



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202423477 A

(43) 公開日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 16 日

(21) 申請案號：112128851 (22) 申請日：中華民國 112 (2023) 年 08 月 01 日

(51) Int. Cl. : *A61K39/095 (2006.01)* *A61K39/39 (2006.01)*  
*C07K14/22 (2006.01)* *A61P31/04 (2006.01)*  
*A61P37/04 (2006.01)*

(30) 優先權：2022/08/03 美國 63/370,333

(71) 申請人：美商賽諾菲巴斯德公司 (美國) SANOFI PASTEUR INC. (US)  
美國

(72) 發明人：奧薩爾 薩爾瓦多 AUSAR, SALVADOR (CA)；巴爾哈拉 維諾德 BALHARA,  
VINOD (CA)；達蒙特 安妮 蓋爾 DARMONT, ANNE-GAELLE (FR)；拉赫曼  
諾辛 RAHMAN, NAUSHEEN (CA)

(74) 代理人：何愛文；王仁君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：47 項 圖式數：13 共 178 頁

(54) 名稱

針對腦膜炎奈瑟氏菌 B 的含佐劑免疫原性組成物

(57) 摘要

本公開文本涉及一種免疫原性組成物，所述免疫原性組成物包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合和羥基磷酸鋁 (AlPO<sub>4</sub>) 佐劑，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (factor H binding protein, fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B，所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑被選擇為零電荷點 (PZC) 低於 5。

The disclosure relates to an immunogenic composition comprising a combination of Neisseria meningitidis serogroup B antigens, said combination comprising at least one factor H binding protein (fHBP) A and at least one factor H binding protein (fHBP) B, and an aluminum hydroxyphosphate (AlPO<sub>4</sub>) adjuvant, the AlPO<sub>4</sub> adjuvant being selected as having a point of zero charge (PZC) below 5.

指定代表圖：

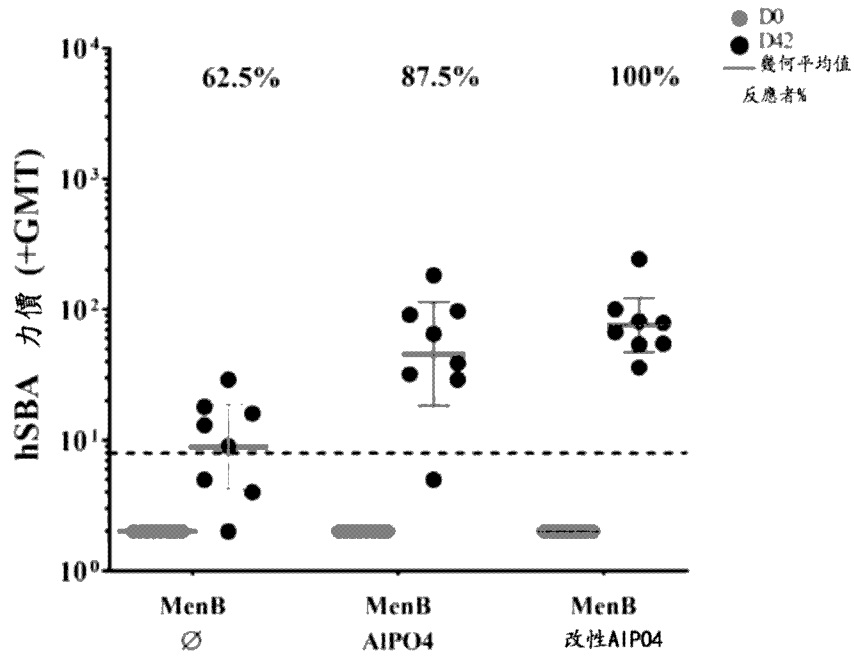


圖 1

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】針對腦膜炎奈瑟氏菌B的含佐劑免疫原性組成物

【英文發明名稱】ADJUVANTED IMMUNOGENIC COMPOSITION AGAINST  
NEISSERIA MENINGITIDIS B

### 【中文】

本公開文本涉及一種免疫原性組成物，所述免疫原性組成物包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群B抗原的組合和羥基磷酸鋁（ $\text{AlPO}_4$ ）佐劑，所述組合包含至少一種H因子結合蛋白（factor H binding protein, fHBP）A和至少一種H因子結合蛋白（fHBP）B，所述 $\text{AlPO}_4$ 佐劑被選擇為零電荷點（PZC）低於5。

### 【英文】

The disclosure relates to an immunogenic composition comprising a combination of *Neisseria meningitidis* serogroup B antigens, said combination comprising at least one factor H binding protein (fHBP) A and at least one factor H binding protein (fHBP) B, and an aluminum hydroxyphosphate ( $\text{AlPO}_4$ ) adjuvant, the  $\text{AlPO}_4$  adjuvant being selected as having a point of zero charge (PZC) below 5.

