置、或方法)具有所述的要素(或步驟)，僅此而已。相反，術語「包括」亦可涵蓋除了步驟a)、b)及c)之外亦包括另外的步驟，例如步驟d)及e)的方法。

【0063】術語「第一」、「第二」、「第三」等不應被解釋為限制本揭露案的範疇，因為前述術語僅可用於區分一個要素、部件、區域、層或區段與另一個部件、區域、層或區段。當在本文使用時，除非本揭露案明確暗示，否則諸如第一、第二、第三等的術語並不暗示特定的順序或次序。

【0064】此外，說明書和申請專利範圍中的術語「第

一」、「第二」、「第三」或「(a)」、「(b)」、「(c)」、「(d)」等用於區分相似的要素，而不一定用於描述順序或時間順序。應當理解的是，如此使用的術語在適當的情況下是可互換的，並且本文所述的本發明的實施例能夠按照與本文所述或說明的順序不同的順序進行操作。在術語「第一」、「第二」、「第三」或「(A)」、「(B)」及「(C)」或「(a)」、「(b)」、「(c)」、「(d)」、「i」、「ii」等涉及方法或用途或測定的步驟的情況下，該等步驟之間沒有時間或時間間隔一致性，亦即，該等步驟可以同時進行，或者此類步驟之間可能有以秒、分鐘、小時、天、周、月或甚至年計的時間間隔，除非本申請中如上文或下文所述另有說明。

【0065】 在以下段落中，將更詳細地定義本發明的不同態樣。除非明確指示為相反，否則如此定義的每個態樣均可與任何其他一或多個態樣進行組合。特別地，任何被指示為較佳或有利的特徵可以與任何其他被指示為較佳或有利的特徵進行組合。

【0066】 貫穿本說明書提到「一個實施例」或「一實施例」意指結合該實施例描述的特定特徵、結構或特性被包含在本發明的至少一個實施例中。因此，貫穿本說明書各處出現短語「在一個實施例中」或「在實施例中」不一定都係指同一實施例，但可以如此。此外，本領域技藝人士從本揭露案可以顯而易見的是，特定的特徵、結構或特性可以以任何合適的方式在一或多個實施例中進行組合。

此外，儘管本文所述的一些實施例包括其他實施例中所包括的一些特徵而非其他特徵，但是不同實施例的特徵的組合意調在本發明的範疇內並且形成不同的實施例，正如本領域技藝人士所理解的。例如，在所附申請專利範圍中，任何主張保護的實施例都可以以任意組合使用。

【0067】應當理解的是，本文中所述的每個特徵或實施例或組合均為本發明的任何態樣的非限制性、說明性實施例，並且因此意調是與本文所述的任何其他特徵或實施例或組合可組合的。例如，在用諸如「一個實施例」、「一些實施例」、「某些實施例」、「另外的實施例」、「特定的例示性實施例」及/或「另一實施例」的語言來描述特徵的情況下，該等類型的實施例中的每個實施例都是意欲與本文所述的任何其他特徵或特徵組合進行組合的特徵的非限制性實施例，而不必列出所有可能的組合。此類特徵或特徵組合適用於本發明的任何態樣。

【0068】此外，貫穿說明書所定義的範疇亦包括端值，亦即1至10的範圍，在1與10之間暗示1及10都包含在該範圍內。為避免疑義，本申請人將有權根據適用法律獲得任何等同物。

【0069】如本文所用，術語「約」當在對所述項目、數目、百分比或術語的值進行定量時係指所述項目、數目、百分比或術語的值的正或負10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的範圍。較佳範圍係正或負10%。

【0070】若本文使用數值範圍，諸如「在1微莫耳與5微莫耳之間的濃度」，則該範圍不僅包括1微莫耳及5微莫耳，亦包括在1微莫耳與5微莫耳之間的任何數值，例如2微莫耳、3微莫耳及4微莫耳。如本文所用的術語「體外」表示在動物或人體的外部或體外。如本文所用的術語「體外」應理解為包括「離體」。術語「離體」通常係指從動物或人體中取出並在體外(例如，在培養容器中)維持或繁殖的組織或細胞。如本文所用的術語「體內」表示動物或人體的內部或體內。

定義：

【0071】為了使本揭露案更易理解，下面首先定義了某些術語。貫穿說明書中可能會闡述以下術語及其他術語的額外定義。

【0072】如本文所用的術語「蛋白質」或「多胜肽」或「(多)胜肽」或「胜肽」(若沒有另外說明，則所有術語可互換使用)涵蓋基本上不含其他宿主細胞多胜肽的分離的及/或純化的及/或重組的(多)胜肽。如本文所提及的術語「胜肽」包含至少2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、45個、50個、60個、70個、80個、90個、100個、150

個、200個、250個、300個或甚至更多個胺基酸殘基，其中一個胺基酸殘基的 α 羧基與另一個胺基酸殘基的 α 胺基結合。如本文所用和所設想的蛋白質或胜肽的翻譯後修飾是對新形成的蛋白質或胜肽的修飾，並且可能涉及胺基酸的缺失、取代或添加，某些胺基酸的化學修飾，例如醯胺化、乙醯化、磷酸化、糖基化、焦谷胺酸形成、甲硫胺酸上磺基基團的氧化/還原，或向某些胺基酸添加類似的小分子。

【0073】如本文所用的術語「同源物」係指本發明中可用的氧化酶或紅素氧還蛋白或紅素氧還蛋白還原酶的細菌、真菌、植物或動物同源物，較佳地植物同源物，但亦包括截短序列、編碼及非編碼DNA序列的單鏈DNA或RNA。

【0074】序列同一性、同源性或相似性在本文中定義為如藉由比較該等序列而確定的兩個或更多個胺基酸序列或兩個或更多個核酸序列之間的關係。通常，序列同一性或相似性是在序列的整個長度上進行比較的，但亦可以僅對彼此進行比對的序列一部分進行比較。較佳地，本文中對序列的整個長度上的序列同一性或相似性進行比較。在本領域中，「同一性」或「相似性」亦意謂多胜肽序列或核酸序列之間的序列相關程度，根據情況而定，由此類序列之間的匹配度確定。可以使用多種軟體工具來生成序列比對，該等軟體工具為諸如：

【0075】Needleman及Wunsch算法-Needleman, Saul B.

及 Wunsch, Christian D. (1970). 「 A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」. Journal of Molecular Biology 48 (3): 443-453。

【0076】例如，此種算法被實施到「NEEDLE」程式中，該程式對兩個序列執行全域比對。NEEDLE程式包含在歐洲分子生物學開放軟體套件(European Molecular Biology Open Software Suite, EMBOSS)中。

【0077】EMBOSS-各種程式的集合：歐洲分子生物學開放軟體套件(EMBOSS)，Trends in Genetics 16 (6), 276 (2000)。

【0078】BLOSUM(BLOcks取代矩陣)—通常基於保守區域(例如蛋白質結構域的保守區域)的比對生成(Henikoff S、Henikoff JG：Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1992年11月15日;89(22):10915-9)。眾多BLOSUM之一係「BLOSUM62」，其往往是許多程式在比對蛋白質序列時的「默認」設置。

【0079】BLAST(基本局部比對搜索工具)-由幾個單獨的程式(BlastP、BlastN)組成，其主要用於在大型序列資料庫中搜索相似序列。BLAST程式亦創建局部比對。通常使用的是由NCBI(美國國家生物技術資訊中心)提供的「BLAST」介面，其為改進版本(「BLAST2」)。「原始」BLAST：Altschul, S.F.、Gish, W.、Miller, W.、

Myers, E.W.及 Lipman, D.J. (1990) 「 Basic local alignment search tool. 」 J. Mol. Biol. 215:403-410 ; BLAST2 : Altschul, Stephen F.、 Thomas L. Madden、 Alejandro A. Schaffer、 Jinghui Zhang、 Zheng Zhang、 Webb Miller、 及 David J. Lipman (1997), 「 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs 」 , Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 。

【 0080 】 如本文所用的序列同一性較佳地是藉由 EMBOSS成對比對算法「 Needle 」確定的值。特定言之，可以使用 NOBRIEF 選項 (與 NO的『簡並同一性及相似性』)，使用來自 EMBOSS包的 NEEDLE程式 (版本 2.8.0或更高版本，EMBOSS：The European Molecular Biology Open Software Suite - Rice, P.等人 Trends in Genetics (2000) 16: 276-277; <http://emboss.bioinformatics.nl>)，其計算「最長同一性」。兩個比對序列之間的同一性、同源性或相似性計算如下：比對中顯示兩個序列中相同胺基酸的對應應位置的數量除以減去比對中的空位總數之後的比對總長度的值。對於胺基酸序列比對，默認參數係：矩陣=Blosum62；開放空位罰分=10.0；空位延伸罰分=0.5。對於核酸序列比對，默認參數係：矩陣=DNAfull；開放空位罰分=10.0；空位延伸罰分=0.5。

【 0081 】 序列同一性通常提供為「序列同一性 %」或「同一性 %」。為了確定兩個胺基酸序列之間的同一性百分比，在第一步驟中生成該兩個序列之間的成對序列比

對，其中該兩個序列在其完整長度、整個長度或全長上進行比對(亦即，成對全域比對)。該比對是用本文所述的程式或軟體生成的。出於本發明目的的較佳比對是可以確定最高序列同一性的比對。

【0082】本文所用的術語序列「同一性」係指使用標準 NCBI BLAST 參數 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 的兩個比對序列之間的同一性百分比。

【0083】本發明的核酸(或多核苷酸)包含編碼本發明的融合蛋白的核酸序列。編碼本發明的融合蛋白的核酸序列較佳地為重組的及/或分離的及/或純化的核酸序列。編碼本發明的融合蛋白的核酸序列可以使用已知的分子生物學標準技術、本文提供的序列資訊及生物體來產生和分離。

【0084】如本文所用的術語「核酸」包括單鏈或雙鏈形式的脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物，亦即多核苷酸，並且除非另有限制，否則涵蓋具有天然核苷酸的基本性質的已知類似物，因為該等已知類似物以類似於天然存在的核苷酸(例如，胜肽核酸)的方式與單鏈核酸雜交。多核苷酸可以是天然或異源結構或調控基因的全長或子序列。除非另有說明，否則該術語包括對指定序列及其互補序列的引用。因此，為了穩定性或出於其他原因而修飾的主鏈的 DNA 或 RNA 是「多核苷酸」，正如該術語在本文中所意欲所指的。此外，包含不常見鹼基(諸如肌苷)或經修飾的鹼基(諸如三苯甲基化鹼基)的 DNA 或 RNA 僅舉兩個實

例而言是如本文所用的術語「多核苷酸」。應當認識到，已對DNA及RNA進行了多種修飾，該等修飾用於本領域技藝人士所知的許多有用用途。如本文所採用的術語「多核苷酸」涵蓋化學、酶促或代謝修飾形式的多核苷酸，以及病毒及細胞(尤其包括簡單及複雜細胞)的特徵性DNA及RNA的化學形式。本文中編碼多胜肽(諸如氧化酶或紅素氧還蛋白或紅素氧還蛋白還原酶)的每個核酸序列，藉由參考遺傳密碼，亦描述了核酸的每一種可能的沉默變體。術語「保守修飾的變體」適用於胺基酸及核酸序列兩者。對於特定的核酸序列，術語「保守修飾的變體」若使用，則可係指由於遺傳密碼的簡並性而編碼胺基酸序列的相同或保守修飾的變體的彼等核酸。術語「遺傳密碼的簡並性」係指事實上大量功能相同的核酸編碼任何給定的蛋白質。例如，密碼子GCA、GCC、GCG及GCU都編碼胺基酸丙胺酸。因此，在密碼子指定丙胺酸的每個位置上，該密碼子都可以改變為所描述的任何對應密碼子，而不會改變所編碼的多胜肽。此種核酸變體是「沉默變體」，並且代表一種保守修飾的變體。術語「多胜肽」、「胜肽」及「蛋白質」在本文中可互換使用以係指胺基酸殘基的聚合物。

【0085】術語「多胜肽」、「胜肽」及「蛋白質」亦適用於其中一或多個胺基酸殘基是對應天然存在的胺基酸的人工化學類似物的胺基酸聚合物，以及天然存在的胺基酸聚合物。天然存在的胺基酸的此類類似物的基本性質

是，當被摻入蛋白質中時，彼蛋白質會對針對相同蛋白質引發但完全由天然存在的胺基酸組成的抗體有特異性反應。術語「多胜肽」、「胜肽」及「蛋白質」亦包含修飾，包括但不限於糖基化、脂質附著、硫酸化、穀胺酸殘基的 γ -羧化、羥基化及ADP-核糖基化。在本申請的上下文中，寡聚物(諸如寡核苷酸、寡胜肽)被認為是聚合物群組的一個種類。寡聚物具有相對較低數目的單體單元，一般為2-100個，特別是6-100個，包括例如引物序列，諸如實施例中用於克隆可用於本發明的氧化酶或紅素氧還蛋白或紅素氧還蛋白還原酶的引物序列。

【0086】當關於本發明的核酸(DNA或RNA)或蛋白質使用時，術語「異源」係指此類核酸或蛋白質，該核酸或蛋白質不是作為其所存在於的生物體、細胞、基因組或DNA或RNA序列的一部分天然存在的，或者存在於與基因組或DNA或RNA序列中與自然界中發現的不同的細胞或一個或多個位置中。本發明的異源核酸或蛋白質對於其被引入的細胞而言不是內源性的，而是從另一個細胞獲得的或者是合成或重組產生的。一般而言，儘管不一定，但是此類核酸編碼通常不是由表現該DNA的細胞產生的蛋白質。對於特定宿主細胞而言為內源性但是已經經由例如DNA改組的使用從其天然形式進行修飾的基因，亦稱為異源的。術語「異源」亦包括天然存在的DNA序列的非天然存在的多個拷貝。因此，術語「異源」可以指如此的DNA區段，其對於細胞而言是外來的或異源的，或者對於細胞而言是同

源的但是在宿主細胞核酸內在位置及/或數量方面通常不是原始存在的。外源DNA區段經表現以產生外源多胜肽。

【0087】本發明的「同源」DNA序列是與其被引入的宿主細胞天然相關的DNA序列。本領域技藝人士應識別為對於表現其的細胞而言是異源的或外來的任何核酸或蛋白質在本文中由術語異源核酸或蛋白質所涵蓋。

【0088】本文關於蛋白質或多胜肽與另一蛋白質或多胜肽相比所使用的術語「經修飾的」、「修飾」、「突變的」或「突變」適用於核苷酸或核酸序列。所提及的術語用於表示編碼蛋白質或多胜肽的經修飾的核苷酸或核酸序列與所比較的蛋白質或多胜肽的核苷酸或核酸序列相比在核苷酸或核酸序列中具有至少一個差異。使用該等術語，而無論經修飾或突變的蛋白質實際上是藉由編碼該等胺基酸的核酸的誘變或多胜肽或蛋白質的修飾獲得的，還是以另一種方式，例如使用人工基因合成方法學獲得的。誘變是本領域中眾所周知的方法，並且包括例如借助於PCR或經由寡核苷酸介導的誘變進行定點誘變，如 Sambrook, J. 及 Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (2001)中所述。如本文關於基因所用的術語「經修飾的」、「修飾」、「突變的」或「突變」用於表示彼基因的核苷酸序列或其調控序列中的至少一個核苷酸與所比較的核苷酸序列不同。修飾或突變特定而言可以是將一核苷酸替換為另一個不同的核苷酸、缺失核苷酸或插

入核苷酸。

【0089】術語「經修飾的 fHbp/經修飾的 fHbp 融合蛋白/重組蛋白/嵌合體/嵌合蛋白/嵌合分子/嵌合抗原/融合蛋白/克隆」貫穿說明書中可互換使用，並且係指經由接合兩個或更多個最初編碼單獨或相同蛋白質的兩個或更多個基因而產生的蛋白質，從而產生包含來自不同基因產物或來源的序列的組合的多胜肽。此種重組/嵌合/融合基因的翻譯會產生單個多胜肽，該單個多胜肽具有來源於每個原始蛋白質的功能特性以及一些額外特性。

【0090】本文所用的術語「帶標籤蛋白」係指具有遺傳上移植的特定胜肽序列(亦稱為標籤)的蛋白質。標籤有多種用途，並且可以添加到靶標蛋白質的任一端：係 C 末端特異性的、或 N 末端特異性的、或者 C 末端及 N 末端特異性的。一些標籤亦被插入到感興趣的蛋白質內的位點；該等標籤被稱為內部標籤。

【0091】親和標籤被附加到蛋白質，以便可以使用親和技術從蛋白質的粗生物源中純化該等蛋白質。親和標籤包括幾丁質結合蛋白(chitin binding protein, CBP)、麥芽糖結合蛋白(maltose binding protein, MBP)、Strep-標籤及谷胱甘胜肽-S-轉移酶(glutathione-S-transferase, GST)。聚(His)標籤是一種廣泛使用的蛋白質標籤，其與攜帶有固定化的金屬離子的基質結合。

【0092】本文所用的術語「胜肽環」意欲指在兩端處錨定的單鏈多胜肽序列(例如錨定至支架，諸如 fHbp)。術

語「環」並不推斷或要求由該多胜肽所採用的任何特定二級結構。

【0093】本文在「外源胜肽環」的上下文中使用的術語「外源」應理解為意謂該胜肽環相對於fHbp蛋白來源於不同的來源(亦即，其不是 fHbp或其片段)。然而，它可能與fHbp來自同一生物體。例如，經修飾的fHbp可以包括用來源於腦膜炎雙球菌PorA的(外源)胜肽環修飾的腦膜炎雙球菌fHbp。

【0094】術語「分離的」當應用於本發明的經修飾fHbp時意謂以下蛋白質：(i)使用重組DNA方法或病毒載體由核酸編碼的蛋白質；或(ii)藉由例如化學合成方法合成的蛋白質；或(iii)從生物材料中分離然後純化的蛋白質。本發明的分離的多胜肽包括由編碼該蛋白質的核苷酸序列表現的蛋白質，或由含有編碼該蛋白質的核苷酸序列的重組載體表現的蛋白質。

【0095】本文所用的術語「免疫原性」或「抗原」係指能夠在人體或動物體中引發免疫應答的分子。免疫反應可能是保護性的。

【0096】本文所用的術語「保護性」意謂預防疾病；降低疾病感染、傳播及/或進展的風險；降低疾病的嚴重程度；治癒病症或疾病；緩解症狀；或降低疾病或疾病症狀的嚴重程度。

【0097】本文使用的術語「預防」意謂對疾病的預防或保護性治療。預防可能包括降低感染、傳播及/或進展

的風險，或降低疾病的嚴重程度。

【0098】本文使用的術語「治療」意謂治癒病症或疾病、緩解症狀、或減輕疾病或疾病症狀的嚴重程度。

【0099】術語「冷凍乾燥/凍乾/進行凍乾」係指將懸浮液/溶液冷凍，此後藉由在低壓下昇華移除水分的過程。

【0100】術語「昇華」係指組成物的物理性質的變化，其中組成物直接從固態變為氣態，而不是變成液態。

【0101】本揭露案設想了一種高效平臺製程來製造有效的腦膜炎雙球菌疫苗，該疫苗滿足多項標準，包括提高的免疫原性、安全性及可負擔性，特別是表現出低黏度、沒有聚集；在寬溫度範圍內表現出長期穩定性的改進製劑。

【0102】根據本發明的態樣，提供了一種經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)。在實施例中，經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)是融合蛋白並且包含野生型fHbp變體及至少一個外源胜肽環。

【0103】在一個實施例中，fHbp係腦膜炎球菌fHbp。在另一實施例中，fHbp係淋球菌fHbp。

【0104】在實施例中，經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)具有與序列SEQ ID NO. 6至SEQ ID NO. 10中的任一者具有至少75%同一性的胺基酸序列。

【0105】在實施例中，經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)包含與序列SEQ ID NO. 6至SEQ ID NO. 10中的任一

者具有至少75%同一性的胺基酸序列。

【0106】本領域技藝人士將理解，可以對本文中的本發明的經修飾的fHbp進行一個、兩個、三個或四個或更多個胺基酸取代、缺失或添加，而不會實質上移除其免疫原性功能或影響穩定性。取代可以是取代為相似的胺基酸殘基，例如具有相似的分子量、電荷、疏水性或部分，或合成類似物的胺基酸殘基。此類修飾被視為本發明的一部分。

【0107】在一個實施例中，經修飾的fHbp可以與本文所述的經修飾的fHbp序列中的任一者具有至少75.0%、或80.0%、或85.0%、90.0%、95.0%、95.0%、98.0%、99.0%、或99.5%的同一性。

【0108】在一個實施例中，經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)選自與序列SEQ ID No. 6至SEQ ID No. 10的任一者具有至少75.0%、或80.0%、或85.0%、90.0%、95.0%、95.0%、98.0%、99.0%、或99.5%同一性的胺基酸序列。

【0109】在一個實施例中，經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)選自與序列SEQ ID No. 6具有至少75.0%同一性的胺基酸序列。在較佳實施例中，經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)選自與序列SEQ ID No. 6具有至少75.0%、或80.0%、或85.0%、90.0%、95.0%、95.0%、98.0%、99.0%或99.5%同一性的胺基酸序列。

【0110】在一個實施例中，經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)選自與序列SEQ ID No. 7具有至少75.0%同一性的胺

基 酸 序 列 。 在 較 佳 實 施 例 中 ， 經 修 飾 的 因 子 H 結 合 蛋 白 (fHbp) 選 自 與 序 列 SEQ ID No. 7 具 有 至 少 75.0% 、 或 80.0% 、 或 85.0% 、 90.0% 、 95.0% 、 95.0% 、 98.0% 、 99.0% 或 99.5% 同 一 性 的 胺 基 酸 序 列 。

【 0111 】 在 一 個 實 施 例 中 ， 經 修 飾 的 因 子 H 結 合 蛋 白 (fHbp) 選 自 與 序 列 SEQ ID No. 8 具 有 至 少 75.0% 同 一 性 的 胺 基 酸 序 列 。 在 較 佳 實 施 例 中 ， 經 修 飾 的 因 子 H 結 合 蛋 白 (fHbp) 選 自 與 序 列 SEQ ID No. 8 具 有 至 少 75.0% 、 或 80.0% 、 或 85.0% 、 90.0% 、 95.0% 、 95.0% 、 98.0% 、 99.0% 或 99.5% 同 一 性 的 胺 基 酸 序 列 。

【 0112 】 在 一 個 實 施 例 中 ， 經 修 飾 的 因 子 H 結 合 蛋 白 (fHbp) 選 自 與 序 列 SEQ ID No. 9 具 有 至 少 75.0% 同 一 性 的 胺 基 酸 序 列 。 在 較 佳 實 施 例 中 ， 經 修 飾 的 因 子 H 結 合 蛋 白 (fHbp) 選 自 與 序 列 SEQ ID No. 9 具 有 至 少 75.0% 、 或 80.0% 、 或 85.0% 、 90.0% 、 95.0% 、 95.0% 、 98.0% 、 99.0% 或 99.5% 同 一 性 的 胺 基 酸 序 列 。

【 0113 】 在 一 個 實 施 例 中 ， 經 修 飾 的 因 子 H 結 合 蛋 白 (fHbp) 選 自 與 序 列 SEQ ID No. 10 具 有 至 少 75.0% 同 一 性 的 胺 基 酸 序 列 。 在 較 佳 實 施 例 中 ， 經 修 飾 的 因 子 H 結 合 蛋 白 (fHbp) 選 自 與 序 列 SEQ ID No. 10 具 有 至 少 75.0% 、 或 80.0% 、 或 85.0% 、 90.0% 、 95.0% 、 95.0% 、 98.0% 、 99.0% 或 99.5% 同 一 性 的 胺 基 酸 序 列 。

【 0114 】 根 據 本 發 明 的 實 施 例 ， 至 少 一 個 外 源 胜 肽 環 是 免 疫 原 性 的 ， 並 且 來 源 於 細 菌 膜 蛋 白 。

【0115】在實施例中，fHbp變體選自v1，v2及v3，並且用插入fHbp中的 β 轉角區域中的至少一個PorA環進行修飾。在一個實施例中，fHbp可以包括fHbp v1。在另一實施例中，fHbp可以包括fHbp v2。在另一實施例中，fHbp可以包括fHbp v3。

【0116】在實施例中，野生型fHbp的變體包括fHbp的野生型腦膜炎球菌直系同源物。例如，fHbp的變體可能包括Ghfp，亦即fHbp的淋球菌同源物。Ghfp是非功能性的並且與v3 fHbp密切相關(>95% aa同一性，與因子H的解離常數KD>100 μ M)。

【0117】在另一實施例中，PorA環選自VR1、及VR2。在一個實施例中，PorA環係VR1。在另一實施例中，PorA環係VR2。

【0118】在實施例中，經修飾的因子H結合蛋白經修飾以降低因子H結合活性。在較佳實施例中，與野生型fHbp相比，經修飾的fHbp與人因子H (fH)的結合降低了>80%。

【0119】根據本發明的另一態樣，提供了基本上編碼或至少編碼根據本發明的經修飾的fHbp的核酸。

【0120】在實施例中，本發明係關於一種編碼經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與序列SEQ ID NO. 1至SEQ ID NO. 5中的任一者具有至少75.0%、或80.0%、或85.0%、90.0%、95.0%、95.0%、98.0%、99.0%、或99.5%的同一性。

【0121】在一個實施例中，本發明係關於一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與序列SEQ ID No. 1具有至少75.0%的同一性。在較佳實施例中，本發明係關於一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與SEQ ID No. 1的序列具有至少75.0%、或80.0%、或85.0%、90.0%、95.0%、95.0%、98.0%、99.0%或99.5%的同一性。

【0122】在一個實施例中，本發明係關於一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與序列SEQ ID No. 2具有至少75.0%的同一性。在較佳實施例中，本發明係關於一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與SEQ ID No. 2的序列具有至少75.0%、或80.0%、或85.0%、90.0%、95.0%、95.0%、98.0%、99.0%或99.5%的同一性。

【0123】在一個實施例中，本發明係關於一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與序列SEQ ID No. 3具有至少75.0%的同一性。在較佳實施例中，本發明係關於一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與SEQ ID No. 3的序列具有至少75.0%、或80.0%、或85.0%、90.0%、95.0%、95.0%、98.0%、99.0%或99.5%的同一性。

【0124】在一個實施例中，本發明係關於一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與序列SEQ ID No. 4具有至少75.0%的同一性。在較佳實施例中，本發明

係關於一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與SEQ ID No. 4的序列具有至少75.0%、或80.0%、或85.0%、90.0%、95.0%、95.0%、98.0%、99.0%或99.5%的同一性。

【0125】在一個實施例中，本發明係關於一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與序列SEQ ID No. 5具有至少75.0%的同一性。在較佳實施例中，本發明係關於一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與SEQ ID No. 5的序列具有至少75.0%、或80.0%、或85.0%、90.0%、95.0%、95.0%、98.0%、99.0%或99.5%的同一性。

【0126】在實施例中，提供了一種編碼本發明的經修飾的fHbp的核酸序列。在實施例中，該核酸係載體，諸如病毒載體。

【0127】根據另一態樣，本發明係關於一種免疫原性組成物，其包含至少一種如本文所述的經修飾的fHbp。

【0128】在實施例中，本發明係關於一種免疫原性組成物，其包含至少一種如本文所揭示的經修飾的fHbp或由編碼如本文所揭示的經修飾的fHbp的核酸序列編碼。

【0129】在實施例中，提供了一種免疫原性組成物，其包含至少一種本發明的經修飾的fHbp。

【0130】在實施例中，本發明係關於一種免疫原性組成物，其包含至少一種本發明的經修飾的fHbp，其中該經修飾fHbp包含

【0131】-與胺基酸序列SEQ ID NO. 6至SEQ ID NO. 10中的任一者具有至少75%的同一性的胺基酸序列的至少一種經修飾的fHbp，或其組合，或

【0132】-編碼與核酸序列SEQ ID NO. 1至SEQ ID NO. 5中的任一者具有至少75%的同一性的核酸序列的至少一種經修飾的fHbp，或其組合。

【0133】在實施例中，本發明係關於一種免疫原性組成物，其包含至少一種本發明的經修飾的fHbp，其中該經修飾fHbp包含

- fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(為SEQ ID NO. 6，或由SEQ ID NO. 1編碼)，或

- fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(為SEQ ID NO. 7，或由SEQ ID NO. 2編碼)，或

- fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(為SEQ ID NO. 8，或由SEQ ID NO. 3編碼)，或

- fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(為SEQ ID NO. 9，或由SEQ ID NO. 4編碼)，或

- fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(為SEQ ID NO. 10，或由SEQ ID NO. 5編碼)，或其組合。

【0134】在另一實施例中，該免疫原性組成物包含兩種或更多種不同的經修飾的fHbp。

【0135】在又一實施例中，該免疫原性組成物包含三種或更多種不同的經修飾的fHbp。

【0136】在又一實施例中，該免疫原性組成物包含四

種不同的經修飾的fHbp。

【0137】在實施例中，該免疫原性組成物包含醫藥學上可接受的載劑。在另外的實施例中，該免疫原性組成物包含佐劑。在另一實施例中，該免疫原性組成物進一步包含至少一種其他預防或治療活性分子。

【0138】該至少一種其他預防或治療活性分子包括：

- 單價蛋白質:莢膜多糖疫苗；或
- 綴合疫苗，其中包含帶有外源胜肽環的fHbp
支架的抗原被摻入作為該綴合疫苗中的蛋白質載體分子。

【0139】本發明的經修飾的fHbp、核酸或組成物可用作藥物，或用於治療或預防受試者的病原體感染或定殖。

【0140】本發明進一步設想了一種免疫原性組成物，其包含經修飾的fHbp、核酸與至少一種其他預防或治療活性分子的組合。

【0141】在實施例中，該至少一種其他預防或治療活性分子包括蛋白質:莢膜多糖綴合物疫苗。

【0142】在實施例中，該蛋白質:莢膜多糖疫苗包括以下中的任一者：具有細菌類毒素的血清群C或A莢膜、二價疫苗(具有與細菌類毒素綴合的血清群C和A莢膜多糖)、四價(與細菌類毒素綴合的血清群A、C、Y、W多糖)或五價(與細菌類毒素綴合的血清群A、C、Y、W、X多糖)綴合物疫苗。

【0143】在另一實施例中，該至少一種其他預防或治療活性分子包含綴合物疫苗，其中包含帶有外源胜肽環的

fHbp 支架的抗原被摻入作為該綴合物疫苗中的蛋白質載體分子，任選地其中該綴合物疫苗包含選自 A、C、Y、W 或 X 毒株的任何血清群莢膜多糖，或其組合。

【0144】在實施例中，因子 H 結合蛋白 (fHbp) 用作表位展示支架。

【0145】腦膜炎雙球菌的表面上發現的 fHbp 是一種由藉由短胺基酸接頭接合的兩個 β 桶 (N 末端桶及 C 末端桶) 組成的 27 KDa 脂蛋白。當血管內皮的表面上的帶電荷的碳水化合物與 fH 接合時，fHbp 中的帶電荷的胺基酸會以奈莫耳親和力在此互補調節劑的同一位置處與 fH 結合。基於核苷酸及所預測的胺基酸序列的差異，來自不同腦膜炎雙球菌菌株的 fHbp 可以使用若干種方案進行分類。因子 H 結合蛋白 (fHbp，在本領域中亦稱為脂蛋白 2086 (Fletcher 等人 (2004) Infect Immun 72:2088-2100)、基因組衍生的奈瑟氏球菌抗原 (Genome-derived Neisserial antigen, GNA) 1870 (Masignani 等人 (2003) J Exp Med 197:789-99 或「741」) 是在腦膜炎雙球菌中表現的表面暴露脂蛋白。基於核苷酸及所預測的胺基酸序列的差異，來自不同腦膜炎雙球菌菌株的 fHbp 可以使用若干種方案進行分類。該等包括兩個亞家族 (A 及 B) (Murphy E 等人 (2009) The Journal of Infectious Diseases 200: 379-389) 或三種變異群 (V1、V2、及 V3) (Masignani V 等人 (2003) The Journal of Experimental Medicine 197:789-799)，其中亞家族 A 對應於 V2 及 V3。

【0146】屬於同一變體群組的 fHbp 共享大於 85% 的胺

基酸相似性，而三個變體群組之間的相似性僅為60-70%。fHbp亦是一種在經免疫的個體中引發血清殺菌抗體反應的抗原，並且是目前正在臨床試驗中評估的預防腦膜炎球菌病(特別是血清群B病)的試驗性疫苗的關鍵組分。然而，用屬於一種變體fHbp家族的蛋白質進行免疫會產生變體特異性反應，而不會與其他變體群組有交叉反應性。因此，單個fHbp不提供針對腦膜炎球菌病的普遍保護，因此使用來自三種變體V1、V2及V3中的每一者的代表進行免疫是基於廣譜的疫苗所必須的。

【0147】腦膜炎球菌外膜囊泡(OMV)是PorA，一種腦膜炎球菌中的完整外膜蛋白(OMP)。然而，此種蛋白質的序列是多樣的，並且特定變體的流行程度因地理區域而異。PorA的變體藉由蛋白質的可變區(VR)中的序列來鑒定，該等序列位於蛋白質的表面暴露的胜肽環中並且是免疫應答的靶標。PorA具有七個細胞外胜肽環；第四個環是可變區2 (VR2)並且是自然感染和用OMV進行免疫後由PorA產生的大部分血清殺菌活性(SBA)的靶標。SBA是已知的保護免受腦膜炎球菌病的相關物質。儘管有序列多樣性，但是含有六個蛋白的疫苗覆蓋約70%的UK分離株(<http://pubmlst.org/neisseria/PorA/>)。

【0148】本文已證明免疫原性胜肽(諸如來自PorA的彼等胜肽)可以引入到因子H結合蛋白(fHbp)中，該fHbp充當分子支架。引入fHbp中的胜肽被呈遞給免疫系統，並能夠引發保護性反應諸如SBA。有利地，fHbp分子提供了理

想的分子支架來穩定地包含用於展示表位的胜肽環，特別是對於難以穩定化和以其天然構象展示的表位，例如來自諸如 PorA 的完整 OMP 的環。特別地，許多 OMP，諸如 PorA，由於其跨膜結構域不溶性而難以表現。PorA 具有 16- β 鏈桶結構，其中在鏈 1 與鏈 2 之間的面暴露的環(環 1)、在鏈 7 與鏈 8 之間的面暴露的環(環 4)、在鏈 9 與鏈 10 之間的面暴露的環(環 5)以及在鏈 11 與鏈 12 之間的面暴露的環(環 7)被證實是最有效的抗原。fHbp 含有兩個 β 桶，因此來自 OMP 的胜肽環序列可以插入到 fHbp 的 $\beta\alpha$ 鏈之間的環的尖端中以其天然構象中呈遞來自完整 OMP 的細胞外環片段以進行免疫。因此，本發明的經修飾的 fHbp 支架分子可用作針對 Nm 或淋球菌的預防性或治療性疫苗，其中單一蛋白質呈遞來自兩種不同抗原的關鍵表位。

【0149】在一個實施例中，經修飾的 fHbp 是融合蛋白，諸如重組融合蛋白。在另一實施例中，經修飾的 fHbp 是分離的經修飾的 fHbp 分子。在又一實施例中，本發明的經修飾的 fHbp 分子作為單一蛋白質被包含在多價疫苗中。在又一實施例中，經修飾的 fHbp 被包含在 OMV 疫苗中。

【0150】在將多於一個外源胜肽環插入 fHbp 或其變體的實施例中，外源胜肽環是相同的，例如相同的序列，或實質上相似。例如，一些表位(諸如 PorA 表位)當單獨展示在 fHbp 上時可能不會引起足夠的功能反應。在此種情況下，本發明可用於在同一經修飾的 fHbp 分子上的多個位點處提供相同的表位，從而增強表位的免疫原性識別。或

者，外源胜肽環相對於彼此不同。例如，當外源胜肽環來源於單一蛋白質(諸如PorA)時，不同的外源胜肽環來自該蛋白質(諸如PorA)的不同區域。在一個實施例中，不同的外源胜肽環來源於蛋白質(諸如PorA)的重疊及不同的區域。在將多於一個外源胜肽環插入fHbp或其變體的實施例中，外源胜肽環來源於不同的物種或菌株。例如，當需要針對包括不同生物在內的多種不同抗原的多價疫苗時。

【0151】在本發明的另一態樣中，開發了一種有效的疫苗製劑，其包含至少一種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白、佐劑及一或多種醫藥學上可接受的賦形劑。

【0152】在實施例中，包含至少一種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的疫苗製劑進一步另外包含選自以下的抗原：抗原胜肽亞變體fHbp 3.45、fHbp 1.55、fHbp-fHbp-fHbp或任何其他fHbp融合蛋白、fHbp-霍亂毒素、與單個fHbp融合的多個Por A、重組腦膜炎雙球菌B群NHBA融合蛋白、重組腦膜炎雙球菌B群NadA蛋白、重組腦膜炎雙球菌B群fHbp融合蛋白或來自腦膜炎雙球菌B群菌株NZ98/254的外膜囊泡(OMV)。

【0153】在一個實施例中，重組蛋白可以包括轉鐵蛋白結合蛋白、奈瑟氏球菌肝素結合蛋白、奈瑟氏球菌表面蛋白A、PorA、腦膜炎球菌腸桿菌素受體FetA、奈瑟氏菌黏附素A、或因子H結合蛋白(fHbp)。

【0154】然而較佳地，重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白可以包括經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)，該經修飾

的 fHbp 包括 fHbp 或其變體，以藉由添加至少一個來自不同抗原的外源胜肽環進行修飾而充當分子支架。

【0155】然而較佳地，重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白可以包括經修飾的因子 H 結合蛋白 (fHbp)，該經修飾的 fHbp 包括 fHbp 或其變體，以藉由添加至少兩個來自不同抗原的外源胜肽環進行修飾而充當分子支架。

【0156】例如，疫苗製劑可包含選自 v1 或 v2 或 v3 的 fHbp 變體。該製劑可包含選自 v1 及 v2 的 fHbp 變體。該製劑可包含選自 v2 及 v3 的 fHbp 變體。該製劑可包含選自 v1、v2 及 v3 的 fHbp 變體。

【0157】重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白是選自 v1、v2 及 v3 的 fHbp 變體，其用插入到 fHbp 中的 β 轉角區中的至少一個包含至少 10 個胺基酸的 PorA 環修飾。在實施例中，PorA 環選自 VR1 及 VR2，並且與野生型 fHbp 相比與人因子 H (fH) 的結合降低了 >80%。

【0158】所有與重組經修飾的因子 H 結合蛋白 (fHbp) 生成相關的活動均在 Oxford University Innovation Limited 進行。PCT/GB2013/052215 及 PCT/GB2017/052535 的內容全部併入本文。

【0159】在實施例中，疫苗製劑是針對腦膜炎雙球菌開發的，其中疫苗製劑可以包含一或多種來源於腦膜炎雙球菌的重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白以及醫藥學上可接受的載劑或賦形劑。

【0160】在一個實施例中，重組蛋白/經修飾的 fHbp

融合蛋白來源於腦膜炎雙球菌血清群 *A*、*B*、*C*、*H*、*I*、*K*、*L*、*29E*、*W135*、*X*、*Y*及*Z*。

【0161】在較佳實施例中的一個較佳實施例中，重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白來源於腦膜炎雙球菌血清群 *B*。

【0162】在一個實施例中，疫苗製劑可以包含一或多種不同的經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)變體作為抗原，該等變體選自包括以下的群組：

表 3：經修飾的因子 H 結合蛋白(fHbp)的變體		
序號	fHbp-PorA 嵌合蛋白變體	SEQ ID
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14	1 (NA) 6 (AA)
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4	2 (NA) 7 (AA)
3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9	3 (NA) 8 (AA)
4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4	4 (NA) 9 (AA)
5	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9	5 (NA) 10 (AA)

表 3a：可使用的經修飾的因子 H 結合蛋白(fHbp)的額外變體	
序號	fHbp-PorA 嵌合蛋白變體
1	fHbp V2.19 M6 PorA ^{190/exP1.4}
2	fHbp V2.19 M6 PorA ^{190/exP1.9}
3	fHbp V2.19 M6 PorA ^{316-320/exP1.9}
4	fHbp V2.19 M6 PorA ^{316-320/exP1.14}
5	fHbp V 2.19 M6 PorA ^{316-320/exP 1.15-11}
6	fHbp V3.45 M5 PorA ^{190/exP1.14}
7	fHbp V3.45 M5 PorA ^{316-320/exP1.4}
8	fHbp V3.45 M5 PorA ^{316-320/exP1.9}
9	fHbp V3.45 M5 PorA ^{316-320/exP 1.15-11}
10	fHbp V3.45 M5 PorA ^{190/exP 1.15-11}
11	fHbp V1.14 PorA ^{183/exP1.4}
12	fHbp V1.14 PorA ^{183/exP1.9}
13	fHbp V1.14 PorA ^{307-311/exP1.4}
14	fHbp V1.14 PorA ^{307-311/exP1.14}
15	fHbp V1.14 PorA ^{307-311/exP 1.15-11}
16	fHbp V1.1 PorA ^{183/exP1.4}
17	fHbp V1.1 PorA ^{183/exP1.9}
18	fHbp V1.1 PorA ^{307-311/exP1.14}
19	fHbp V1.1 PorA ^{307-311/exP 1.15-11}

【0163】在實施例中，重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白的分子量在 10 kDa 至 200 kDa 的範圍內，較佳地高達 50 kDa。

【0164】在實施例中，重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白的分子量在 20 kDa 至 40 kDa 的範圍內。在一個實施例中，製劑可以包含選自表 4 中總結的群組的四種不同的經修飾的因子 H 結合蛋白(fHbp)變體。

表 4：經修飾的因子 H 結合蛋白(fHbp)的變體	
序號	fHbp-PorA 嵌合蛋白變體
1	fHbp V3.45 M5 PorA ³¹⁶⁻³²⁰ exP1.14
2	fHbp V2.19 PorA ³¹⁶⁻³²⁰ exP1.4
3	fHbp V1.14 PorA ³⁰⁷⁻³¹¹ exP1.9
4	fHbp V1.1 PorA ³⁰⁷⁻³¹¹ exP1.4
5	fHbp V1.1 PorA ³⁰⁷⁻³¹¹ exP1.9

【0165】在一個實施例中，製劑可以包含選自表 1 的四種不同的經修飾的因子 H 結合蛋白 (fHbp) 變體作為抗原。

【0166】在一個實施例中，重組蛋白 / 經修飾的 fHbp 融合蛋白被吸附到佐劑上以提高抗原的免疫原性並最大化免受相關疾病的保護。

【0167】在一個實施例中，評估重組蛋白 / 經修飾的 fHbp 融合蛋白到佐劑上的吸附並優化其到佐劑上的吸附百分比。根據本發明的實施例，使用吸附緩衝液來改善對表面的吸附，減少結合時的聚集和解折疊，降低重組蛋白 / 經修飾的 fHbp 融合蛋白作為吸附後抗原的劑量功效。

【0168】在一個實施例中，重組蛋白 / 經修飾的 fHbp 融合蛋白吸附到佐劑上，該佐劑選自包括以下的群組：基於鋁佐劑的鹽 (諸如氫氧化鋁、磷酸鋁、羥基磷酸鋁及硫酸鋁鉀)；或基於免疫刺激組分的佐劑，該佐劑選自由以下項組成的群組：油和水乳液 (MF-59、脂質體、脂多糖、皂苷、脂質 A、脂質 A 衍生物、單磷醯脂質 A、GLA、3-脫