【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】 針對腦膜炎奈瑟氏菌B的含佐劑免疫原性組成物

【英文發明名稱】 ADJUVANTED IMMUNOGENIC COMPOSITION AGAINST  
*NEISSERIA MENINGITIDIS B*

### 【技術領域】

**[0001]** 本公開文本涉及針對腦膜炎奈瑟氏菌B的含AlPO<sub>4</sub>佐劑免疫原性組成物，以及用於藉由佐劑穩定抗原和增強針對自體和異源抗原的免疫原性反應的方法和用途。

### 【先前技術】

**[0002]** 腦膜炎奈瑟氏菌是革蘭氏陰性雙球菌，人類是其唯一已知的天然宿主。腦膜炎奈瑟氏菌是人類鼻咽部和口咽部的常見定殖者，但可以在人體的其他區域（如肛門黏膜、結膜和泌尿生殖道）中發現（Rouphael等人，*Methods Mol Biol.* 2012;799:1-20；Stephens, *Vaccine.* 2009;27 增刊2:B71-7；Batista等人，*Asian Pac J Trop Med.* 2017;10(11):1019-29）。

**[0003]** 根據莢膜多糖（PS）的免疫化學，至少已經劃分了12種不同的腦膜炎球菌血清群。一些菌株比其他菌株更可能引起感染。在世界範圍內，大多數腦膜炎球菌疾病病例是由血清群A、B、C、W、X和Y引起的。血清群B是地方病和一些暴發的原因（Harrison等人，[編] Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM Plotkin SA. *Vaccines.* 7. Philadelphia (PA): Elsevier; 2018. 第619-43頁；Borrow等人，*Expert Rev Vaccines.* 2017;16(4):313-28；Harrison等人，*Emerg Infect Dis.*

2013;19(4):566-73 ; Pollard, *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(12增刊):S274-9 ; Kvalsvig 等人, *J Clin Pathol.* 2003;56(6):417-22) 。

**[0004]** 腦膜炎奈瑟氏菌血清群B是呼吸道傳播細菌（藉由飛沫），其無法在環境中生存，需要密切和長時間接觸或直接身體接觸（如親吻）才能有效傳播。無症狀攜帶者存在於低於2%的低於5歲的兒童和20%至25%的青少年和年輕成人中，是病原體傳播途徑中和其在自然界中保持的主要因素，甚至在流行期期間也是如此（Christensen等人, *Lancet Infect Dis.* 2010;10(12):853-61 ; Batista等人, *Asian Pac J Trop Med.* 2017;10(11):1019-29) 。

**[0005]** 一般來說，攜帶發生率最高的年齡組是青少年和年輕成人，他們易於從事被認為是攜帶和最終出現侵襲性腦膜炎球菌病（IMD）的危險因素的行為（Christensen等人, *Lancet Infect Dis.* 2010;10(12):853-61 ; Stephens, *Vaccine.* 2009;27 增刊2:B71-7 ; Bruce等人, *JAMA.* 2001;286(6):688-93 ; Germinario等人, *Hum Vaccin.* 2010;6(12):1025-7 ; MacLennan 等人, *Emerg Infect Dis.* 2006;12(6):950-7) 。因此，這些年齡組的疫苗接種有可能影響其他年齡組的IMD發生率，這已在許多歐洲國家得到證明，這些國家的血清群C接合疫苗的疫苗接種活動已導致未接種疫苗年齡組的群體保護（Maiden等人, *J Infect Dis.* 2008;197(5):737-43 ; Trotter等人, *Lancet.* 2004;364(9431):365-7 ; Bijlsma等人, *Clin Infect Dis.* 2014;59(9):1216-21) 。

**[0006]** 侵襲性腦膜炎球菌病（IMD）是由腦膜炎奈瑟氏菌（包括腦膜炎奈瑟氏菌血清群B）引起的嚴重疾患，並且症狀可包括劇烈頭痛、發燒、噁心、嘔吐、畏光、頸硬、嗜睡、肌痛和特徵性瘀點皮疹（Harrison等人, [編] Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM Plotkin SA. *Vaccines.* 7. Philadelphia (PA): Elsevier; 2018. 第

619-43頁)。IMD可導致腦膜炎球菌性腦膜炎和腦膜炎球菌血症。腦膜炎球菌血症可能是對人最快速致命的傳染病症，據報導約有90%的死亡發生在住院治療的前2天內。由於主要由莢膜多糖、特異性免疫球蛋白和補體成分C3構成的抗原-抗體複合物的沉積，6%至15%的IMD患者可能出現發炎症候群。這些反應通常發生在疾病發作後4至12天，並且包括關節炎（主要是單關節炎（7%至14%的患者））、皮膚血管炎、虹膜炎、鞏膜外層炎、胸膜炎和心包炎。同時可出現再次發熱、白血球增多和血清C反應蛋白升高。IMD患者中可能發生的其他併發症包括單純疱疹感染啟動、遠端對稱性壞死、血管炎外觀形貌上的廣泛潰瘍、消化道出血、硬腦膜下積液、心肌炎、橫紋肌溶解、成人型呼吸窘迫症候群、酸鹼和電解質紊亂、腦梗死和顱內化膿。

**[0007]** IMD倖存者可能會出現後遺症。神經系統後遺症發生的風險為7%至12%（與肺炎球菌性腦膜炎相比比率較低），主要發生在嬰兒中。聽力損失（持續性或暫時性）是最常見的併發症，發生在大約4%的病例中。其他後遺症包括視覺缺損、腦積水、共濟失調、言語障礙、運動缺陷、發育延遲、關節炎、痙攣、驚厥、腎衰竭、骨壞死、萎縮性疤痕、四肢部分喪失、學習障礙和行為障礙等（Batista等人，*Asian Pac J Trop Med.* 2017;10(11):1019-29；Stephens等人，*Neisseria meningitidis*. [編] J.E. Bennett、R. Dolin和M.J. Blaser. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. 第2425-45頁；Campsall等人，*Crit Care Clin.* 2013;29(3):393-409；Pace等人，*Vaccine.* 2012;30 增刊2:B3-9）。

**[0008]** 血清群B是地方病的重要原因，並導致幾個工業化國家的多種長期流行病（Vuocolo等人，*Hum Vaccin Immunother.* 2018;14(5):1203-15），包括古巴（Rodriguez等人，*Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(4):433-40）、挪威（Fredriksen

等人，NIPH Ann. 1991;14(2):67-79; 討論 -80) 和紐西蘭 (Martin等人，J Infect Dis. 1998;177(2):497-500；Dyett等人，Epidemiol Infect. 2006;134(2):377-83)。在諸如法國 (從2000年到2003年) (Grodet等人，Microbiol Infect. 2004;10(9):845-8；Caron等人，Lancet Infect Dis. 2011;11(6):455-63) 和美國 (從2013年到2017年) 等其他國家也報告了由單一菌株引起的較小爆發，其中一些與學院和大學有關 (Folaranmi等人，2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015;64(22):608-12；Atkinson等人，Pharmacotherapy. 2016;36(8):880-92)。

**[0009]** 最近有兩種針對腦膜炎奈瑟氏菌血清群B的疫苗獲得許可：來自葛蘭素史克公司[GSK]的4組分MenB蛋白疫苗 (4CMenB) BEXSERO<sup>®</sup>和基於fHBP蛋白的二價重組 (rLP2086) 疫苗 (來自輝瑞的TRUMENBA<sup>®</sup>)。這些疫苗分別用氫氧化鋁佐劑和羥基磷酸鋁佐劑充當佐劑。

**[0010]** 佐劑是摻入疫苗調配物中以增強疫苗抗原的免疫原性的試劑。鋁鹽 (如磷酸鋁和氫氧化鋁) 是當今人類和獸醫疫苗中最常用的佐劑。儘管有許多含鋁佐劑可供使用，但任何一種特異性疫苗調配物若要長期具有免疫原性和穩定性，就需要適當選擇佐劑/抗原組合。

**[0011]** 羥基磷酸鋁 ( $\text{AlPO}_4$ ) 佐劑是無定形的，並且大多數可商購的 $\text{AlPO}_4$ 佐劑具有5至7的零電荷點 (PZC)，並且在7.0的中性pH下是中性或帶負電荷的 (Hem SL, 2007)。零電荷點等同於蛋白質或生物分子的pI或等電pH，並且定義為分子表面上的淨電荷為零時的pH。零電荷點取決於 $\text{AlPO}_4$ 表面的氫氧根離子與磷酸根離子的比率。在中性pH下， $\text{AlPO}_4$ 可以強烈吸附具有鹼性pI的蛋白質。