乙醯單磷醯脂質 A、AS01、AS03、AF3)(包含我們正在探索的所有3家MPLA供應商，包括合成等；來自腸道沙門氏菌血清型 Minnesota Re 595的MPL)(例如，Sigma Aldrich目錄號 L6895)。)、IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L及41BBL、3-脫乙醯基單磷醯脂質 A、AS01、AS03、AF3)、寡核苷酸、包含至少一個未甲基化 CpG及/或脂質體的寡核苷酸、弗氏佐劑、弗氏完全佐劑、弗氏不完全佐劑、聚合物、共聚物(諸如聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物，包括嵌段共聚物)、聚合物 p 1005、CRL-8300佐劑、胞壁醯二肽，諸如 TLR1/2 的激動劑(其可以是合成配體)(例如，Pam3Cys)、TLR2(例如，CFA、Pam2Cys)、TLR3(例如，聚 FC、聚 A:U)、TLR-4激動劑(例如，MPLA、脂質 A、及 LPS)、TLR5(例如，鞭毛蛋白)、TLR7(例如，加地喹莫特、咪喹莫特、洛索立濱、Resiquimod®)、TLR7/8(例如，R0848)、TLR8(例如，咪唑喹啉、ssPolyU、3M-012)、TLR9(例如，ODN 1826(B型)、ODN 2216(A型)、及/或TLR11/12(例如，原肌球蛋白)、TLR-4激動劑、鞭毛蛋白、來源於革蘭氏陰性細菌的鞭毛蛋白、TLR-5激動劑、能夠與TLR-5受體結合的鞭毛蛋白的片段、 α -C-半乳糖苷基神經醯胺、幾丁質、介白素-2、QS-21、ISCOMS、角鯊烯混合物(SAF-1)、Quil A、霍亂毒素B亞基，聚磷腈及其衍生物、分枝桿菌細胞壁製備物、黴菌酸衍生物、非離子嵌段共聚物表面活性劑、OMV、fHbp、皂苷與固醇和脂質

的組合、TLR激動劑(MPL、CpG、聚IC、咪喹莫特)、dmLT、1,25-二羥基維生素D3、CAF01、聚[二(羧基苯氧基)-磷腈](PCPP)和委內瑞拉馬腦炎(VEE)複製子粒子或其組合。在實施例中，佐劑的量在0.5 mg/ml至4.5 mg/ml的範圍內。

【0169】在實施例中，佐劑是粒徑>500 nm的氫氧化鋁。

【0170】在實施例中，重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白在佐劑上的吸附百分比在70%至100%的範圍內。

【0171】在另一實施例中，fHbp V3.45 M5 PorA^{316-320 exP1.14}到佐劑上的吸附百分比在80%至100%的範圍內。

【0172】在另一實施例中，fHbp V1.14 PorA^{307-311 exP1.9}到佐劑上的吸附百分比在80%至90%的範圍內。

【0173】在另一實施例中，fHbp V2.19 PorA^{316-320 exP1.4}到佐劑上的吸附百分比在80%至90%的範圍內。

【0174】在另一實施例中，fHbp V1.1 PorA^{307-311 exP1.4}到佐劑上的吸附百分比在80%至90%的範圍內。

【0175】在另一實施例中，fHbp V1.1 PorA^{307-311 exP1.9}到佐劑上的吸附百分比在70%至80%的範圍內。

【0176】在一個實施例中，醫藥學上可接受的載劑或賦形劑可以選自包括以下的群組：緩衝劑、糖、糖醇或多元醇、表面活性劑、聚合物、鹽、胺基酸或pH調節劑、水解蛋白、防腐劑及液體載體。

【0177】緩衝劑的實例選自由以下項組成的群組：碳

酸鹽、磷酸鹽、醋酸鹽、HEPES、琥珀酸鹽、TRIS、硼酸鹽、檸檬酸鹽、乳酸鹽、葡萄糖酸鹽及酒石酸鹽，以及更複雜的有機緩衝劑，包括含有磷酸鈉及/或磷酸鉀的磷酸鹽緩衝劑，該磷酸鈉及/或磷酸鉀的比率經選擇以達到所需pH。在另一實例中，緩衝劑含有Tris(羥甲基)胺基甲烷或「Tris」，其經配製以實現所需的pH。在另一實例中，緩衝劑可以是含有Hanks鹽的最低必需培養基。本揭露案亦設想了其他緩衝劑，諸如HEPES、呱咩-N,N'-雙(PIPES)、及2-乙磺酸(MES)。該緩衝劑有助於穩定化本揭露案的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白。在實施例中，緩衝劑的量在0.1 mM至300 mM的範圍內。

【0178】作為賦形劑的糖的實例選自以下群組：海藻糖、甘露糖、棉子糖、乳糖酸、葡萄糖、麥芽酮糖、異麥芽酮糖、麥芽糖、乳糖、右旋糖、果糖或其組合。在實施例中，糖的量在5 mg/ml至100 mg/ml的範圍內。

【0179】作為賦形劑的糖醇或多元醇的實例選自以下群組：甘露醇、乳糖醇、山梨醇、甘油、木糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、赤蘚糖醇、異麥芽酮糖醇及氫化澱粉水解物或其組合。在實施例中，糖醇或多元醇的量在5 mg/ml至100 mg/ml的範圍內。

【0180】表面活性劑可以根據其『HLB'(親水/親油平衡)進行分類。本發明的較佳表面活性劑具有為至少10，較佳地至少15，更較佳至少16的HLB。作為賦形劑的表面活性劑的實例可以包括非離子表面活性劑，諸如聚山梨醇

酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 60、聚山梨醇酯 65、聚山梨醇酯 85、壬基苯氧基聚乙氧基乙醇、辛基苯氧基聚乙氧基乙醇、辛苯聚醇 40、壬苯醇醚-9、三乙醇胺、三乙醇胺多胜肽油酸酯、聚氧乙烯-660 羥基硬脂酸酯、聚氧乙烯-35 蓖麻油酸酯、大豆卵磷脂及泊洛沙姆-0.001%-0.05%。以 DOWF AX™ 商品名銷售的環氧乙烷(EO)、環氧丙烷(PO)及/或環氧丁烷(BO)的共聚物，諸如直鏈 EO/PO 嵌段共聚物；辛苯聚醇，其重複乙氧基(氧-1,2-乙烷二基)基團的數量可以變化，其中辛苯聚醇-9(Triton X-100，或三級辛基苯氧基聚乙氧基乙醇)特別令人感興趣；(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇(IGEPAL CA-630/NP-40)；磷脂，諸如磷脂酰膽鹼(卵磷脂)；壬基酚聚氧乙烯醚，諸如 Tergitol™ NP 系列；衍生自月桂醇、鯨蠟醇、硬脂醇及油醇的聚氧乙烯脂肪醚(稱為 Brij 表面活性劑)，諸如三乙二醇單月桂基醚(Brij 30)；以及脫水山梨醇酯(通常稱為 SPAN)，諸如脫水山梨醇三油酸酯(Span 85)及脫水山梨醇單月桂酸酯。非離子表面活性劑係較佳的。用於包含在乳液中的較佳表面活性劑係 Tween 20。在實施例中，表面活性劑的量在 0.01 mg/ml 至 2 mg/ml 的範圍內。聚合物的實例可以包括葡聚糖、羧甲基纖維素、透明質酸、環糊精等。

【0181】鹽的實例可包括 NaCl、KCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·2H₂O、CaCl₂、MgCl₂等。

【0182】作為賦形劑的胺基酸的實例可以包括三(羥甲基)甲基甘氨酸、亮胺酸、異亮胺酸、甘胺酸、穀胺醯

胺、L-精胺酸、L-精胺酸鹽酸鹽、離胺酸、L-丙胺酸、色胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、纈胺酸、半胱胺酸、甘胺酸、甲硫胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸。

【0183】水解蛋白的實例可以包括明膠、乳清蛋白水解物、麩胺酸鈉、膠原蛋白水解物、角蛋白水解物、胜肽、酪蛋白水解物及乳清蛋白水解物、血清白蛋白。

【0184】防腐劑的實例可以包括2-苯氧乙醇、苯索寧氯鹽(苯紫氯銨)、苯酚、間甲酚、硫柳汞、甲醛、對羥基苯甲酸酯(例如，對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯或對羥基苯甲酸丁酯)、苯索寧氯鹽、苯甲醇、氯丁醇、對氯間甲酚、或苯甲醇或其組合。疫苗組成物可包含用於單次免疫的防腐劑，或可能包含用於多次免疫的材料(亦即『多劑量』試劑盒)。在多劑量安排中包含防腐劑係較佳的。作為在多劑量組成物中包含防腐劑的替代方案(或補充)，該組成物可以容納在具有用於取出材料的無菌適配器的容器中。在實施例中，防腐劑的量在1 mg/mL至10 mg/mL的範圍內。

【0185】合適的液體載體的實例可以包括WFI(注射用水)及鹽水。

【0186】在實施例中，該疫苗製劑包含：

- 至少一種重組蛋白/至少一種經修飾的fHbp
- 氫氧化鋁；
- 甘露醇；
- 磷酸鹽；以及

- 聚山梨醇酯。

【0187】在另一實施例中，該疫苗製劑包含：

- 與胺基酸序列SEQ ID NO. 6至SEQ ID NO. 10中的任一者具有至少75%的同一性的胺基酸序列的至少一種經修飾的fHbp；或
- 編碼與核酸序列SEQ ID NO. 1至SEQ ID NO. 5中的任一者具有至少75%的同一性的核酸序列的至少一種經修飾的fHbp；以及
- 氫氧化鋁；
- 甘露醇；
- 磷酸鹽；以及
- 聚山梨醇酯。

【0188】根據本發明的實施例，疫苗製劑被配製為劑量在0.1 mL至1 mL，例如0.2 mL至0.8 mL、0.4 mL至0.6 mL的範圍內。在一個實施例中，疫苗製劑被配製為劑量為0.5 mL。

【0189】根據本發明的實施例，重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白在疫苗製劑中以在15 µg/ml至200 µg/ml，例如20 µg/ml至200 µg/ml、25 µg/ml至200 µg/ml、25 µg/ml至150 µg/ml、30 µg/ml至200 µg/ml、30 µg/ml至150 µg/ml、35 µg/ml至200 µg/ml、35 µg/ml至150 µg/ml、40 µg/ml至200 µg/ml、40 µg/ml至150 µg/ml、45 µg/ml至200 µg/ml、45 µg/ml至150 µg/ml、50 µg/ml至200 µg/ml、50 µg/ml至150 µg/ml、75 µg/ml至200 µg/ml、75 µg/ml至150

$\mu\text{g/ml}$ 、 $120\ \mu\text{g/ml}$ 至 $200\ \mu\text{g/ml}$ ， $120\ \mu\text{g/ml}$ 至 $150\ \mu\text{g/ml}$ 的範圍內的量存在。

【0190】根據本發明的實施例，重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白在疫苗製劑中以 $15\ \mu\text{g/ml}$ 、 $20\ \mu\text{g/ml}$ 、 $25\ \mu\text{g/ml}$ 、 $30\ \mu\text{g/ml}$ 、 $35\ \mu\text{g/ml}$ 、 $40\ \mu\text{g/ml}$ 、 $45\ \mu\text{g/ml}$ 、 $50\ \mu\text{g/ml}$ 、 $55\ \mu\text{g/ml}$ 、 $60\ \mu\text{g/ml}$ 、 $65\ \mu\text{g/ml}$ 、 $70\ \mu\text{g/ml}$ 、 $75\ \mu\text{g/ml}$ 、 $80\ \mu\text{g/ml}$ 、 $85\ \mu\text{g/ml}$ 、 $90\ \mu\text{g/ml}$ 、 $95\ \mu\text{g/ml}$ 、 $100\ \mu\text{g/ml}$ 、 $105\ \mu\text{g/ml}$ 、 $110\ \mu\text{g/ml}$ 、 $115\ \mu\text{g/ml}$ 、 $120\ \mu\text{g/ml}$ 、 $125\ \mu\text{g/ml}$ 、 $130\ \mu\text{g/ml}$ 、 $135\ \mu\text{g/ml}$ 、 $140\ \mu\text{g/ml}$ 、 $145\ \mu\text{g/ml}$ 、 $150\ \mu\text{g/ml}$ 、 $200\ \mu\text{g/ml}$ 的量存在。

【0191】在實施例中，該疫苗製劑包含(i)至少一種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；(ii)量在 $0.5\ \text{mg/ml}$ 至 $4.5\ \text{mg/ml}$ 的範圍中的氫氧化鋁；(iii)量在 $5\ \text{mg/ml}$ 至 $100\ \text{mg/ml}$ 的範圍中的甘露醇；(iv)量在 $1\ \text{mM}$ 至 $10\ \text{mM}$ 的範圍中的磷酸鹽緩衝液；以及(v)量在 $0.01\ \text{mg/ml}$ 至 $2\ \text{mg/ml}$ 的範圍中的聚山梨醇酯20；其中每種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白以在 $15\ \mu\text{g/ml}$ 至 $150\ \mu\text{g/ml}$ 範圍內的量存在。

【0192】在實施例中，該疫苗製劑包含(i)至少兩種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；(ii)量在 $0.5\ \text{mg/ml}$ 至 $4.5\ \text{mg/ml}$ 的範圍中的氫氧化鋁；(iii)量在 $5\ \text{mg/ml}$ 至 $100\ \text{mg/ml}$ 的範圍中的甘露醇；(iv)量在 $1\ \text{mM}$ 至 $10\ \text{mM}$ 的範圍中的磷酸鹽緩衝液；以及(v)量在 $0.01\ \text{mg/ml}$ 至 $2\ \text{mg/ml}$ 的範圍中的聚山梨醇酯20；其中每種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白以在 $15\ \mu\text{g/ml}$ 至 $150\ \mu\text{g/ml}$ 範圍內的量存在。

【0193】在實施例中，該疫苗製劑包含(i)至少三種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；(ii)量在0.5 mg/ml至4.5 mg/ml的範圍中的氫氧化鋁；(iii)量在5 mg/ml至100 mg/ml的範圍中的甘露醇；(iv)量在1 mM至10 mM的範圍中的磷酸鹽緩衝液；以及(v)量在0.01 mg/ml至2 mg/ml的範圍中的聚山梨醇酯20；其中每種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白以在15 µg/ml至150 µg/ml範圍內的量存在。

【0194】在實施例中，該疫苗製劑包含(i)至少四種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；(ii)量在0.5 mg/ml至4.5 mg/ml的範圍中的氫氧化鋁；(iii)量在5 mg/ml至100 mg/ml的範圍中的甘露醇；(iv)量在1 mM至10 mM的範圍中的磷酸鹽緩衝液；以及(v)量在0.01 mg/ml至2 mg/ml的範圍中的聚山梨醇酯20；其中每種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白以在15 µg/ml至150 µg/ml範圍內的量存在。

【0195】在實施例中，該疫苗製劑包含：

- 與胺基酸序列SEQ ID NO. 6至SEQ ID NO. 10中的任一者具有至少75%的同一性的胺基酸序列的至少一種經修飾的fHbp；或
- 編碼與核酸序列SEQ ID NO. 1至SEQ ID NO. 5中的任一者具有至少75%的同一性的核酸序列的至少一種經修飾的fHbp，

及

- 氫氧化鋁；
- 甘露醇；

- 磷酸鹽；以及
- 聚山梨醇酯。

【0196】 在一個實施例中，疫苗製劑包含：

- 與胺基酸序列 SEQ ID NO. 6至SEQ ID NO. 10中的任一者具有至少75%的同一性的胺基酸序列的至少一種經修飾的fHbp，其量在15 µg/ml至150 µg/ml的範圍內，或
- 編碼與核酸序列 SEQ ID NO. 1至SEQ ID NO. 5中的任一者具有至少75%的同一性的核酸序列的至少一種經修飾的fHbp，其量在15 µg/ml至150 µg/ml的範圍內；以及
- 氫氧化鋁，其量在0.5 mg/ml至4.5 mg/ml的範圍內；
- 甘露醇，其量在5 mg/ml至100 mg/ml的範圍內；
- 磷酸鹽緩衝液，其量在1 mM至10 mM的範圍內；以及
- 聚山梨醇酯 20，其量在0.01 mg/ml至2 mg/ml的範圍內。

【0197】 在實施例中，疫苗製劑包含：

- fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(為 SEQ ID NO. 6，或由SEQ ID NO. 1編碼)，其量在15 µg/ml至150 µg/ml的範圍內，或
- fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(為 SEQ ID NO. 7，或由SEQ ID NO. 2編碼)，其量在15 µg/ml至150 µg/ml的範圍內；或

- fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(為 SEQ ID NO. 8，或由 SEQ ID NO. 3 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/ml}$ 至 150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；或
- fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(為 SEQ ID NO. 9，或由 SEQ ID NO. 4 編碼，其量在 15 $\mu\text{g/ml}$ 至 150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；以及
- 氫氧化鋁，其量在 0.5 mg/ml 至 4.5 mg/ml 的範圍內；
- 甘露醇，其量在 5 mg/ml 至 100 mg/ml 的範圍內；
- 磷酸鹽緩衝液，其量在 1 mM 至 10 mM 的範圍內；以及
- 聚山梨醇酯 20，其量在 0.01 mg/ml 至 2 mg/ml 的範圍內。

【0198】在實施例中，疫苗製劑包含：

- fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 6，或由 SEQ ID NO. 1 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/ml}$ 至 150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；
- fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 7，或由 SEQ ID NO. 2 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/ml}$ 至 150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；
- fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 8，或由 SEQ ID NO. 3 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/ml}$ 至 150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；
- fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 9，或由 SEQ ID NO. 4 編碼，其量在 15 $\mu\text{g/ml}$ 至 150 $\mu\text{g/ml}$ 的

範圍內；

- 氫氧化鋁，其量在 0.5 mg/ml 至 4.5 mg/ml 的範圍內；
- 甘露醇，其量在 5 mg/ml 至 100 mg/ml 的範圍內；
- 磷酸鹽緩衝液，其量在 1 mM 至 10 mM 的範圍內；以及
- 聚山梨醇酯 20，其量在 0.01 mg/ml 至 2 mg/ml 的範圍內。

【0199】在實施例中，疫苗製劑包含：

- fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 6，或由 SEQ ID NO. 1 編碼)，其量在 15 µg/mL 至 150 µg/mL 的範圍內；或
- fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 7，或由 SEQ ID NO. 2 編碼)，其量在 15 µg/mL 至 150 µg/mL 的範圍內；或
- fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 8，或由 SEQ ID NO. 3 編碼)，其量在 15 µg/mL 至 150 µg/mL 的範圍內；或
- fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 8，或由 SEQ ID NO. 3 編碼)，其量在 15 µg/mL 至 150 µg/mL 的範圍內；以及
- 氫氧化鋁，其量在 0.5mg/mL 至 4.5mg/mL 的範圍內；
- 甘露醇，其量在 5 mg/mL 至 100 mg/mL 的範圍內；
- 磷酸鹽緩衝液，其量在 1 mM 至 10 mM 的範圍內；以及

- 聚山梨醇酯 20，其量在 0.01 mg/mL 至 2 mg/mL 的範圍內。

【0200】在實施例中，疫苗製劑包含：

- fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 6，或由 SEQ ID NO. 1 編碼)，其量在 15 µg/mL 至 150 µg/mL 的範圍內；
- fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 7，或由 SEQ ID NO. 2 編碼)，其量在 15 µg/mL 至 150 µg/mL 的範圍內；
- HbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(為 SEQ ID NO. 10 或由 SEQ ID NO. 5 編碼)，其量在 15 µg/mL 至 150 µg/mL 的範圍內；
- fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 8，或由 SEQ ID NO. 3 編碼)，其量在 15 µg/mL 至 150 µg/mL 的範圍內；
- 氫氧化鋁，其量在 0.5 mg/mL 至 4.5 mg/mL 的範圍內；
- 甘露醇，其量在 5 mg/mL 至 100 mg/mL 的範圍內；
- 磷酸鹽緩衝液，其量在 1 mM 至 10 mM 的範圍內；以及
- 聚山梨醇酯 20，其量在 0.01 mg/mL 至 2 mg/mL 的範圍內。

【0201】在一個實施例中，疫苗製劑含量在 1 mg/mL 至 10 mg/mL 的範圍內的 2-苯氧乙醇。

【0202】根據本發明的實施例，疫苗製劑包含(i)至少一種包含穩定的非功能性/非脂化的fHbp及PorA VR2環的融合蛋白；以及(ii)至少一種多糖-蛋白質綴合物。

【0203】在實施例中，該疫苗製劑包含i)至少一種融合蛋白，其包含穩定的非功能性/非脂化的fHbp及PorA VR2環以及至少一種選自以下的綴合物：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

【0204】在一個實施例中，疫苗製劑包含i)至少兩種融合蛋白，每種融合蛋白由一種與一個PorA VR2環偶聯的fHbp變體類型及至少一種選自以下的綴合物組成：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

【0205】在一個實施例中，疫苗製劑包含i)至少三種融合蛋白，每種融合蛋白由一種與兩個PorA VR2環偶聯的fHbp變體類型及至少一種選自以下的綴合物組成：(a) (i)

血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

【0206】在一個實施例中，疫苗製劑包含i)至少四種融合蛋白，每種融合蛋白由一種與三個PorA VR2環偶聯的fHbp變體類型及至少一種選自以下的綴合物組成：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

【0207】在實施例中，本發明的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白與選自BEXSERO、MENVEO、MENACTRA、NIMENRIX、MenQuadFi、MENFIVE、MenAfriVac、Men AC、及Men ACHib中的一或多種疫苗共施用。

【0208】在較佳實施例中，本發明的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白與MENFIVE共施用。

【0209】在實施例中，疫苗製劑含量在1 mg/mL至10 mg/ml的範圍內的2-苯氧乙醇。

【0210】在實施例中，疫苗製劑具有在-16 mV至-30 mV範圍內的 ζ 電位。

【0211】在實施例中，疫苗製劑的滲透重量莫耳濃度在200 mOsmol/kg至500 mOsmol/kg的範圍內。

【0212】上述疫苗製劑藉由以下廣泛步驟製造，該等方法步驟在後續段落中進一步詳細解釋：

- 在營養培養基中培養包含表現載體的宿主細胞；
- 誘導該等宿主細胞表現蛋白質；
- 收穫並分離該等宿主細胞；
- 裂解該等收穫的細胞並分離宿主細胞碎片以獲得帶標籤蛋白；
- 純化該等帶標籤蛋白；
- 從該等帶標籤蛋白中移除標籤以獲得重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；
- 純化該等重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；以及
- 製備包含該等純化重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的疫苗製劑。

【0213】根據本發明的又一態樣，開發並優化了上游生物製程，以增加領先細胞系的細胞密度及重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的生產力。

【0214】在一個實施例中，上游生物製程可以包括分批、補料分批、連續或灌注培養模式，以生產重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白。

【0215】在一個實施例中，上游生物製程可以包括補

料分批方法，該補料分批方法包括以下步驟：

- (a) 製備水性發酵罐營養培養基及進料溶液；
- (b) 將宿主細胞系接種到發酵罐培養基中；
- (c) 用進料溶液連續進料；
- (d) 誘導蛋白質表現；
- (e) 收穫及細胞分離。
- (f) 在一個實施例中，在上游生物製程開發期間執行大量實驗，以便實現預期商業化製程所需的高生產率。培養製程開發努力聚焦於四個領域：(1)確認在篩選及選擇具有改進的基線培養製程的克隆期間鑒定出的高每細胞表現菌株的效能；(2)開發能夠支持高生產率培養效能的增強培養基組成物；(3)調整發酵製程參數及製程內控制以實現高細胞密度和重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白表現；以及(4)進料策略和胺基酸添加優化以防止轉錄及翻譯期間的停滯。
- (g) 在一個實施例中，水性發酵罐營養培養基可以包含未定義的培養基、Terrific肉湯(TB)培養基、Lysogenia肉湯、Luria肉湯或Luria-Bertani培養基、化學上明確的培養基、M9最小培養基、化學上明確的M9改良鹽培養基、2xYT培養基或具有分解代謝抑制的超級最佳肉湯(SOC)培養基或其組合。
- (h) 然而，較佳地，Luria肉湯(LB培養基)的組成總結

在表 5 中。

表 5：LB 培養基組成		
序號	組分	量(每升)
1	胰蛋白胨	5-20 g
2	酵母提取物	1-20 g
3	NaCl	5-20 g

NaCl-氯化鈉

【0216】然而較佳地，化學上明確的 M9 改良鹽培養基的組成總結在表 6 中。

表 6：化學上明確的 M9 改良鹽培養基組成		
序號	組分	量(每升)
1	葡萄糖	5-30 g
2	K ₂ HPO ₄	5-30 g
3	KH ₂ PO ₄	5-30 g
4	檸檬酸	0.5-10 g
5	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5-10 g
6	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5-10 g
7	TES	1-20 mL
8	鹽酸硫胺素	1-20 mg
9	L-甲硫胺酸	1-20 mM

【0217】 K₂HPO₄-磷酸氫二鉀

【0218】 KH₂PO₄-磷酸二氫鉀

【0219】 (NH₄)₂SO₄-硫酸銨

【0220】 MgSO₄·7H₂O-七水硫酸鎂

【0221】 TES-微量元素溶液

【0222】 14%液態胺水及 6%正磷酸用於維持發酵批次期間的 pH 在 6.8-8.2 的 pH 範圍內

【0223】然而較佳地，微量元素溶液的組成總結在表

7 中。

表 7：微量元素溶液組成		
序號	組分	量(每升)
1	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.8 g
2	MnSO ₄ ·H ₂ O	2.68 g
3	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.42 g
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.5 g
5	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.18 g
6	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
7	HCl	87 mL

【 0224 】 仍 較 佳 地 ， Terrific 肉 湯 (TB) 培 養 基 的 組 成 總 結 在 表 8 中 。

表 8：TB 培養基組成		
序號	組分	量(每升)
1	胰蛋白胨	5-30 g
2	酵母提取物	5-30 g
3	甘油	1-20 g
4	10X PBS 儲備溶液	1-200 mL

【 0225 】 在 一 個 實 施 例 中 ， 水 性 發 酵 罐 營 養 培 養 基 可 以 另 外 包 含 選 自 包 括 以 下 的 群 組 的 抗 生 素 ： 卡 那 黴 素 、 新 黴 素 、 鏈 黴 素 、 妥 布 黴 素 、 巴 龍 黴 素 、 兩 性 黴 素 B 、 胺 苄 西 林 、 紅 黴 素 、 慶 大 黴 素 、 制 黴 菌 素 、 青 黴 素 - 鏈 黴 素 、 多 黏 菌 素 B 、 四 環 素 、 噻 菌 靈 或 泰 樂 菌 素 或 其 組 合 。

【 0226 】 在 一 個 實 施 例 中 ， 宿 主 細 胞 系 可 以 包 括 細 菌 表 現 宿 主 系 統 。

【 0227 】 更 佳 地 ， 該 細 菌 表 現 宿 主 系 統 為 大 腸 桿 菌 (E.coli) ， 且 該 大 腸 桿 菌 菌 株 選 自 包 括 以 下 的 群 組 ： BL21

(DE3)、BL21 (DE3) pLysS*、BL21 (DE3) pLysE*、BL21 star (DE3)、BL21-A1、BLR (DE3)、HMS174 (DE3)**、Tuner (DE3)、Origami2 (DE3)**、Rosetta2 (DE3)*、Rosettagami (DE3)、Lemo21 (DE3)*、T7 Express、m15 pREP4*、C41(DE3)、C43(DE3)或B834(DE3)。

【0228】 *表示存在額外的質粒

【0229】 最佳地，該細菌表現宿主系統為大腸桿菌菌株 B834(DE3)。

【0230】 在一個實施例中，接種宿主細胞系後的發酵條件可以包括在 35℃ 至 39℃ 的範圍內的溫度；在 5.0至 9.0 的範圍內的 pH；在 10%至 100%的範圍內的溶解氧；在 100-1800 rpm的範圍內的攪動；氣體流率 0-2 VVM(每分鐘每單位體積液體的氣體體積)。

【0231】 在一個實施例中，所接種的發酵罐營養培養基可以包括在碳源耗盡後用進料溶液連續進料。

【0232】 較佳地，包含葡萄糖的進料溶液的組成總結在表 9 中。

表 9：葡萄糖進料組成		
序號	組分	量/L
1	葡萄糖	100-1000 g
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10-50 g
3	鹽酸硫胺素	1-200 mg
4	微量元素溶液	5-20 mL

(在本申請中，葡萄糖/右旋糖/右旋糖一水合物可互換使用)

【0233】較佳地，包含甘油的進料溶液煩人組成總結在表10中。

表 10：甘油進料組成		
序號	組分	量/L
1	甘油	100-1000 g
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10-50 g
3	鹽酸硫胺素	1-200 mg
4	微量元素溶液	5-20 mL

【0234】在實施例中，甘油進料組成物中的甘油濃度在30%至80%的範圍內。在一個實施例中，甘油進料組成物中的甘油濃度為50%。

【0235】在一個實施例中，葡萄糖進料的進料速率在0.3 mL/min/L培養物至3.0 mL/min/L培養物的範圍內。

【0236】在一個實施例中，可以用甘油進料溶液代替葡萄糖進料，並且隨後可以誘導宿主細胞系以進行重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白表現。

【0237】在一個實施例中，甘油進料的進料速率在0.3 mL/min/L培養物至3.0 mL/min/L培養物的範圍內。

【0238】在一個實施例中，使用選自乳糖或其不可水解的類似物異丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)的誘導劑誘導宿主細胞系表現重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白。

【0239】在一個實施例中，誘導參數可以包括以在590/600 nm下量測的在20-100的範圍內的OD進行誘導。在實施例中，誘導劑是濃度在1 mM至10 mM範圍內的IPTG。在另一實施例中，誘導劑是濃度在5 mM至10 mM範圍內的IPTG。在實施例中，誘導劑是濃度在1 g/L至50 g/L範圍內的乳糖。在另一實施例中，誘導劑是濃度在5 g/L至50 g/L範圍內的乳糖。

【0240】在實施例中，誘導/誘導溫度範圍在17°C至37°C的範圍內，並且誘導時間在3小時至24小時的範圍內。

【0241】在一個實施例中，在誘導期間執行大量實驗以優化誘導密度和時長、培養溫度、培養pH、溫度偏移、及葡萄糖/甘油進料速率。

【0242】在一個實施例中，表11中總結了用於在發酵罐中生產嵌合蛋白的三種不同的補料分批方法/方案。

表 11：用於在發酵罐中生產嵌合蛋白的補料分批方法/方案			
序號	發酵培養基中的碳源	進料中的碳源	誘導劑
1	葡萄糖	葡萄糖	IPTG
2	甘油	甘油	IPTG/乳糖
3	葡萄糖	雙重進料 A.生長階段中的葡萄糖進料 B. 誘導/生產階段中的甘油進料	IPTG/乳糖

【0243】在一個實施例中，在誘導後3-7小時收穫培養物。

【0244】在一個實施例中，在收穫後，藉由離心將細胞與發酵罐營養培養基分離。

【0245】較佳地，離心參數可以包括在1℃至5℃下6000-8000的相對離心力(rcf)持續30-60 min。

【0246】在一個實施例中，收穫後所得的濕細胞質量(g/L)可能包含150-350 g/L的收穫肉湯。

【0247】根據本發明的仍另一態樣，開發並優化了下游生物製程以便高產量和高純度生產重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白。

【0248】在一個實施例中，下游生物製程可以包括以下步驟中的任一步驟：

【0249】細胞裂解/細胞破裂；

【0250】細胞分離及澄清；

【0251】帶標籤蛋白的純化；

【0252】親和標籤移除；

【0253】蛋白質純化；

【0254】濃縮/滲濾/緩衝液交換。

【0255】在一個實施例中，在下游生物製程開發期間，沒有執行任何實驗以實現預期商業製程所需的高產量和高純度。

【0256】在一個實施例中，收穫和細胞分離後，細胞培養物被裂解或破壞以使細胞內產物可及。

【0257】在一個實施例中，藉由選自包括化學、生物、實體或機械模式或其組合的方法來進行細胞裂解/細胞破壞。其中細胞裂解的化學方法可以包括去汙劑、溶劑、酸或鹼或其組合。其中細胞裂解的生物方法可以包括胞溶酶。其中細胞裂解的實體方法可以包括凍融、聲空化、水動力空化或滲透衝擊或其組合。其中細胞裂解的機械模式可以包括研磨(例如珠磨機)或高壓均質化或其組合。

【0258】在實施例中，細胞裂解/細胞破碎藉由包括高壓均質化的機械模式進行。

【0259】在另一實施例中，細胞裂解/細胞破碎是藉由使用裂解緩衝液的化學裂解進行的。

【0260】在仍另一實施例中，細胞裂解/細胞破碎是藉由化學裂解之後機械模式(包括高壓均質化)的組合來進

行的。在實施例中，高壓均質化包括在1000-1500巴的範圍內的壓力、在3-8個的範圍內的循環、9 L/小時 $\pm$ 5%的流率、在4°C至15°C範圍內的溫度。

【0261】在實施例中，隨著製程擴大，流率亦增大。

【0262】在實施例中，使用均質機進行機械裂解。

【0263】在實施例中，裂解緩衝液包含在10-100 mM，pH 6.0-8.0範圍內的磷酸鈉、在10-50 mM範圍內的咪唑、在100-500 mM範圍內的氯化鈉(NaCl)。

【0264】裂解緩衝液：裂解緩衝液是一種用於打開細胞以供使用的緩衝溶液。

【0265】在一個實施例中，在細胞裂解/細胞破裂後，藉由量測以下參數中的任一種或全部來評估細胞內產物的破裂效率和潛在產物損失，該等參數包括總蛋白質釋放、細胞活力及粒徑分佈。

【0266】在一個實施例中，在細胞裂解/細胞破裂後，藉由選自包括SDS-PAGE、蛋白質印跡、ELISA、酶測定的群組的方法評估細胞內產物的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的表現位準。

【0267】較佳地，重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白可以包含fHbp-PorA嵌合蛋白。

【0268】在一個實施例中，fHbp-PorA嵌合蛋白可以包含選自包含胜肽標籤及/或大多胜肽的群組的親和標籤。

【0269】親和標籤：當設計需要純化的可溶活性重組

蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的項目時(通常如此)，擁有以下手段是非常有價值的：(i)在表現及純化方案中偵測該純化的可溶性活性重組蛋白；(ii)達到最大溶解度；以及(iii)輕鬆地從大腸桿菌細胞環境中純化該純化的可溶性活性重組蛋白。表現與所需蛋白質串聯的一段胺基酸(胜肽標籤)或一段較大的多胜肽(融合伴侶)以形成帶標籤的融合蛋白可以允許直接實現該三個目標。

【0270】較佳地，fHbp-PorA嵌合蛋白可以包含選自包括聚Arg-、FLAG-、聚His-、c-Myc-、S-及Strep II-標籤的群組的小胜肽標籤以及選自包括麥芽糖結合蛋白(MBP)、N-利用物質蛋白A(NusA)、硫氧還蛋白(Trx)、谷胱甘胜肽S-轉移酶(GST)、泛素及SUMO的群組的大多胜肽(融合伴侶)。

【0271】最佳地，fHbp-PorA嵌合蛋白可以包括聚His和MBP標籤；其中表現載體可以包括pET28a-His-MBP-TEV-fHbp-PorA。

【0272】在一個實施例中，在細胞裂解/細胞破碎後，對細胞團進行細胞分離和澄清。

【0273】較佳地，細胞分離藉由離心進行，其中包含重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的細胞內產物分離在上清液中。

【0274】在實施例中，在1℃至5℃以4000-10000 RPM進行離心30-60 min。

【0275】在一個實施例中，細胞分離後，對上清液進

行澄清以移除裂解物蛋白質。

【0276】在實施例中，澄清是藉由使用選自包括不斷減小的孔徑(例如，6 μ 、5 μ 、0.8 μ 、0.65 μ 、0.45 μ 、0.2 μ)的群組的過濾器來進行的。合適的市售過濾器和過濾裝置是本領域中眾所周知的並可由本領域技藝人士選擇。例示性的過濾裝置可以由聚丙烯或醋酸纖維素或聚醚砜製成，並且市售的過濾器可以是 Millipak (Millipore)、Kleenpak (Pall)和 Sartobran™ P過濾裝置。

【0277】在一個實施例中，在細胞分離和澄清後，對包含帶標籤的重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白的上清液進行純化，該純化包括基於層析的純化方法、超濾、滲濾或其組合。

【0278】在實施例中，基於層析法的純化方法包括離子交換層析法或親和層析法或兩者的組合。

【0279】在另一實施例中，基於層析的純化方法包括基於親和層析的純化，其中帶標籤的重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白與親和柱結合，並進一步用濃度不斷增加的緩衝液進行洗滌，該緩衝液包含磷酸鈉+NaCl+咪唑。用洗脫緩衝液洗脫該帶標籤的蛋白質。

【0280】較佳地，親和柱可以包括固定化的金屬親和柱樹脂。

【0281】固定化的金屬親和層析(IMAC)樹脂是一種高結合容量樹脂，其用於純化帶 His 標籤的蛋白，其中其依賴於 His 對固定化的過渡金屬的親和力。

【0282】根據實施例，固定化的金屬親和柱樹脂包含選自銅、鋅、鎳等的金屬離子。

【0283】較佳地，固定化的金屬親和柱樹脂包含不帶電荷或預荷電的Ni²⁺樹脂。

【0284】在實施例中，不帶電荷形式荷有所選的金屬離子，以實現甚至更大的淨化靈活性。在另一實施例中，固定化的金屬親和柱樹脂可以包含Ni 瓊脂糖6快速流動柱。

【0285】在實施例中，洗滌緩衝液包含20-50 mM的磷酸鈉緩衝液、50-300 mM的氯化鈉(NaCl) pH 7.4，並且增加濃度的咪唑包含20-80 mM(各5-6 CV)。

【0286】在實施例中，使用包含20-50 mM的磷酸鈉緩衝液、50-120 mM的氯化鈉(NaCl) pH 7.4和100-300 mM的咪唑的洗脫緩衝液來進行靶蛋白的洗脫。

【0287】在實施例中，洗脫後，對包含帶標籤的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的洗脫物進一步進行濃縮和滲濾。

【0288】在實施例中，濃縮及滲濾是使用切向流過濾(TFF)進行的，該TFF通常經由截留分子量(MWCO)在5 KDa-50 KDa之間範圍內的過濾器 and 10-50 mM的磷酸鈉緩衝液pH 7.4進行。

【0289】在實施例中，濃縮及滲濾是使用切向流過濾(TFF)進行的，該TFF通常經由截留分子量(MWCO)在5 KDa至50 KDa之間範圍內的過濾器和10-50 mM的磷酸鈉緩

衝液 pH 7.4 或 Tris-HCl 緩衝液 pH 8.5 進行。

【0290】在一個實施例中，帶標籤的重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白經受 TEV 蛋白酶消化以移除親和標籤。

【0291】在實施例中，對包含聚 His 和 MBP 標籤的重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白進行 TEV 蛋白酶消化以移除 His-MBP 標籤，其中 TEV 蛋白酶消化包括將包含聚 His 和 MBP 標籤的重組蛋白與 TEV 蛋白酶一起孵育。

【0292】煙草蝕紋病毒 (TEV) 蛋白酶是 TEV 中多聚蛋白核包涵體 a (NIa) 的 27 kDa 催化結構域，其識別特定胺基酸序列 ENLYFQG/S 並在 Q 與 G/S 之間切割。在一個實施例中，帶標籤的重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白經過 TEV 蛋白酶消化以移除親和標籤，其中 HIS-GST-TEV 蛋白酶與胺基酸 SEQ ID NO. 12 具有至少 75% 的同一性或由與序列 SEQ ID NO. 11 具有至少 75.0% 同一性的核酸序列編碼。

【0293】在實施例中，His-GST-TEV 蛋白酶的分子大小為約 50 kDa。

【0294】在較佳實施例中，帶標籤重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白經受 TEV 蛋白酶消化以移除親和標籤，其中該 HIS-GST-TEV 蛋白酶與胺基酸 SEQ ID NO. 12 具有至少 75% 或 80.0%、或 85.0%、或 90.0% 或 95.0% 或 98.0%、或 99.0%、或 99.5% 的同一性，或由與序列 SEQ ID NO. 11 具有至少 75.0%、或 80.0%、或 85.0%、或 90.0%、或 95.0%、或 98.0%、或 99.0%、或 99.5% 同一性的核酸序列編碼。

【0295】在實施例中，帶標籤的重組蛋白/經修飾的

fHbp融合蛋白:TEV蛋白酶的比率基於TEV蛋白酶的活性和純度而在5:1到30:1或更高的範圍內。在實施例中，帶標籤的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白(受質):TEV蛋白酶的比率為20:1。

【0296】在實施例中，孵育溫度在4℃至35℃的範圍內，並且孵育時間在15小時至20小時的範圍內。

【0297】在一個實施例中，在10-50 mM磷酸鈉緩衝液pH7.4存在下執行TEV蛋白酶消化，然後添加終濃度為0.5 mM至5 mM的二硫蘇糖醇(DTT)。

【0298】在實施例中，用於標籤移除/消化的TEV蛋白酶藉由包括以下步驟的方法產生：

- 在營養培養基中培養包含表現載體的宿主細胞；
- 誘導宿主細胞表現TEV蛋白酶；
- 收穫並分離該等宿主細胞；
- 裂解該等收穫的細胞並分離宿主細胞以獲得TEV蛋白酶；以及
- 純化TEV蛋白酶。

【0299】在實施例中，宿主細胞可以包括大腸桿菌(E. coli)，並且大腸桿菌菌株可以選自包括以下的群組：BL21 (DE3)、BL21 (DE3) pLysS*、BL21 (DE3) pLysE*、BL21 star (DE3)、BL21-A1、BLR (DE3)、HMS174 (DE3)**、Tuner (DE3)、Origami2 (DE3)**、Rosetta2 (DE3)*、Rosetta2 (DE3)、Lemo21 (DE3)*、T7 Express、m15 pREP4*、C41(DE3)、C43(DE3)、

Rosetta™(DE3)pLysS或B834(DE3)。

【0300】在實施例中，用於表現TEV蛋白酶的宿主細胞是大腸桿菌Rosetta™(DE3)pLysS。

【0301】在實施例中，藉由上述方法產生的TEV蛋白酶包括具有SEQ ID NO. 12或由SEQ ID NO. 11編碼的TEV蛋白酶。

【0302】在實施例中，使用以下非限制性步驟純化TEV蛋白酶：

- 裂解所收穫的細胞；
- 分離宿主細胞碎片並收集上清液；
- 使用洗滌緩衝液對上清液進行至少一次洗滌；
- 用洗脫緩衝液洗脫純化的TEV蛋白酶；
- 濃縮純化的TEV蛋白酶。

【0303】在實施例中，洗滌緩衝液包含磷酸鈉、氯化鈉和咪唑。

【0304】在實施例中，用pH 7.4的洗滌緩衝液對上清液進行至少4次洗滌步驟

【0305】在另一實施例中，用pH 8.5的洗滌緩衝液對上清液進行至少2次洗滌步驟。

【0306】用於TEV蛋白酶的生產和純化的方法和參數與上面描述的帶標籤的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白類似，並在後面的實施例中詳細說明。

【0307】在一個實施例中，在標籤移除後，對重組蛋

白/經修飾的fHbp融合蛋白進行純化，該純化包括基於層析的純化方法、超濾、滲濾或其組合。

【0308】根據實施例，層析法選自柱層析法、離子交換層析法、陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、柱層析法、快速層析法、凝膠過濾/尺寸排阻/凝膠滲透(分子篩)層析法、親和層析法、紙層析法、薄層層析法、氣相層析法、染料-配體層析法、疏水相互作用層析法、擬親和層析法、液相層析法、高壓液相層析法(HPLC)、固定化的金屬親和層析法、陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、多模式層析法、多模式陰離子交換層析法、靜電相互作用層析法、氫鍵層析法、反相層析法及其組合。

【0309】在實施例中，基於層析法的純化方法包括離子交換層析法或親和層析法或兩者的組合。

【0310】在另一實施例中，基於層析的純化方法包括離子交換之後進行基於親和層析的純化。

【0311】在又一實施例中，離子交換層析法包括陰離子交換層析法。

【0312】在又一個實施例中，陰離子交換層析法包括強陰離子交換層析法。

【0313】在實施例中，親和柱可以包括固定化的金屬親和柱樹脂。

【0314】固定化的金屬親和層析(IMAC)樹脂是一種高結合容量樹脂，其用於純化帶His標籤的蛋白，其中其依賴於His對固定化的過渡金屬的親和力。

【0315】在實施例中，固定化的金屬親和柱樹脂包括不帶電荷或預荷電的Ni²⁺樹脂。

【0316】在實施例中，不帶電荷形式荷有所選的金屬離子，以實現甚至更大的淨化靈活性。

【0317】在實施例中，固定化的金屬親和柱樹脂包括Ni瓊脂糖6快速流動柱。

【0318】層析法可以是多模式陰離子交換樹脂Capto™ Adhere、Capto Adhere ImpRes、Capto MMC ImpRes或任何其他混合模式的層析法組合，包括離子交換、靜電相互作用、氫鍵和疏水相互作用

【0319】在實施例中，濃縮和滲濾是使用切向流過濾(TFF)進行的，該TFF通常經由截留分子量(MWCO)在5 KDa-50 KDa之間範圍內的過濾器進行。

【0320】在一個實施例中，包含重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的洗脫物經由至少一個無菌級過濾器藉由直流過濾(DFF)進行無菌，以獲得包含無菌重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的濾液。其中除菌級過濾器可選用包括0.8 μ、0.45 μ、0.2 μ的群組。進一步，市售過濾器和過濾裝置是本領域中眾所周知的並可由本領域技藝人士選擇。例示性的過濾裝置可以由聚丙烯或醋酸纖維素或聚醚砜或聚偏二氟乙烯製成，並且市售的過濾器可以是Millipak (Millipore)、Kleenpak (Pall)和Sartobran™ P過濾裝置。

【0321】在實施例中，重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白亦包含包涵體(IB)。

【0322】包涵體(IB)：蛋白質聚集體/不溶性蛋白質的累積被稱為IB。IB形成是由於蛋白質聚集與溶解之間不平衡造成的。

【0323】在一個實施例中，對包含包涵體(IB)的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白進行以下步驟：

- a) 包涵體清洗及回收；
- b) 包涵體(IB)的溶解和重折疊；

【0324】在一個實施例中，對包含包涵體(IB)的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白進行尿素變性並且使溶解在尿素中的包涵體與親和柱結合並進一步用不斷降低濃度的尿素和促進正確重折疊的重折疊緩衝液進行洗滌。用洗脫緩衝液洗脫靶標蛋白。

【0325】在實施例中，使用包含20-50 mM磷酸鈉緩衝液、50-120 mM氯化鈉(NaCl) pH 7.4和5-10 M尿素的變性緩衝液組成物進行變性。

【0326】在另一實施例中，用不斷降低濃度的尿素洗滌包括用20-50 mM磷酸鈉緩衝液、50-120 mM氯化鈉(NaCl) pH 7.4進行洗滌。在另一實施例中，尿素的不斷降低的濃度包括8 M、6 M、4 M、2 M、1 M(各5-6 CV)。

【0327】在實施例中，使用包含40 mM-400 mM咪唑的洗脫緩衝液進行靶蛋白的洗脫。

【0328】在實施例中，親和柱包含固定化的金屬親和柱樹脂。

【0329】固定化的金屬親和層析(IMAC)樹脂是一種

高結合容量樹脂，其用於純化帶 His 標籤的蛋白，其中其依賴於 His 對固定化的過渡金屬的親和力。

【0330】在實施例中，固定化的金屬親和柱樹脂包括不帶電荷或預荷電的 Ni²⁺樹脂。

【0331】在另一實施例中，不帶電荷形式荷有所選的金屬離子，以實現甚至更大的淨化靈活性。

【0332】在又一實施例中，固定化的金屬親和柱樹脂包括 Ni 瓊脂糖 6 快速流動柱。

【0333】在一個實施例中，在尿素變性之前，對包含包涵體的上清液進行蛋白質沉澱。

【0334】在實施例中，使用硫酸銨進行蛋白質沉澱。

【0335】在一個實施例中，在尿素變性後，使用 0.22 μM 過濾器對上清液進行過濾。

【0336】在一個實施例中，洗脫後，對包含靶標重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白的洗脫物進一步進行濃縮和滲濾。

【0337】在實施例中，濃縮和滲濾是使用切向流過濾 (TFF) 進行的，該 TFF 通常經由截留分子量 (MWCO) 在 5 kDa-50 kDa 之間範圍內的過濾器進行。

【0338】在實施例中，重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白的濃度大於 0.95 mg/ml。

【0339】在另一實施例中，當 590/600 nm 下的 OD 為 20-100 時，停止葡萄糖進料並開始甘油進料，並藉由在補料分批模式下添加及/或維持 1-50 g/L 的乳糖來誘導培養

【0340】在實施例中，純化的嵌合/重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白儲存在2°C至8°C下直至進一步使用。在另一實施例中，純化的嵌合/重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白在穩定劑存在下儲存在2°C至8°C下。在實施例中，穩定劑選自TRIS、Tween/聚山梨醇酯、非離子洗滌劑，諸如聚乙二醇十二烷基醚(BRIJ35)、蔗糖(高達5%)等。

【0341】根據本發明的另一態樣，對重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白製劑進行優化，以在重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白抗原的長期儲存中提高免疫原性、提高穩定性並維持穩定性。

【0342】在一個實施例中，優化的疫苗製劑具有低黏度，沒有聚集，並且在寬溫度範圍內具有長期穩定性。在實施例中，優化的疫苗製劑包含固體或液體載體。

【0343】在一個實施例中，疫苗製劑是完全液體的。液體製劑的合適形式包括溶液、懸浮液、乳液、糖漿、等滲水溶液、黏稠組成物及緩衝至選定pH的醃劑。

【0344】在一個實施例中，疫苗製劑包含聚合物或其他藥劑以控制組成物的稠度，及/或控制抗原/分泌蛋白從組成物中的釋放。

【0345】在一個實施例中，疫苗製劑是透皮製備物形式，包括洗劑、凝膠劑、噴霧劑、軟膏劑或其他合適的技術。若需要經鼻或呼吸道(黏膜)施用(例如，氣霧吸入或吹入)，則組成物可以製成某種形式，並藉由擠壓噴霧分配器、泵分配器或氣霧分配器進行分配。氣溶膠通常借助於

碳氫化合物在壓力下形成。泵分配器可以較佳地分配定量劑量或具有特定粒徑的劑量。當採用溶液、懸浮液和凝膠的形式時，在一些實施例中，除了活性成分外，免疫原性組成物亦含有大量的水(較佳地純淨水)。

【0346】在一個實施例中，疫苗製劑在2-8℃下穩定12至36個月；在25℃下穩定2至6個月；在37℃下穩定1周至4周，在42℃下穩定2-7天，並且在55℃下穩定2-7天。

【0347】在一個實施例中，疫苗製劑是凍乾/冷凍乾燥製劑。

【0348】在一個實施例中，製劑的最終pH可以在pH 6.0至pH 8.0的範圍內。

【0349】根據本發明的另外態樣，提供了一種根據本發明的經修飾的fHbp、核酸或製劑，其用於治療或預防受試者的致病感染或定殖。根據本發明的仍另外態樣，提供了一種治療或預防受試者的致病感染或定殖的方法，其包括向該受試者施用根據本發明的經修飾的fHbp、核酸或組成物。根據本發明的另一個態樣，提供了一種疫苗接種方法，其包括向受試者施用根據本發明的經修飾的fHbp、核酸或組成物。

【0350】在一個實施例中，經修飾的fHbp是免疫原性的，涉及經由腸胃外或皮下或皮內、肌內或腹膜內或靜脈內施用或可注射施用或從植入物緩釋或藉由滴眼劑或經鼻或經直腸或經頰或經陰道、經口或胃內或黏膜或鼻腔、肺泡或牙齦或嗅覺或呼吸道黏膜施用或任何其他免疫途徑將

免疫有效量的免疫原性製劑施用於人受試者。

【0351】如本文所用的「共施用的」意謂不同的免疫原性組成物/疫苗可以單獨施用或組合施用。

【0352】當疫苗分開施用時，它們通常會在不同的部位施用，例如，一種疫苗施用至左上臂，並且第二疫苗施用至右上臂。因此，可以對側地(例如雙臂或雙腿，或對側手臂和腿)或同側地(例如身體同一側的手臂和腿)施用兩種疫苗。儘管疫苗是分開施用的，但它們是在實質上同一時間施用的(例如在同一醫療諮詢或隨訪醫療保健專業人員或疫苗接種中心期間)，諸如彼此相隔1小時內。

【0353】然而，不是單獨進行共免疫，而是可以執行組合施用。因此，共免疫可以使用組合疫苗，亦即摻混了不同免疫原的單一組成物。組合疫苗為受試者提供了接受減少次數的注射的優勢，此可以導致依從性提高的臨床優點。

【0354】本發明的組成物通常直接施用於患者。直接遞送可藉由腸胃外注射(例如皮下、腹膜內、靜脈內、肌內、或組織間隙空間注射)，或藉由直腸、口服、陰道、局部、透皮、鼻內、眼部、耳、肺或其他黏膜施用來實現。肌內施用於大腿或上臂係較佳的。注射可以經由針頭(例如，皮下注射針)進行，但是亦可以替代地採用無針注射。典型的肌內注射劑量為約0.5 ml。

【0355】該組成物可以進一步在『多劑量』試劑盒，亦即含有足夠用於多次免疫的組成物的單個容器中提供。

多劑量可以包含防腐劑，或者多劑量容器可以具有無菌適配器以用於取出個別劑量的組成物。

【0356】被免疫的受試者是人類，其可以是任何年齡，例如0-12個月大、1-5歲、5-18歲、18-55歲、或大於55歲。較佳地，被免疫的受試者是青少年(例如12-18歲)或成年人(18歲或更大年齡)。

【0357】任選選地，受試者是在兒童期(例如，12歲之前)已針對腦膜炎雙球菌進行免疫並且接受了加強劑量的根據本發明的免疫原性組成物的青少年或成年人。

【0358】在實施例中，本發明的疫苗製劑闡明瞭針對淋病雙球菌菌株和腦膜炎雙球菌血清群ACWYX的交叉保護。

【0359】施用可以以治療有效量提供。本領域技藝人士能夠確定適當的劑量和施用重複次數。

【0360】疫苗製劑可以配製成單劑量小瓶或多劑量小瓶(2劑量或5劑量或10劑量小瓶)或多劑量試劑盒或作為預填充的注射器，其中該疫苗製劑可以以單劑量方案給予，或較佳地以多劑量方案給予，其中在主要疫苗接種過程之後若需要，則在1-3年後的後續時間間隔內給予1-3個單獨劑量。劑量方案亦將至少部分地根據提供保護性免疫所需的加強劑量的需要而確定。

【0361】在實施例中，疫苗製劑被配製用於按照一劑量或兩劑量方案或三劑量方案施用於人類受試者老年人、青少年、成年人或小於2歲或大於2歲的兒童，該等方案由

以下組成：第一劑量及/或待在第一劑量之後3個月至2年之間施用的第二劑量及/或待在第二劑量之後3個月至2年之間施用的第三劑量。

【0362】在實施例中，受試者是哺乳動物，諸如人類。

【0363】在實施例中，感染是細菌感染。在另一實施例中，感染是腦膜炎，例如腦膜炎雙球菌或淋病雙球菌。

【0364】根據本發明的另外態樣，提供了根據本發明的經修飾的fHbp與至少一種其他預防或治療活性分子的組合。

【0365】在實施例中，至少一種其他預防或治療活性分子包含與本文的根據本發明的經修飾的fHbp不同的疫苗或抗原。根據本發明的實施例，該抗原選自但不限於白喉類毒素(D)、破傷風類毒素(T)、全細胞百日咳(wP)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、流感嗜血桿菌b PRP-載體蛋白綴合物(Hib)、流感嗜血桿菌(a、c、d、e、f血清型及無莢膜毒株)、腦膜炎雙球菌A抗原、腦膜炎雙球菌C抗原、腦膜炎雙球菌W-135抗原、腦膜炎雙球菌Y抗原、腦膜炎雙球菌X抗原、肺炎鏈球菌抗原、腦膜炎雙球菌B胞疹或純化抗原、金黃色葡萄球菌抗原、炭疽、BCG、肝炎(A、C、D、E、F及G毒株)抗原、人乳頭瘤病毒、HIV、傷寒沙門氏菌抗原、無細胞百日咳、經修飾的腺苷酸環化酶、瘧疾抗原(RTS,S)、麻疹、腮腺炎、風疹、登革熱、寨卡病毒、埃博拉病毒、基孔肯雅熱病毒、日本腦炎、輪狀病

毒、腹瀉抗原、黃病毒、天花、黃熱病、帶狀皰疹、及水痘病毒抗原。

【0366】在另一實施例中，除 fHbp-PorA 嵌合抗原之外，本發明亦設想了包含用於針對其他疾病或感染進行免疫的抗原的組成物。根據實施例，該組成物包含以下額外抗原：

- 來自 PorB、Fet A、OmpC、NHBA、NadA、腦膜炎球菌抗原 287、NspA、HmbR、NhhA、App、936 的蛋白抗原，

- 糖類抗原，其來自腦膜炎雙球菌血清群 A、C、W、Y 及 / 或 X，

- 來自肺炎鏈球菌的糖類抗原，

- 白喉抗原，諸如白喉類毒素，例如 CRM197 突變體，

- 破傷風抗原，諸如破傷風類毒素，

- 來自百日咳桿菌的抗原、無細胞或全細胞百日咳抗原，

- 來自乙型流感嗜血桿菌的糖類抗原，

- 脊髓灰質炎抗原，諸如 IPV，

- 麻疹、腮腺炎及 / 或風疹抗原，

- 流感抗原，諸如血球凝集素及 / 或神經胺酸酶表面蛋白，

- 來自無乳鏈球菌 (B 群鏈球菌) 的抗原 (蛋白質或糖)，

- 來自化膿性鏈球菌 (A 群鏈球菌) 的抗原 (蛋白質或糖)，

- 來自金黃色葡萄球菌的抗原(蛋白質、糖)，
- 來自沙門氏菌屬種屬的抗原(蛋白質或糖)。

【0367】在一個實施例中，該至少一種其他預防或治療活性分子包括單價莢膜多糖-蛋白質綴合物疫苗。單價蛋白質莢膜多糖疫苗可以包括以下中的任一者：具有細菌類毒素的腦膜炎雙球菌血清群C或A莢膜、二價疫苗(具有與細菌類毒素綴合的血清群C及A莢膜多糖)、四價(血清群A、C、Y、W)或五價(A、C、Y、W、X)綴合物疫苗。或者，該至少一種其他預防或治療活性分子可包含綴合物疫苗，其中包含帶有外源胜肽環(諸如PorA環)的fHbp支架的抗原可作為蛋白質載體分子摻入綴合物疫苗中。該綴合物疫苗可單獨或組合地包來自A、C、Y、W或X菌株的任何血清群莢膜多糖。

【0368】組合疫苗可選自六價(ACWYX-B)、四價(AC-Hib-B)、三價(AC-B)、二價(AB、XB、CB)。

【0369】在實施例中，液體N腦膜炎球菌血清群B疫苗與凍乾的ACWYX綴合物疫苗一起重構，以用於床邊施用。

【0370】根據實施例，本發明涉及一種在哺乳動物中誘導針對腦膜炎雙球菌的免疫應答的方法。該方法包括向哺乳動物施用有效量的免疫原性組成物，該免疫原性組成物包含i)至少一種融合蛋白，其包含穩定的非功能性/非脂化的fHbp及PorA的PorA VR2環以及至少一種選自以下的綴合物：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷

風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

【0371】本發明的一個態樣涉及在哺乳動物中誘導針對腦膜炎雙球菌的免疫應答的方法。該方法包括向哺乳動物施用有效量的免疫原性組成物，該免疫原性組成物包含 i)至少兩種融合蛋白，每種融合蛋白由一種與一個 PorA VR2環偶聯的 fHbp變體類型及至少一種選自以下的綴合物組成：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

【0372】本發明的另一態樣涉及一種在哺乳動物中誘導針對腦膜炎雙球菌的免疫應答的方法。該方法包括向哺乳動物施用有效量的免疫原性組成物，該免疫原性組成物包含 i)至少三種融合蛋白，每種融合蛋白由一種與兩個 PorA VR2環偶聯的 fHbp變體類型及至少一種選自以下的綴合物組成：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌

的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

【0373】 本發明的另一態樣涉及一種在哺乳動物中誘導針對腦膜炎雙球菌的免疫應答的方法。該方法包括向哺乳動物施用有效量的免疫原性組成物，該免疫原性組成物包含 i)至少四種融合蛋白，每種融合蛋白由一種與三個 PorA VR2環偶聯的 fHbp變體類型及至少一種選自以下的綴合物組成：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

【0374】 用於本發明的 fHbp-PorA嵌合抗原包含的胺基酸序列：與如下揭示的序列具有50%或更高的同一性(例如 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更高)：

【0375】 部分 A：5種嵌合蛋白/重組蛋白/經修飾的 fHbp融合蛋白的核苷酸序列：

1.HIS-MBP-TEV- fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14 (SEQ ID NO. 1)

ATGGGGCCATCACCATCACCATCACCCCATGAAAATCGAA
GAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGGCGATAAAGG
CTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAA
AGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATA
AACTGGAAGAGAAATTCCCACAGGTTGCGGGCAACTGGC
GATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGGCACACGACCGCTTT
GGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACC
CCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACC
TGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTAC
CCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAA
GATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGAT
CCCGGCGCTGGATAAAGAAGTGAAGCGAAAGGTAAGA
GCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCT
GGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGGTTATGCGTTCAAGT
ATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAAGACGTGGGGCGTG
GATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGGTCTGACCTTCCTGGTT
GACCTGATTAAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGA
TTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAAC
AGCGATGACCATCAACGGCCCCGTGGGGCATGGTCCAACA
TCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGC
CGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTTCGTTGGCG
TGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAA

GAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGACT
GATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCT
GGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGG
CGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCC
AGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCC
GCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCC
GCCAGCGGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGA
CGCGCAGACTCCGGGTAGCGAAAATCTGTATTTTCAGGG
TGTTGCAGCAGATATTGGCACCGGTCTGGCAGATGCACT
GACCGCACCGCTGGATCATAAAGATAAAGGTCTGAAAA
GTCTGACCCTGGAAGATAGCATTAGCCAGAATGGTACAC
TGACCCTGAGTGACAGGGTGCAGAAAAAACCTTTAAA
GTGGGTGATAAAGACAACAGCCTGAATACCGGTAAACT
GAAAAACGATAAAATCAGCCGCTTTGACTTCGTCCAGAA
AATTGAAGTTGATGGTCAGACCATTACACTGGCAAGCGG
TGAATTTTCAGATCTATAAACAGAGCCATAGCGCAGTTAC
CGCATTTTCAGATTGAAAAAATCAACAACCCGGATAAAA
TCGATAGCCTGATTAACCAGCGTAGCTTTCTGGTTGGTG
ATTTAGGTGGTGAACATACCGCATTTAATCAGCTGCCGA
GCGGTAAAGCAGAATATCATGGTAAAGCATTTAGCAGT
GATGATGCCGGTGGCAAACCTGACCTATACCATTGATTTT
GCAGCAAAACAAGGCCACGGCAAAATTGAACATCTGAA
AACACCGGAACAGAATGTTGAACTGGCCAGCGCAGAAC
TGAAAGCCGATGAAAAAAGCCATGCAGTTATTCTGGGT

GATACCCGTTATGGTAGCGAAGAAAAAGGCACCTATCA
TCTGGCACTGTTTGGTGATCGTGCACAAGAAATTGCAGG
TAGCGCAACCGTTAAAATTTCGTGCATATAAACCGGCATA
TGTGGACGAGAAAAAAATGGTTCATGCAGCCGTTGTTGG
CAAAAAAGTGCATGAAATTGGGATCGCAGGTAAACAGT
AA

2.HIS-MBP-TEV- fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4 (SEQ ID NO. 2)

ATGGGCCATCACCATCACCATCACCCCATGAAAATCGAA
GAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGG
CTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAA
AGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATA
AACTGGAAGAGAAATTCCCACAGGTTGCGGCAACTGGC
GATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTT
GGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACCC
CCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACC
TGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTAC
CCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAA
GATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGAT
CCCGGCGCTGGATAAAGAAGTGAAGCGAAAGGTAAGA
GCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCT
GGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGTTATGCGTTCAAGT
ATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAAGACGTGGGGCGTG

GATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTT
GACCTGATTAAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGA
TTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAAC
AGCGATGACCATCAACGGCCCCGTGGGCATGGTCCAACA
TCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGC
CGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCG
TGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAA
GAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGACT
GATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCT
GGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGG
CGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCC
AGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCC
GCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCC
GCCAGCGGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGA
CGCGCAGACTCCGGGGTAGCGAAAATCTGTATTTTCAGGG
TGTTGCAGCAGATATTGGTGCAGGTCTGGCAGATGCACT
GACCGCACCGCTGGATCATAAAGATAAAGGTCTGCAGA
GTCTGACCCTGGATCAGAGCGTTTCGTAAAAATGAAAAA
CTGAAACTGGCAGCACAGGGTGCAGAAAAAACCTATGG
TAATGGTGATAGCCTGAATACCGGCCAAACTGAAAAATG
ATAAAGTGAGCCGCTTTGATTTTATCCGCCAGATTGAAG
TTGATGGTCAGCTGATTACCCTGGAAAGCGGTGAATTTC
AGATCTATAAACAGAGCCATAGCGCAGTTACCGCATTTC
AGATTGAAAAAATCAACAACCCGGACAAAATTGACAGC

CTGATTAACCAGCGTAGCTTTCTGGTTGGTGATTTAGGT
GGTGAACATACCGCATTTAACCAGCTGCCGAGCGGTAA
AGCAGAATATCATGGTAAAGCATTTAGCAGTGATGATGC
CGGTGGTAAACTGACCTATACCATTGATTTTGCAGCCAA
ACAAGGCCATGGCAAAATTGAACATCTGAAAACACCGG
AACAGAATGTTGAACTGGCAAGCGCAGAACTGAAAGCC
GATGAAAAAAGCCATGCAGTTATTCTGGGTGATACCCGT
TATGGTGGTGAAGAAAAAGGCACCTATCATCTGGCACTG
TTTGGTGATCGTGCACAAGAAATTGCAGGTAGCGCAACC
GTTAAAGCATATACACCGGCACATGTTGTGGTTAATAAC
AAAGTTGCAACCCATGTTCCGGCAGTTGTTGGTCATCAT
GAAATTGGGATCGCAGGTAAACAGTAA

3.HIS-MBP-TEV-fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO. 3)

ATGGGCCATCACCATCACCATCACCCCATGAAAATCGAA
GAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGG
CTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAA
AGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATA
AACTGGAAGAGAAATTCCCACAGGTTGCGGCAACTGGC
GATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTT
GGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACC
CCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACC
TGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTAC

CCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAA
GATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGAT
CCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGA
GCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCT
GGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGGTTATGCGTTCAAGT
ATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAAGACGTGGGCGTG
GATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGTCTGACCTTCCTGGTT
GACCTGATTAAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGA
TTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAAC
AGCGATGACCATCAACGGCCCCGTGGGCATGGTCCAACA
TCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGC
CGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCG
TGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAA
GAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGACT
GATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCT
GGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGG
CGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCC
AGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCC
GCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCC
GCCAGCGGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGA
CGCGCAGACTCCGGGTAGCGAAAATCTGTATTTTCAGGG
TGTTGCAGCAGATATTGGTGCAGGTCTGGCAGATGCACT
GACCGCACCGCTGGATCATAAAGATAAAAGCCTGCAGA
GTCTGACCCTGGATCAGAGCGTTCGTAAAAATGAAAAA

CTGAAACTGGCAGCACAGGGGTGCAGAAAAAACCTATGG
TAATGGTGATAGCCTGAATACCGGCAAACCTGAAAAATG
ATAAAGTGAGCCGCTTTGATTTTATCCGCCAGATTGAAG
TTGATGGTCAGCTGATTACCCTGGAAAGCGGTGAATTTC
AGGTGTATAAACAGAGCCATAGTGCCCTGACAGCACTG
CAGACCGAACAAGAACAGGATCCGGAACATAGCGGTAA
AATGGTTGCAAAACGTCGCTTTAAAATCGGTGATATTGC
CGGTGAACATACCAGCTTTGATAAACTGCCGAAAGATGT
TATGGCAACCTATCGTGGCACCGCATTTGGTAGTGATGA
TGCCGGTGGTAAACTGACCTATACCATTGATTTTGCAGC
CAAACAAGGCCATGGCAAAATTGAACATCTGAAAAGTC
CGGAACTGAATGTTGAACTGGCAACCGCATATATCAAAC
CGGATGAAAAACATCATGCCGTTATTAGCGGTAGCGTTC
TGTATAATCAGGATGAGAAAGGTAGCTATAGCCTGGGT
ATTTTTGGTGGTCAGGCACAAGAAGTTGCAGGTTCAGCC
GAAGTTGAAGCATATACACCGGCATATGTTGATGAGCA
GAGCAAATATCATGCAGCCGTTGTTGGTAAACATCACAT
TGGCCTGGCAGCAAAACAGTAA

4.HIS-MBP-TEV- fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4 (SEQ ID NO. 4)

ATGGGCCATCACCATCACCATCACCCCATGAAAATCGAA
GAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGCGATAAAGG
CTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAA

AGATACCGGAATTAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATA
AACTGGAAGAGAAATTCCCACAGGTTGCGGCAACTGGC
GATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGCACACGACCGCTTT
GGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACC
CCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACC
TGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTAC
CCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAA
GATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGAT
CCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGA
GCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCT
GGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGGTTATGCGTTCAAGT
ATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAGACGTGGGCGTG
GATAACGCTGGCGCGAAAGCGGGGTCTGACCTTCCTGGTT
GACCTGATTAAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGA
TTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAAC
AGCGATGACCATCAACGGCCCCGTGGGCATGGTCCAACA
TCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGC
CGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTTCGTTGGCG
TGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAA
GAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGACT
GATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCT
GGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGG
CGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCC
AGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCC

GCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCC
GCCAGCGGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGA
CGCGCAGACTCCGGGTAGCGAAAATCTGTATTTTCAGGG
TGTCGCCGCCGACATCGGTGCGGGGGCTTGCCGATGCACT
AACCGCACCGCTCGACCATAAAGACAAAGGTTTGCAGT
CTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAA
CTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAAAACTTATGG
AAACGGTGACAGCCTCAATACGGGGCAAATTGAAGAACG
ACAAGGTCAGCCGTTTCGACTTTATCCGCCAAATCGAAG
TGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGTGGAGAGTTCC
AAGTATACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCTTTC
AGACCGAGCAAATACAAGATTCGGAGCATTCCGGGAAG
ATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGGCGACATAGC
GGGCGAACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCGAAGGCGG
CAGGGCGACATATCGCGGGACGGCGTTTCGGTTCAGACG
ATGCCGGCGGAAAACTGACCTACACCATAGATTTTCGCCG
CCAAGCAGGGAAACGGCAAATCGAACATTTGAAATCG
CCAGAACTCAATGTCGACCTGGCCGCCGCCGATATCAAG
CCGGATGGAAAACGCCATGCCGTCATCAGCGGTTCGGTC
CTTTACAACCAAGCCGAGAAAGGCAGTTACTCCCTCGGT
ATCTTTGGCGGAAAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGC
GGAAGTGAAAGCATATACACCGGCACATGTTGTGGTTA
ATAACAAAGTTGCAACCCATGTTCCGGCAGTTGTTGGTA
AACGCCATATCGGCCTTGCCGCCAAGCAATAA

5.HIS-MBP-TEV- fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO. 5)

ATGGGGCCATCACCATCACCATCACCCCATGAAAATCGAA
GAAGGTAAACTGGTAATCTGGATTAACGGGCGATAAAGG
CTATAACGGTCTCGCTGAAGTCGGTAAGAAATTCGAGAA
AGATACCGGAATTAAAGTCACCGTTGAGCATCCGGATA
AACTGGAAGAGAAATTCCCACAGGTTGCGGGCAACTGGC
GATGGCCCTGACATTATCTTCTGGGGCACACGACCGCTTT
GGTGGCTACGCTCAATCTGGCCTGTTGGCTGAAATCACC
CCGGACAAAGCGTTCCAGGACAAGCTGTATCCGTTTACC
TGGGATGCCGTACGTTACAACGGCAAGCTGATTGCTTAC
CCGATCGCTGTTGAAGCGTTATCGCTGATTTATAACAAA
GATCTGCTGCCGAACCCGCCAAAAACCTGGGAAGAGAT
CCCGGCGCTGGATAAAGAACTGAAAGCGAAAGGTAAGA
GCGCGCTGATGTTCAACCTGCAAGAACCGTACTTCACCT
GGCCGCTGATTGCTGCTGACGGGGGGTTATGCGTTCAAGT
ATGAAAACGGCAAGTACGACATTAAAGACGTGGGGCGTG
GATAACGCTGGCGCGGAAAGCGGGGTCTGACCTTCCTGGTT
GACCTGATTAAAAACAAACACATGAATGCAGACACCGA
TTACTCCATCGCAGAAGCTGCCTTTAATAAAGGCGAAAC
AGCGATGACCATCAACGGCCCCGTGGGCATGGTCCAACA
TCGACACCAGCAAAGTGAATTATGGTGTAACGGTACTGC
CGACCTTCAAGGGTCAACCATCCAAACCGTTCGTTGGCG

TGCTGAGCGCAGGTATTAACGCCGCCAGTCCGAACAAA
GAGCTGGCAAAAGAGTTCCTCGAAAACCTATCTGCTGACT
GATGAAGGTCTGGAAGCGGTTAATAAAGACAAACCGCT
GGGTGCCGTAGCGCTGAAGTCTTACGAGGAAGAGTTGG
CGAAAGATCCACGTATTGCCGCCACTATGGAAAACGCCC
AGAAAGGTGAAATCATGCCGAACATCCCGCAGATGTCC
GCTTTCTGGTATGCCGTGCGTACTGCGGTGATCAACGCC
GCCAGCGGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCCCTGAAAGA
CGCGCAGACTCCGGGTAGCGAAAATCTGTATTTTCAGGG
TGTCGCCCGCCGACATCGGTGCGGGGGCTTGCCGATGCACT
AACCGCACCGCTCGACCATAAAGACAAAGGTTTGCAGT
CTTTGACGCTGGATCAGTCCGTCAGGAAAAACGAGAAA
CTGAAGCTGGCGGCACAAGGTGCGGAAAAAACTTATGG
AAACGGTGACAGCCTCAATACGGGCAAATTGAAGAACG
ACAAGGTCAGCCGTTTCGACTTTATCCGCCAAATCGAAG
TGGACGGGCAGCTCATTACCTTGGAGAGTGGAGAGTTCC
AAGTATACAAACAAAGCCATTCCGCCTTAACCGCCTTTC
AGACCGAGCAAATACAAGATTCGGAGCATTCCGGGAAG
ATGGTTGCGAAACGCCAGTTCAGAATCGGCGACATAGC
GGGCGAACATACATCTTTTGACAAGCTTCCCGAAGGCGG
CAGGGCGACATATCGCGGGACGGCGTTTCGGTTCAGACG
ATGCCGGCGGAAAACTGACCTACACCATAGATTTCGCCG
CCAAGCAGGGAAACGGCAAAATCGAACATTTGAAATCG
CCAGAACTCAATGTCGACCTGGCCGCCGCCGATATCAAG

CCGGATGGAAAACGCCATGCCGTCATCAGCGGTTCCGTC
CTTTACAACCAAGCCGAGAAAGGCAGTTACTCCCTCGGT
ATCTTTGGCGGAAAAGCCCAGGAAGTTGCCGGCAGCGC
GGAAGTGAAAGCATATACACCGGCATATGTTGATGAGC
AGAGCAAATATCATGCAGCCGTTGTTGGTAAACGCCATA
TCGGCCTTGCCGCCAAGCAATAA

【 0376】 部分 B：5種嵌合蛋白/重組蛋白/經修飾的
fHbp融合蛋白的胺基酸序列

1. fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14 (SEQ ID NO. 6)

G V A A D I G T G L A D A L T A P L D H K D K G L K S
L T L E D S I S Q N G T L T L S A Q G A E K T F K V G D
K D N S L N T G K L K N D K I S R F D F V Q K I E V D
G Q T I T L A S G E F Q I Y K Q S H S A V T A F Q I E K
I N N P D K I D S L I N Q R S F L V G D L G G E H T A F
N Q L P S G K A E Y H G K A F S S D D A G G K L T Y T
I D F A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L A S A E
L K A D E K S H A V I L G D T R Y G S E E K G T Y H L
A L F G D R A Q E I A G S A T V K I R A Y K P A Y V D
E K K M V H A A V V G K K V H E I G I A G K Q

2. fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4 (SEQ ID NO. 7)

G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K G L Q S
L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K T Y G N G

D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L
I T L E S G E F Q I Y K Q S H S A V T A F Q I E K I N N
P D K I D S L I N Q R S F L V G D L G G E H T A F N Q L
P S G K A E Y H G K A F S S D D A G G K L T Y T I D F
A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L A S A E L K
A D E K S H A V I L G D T R Y G G E E K G T Y H L A L
F G D R A Q E I A G S A T V K A Y T P A H V V V N N K
V A T H V P A V V G H H E I G I A G K Q

3. fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO. 8)

G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K S L Q S
L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K T Y G N G
D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L
I T L E S G E F Q V Y K Q S H S A L T A L Q T E Q E Q D
P E H S G K M V A K R R F K I G D I A G E H T S F D K
L P K D V M A T Y R G T A F G S D D A G G K L T Y T I
D F A A K Q G H G K I E H L K S P E L N V E L A T A Y
I K P D E K H H A V I S G S V L Y N Q D E K G S Y S L G
I F G G Q A Q E V A G S A E V E A Y T P A Y V D E Q S
K Y H A A V V G K H H I G L A A K Q

4. fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4 (SEQ ID NO. 9)

G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K G L Q S
L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K T Y G N G

D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L
I T L E S G E F Q V Y K Q S H S A L T A F Q T E Q I Q D
S E H S G K M V A K R Q F R I G D I A G E H T S F D K
L P E G G R A T Y R G T A F G S D D A G G K L T Y T I
D F A A K Q G N G K I E H L K S P E L N V D L A A A D
I K P D G K R H A V I S G S V L Y N Q A E K G S Y S L
G I F G G K A Q E V A G S A E V K A Y T P A H V V V N
N K V A T H V P A V V G K R H I G L A A K Q

5. fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO. 10)

G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K G L Q S
L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K T Y G N G
D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L
I T L E S G E F Q V Y K Q S H S A L T A F Q T E Q I Q D
S E H S G K M V A K R Q F R I G D I A G E H T S F D K
L P E G G R A T Y R G T A F G S D D A G G K L T Y T I
D F A A K Q G N G K I E H L K S P E L N V D L A A A D
I K P D G K R H A V I S G S V L Y N Q A E K G S Y S L
G I F G G K A Q E V A G S A E V K A Y T P A Y V D E Q
S K Y H A A V V G K R H I G L A A K Q

【0377】用於測試fHbp-PorA嵌合疫苗的Men B菌株的列表

【0378】使用在H44/76ΔfHbpΔPorA構建體中表現不同fHbp(V1.1、V1.14、V2.19及V3.45)的fHbp同基因型菌

株來測試 fHbp-PorA嵌合疫苗：

A. fHbp表現菌株：

- 1. H44/76ΔfHbpΔPorA::fHbp V1.1
- 2. H44/76ΔfHbpΔPorA::fHbp V1.14
- 3. H44/76ΔfHbpΔPorA::fHbp V2.19
- 4. H44/76ΔfHbpΔPorA::fHbp V3.45

B. PorA表現菌株：

- 1. H44/76ΔfHbpΔPorA::PorA 1.4
- 2. H44/76ΔfHbpΔPorA::PorA 1.9

C. 臨床分離株：

M11.240413(表現 fHbp V1.13及 PorA 1.9)

【 0379 】 以下腦膜炎雙球菌臨床菌株將用於
Oxford/UKHSA處的SBA以測試 fHbp-PorA嵌合疫苗：

序號	菌株分離株ID	表現 fHbp及 PorA的 克隆複合物	PubMLST ID
1	M08 240157	ST-32複合物 (fHbp V1.1、PorA 1.4)	40818
2	M17 240832	ST-41/44複合物 (fHbp V1.14、PorA 1.9)	60604
3	M17 240156	ST-213複合物 (fHbp V3.45、PorA 1.15- 11)	53319
4	M18 240043	ST-269複合物 (fHbp	60955

V2.19、PorA 1.14)

【0380】此外，腦膜炎雙球菌菌株 M15 240912、M16 240272、M15 240460 或任何其他合適的菌株均可用於 SBA。

【0381】根據本發明的另一態樣，提供了因子 H 結合蛋白 (fHbp) 作為表位展示支架的用途。作為表位展示支架的用途可以包括使用包含本文所述的任何修飾的因子 H 結合蛋白 (fHbp)。除了其作為疫苗的潛在用途之外，根據本發明的組成物或經修飾的 fHbps 亦可以用作診斷試劑和作為疫苗的免疫能力的量度。

【0382】本發明的經修飾 fHbp 引發的免疫應答可能影響腦膜炎雙球菌 (Nm) 感染用本發明的經修飾的 fHbp 免疫的受試者的能力。較佳地，阻礙或阻止 Nm 感染用本發明的經修飾的 fHbp 免疫的受試者的能力。所引發的免疫反應可能會識別並摧毀 Nm。

【0383】可替代地或另外地，所引發的免疫應答可阻礙或阻止 Nm 的複製。可替代地或另外地，所引發的免疫應答可阻礙或阻止 Nm 在人類或非人類動物中引起疾病。

【0384】前述對特定實施例的描述充分揭露了本文實施例的一般性質為其他人可以在不脫離一般概念的情況下藉由應用現有知識針對各種應用容易地修改及/或調適此類特定實施例，並且因此此類調適和修改應該且意欲被涵蓋在所揭示的實施例的等效物的含義和範圍內。應當理解的是，本文所採用的措辭或術語是為了描述目的，而不是

限制目的。因此，儘管本文的實施例已以較佳實施例進行了描述，但是本領域技藝人士將認識到，可以在如本文所述實施例的精神和範圍內用修改來實踐本文的實施例。

【0385】貫穿本說明書，字詞「包括」或其變體，諸如「包含」或「含有」，應理解為暗示包含所述的要素、整數或步驟，或要素、整數或步驟的群組，但不排除任何其他要素、整數或步驟，或要素、整數或步驟的群組。

【0386】表述「一或多個」或「至少一個」的使用表明使用一或多個要素或成分或量，因為該用途可以在本發明的實施例中實現期望的目的或結果中的一或多者。

【0387】本說明書中已經包括的對文件、行為、材料、裝置、製品或類似物的任何論述僅僅是為了提供揭示內容的上下文。此不應被視為承認該等事項中的任何一項或全部形成先前技術基礎的一部分，或屬於與本揭露案相關的領域的公知常識，因為其在本申請的優先權日之前的任何地方都已存在。

【0388】對於各種實體參數、尺寸及量給出的數值僅為近似值，並且可以設想，高於指派給該等實體參數、尺寸及量的數值的值亦落入本發明的範圍，除非說明書中聲明相反。

【0389】儘管本文重點強調了較佳實施例的特定特徵，但應當理解的是，可以添加許多額外特徵並且可以在較佳實施例中進行許多改變而不脫離本揭露案的原理。根據本文的揭示內容，本揭露案的較佳實施例中的該等和其

他改變對於本領域技藝人士而言將顯而易見，由此因此應清楚地理解，前述描述性內容應僅解釋為對本揭露案的說明，而非限制。

技術優點：

【0390】1. 本發明提供了一種用於製造有效的腦膜炎雙球菌疫苗的高效平臺製程，該疫苗滿足多項標準，包括提高的免疫原性、安全性及可負擔性。

【0391】2. 本發明提供了一種開發及優化上游生物製程以增加領先細胞系的細胞密度和重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的生產力的方法。

【0392】3. 本發明提供了一種開發和優化下游生物製程以便以高產量和高純度生產重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的方法。

【0393】4. 該改進的製劑克服了先前技術的局限性並且表現出低黏度、無聚集；跨寬溫度範圍表現出長期穩定性，間接保留了重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的所需特性，包括高穩定性及免疫原性。

【0394】5. 申請人的新製劑/組成物i)無聚集體和粒子形成、具有更高的滲透壓、優化的 ζ 電位、低黏度；iii)保留了重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的穩定性和免疫原性的所需物理化學和免疫原性特性在2-8℃下達12個月，在25℃下達6個月，在40℃下達30天。

【0395】6. 針對血清群B腦膜炎雙球菌的嵌合抗原

(ChA)。ChA利用fHbp(非脂化的)作為分子支架來呈遞表面暴露的PorA VR2環，此是藉由將VR2環(「10-20個胺基酸的」PorA VR2環而不是「整個PorA蛋白」)插入fHbp中的 β 轉角區域中來實現的。ChA保留了來自fHbp及PorA兩者的表位，並被發現引發針對兩種抗原的功能性免疫應答。VR2環的整合不會改變fHbp的整體架構，並且VR2環會折疊成由殺菌mAb識別的構象。

【0396】7. 可溶且產量高的嵌合蛋白是穩定的，其中fHbp及PorA VR2環均是免疫原性的。

【0397】8. 生成由最普遍的fHbp及PorA抗原構成的嵌合體以最大化疫苗覆蓋率，因為嵌合體組成反映了在給定地理區域內循環的普遍的fHbp及PorA抗原。

【0398】9. 在fHbp中的特定位置處插入PorA環以獲得所需的因子H結合減少(與野生型相比減少了至少10%、至少50%；較佳地>70%)並且分子量在20 kDa至40 kDa範圍內，與此同時保留fHbp及PorA兩者的免疫原性表位(表12)。

表 12：fHbp-PorA 嵌合體		
嵌合體序號	嵌合體的描述	分子量 (kDa)
嵌合體 1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO.1, 6)	20-40
嵌合體 2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO.2, 7)	20-40
嵌合體 3	fH bpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO.3, 8)	20-40
嵌合體 4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO.4,9)	20-40
嵌合體 5	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO.5,10)	20-40

【0399】本發明藉由以下實施例以及實施例組合進行更詳細的說明，該等實施例和實施例組合源自對應的依賴性參考和鏈接：

- I. 一種經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)，其包含野生型fHbp變體及至少一個外源胜肽環，其中
 - a. 該經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)選自與序列SEQ ID No. 6至SEQ ID No. 10中的任一者具有至少75%同一性的胺基酸序列，
 - b. 其中該至少一個外源胜肽環係免疫原性的，
 - c. 其中該至少一個外源胜肽環來源於細菌膜蛋白，
 - d. 其中該經修飾的fHbp是融合蛋白，
 - e. 其中該fHbp變體選自v1、v2及v3，經插入到fHbp中的β轉角區中的至少一個包含至少10個胺基酸的PorA環修飾；並且

- f. 其中該 PorA 環選自 VR1、及 VR2。
- II. 如實施例 I 所揭示的經修飾的因子 H 結合蛋白，其中該經修飾的 fHbp 包含野生型 fHbp 變體及至少一個外源性細菌膜蛋白胜肽環，或者其中該經修飾的 fHbp 係融合蛋白。
- III. 如前述實施例中任一者所揭示的經修飾的因子 H 結合蛋白，其中該經修飾的 fHbp 經修飾以降低因子 H 結合活性。
- IV. 一種編碼該經修飾的 fHbp 的核酸序列，其中該核酸序列與序列 SEQ ID NO. 1 至 SEQ ID NO. 5 中的任一者具有至少 75% 的同一性。
- V. 一種免疫原性組成物，其包含至少一種如前述實施例中任一者所揭示的經修飾的 fHbp 或如實施例 IV 所揭示的編碼該經修飾的 fHbp 的核酸序列。
- VI. 如實施例 V 所揭示的免疫原性組成物，其中該組成物包含兩種或更多種不同的經修飾的 fHbp。
- VII. 如前述實施例中任一者所揭示的免疫原性組成物，其中該組成物包含醫藥學上可接受的載劑。
- VIII. 如前述實施例中任一者所揭示的免疫原性組成物，其中該組成物進一步包含佐劑。
- IX. 如前述實施例中任一者所揭示的免疫原性組成