**[0012]** 脫氫結晶形式的氫氧化鋁在化學上是羥基氧化鋁 $[\text{AlO}(\text{OH})]$ ，並且在其水相中，它藉由獲得另外的水分子變成三水合氧化鋁 $[\text{Al}(\text{OH})_3]$  (Stanley L Hem，



2007)。羥基氧化鋁的PZC為11，並且因此在7.0的中性pH下帶正電荷。這種正電荷使羥基氧化鋁成為帶負電荷的抗原（例如，酸性pI蛋白）的良好吸附劑。用磷酸根離子滴定可以降低氫氧化鋁的PZC。這是由氫氧化鋁表面的氫氧根離子與磷酸根離子之間的配體交換引起的。

**[0013]** 抗原在鋁佐劑上的吸附取決於所述抗原的物理和化學特徵、所用鋁佐劑的類型以及吸附條件。可影響抗原在鋁佐劑上的吸附的因素包括靜電力、疏水相互作用、范德華力、氫鍵、pH、溫度和佐劑顆粒的大小。通常，抗原藉由靜電吸引（即佐劑和抗原具有相反的電荷）和/或藉由配體交換（即抗原上的磷酸基團置換佐劑表面上的羥基）吸附到鋁佐劑上（Seeber SJ, 1991; Iyer S, 2004）。鋁佐劑與抗原蛋白之間的靜電相互作用可能會受到調配物的pH、鋁的零電荷點（PZC）和蛋白質的等電點（pI）的影響。通常尋求靜電相互作用的適當平衡，因為與鋁結合過強的蛋白質可能會引起不良的免疫反應，而弱的相互作用可能會導致吸附不良和產物穩定性降低。

**[0014]** 可以作為單層吸附到佐劑上的抗原的最大量稱為「吸附能力」，並且吸附的強度由「吸附係數」表示（Jendrek, 2003）。

**[0015]** 吸附可影響蛋白質的結構和穩定性。關於吸附對含鋁佐劑的影響的研究結果並不完全一致。在一項研究中，三種蛋白質（牛血清白蛋白[BSA]、溶菌酶和卵清蛋白）在吸附到Alhydrogel<sup>®</sup>或Adju-Phos<sup>®</sup>上後不穩定。在另一項研究中，BSA和β-乳球蛋白（BLG）的結構藉由吸附到氫氧化鋁上而穩定（Jones, 2005; Zheng, 2007）。用於用鋁鹽佐劑穩定疫苗的液體調配物的方法包括凍乾、冷凍和冷凍乾燥，但這些方法通常導致佐劑聚集、免疫原濃度降低和免疫原性喪失（Maa, 2003; Diminsky, 1999; Alving, 1993; Warren, 1986）。即使對於那

些保持在冷藏條件下（例如，2°C至8°C）的調配物，吸附的抗原也可能是化學上不穩定的，並且因此隨著時間的推移可能經歷水解和斷裂。

**[0016]** WO 2010/109323揭露了包含吸附在羥基磷酸鋁佐劑上的H因子結合蛋白（factor H binding protein，fHBP）抗原的免疫原性組成物。選擇具有在5.0至7.0範圍內的PZC的羥基磷酸鋁佐劑以確保抗原的有效吸附。此外，組成物的pH被選擇在PZC的1.2個pH單位內。

**[0017]** 仍然需要提供包含鋁佐劑並且能夠降低蛋白抗原的不穩定性或改善蛋白抗原的穩定性的免疫原性組成物。

**[0018]** 需要提供包含鋁佐劑並且能夠誘導和增強免疫反應的免疫原性組成物。

**[0019]** 需要提供包含提供良好安全性的鋁佐劑的免疫原性組成物。

**[0020]** 需要提供包含腦膜炎奈瑟氏球菌血清群B抗原的組合並且能夠誘導增強的免疫反應的免疫原性組成物。

**[0021]** 需要提供包含腦膜炎奈瑟氏球菌血清群B抗原的組合並且能夠誘導針對異源抗原的增強的免疫反應的免疫原性組成物。

**[0022]** 需要提供包含含有至少一種fHBP A抗原的腦膜炎奈瑟氏球菌血清群B抗原的組合並且能夠誘導針對與組成物的fHBP A抗原異源和/或同源的fHBP A抗原的增強的免疫反應的免疫原性組成物。

**[0023]** 需要提供包含含有至少一種fHBP B抗原的腦膜炎奈瑟氏球菌血清群B抗原的組合並且能夠誘導針對與組成物的fHBP B抗原異源和/或同源的fHBP B抗原的增強的免疫反應的免疫原性組成物。

**[0024]** 需要提供包含腦膜炎奈瑟氏球菌血清群B抗原的組合並且能夠改善組成物的抗原的穩定性的免疫原性組成物。

**[0025]** 需要提供包含含有至少一種fHBP A和/或奈瑟氏菌黏附素A (NadA) 抗原的腦膜炎奈瑟氏球菌血清群B抗原的組合並且能夠誘導抗原的增強的穩定性的免疫原性組成物。

**[0026]** 本公開文本的目的是滿足這些需求的全部或部分。

### 【發明內容】

**[0027]** 根據本公開文本的一個目的，本公開文本涉及一種免疫原性組成物，所述免疫原性組成物包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合和羥基磷酸鋁 (AlPO<sub>4</sub>) 佐劑，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B，所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑被選擇為零電荷點 (PZC) 低於 5。

**[0028]** 本公開文本涉及一種包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合和羥基磷酸鋁 (AlPO<sub>4</sub>) 佐劑的免疫原性組成物，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B，在引入所述組成物之前，所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑的 PZC 低於 5。

**[0029]** 本公開文本的組成物包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合。所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B，以及羥基磷酸鋁 (AlPO<sub>4</sub>) 佐劑。所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑被選擇為「零電荷點」(PZC) 低於 5。所述 fHBP A 和 B 的等電點 (pI) 高於所述佐劑的 PZC。所述組成物的 pH 比所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑的 PZC 大至少 1.2 個單位。所述組成物的 pH 為約 5.5 至約 7.0。約 50%至約 85%的 fHBP A 和/或 B 吸附在所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑上。組成物可進一步包含 NadA 或 dOMV 抗原中的至少一者。

[0030] 在本公開文本中，在引入所述免疫原性組成物中之前，所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 低於 5。

[0031] 出人意料的是，藉由選擇 PZC 低於 5 的羥基磷酸鋁 ( $\text{AlPO}_4$ ) 佐劑 (與 WO 2010/109323 的建議相反) - 以調配包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原 (包括 fHBP 抗原) 的組合的免疫原性組成物，諸位發明人觀察到，有可能增強針對所述抗原的免疫反應、擴大腦膜炎奈瑟氏菌 B 菌株的覆蓋範圍並且進一步穩定所述抗原。

[0032] 出人意料的是，在所述組成物的 pH 比所述羥基磷酸鋁的 PZC 高 1.2 個單位的情況下觀察到有利的效果。

[0033] 出人意料的是，在所述 fHBP 抗原的吸附低於 85% 的情況下觀察到有利效果。

[0034] 如實例部分所示，與用 PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  製備的組成物相比，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B 的免疫原性組成物使得所述組成物誘導針對與所述組成物的 fHBP B 同源的 fHBP B 的增強的免疫反應 (用抗體的幾何平均力價 (GMT) 測量)。

[0035] 此外，如實例部分所示，與用 PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  製備的組成物相比，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B 的免疫原性組成物使得所述組成物誘導針對與所述組成物的 fHBP B 異源的 fHBP B 的增強的免疫反應 (用 GMT 和反應者的百分比測量)。

[0036] 此外，如實例部分所示，與用 PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  製備的組成物相比，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 的免疫原性組成物使得所述組成物誘導針對與所述組成物的 fHBP A 抗原同源的 fHBP A 的增強的免疫反應 (用 GMT 和反應者的百分比測量)。

[0037] 此外，如實例部分所示，與用 PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  製備的組成物相比，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 的免疫原性組成物使得所述組成物誘導針對與所述組成物的 fHBP A 異源的 fHBP A 的增強的免疫反應（用 GMT 和反應者的百分比測量）。

[0038] 與用含有 PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  的組成物獲得的 hSBA GMT 相比，藉由用根據本公開文本的組成物獲得的使用人補體的功能性血清殺細菌抗體活性（hSBA）的增加的幾何平均力價（GMT）觀察到增強的免疫反應。

[0039] 此外，與用含有 PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  的組成物獲得的反應者%相比，藉由用根據本公開文本的組成物獲得的增加的反應者%觀察到增強的免疫反應。

[0040] 藉由增加的 hSBA GMT fHBP 特異性反應和/或增加的反應者%可以觀察到增強的免疫反應。

[0041] 此外，如實例部分所示，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備根據本公開文本的包含含有至少一種 fHBP A 和/或至少一種 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物有利地不損害 fHBP 的穩定性。