物，其中該組成物進一步包含至少一種其他預防或治療活性分子，該至少一種其他預防或治療活性分子包括單價蛋白:莢膜多糖疫苗。

X. 如前述實施例中任一者所揭示的免疫原性組成物，其中帶有外源胜肽環的該 fHbp 支架被作為該綴合疫苗中的該蛋白載體分子摻入。

XI. 如前述實施例中任一者所揭示的免疫原性組成物，其包含重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白與至少一種選自以下的額外抗原的組合：

- 來自 PorB、Fet A、OmpC、NHBA、NadA、腦膜炎球菌抗原 287、NspA、HmbR、NhhA、App、936 的蛋白抗原，
- 糖類抗原，其來自腦膜炎雙球菌血清群 A、C、W、Y 及/或 X，
- 來自肺炎鏈球菌的糖類抗原，
- 白喉抗原，諸如白喉類毒素，例如 CRM197 突變體，
- 破傷風抗原，諸如破傷風類毒素，
- 來自百日咳桿菌的抗原、無細胞或全細胞百日咳抗原，
- 來自乙型流感嗜血桿菌的糖類抗原，
- 脊髓灰質炎抗原，諸如 IPV，
- 麻疹、腮腺炎及/或風疹抗原，
- 流感抗原，諸如血球凝集素及/或神經胺酸

酶表面蛋白，

- 來自無乳鏈球菌(B群鏈球菌)的抗原(蛋白質或糖)，
- 來自化膿性鏈球菌(A群鏈球菌)的抗原(蛋白質或糖)，
- 來自金黃色葡萄球菌的抗原(蛋白質、糖)，
- 來自沙門氏菌屬種屬的抗原(蛋白質或糖)。

XII. 如前述實施例中任一者所揭示的免疫原性組成物，其中帶有外源胜肽環的該fHbp支架被作為該蛋白質載體分子摻入該多糖綴合物疫苗中，該多糖綴合物疫苗選自單價(A、X、C、W、Y)、二價(A-B、X-B、C-B)、三價(AC-B、AC-Hib)、四價(AC-Hib-B)、五價(ACWYX)、或六價(ACWYX-B)。

XIII. 如實施例I至III中任一者所揭示的經修飾的fHbp、如實施例IV所揭示的核酸、或如實施例V至IX中任一者所揭示的組成物，其用作藥物，或用於治療或預防受試者的病原體感染或定殖。

XIV. 一種如實施例I至III中任一者所揭示的經修飾的fHbp、如實施例IV所揭示的核酸、或如實施例V至IX中任一者所揭示的組成物與至少一種其他預防或治療活性分子的組合。

XV. 如實施例XIII所揭示的組合或如請求項IX所述

之組成物，其中該至少一種其他預防或治療活性分子包括綴合物疫苗，包括選自A、C、Y、W、或X毒株，或其組合的任意血清群莢膜多糖。

XVI. 如實施例XV所揭示的組合或如實施例IX所揭示的組成物，其中該蛋白質:莢膜多糖疫苗包括以下中的任一者：具有細菌類毒素的血清群C或A莢膜、二價疫苗(具有與細菌類毒素綴合的血清群C和A莢膜多糖)、四價(與細菌類毒素綴合的血清群A、C、Y、W多糖)或五價(與細菌類毒素綴合的血清群A、C、Y、W、X多糖)綴合物疫苗。

XVII. 如實施例I至III所揭示的因子H結合蛋白(fHbp)，其如並且當用作表位展示支架時。

XVIII. 一種疫苗製劑，其包含至少一種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白、佐劑以及一或多種醫藥學上可接受的賦形劑，其中該重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白為選自由以下項組成的群組中的至少一種：轉鐵蛋白結合蛋白、奈瑟氏球菌肝素結合蛋白、奈瑟氏球菌表面蛋白A、PorA、腦膜炎球菌腸桿菌素受體FetA、奈瑟氏球菌黏附素A、如前述實施例中任一者所揭示的因子H結合蛋白(fHbp)或其組合。

XIX. 如實施例XVIII中所揭示的疫苗製劑，其中該

重組蛋白是如前述實施例中任一者所揭示的 fHbp，並且其中該 fHbp 來源於腦膜炎雙球菌血清群 A、B、C、H、I、K、L、29E、W135、X、Y 和 Z。

XX. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該重組蛋白是如前述實施例中任一者所揭示的 fHbp，並且其中該 fHbp 來源於腦膜炎雙球菌血清群 B。

XXI. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該重組蛋白是如前述實施例中任一者所揭示的 fHbp，並且其中該 fHbp 的分子量在 10 kDa 至 200 kDa 範圍內，較佳地高達 50 kDa。

XXII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該佐劑選自由以下項組成的群組：氫氧化鋁、磷酸鋁、羥基磷酸鋁、及硫酸鋁鉀、MF-59、脂質體、脂多糖、皂苷、脂質 A、脂質 A 衍生物、單磷醯脂質 A、GLA、3-脫乙酰單磷醯脂質 A、AS01、AS03、AF3、IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L 及 41BBL、寡核苷酸、包含至少一個非甲基化的 CpG 的寡核苷酸及 / 或脂質體的寡核苷酸、弗氏佐劑、弗氏完全佐劑、弗氏不完全佐劑、聚合物、共聚物諸如聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚

物，包括嵌段共聚物、聚合物 p 1005、CRL-8300 佐劑、胞壁醯二胜肽諸如 TLR1/2 激動劑、TLR2 激動劑、TLR3 激動劑、TLR-4 激動劑、TLR5 激動劑、TLR7 激動劑、TLR7/8 激動劑、TLR8 激動劑、TLR9 激動劑、ODN 2216(A 型)激動劑、TLR11/12、TLR-4 激動劑、鞭毛蛋白、源自革蘭氏陰性細菌的鞭毛蛋白、TLR-5 激動劑、能夠與 TLR-5 受體結合的鞭毛蛋白的片段、 α -C-半乳糖苷基神經醯胺、幾丁質、介白素-2、QS-21、角鯊烯、Quil A、霍亂毒素 B 亞基、聚磷腈及其衍生物、分枝桿菌細胞壁製備物、黴菌酸衍生物、非離子嵌段共聚物表面活性劑、OMV，fHbp、皂苷與固醇及脂質的組合、dmLT、1,25-二羥基維生素 D3、CAF01、聚[二(羧基合苯氧基)-磷腈](PCPP)及委內瑞拉馬腦炎(VEE)複製子粒子或其組合。

XXIII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該佐劑係粒徑 >500 nm 的氫氧化鋁。

XXIV. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該一或多種醫藥學上可接受的賦形劑係

- a. 緩衝劑，其選自碳酸鹽、磷酸鹽、醋酸鹽、HEPES、琥珀酸鹽、TRIS、硼酸鹽、檸檬酸鹽、乳酸鹽、葡糖酸鹽、酒石酸鹽或其組

合；

- b. 糖，其選自海藻糖、甘露糖、棉子糖、乳糖酸、葡萄糖、麥芽酮糖、異麥芽酮糖、麥芽糖、乳糖、右旋糖、果糖或其組合；
- c. 糖醇或多元醇，其選自甘露醇、乳糖醇、山梨醇、甘油、木糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、赤蘚糖醇、異麥芽酮糖醇和氫化澱粉水解物或其組合；
- d. 表面活性劑，其選自：聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 60、聚山梨醇酯 65、聚山梨醇酯 85、壬基苯氧基聚乙氧基乙醇、辛基苯氧基聚乙氧基乙醇、辛苯聚醇 40、壬苯醇醚-9、三乙醇胺、三乙醇胺多胜肽油酸酯、聚氧乙烯-660羥基硬脂酸酯、聚氧乙烯-35蓖麻油酸酯、大豆卵磷脂、泊洛沙姆、環氧乙烷(EO)、環氧丙烷(PO)及/或環氧丁烷(BO)的共聚物、辛苯聚醇、磷脂、壬基酚聚氧乙烯醚、衍生自月桂醇、鯨蠟醇、硬脂醇及油醇的聚氧乙烯脂肪醚、脫水山梨醇酯或其組合；
- e. 聚合物，其選自葡聚糖、羧甲基纖維素、透明質酸、環糊精或其組合；
- f. 鹽，其選自 NaCl 、 KCl 、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCl_2 、 MgCl_2 或其組合；

- g. 胺基酸，其選自三(羥甲基)甲基甘氨酸、亮氨酸、異亮氨酸、甘氨酸、穀胺醯胺、L-精氨酸、L-精氨酸鹽酸鹽、離氨酸、L-丙氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、纈氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、絲氨酸、蘇氨酸或其組合；
- h. 水解蛋白，其選自明膠、乳清蛋白水解物、麩胺酸鈉、膠原蛋白水解物、角蛋白水解物、胜肽、酪蛋白水解物、乳清蛋白水解物、血清白蛋白或其組合；
- i. 防腐劑，其選自苯氧乙醇、苯索寧氯鹽(苯紫氯銨)、苯酚、間甲酚、硫柳汞、甲醛、對羥基苯甲酸酯、苯索寧氯鹽、苯甲醇、氯丁醇、對氯間甲酚、苯甲醇或其組合；以及
- j. 液體載體，其選自注射用水(WFI)或鹽水。

XXV. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該疫苗製劑包含：

- 如前述請求項中任一項所述之至少一種重組蛋白/至少一種經修飾的fHbp；
- 氫氧化鋁；
- 甘露醇；
- 磷酸鹽；以及
- 聚山梨醇酯。

XXVI. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其

中該疫苗製劑包含：

- 與胺基酸序列SEQ ID NO. 6至SEQ ID NO. 10中的任一者具有至少75%的同一性的胺基酸序列的至少一種經修飾的fHbp；或
- 編碼與核酸序列SEQ ID NO. 1至SEQ ID NO. 5中的任一者具有至少75%的同一性的核酸序列的至少一種經修飾的fHbp；以及
- 氫氧化鋁；
- 甘露醇；
- 磷酸鹽；以及
- 聚山梨醇酯。

XXVII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含(i)至少一種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；(ii)量在0.5 mg/ml至4.5 mg/ml的範圍中的氫氧化鋁；(iii)量在5 mg/ml至100 mg/ml的範圍中的甘露醇；(iv)量在1 mM至10 mM的範圍中的磷酸鹽緩衝液；以及(v)量在0.01 mg/ml至2 mg/ml的範圍中的聚山梨醇酯20；其中每種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白以在15 µg/ml至150 µg/ml範圍內的量存在。

XXVIII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含(i)至少兩種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；(ii)量在0.5 mg/ml至4.5 mg/ml的範圍中的氫氧化鋁；(iii)量在5 mg/ml至100 mg/ml

的範圍中的甘露醇；(iv)量在1 mM至10 mM的範圍中的磷酸鹽緩衝液；以及(v)量在0.01 mg/ml至2 mg/ml的範圍中的聚山梨醇酯20；其中每種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白以在15 µg/ml至150 µg/ml範圍內的量存在。

XXIX. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含(i)至少三種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；(ii)量在0.5 mg/ml至4.5 mg/ml的範圍中的氫氧化鋁；(iii)量在5 mg/ml至100 mg/ml的範圍中的甘露醇；(iv)量在1 mM至10 mM的範圍中的磷酸鹽緩衝液；以及(v)量在0.01 mg/ml至2 mg/ml的範圍中的聚山梨醇酯20；其中每種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白以在15 µg/ml至150 µg/ml範圍內的量存在。

XXX. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含(i)至少四種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；(ii)量在0.5 mg/ml至4.5 mg/ml的範圍中的氫氧化鋁；(iii)量在5 mg/ml至100 mg/ml的範圍中的甘露醇；(iv)量在1 mM至10 mM的範圍中的磷酸鹽緩衝液；以及(v)量在0.01 mg/ml至2 mg/ml的範圍中的聚山梨醇酯20；其中每種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白以在15 µg/ml至150 µg/ml範圍內的量存在。

XXXI. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，

其中該疫苗製劑包含：

- 與胺基酸序列SEQ ID NO. 6至SEQ ID NO. 10中的任一者具有至少75%的同一性的胺基酸序列的至少一種經修飾的fHbp；或
- 編碼與核酸序列SEQ ID NO. 1至SEQ ID NO. 5中的任一者具有至少75%的同一性的核酸序列的至少一種經修飾的fHbp；及
- 氫氧化鋁，其量在0.5 mg/ml至4.5 mg/ml的範圍內；
- 甘露醇，其量在5 mg/ml至100 mg/ml的範圍內；
- 磷酸鹽緩衝液，其量在1 mM至10 mM的範圍內；以及
- 聚山梨醇酯20，其量在0.01 mg/ml至2 mg/ml的範圍內。

XXXII.如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含：

- a. fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(為SEQ ID NO. 6，或由SEQ ID NO. 1編碼)，其量在15 µg/ml至150 µg/ml的範圍內；或
- b. fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(為SEQ ID NO. 7，或由SEQ ID NO. 2編碼)，其量在15 µg/ml至150 µg/ml的範圍內；或
- c. fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(為SEQ ID NO.

- 8，或由SEQ ID NO. 3編碼)，其量在15 $\mu\text{g/ml}$ 至150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；或
- d. fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(為SEQ ID NO. 9，或由SEQ ID NO. 4編碼，其量在15 $\mu\text{g/ml}$ 至150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；以及
- e. 氫氧化鋁，其量在0.5 mg/ml至4.5 mg/ml的範圍內；
- f. 甘露醇，其量在5 mg/ml至100 mg/ml的範圍內；
- g. 磷酸鹽緩衝液，其量在1 mM至10 mM的範圍內；以及
- h. 聚山梨醇酯20，其量在0.01 mg/ml至2 mg/ml的範圍內。

XXXIII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含：

- a. fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 6，或由SEQ ID NO. 1編碼)，其量在15 $\mu\text{g/ml}$ 至150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；
- b. fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 7，或由SEQ ID NO. 2編碼)，其量在15 $\mu\text{g/ml}$ 至150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；
- c. fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 8，或由SEQ ID NO. 3編碼)，其量在15 $\mu\text{g/ml}$ 至150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；

- d. fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 4 或 SEQ ID NO. 9)，其量在 15 $\mu\text{g/ml}$ 至 150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；
- e. 氫氧化鋁，其量在 0.5 mg/ml 至 4.5 mg/ml 的範圍內；
- f. 甘露醇，其量在 5 mg/ml 至 100 mg/ml 的範圍內；
- g. 磷酸鹽緩衝液，其量在 1 mM 至 10 mM 的範圍內；以及
- h. 聚山梨醇酯 20，其量在 0.01 mg/ml 至 2 mg/ml 的範圍內。

XXXIV. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含：

- a. fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 6，或由 SEQ ID NO. 1 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/mL}$ 至 150 $\mu\text{g/mL}$ 的範圍內；或
- b. fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 7，或由 SEQ ID NO. 2 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/mL}$ 至 150 $\mu\text{g/mL}$ 的範圍內；或
- c. fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(為 SEQ ID NO. 10，或由 SEQ ID NO. 5 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/mL}$ 至 150 $\mu\text{g/mL}$ 的範圍內；或
- d. fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(為 SEQ ID NO. 8，或由 SEQ ID NO. 3 編碼)，其量在 15

$\mu\text{g/mL}$ 至 $150\ \mu\text{g/mL}$ 的範圍內；以及

- e. 氫氧化鋁，其量在 $0.5\ \text{mg/mL}$ 至 $4.5\ \text{mg/mL}$ 的範圍內；
- f. 甘露醇，其量在 $5\ \text{mg/mL}$ 至 $100\ \text{mg/mL}$ 的範圍內；
- g. 磷酸鹽緩衝液，其量在 $1\ \text{mM}$ 至 $10\ \text{mM}$ 的範圍內；以及
- h. 聚山梨醇酯 20，其量在 $0.01\ \text{mg/mL}$ 至 $2\ \text{mg/mL}$ 的範圍內。

XXXV. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含：

- a. fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 6，或由 SEQ ID NO. 1編碼)，其量在 $15\ \mu\text{g/mL}$ 至 $150\ \mu\text{g/mL}$ 的範圍內；
- b. fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 7，或由 SEQ ID NO. 2編碼)，其量在 $15\ \mu\text{g/mL}$ 至 $150\ \mu\text{g/mL}$ 的範圍內；
- c. fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(為 SEQ ID NO. 10，或由 SEQ ID NO. 5編碼)，其量在 $15\ \mu\text{g/mL}$ 至 $150\ \mu\text{g/mL}$ 的範圍內；或
- d. fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 8，或由 SEQ ID NO. 3編碼)，其量在 $15\ \mu\text{g/mL}$ 至 $150\ \mu\text{g/mL}$ 的範圍內；
- e. 氫氧化鋁，其量在 $0.5\ \text{mg/mL}$ 至 $4.5\ \text{mg/mL}$ 的

範圍內；

- f. 甘露醇，其量在 5 mg/mL至 100 mg/mL的範圍內；
- g. 磷酸鹽緩衝液，其量在 1 mM至 10 mM的範圍內；以及
- h. 聚山梨醇酯 20，其量在 0.01 mg/mL至 2 mg/mL的範圍內。

XXXVI. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該製劑含量在 1 mg/mL至 10 mg/ml範圍內的 2-苯氧乙醇。

XXXVII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該疫苗組成物在 2-8℃、25℃ 和 40℃ 下穩定達六個月的時段。

XXXVIII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其 ζ 電位在 -16 V至 -30 V的範圍內；滲透重量莫耳濃度在 200 Osmol/kg 至 500 Osmol/kg的範圍內。

XXXIX. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其進一步包含一或多種選自以下的抗原：白喉類毒素(D)、破傷風類毒素(T)、全細胞百日咳(wP)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、流感嗜血桿菌b PRP-載體蛋白綴合物(Hib)、流感嗜血桿菌(a、c、d、e、f血清型及無莢膜毒株)、腦膜炎雙球菌A抗

原、腦膜炎雙球菌C抗原、腦膜炎雙球菌W-135抗原、腦膜炎雙球菌Y抗原、腦膜炎雙球菌X抗原、肺炎鏈球菌抗原、腦膜炎雙球菌B胞疹或純化抗原、金黃色葡萄球菌抗原、炭疽、BCG、肝炎(A、C、D、E、F及G毒株)抗原、人乳頭瘤病毒、HIV、傷寒沙門氏菌抗原、無細胞百日咳、經修飾的腺苷酸環化酶、瘧疾抗原(RTS,S)、麻疹、腮腺炎、風疹、登革熱、寨卡病毒、埃博拉病毒、基孔肯雅熱病毒、日本腦炎、輪狀病毒、腹瀉抗原、黃病毒、天花、黃熱病、帶狀胞疹、水痘病毒抗原、及其組合。

XL. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含(i)至少一種包含穩定的非功能性/非脂化的fHbp及PorA VR2環的融合蛋白，以及(ii)至少一種多糖-蛋白質綴合物。

XLI. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白與選自BEXSERO、MENVEO、MENACTRA、NIMENRIX、MenQuadFi、MENFIVE、MenAfriVac、Men AC、及Men ACHib中的一或多種疫苗共施用。

XLII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製

劑，其中該重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白與MENFIVE共施用。

XLIII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含i)至少一種融合蛋白，其包含穩定的非功能性/非脂化的fHbp及PorA VR2環以及至少一種選自以下的綴合物：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

XLIV. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含i)至少兩種融合蛋白，每種融合蛋白由一種與一個PorA VR2環偶聯的fHbp變體類型及至少一種選自以下的綴合物組成：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197

的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

XLV. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含i)至少三種融合蛋白，每種融合蛋白由一種與兩個PorA VR2環偶聯的fHbp變體類型及至少一種選自以下的綴合物組成：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

XLVI. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其包含i)至少四種融合蛋白，每種融合蛋白由一種與三個PorA VR2環偶聯的fHbp變體類型及至少一種選自以下的綴合物組成：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197

的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

XLVII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其用於治療或預防由腦膜炎雙球菌血清群B引起的感染及/或疾病。

XLVIII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該疫苗製劑闡明瞭針對淋病雙球菌菌株和腦膜炎雙球菌血清群ACWYX的交叉保護。

XLIX. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中該重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白至佐劑上的吸附百分比在70%至100%的範圍內。

L. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中fHbp V3.45 M5 PorA 316-320 exP1.14到佐劑上的吸附百分比在80%至100%的範圍內。

LI. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中fHbp V1.14 PorA 307-311 exP1.9在佐劑上的吸附百分比在80%至90%的範圍內。

LII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中fHbp V2.19 PorA 316-320 exP1.4在佐劑上的吸附百分比在80%至90%的範圍

內。

LIII. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中fHbp V1.1 PorA 307-311 exP1.4在佐劑上的吸附百分比在80%至90%的範圍內。

LIV. 如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑，其中fHbp V1.1 PorA 307-311 exP1.9在佐劑上的吸附百分比在70%至80%的範圍內。

LV. 一種製造如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑的方法，該方法包括以下步驟：

- a. 在營養培養基中培養包含表現載體的宿主細胞；
- b. 誘導該等宿主細胞表現蛋白質；
- c. 收穫並分離該等宿主細胞；
- d. 裂解該等收穫的細胞並分離宿主細胞碎片以獲得帶標籤蛋白；
- e. 純化該等帶標籤蛋白；
- f. 從該等帶標籤蛋白中移除標籤以獲得重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；
- g. 純化該等重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；以及
- h. 製備包含該等純化重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的疫苗製劑。

- LVI. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中該宿主細胞是細菌表現宿主系統。
- LVII. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中該細菌表現宿主系統是選自由以下項組成的群組的大腸桿菌菌株：BL21 (DE3)、BL21 (DE3) pLysS*、BL21 (DE3) pLysE*、BL21 star (DE3)、BL21-A1、BLR (DE3)、HMS174 (DE3)**、Tuner (DE3)、Origami2 (DE3)**、Rosetta2 (DE3)*、Rosetta2 (DE3)、Lemo21 (DE3)*、T7 Express、m15 pREP4*、C41(DE3)、C43(DE3)或B834(DE3)。
- LVIII. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中該營養培養基選自未定義的培養基、Terrific肉湯(TB)培養基、Lysogenia肉湯、Luria肉湯或Luria-Bertani培養基、化學上明確的培養基、M9最小培養基、化學上明確的M9改良鹽培養基、2xYT培養基或具有分解代謝抑制的超級最佳肉湯(SOC)培養基及其組合。
- LIX. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中步驟(a)中宿主細胞的生長期間L-甲硫氨酸的濃度維持在1 mM至10 mM範圍內，其中該發酵為補料分批模式。
- LX. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中該等宿主細胞在以下條件下生長：在35℃至

39°C 的範圍內的溫度；在 5.0 至 9.0 的範圍內的 pH；在 10% 至 100% 的範圍內的溶解氧；在 100-1800 rpm 的範圍內的攪動；在 0-2 氣體體積/單位體積液體/分鐘 (VVM) 內的氣體流率。

- LXI. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中使用選自乳糖及其不可水解類似物異丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷 (IPTG) 的誘導劑來誘導宿主細胞。
- LXII. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中乳糖的濃度在 1 g/L 至 50 g/L 的範圍內，並且 IPTG 的濃度在 1 mM 至 10 mM 的範圍內。
- LXIII. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中使用選自化學模式、生物模式、實體模式、機械模式及其組合的方法來裂解宿主細胞。
- LXIV. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中使用化學模式和機械模式的組合來裂解宿主細胞。
- LXV. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中使用 pH 在 7 至 9 範圍內的裂解緩衝液裂解宿主細胞，然後在 1000-1500 巴範圍內的壓力下進行機械裂解，進行 3 至 8 個循環。
- LXVI. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中使用均質機進行機械裂解。
- LXVII. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中

使用層析步驟純化步驟(e)中的該帶標籤蛋白，然後進行濃縮及滲濾。

LXVIII. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中使用蛋白質:TEV蛋白酶比率在5:1至30:1範圍內的TEV蛋白酶移除該等標籤。

LXIX. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中使用層析步驟純化步驟(g)中的該重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白，然後進行濃縮及滲濾。

LXX. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中該層析法選自柱層析法、離子交換層析法、陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、柱層析法、快速層析法、凝膠過濾/尺寸排阻/凝膠滲透(分子篩)層析法、親和層析法、紙層析法、薄層層析法、氣相層析法、染料-配體層析法、疏水相互作用層析法、擬親和層析法、液相層析法、高壓液相層析法(HPLC)、固定化的金屬親和層析法、陰離子交換層析法、陽離子交換層析法、多模式層析法、多模式陰離子交換層析法、靜電相互作用層析法、氫鍵層析法、反相層析法及其組合。

LXXI. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中該等帶標籤蛋白作為包涵體(IB)表現並藉由蛋白質的尿素解折疊和蛋白質的柱上重折疊

進行純化。

LXXII. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中該疫苗製劑藉由以下方式製備：將個別重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白吸附到佐劑上，然後添加到包含糖醇、緩衝劑、穩定劑及液體載體的賦形劑混合物中。

LXXIII. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中該賦形劑混合物包含防腐劑。

LXXIV. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中該TEV蛋白酶藉由包括以下步驟的方法產生：

- a. 在營養培養基中培養包含表現載體的宿主細胞；
- b. 誘導宿主細胞表現TEV蛋白酶；
- c. 收穫並分離該等宿主細胞；
- d. 裂解該等收穫的宿主細胞並分離該等宿主細胞以獲得TEV蛋白酶；以及
- e. 純化該TEV蛋白酶；以及
- f. 濃縮、滲濾和儲存該純化的TEV蛋白酶。

LXXV. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中該用於表現TEV蛋白酶的宿主細胞是選自由以下項組成的群組的大腸桿菌菌株：BL21 (DE3)、BL21 (DE3) pLysS*、BL21 (DE3) pLysE*、BL21 star (DE3)、BL21-A1、BLR

(DE3)、HMS174 (DE3)**、Tuner (DE3)、Origami2 (DE3)**、Rosetta2 (DE3)*、Rosettagami (DE3)、Lemo21 (DE3)*、T7 Express、m15 pREP4*、C41(DE3)、C43(DE3)、Rosetta™(DE3)pLysS 或 B834(DE3)。

LXXVI. 如前述實施例中任一者所揭示的方法，其中當 590/600 nm 下的 OD 為 20-100 時，停止葡萄糖進料並開始甘油進料，並藉由在補料分批模式下添加及/或維持 1-50 g/L 的乳糖來誘導培養。

LXXVII. 一種藉由向個體施用如前述實施例中任一者所揭示的疫苗製劑來在該個體中誘導針對腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫應答的方法，其中該施用步驟誘導針對腦膜炎雙球菌血清群 B 菌株的免疫應答。

實例

【0400】上述實施例的描述僅提供用於說明目的，並非旨在限制本揭露案的範疇。特定實施例的各個部件通常不限於該特定實施例，而是可互換的。該等變化不應被視為脫離本揭露案，並且所有此類修改均被視為在本揭露案的範疇內。

【0401】本發明將根據以下實施例作進一步描述，該

等實施例僅闡述用於說明目的，而不應理解為限制本揭露案的範圍。

【0402】 用於製造根據本揭露案的疫苗製劑的方法包括以下主要步驟，該等主要步驟將在後面段落中進一步詳細說明：

- 在營養培養基中培養包含表現載體的宿主細胞；
- 誘導該等宿主細胞表現蛋白質；
- 收穫並分離該等宿主細胞；
- 裂解該等收穫的細胞並分離宿主細胞碎片以獲得帶標籤蛋白；
- 純化該等帶標籤蛋白；
- 從該等帶標籤蛋白中移除標籤以獲得重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；
- 純化該等重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；
- 製備包含該等純化重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的疫苗製劑。

實例 1：帶標籤fHbp蛋白和TEV蛋白酶的表现

【0403】 本揭露案中所用的生物資源的來源：

- 1) **宿主細胞**：使用大腸桿菌B834(DE3)來表現重組蛋白；目錄號D48175，Sigma Aldrich(從Oxford University轉移至Serum Institute of India Pvt. Ltd.)
- 2) **質粒***：pET-28a(+) DNA；目錄號D48556，EMD Millipore(從Oxford University轉移至Serum

Institute of India Pvt. Ltd.)

3) 宿主細胞：使用 Rosetta™(DE3)pLysS 感受態細胞來表現 TEV 蛋白酶；目錄號 D49062，Sigma Aldrich

4) 質粒*：pET-28a(+) DNA；目錄號 D48556，EMD Millipore(從 Oxford University 轉移至 Serum Institute of India Pvt. Ltd.)

(*感興趣的基因被克隆/插入到 pET-28a(+)質粒的主鏈中)

1A：帶標籤的 fHbp 蛋白的表現

【0404】從 University of Oxford 收到了 33 個表現 fHbp-porA 嵌合蛋白的克隆構建體。在所收到的 33 個克隆中的 24 個克隆進行了蛋白質表現篩選，其細節提供在表 3 中。在篩選出的 24 個克隆中，基於分子和生化表徵最終確定了 5 個克隆用於表 13 所列的疫苗製劑。重組蛋白 / 經修飾的 fHbp 融合蛋白和 TEV 蛋白酶的序列表提供在表 13a 中。

表 13：用於疫苗配製的克隆	
序號	最終確定用於疫苗配製的克隆
1	fHbp V3.45 M5:PorA ^{316-320/exP1.14}
2	fHbp V2.19 M6:PorA ^{316-320/exP1.4}
3	fHbp V1.14:PorA ^{307-311/exP1.9}
4	fHbp V1.1:PorA ^{307-311/exP1.4}
5	fHbp V1.1:PorA ^{307-311/exP1.9}

表 13a：重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白和 TEV 蛋白酶的序列表			
Seq Id No	名稱	鹼基對長度	類型
1	HIS-MBP-TEV-fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14 (SEQ ID NO. 1)	1968	核酸
2	HIS-MBP-TEV-fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4 (SEQ ID NO. 2)	1956	核酸
3	HIS-MBP-TEV-fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO. 3)	1950	核酸
4	HIS-MBP-TEV-fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4 (SEQ ID NO. 4)	1959	核酸
5	HIS-MBP-TEV-fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO. 5)	1950	核酸
6	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14 (SEQ ID NO. 6)	270	胺基酸
7	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4 (SEQ ID NO. 7)	266	胺基酸
8	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO. 8)	264	胺基酸
9	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4 (SEQ ID NO. 9)	267	胺基酸
10	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO. 10)	264	胺基酸
11	HIS GST TEV 蛋白酶	1395	核酸
12	HIS GST TEV 蛋白酶	464	胺基酸

【 0405 】 用於表現 fHbp 帶標籤蛋白的表現載體是 pET28a-His-MBP-TEV-fHbp-PorA。下表 14 和第 1 圖至第 5 圖中提供了載體圖和核苷酸序列的細節。

表 14：用於表現 fHbp 帶標籤蛋白的克隆的載體圖和核苷酸序列		
克隆	載體圖	核苷酸序列
fHbp V3.45 M5:PorA ^{316-320/exP1.14}	第 1 圖	SEQ ID NO.1
fHbp V2.19 M6:PorA ^{316-320/exP1.4}	第 2 圖	SEQ ID NO.2
fHbp V1.14:PorA ^{307-311/exP1.9}	第 3 圖	SEQ ID NO.3
fHbp V1.1:PorA ^{307-311/exP1.4}	第 4 圖	SEQ ID NO.4
fHbp V1.1:PorA ^{307-311/exP1.9}	第 5 圖	SEQ ID NO.5

【 0406 】 fHbp 帶標籤蛋白的生產是在 10 L 規模發酵批次中進行的。表 15 至表 19 中提供了所用培養基的細節。

【 0407 】 用於培養基和進料製備的儲備溶液：

- 1)基礎溶液：14%胺水溶液
- 2)酸性溶液：6%正磷酸
- 3)消泡溶液：10%消泡劑 (STRUKTOL® J 673 A)

表 15：微量元素溶液(TES)的組成		
序號	組分	量(每升)
1	七水硫酸亞鐵	2.8 g
2	一水硫酸錳	2.68 g
3	六水氯化鈷	1.42 g
4	二水氯化鈣	1.5 g
5	五水硫酸銅	0.18 g
6	七水硫酸鋅	0.3 g
7	鹽酸	87 mL

表 16：種子培養基的組成		
序號	組分	量(每升)
1	葡萄糖一水合物	10 g
2	磷酸氫二鉀	15 g
3	磷酸二氫鉀	7.5 g
4	檸檬酸	2.0 g
5	硫酸銨	2.5 g
6	七水硫酸鎂	1.4 g
7	微量元素溶液	10 mL
8	鹽酸硫胺素	10 mg
9	L-甲硫胺酸	750 mg
種子培養基的最終 pH 為 7.0±0.2		

表 17：發酵培養基的組成		
序號	組分	量(每升)
1	葡萄糖一水合物	20 g
2	甘油	2 g
3	磷酸氫二鉀	15 g
4	磷酸二氫鉀	7.5 g
5	檸檬酸	2.0 g
6	硫酸銨	2.5 g
7	七水硫酸鎂	1.4 g
8	微量元素溶液	10 mL
9	鹽酸硫胺素	10 mg
10	L-甲硫胺酸	750 mg*
發酵培養基的最終 pH 為 7.0±0.2		
*750 mg/ L 的 L-甲硫胺酸相當於 5 mM 的 L-甲硫胺酸		

【 0408 】 進料溶液的詳情：

【 0409 】 甲硫胺酸儲備溶液：45 mg/mL 的 L-甲硫胺酸溶液

表 18：葡萄糖進料		
序號	組分	量(每升)
1	葡萄糖一水合物	500 g
2	七水硫酸鎂	24.6 g
3	鹽酸硫胺素	70 mg
4	微量元素溶液	15 mL

表 19：甘油進料		
序號	組分	量(每升)
1	甘油	500 g
2	七水硫酸鎂	24.6 g
3	鹽酸硫胺素	70 mg
4	微量元素溶液	15 mL

【 0410 】 誘導劑：乳糖一水化合物溶液

【0411】第7圖中提供了用於生產帶標籤fHbp蛋白的10 L規模發酵批次的種子開發過程。第8圖中提供了用於在0 L規模發酵罐中生產帶標籤fHbp蛋白的過程。

【0412】每個帶標籤fHbp蛋白都按照第7圖第8圖中所提供的過程單獨生長。

【0413】在從細胞裂解物中純化帶標籤蛋白期間，遇到了克隆fHbp V3.45 M5: PorA^{316-320/exP1.14}及fHbp V2.19 M6: PorA^{316-320/exP1.4}的蛋白質沉澱。為瞭解決此問題，在發酵過程期間，在誘導時，溫度設定點從37℃偏移至33℃。

【0414】溫度變化的影響在以下給出：

克隆fHbp V2.19 M6：PorA^{316-320/exP1.4}：

- 低溫誘導(33℃)導致帶標籤fHbp蛋白大部分以可溶形式表現。
- 將溫度降低4℃解決了下游加工期間蛋白質沉澱的問題。

克隆fHbp V3.45 M5:PorA^{316-320/exP1.14}：

- 低溫誘導(33℃)導致帶標籤fHbp蛋白大部分以可溶形式表現。
- 雖然該問題在一定程度上得到瞭解決，但在下游加工期間該問題仍然存在。

【0415】第9a圖至第9h圖中提供了10 L規模發酵批次中帶標籤fHbp蛋白的生長概況以及SDS PAGE凝膠圖像。

第 9a 圖 及 第 9b 圖 分 別 圖 示 了 fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14 (SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)在 10 L 規 模 發 酵 批 次 中 的 生 長 概 況 和 SDS PAGE凝 膠 圖 像 ； 第 9c圖 和 第 9d 圖 分 別 圖 示 了 fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)在 10 L 規 模 發 酵 批 次 中 的 生 長 概 況 和 SDS PAGE凝 膠 圖 像 ； 第 9e 圖 和 第 9f圖 分 別 圖 示 了 fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)在 10 L 規 模 發 酵 批 次 中 的 生 長 概 況 和 SDS PAGE凝 膠 圖 像 ； 並 且 第 9g 圖 和 第 9h 圖 分 別 圖 示 了 fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 9)在 10 L 規 模 發 酵 批 次 中 的 生 長 概 況 和 SDS PAGE凝 膠 圖 像 。

【 0416】 從 SDS PAGE分 析 (第 9b圖 、 9d圖 、 第 9f圖 和 第 9h圖)可 以 看 出 ， 所 有 重 組 帶 標 籤 fHbp蛋 白 (60 kDa至 80 kDa)的 大 部 分 以 可 溶 形 式 表 現 。

1B：TEV蛋白酶的表現

【 0417】 用 於 表 現 TEV蛋 白 酶 的 表 現 載 體 是 His-Gst-TEV蛋 白 酶 (pET28a) (Kan/氯 黴 素)。 以 下 在 表 20和 附 圖 中 提 供 了 載 體 圖 和 核 苷 酸 序 列 的 細 節 。

表 20：用於表現 TEV 蛋白酶的克隆的載體圖和核苷酸序列		
克隆	載體圖	核苷酸序列
HIS-GST-TEV 蛋白酶	第 6 圖	SEQ ID NO. 11

【 0418】 TEV蛋 白 酶 生 產 是 以 10 L 規 模 發 酵 批 次 進 行

的。表 21 至表 24 中提供了所用培養基的細節。

【0419】用於培養基和進料製備的儲備溶液：

- 1)基礎溶液：14%胺水溶液
- 2)酸性溶液：6%正磷酸
- 3)消泡溶液：10%消泡劑 (STRUKTOL® J 673 A)

表 21：微量元素溶液(TES)的組成		
序號	組分	量(每升)
1	七水硫酸亞鐵	2.8 g
2	一水硫酸錳	2.68 g
3	六水氯化鈷	1.42 g
4	二水氯化鈣	1.5 g
5	五水硫酸銅	0.18 g
6	七水硫酸鋅	0.3 g
7	鹽酸	87 mL

表 22：種子培養基的組成		
序號	組分	量(每升)
1	葡萄糖一水合物	10 g
2	磷酸氫二鉀	15 g
3	磷酸二氫鉀	7.5 g
4	檸檬酸	2.0 g
5	硫酸銨	2.5 g
6	七水硫酸鎂	1.4 g
7	微量元素溶液	10 mL
8	鹽酸硫胺素	10 mg
9	L-甲硫胺酸	750 mg
10	硫酸卡那黴素	50 mg
種子培養基的最終 pH 為 7.0±0.2		

表 23：發酵培養基的組成		
序號	組分	量(每升)
1	葡萄糖一水合物	20 g
2	磷酸氫二鉀	15 g
3	磷酸二氫鉀	7.5 g
4	檸檬酸	2.0 g
5	硫酸銨	2.5 g
6	七水硫酸鎂	1.4 g
7	微量元素溶液	10 mL
8	鹽酸硫胺素	10 mg
9	L-甲硫胺酸	750 mg*
10	硫酸卡那黴素	50 mg
發酵培養基的最終 pH 為 7.0±0.2		
*750 mg/ L 的 L-甲硫胺酸相當於 5 mM 的 L-甲硫胺酸		

【 0420】 進料溶液詳情 -

【 0421】 L-甲硫胺酸儲備溶液：45 mg/mL 的 L-甲硫胺酸溶液

表 24：葡萄糖進料		
序號	組分	量(每升)
1	葡萄糖一水合物	500 g
2	七水硫酸鎂	24.6 g
3	鹽酸硫胺素	70 mg
4	微量元素溶液	15 mL
4	硫酸卡那黴素	50 mg

【 0422】 誘導劑 -IPTG 溶液

【 0423】 第 10 圖中提供了用於生產 TEV 蛋白酶的 10 L 規模發酵批次的種子開發過程。第 11 圖中提供了用於在 10 L 規模發酵罐中生產 TEV 蛋白酶的過程。

【 0424】 從細胞裂解物中純化 TEV 蛋白酶期間，遇到

了蛋白質沉澱。為瞭解決此問題，在發酵過程期間，在誘導時，將溫度設定點從 37°C 偏移 20°C，亦即在 20°C 下用 IPTG 誘導培養 12-16 小時。

【0425】溫度變化的影響在以下給出：

- 低溫誘導 (20°C) 導致 TEV 蛋白大部分以可溶形式表現。
- 低溫誘導 (20°C) 解決了下游加工期間蛋白質沉澱的問題。
- 由於培養是在 20°C 下誘導的，所以誘導時間延長到 12-16 小時。

【0426】第 12a 圖和第 12b 圖中分別提供了 TEV 蛋白酶在 10 L 規模發酵批次中的生長概況以及 SDS PAGE 凝膠圖像。從 SDS PAGE 分析 (第 12b 圖) 可以看出，TEV 蛋白酶大部分 (50 kDa) 以可溶形式表現。

實例 2：帶標籤 fHbp 蛋白和 TEV 蛋白酶的純化

【0427】使用以下一般步驟以任意順序對實例 1 中獲得的所收穫的細胞進行純化：

- 藉由化學和機械手段裂解細胞；
- 層析分離；
- 一或多個洗滌步驟；
- 蛋白質的洗脫；
- 蛋白質的濃縮和滲濾
- 儲存蛋白質直至進一步使用。

【0428】若帶標籤蛋白在包涵體(IB)中表現，則需要進行硫酸銨沉澱、蛋白質的尿素解折疊和蛋白質的柱上重折疊的額外步驟。

【0429】以下章節中將詳細闡述純化步驟。進行了用於優化各種參數(諸如，嵌合蛋白、賦形劑等的濃度)研究，其在下面詳細說明。

優化研究：

【0430】進行參數(諸如細胞的機械裂解、以及TEV蛋白酶切割)的優化。

i) 均質機優化：

【0431】將所收穫的大腸桿菌細胞沉澱物(用於表現帶標籤fHbp蛋白和TEV蛋白酶)溶解在裂解緩衝液(25 mM磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl+20 mM咪唑，pH 7.4)中，並將細胞用Panda均質機在1000-1200巴下裂解6個循環。第1個循環在沒有壓力的情況下運行，並且接下來的5個循環在1000-1200巴的壓力下運行。

【0432】每次循環後收集裂解物並使用分光光度計在600 nm處測定光密度。結果在表25中展示。

表 25：每次均質化循環後裂解物的光密度			
序號	均質化循環	600 nm 處的光密度	稀釋
1	重懸	0.930	01:20
2	無壓力	0.898	01:20
3	循環 1(1000-1200 巴)	0.181	01:20
4	循環 2(1000-1200 巴)	0.042	01:20
5	循環 3(1000-1200 巴)	0.024	01:20
6	循環 4(1000-1200 巴)	0.019	01:20
7	循環 5(1000-1200 巴)	0.019	01:20

【 0433 】 結 論 - 僅 在 第 1 個 循 環 中 施 加 壓 力 後 細 胞 懸 浮 液 的 光 密 度 (OD) 降 低 。 到 第 3 個 循 環 時 ， 觀 察 到 OD 進 一 步 減 少 。 第 4 個 循 環 和 第 5 個 循 環 沒 有 顯 示 出 明 顯 的 OD 差 異 。

【 0434 】 考 慮 到 重 懸 樣 本 具 有 100% 活 細 胞 和 0% 裂 解 ， 計 算 所 有 均 質 化 循 環 的 裂 解 百 分 比 ， 並 且 所 得 結 果 在 表 26 和 第 13 圖 中 圖 示 。

表 26：均質化循環的裂解%	
均質化循環	裂解%
重懸	0
無壓力	3.4409
第 1 循環	80.5376
第 2 循環	95.48387
第 3 循環	97.41935
第 4 循環	97.95699
第 5 循環	97.95699

【 0435 】 結 論 - 從 表 26 和 第 13 圖 看 出 ， 在 第 1 循 環 中 實 現 了 約 80% 的 裂 解 ， 並 且 到 第 3 循 環 結 束 時 進 一 步 降 低 至 約 98% 。 因 此 大 腸 桿 菌 細 胞 的 有 效 裂 解 需 要 以 1000-1200 巴