[0042] 如實例部分所示，與用 PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑製備的組成物相比，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備根據本公開文本的包含含有至少一種 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物使得所述 fHBP A 的穩定性增強。

[0043] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑可以被選擇為 PZC 範圍是約 4.1 至小於 5、或範圍是約 4.2 至約 4.9、或範圍是約 4.3 至約 4.8 或 PZC 是約 4.5。

[0044] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑可以被選擇為 PZC 是約 4.5。

[0045] 本公開文本的所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述組成物的 pH 之間的差的範圍為約 0.6 至約 2.9。

[0046] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 0.6 至 2.9 個單位，或與所述佐劑的 PZC 相差 1.2 至 2.9 個單位。

[0047] 所述免疫原性組成物的 pH 範圍可以是約 5.5 至約 7.0，或 pH 可以是約 6.0。

[0048] 本公開文本的免疫原性組成物可進一步包含至少一種去污劑提取的外膜囊泡（detergent-extracted Outer Membrane Vesicle，dOMV）和/或至少一種奈瑟氏菌黏附素 A（NadA）蛋白。

[0049] 如實例部分所示，與用 PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  製備的組成物相比，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備根據本公開文本的包含含有至少一種 NadA 蛋白的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物使得所述 NadA 蛋白的穩定性增強。

[0050] 如實例部分所示，與用 PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  製備的組成物相比，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備根據本公開文本的包含含有 fHBP A 和 NadA 蛋白的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物使得所述 fHBP A 和所述 NadA 蛋白的穩定性增強。

[0051] 此外，如實例部分所示，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備根據本公開文本的包含含有至少一種 NadA 蛋白的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物有利地不損害所述 NadA 蛋白誘導的免疫反應。

[0052] 此外，如實例部分所示，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備根據本公開文本的包含含有至少一種去污劑提取的外膜囊泡（dOMV）的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物有利地不損害穩定性或所述 dOMV 誘導的免疫反應。

[0053] 此外，如實例部分所示，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備根據本公開文本的包含含有至少一種去污劑提取的外膜囊泡 (dOMV) 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物有利地不增加所述組成物的致熱原性。

[0054] 此外，如實例部分所示，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備根據本公開文本的包含含有至少 fHBP A、fHBP B、NadA 和 dOMV 抗原的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物有利地不增加所述組成物的致熱原性。

[0055] 在本公開文本的免疫原性組成物中，所述 fHBP B 可以以所述組成物中存在的 fHBP B 總量的約 85% 或更小的量或以所述組成物中存在的 fHBP B 總量的範圍為約 50% 至小於 85% 的量吸附到  $\text{AlPO}_4$  佐劑上。

[0056] 所述 fHBP B 的等電點 (pI) 可以高於所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC。

[0057] 所述 fHBP B 的等電點 (pI) 的範圍是約 5.0 至約 7.0、或 5.2 至約 6.5、或約 5.3 至約 6.0，或等電點可以是約 5.5 或 5.46。

[0058] fHBP 的等電點可以藉由如等電聚焦等技術憑經驗測定。然而，更便利的是，所述等電點是理論等電點。這可以使用 Bjellqvist 等人，(1993) Electrophoresis 14:1023-31 中描述的胺基酸的 pKa 值，使用相關 ExPASy 工具 (Gasteiger 等人，(2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server in The Proteomics Protocols Handbook (編輯 John M. Walker), Humana Press (2005)) 來計算。

[0059] 所述 fHBP B 可以是非脂化的。

[0060] 所述 fHBP B 可以是包含降低或抑制所述 fHBP B 與人類 H 因子 (fH) 的結合的至少一個突變的突變 fHBP B。

[0061] 所述 fHBP B 可以是包含與 SEQ ID NO: 3 至少約 85% 的同一性的突變 fHBP B。

[0062] 所述 fHBP B 可以基於 SEQ ID NO: 6 的編號包含選自以下中至少一者的至少一個胺基酸取代：a) 在胺基酸 38 處的麩醯胺酸 (Q38) 的胺基酸取代；b) 在胺基酸 92 處的麩胺酸 (E92) 的胺基酸取代；c) 在胺基酸 130 處的精胺酸 (R130) 的胺基酸取代；d) 在胺基酸 223 處的絲胺酸 (S223) 的胺基酸取代；和 e) 在胺基酸 248 處的組胺酸 (H248) 的胺基酸取代，或包含 SEQ ID NO: 4 或由 SEQ ID NO: 4 組成，或包含 SEQ ID NO: 9 或由 SEQ ID NO: 9 組成。