壓力進行的至少/最低3個循環的均質化。

【0436】需注意的是，在本發明方法中，化學裂解和機械裂解都用於破壞細胞。使用具有較高滲透壓的裂解緩衝液進行化學裂解，並且使用細胞均質機進行機械裂解。

【0437】均質機用於大規模(工業/生產規模；模型規模的容量-10 L/Hr至數千 L/Hr)細胞破碎並提供均勻的裂解，而超聲波處理用於小規模(低於100 ml)細胞破碎。

ii) TEV蛋白酶切割過程：

-酶:受質濃度優化：

【0438】使用 His-MBP帶標籤蛋白 (FHBP V1.1: PorA_{307-311/exP1.4})來優化 TEV 蛋白酶:受質濃度(在此受質是帶標籤 fHbp 蛋白)。對於1份 TEV蛋白酶，研究了不同份量的受質 5、10、20、30和40。在輕輕混合下在30℃ 孵育1小時，並收集樣本。按照實例2C，在輕輕混合下在30℃ 進一步孵育相同反應18小時。將 TEV蛋白酶切割反應物上樣到 SDS-PAGE上，並且所得結果在第14a圖和第14b圖中圖示。

【0439】進一步，使用 Biorad凝膠文檔編制系統進行第14b圖的密度量測分析，其中量測條帶的強度，並考慮到1:5比率的100%切割計算所形成的產物的百分比。所得結果圖示在表27和第15圖中。

表 27：TEV 蛋白酶切割反應的密度量測分析			
酶:受質比率	孵育時間	譜帶強度	所形成產物%
1:5	18 小時	1,73,37,698	100
1:10	18 小時	1,69,08,753	97.5
1:20	18 小時	1,64,12,903	94.6
1:30	18 小時	1,40,72,853	81.1
1:40	18 小時	1,32,40,769	76.3

【 0440】 結 論： 從 表 27 和 第 15 圖 看 出， 在 使 用 1:5 和 1:10 的 酶 : 受 質 比 率 孵 育 1 小 時 後， 獲 得 了 更 高 的 切 割 程 度。 然 而， 在 孵 育 18 小 時 後， 觀 察 到 了 1:5、 1:10 和 1:20 的 飽 和， 亦 即 約 95% 及 以 上 的 產 物 形 成。 在 1:30 及 1:40 的 較 高 酶 : 受 質 比 率 下 觀 察 到 了 未 切 割 的 受 質， 產 物 形 成 率 分 別 為 81% 和 76%， 表 明 在 該 等 較 高 的 酶 : 受 質 比 率 下 可 能 需 要 更 長 的 時 間 才 能 完 全 切 割。 因 此， 發 現 對 於 TEV 切 割， 以 1:20 的 酶 : 受 質 比 率 或 更 低 的 酶 : 受 質 比 率 孵 育 18 小 時 是 最 佳 的。

【 0441】 對 於 其 餘 帶 標 籤 fHbp 蛋 白 亦 觀 察 到 了 類 似 的 發 現。

-TEV蛋白酶切割實驗的溫度優化及結果-

【 0442】 使 用 His-MBP 帶 標 籤 蛋 白 (FHBP V1.1: PorA 307-311/exP1.4) 來 優 化 在 5℃ 至 50℃ 的 各 種 溫 度 下 的 TEV 蛋 白 酶 切 割。 對 於 1 份 TEV 蛋 白 酶， 使 用 20 份 受 質。 在 輕 輕 混 合 下 在 5℃ 至 50℃ 的 各 種 溫 度 進 行 孵 育 1 小 時， 並 收 集 樣 本。 如 第 16 圖 所 示， 將 各 種 溫 度 下 的 TEV 蛋 白 酶 切 割 反 應 物 上 樣 到 SDS-PAGE 上。 進 一 步 地， 使 用 Biorad 凝 膠 文

檔編制系統進行第16圖的密度量測分析，其中所測量的條帶的強度和所形成的產物的變化倍數是考慮到在5℃的初始溫度下所形成的產物強度具有值1而計算的。所獲得的結果展示在表28和第17圖中。

表 28：TEV 切割產物的密度量測分析			
溫度	孵育時間	譜帶強度	變化倍數
5℃	1 小時	27,69,543	1
10℃	1 小時	31,71,273	1.14
20℃	1 小時	45,21,956	1.63
30℃	1 小時	69,56,920	2.51
40℃	1 小時	55,25,733	1.99
50℃	1 小時	20,03,602	0.72

【0443】結論：從表28和第17圖看出，在0小時時沒有觀察到切割。在1小時後，在30℃下形成的產物/嵌合體較高，其為在5℃下形成的產物/嵌合體的2.5倍。因此，發現用於TEV蛋白酶切割的最適溫度為約30℃。

實例 2A：TEV蛋白酶的純化

【0444】使用按照第18圖的製程純化實例1B中收穫的TEV蛋白酶，其中裂解緩衝液的pH為7.4。

【0445】蛋白質的等電點(pI)定義為蛋白質分子淨電荷為零時的pH。當溶液pH高於pI時，蛋白質表面主要帶負電荷，並且因此帶同種電荷的分子會表現出排斥力。同樣，在溶液pH低於pI時，蛋白質表面主要帶正電荷，並且蛋白質之間會發生排斥。然而，在pI處，負電荷和正電荷達到平衡，從而降低了排斥靜電力，並且吸引力占主導地

位，從而導致聚集和沉澱。

【0446】 HIS-GST-TEV蛋白酶的pI為7.8，並且因此為7.4的工作pH無法導致所需的純度。因此，按照第19圖所示的過程，將工作pH增加到8.5，導致HIS-GST-TEV蛋白酶的純度提高。

【0447】 第20a和第20b圖分別圖示了TEV蛋白酶在pH 8.5及pH 7.4下的純化概況。用星號(★)標記的泳道代表TEV蛋白酶的最終洗脫級分。與使用pH 7.4的製程生產的TEV蛋白酶相比，使用pH 8.5的製程生產的TEV蛋白酶的純度更高。

實例2B：帶標籤fHbp蛋白的純化

【0448】 將實例1A中收穫的帶標籤fHbp蛋白按照第21圖單獨純化。

【0449】 帶標籤fHbp蛋白在用於純化的工作pH下可溶，並且上述過程(第21圖)產生具有所需純度的帶標籤fHbp蛋白。使用第21圖中所示的純化過程來純化fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14、fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4、fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9、fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9、及fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4。

【0450】 然而，可能的是在擴大規模期間，以高速率表現的帶標籤fHbp蛋白可能會由於蛋白質聚集到包涵體(IB)中而具有溶解度問題。IB是由於部分折疊和錯誤折疊的蛋白質分子的聚集而形成的。

【0451】為了避免此種溶解度問題並從IB中回收所表現的蛋白質，可以使用涉及尿素的替代製程(第22圖)。

【0452】已知包涵體具有類似天然構象的蛋白質分子，並且一些包涵體具有顯著的生物活性。

【0453】在替代方法中(第22圖)中，將作為IB表現的帶標籤蛋白用8 M尿素溶解，隨後與Ni-瓊脂糖6FF柱結合以進行柱上重折疊和純化。

【0454】在第一步驟中藉由將尿素濃度從8 M降低到1 M，來將尿素從柱中移除。隨後用25 mM磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4洗滌達5-6倍柱體積，將尿素從柱子和與柱結合的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白中完全移除。

實例2C：用於從純化的帶標籤fHbp蛋白中移除標籤的過程

【0455】按照第23圖中的過程，使用TEV蛋白酶(SEQ ID NO. 12或由SEQ ID NO. 11編碼)從純化蛋白質(帶標籤fHbp蛋白)中移除His-MBP標籤。

【0456】在從fHbp蛋白移除標籤後，藉由使用離子交換層析法(第24圖)之後親和層析法(第25圖)的2步層析法進一步純化消化混合物中所獲得的嵌合蛋白。

【0457】使用本揭露案的方法產生的嵌合蛋白的表徵在表29中提供。

表 29：嵌合蛋白的物理化學參數						
測試	方法	fHbpV3.45 M5:PorA3 16- 320/exP1.1 4(SEQ ID NO. 1、 SEQ ID NO. 6)	fHbpV2.19 M6:PorA3 16- 320/exP1.4 (SEQ ID NO. 2、 SEQ ID NO. 7)	fHbpV1.14 :PorA307- 311/exP1.9 (SEQ ID NO. 3、 SEQ ID NO. 8)	fHbpV1.1: PorA307- 311/exP1.4 (SEQ ID NO. 4、 SEQ ID NO. 9)	fHbpV1.1: PorA307- 311/exP1.9 (SEQ ID NO. 5、 SEQ ID NO. 10)
身份	PorA 結合 ELISA	觀察到對 POR-A 抗體的陽性反應				
	fHbp 結合 ELISA	與野生型 fHbp 相 比，fH 結 合降低 >85%	與野生型 fHbp 相 比，fH 結 合降低 >85%	與野生型 fHbp 相 比，fH 結 合率降低 >90%	與野生型 fHbp 相 比，fH 結 合率降低 >90%	與野生型 fHbp 相 比，fH 結 合率降低 >90%
量	藉由 BCA 測 定的總蛋白 質濃度*	1.18 mg/mL	1.15 mg/mL	1.6 mg/mL	0.99 mg/mL	1.8 mg/mL
純度 (與產 物相 關)	SE-HPLC	98.3%單體	98.4%單體	98.9%單體	96.0%單體	97.0%單體
	SDS- PAGE(還原 條件)	29.5 kDa	29.5 kDa	29.7 kDa	28.3 kDa	27.9 kDa
	HCP	97.9 ng/mg	54.7 ng/mg	8.3 ng/mg	13.3 ng/mg	31.4 ng/mg
	HCD	0.14 ng/mg	0.09 ng/mg	0.09 ng/mg	0.13 ng/mg	0.15 ng/mg

純度 (與製 程相 關)	藉由 AES 測 定的鎳浸出 液	<0.080 ppm	<0.080 ppm	<0.080 ppm	0.119 ppm	0.096 ppm
微型	細菌內毒素 測試	605.2 EU/mg	140.9 EU/mg	31.3 EU/mg	50.5 EU/mg	27.8 EU/mg
fH=人因子 H *BCA 方法在實例 8 中詳細解釋。						

【0458】 FHbp特異性地與人類因子 H (fH)結合，其下調補體活化並增強對殺菌活性的抗性。引入到 fHbp 抗原中的修飾會導致 fH 結合降低並可增加保護性抗體反應。

【0459】 從表 29 中看出，與野生型 fHbp 相比，重組 fHbp 的 fH 結合率降低了 >85%，此將有助於提高含有該等重組 fHbp 的疫苗製劑的免疫原性。

【0460】 以前，使用多步層析法來純化消化混合物，包括金屬親和層析法、陽離子交換層析法、陰離子交換層析法和凝膠過濾層析法 (Gel filtration chromatography, GFC)。而本發明方法在 TEV 蛋白酶介導的標籤移除後使用 2 個層析步驟 (陰離子交換和金屬親和層析法)。使用本揭露案的 2 個層析步驟產生的嵌合蛋白表現出與使用多步層析法產生的嵌合蛋白相似的特徵和純度概況。

實例 3：包含重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白/嵌合蛋白

的製劑

【0461】製備重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的不同製劑並對其進行評估以獲得具有最佳物理化學特性、穩定性和免疫原性的製劑。

i) 佐劑優化：

【0462】為了增強免疫原性反應和物理化學性質，製劑開發始於將蛋白質吸附在不同佐劑，如氫氧化鋁(Alhydrogel)、磷酸鋁(Adjuphos)、雙重突變不耐熱毒素(dmLT)等上。基於不同的物理化學參數對該等製劑進行評估。以下提供了試驗的總結、其結局和結論。

表 30：佐劑優化		
批號 290121-A		
序號	式	濃度
1	fHbp V2.19 M6 PorA ^{316-320 exp 1.4}	100 µg/mL
2	<u>dmLT</u>	1 µg/mL
3	氯化鈉	0.9%v/v
4	聚山梨醇酯 20	0.01% v/v
5	磷酸鹽緩衝液	10 mM
6	注射用水	適量
結果	pH	7.27
	ζ 電位	-5.07 mV
批號 290121-B		
1	fHbp V2.19 M6 PorA ^{316-320 exp 1.4}	100 µg/mL
2	水凝膠(氫氧化鋁)	2.89 mg/mL
3	氯化鈉	0.9%v/v
4	磷酸鹽緩衝液	2.5 mM
5	注射用水	適量
結果	pH	7.53
	ζ 電位	-9.76 mV
批號 290121-C		
序號	式	濃度
1	fHbp V2.19 M6 PorA ^{316-320 exp 1.4}	100 µg/mL
2	Adjuphos(磷酸鋁)	2.27 mg/mL
3	氯化鈉	0.9%v/v
4	磷酸鹽緩衝液	2.5 mM

5	注射用水	適量
結果	pH	6.94
	ζ電位	-17.3 mV

【 0463 】 結 論 ： 評 估 了 三 種 佐 劑 ， 亦 即 dmLT 、 Alhydrogel 和 Adjuphos 。 從 表 30 看 出 ， Alhydrogel 和 Adjuphos 吸 附 的 製 劑 比 dmLT 吸 附 的 製 劑 產 生 了 更 令 人 滿 意 的 ζ 電 位 。

【 0464 】 Alhydrogel 的 等 電 點 (pI) 為 約 11.4 ， 而 Adjuphos 的 pI 值 在 4.5-6.0 之 間 。 所 有 fHbp 蛋 白 的 pI 範 圍 都 在 5.5 至 6.5 的 範 圍 內 。 因 此 ， 為 了 實 現 疫 苗 製 劑 中 所 有 蛋 白 質 在 佐 劑 上 的 最 佳 吸 附 ， 使 用 Alhydroge 進 行 進 一 步 研 究 。

ii) 緩 衝 液 和 糖 的 優 化 ：

表 31：緩衝液和糖的優化		
批號 051021-A		
序號	式	濃度
1	fHbp V1.14 PorA ^{307-311 Exp1.9}	100 µg/mL
2	Alhydrogel(氫氧化鋁)	2.89 mg/mL
3	氯化鈉	0.9%v/v
4	蔗糖	4% v/v
5	注射用水	適量
結果	pH	7.08
	ζ 電位	9.55 mV
批號 051021-B		
序號	式	濃度
1	fHbp V1.14 PorA ^{307-311 Exp1.9}	100 µg/mL
2	Alhydrogel(氫氧化鋁)	2.89 mg/mL
3	氯化鈉	0.9%v/v
4	甘露醇	4% v/v
5	注射用水	適量
結果	pH	7.0
	ζ 電位	10.7 mV
批號 061021		
序號	式	濃度
1	fHbp V1.14 PorA ^{307-311 Exp1.9}	100 µg/mL
2	Alhydrogel(氫氧化鋁)	2.89 mg/mL
3	氯化鈉	0.9%v/v
4	甘露醇	4% v/v

5	磷酸鹽緩衝液，pH 7.4	5 mM
6	注射用水	適量
結果	pH	8.0
	ζ 電位	-30.4 mV

【0465】從表31看出，當在製劑中使用氯化鈉和蔗糖時，批號051021-A和批號051021-B沒有獲得所需的ζ電位。在配製該組成物的初始階段使用了蔗糖。然而，含有蔗糖的組成物未產生最佳的物理化學特性，並且因此未被包含在後續組成物中。

【0466】當將磷酸鹽緩衝液添加到製劑(批號061021)中時，觀察到ζ電位有所改善，但pH值不在預期範圍內。使用甘露醇和磷酸鹽緩衝液進行進一步的研究。製劑的細節和所獲得的結果總結於表32中。

表 32：使用甘露醇和磷酸鹽緩衝液進行緩衝液和糖的優化		
批號 071021		
序號	式	濃度
1	fHbp V1.14 PorA ³⁰⁷⁻³¹¹ Exp1.9	100 µg/mL
2	Alhydrogel(氫氧化鋁)	2.89 mg/mL
3	甘露醇	5%v/v
4	磷酸鹽緩衝液，pH 7.2	5 mM
5	注射用水	適量
結果	pH	7.48
	ζ 電位	-18.8 mV
	滲透重量莫耳濃度	300 mOsmol/kg

【0467】 從表 32 看出，當在製劑中使用甘露醇和磷酸鹽緩衝液時，pH、滲透重量莫耳濃度和ζ電位均在預期範圍內。亦觀察到，將甘露醇濃度從 4% 增加到 5% 可產生製劑的最佳滲透重量莫耳濃度。

iii) 個別嵌合蛋白製劑：

【0468】 對其餘蛋白質亦進行了類似的研究。製劑細節和所獲得的結果總結於表 33 中。

表 33：個別蛋白質的製劑細節									
蛋白質	式						結果		
	蛋白質 (µg/mL)	Alhydrogel(氫 氧化鋁) (mg/mL)	甘露醇(% v/v)	磷酸鹽緩衝 液，pH 7.2 (mM)	聚山梨醇酯- 20 (mg/mL)	WFI	pH	ζ 電位(mV)	滲透重量莫耳 濃度 (mOsmol/kg)
fHbpV3.45 M5:PorA316- 320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)(批號 111021)	100	2.89	5	5	0.05	適量	7.33	-23.2	357
fHbpV2.19 M6:PorA316- 320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)(批號 121021-A)	100	2.89	5	5	0.05	適量	7.71	-24.0	388
fHbpV1.1:PorA307- 311/exP1.9(SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 10) (批號 121021-B)	100	2.89	5	5	0.05	適量	7.56	-25.2	398
fHbpV1.14:PorA307- 311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8) (批號 141021)	100	2.89	5	5	0.05	適量	7.56	-24.4	370

【 0469 】 看出使用表 33 中提供的包含甘露醇 (5% v/v)、聚山梨醇酯 20 (0.05 mg/ mL)的製劑，產生了對於所有個別蛋白質最佳的物理化學參數。

iv) 包含多種嵌合蛋白的製劑：

【 0470 】 與個別蛋白質製劑類似，確定了包含蛋白質組合的製劑的物理化學性質。製劑細節和所獲得的結果總結於表 34 中。將蛋白質單獨吸附在佐劑上，然後添加到賦形劑混合物中以獲得製劑。

表 34：包含優化的賦形劑的疫苗製劑			
批號 161021			
序號	式	濃度	
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	25 µg/mL	
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	25 µg/mL	
3	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 10)	25 µg/mL	
4	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	25 µg/mL	
5	Alhydrogel(氫氧化鋁)	2.89 mg/mL	
6	甘露醇	5%v/v	
7	磷酸鹽緩衝液，pH 7.2	5 mM	
8	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL	
9	注射用水	適量	
		初始	第 7 天(2-8℃)
結果	pH	7.52	7.52
	ζ 電位	-27.0 mV	-26.1 mV
	吸附%	92.8%	82.5%

【 0471】 從表 34 看出，該製劑在 2-8℃ 下儲存約 7 天時是穩定的。進一步，pH、ζ 電位和吸附 % 保持穩定。因

此，該製劑中的輔料組合將被進一步成比例擴大。

v) 嵌合蛋白濃度的優化：

【0472】使用更高濃度的嵌合蛋白進行研究，以確定嵌合蛋白對pH、滲透重量莫耳濃度和ζ電位的效應。製劑細節和所獲得的結果總結於表35a和表35b中。

表 35a：吸附%研究		
批號 251021		
序號	式	濃度
1	fHbp V1.14 PorA 307-311 exp 1.9fHbpV1.14:PorA307- 311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	400 µg/mL
2	Alhydrogel(氫氧化鋁)	2.89 mg/mL
3	甘露醇	5%v/v
4	磷酸鹽緩衝液，pH 7.2	5 mM
5	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL
6	注射用水	適量
結果	pH	7.26
	ζ電位	-15.3 mV
	吸附%	93.3%
	吸附%-第 7 天	76.2%

表 35b：ζ 電位研究		
批號 261021		
序號	式	濃度
1	fHbp V1.14 PorA 307-311 exp 1.9fHbpV1.14:PorA307- 311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	400 µg/mL
2	Alhydrogel(氫氧化鋁)	2.89 mg/mL
3	甘露醇	5%v/v
4	磷酸鹽緩衝液，pH 7.2	5 mM
5	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL
6	注射用水	適量
結果	pH	7.45
	pH—第 3 天	7.52
	ζ 電位	-17.2 mV
	ζ 電位—第 3 天	-21.6 mV

【0473】從表 35a 和表 35b 看出，較高蛋白質含量的製劑與磷酸鹽緩衝液、聚山梨醇酯 20 和 5% 甘露醇的組合賦予最佳 pH、滲透重量莫耳濃度和 ζ 電位。

vi) 賦形劑濃度的優化：

【0474】進行研究以優化賦形劑的濃度。製劑細節和所獲得的結果總結於表 36 至表 39 中。

表 36：包含大量蛋白質和賦形劑的疫苗製劑		
批號 180123		
序號	式	濃度
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	120 µg/mL
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	120 µg/mL
3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	120 µg/mL
4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 9)	120 µg/mL
5	Alhydrogel(氫氧化鋁)	3.4 mg/mL
6	甘露醇	4% v/v
7	磷酸鹽緩衝液，pH 7.2	10 mM
8	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL
9	2 苯氧乙醇	0.5% w/v
10	注射用水	適量
結果		初始
	pH	7.51
	ζ 電位(mV)	-23.8
	滲透重量莫耳濃度(mOsmol/kg)	285
	吸附%	79

表 37：含聚山梨醇酯 20 的疫苗製劑		
批號 230123-製劑 1		
序號	式	濃度
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	120 µg/mL
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	120 µg/mL
3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	120 µg/mL
4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 9)	120 µg/mL
5	Alhydrogel(氫氧化鋁)	3.4 mg/mL
6	甘露醇	4.5%v/v
7	磷酸鹽緩衝液，pH 7.0	5 mM
9	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL
10	2 苯氧乙醇	0.5% w/v
11	注射用水	適量
初始 結果	pH	7.47
	ζ 電位(mV)	-22.5
	滲透重量莫耳濃度(mOsmol/kg)	283
	蛋白質吸附%	92.2

表 38：不含聚山梨醇酯 20 的疫苗製劑		
批號 230123-製劑 2		
序號	式	濃度
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	120 µg/mL
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	120 µg/mL
3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	120 µg/mL
4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 10)	120 µg/mL
5	Alhydrogel(氫氧化鋁)	3.4 mg/mL
6	甘露醇	4.5% v/v
7	磷酸鹽緩衝液，pH 7.0	5 mM
8	2 苯氧乙醇	0.5% w/v
9	注射用水	適量
初始結果	pH	7.48
	ζ 電位(mV)	-25.5
	滲透重量莫耳濃度(mOsmol/kg)	290
	蛋白質吸附%	94.5

表 39：上述製劑 1 和製劑 2 的穩定性資料															
序號	批號	測試參數	初始	加速條件(25℃)			長期條件(2-8℃)								
				1M	3M	6M	1M	3M	6M						
1	230123-製劑 1 (含 PS20)	蛋白質吸附%	92.2	87.8	84.2	79.8	91.6	87.1	82.7						
		pH	7.47												
		ζ 電位(mV)	-22.5												
		滲透重量莫耳濃度(mOsmol/kg)	283												
		PSD(Zavg , nm)	4919												
			7.90			7.79									
			-26.8			-25.5									
			-			-									
			1737			1987									
2	230123-製劑 2 (不含 PS20)	蛋白質吸附%	94.5	89.4	86.3	82.0	94.2	89.0	85.0						
		pH	7.48												
		ζ 電位(mV)	-25.5												
		滲透重量莫耳濃度(mOsmol/kg)	290												
		PSD(Zavg , nm)	3195												
			7.95			7.88									
			-28.9			-25.0									
			-			-									
			1914			2115									
PSD=粒徑分佈															

【 0475】 從表 36至 39看出，使用 5% v/v甘露醇、0.05 mg/mL聚山梨醇酯 20、5 mM磷酸鹽緩衝液(pH 7.0)和 0.5% w/v 2-苯氧乙醇與 120 µg/mL的各嵌合蛋白的組合導致最佳的物理化學特性。

【 0476】 pH的優化：

【 0477】 進行研究以檢查 pH對吸附的影響。製劑細節和所獲得的結果總結於表 40和表 41中。

表 40：pH 對吸附的影響(磷酸鹽緩衝液的 pH：>7)		
批號 150323—製劑 1		
序號	式	濃度
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	120 µg/mL
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	120 µg/mL
3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	120 µg/mL
4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 9)	120 µg/mL
5	Alhydrogel(氫氧化鋁)	3.4 mg/mL
6	甘露醇	5%v/v
7	磷酸鹽緩衝液，pH 7.4	5 mM
8	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL
9	2-苯氧乙醇	0.5% w/v
10	注射用水	適量
初始結果	pH	7.83
	ζ 電位(mV)	-21.7
	PSD(Zavg.nm)	1902
	蛋白質吸附%	85.7

表 41：pH 對吸附的影響(磷酸鹽緩衝液的 pH：>7)		
批號 150323—製劑 2		
序號	式	濃度
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	120 µg/mL
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	120 µg/mL
3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	120 µg/mL
4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 10)	120 µg/mL
5	Alhydrogel(氫氧化鋁)	3.4 mg/mL
6	甘露醇	5%v/v
7	磷酸鹽緩衝液，pH 7.4	5 mM
8	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL
9	2-苯氧乙醇	0.5% w/v
10	注射用水	適量
初始結果	pH	7.86
	ζ 電位(mV)	-21.3
	PSD(Zavg.nm)	2627
	蛋白質吸附%	86.9

【 0478】 從表 40至表 41看出，磷酸鹽緩衝液的 pH增加至 7.4導致最終製劑的 pH增加 (7.83至 7.86)。此外，磷酸鹽緩衝液的 pH增加會導致蛋白質吸附率從 94%降低至 85%。

表 42：pH 對吸附的影響(磷酸鹽緩衝液的 pH：7)		
批號 250423—製劑 1		
序號	式	濃度
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	120 µg/mL
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	120 µg/mL
3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	120 µg/mL
4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 9)	120 µg/mL
5	Alhydrogel(氫氧化鋁)	3.4 mg/mL
6	甘露醇	5%v/v
7	磷酸鹽緩衝液，pH 7.0	5 mM
8	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL
9	2-苯氧乙醇	0.5% w/v
10	注射用水	適量
結果		初始
	pH	7.53
	ζ 電位(mV)	-19.1
	PSD(Zavg，nm)	3883
	蛋白質吸附%	88
	滲透重量莫耳濃度(mOsmol/kg)	385

表 43：pH 對吸附的影響(磷酸鹽緩衝液的 pH：7)		
批號 250423—製劑 2		
序號	式	濃度
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	120 µg/mL
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	120 µg/mL
3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	120 µg/mL
4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 10)	120 µg/mL
5	Alhydrogel(氫氧化鋁)	3.4 mg/mL
6	甘露醇	5%v/v
7	磷酸鹽緩衝液，pH 7.0	5 mM
8	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL
9	2-苯氧乙醇	0.5% w/v
10	注射用水	適量
結果		初始
	pH	7.46
	ζ 電位(mV)	-18.8
	PSD(Zavg，nm)	2136
	蛋白質吸附%	92.3
	滲透重量莫耳濃度(mOsmol/kg)	373

【0479】從表42至表43中看出，當將pH 7.0的磷酸鹽緩衝液用於製劑時，達到了在7.3至7.5範圍內的最終pH並且蛋白質吸附增加。

實例4：包含重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的疫苗製劑的穩定性研究

【0480】對2個批次在2-8℃下進行6個月和10個月的穩定性研究。製劑細節和所獲得的結果總結於表44中。

表 44：在 2-8℃ 下的穩定性研究					
序號	式	濃度			
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	120 µg/mL			
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	120 µg/mL			
3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	120 µg/mL			
4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 9)	120 µg/mL			
5	Alhydrogel(氫氧化鋁)	3.4 mg/mL			
6	甘露醇	50 mg/mL			
7	磷酸鹽緩衝液，pH 7.0	5 mM			
8	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL			
9	2-苯氧乙醇	5 mg/mL			
10	注射用水	適量			
結果	批號 ⇨	090823—製劑 1		250423—製劑 2	
	測試參數 ⇩	初始	6M (2-8℃)	初始	10M (2-8℃)
	蛋白質吸附%	84.8	90.6	88	88.6
	pH	7.65	7.68	7.53	7.80
	ζ 電位(mV)	-20.6	-24.2	-19.1	-24.1
	PSD(Zavg，nm)	3228	1679	3883	1761
	滲透重量莫耳濃度(mOsmol/kg)	-	330	-	385

【0481】結論：從表44看出，包含重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的疫苗製劑在2-8℃下保存長達6個月的蛋白質吸附%、pH、ζ電位和PSD均在所需範圍內。

實例5：包含重組/嵌合蛋白的製劑的免疫原性研究

【0482】所用生物材料的細節在以下面提供：
腦膜炎雙球菌血清群B菌株：

【0483】從Chris Tang教授(Sir William Dunn School of Pathology, UK)接收腦膜炎雙球菌的甘油儲備溶液。收到了腦膜炎雙球菌血清群B的四種菌株。菌株細節在下面提供，並在表45中進一步總結。

- 1.腦膜炎雙球菌 M08.240157 (fHbp V1.1:PorA VR2 16)
- 2.腦膜炎雙球菌 M17. 240832 (fHbp 1.4: PorA VR2 4)
- 3.腦膜炎雙球菌 M17. 240156 (fHbp 3.45: PorA VR2 14)
- 4.腦膜炎雙球菌 M18 240043 (fHbp 1.15: PorA VR2 15-11)

表 45：用於免疫原性研究的腦膜炎雙球菌血清群 B 菌株									
序 號	PubMLS T ID	分離株	fHb p 胜 肽	Nad A 胜 肽	NHB A 胜 肽	PorA_V R1	PorA_V R2	ST (MLS T)	克隆複 合體 (MLS T)
1.	40818	M082401 57	1	1	3	7	16	32	ST-32 複合物
2.	60604	M172408 32	4	0	2	7-2	4	1194	ST- 41/44 複合物
3.	53319	M172401 56	45	0	18	22	14	213	ST-213 複合物
4.	60955	M182400 43	15	0	21	19-1	15-11	269	ST-269 複合物

【 0484】 用於免疫原性研究的製劑的細節總結於表 46 中。

表 46：用於免疫原性研究的疫苗製劑				
序號	式	製劑 1 批號 250423	製劑 2 批號 250423	安慰劑
1	fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 6)	120 µg/mL	120 µg/mL	不適用
2	fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 7)	120 µg/mL	120 µg/mL	
3	fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 8)	120 µg/mL	120 µg/mL	
4	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 9)	120 µg/mL	-	
	fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 10)	-	120 µg/mL	
5	Alhydrogel(氫氧化鋁)	3.4 mg/mL	3.4 mg/mL	3.4 mg/mL
6	甘露醇	5%v/v	5%v/v	5%v/v
7	磷酸鹽緩衝液，pH 7.0	5 mM	5 mM	5 mM
8	聚山梨醇酯 20	0.05 mg/mL	0.05 mg/mL	0.05 mg/mL
9	2-苯氧乙醇	0.5% w/v	0.5% w/v	0.5% w/v
10	注射用水	適量	適量	適量
結果		初始	初始	初始
	pH	7.53	7.46	7.16
	ζ 電位(mV)	-19.1	-18.8	-19.5

	PSD(Zavg , nm)	3883	2136	3188
	蛋白質吸附%	88	92.3	不適用

血清殺菌測定

用於針對Men B毒株的hSBA的工序

藉由用於SBA的工作測定儲備液進行製備

【0485】從深度冷凍機中取出主儲備液小瓶，將培養物快速劃線到已乾燥的血瓊脂平板(含有5%馬血的哥倫比亞血瓊脂)上。將板在37℃下用5% CO₂孵育過夜。用無菌環挑取約50個菌落並將其重懸(從而產生重懸浮液)於容納有15 ml含甘油的BHI肉湯的無菌50 ml離心管中。將懸浮液按0.25 mL體積分裝到1.8 mL冷凍小瓶中。將經標記的小瓶儲存在-70℃深度冷凍機中。

用於針對Men B毒株的抗體的滴定的血清殺菌測定的測定工序：

【0486】將腦膜炎雙球菌B菌株(工作儲備液)劃線到單個血瓊脂平板上，並在37℃下用5% CO₂孵育過夜。再次將培養物劃線到新鮮的血瓊脂平板上以實現貼壁生長，在平板的中心形成正方形。將所有Men B毒株的平板在CO₂培養箱中在37℃下用5% CO₂孵育4小時(+15分鐘)。將從平板中心掃過的生長物懸浮到5 ml的含有Ca⁺²和Mg⁺²的Hanks平衡鹽溶液/緩衝液(Invitrogen)中以製備懸浮液。使

用 1 ml 懸浮液以讀取 650 nm 下的吸光度。將懸浮液稀釋至 650 nm 下的 OD=0.1，然後用緩衝液進行 1/10 稀釋，然後 1/250 稀釋。將 20 µl 緩衝液添加到到 96 孔微量滴定板的直至第 11 行的所有孔中。將 20 µl (稀釋或未稀釋的) 測試血清樣本添加到板的第 1 行；最後兩列保留用於質控血清。20 µl 從第 1 行到第 2 行連續稀釋，以此類推直至第 9 行，棄去來自第 9 行的 20 µl。第 10 行和第 11 行保留用於補體對照。將 10 µl 已製備的細菌懸浮液添加到直到第 11 行的所有孔中。將 10 µl 的人類補體添加到直到第 10 行的所有孔中。將 10 µl 熱滅活的 (56°C 達 30 min) 人類補體添加到第 11 行的所有孔中。將孔中的內容物充分混合，並將平板在 37°C 下保持孵育 1 小時。在孵育後，將每孔中的 10 µl 內容物點樣到正確標記的血瓊脂平板上。將血瓊脂平板在 CO₂ 培養箱中在 37°C 下用 5% CO₂ 孵育。第二天使用自動菌落計數器 (Synbiosis-ProtoCOL3) 對細菌菌落進行計數。

研究細節：

【 0487 】 使用 3 種製劑 / 群組對兔子 (New Zealand White) 進行免疫原性研究，該 3 種製劑為 G1-Trumenba (Pfizer)、G2-製劑 1、G3-製劑 2，每種製劑注射到 4 只雄性兔子和 4 只雌性兔子體內。在第 0 天、第 14 天和第 28 天進行注射，並在第 0 天和第 37 天執行放血。藉由 hSBA (使用人類補體的血清殺菌測定) 分析血清樣本的免疫原性，向所有兔子給予全人類劑量。**藥物產品：**腦膜炎球菌 B 疫苗

(MenB)(250423-製劑 1和 250423-製劑 2)

研究設計：研究設計總結於表 47 中。

表 47：免疫原性研究中的治療群組									
序 號	群組 ID	測試化合物	劑量 (mcg)/注 射	數量	注射 途徑	注射 體積 (μL)	按劑 量投 配日	血清收集日	
			MenB					第 0 天	第 37 天
1	G1	Trumenba	120	8	IM	500	1、 14、 28	8	8
2	G2	製劑 1	240	8	IM	500	1、 14、 28	8	8
3	G3	製劑 2	240	8	IM	500	1、 14、 28	8	8
兔子總數				24	-			24	24
總血清樣本								48	

群組間顯著差異的標準：

【 0488】滴度的 2 倍變化被認為是測定變異，並且比較群組之間滴度≥4 倍的差異被認為是顯著的。

目的和範圍：

【 0489】該研究的目的是比較個別 Men B 製劑 (製劑 1 和製劑 2) 以及 Trumenba 對 MenB 菌株 -M 08240157(fhbp 1.1)、M 17240832 (fhbp 1.4)、M 17240156 (fhbp 3.45)和 M 18240043 (fhbp 1.15) hSBA 的免疫原性反應。所獲得的結果在表 48 中說明。

表 48：製劑針對不同 Men B 菌株的 hSBA 結果												
式	Men B 菌株											
	M08240157			M17240832			M17240156			M18240043		
	第 0 天	第 37 天	F.D.	第 0 天	第 37 天	F.D.	第 0 天	第 37 天	F.D.	第 0 天	第 37 天	F.D.
Trumenba-G1	9	32	4	9	117	13	235	1878	8	9	2233	248
製劑 1-G2	9	128	14	6	41	7	152	1024	7	6	215	36
製劑 2-G3	10	64	6	4	29	7	152	790	5	4	279	70
FD=與所獲得的基線 SBA(D37/D0)滴度相比的滴度倍數差異。給出的所有值均為每個資料集的 GMT												

【0490】 在第26圖中提供樂圖形表示，其中突出顯示了每個放血日的個別資料點和 GMT。

【0491】 從 hSBA 資料看出，包含本揭露案的重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白的製劑 (製劑 1/Quad 1 和製劑 2/Quad 2) 是高度免疫原性的，並且能夠引發針對不同腦膜炎雙球菌菌株 (M 08240157、M 17240832、M 17240156 和 M 18240043) 的保護性 SBA 滴度。

i) 用於評定與 Men B 樣本的重組野生型相比，人類補體因子-H與fHbp-PorA嵌合蛋白的結合的 ELISA 目的：

【0492】 本研究的目的是描述用於在 Monoclonal Antibodies IPQC Laboratory (MAb IPQC) 中評定與 Men B 樣本的重組野生型相比，人補體因子-H與fHbp-PorA嵌合蛋白的結合的方法。

安全性：

【0493】在開始分析之前應遵循但不限於以下幾點：

- 工作時請穿戴適當的個人防護裝備，如手套、護目鏡等。
- 確保工作之前和之後工作區域是清潔的
- 在處理過危險材料(若有)後，請立即清洗您的雙手及/或其他接觸區域。
- 在操作電動儀器(如渦旋混合器、酶標儀等)時，請採取適當的預防措施和安全措施。

工序：

【0494】表49中提供了所需的化學品和試劑。

表 49：化學品和試劑的列表			
序號	化學名稱	供應商/品牌	目錄號
1.	來自人血漿的補體因子 H	Sigma Aldrich	C5813
2.	OX24 抗因子 H 單克隆抗體	Abcam	ab118820
3.	多克隆山羊抗小鼠 HRP 二抗	Sigma Aldrich	A4416
4.	Tween20	Sigma Aldrich	P7949
5.	牛血清白蛋白(BSA)	Sigma Aldrich	A7030
6.	顯影試劑	R&D systems	DY999
7.	終止溶液	R&D systems	DY994
8.	PBS 緩衝片劑(pH 7.4±0.05)	Gibco	18912-014

對於所有上述化學品，亦可以使用來自其他品牌的等效製品。

【0495】所需裝備：

- ELISA酶標儀能夠量測450 nm和630 nm下的波長。
- 微孔板清洗機

- 能夠達到並維持 37°C 的培養箱
- 冰箱

【0496】所需耗材：

- NUNC-免疫板，製造商：Thermo Scientific；目錄號：442404或等同物。
- 平板密封膠帶
- 50 mL試劑貯存器
- 適用的玻璃器皿
- 微量移液器(單通道和多通道)及相應的吸頭
- 渦旋混合器
- 微量離心管 -15 mL和 50 mL

【0497】試劑和溶液的製備：

-包被緩衝液：1X PBS pH 7.4

將2片PBS片劑溶解於800 μ L WFI中，然後定容至1 L。儲存於室溫(RT)下，在製備日前1個月內使用。

-洗滌緩衝液：1X PBST(0.05% Tween20在1X PBS pH 7.4中的溶液)

如上所述準備1 L PBS。將0.5 mL Tween 20溶液添加到999.5 mL的1X PBS中，並使用磁力攪拌器混合。儲存於室溫(RT)下，在製備日前1個月內使用。此種1X PBST亦可用作封閉溶液和抗體製備物的稀釋劑。

-封閉：4% BSA的PBST溶液

準確稱取 4.0 g 的 BSA，並將其溶解於 100 mL 的 1X PBST 中。

TMB 溶液：2 組分混合物

準確量取等體積的溶液 A 和溶液 B (作為顯影試劑提供)。均衡至 RT (儲存於黑暗中)。新鮮製備，在使用前輕輕混合。

注意：上面給出的製備試劑和溶液的工序僅用於說明目的。應根據測定板的數量來計算化學品/試劑的實際體積/量。

【0498】方法：

- 抗原包被：

- 在 96 孔板的側面貼上帶有抗原細節、分析人員姓名首字母以及板包被日期的標籤。
- 確定包被所需數量的平板所需的對應抗原和包被緩衝液的體積。
- 用 5.0 μg 抗原 (fHbp-PorA 嵌合體) 包被 ELISA 平板的每個孔，在磷酸鹽緩衝鹽水 (1X PBS) 中稀釋至終濃度為 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，並借助多通道移液器的幫助將 50 μL 稀釋的抗原添加到 96 孔 Nunc 平底板的各孔中。
- 作為對照，向孔中僅添加 50.0 μL 的 PBS。
- 將密封的平板在 2-8°C 下孵育過夜。

- 洗滌：

- 取出經包被的 96 孔微量滴定板，將該平板放入微孔板清洗機中，並藉由選擇預進料程式進行 3 次洗滌

來執行洗滌工序。

- 對於手動洗滌，先藉由將內容物棄置到水槽中來清空所有孔，然後添加 300 μL /孔的洗滌緩衝液/1X PBST，使該等孔浸泡幾秒鐘，再將所有孔中的內容物清空到水槽中。輕敲不掉毛的薄棉紙(link free tissue paper)以確保所有孔都完全清空。重複該洗滌過程兩次。

-封閉：

- 在第二天藉由用 300 μL /孔的 1X PBST洗滌平板三次，移除未結合的抗原。
- 用 200 μL 的 4% BSA的 PBST溶液封閉孔。將平板在 37°C 下孵育 1 小時。

-添加人類補體因子 -H：

- 藉由用 300 μL /孔的 1X PBST洗滌平板三次，移除未結合的 BSA。
- 人補體因子 -H稀釋方案總結於表 50 中：

表 50：人類補體因子-H 稀釋方案				
稀釋倍數	來自儲備液的體積(μL)	稀釋劑的體積(μL)	最終體積(μL)	所得濃度(μg/mL)
1	30.0 μL，來自 1.0 mg/mL	1470.0 μL	1500.0 μL	20.0 μg/mL
2	250.0 μL，來自 20.0 μg/mL	250.0 μL	500.0 μL	10.0 μg/mL
3	200.0 μL，來自 20.0 μg/mL	300.0 μL	500.0 μL	8.0 μg/mL
4	150.0 μL，來自 20.0 μg/mL	350.0 μL	500.0 μL	6.0 μg/mL
5	100.0 μL，來自 20.0 μg/mL	400.0 μL	500.0 μL	4.0 μg/mL
6	50.0 μL，來自 20.0 μg/mL	450.0 μL	500.0 μL	2.0 μg/mL
7	25.0 μL，來自 20.0 μg/mL	475.0 μL	500.0 μL	1.0 μg/mL
8	50.0 μL，來自 2.0 μg/mL	450.0 μL	500.0 μL	0.2 μg/mL
9	50.0 μL，來自 1.0 μg/mL	450.0 μL	500.0 μL	0.1 μg/mL
10	50.0 μL，來自 0.2 μg/mL	450.0 μL	500.0 μL	0.02 μg/mL

- 添加 50.0 μ 的稀釋至適當終濃度的因子 H(按照如表 50 所示的稀釋方案，以下是因子 H 的終濃度，50.0 μL 中 0.0 μg、0.001 μg、0.005 μg、0.01 μg、0.05 μg、0.1 μg、0.2 μg、0.3 μg、0.4 μg、0.5 μg 和 1.0 μg 蛋白質)，並將平板在 37°C 下孵育 1 小時。

-添加一抗：

- 藉由用 300 μL/孔的 1X PBST 洗滌平板三次，移除未結合的因子 H。
- 添加 50.0 μL 的在 PBST 中稀釋至 1/10,000 的 OX24 mAb，並將平板在 37°C 下孵育 1 小時。

-添加二抗：

- 藉由用 300 μL /孔的 1X PBST洗滌平板三次，移除未結合的一抗(OX24 mAb)。
- 添加 50.0 μL 的在 PBST中稀釋至終濃度為 1/10,000 的二抗，並將平板在 37°C 下孵育 1 小時。

-添加 TMB 受質：

- 藉由用 300 μL /孔的 1X PBST洗滌平板三次，移除未結合的二抗。
- 藉由添加 100.0 μL 的顯影試劑(顯影試劑為溶液 A 和溶液 B 的 1:1 混合物)對平板進行顯影。將平板在 25°C /RT 下孵育 20 min，並藉由添加 50.0 μL 的終止溶液來停止，該終止溶液使反應物變成黃色。
- 在酶標儀上讀取在 450 nm 和 630 nm 處的吸光度時經顯影的孔的吸光度。使用歸一化的吸光度(A450 nm-A630 nm)以使用 Excel 和 Graph-pad PRISM 繪製圖形。

【0499】第 27 圖及表 51 圖示了人類補體因子-H 與野生型 fHbp 結合相較於與 Men B 嵌合蛋白結合的代表性資料。

表 51：人類補體因子-H 的結合							
嵌合蛋白	人類補體因子-H 的濃度	SIPL 嵌合體	Oxford 嵌合體	Oxford 野生型	與 Oxford ChA 相比的折疊效力	與 Oxford 野生型相比的折疊效力	差異 (與 Oxford 野生型相比)
fHbp V3.45 M5: PorA ³¹⁶⁻³²⁰ /exP1.14	4 µg/mL	0.171	不適用	1.244	不適用	13.75	86.25
fHbp V2.19 M6: PorA ³¹⁶⁻³²⁰ /exP1.4	4 µg/mL	0.064	0.080	1.176	80.00	5.44	94.56
fHbp V1.14: PorA ³⁰⁷⁻³¹¹ /exP1.9	4 µg/mL	0.095	0.074	1.036	129.25	9.17	90.83
fHbp V1.1 : PorA ³⁰⁷⁻³¹¹ /exP1.4	4 µg/mL	0.065	0.055	0.982	117.27	6.57	93.43
fHbp V1.1 : PorA ³⁰⁷⁻³¹¹ /exP1.9	4 µg/mL	0.061	0.060	0.982	101.67	6.21	93.79

【0500】結論：從表 51 和第 27 圖看出，與野生型 fHbp 蛋白相比，本發明的重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白表現出大於 80% 的人補體因子 H 結合率降低。

實例 6：包含重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白製劑的組合製劑

【0501】組合製劑的物理化學表徵：

【0502】發現本發明的包含來自腦膜炎雙球菌血清群B的重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的疫苗製劑是穩定的和免疫原性的。進一步，研究了包含該疫苗製劑以及其他腦膜炎雙球菌血清群的組合製劑，以找出對物理化學表徵、穩定性和免疫原性的影響。

【0503】本研究使用了申請人的MenFive製劑，該製劑包含針對腦膜炎雙球菌血清群ACYWX的多糖-蛋白質綴合物。將凍乾的MenFive疫苗用MenB製劑重構，並在室溫下儲存2小時以研究對整體重構的溶液的物理化學參數的影響。進行該研究是為了評估動物注射期間重構溶液的穩定性並模擬常規臨床實踐。

【0504】使用來自批號090823的MenB製劑和MenFive製劑(批號2352M001：在本研究中使用5劑量的凍乾小瓶，每瓶內容物：每種抗原(A、C、Y、W、X)=32 µg；蔗糖=15 mg；檸檬酸三鈉=2.5 mg；Tris緩衝液=0.61 mg)用於研究。測試參數和所獲得的結果總結於表52中。

表 52：組合製劑的物理化學表徵				
序號	摻混物	測試參數	初始	室溫下 2 小時
1	MenFive (B#2352M001)+MenB 安慰劑(B#090823)	pH	7.30	7.30
		ζ 電位(mV)	-33.3	-32.8
		PSD(Zavg , nm)	1550	1938
2	MenFive (B#2352M001)+ MenB(B#090823-製劑 1)	pH	7.64	7.63
		ζ 電位(mV)	-41.3	-41.6
		PSD(Zavg , nm)	1912	2302
3	MenFive (B#2352M001)+ MenB(B#090823-製劑 2)	pH	7.65	7.66
		ζ 電位(mV)	-35.6	-35.8
		PSD(Zavg , nm)	2421	2447

【 0505 】 結 論 ： 從 表 52 看 出 ， 重 構 溶 液 在 2 小 時 內 是 物 理 化 學 性 質 穩 定 的 ， 並 且 目 視 亦 未 發 現 粒 子 聚 集 / 沉 降 。

【 0506 】 因 此 ， 計 劃 進 一 步 研 究 以 確 定 MenFive+MenB 組 合 製 劑 的 免 疫 原 性 和 非 干 擾 性 。

【 0507 】 組 合 製 劑 的 免 疫 原 性 和 非 干 擾 性 研 究 ：

【 0508 】 所 用 生 物 材 料 的 細 節 在 以 下 面 提 供 ：

【 0509 】 腦 膜 炎 雙 球 菌 血 清 群 B 菌 株 ：

【 0510 】 所 用 的 腦 膜 炎 雙 球 菌 血 清 群 B 菌 株 與 實 施 例 5 中 所 用 的 彼 等 相 同 。

【 0511 】 腦 膜 炎 雙 球 菌 血 清 群 A 、 C 、 W 、 Y 和 X) 菌 株 ：

【 0512 】 腦 膜 炎 雙 球 菌 的 甘 油 儲 備 液 於 2012 年 7 月 從 Ray Borrow 教 授 (Health Protection Agency, Manchester

Laboratory UK)處接受。接受了如下的5種腦膜炎雙球菌血清群：

- 1.腦膜炎雙球菌血清群A，F8238
- 2.腦膜炎雙球菌血清群C11，M05 240852
- 3.腦膜炎雙球菌血清群W135，M01 0240070
- 4.腦膜炎雙球菌血清群X，BF2/97
- 5.腦膜炎雙球菌血清群Y，M03 0241125

【0513】用於針對Men B毒株的hSBA的工序：

【0514】藉由用於SBA的工作測定儲備液進行製備

【0515】從深度冷凍機中取出主儲備液小瓶，將培養物快速劃線到已乾燥的血瓊脂平板(含有5%馬血的哥倫比亞血瓊脂)上。將板在37℃下用5% CO₂孵育過夜。用無菌環挑取約50個菌落並將其重懸(從而產生重懸浮液)於容納有15 ml含甘油的BHI肉湯的無菌50 ml離心管中。將懸浮液按0.25 mL體積分裝到1.8 mL冷凍小瓶中。將經標記的小瓶儲存在-70℃深度冷凍機中。

【0516】用於針對Men B毒株的抗體的滴定的血清殺菌測定的測定工序：

【0517】將腦膜炎雙球菌B菌株(工作儲備液)劃線到單個血瓊脂平板上，並在37℃下用5% CO₂孵育過夜。再次將培養物劃線到新鮮的血瓊脂平板上以實現貼壁生長，在平板的中心形成正方形。將所有Men B毒株的平板在CO₂培養箱中在37℃下用5% CO₂孵育4小時(+15分鐘)。將從平板中心掃過的生長物懸浮到5 ml的含有Ca²⁺和Mg²⁺的

Hanks平衡鹽溶液/緩衝液(Invitrogen)中以製備懸浮液。使用1 ml懸浮液以讀取650 nm下的吸光度。將懸浮液稀釋至650 nm下的OD=0.1，然後用緩衝液進行1/10稀釋，然後1/250稀釋。將20 µl緩衝液添加到到96孔微量滴定板的直至第11行的所有孔中。將20 µl(稀釋或未稀釋的)測試血清樣本添加到板的第1行；最後兩列保留用於質控血清。20 µl從第1行到第2行連續稀釋，以此類推直至第9行，棄去來自第9行的20 µl。第10行和第11行保留用於補體對照。將10 µl已製備的細菌懸浮液添加到直到第11行的所有孔中。將10 µl的人類補體添加到直到第10行的所有孔中。將10 µl熱滅活的(56°C 達30 min)人類補體添加到第11行的所有孔中。將孔中的內容物充分混合，並將平板在37°C下保持孵育1小時。在孵育後，將每孔中的10 µl內容物點樣到正確標記的血瓊脂平板上。將血瓊脂平板在CO₂培養箱中在37°C下用5% CO₂孵育。第二天使用自動菌落計數器(Synbiosis-ProtoCOL3)對細菌菌落進行計數。

【0518】用於針對MenFive血清群(A、C、W、Y和X)的hSBA的工序：

【0519】藉由用於SBA的工作測定儲備液進行製備

【0520】從深度冷凍機中取出主儲備液小瓶，將培養物快速劃線到已乾燥的血瓊脂平板(含有5%馬血的哥倫比亞血瓊脂)上。將板在37°C下用5% CO₂孵育過夜。用無菌環挑取約50個菌落並將其重懸(從而產生重懸浮液)於容納有15 ml含甘油的BHI肉湯的無菌50 ml離心管中。將懸浮

液按0.25 mL體積分裝到1.8 mL冷凍小瓶中。將經標記的小瓶儲存在-70℃深度冷凍機中。

【0521】用於滴定MenFive血清群(A、C、W、Y和X)的抗體的血清殺菌測定的測定工序：

【0522】將腦膜炎雙球菌血清群-A、C、W、Y和X工作儲備液劃線於單個血瓊脂平板上，並在37℃下用5% CO₂孵育過夜。再次將培養物劃線到新鮮的血瓊脂平板上以實現貼壁生長，在平板的中心形成正方形。將平板在CO₂培養箱中在37℃下用5% CO₂孵育對於血清群C、W、Y、X而言4小時(±15分鐘)並且對於血清群A孵育3小時(±15分鐘)。將從平板中心掃過的生長物懸浮到5 ml的對於血清群A、Y和X含有Ca⁺²和Mg⁺²並且對於血清群C和W含有Ca-和Mg-以及BSA的Hanks平衡緩衝液(Hanks平衡鹽溶液，Invitrogen)中以製成懸浮液。使用1 ml懸浮液以讀取650 nm下的吸光度。將懸浮液稀釋至650 nm下的OD=0.1，然後用緩衝液進行1/10稀釋，然後1/250稀釋。將20 µl緩衝液添加到到96孔微量滴定板的直至第11行的所有孔中。將20 µl(稀釋或未稀釋的)測試血清樣本添加到板的第1行；最後兩列保留用於質控血清。20 µl從第1行到第2行連續稀釋，以此類推直至第9行，棄去來自第9行的20 µl。第10行和第11行保留用於補體對照。將10 µl已製備的細菌懸浮液添加到直到第11行的所有孔中。將10 µl的人類補體添加到直到第10行的所有孔中。將10 µl熱滅活的人類補體添加到第11行的所有孔中。將孔中的內容物充分混合，並將平

板在37°C下保持孵育1小時。在孵育後，將每孔中的10 µl 內容物點樣到正確標記的血瓊脂平板上。將血瓊脂平板在CO₂培養箱中在37°C下用5% CO₂孵育。第二天使用自動菌落計數器(Synbiosis-ProtoCOL3)對細菌菌落進行計數。

【0523】研究細節：

【0524】 使用5種製劑/群組(G1-安慰劑、G2-MenFive、G3-MenFive+MenB-製劑1、G4-MenFive+MenB-製劑2、和G5-Menfive+Trumenba)對兔子(New Zealand White)進行免疫原性研究，每種製劑注射到4只雄性兔子和4只雌性兔子體內。在第0天、第14天和第28天進行注射，並在第0天、第28天和第41天執行放血，藉由hSBA(使用人類補體的血清殺菌測定)分析血清樣本的免疫原性。所有兔子均給予全人類劑量。

【0525】藥物產品：腦膜炎球菌(A-TT、C-CRM、Y-CRM、W-CRM、X-TT)多糖綴合物疫苗-5劑小瓶(Men5)(2352M001)用腦膜炎球菌B疫苗(MenB)重構(090823-製劑1和製劑2)

【0526】研究設計：

【0527】 研究設計如表53所示。

表 53：免疫原性研究中的治療群組											
序 號	群組 ID	測試化合物	劑量(mcg)/ 注射		數 量	注 射 途 徑	注射 體積 (μL)	按劑 量投 配日	血清收集日		
			Men 5	Men B					第 0 天	第 28 天	第 41 天
1	G1	用於 MenB 製劑的安慰 劑	-	-	8	IM	500	1、 14、 28	8	8	8
2	G2	Men5+鹽水	25	-	8	IM	500	1、 14、 28	8	8	8
3	G3	Men5+Men B(製劑 1)	25	240	8	IM	500	1、 14、 28	8	8	8
4	G4	Men5+Men B(製劑 2)	25	240	8	IM	500	1、 14、 28	8	8	8
5	G5	Men5+Tru menba	25	120	5	IM	500	1、 14、 28	5	5	5
兔子總數					37	-			37	37	37
總血清樣本									111		

【 0528】 群組間顯著差異的標準：

【 0529】 滴度的 2 倍變化被認為是測定變異，並且比較群組之間滴度 >4 倍的差異被認為是顯著的。

【 0530】 目的和範圍：

【 0531】 本研究的目的是使用 hSBA 比較個別 MenFive+MenB 摻混製劑對 MenFive 血清群 (A、C、W、Y 和 X) 和 MenB 菌株 -M 08240157(fhbp 1.1)、M 17240832 (fhbp 1.4)、M 17240156 (fhbp 3.45) 和 M 18240043 (fhbp 1.15) 的免疫原性反應。範圍亦包括檢查兩種個別的疫苗製劑 (MenFive 和 MenB) 之間是否存在任何干擾/交叉保護。

【 0532】 所獲得的結果總結在表 54 至表 55 和第 28 圖至第 29 圖中。

表 54：針對 MenFive 血清群的製劑的 hSBA 結果：

式	MEN A				MEN C				MEN W				MEN Y				MEN X			
	第 0 天	第 28 天	第 41 天	F.D.	第 0 天	第 28 天	第 41 天	F.D.	第 0 天	第 28 天	第 41 天	F.D.	第 0 天	第 28 天	第 41 天	F.D.	第 0 天	第 28 天	第 41 天	F.D.
安慰劑	2	2	2	1.0	2	2	2	1.0	2	2	2	1.0	2	2	2	1.0	23	17	25	1.1
MenFive	3	939	609	181.1	3	197	140	41.6	3	512	181	53.8	3	304	256	76.1	29	558	152	5.2
MenFive+製劑 1	2	1117	861	430.5	2	166	181	90.5	2	1024	470	235.0	2	256	166	83.0	45	558	431	9.5
MenFive+製劑 2	2	1218	790	395.0	2	152	215	107.5	2	939	362	181.0	2	235	166	83.0	29	664	362	12.3
MenFive+Trumenba	2	388	194	97.0	2	223	512	256.0	2	891	388	194.0	2	446	1024	512.0	28	111	64	2.3

表 55：針對 MenB 血清群的製劑的 hSBA 結果：

式	M08240157				M17240832				M17240156				M18240043			
	第 0 天	第 28 天	第 41 天	F.D.	第 0 天	第 28 天	第 41 天	F.D.	第 0 天	第 28 天	第 41 天	F.D.	第 0 天	第 28 天	第 41 天	F.D.
安慰劑	11	10	19	1.7	2	2	7	3.5	76	256	235	3.1	4	4	5	1.4
MenFive	15	10	38	2.6	5	2	13	2.5	99	304	304	3.1	7	5	4	0.5
MenFive+製劑 1	16	27	108	6.8	6	21	41	6.6	117	558	609	5.2	6	45	197	31.9
MenFive+製劑 2	16	10	64	4	5	23	35	6.7	140	790	861	6.2	7	64	117	17.4
MenFive+Trumenba	9	14	49	5.3	3	28	42	12.1	74	776	676	9.2	12	147	891	73.5

【0533】結論：基於在表54至表55和第28圖至第29圖中獲得的結果，做出了以下觀察結果。

【0534】對MenFive血清群的推斷：所獲得的組合製劑(MenFive+製劑1以及MenFive+製劑2)對所有五種血清群(A、C、W、Y及X)的滴度與個別的單獨MenFive製劑相當(在2倍以內)，表明與Men B組分摻混後免疫原性反應沒有損失。SBA滴度有所增加，數量上略有增加，但任何血清群均未見減少。

【0535】針對Men B血清群的推斷：在滴定前(第0)和滴定後(第41天)的比較中，MenFive+MenB製劑對Men B菌株的滴度顯示出 ≥ 4 倍的滴度上升，表明有針對4種不同Men B菌株有改善且可接受的免疫反應的代。

【0536】結果表明，MenFive與Men-B製劑的組合不會導致任何免疫原性反應的喪失，從而表明組合製劑對任一疫苗組分均無干擾。

實例7：使用ELISA對重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白進行定量

【0537】二金雞鈉酸(BCA)法通常用於估計最終疫苗製劑中的總重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白含量。

【0538】本發明的疫苗製劑包含多於一種重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白。BCA提供總重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的定量，但不能提供疫苗製劑中存在的每種蛋白質的個別含量。

【0539】作為替代方案，使用ELISA來定量疫苗製劑中個別重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的含量。此測試亦可用作批次釋放測試。

【0540】用於定量個別重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的ELISA的材料總結於表56中。

表 56：用於蛋白質定量的材料		
材料名稱	製造商	目錄號
透明平底免疫非無菌 96 孔板	Thermo Scientific	442404
BSA	Sigma	A7030
PBS	Gibco	18912-014
Tween-20	Sigma	P-7949
抗因子 H 結合蛋白[JAR41]，兔 IgG，κ	Absolute Antibody	Ab03894-23.0
來自腦膜炎雙球菌的抗因子 H 結合蛋白[JAR5]，人 IgG1，κ	Absolute Antibody	Ab00445-10.3
抗 fHbp 抗體，克隆 JAR 11	Merck	MABF2668-100UG
抗腦膜炎球菌血清亞型 P1.4 mAb	NIBSC	02/148
抗腦膜炎球菌血清亞型 P1.14 mAb	NIBSC	03/142
抗腦膜炎球菌血清亞型 P1.9 mAb	NIBSC	05/190
多克隆山羊抗小鼠 HRP 二抗	Sigma	A4416
TMB	Sigma	T0440-1L
HCl	Fisher scientific	29507

【0541】測定工序：

【0542】步驟 1(捕獲抗體包衣)：將 JAR-41 或 JAR-5 抗體使用 0.1% BSA 的 PBS 溶液稀釋，並用於以 0.5 μg/孔至 10 μg/孔範圍進行包被，並以 100 μL/孔上樣到 96 孔板上。包衣孵育將為在室溫或 2-8℃ 下 2.5 小時至 18 小時。

【0543】步驟 2(封閉)：將 300 μL 至 320 μL 的 1% BSA

的PBS溶液添加到96孔板中，並在室溫下孵育1小時至2.5小時。

【0544】步驟3(添加標準/測試樣本)：使用0.1% BSA的PBS溶液將參考標準嵌合體從0.5 mg/mL連續稀釋至1 ng/mL，然後將50 μ L至150 μ L添加到相應的孔中。將測試樣本使用0.1% BSA的PBS溶液稀釋，使其在藉由以50 μ L至150 μ L上樣時將落入定量範圍內。在添加標準品和測試樣本兩者後，將在室溫下孵育0.5小時至2.0小時。

【0545】步驟4(偵測抗體添加)：將偵測抗體(抗POR-A P1.14 mAb/抗POR-A P1.4 mAb/抗POR-A P1.9 mAb/JAR-11 mAb)在100倍與100000倍之間任何處稀釋，並以100 μ L/孔上樣到96孔板中。偵測抗體孵育將為在室溫下0.5小時至2.0小時。

【0546】步驟5(偵測二抗添加)：將偵測二抗(山羊抗小鼠HRP抗體)在100倍與100000倍之間任何處稀釋，並以100 μ L/孔上樣到96孔板中。偵測二抗孵育將為在室溫下0.5小時至2.0小時。

【0547】步驟6(受質添加和停止)：將100 μ L的TMB受質添加到每個孔中，並在室溫下孵育10 min至45 min，然後向每個孔中添加100 μ L的1N HCl來停止孵育。立即讀取板在450/630處的吸光度。

實例8：使用BCA估算重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白中的蛋白質

【0548】目的：

【0549】 本研究的目的是提供藉由96孔板微量二金雞鈉酸(BCA)法估算Men B樣本中的蛋白質的工序。

【0550】 BCA是一種定量樣本中的蛋白質濃度的方法。在鹼性條件下， Cu^{2+} 與蛋白質反應生成 Cu^+ 。 Cu^+ 與二金雞鈉酸反應形成紫色複合物。在37℃下孵育後顯色。使用分光光度計在562 nm下偵測有色複合物。

【0551】安全性：

【0552】 在開始分析之前應遵循但不限於以下幾點：

- 工作時請穿戴適當的個人防護裝備，如手套、護目鏡等。
- 確保工作之前和之後工作區域是清潔的。
- 分析後取出或丟棄樣本/緩衝液。

【0553】材料和裝備：

- Micro BCA蛋白質測定試劑盒(Thermoscientific, 23235)，其含有
 - a. Micro BCA試劑A (MA)
 - b. Micro BCA試劑B (MB)
 - c. Micro BCA試劑C (MC)
 - d. 牛血清白蛋白標準安瓿瓶(2 mg/ml)
- 注射用水(WFI)
- 微量離心管(1.5 mL的Eppendorf管)
- 移液器和吸頭
- 96孔板

- 96孔酶標儀 (TECAN, Infinite M200)
- 平板培養箱 (Biosan恆溫搖床)

【0554】測試工序：

【0555】標準品及工作試劑的製備：

- 將培養箱設為 37℃。
- 根據 BSA 標準品 (2 mg/ml) 製備 200 µg/ml 的儲備液。
- 使用 200 µg/ml 的儲備液繪製如表 57 和第 30 圖所示的標準曲線。每次執行測定時都要繪製標準曲線。
- 藉由將 25 份 Micro BCA 試劑 MA、24 份試劑 MB 與 1 份試劑 MC 混合 (25:24:1) 來製備工作試劑。

表 57：標準品的製備			
小瓶	稀釋劑體積(µL)	BSA 的體積(µL)和來源	最終 BSA 濃度 (µg/ml)
A	349.98	150.15µl，來自 200µg/ml 儲備液	60
B	640	160µl，來自 200µg/ml 儲備液	40
C	400	400µl，來自小瓶 B 瓶稀釋液	20
D	400	400µl，來自小瓶 C 稀釋液	10
E	400	400µl，來自小瓶 D 稀釋液	5
F	400	0	0

【0556】樣本製備：

【0557】將 MEN-B 配製樣本分析為：a) 未離心的樣本；b) 離心後的上清液；和 c) 離心後的沉澱物。

- a. 未離心的樣本：製劑樣本可以取純品或稀釋品以擬合標準曲線。
- b. 上清液：取 500 µl 的各樣本，並以 8000 rpm 離心 5 分鐘。在離心後，將上清液小心地轉移到新試管中。將收集的上清液作為純樣本獲取或經稀釋以擬合曲線。
- c. 沉澱物：離心後形成的沉澱物藉由添加 500µl 的 WFI 重懸。該等樣本的稀釋度與 (a) 的樣本相同。
 - 為每個樣本和標準品準備一式兩份的稀釋液。
 - 將 150 µl 標準品和樣本轉移到平板孔中。
 - 向每個孔中添加 150 µl 的工作試劑，並在平板振盪器上徹底混合平板 30 秒。
 - 將平板加蓋並在 37℃ 下孵育 2 小時。
 - 量測 562 nm 處的吸光度，並且所獲得的結果提供在表 58 中。

表 58：562 nm 下的吸光度									
標準品	濃度 (µg/mL)	562 nm 下的吸光度 讀數 1	562 nm 下的吸光度 讀數 2	平均吸光度	歸一化的吸光度	標準偏差	CV %	標準回算值	標準回收率 (%)
B	0.000	0.0994	0.1031	0.1013	0.000	0.003	2.58	2.519	不適用
S1	5.000	0.1310	0.1403	0.1357	0.034	0.007	4.85	4.946	98.93
S2	10.000	0.1963	0.2010	0.1987	0.097	0.003	1.67	9.392	93.92
S3	20.000	0.3473	0.3470	0.3472	0.246	0.000	0.06	19.872	99.36
S4	40.000	0.6520	0.6672	0.6596	0.558	0.011	1.63	41.922	104.81
S5	60.000	0.9070	0.8924	0.8997	0.798	0.010	1.15	58.867	98.11

【0558】 吸附 % 是根據用 100 減去上清液中樣本的濃度與未經離心的相同樣本的濃度之比來計算的。吸附百分比提供在表 59 中。

表 59：吸附百分比計算										
樣本類型	樣本名稱	稀釋因子	562 nm 下的吸光度_ 讀數 1	562 nm 下的吸光度_ 讀數 2	歸一化的吸光度	蛋白質 濃度	濃度 (µg/mL)	標準 偏差	CV %	吸附%
未離心的樣本	090224-F3	12	0.7068	0.7158	0.607	43.798	525.6	0.01	0.00	90.8
可溶性形式	090224-F3	1	0.7846	0.7805	0.678	48.604	48.6	0.00	0.01	
粒子	090224-F3	12	0.6394	0.6439	0.537	39.100	469.2	0.00	0.00	

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en" dtdVersion="V1_3"
fileName="SI IPL MEN B 2023_IN202321021121_001120RDIN.xml" softwareName="WIPO
Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2024-07-16">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>113110870</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2024-03-22</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>001120RDIN</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>IN</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>IN202321021121</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-03-24</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">印度商印度血清研究公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE
LIMITED</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">基於腦膜炎球菌蛋白的疫苗製劑及其製造方法
</InventionTitle>
  <InventionTitle languageCode="en">MENINGOCOCCAL PROTEIN BASED VACCINE
FORMULATIONS AND METHODS FOR MANUFACTURING THEREOF</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>12</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>1968</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..1968</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```
<INSDQualifier id="q2">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>HIS-MBP-TEV-fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14 (SEQ ID
NO. 1)</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggccatcaccatcaccatcaccccatgaaaatcgaagaaggtaaactggtaatctggat
taacggcgataaaggctataacggtctcgtcgaagtcggtaagaaattcgagaaagataccggaattaaagtcaccgttg
agcatccggataaactggaagagaaattcccacaggttgcggcaactggcgatggccctgacattatcttctgggcacac
gaccgcttttggtggctacgctcaatctggcctgttggctgaaatcaccccgacaaagcgttccaggacaagctgtatcc
gtttacctgggatgccgtacgttacacggcaagctgattgcttaccgatcgtgttgaagcgttatcgtgatttata
acaaagatctgctgccgaacccgccaaaaacctgggaagagatcccgcgctggataaagaactgaaagcgaaaggtaag
agcgcgctgatgttcaacctgcaagaaccgtacttcacctggccgctgattgctgctgacgggggttatgcgttcaagta
tgaaaacggcaagtacgacattaaagacgtgggcgtggataacgctggcgcgaaagcgggtctgaccttccctgggttgacc
tgattaaaaacaaacacatgaatgcagacaccgattactccatcgcagaagctgcctttaataaaggcgaaacagcgatg
accatcaacggcccgtgggcatggtccaacatcgacaccagcaaagtgaattatggtgtaacggtactgccgaccttcaa
gggtcaaccatccaaaccgttcgttggcgtgctgagcgcaggtattaacgccgccagtcggaacaaagagctggcaaaag
agttcctcgaaaactatctgctgactgatgaaggctcggaaagcggttaataaagacaaaccgctgggtgccgtagcgtg
aagctttacgaggaagagttggcgaaagatccacgtattgccgccactatggaaaacgcccagaaagggtgaaatcatgcc
gaacatcccgcagatgtccgctttctggtatgccgtgcgtactgcggtgatcaacgccgccagcggctcgtcagactgtcg
atgaagccctgaaagacgcgcgactccgggtagcgaaaatctgtattttcagggtgttgacgcagatattggcaccggt
ctggcagatgcactgaccgcaccgctggatcataaagataaaggctcgtgaaaagcttgacctggaagatagcattagcca
gaatggtacactgacctgagtgacaggggtgcagaaaaaacctttaagtgggtgataaagacaacagcctgaataccg
gtaaactgaaaaacgataaaaatcacccgctttgacttcgtccagaaaattgaagttgatgggtcagaccattacactggca
agcgggtgaatttcagatctataaacagagccatagcgcagttaccgcatttcagattgaaaaaatcaacaacccggataa
aatcgatagcctgattaaccagcgtagctttctgggttggtgatttaggtggtgaacataaccgcatttaatcagctgccga
gcggtaaagcagaatatcatggtaaagcatttagcagtgatgatgccggtggcaaaactgacctataccattgattttgca
gcaaaacaaggccacggcaaaattgaacatctgaaaacaccggaacagaatgttgaactggccagcgcagaactgaaagc
cgatgaaaaaagccatgcagttattctgggtgatacccggttatggtagcgaagaaaaaggcacctatcatctggcactgt
ttggtgatcgtgcacaagaaattgcaggtagcgaaccggttaaaattcgtgcatataaaccggcatatgtggacgagaaa
aaaatggttcatgcagccgttgttggcaaaaaagtgcattgaaattgggatcgcaggtaaacagtaa</INSDSeq_sequ
ence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1956</INSDSeq_length>
```

```
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..1956</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q24">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>HIS-MBP-TEV-fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4 (SEQ ID
NO. 2)</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggccatcaccatcaccatcaccccatgaaaatcgaagaaggtaaactggtaatctggat
taacggcgataaaggctataacggtctcgtcgaagtcggtaagaaattcgagaaagataccggaattaaagtcaccgttg
agcatccggataaactggaagagaaattcccacaggttgccggaactggcgatggccctgacattatcttctgggcacac
gaccgctttggtggctacgctcaatctggcctgttggctgaaatcaccccgacaaagcggtccaggacaagctgtatcc
gtttacctgggatgccgtacgttacacggcaagctgattgcttaccgatcgctgttggaagcggttatcgctgatttata
acaaagatctgctgccgaacccgccaaaaacctgggaagagatcccggcgctggataaagaactgaaagcgaaaggtaag
agcgcgctgatgttcaacctgcaagaaccgtacttcacctggccgctgattgctgctgacgggggttatgcgttcaagta
tgaaaacggcaagtacgacattaaagacgtgggcgtggataacgctggcgcgaaagcgggtctgaccttccctggttgacc
tgattaaaaacaaacacatgaatgcgacacccgattactccatcgcagaagctgcctttaataaaggcgaaacagcgatg
accatcaacggcccgtgggcatggtccaacatcgacaccagcaaagtgaattatggtgtaacggtactgccgaccttcaa
gggtcaaccatccaaaccgttcgttggcgtgctgagcgcgaggtattaacgccgccagtcggaacaaagagctggcaaaag
agttcctcgaaaactatctgctgactgatgaaggcttggaagcggttaataaagacaaaccgctgggtgccgtagcgctg
aagtccttacgaggaagagttggcgaaagatccacgtattgccgccactatggaaaacgcccagaaagggtgaaatcatgcc
gaacatcccgcagatgtccgctttctggtatgccgtgcgtactgcggtgatcaacgccgccagcggtcgtcagactgtcg
atgaagccctgaaagacgcgcagactccgggtagcgaaaatctgtatcttcagggtgttgagcagatattggtgcaggt
ctggcagatgcactgaccgcaccgctggatcataaagataaaggcttcgagagcttgaccctggatcagagcggttcgtaa
aaatgaaaaactgaaactggcagcacagggtgcagaaaaaacctatggtaattggtgatagcctgaataccggcaaaactga
aaaatgataaagttagccgctttgattttatccgccagattgaagttgatggtcagctgattaccctggaaagcggtgaa
tttcagatctataaacagagccatagcgcgattaccgcatttcagattgaaaaaatcaacaacccggacaaaaattgacag
cctgattaaccagcgtagctttctggttggtgatttaggtggtgaacataccgcatttaaccagctgccgagcggtaaag
cagaatatcatggttaaagcatttagcagtgatgatgccggtggttaaactgacctataccattgattttgcagccaaacaa
```

```
ggccatggcaaaattgaacatctgaaaacaccggaacagaatgttgaactggcaagcgcagaactgaaagccgatgaaaa
aagccatgcagttatttctgggtgatacccgttatgggtggtgaagaaaaaggcacctatcatctggcactgtttgggtgatc
gtgcacaagaaattgcaggtagcgcgaaccgttaaagcatatacaccggcacatgtttgtggttaataacaaagtgtgaacc
catgttccggcagttgttggtcatcatgaaattgggatcgcaggtaaacagtaa</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1950</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1950</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q25">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>HIS-MBP-TEV-fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO.
3)</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>atgggccatcaccatcaccatcaccccatgaaaaatcgaagaaggtaaactggtaatctggat
taacggcgataaaggctataacggtctcgctgaagtcggtaagaaattcgagaaagataccggaattaaagtcaccgttg
agcatccggataaactggaagagaaattcccacaggttgcggcaactggcgatggccctgacattatcttctgggcacac
gaccgctttggtggctacgctcaatctggcctgttggctgaaatcaccccggaacaaagcgttccaggacaagctgtatcc
gtttacctgggatgccgtacgttacacggcaagctgattgcttaccgatcgctgttgaagcgttatcgctgatttata
acaaagatctgctgccgaaccgcccaaaaacctgggaagagatcccgcgctggataaagaactgaaagcgaaaggtaag
agcgcgctgatgttcaacctgcaagaaccgtacttcacctggccgctgattgctgctgacgggggttatgcgttcaagta
tgaaaacggcaagtacgacattaaagacgtgggcgtggataacgctggcgcgaaagcgggtctgaccttcctggttgacc
tgattaaaaacaaacacatgaatgcagacaccgattactccatcgcagaagctgcctttaataaaggcgaaacagcgatg
accatcaacggcccgtgggcacgttccaacatcgacaccagcaaagtgaattatggtgtaacggtactgccgaccttcaa
gggtcaaccatccaaaccgttcgttggcgtgctgagcgcaggtattaacgccgccagtcggaacaaagagctggcaaaag
agttcctcgaaaactatctgctgactgatgaaggtctggaagcggttaataaagacaaaccgctgggtgccgtagcgcgtg
```

aagtccttacgaggaagagttggcgaaagatccacgtattgccgccactatggaaaacgccagaaaggtgaaatcatgccgaacatccccgcagatgtccgctttctgggtatgccgtgcgtactgccggtgatcaacgccgccagcggctcgtcagactgtcgtatgaagccctgaaagacgcgcagactccgggtagcgaaaaatctgtattttcagggtgtttgcagcagatatattggtgcaggtctggcagatgcactgaccgcaccgctggatcataaaagataaaaagcctgcagagtcctgacctggatcagagcgttcgtaa
aaatgaaaaactgaaactggcgagcacagggtgcagaaaaaacctatggtaattggtgatagcctgaataccggcgaactga
aaaatgataaaagtgagccgctttgattttatccgccagattgaagttgatggtcagctgattaccttggaagcggtgaa
tttcagggtgtataaacagagccatagtgccttgacagcactgcagaccgaacaagaacaggatccggaacatagcggtaa
aatggttgcaaaacgtcgttttaaaatcggtgatattgccggtgaacataaccagctttgataaaactgccgaaagatgtta
tggaacctatcgtggcaccgcatttggtagtgatgatgccggtggtaaactgacctataccattgattttgcagccaaa
caaggccatggcaaaattgaacatctgaaaagtcgggaactgaatgttgaactggcaaccgcataatacaaacggatga
aaaacatcatgccgttatttagcggtagcgttctgtataatcaggatgagaaaggtagctatagcctgggtattttgggtg
gtcagggcacaagaagttgcaggttcagccgaagttgaagcatatacaccggcataatgttgatgagcagagcaaataatcat
gcagccgttggttggtaaacatcacattggcctggcgagcaaaacagtaa</INSIDSeq_sequence>

</INSDSeq>

</SequenceData>

<SequenceData sequenceIDNumber=" 4" >

 $\langle \text{INSDSeq} \rangle$

<INSDSeq_length>1959</INSDSeq_length>

<INSDSeq_mol type>DNA</INSDSeq_mol type>

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

<INSDSeq_feature-table>

<INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..1959</INSDFeature_location>

<INSDFeature_qual>

<INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>

</INSDQualifier>

<INSDQualifier id="q26">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>HIS-MBP-TEV-fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4 (SEQ ID NO.

4)</INSDQualifier_value>

</INSDQualifier>

</INSDFeature_qual>

</INSDFeature>

</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>atgggccatcaccatcaccatcaccccatgaaaatcgaagaaggtaaactggtaatctggat
taacggcgataaaggctataacggtctcgc tgaagtcggtaagaaattcgagaaagataccggaattaaagtcaccgttg
agcatccggataaaactggaagagaaaattccacaggttgcggcaactggcgatggccctgacattatcttctgggcacac

gaccgctttggtggctacgctcaatctggcctgttggctgaaatcaccccgacaaagcgttccaggacaagctgtatcc
gtttacctgggatgccgtacgttacacggcaagctgattgcttaccgatcgctgttgaagcgttatcgctgatttata
acaaagatctgctgccgaacccgccaaaaacctgggaagagatcccggcgctggataaagaactgaaagcgaaaggtaag
agcgcgctgatgttcaacctgcaagaaccgtacttcacctggccgctgattgctgctgacgggggttatgctgtcaagta
tgaaaacggcaagtacgacattaaagacgtgggcgtggataacgctggcgcgaaagcgggtctgaccttcctggttgacc
tgattaaaaacaaacacatgaatgcagacaccgattactccatcgcagaagctgcctttaataaaggcgaaacagcgatg
accatcaacggcccgtgggcatggtccaacatcgacaccagcaaagtgaattatggtgtaacggtactgccgaccttcaa
gggtcaaccatccaaaccgttctgttggcgtgctgagcgcaggtattaacgccgccagtcgcaacaaagagctggcaaaag
agttcctcgaaaactatctgctgactgatgaaggcttggaagcggttaataaagacaaaccgctgggtgccgtagcgtg
aagtcttacgaggaagagttggcgaaagatccacgtattgccgccactatggaaaacgcccgaaaggtgaaatcatgcc
gaacatcccgcagatgtccgctttctggtatgccgtgcgtactgcggtgatcaacgccgccagcggtcgtcagactgtcg
atgaagccctgaaagacgcgcagactccgggtagcgaaaatctgtattttcagggtgtcgccgccgacatcggtgcgggg
cttgccgatgcactaacgcaccgctcgaccataaagacaaaggtttgcagtccttgacgctggatcagtcgcgtcaggaa
aaacgagaaactgaagctggcggcacaaggtgcggaaaaaacttatggaaacggtgacagcctcaatacggggcaaatga
agaacgacaaggtcagccgtttcgactttatccgccaaatcgaagtggacgggcagctcattaccttgagagtgagag
ttccaagtatacaaacaagccattccgccttaaccgccttcagaccgagcaaatacaagattcgagcattccgggaa
gatggttgcgaaacgccagttcagaatcggcgacatagcgggcgaacatacatcttttgacaagcttcccgaaggcggca
gggcgacatatcgcgggacggcggttcggttcagacgatgccggcggaactgacctacaccatagatttcgccgccaaag
cagggaacggcaaaatcgaacatttgaaatcgccagaactcaatgtcgacctggccgccgccgatatcaagccggatgg
aaaacgccatgccgtcatcagcggttccgtcctttacaaccaagccgagaaaggcagttactccctcggtatctttggcg
gaaaagcccaggaagttgccggcagcgcggaagtgaagcatatacaccggcacatgttgtgtggttaataacaaagttgca
acccatgttccggcagttgttggtaaacgccatatcggccttgccgccgaagcaataa</INSDSeq_sequence>

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1950</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1950</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q27">
```

```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>HIS-MBP-TEV-fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO.
5)</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggccatcaccatcaccatcaccccatgaaaatcgaagaaggtaaactggtaatctggat
taacggcgataaaggctataacggtctcgtcgaagtcggtaagaaattcgagaaagataccggaattaaagtcaccgttg
agcatccggataaactggaagagaaattcccacaggttgccggaactggcgatggccctgacattatcttctgggcacac
gaccgctttggtggctacgctcaatctggcctgtttggctgaaatcaccccgacaaagcgttccaggacaagctgtatcc
gtttacctgggatgccgtacgttacacggcaagctgattgcttaccgatcgctgttgaaagcgttatcgctgatttata
acaaagatctgctgccgaacccgccaaaaacctgggaagagatcccggcgctggataaagaactgaaagcgaaaggtaag
agcgcgctgatgttcaacctgcaagaaccgtacttcacctggccgctgattgctgctgacgggggttatgcgttcaagta
tgaaaacggcaagtacgacattaaagacgtgggcgtggataacgctggcgcgaaagcgggtctgaccttcctggttgacc
tgattaaaaacaaacacatgaatgcagacaccgattactccatcgcagaagctgcctttaataaaggcgaaacagcgatg
accatcaacggcccgtgggcatggtccaacatcgacaccagcaaagtgaattatggtgtaacggtactgccgaccttcaa
gggtcaaccatccaaaccgttgcgttggcgtgctgagcgcaggtattaacgccgccagtcggaacaaagagctggcaaaag
agttcctcgaaaactatctgctgactgatgaaggcttggaagcggttaataaagacaaaccgctgggtgccgtagcgctg
aagtcttacgaggaagagttggcgaaagatccacgtattgccgccactatggaaaacgcccgaaaggtgaaatcatgcc
gaacatcccgcagatgtccgctttctggtatgccgtgcgtactgcggtgatcaacgccgccagcggtcgtcagactgtcg
atgaagccctgaaagacgcgcagactccgggtagcgaaaatctgtatcttcagggtgtcgccgccgacatcggtgcgggg
cttgccgatgcactaacgcaccgctcgaccataaagacaaaggtttgcagctcttgacgctggatcagtcctgcaggaa
aaacgagaaactgaagctggcggcacaaggtgcggaaaaaacttatggaaacggtgacagcctcaatacggggcaaatga
agaacgacaaggtcagccgtttcgactttatccgccaaatcgaagtggacgggcagctcattaccttgagagtgagag
ttccaagtatacaaaacaaagccattccgccttaaccgccttcagaccgagcaaatacaagattcgagacattccgggaa
gatggttgcgaaacgccagttcagaatcggcgacatagcgggcgaacatacatcttttgacaagcttcccgaaggcggca
ggcgacatatcgcgggacggcggttcggttcagacgatgccggcggaaaactgacctacaccatagatttcgccgccaaag
cagggaacggcaaaatcgaacatttgaaatcgccagaactcaatgtcgacctggccgccgccgatataagccggatgg
aaaacgccatgccgtcatcagcggttccgtcctttacaaccaagccgagaaaggcagttactccctcggtatctttggcg
gaaaagcccaggaagttgccggcagcgcggaagtgaagcatatacaccggcatatgttgatgagcagagcaaatatcat
gcagccgttggtgtaaacgcccatatcggccttgccgccaagcaataa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>270</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```

```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..270</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q28">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14 (SEQ ID NO.
6)</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTLTLSAQGAEKTFKVGDKDNSLNT
GKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQSHSAVTAFAQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVGD LGGEHTAFNQLP
SGKAEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLAL
FGDRAQEIAGSATVKIRAYKPAYVDEKKMVHA AVVGKKVHEIGIAGKQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>266</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..266</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q29">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```
<INSDQualifier_value>fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4 (SEQ ID NO.
7)</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKL
KNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQIYKQSHSAVTAFAQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVGD LGGEHTAFNQLPSGK
AEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGGEEKGTYHLALFGD
RAQEIAGSATVKAYTPAHVVVNNKVATHVPAVVGHHEIGIAGKQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>264</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..264</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q30">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO.
8)</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKL
KNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQE QDPEHSGKMVAKRRFKIGDIAGEHTSFDKLPKDV
MATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFG
GQAQEVAGSAEVEAYTPAYVDEQSKYHAAVVGKHHIGLAAKQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 9" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>267</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..267</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q31">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4 (SEQ ID NO.
9)</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEKTYGNGDSLNTGKL
KNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGG
RATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEGKSYSGLIFG
GKAQEVAGSAEVKAYTPAHVVVNNKVATHVPAVVGKRHIGLAAKQ</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 10" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>264</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..264</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
```