[0063] 在一些實施例中，所述 fHBP B 可以包含 SEQ ID NO: 9 或由 SEQ ID NO: 9 組成。

[0064] 在本公開文本的免疫原性組成物中，所述 fHBP A 可以以所述組成物中存在的 fHBP A 總量的約 85% 或更小的量或以所述組成物中存在的 fHBP A 總量的範圍為約 50% 至小於 85% 的量吸附到  $\text{AlPO}_4$  佐劑上。

[0065] 所述 fHBP A 的等電點 (pI) 的範圍可以是約 5 至約 7、或 5.2 至約 6.5、或約 5.4 至約 6，或等電點是約 5.9 或 5.86。

[0066] 所述 fHBP A 可以是非脂化的。

[0067] 所述 fHBP A 可以是包含降低或抑制所述 fHBP A 與人類 H 因子 (fH) 的結合的至少一個突變的突變 fHBP A。

[0068] 所述 fHBP A 可以是包含與 SEQ ID NO: 1 至少約 85% 的同一性的突變蛋白。

[0069] 所述 fHBP A 基於 SEQ ID NO: 6 的編號包含選自以下中至少一者的至少一個胺基酸取代：a) 在胺基酸 115 處的天門冬醯胺酸 (N115) 的胺基酸取代；b) 在胺基酸 121 處的天門冬胺酸 (D121) 的胺基酸取代；c) 在胺基酸 128 處的絲胺酸 (S128) 的胺基酸取代；d) 在胺基酸 129 處的苯丙胺酸 (F129) 的胺基酸取代；e) 在胺基酸 130 處的白胺酸 (L130) 的胺基酸取代；f) 在位置 131 處的纈胺酸 (V131) 的胺基酸取代；g) 在位置 133 處的甘胺酸 (G133) 的胺基酸



取代；h) 在位置 219 處的離胺酸 (K219) 的胺基酸取代；以及 i) 在位置 220 處的甘胺酸 (G220) 的胺基酸取代，或包含 SEQ ID NO: 2 或由 SEQ ID NO: 2 組成，或包含 SEQ ID NO: 8 或由 SEQ ID NO: 8 組成。

**[0070]** 在一些實施例中，所述 fHBP A 可以包含 SEQ ID NO: 8 或由 SEQ ID NO: 8 組成。

**[0071]** 在本公開文本的免疫原性組成物中，所述 fHBP A 和/或所述 fHBP B 可以各自以範圍為約 20 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 40 µg/劑量至約 140 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 120 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 100 µg/劑量的量，或以約 50 µg/劑量、或約 50 µg/劑量、或約 100 µg/劑量的量存在。

**[0072]** 劑量的範圍可以是約 0.1 mL 至約 1 mL，例如，約 0.2 mL 至約 0.8 mL、約 0.4 mL 至約 0.6 mL，或可以是約 0.5 mL。

**[0073]** 在本公開文本的免疫原性組成物中，所述 fHBP A 可以以範圍為約 20 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 40 µg/劑量至約 140 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 120 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 100 µg/劑量的量，或以約 50 µg/劑量或約 100 µg/劑量的量存在。

**[0074]** 所述 fHBP B 可以以範圍為約 20 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 40 µg/劑量至約 140 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 120 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 100 µg/劑量的量，或以約 50 µg/劑量、或約 100 µg/劑量的量存在。

**[0075]** 在本公開文本的免疫原性組成物中，所述 NadA 蛋白可以是 NadA1 蛋白或可包含與 SEQ ID NO: 5 至少約 85% 的同一性，或包含 SEQ ID NO: 5 或由 SEQ ID NO: 5 組成。

[0076] 所述 NadA 蛋白可以以範圍為約 20 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 40 µg/劑量至約 140 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 120 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 100 µg/劑量的量，或以約 50 µg/劑量的量存在。

[0077] 在本公開文本的免疫原性組成物中，所述 dOMV 可包含孔蛋白 A(PorA) 蛋白。

[0078] 所述孔蛋白 A(PorA) 蛋白可以選自 PorA VR2 亞型或是 PorA VR2 P1.2。

[0079] 所述 dOMV 可以以範圍為約 5 µg/劑量至約 400 µg/劑量、或約 10 µg/劑量至約 300 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 250 µg/劑量、或約 35 µg/劑量至約 225 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 100 µg/劑量至約 150 µg/劑量、或約 110 µg/劑量至約 125 µg/劑量的量，或以約 25 µg/劑量、或以約 50 µg/劑量、或以約 125 µg/劑量的量存在。