```
<INSDQualifier>
  <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q32">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9 (SEQ ID NO.
10)</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAAQGAEKTYGNGDSLNTGKL
KNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPegg
RATYRGTAFGSDDAGGKLTyTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAekGSysSLGIFG
GKAQEVAGSAEVKAYTPAYVDEQSKYHAAVVGKRHIGLAakQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>1395</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..1395</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>unassigned DNA</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q33">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>HIS GST TEV Protease NA SEQ ID No.
11</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>atgggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctgggtgccgcgcggcagccatat
gtcccctatactagggttattggaaaattaagggccttgtgcaaccactcgacttcttttggaatatcttgaagaaaaat
atgaagagcatttgtatgagcgcgatgaaggtgataaatggcgaaacaaaaagtttgaattgggtttggagtttcccaat
cttccttattatattgatgggtgatgttaaattaacacagtcctatggccatcatacgttatatagctgacaagcacaacat
gttgggtgggtgtccaaaagagcgtgcagagatttcaatgcttgaaggagcggttttggatattagatacgggtgttcga
gaattgcatatagtaaagactttgaaactctcaaagttgattttcttagcaagctacctgaaatgctgaaaatgttcgaa
gatcgttttatgtcataaaacatatttaaatgggtgatcatgtaaccatcctgacttcatgtttgtatgacgctcttgatgt
tgttttatacatggaccaatgtgcctggatgcgttcccaaaattagtttgttttaaaaaacgtattgaagctatcccac
aaattgataagtacttgaaatccagcaagtatatagcatggcctttgcagggctggcaagccacgtttgggtgggtggcgac
catcctccaaaaggagaaagcttgtttaagggaccacgtgattacaaccgatatcgagcaccatttgtcatttgacgaa
tgaatctgatgggcacacaacatcgttgtatgggtattggatttgggtcccttcatcattacaacaagcacttgtttcgtc
gcaataatggaacactgttgggtccaatcactacatgggtgtattcaaggtcaaggacaccgcgactttgcaacaacacctc
attgatgggagggacatgatgattattcgcatgcctaaggatttcccaccatttctcaaaagctgaaatttagagagcc
acaaagggaagagcgcataatgtcttgtgacaaccaacttccaagctaagagcatgtctagcatgggtgtcagacactagtt
gcacattcccttcatctgatggtatattctggaagcattggattcaaaccaaggatgggcagtggtggcagtcattagta
tcaactagagatgggttcattgttgggtatacactcagcatcgaatttcaccaacacaaacaattatttcacaagcgtgcc
gaaaaacttcatggaattgttgacaaatcaggaggcgcagcagtggttagtggttggcgattaaacgctgactcagtat
tgtgggggggccataaagttttcatgggtcaaacctgaagaacctggttcttaa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>464</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..464</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q34">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>HIS-GST-TEV Protease AA SEQ ID NO.
12</INSDQualifier_value>
```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWR
NKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAESMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDF
LSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWP
LQGWQATFGGGDHPPKGESLFGKPRDYNPISSTICHLTNESDGHTTSLYIGFGPFIITNKHLFRRNNGTLLVQSLHG VF
KVKDTATLQQHLIDGRDMMIIRMPKDFPPFPQKLKFREPQREERICLVTTNFQAKSMSSMVSDTSCTFPSSDGIFWKHWI
QTKDGQCGSPLVSTRDGFIVGIHSASNFTNTNNYFTSVPKNFMELLTNQEAQQWVSGWRLNADSVLWGGHKVFMVKPEEP
GS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)，其包含一野生型fHbp變體及至少一個外源環，其中

a.該經修飾的因子H結合蛋白(fHbp)選自與序列SEQ ID No. 6至SEQ ID No. 10中的任一者具有至少75%同一性的一胺基酸序列，

b.該至少一個外源胜肽環係免疫原性的，

c.該至少一個外源胜肽環來源於一細菌膜蛋白，

d.該經修飾的fHbp是一融合蛋白，

e.該fHbp變體選自v1、v2及v3，經插入到fHbp中的一β轉角區中的至少一個包含至少10個胺基酸的PorA環修飾；並且

f.該PorA環選自VR1、及VR2。

【請求項2】如請求項1所述之經修飾的因子H結合蛋白，其中該經修飾的fHbp包含一野生型fHbp變體及至少一個外源性細菌膜蛋白胜肽環，或者其中該經修飾的fHbp係一融合蛋白。

【請求項3】如前述請求項中任一項所述之經修飾的因子H結合蛋白，其中該經修飾的fHbp經修飾以降低因子H結合活性。

【請求項4】一種編碼該經修飾的fHbp的核酸序列，其中該核酸序列與序列SEQ ID NO. 1至SEQ ID NO. 5中的任一者具有至少75%的同一性。

【請求項5】一種免疫原性組成物，其包含至少一種

如前述請求項中任一項所述之經修飾的 fHbp 或如請求項 4 所述之編碼該經修飾的 fHbp 的該核酸序列。

【請求項 6】如請求項 5 所述之免疫原性組成物，其中該組成物包含兩種或更多種不同的經修飾 fHbp。

【請求項 7】如前述請求項中任一項所述之免疫原性組成物，其中該組成物包含一醫藥學上可接受的載劑。

【請求項 8】如前述請求項中任一項所述之免疫原性組成物，其中該組成物進一步包含一佐劑。

【請求項 9】如前述請求項中任一項所述之免疫原性組成物，其中該組成物進一步包含至少一種其他預防或治療活性分子，該至少一種其他預防或治療活性分子包括一單價載體蛋白：莢膜多糖綴合物疫苗。

【請求項 10】如前述請求項中任一項所述之免疫原性組成物，其中帶有外源胜肽環的該 fHbp 支架被作為該綴合疫苗中的該蛋白載體分子摻入。

【請求項 11】如前述請求項中任一項所述之免疫原性組成物，其包含一重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白與至少一種選自以下的額外抗原的組合：

- 一來自 PorB、FetA、OmpC、NHBA、NadA、腦膜炎球菌抗原 287、NspA、HmbR、NhhA、App、936 的蛋白抗原，

- 一糖類或綴合抗原，其來自腦膜炎雙球菌血清群 A、C、W、Y 及 / 或 X，

- 一來自肺炎鏈球菌的糖類或綴合抗原，

- 一白喉抗原，諸如白喉類毒素，例如 CRM197 突變體，
- 一破傷風抗原，諸如破傷風類毒素，
- 一來自百日咳桿菌的抗原、無細胞或全細胞百日咳抗原，
- 一來自乙型流感嗜血桿菌的糖類或綴合抗原，
- 脊髓灰質炎抗原，諸如 IPV，
- 麻疹、腮腺炎及/或風疹抗原，
- 流感抗原，諸如血球凝集素及/或神經胺酸酶表面蛋白，
- 來自無乳鏈球菌(B群鏈球菌)的抗原(蛋白質或糖或綴合物)，
- 來自化膿性鏈球菌(A群鏈球菌)的抗原(蛋白質或糖或綴合物)，
- 來自金黃色葡萄球菌的抗原(蛋白質、糖或綴合物)，
- 來自沙門氏菌屬種屬的抗原(蛋白質或糖或綴合物)。

【請求項 12】如前述請求項中任一項所述之免疫原性組成物，其中帶有外源胜肽環的該 fHbp 支架被作為該蛋白質載體分子摻入該多糖綴合物疫苗中，該多糖綴合物疫苗選自單價(A、X、C、W、Y)、二價(A-C、A-B、X-B、C-B)、三價(AC-B、AC-Hib)、四價(AC-Hib-B)、五價(ACWYX)、或六價(ACWYX-B)。

【請求項 13】如請求項 1 至 3 中任一項所述之經修飾的 fHbp、如請求項 4 所述之核酸、或如請求項 5 至 9 中任一項

所述之組成物，其用作一藥物，或用於治療或預防一受試者的一病原體感染或定殖。

【請求項 14】一種如請求項 1 至 3 中任一項所述之經修飾的 fHbp、如請求項 4 所述之核酸、或如請求項 5 至 9 中任一項所述之組成物與至少一種其他預防或治療活性分子的組合。

【請求項 15】如請求項 13 所述之組合或如請求項 9 所述之組成物，其中該至少一種其他預防或治療活性分子包括一綴合物疫苗，包括選自 A、C、Y、W、或 X 毒株，或其組合的任意血清群莢膜多糖。

【請求項 16】如請求項 15 所述之組合或如請求項 9 所述之組成物，其中該蛋白質：莢膜多糖疫苗包括以下中的任一者：具有細菌類毒素的血清群 C 或 A 莢膜、二價疫苗（具有與細菌類毒素綴合的血清群 C 和 A 莢膜多糖）、四價（與細菌類毒素綴合的血清群 A、C、Y、W 多糖）或五價（與細菌類毒素綴合的血清群 A、C、Y、W、X 多糖）綴合物疫苗。

【請求項 17】如請求項 1 至 3 所述之因子 H 結合蛋白（fHbp），其如並且當用作一表位展示支架時。

【請求項 18】一種疫苗製劑，其包含至少一種重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白、一佐劑及一或多種醫藥學上可接受的賦形劑，其中在該重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白中，該一或多個外源環選自但不限於由以下組成的群組：轉鐵蛋白結合蛋白、奈瑟氏球菌肝素結合蛋白、奈瑟

氏球菌表面蛋白 A、PorA、腦膜炎球菌腸桿菌素受體 FetA、奈瑟氏球菌黏附素 A、如前述請求項中任一項所述之 fHbp-fHbp 融合蛋白或其組合，較佳地其中該重組蛋白 / 經修飾的 fHbp 融合蛋白為如前述請求項中任一項所述之 fHbp，並且其中該 fHbp 來源於腦膜炎雙球菌血清群 A、B、C、H、I、K、L、29E、W135、X、Y 及 Z。

【請求項 19】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其中該佐劑選自由以下項組成的群組：氫氧化鋁、磷酸鋁、羥基磷酸鋁、及硫酸鋁鉀、MF-59、脂質體、脂多糖、皂苷、脂質 A、脂質 A 衍生物、單磷醯脂質 A、GLA、3-脫乙醯單磷醯脂質 A、AS01、AS03、AF3、IL-2、RANTES、GM-CSF、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、LFA-3、CD72、B7-1、B7-2、OX-40L 及 41BBL、寡核苷酸、包含至少一個非甲基化的 CpG 的寡核苷酸及 / 或脂質體的寡核苷酸、弗氏佐劑、弗氏完全佐劑、弗氏不完全佐劑、聚合物、共聚物諸如聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物，包括嵌段共聚物、聚合物 p 1005、CRL-8300 佐劑、胞壁醯二肽諸如 TLR1/2 激動劑、TLR2 激動劑、TLR3 激動劑、TLR-4 激動劑、TLR5 激動劑、TLR7 激動劑、TLR7/8 激動劑、TLR8 激動劑、TLR9 激動劑、ODN 2216(A 型) 激動劑、TLR11/12、TLR-4 激動劑、鞭毛蛋白、源自革蘭氏陰性細菌的鞭毛蛋白、TLR-5 激動劑、能夠與 TLR-5 受體結合的鞭毛蛋白的片段、 α -C-半乳糖苷基神經醯胺、幾丁質、介白素-2、QS-21、角鯊烯、Quil A、霍亂毒素 B 亞基、聚

磷腈及其衍生物、分枝桿菌細胞壁製備物、黴菌酸衍生物、非離子嵌段共聚物表面活性劑、OMV，fHbp、皂苷與固醇及脂質的組合、dmLT、1,25-二羥基維生素D3、CAF01、聚[二(羧基合苯氧基)-磷腈](PCPP)及委內瑞拉馬腦炎(VEE)複製子粒子或其組合。

【請求項20】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其中該佐劑係粒徑>500 nm的氫氧化鋁。

【請求項21】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其中該一或多種醫藥學上可接受的賦形劑係

a.一緩衝劑，其選自碳酸鹽、磷酸鹽、醋酸鹽、HEPES、琥珀酸鹽、TRIS、硼酸鹽、檸檬酸鹽、乳酸鹽、葡萄糖酸鹽、酒石酸鹽或其組合；

b.一糖，其選自海藻糖、甘露糖、棉子糖、乳糖酸、葡萄糖、麥芽酮糖、異麥芽酮糖、麥芽糖、乳糖、右旋糖、果糖或其組合；

c.一糖醇或多元醇，其選自甘露醇、乳糖醇、山梨醇、甘油、木糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、赤蘚糖醇、異麥芽酮糖醇和氫化澱粉水解物或其組合；

d.一表面活性劑，其選自：聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯65、聚山梨醇酯85、壬基苯氧基聚乙氧基乙醇、辛基苯氧基聚乙氧基乙醇、辛基聚醇40、壬基醇醚-9、三乙醇胺、三乙醇胺多勝肽油酸酯、聚氧乙烯-660羥基硬脂酸酯、聚氧乙烯-35蓖麻油酸酯、大豆卵磷脂、泊洛沙姆、環氧乙烷(EO)、環氧丙烷

(PO)及/或環氧丁烷(BO)的共聚物、辛苯聚醇、磷脂、壬基酚聚氧乙烯醚、衍生自月桂醇、鯨蠟醇、硬脂醇及油醇的聚氧乙烯脂肪醚、脫水山梨醇酯或其組合；

e.一聚合物，其選自葡聚糖、羧甲基纖維素、透明質酸、環糊精或其組合；

f.一鹽，其選自NaCl、KCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·2H₂O、CaCl₂、MgCl₂或其組合；

g.一胺基酸，其選自三(羥甲基)甲基甘氨酸、亮胺酸、異亮胺酸、甘胺酸、穀胺醯胺、L-精胺酸、L-精胺酸鹽酸鹽、離胺酸、L-丙胺酸、色胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、纈胺酸、半胱胺酸、甘胺酸、甲硫胺酸、脯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸或其組合；

h.一水解蛋白，其選自明膠、乳清蛋白水解物、麩胺酸鈉、膠原蛋白水解物、角蛋白水解物、胨肽、酪蛋白水解物、乳清蛋白水解物、血清白蛋白或其組合；

i.一防腐劑，其選自苯氧乙醇、苯索寧氯鹽(苯紮氯銨)、苯酚、間甲酚、硫柳汞、甲醛、對羥基苯甲酸酯、苯索寧氯鹽、苯甲醇、氯丁醇、對氯間甲酚、苯甲醇或其組合；以及

j.一液體載體，其選自注射用水(WFI)或鹽水。

【請求項22】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其中該疫苗製劑包含：

如前述請求項中任一項所述之至少一種重組蛋白/至少一種經修飾的fHbp；

氫氧化鋁；
甘露醇；
磷酸鹽；和
聚山梨醇酯。

【請求項 23】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其中該疫苗製劑包含：

與胺基酸序列 SEQ ID NO. 6 至 SEQ ID NO. 10 中的任一者具有至少 75% 的同一性的胺基酸序列的至少一種經修飾的 fHbp；或

編碼與核酸序列 SEQ ID NO. 1 至 SEQ ID NO. 5 中的任一者具有至少 75% 的同一性的核酸序列的至少一種經修飾的 fHbp；以及

氫氧化鋁；
甘露醇；
磷酸鹽；及
聚山梨醇酯。

【請求項 24】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其包含 (i) 至少一種重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白；(ii) 量在 0.5 mg/ml 至 4.5 mg/ml 的範圍中的氫氧化鋁；(iii) 量在 5 mg/ml 至 100 mg/ml 的範圍中的甘露醇；(iv) 量在 1 mM 至 10 mM 的範圍中的磷酸鹽緩衝液；以及 (v) 量在 0.01 mg/ml 至 2 mg/ml 的範圍中的聚山梨醇酯 20；其中每種重組蛋白/經修飾的 fHbp 融合蛋白以在 15 µg/ml 至 150 µg/ml 範圍內的量存在。

【請求項 25】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其中該疫苗製劑包含：

與胺基酸序列 SEQ ID NO. 6 至 SEQ ID NO. 10 中的任一者具有至少 75% 的同一性的胺基酸序列的至少一種經修飾的 fHbp；或

編碼與核酸序列 SEQ ID NO. 1 至 SEQ ID NO. 5 中的任一者具有至少 75% 的同一性的核酸序列的至少一種經修飾的 fHbp；

以及

氫氧化鋁，其量在 0.5 mg/ml 至 4.5 mg/ml 的範圍內；

甘露醇，其量在 5 mg/ml 至 100 mg/ml 的範圍內；

磷酸鹽緩衝液，其量在 1 mM 至 10 mM 的範圍內；以及

聚山梨醇酯 20，其量在 0.01 mg/ml 至 2 mg/ml 的範圍內。

【請求項 26】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其包含：

a.fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(為 SEQ ID NO. 6，或由 SEQ ID NO. 1 編碼)，其量在 15 µg/ml 至 150 µg/ml 的範圍內；或

b.fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(為 SEQ ID NO. 7，或由 SEQ ID NO. 2 編碼)，其量在 15 µg/ml 至 150 µg/ml 的範圍內；或

c.fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(為 SEQ ID NO. 8，或由 SEQ ID NO. 3 編碼)，其量在 15 µg/ml 至 150 µg/ml 的範圍內。

圍內；或

d.fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.4(為 SEQ ID NO. 9，或由 SEQ ID NO. 4 編碼，其量在 15 $\mu\text{g/ml}$ 至 150 $\mu\text{g/ml}$ 的範圍內；以及

e. 氫氧化鋁，其量在 0.5 mg/ml 至 4.5 mg/ml 的範圍內；

f. 甘露醇，其量在 5 mg/ml 至 100 mg/ml 的範圍內；

g. 磷酸鹽緩衝液，其量在 1 mM 至 10 mM 的範圍內；以及

h. 聚山梨醇酯 20，其量在 0.01 mg/ml 至 2 mg/ml 的範圍內。

【請求項 27】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其包含：

a.fHbpV3.45 M5:PorA316-320/exP1.14(為 SEQ ID NO. 6，或由 SEQ ID NO. 1 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/mL}$ 至 150 $\mu\text{g/mL}$ 的範圍內；或

b.fHbpV2.19 M6:PorA316-320/exP1.4(為 SEQ ID NO. 7，或由 SEQ ID NO. 2 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/mL}$ 至 150 $\mu\text{g/mL}$ 的範圍內；或

c.fHbpV1.1:PorA307-311/exP1.9(為 SEQ ID NO. 10，或由 SEQ ID NO. 5 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/mL}$ 至 150 $\mu\text{g/mL}$ 的範圍內；或

d.fHbpV1.14:PorA307-311/exP1.9(為 SEQ ID NO. 8，或由 SEQ ID NO. 3 編碼)，其量在 15 $\mu\text{g/mL}$ 至 150 $\mu\text{g/mL}$ 的範圍內；以及

- e. 氫氧化鋁，其量在 0.5mg/mL 至 4.5mg/mL 的範圍內；
- f. 甘露醇，其量在 5 mg/mL 至 100 mg/mL 的範圍內；
- g. 磷酸鹽緩衝液，其量在 1 mM 至 10 mM 的範圍內；以及
- h. 聚山梨醇酯 20，其量在 0.01 mg/mL 至 2 mg/mL 的範圍內。

【請求項 28】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其中該製劑含量在 1 mg/mL 至 10 mg/ml 範圍內的 2-苯氧乙醇。

【請求項 29】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其進一步包含一或多種選自以下的抗原：白喉類毒素(D)、破傷風類毒素(T)、全細胞百日咳(wP)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、流感嗜血桿菌 b PRP-載體蛋白綴合物(Hib)、流感嗜血桿菌(a、c、d、e、f 血清型及無莢膜毒株)、腦膜炎雙球菌 A 抗原、腦膜炎雙球菌 C 抗原、腦膜炎雙球菌 W-135 抗原、腦膜炎雙球菌 Y 抗原、腦膜炎雙球菌 X 抗原、肺炎鏈球菌抗原、腦膜炎雙球菌 B 胞疹或純化抗原、金黃色葡萄球菌抗原、炭疽、BCG、肝炎(A、C、D、E、F 及 G 毒株)抗原、人乳頭瘤病毒、HIV、傷寒沙門氏菌抗原、無細胞百日咳、經修飾的腺苷酸環化酶、瘧疾抗原(RTS,S)、麻疹、腮腺炎、風疹、登革熱、寨卡病毒、埃博拉病毒、基孔肯雅熱病毒、日本腦炎、輪狀病毒、腹瀉抗原、黃病毒、天花、黃熱病、帶狀胞疹、水痘病毒抗原、及其組合。

【請求項30】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其包含(i)至少一種包含穩定的非功能性/非脂化的fHbp及PorA VR2環的融合蛋白，以及(ii)至少一種多糖-蛋白質綴合物。

【請求項31】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其中該重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白與選自BEXSERO、MENVEO、MENACTRA、NIMENRIX、MenQuadFi、MENFIVE、MenAfriVac、Men AC、及Men ACHib中的一或多種疫苗共施用。

【請求項32】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其包含i)至少一種融合蛋白，其包含穩定的非功能性/非脂化的fHbp及PorA VR2環以及至少一種選自以下的綴合物：(a) (i)血清群A腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物；(b) (i)血清群C腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(c) (i)血清群Y腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；(d) (i)血清群W135腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii) CRM197的綴合物；以及(d) (i)血清群X腦膜炎雙球菌的莢膜糖與(ii)破傷風類毒素的綴合物。

【請求項33】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其用於治療或預防由B腦膜炎雙球菌血清群B引起的感染及/或疾病，或其中該疫苗製劑闡明瞭針對淋病雙球菌毒株及腦膜炎雙球菌血清群ACWYX的交叉保護。

【請求項34】如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑，其中該重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白在一佐劑上

的吸附百分比在70%至100%的範圍內。

【請求項35】一種製造如前述請求項中任一項所述之疫苗製劑的方法，該方法包括以下步驟：

- (a)在營養培養基中培養包含表現載體的宿主細胞；
- (b)誘導該等宿主細胞表現蛋白質；
- (c)收穫並分離該等宿主細胞；
- (d)裂解該等收穫的細胞並分離宿主細胞碎片以獲得帶標籤蛋白；
- (e)純化該等帶標籤蛋白；
- (f)從該等帶標籤蛋白中移除標籤以獲得重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；
- (g)純化該等重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白；以及
- (h)製備包含該等純化重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白的疫苗製劑。

【請求項36】如前述請求項中任一項所述之方法，其中使用層析步驟純化步驟(e)中的該帶標籤蛋白，然後進行濃縮及滲濾。

【請求項37】如前述請求項中任一項所述之方法，其中使用蛋白質:TEV蛋白酶比率在5:1至30:1範圍內的TEV蛋白酶移除該等標籤。

【請求項38】如前述請求項中任一項所述之方法，其中使用層析步驟純化步驟(g)中的該重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白，然後進行濃縮及滲濾。

【請求項39】如前述請求項中任一項所述之方法，其

中該等帶標籤蛋白作為包涵體(IB)表現並藉由蛋白質的尿素解折疊和蛋白質的柱上重折疊進行純化。

【請求項40】如前述請求項中任一項所述之方法，其中該疫苗製劑藉由以下方式製備：將個別重組蛋白/經修飾的fHbp融合蛋白吸附到一佐劑上，然後添加到包含一糖醇、一緩衝劑、一穩定劑及一液體載體的一賦形劑混合物中。

【請求項41】如前述請求項中任一項所述之方法，其中該TEV蛋白酶藉由包括以下步驟的方法產生：

在營養培養基中培養包含表現載體的宿主細胞；

誘導該等宿主細胞表現TEV蛋白酶；

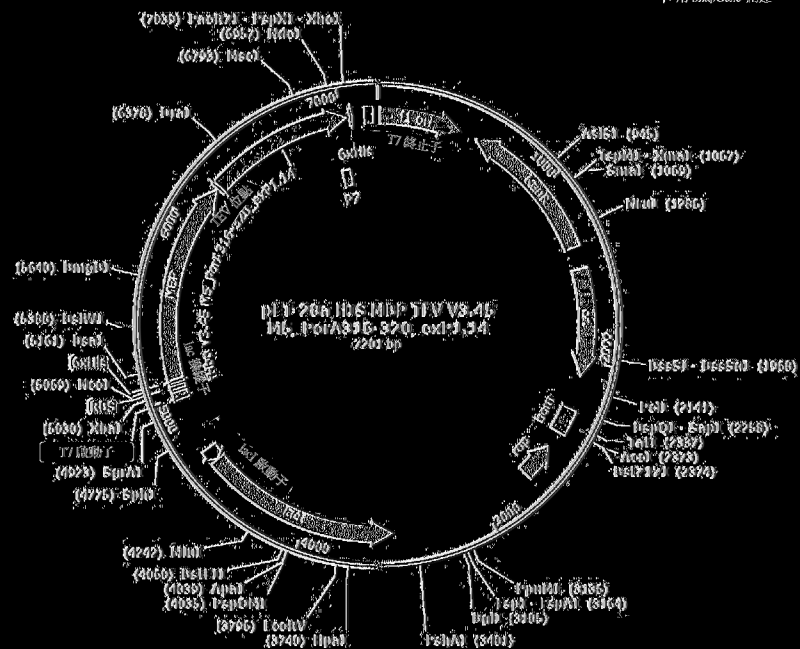
收穫並分離該等宿主細胞；

裂解該等收穫的宿主細胞並分離該等宿主細胞以獲得TEV蛋白酶；

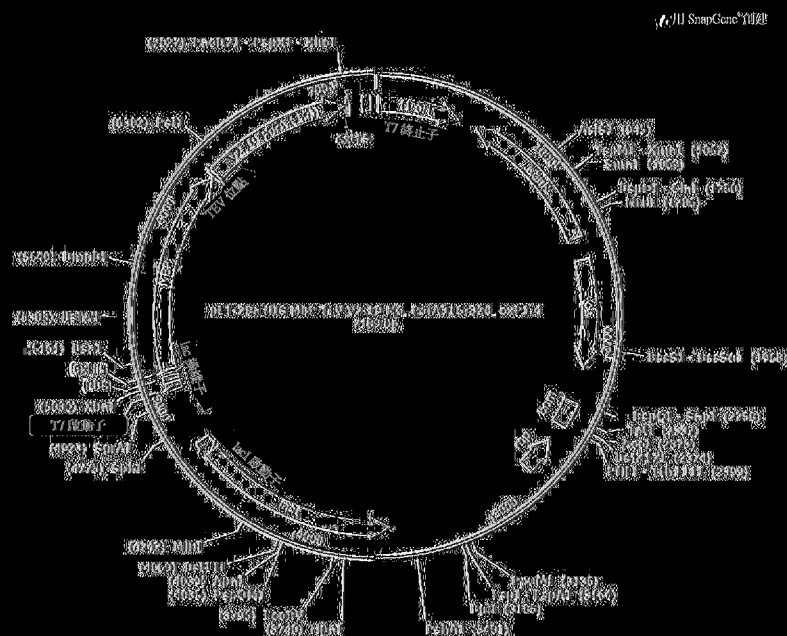
純化該TEV蛋白酶；以及

濃縮、滲濾和儲存該純化的TEV蛋白酶。

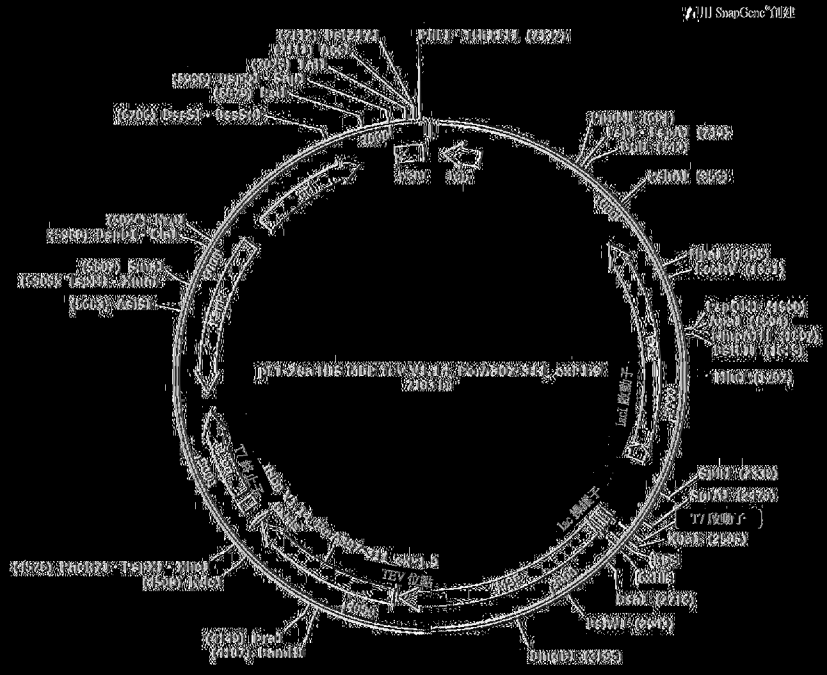
■ 用 SnapGene[®] 創建



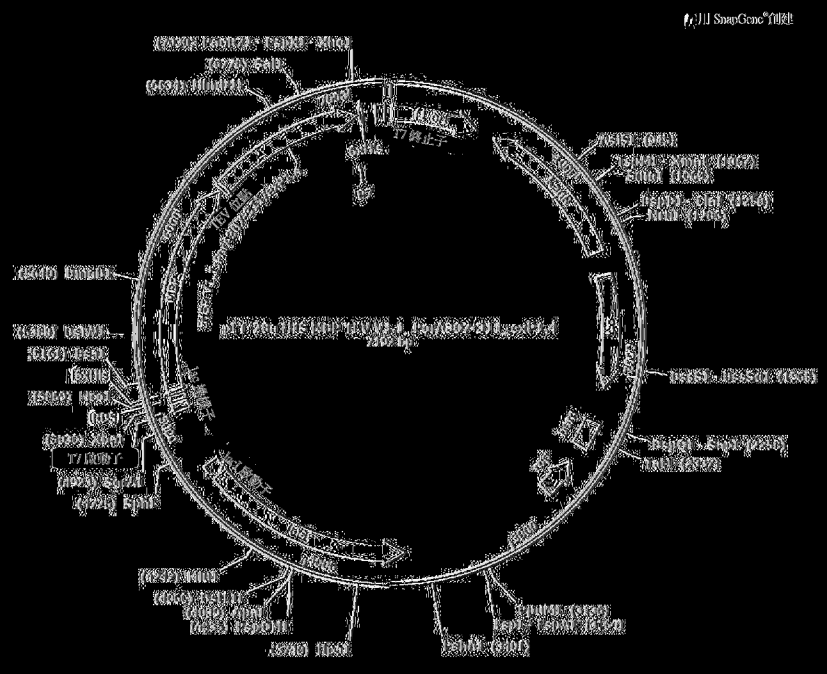
|(第 1 回)|



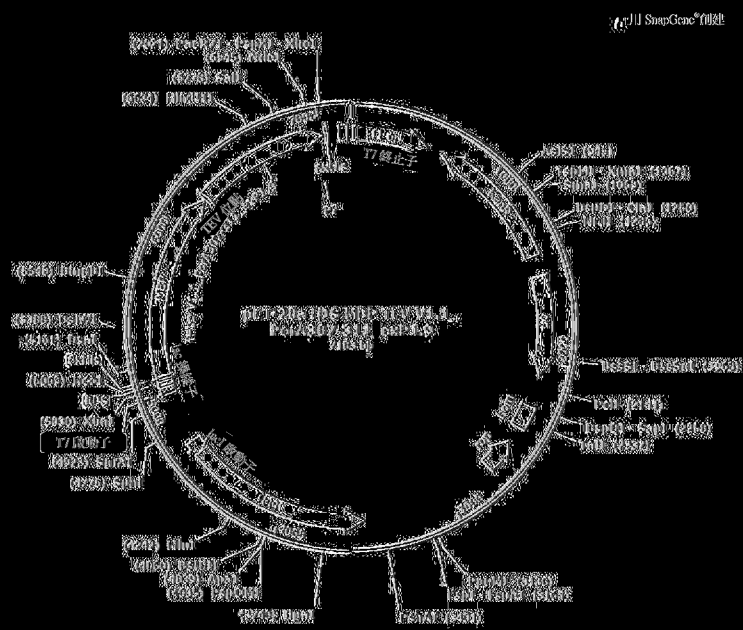
|(第 2 回)|



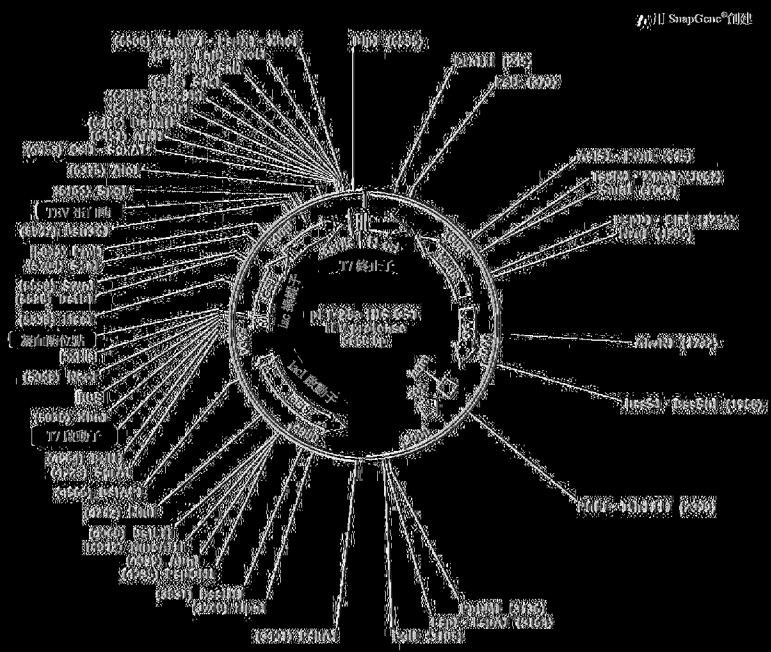
|(第 3 图)|



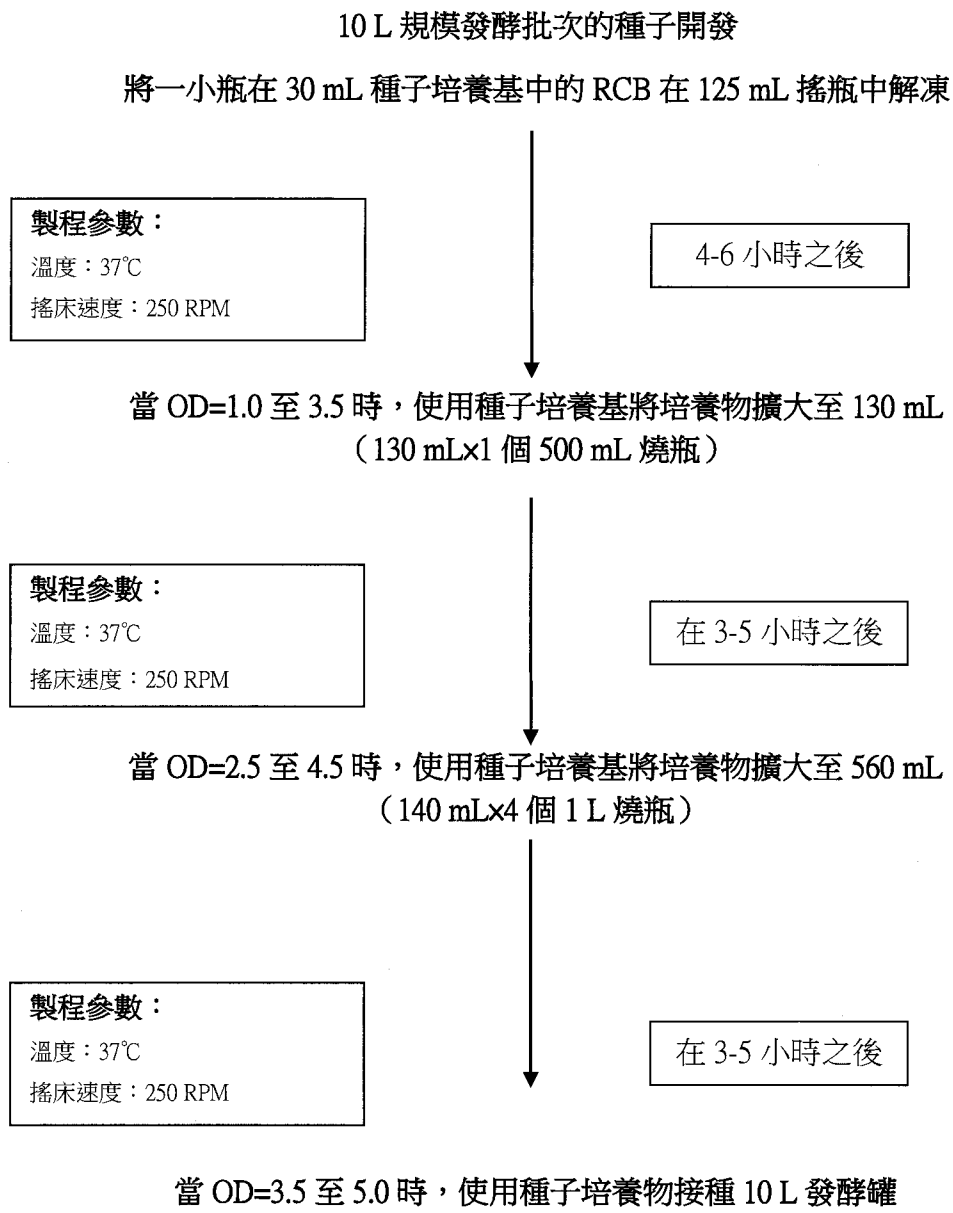
|(第 4 图)|



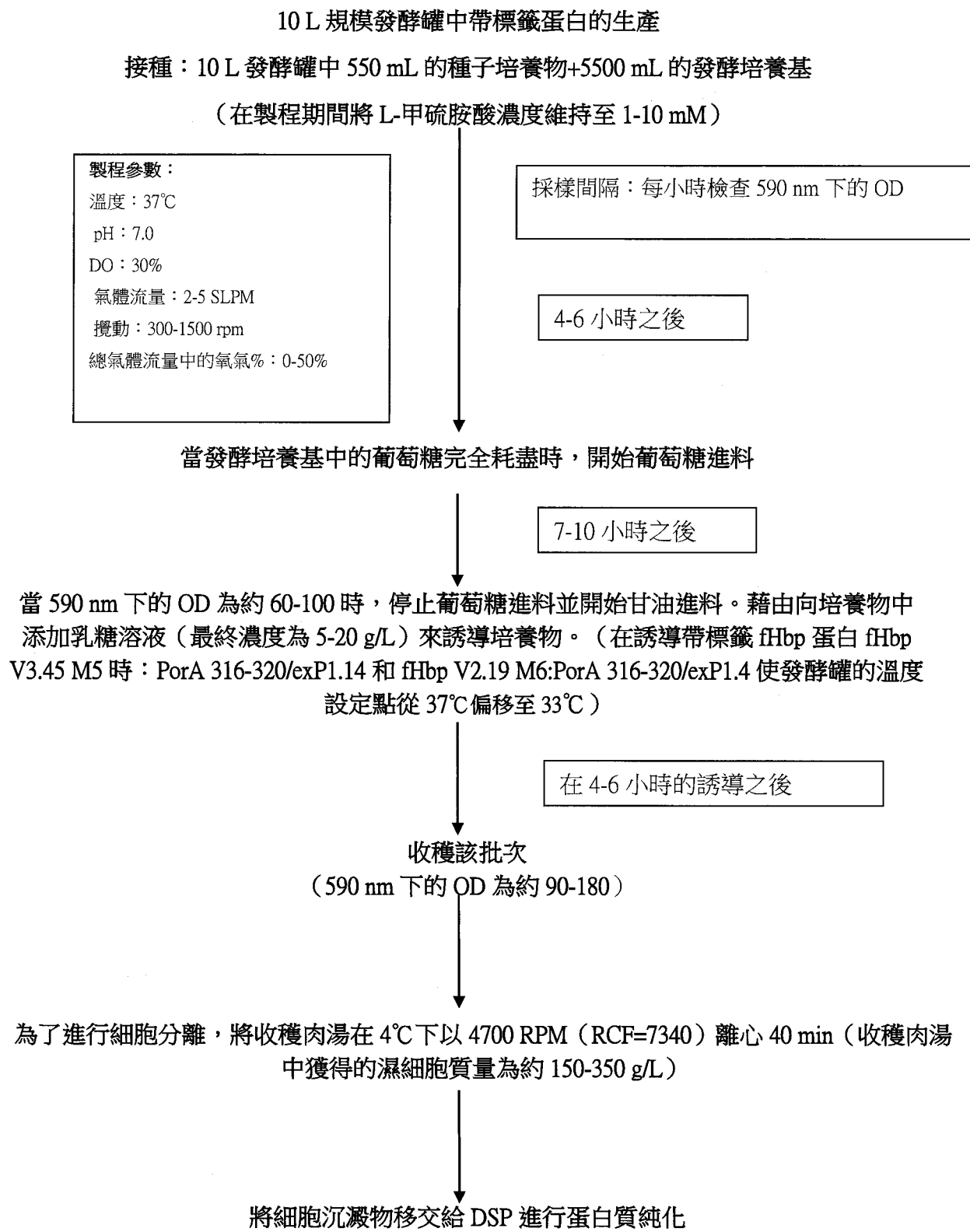
|(第 5 圖)|



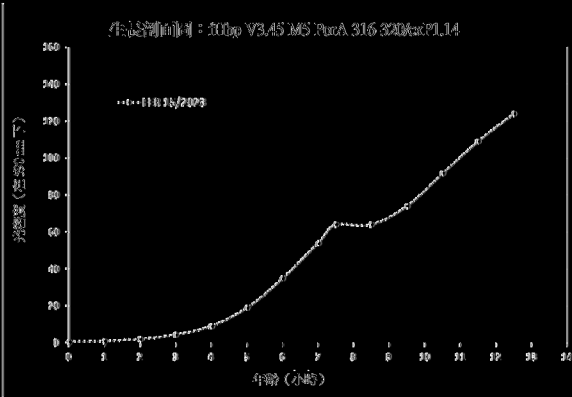
|(第 6 圖)|



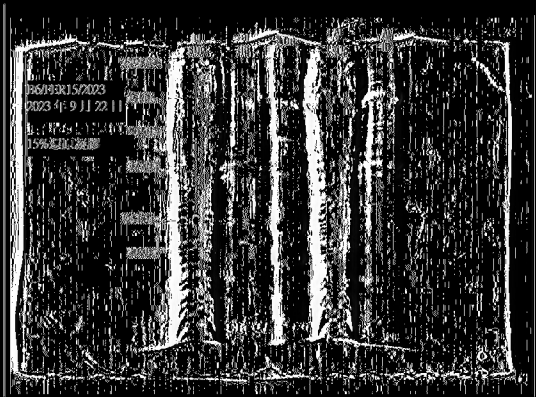
【第 7 圖】



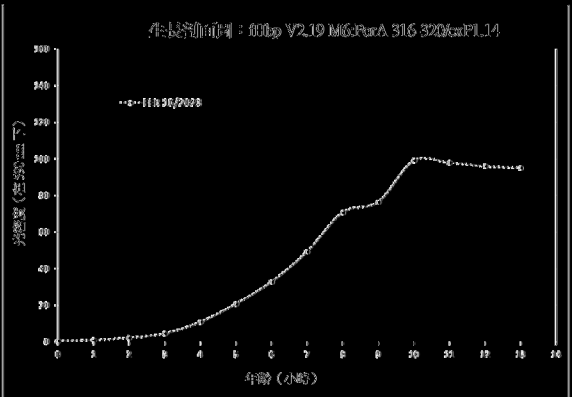
【第 8 圖】



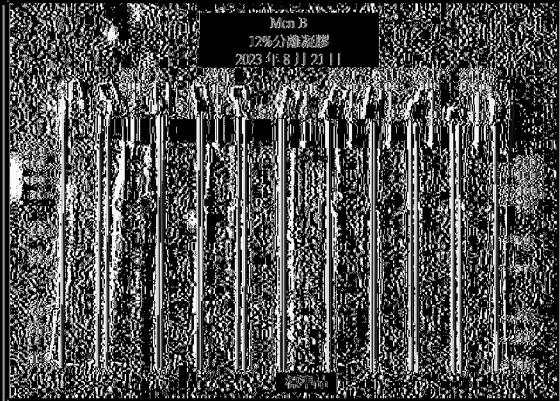
|(第 9a 圖)|



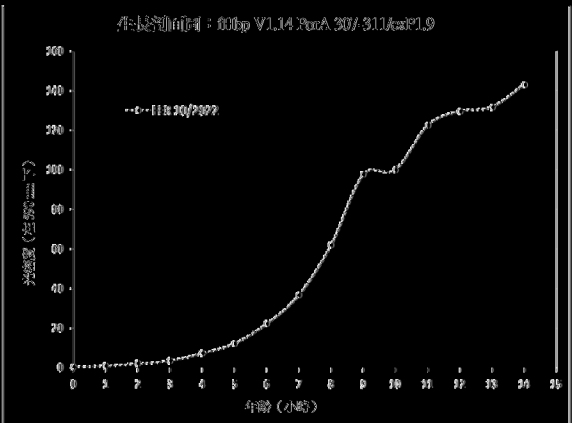
|(第 9b 圖)|



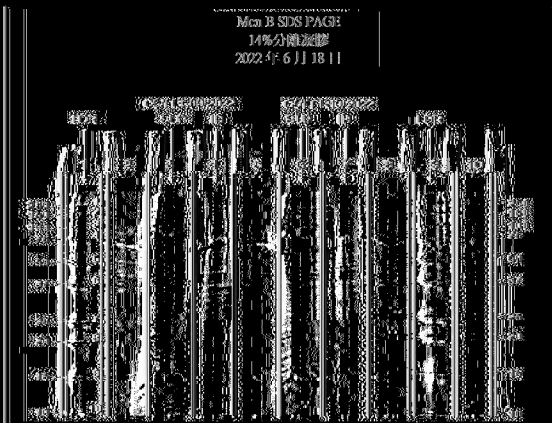
|(第 9c 圖)|



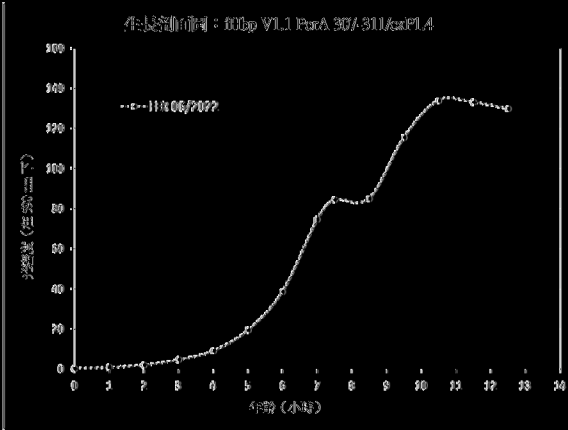
|(第 9d 圖)|



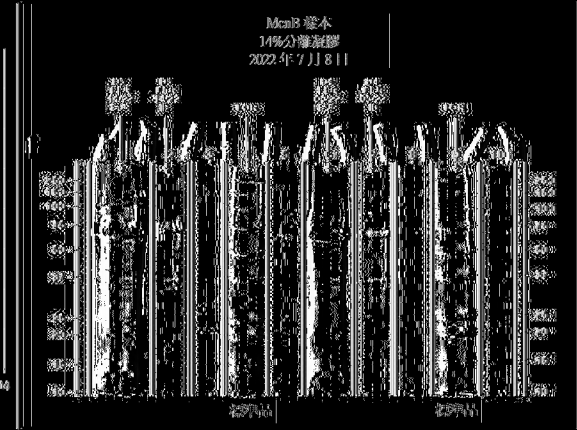
|(第 9e 圖)|



|(第 9f 圖)|

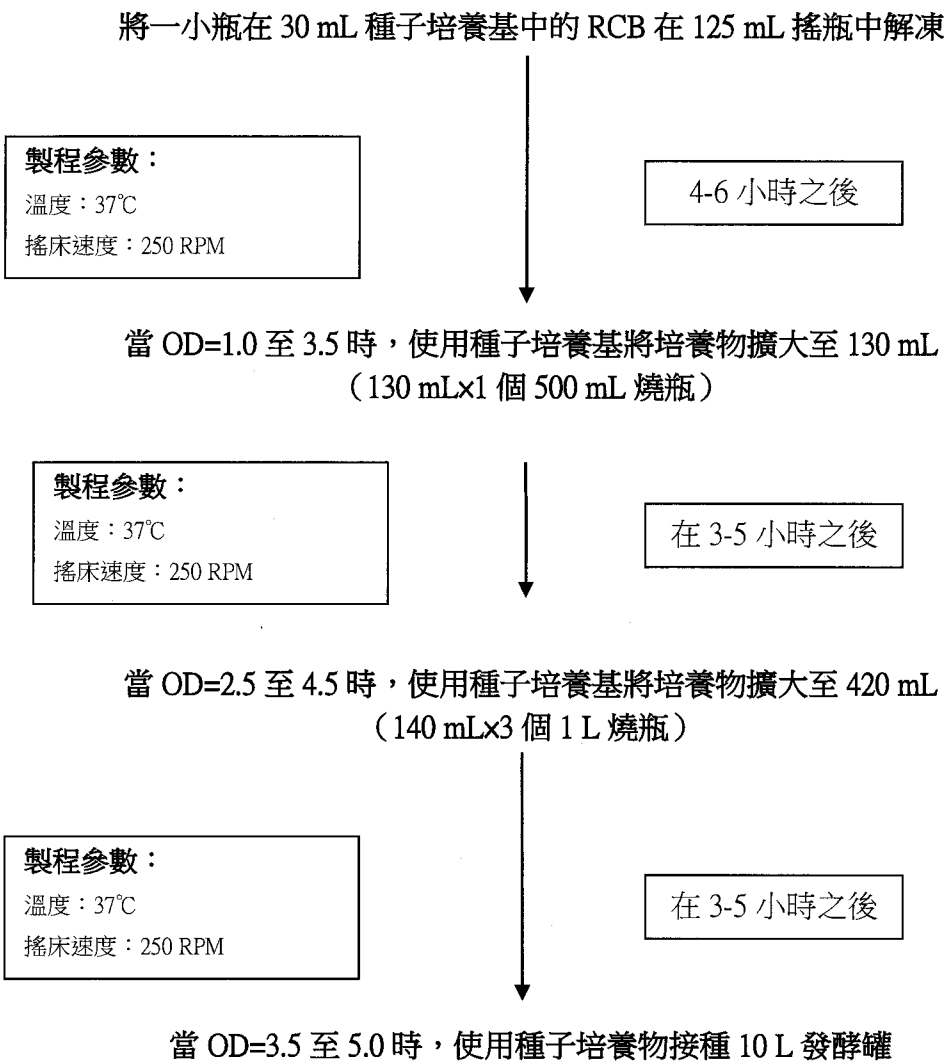


|(第 9g 圖)|



|(第 9h 圖)|

用於生產 TEV 蛋白酶的 10 L 規模發酵批次的種子開發

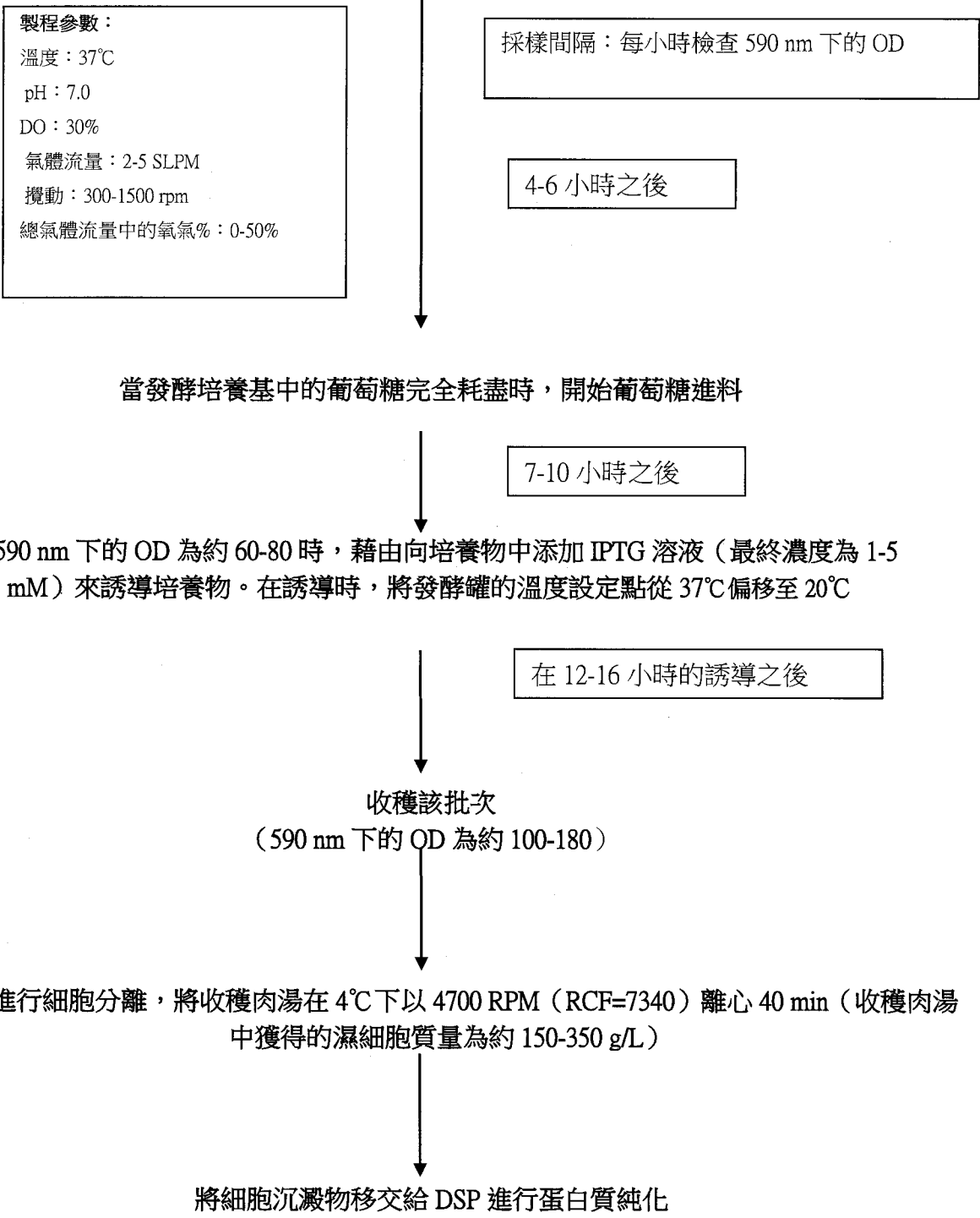


【第 10 圖】

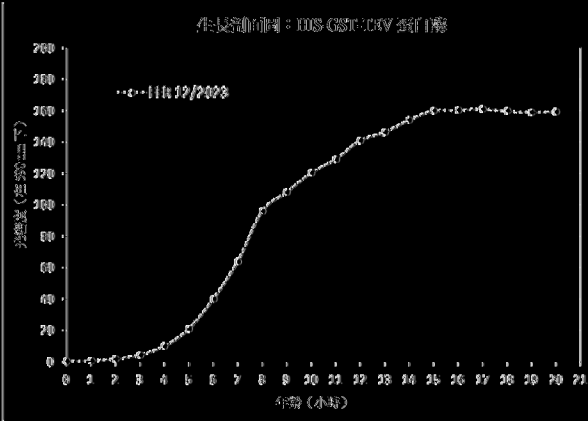
在 10 L 規模發酵罐中生產 TEV 蛋白酶

接種：10 L 發酵罐中 420 mL 的種子培養物+3600 mL 的發酵培養基

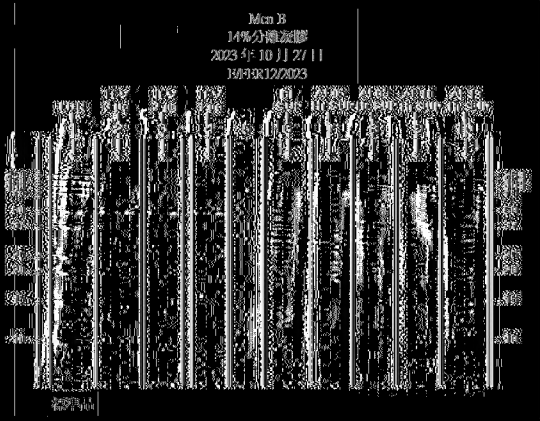
(在製程期間將 L-甲硫胺酸濃度維持至 1-10 mM)



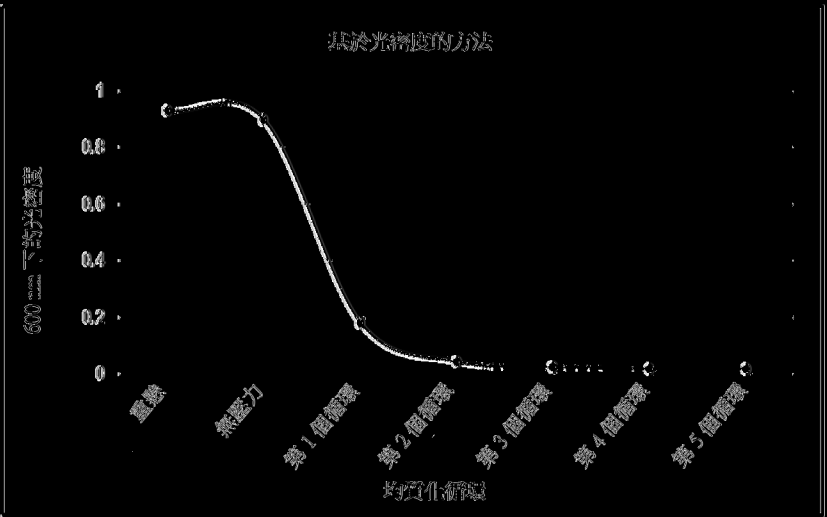
【第 11 圖】



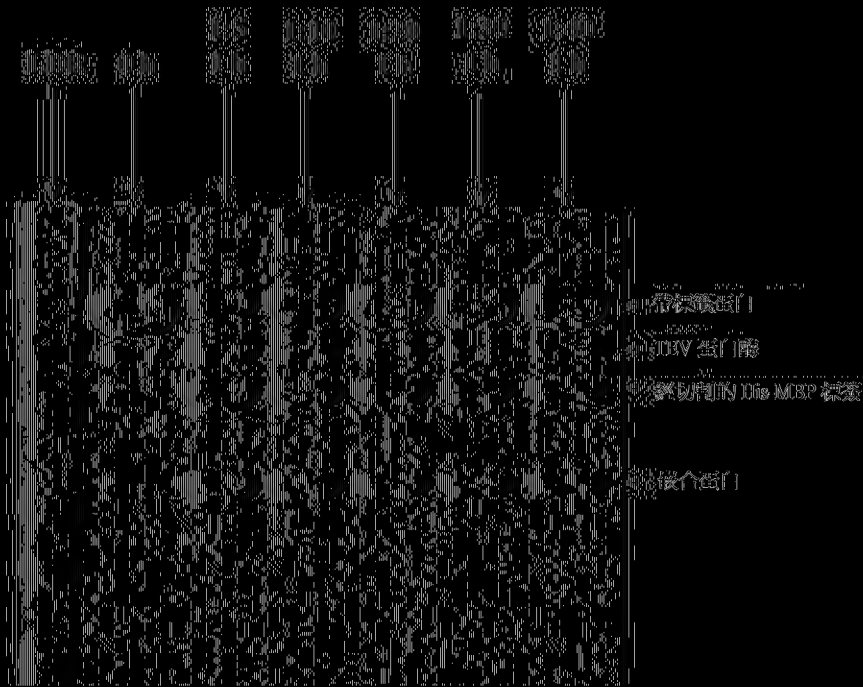
|(第 12a 圖)|



|(第 12b 圖)|



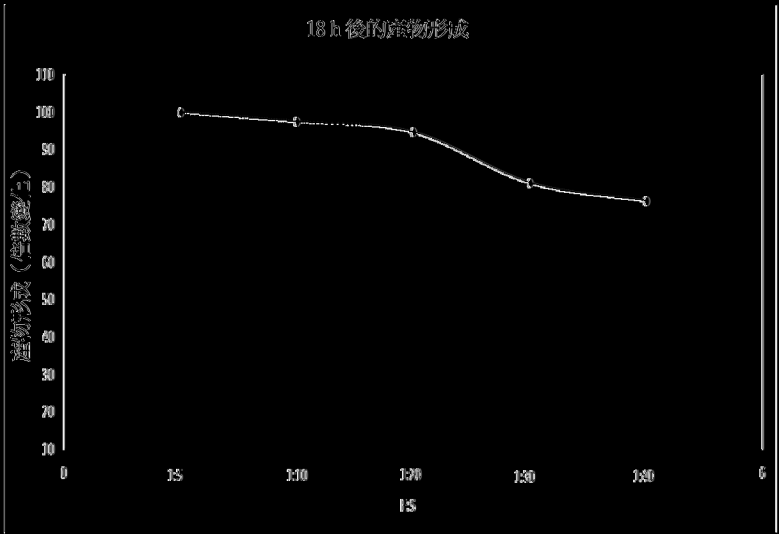
|(第 13 圖)|



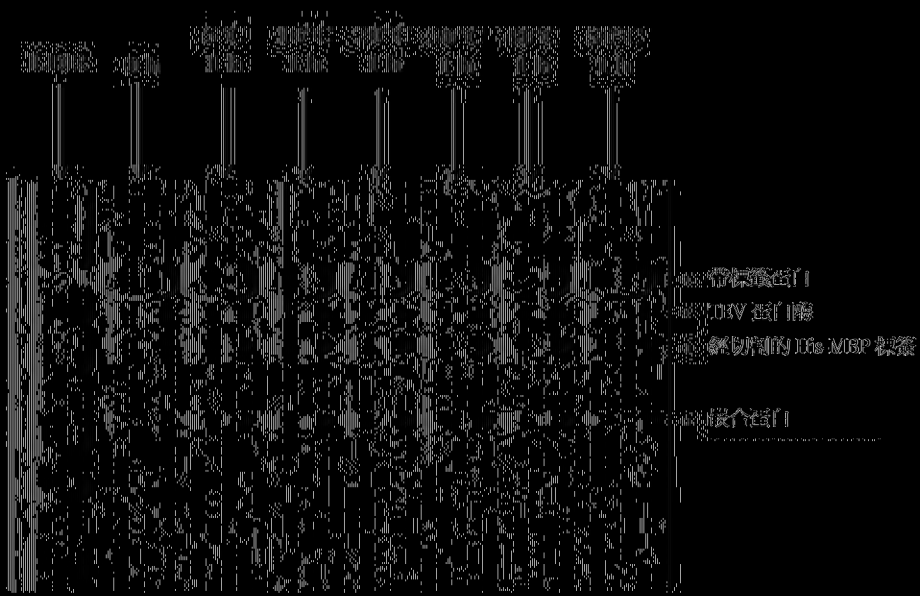
|(第 14a 圖)|



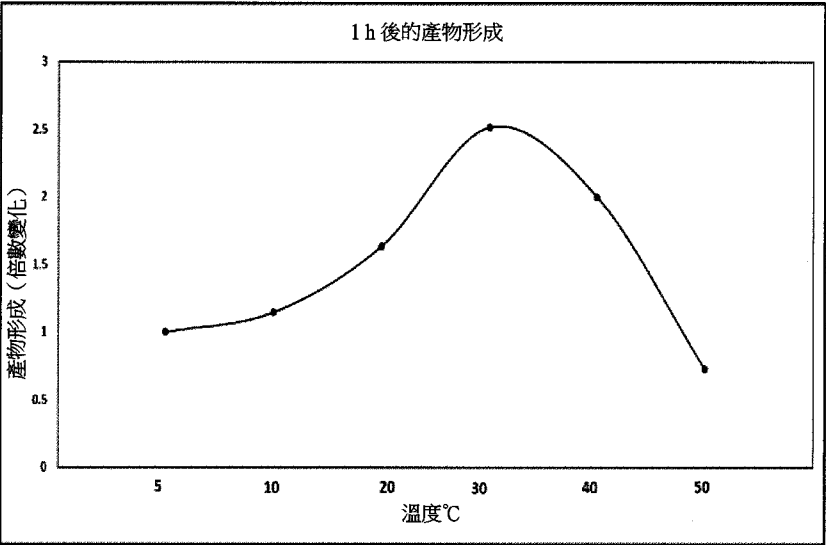
|(第 14b 圖)|



|(第 15 圖)|



|(第 16 圖)|



【第 17 圖】

藉由 Ni-Sepharose 樹脂 (pH 7.4) 純化 TEV 蛋白酶

細胞裂解

將 100 克收穫的細胞沉澱溶解在約 2-3 L 的裂解緩衝液 (25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl+20 mM 咪唑, pH 7.4) 中, 並使用 Panda 均質機在 1000-1200 巴下裂解細胞至少 3 個循環且至多 5 個循環, 離心並收集上清液, 進行 0.45 μ m 過濾



Ni-瓊脂糖 6FF 柱

均衡和上樣: 將 Ni-瓊脂糖柱用裂解緩衝液均衡, 並將 0.45 μ m 經過濾的裂解後上清液上樣到該柱上



用緩衝液進行第 1 次洗滌: (25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl+20 mM 咪唑, pH 7.4); 5-6 CV



用緩衝液進行第 2 次洗滌: (25 mM 磷酸鈉緩衝液+100mM NaCl, pH 7.4+40 mM 咪唑); 5-6 CV



用緩衝液進行第 3 次洗滌: (25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl, pH 7.4+80 mM 咪唑); 5-6 CV



用緩衝液進行第 4 次洗滌: (25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl, pH 7.4+120 mM 咪唑); 5-6 CV



用緩衝液洗脫: (50 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl, pH 7.4+300 mM 咪唑)



在洗脫純化後, 將 TEV 蛋白酶濃縮, 並用 25 mM 磷酸鈉緩衝液 pH 7.4 使用 10 kDa 盒進行滲濾, 並在低於-20°C 與 20%甘油一起儲存直至進一步使用

【第 18 圖】

藉由 Ni-Sepharose 樹脂 (pH 8.5) 純化 TEV 蛋白酶

細胞裂解

將 100 克收穫的細胞沉澱溶解在約 2-3 ltr 的裂解緩衝液 (25 mM Tris-HCl 緩衝液+100 mM NaCl+40 mM 咪唑, pH 8.5) 中, 並使用 Panda 均質機在 1000-1200 巴下裂解細胞至少 3 個循環且至多 5 個循環, 離心並收集上清液, 進行 0.45 μ m 過濾



Ni-瓊脂糖 6FF 柱

均衡和上樣: 將 Ni-瓊脂糖柱用裂解緩衝液均衡, 並將 0.45 μ m 經過濾的裂解後上清液上樣到該柱上



用緩衝液進行第 1 次洗滌: (25 mM Tris-HCl 緩衝液+100 mM NaCl+40 mM 咪唑, pH 8.5); 5-6 CV



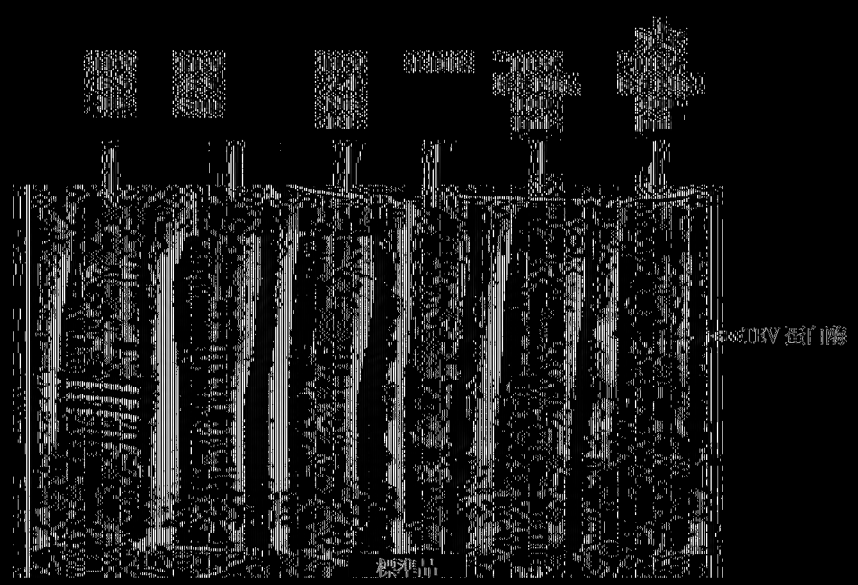
用緩衝液進行第 2 次洗滌: (25 mM Tris-HCl 緩衝液+100 mM NaCl, pH 8.5+100 mM 咪唑); 5-6 CV



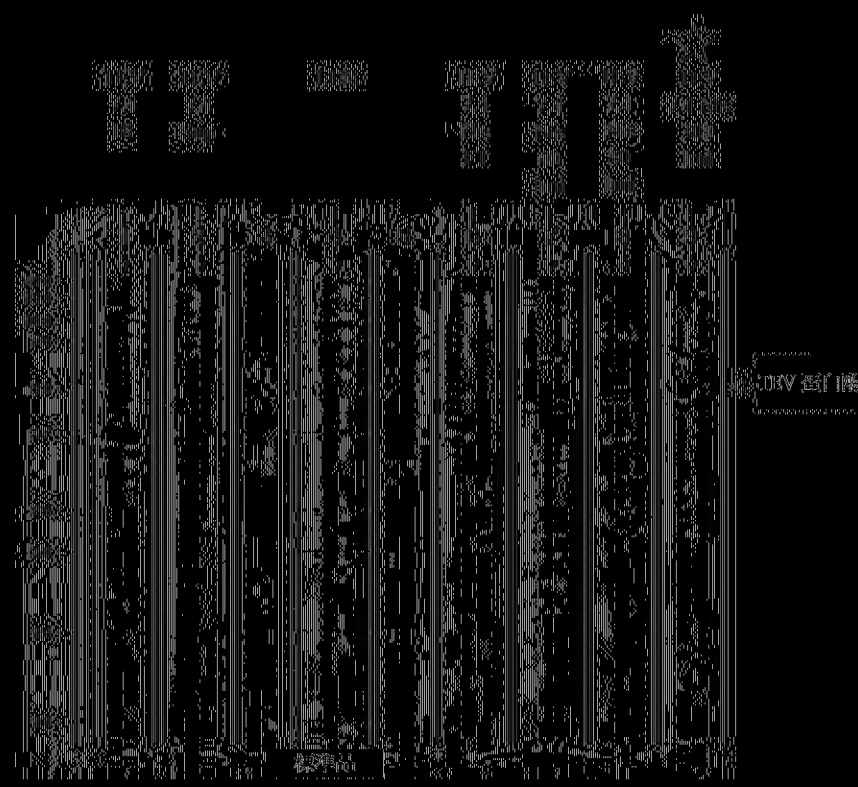
用緩衝液洗脫: (25 mM Tris-HCl 緩衝液+100 mM NaCl, pH 8.5 +300 mM 咪唑)

在洗脫後, 將純化的 TEV 蛋白酶濃縮, 並用 25 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.5 使用 10 kDa 盒進行滲濾, 並在低於-20°C 與 20%甘油一起儲存直至進一步使用

【第 19 圖】



|(第20a 圖)|



|(第20b 圖)|

藉由 Ni-瓊脂糖樹脂純化 6xHis-MBP 帶標籤蛋白

將 100 克收穫的細胞沉澱溶解在約 2-3 ltr 的裂解緩衝液（25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl+20 mM 咪唑，pH 7.4）中，並使用 Panda 均質機在 1000-1200 巴下裂解細胞至少 3 個循環且至多 5 個循環，離心並收集上清液，進行 0.45 μ m 過濾



Ni-瓊脂糖 6FF 柱

均衡和上樣：將 Ni-瓊脂糖柱用裂解緩衝液均衡，並將 0.45 μ m 經過濾的裂解後裂解上清液上樣到該柱上



用緩衝液進行第 1 次洗滌：（25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl+20 mM 咪唑，pH 7.4）；5-6 CV



用緩衝液進行第 2 次洗滌：（25 mM 磷酸鈉緩衝液+300 mM NaCl+20 mM 咪唑，pH 7.4）；5-6 CV



用緩衝液進行第 3 次洗滌：（25 mM 磷酸鈉緩衝液+100mM NaCl，pH 7.4+40 mM 咪唑）；5-6 CV



用緩衝液進行第 4 次洗滌：（25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4+80 mM 咪唑）；5-6 CV



用緩衝液洗脫：（25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4+300 mM 咪唑）



在洗脫純化後，將 6xHis-MBP 帶標籤蛋白濃縮，並用 12.5 mM 磷酸鈉緩衝液 pH 7.4 使用 10 kDa/30kDa 盒進行滲濾，並儲存在 2-8°C 下直至進一步使用

【第 21 圖】

包涵體中表現的帶標籤蛋白的純化

細胞裂解

將 100 克收穫的細胞沉澱溶解在約 2-3 ltr 裂解緩衝液（25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4）中，並用 Panda 均質機在 1000-1200 巴下裂解細胞至少 3 個循環且至多 5 個循環，離心並收集上清液和裂解後沉澱物

硫酸銨沉澱

緩慢添加適量硫酸銨以使上清液中的終濃度為 30%。使其靜置 20-30 min 以完全沉澱。離心並收集沉澱物

尿素中的蛋白質解折疊

將硫酸銨沉澱物/IB 緩慢溶解於適當體積的 25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4+8 M 尿素中，直至其完全溶解。用 0.22 μ M 過濾器過濾並上樣到柱上



Ni-瓊脂糖 6FF 柱（在柱上重折疊並純化）

均衡和上樣：將 Ni-瓊脂糖柱用 25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4+8 M 尿素平衡，並將樣本上樣到柱上



重折疊—用不斷降低濃度的 25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4+不斷降低濃度的尿素（亦即 8 M、6 M、4 M、2 M、1 M（各 5-6 CV））洗滌柱



用緩衝液進行第 1 次洗滌：（25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4）；5-6 CV



用緩衝液進行第 2 次洗滌：（25 mM 磷酸鈉緩衝液+100mM NaCl，pH 7.4+40 mM 咪唑）；5-6 CV



用緩衝液進行第 3 次洗滌：（25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4+80 mM 咪唑）；5-6 CV



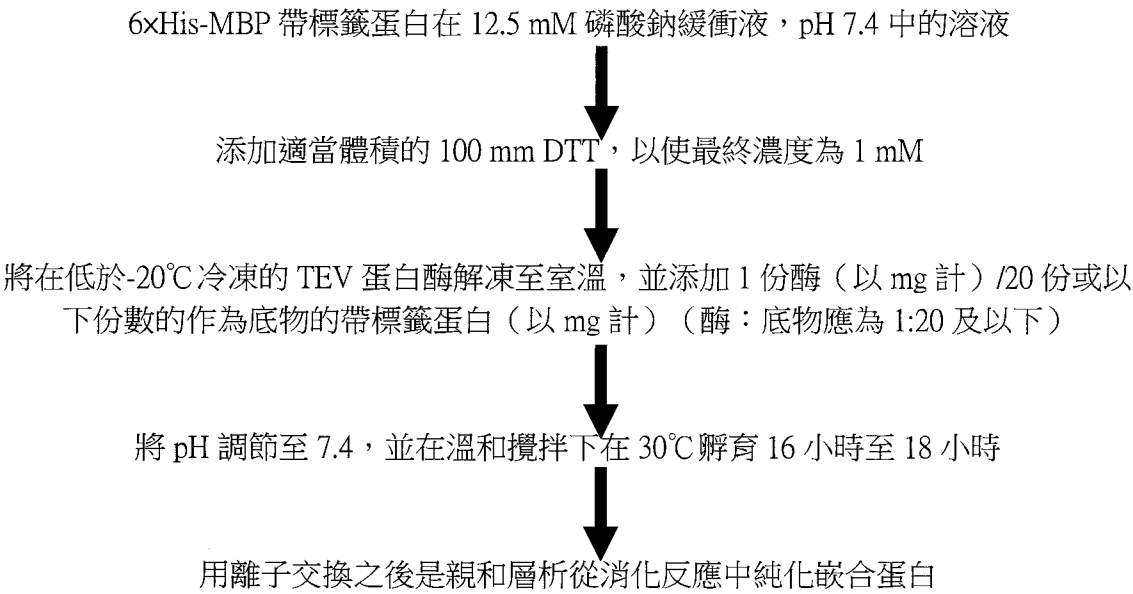
用緩衝液洗脫：（25 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4+300 mM 咪唑）



在洗脫純化後，將 6xHis-MBP 帶標籤蛋白濃縮，並用 12.5 mM 磷酸鈉緩衝液 pH 7.4 使用 10 kDa/30kDa 盒進行滲濾，並儲存在 2-8°C 下直至進一步使用

【第 22 圖】

使用 TEV 蛋白酶從純化蛋白移除 His-MBP 標籤，如下所示：



【第 23 圖】

第 1 部分-離子交換（強陰離子交換 Capto Q）層析法

均衡和上樣：用 12.5 mm 均衡的帶電荷的 Capto Q 柱
將磷酸鈉緩衝液 pH 7.4 和消化反應物上樣到柱上。收集流通物



用緩衝液進行第 1 次洗脫：（12.5 mM 磷酸鈉緩衝液+30 mM NaCl，pH 7.4）；5-6 CV



使用緩衝液進行第 2 次洗脫：（12.5 mM 磷酸鈉緩衝液+60 mM NaCl，pH 7.4）；5-6 CV



用緩衝液進行第 3 次洗脫：（12.5 mM 磷酸鈉緩衝液+90 mM NaCl，pH 7.4）；5-6 CV

FHBP V1.1：PorA 307-311/exP1.4 和 FHBP V1.1：PorA 307-311/exP1.9 存在於流通級分中。
而 FHBP V3.45 M5:PorA316-320/exP1.14、FHBP V2.19 M6:PorA 316-320/exP1.4 和 FHBP
V1.14:PorA307-311/exP1.9 在第 2 次洗脫中洗脫。

將感興趣的級分濃縮並用 12.5 mm 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl+5 mM 咪唑使用 5 kDa 盒
進行滲析，並儲存在 2-8°C 下直至進一步使用

【第 24 圖】

第 2 部分-親和層析 Ni-瓊脂糖 6FF 柱

均衡和上樣：將 Ni-瓊脂糖柱用 12.5 mM 磷酸鈉緩衝液+100mM NaCl+5 mM 咪唑均衡，並將從離子交換層析法純化的嵌合體上樣到柱上以進一步純化嵌合蛋白



第 1 次洗脫：（12.5 mM 磷酸鈉緩衝液+100mM NaCl，pH 7.4+30mM 咪唑）；5-6 CV



第 2 次洗脫：（12.5 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4+60 mM 咪唑）；5-6 CV



第 3 次洗脫：（12.5 mM 磷酸鈉緩衝液+100 mM NaCl，pH 7.4+300 mM 咪唑）

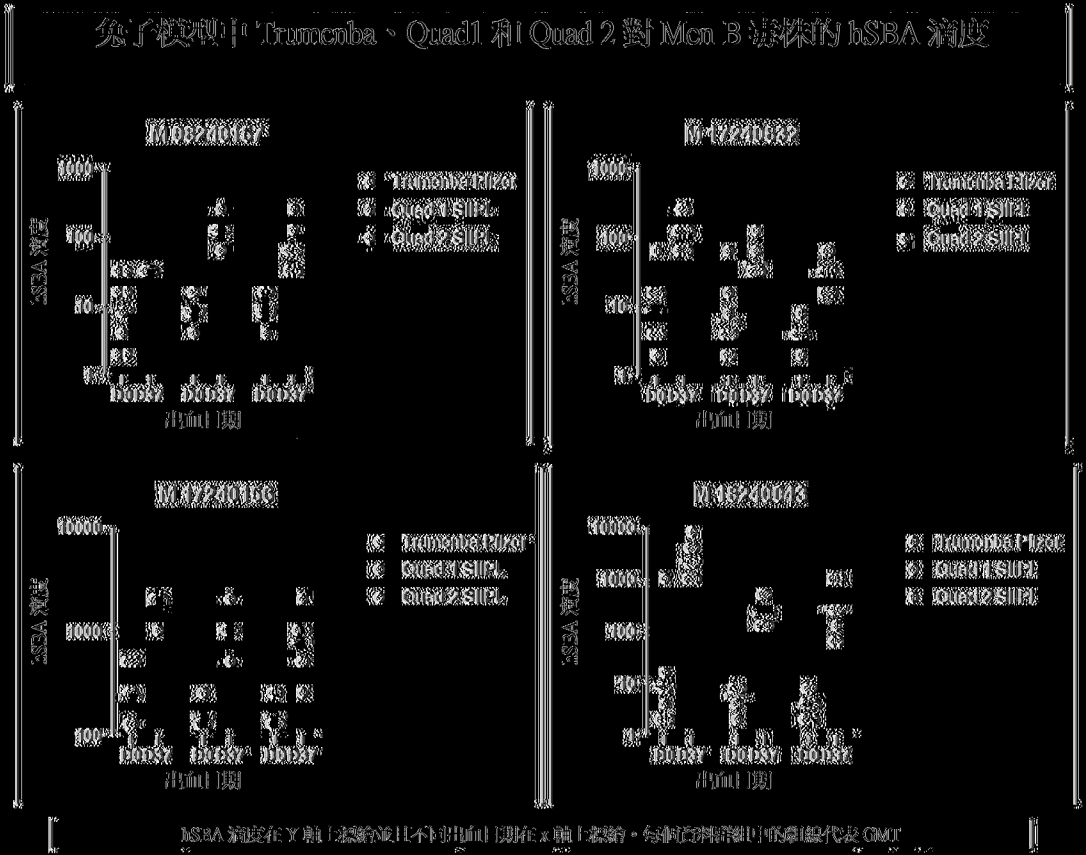


所有嵌合蛋白均在第 1 次洗脫中洗脫。

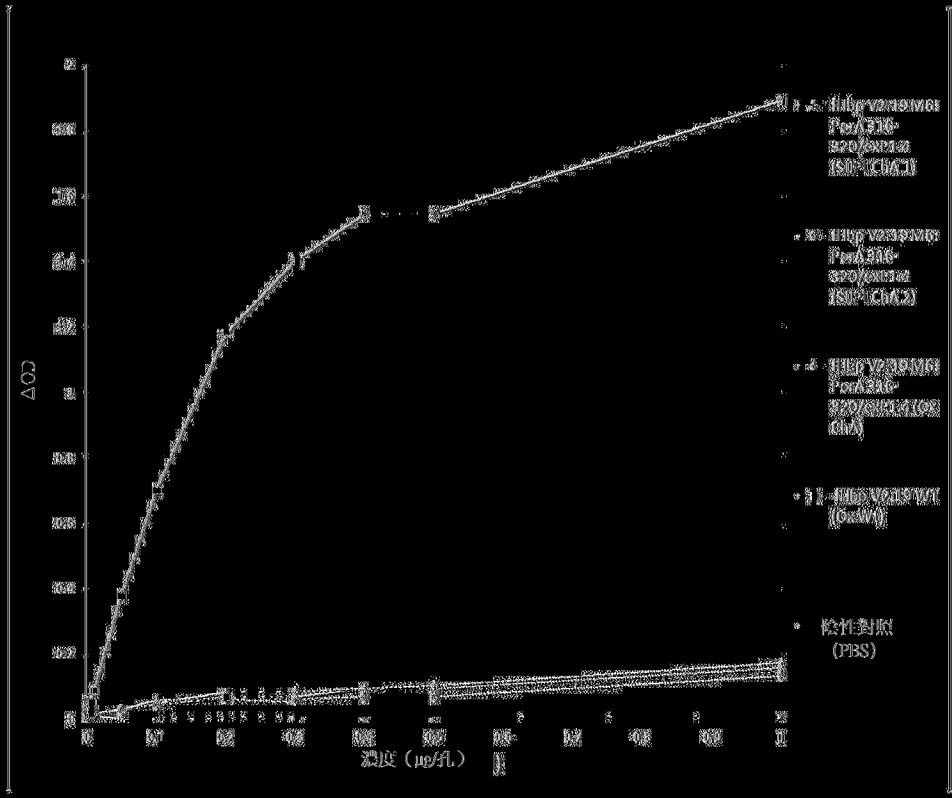
將含有最終藥物物質（亦即嵌合蛋白）的第 1 次洗脫液/第 2 次洗脫液進行彙集（若需要）並用 12.5 mM 磷酸鈉緩衝液 pH 7.4 使用 5 kDa 盒進行濃縮和滲濾。

將藥物物質（亦即嵌合蛋白）進行無菌過濾並儲存在 2-8℃下，直至進一步使用/配製

【第 25 圖】



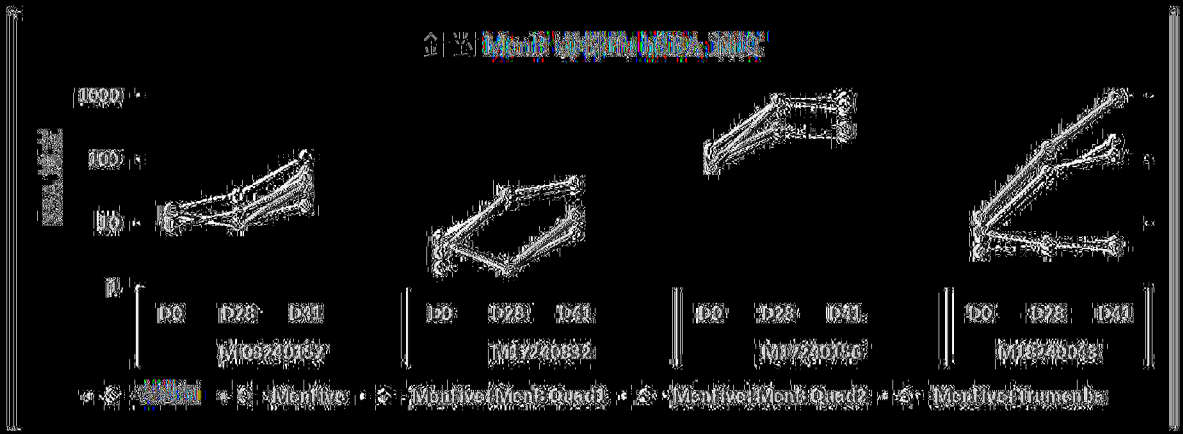
|(第 26 圖)|



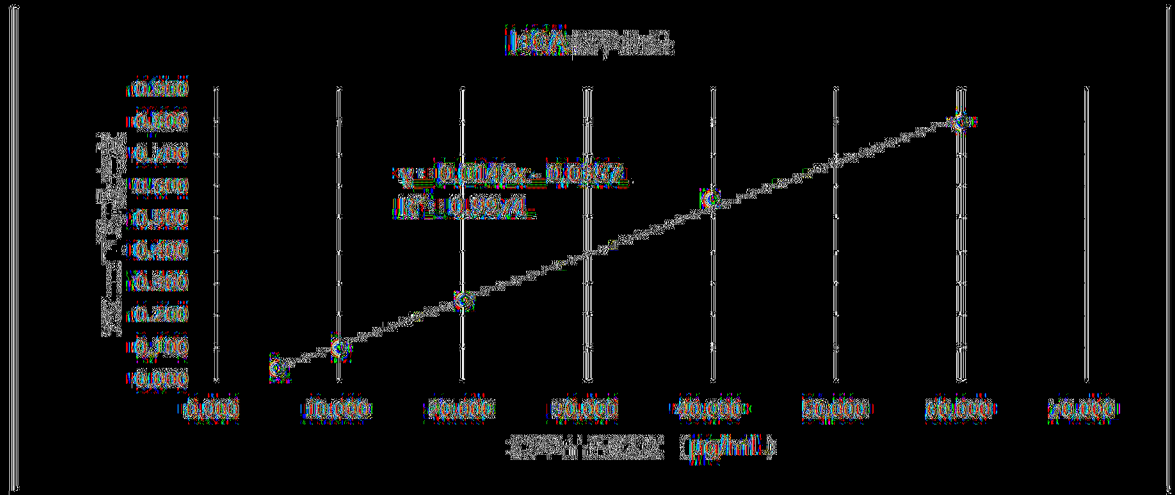
|(第 27 圖)|



|(第 28 圖)|



(第 29 圖)



(第 30 圖)