[0080] 本公開文本的免疫原性組成物可進一步包含緩衝液。

[0081] 所述緩衝液可以選自 Tris 緩衝液、乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液、HEPES 緩衝液或組胺酸緩衝液。

[0082] 所述緩衝液可以是乙酸鈉緩衝液。

[0083] 本公開文本的免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：25 至 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化 fHBP A、25 至 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化 fHBP B、25 至 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、20 至 250 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、100 至 800 µg/劑量的 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 的乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

[0084] 本公開文本的免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：25 至 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化 fHBP A、25 至 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化 fHBP B、25 至 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、

20 至 250  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、100 至 800  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 的乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0085]** 本公開文本的免疫原性組成物可進一步包含來自腦膜炎奈瑟氏菌血清群 A、C、W135 和/或 Y 中的一種或多種的接合至載體蛋白(carrier protein)的至少一種莢膜糖。

**[0086]** 所述接合的莢膜糖可以接合至破傷風類毒素載體。

**[0087]** 如實例部分所示，選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑以製備根據本公開文本的包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合並且包含來自腦膜炎奈瑟氏菌血清群 A、C、W135 和/或 Y 中的一種或多種的至少一種接合莢膜糖的免疫原性組成物有利地不損害所述接合莢膜糖的穩定性或所述接合莢膜糖誘導的免疫反應。

**[0088]** 本公開文本的免疫原性組成物的沉降開始時間 ( $T_{\text{開始}}$ ) 範圍是約 3.5 min 至約 10 min。

**[0089]** 如在實例部分中公開的，可以藉由使用用於檢測液體分散體中的顆粒遷移和尺寸變化的靜態多重光散射來測量沉降開始時間。可以使用兩個檢測器-透射和後向散射-其信號與細微性和濃度相關，並且它們的變化是所發生的不穩定的跡象。此參數是組成物物理穩定性的度量，並且與懸浮液的絮凝特性相關。本領域已知的其他方法可用於測定沉降開始時間。

**[0090]** 有利地，至少或超過 3.5 min 的沉降開始時間使得可確保組成物的組分在製造操作期間保持懸浮，並且因此更好地控制製造。

**[0091]** 本公開文本的免疫原性組成物可以增強針對表現與所述組成物的 fHBP B 異源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應。

**[0092]** 本公開文本的免疫原性組成物可以增強針對表現與所述組成物的 fHBP B 同源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應。

[0093] 本公開文本的免疫原性組成物可以增強針對表現與所述組成物的 fHBP A 異源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應。

[0094] 本公開文本的免疫原性組成物可以增強針對表現與所述組成物的 fHBP A 同源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應。

[0095] 本公開文本的免疫原性組成物可以增強 fHBP A 的穩定性。

[0096] 本公開文本的免疫原性組成物可以增強 NadA 蛋白的穩定性。

[0097] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種包含本公開文本的免疫原性組成物的疫苗。

[0098] 根據一些實施例，本公開文本的免疫原性組成物或疫苗可用於誘導針對腦膜炎奈瑟氏菌 B 菌株的免疫反應的方法中。

[0099] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $AlPO_4$  佐劑用於增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的組成物誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原異源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的用途。

[0100] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $AlPO_4$  佐劑用於增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的組成物誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原同源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的用途。

[0101] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $AlPO_4$  佐劑用於增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 抗原的組成物誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 抗原異源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的用途。

[0102] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $AlPO_4$  佐劑用於增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 抗原的組成物誘導的針對表

現與所述組成物的所述 fHBP A 抗原同源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的用途。

**[0103]** 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於穩定免疫原性組成物中的至少一種 fHBP A 的用途。

**[0104]** 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於穩定免疫原性組成物中的至少一種奈瑟氏菌黏附素 A (NadA) 蛋白的用途。

**[0105]** 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於將包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的組成物的沉降開始時間 ( $T_{\text{開始}}$ ) 穩定在約 3.5 min 至約 10 min 範圍內的用途，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B。

**[0106]** 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於充當包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物的佐劑的用途，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B。

**[0107]** 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於製造包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物的用途，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B。

**[0108]** 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種用於製造免疫原性組成物的方法，所述免疫原性組成物包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合和  $\text{AlPO}_4$  佐劑，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B，所述方法至少包括以下步驟：

**[0109]** a) 選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑，以及

[0110] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B 組合，所述組合以任何順序進行。

[0111] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與 fHBP A 和 fHBP B 的組合可以以任何順序進行。例如，可以將所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與 fHBP A 組合，並且然後可以添加 fHBP B，或可以將所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與 fHBP B 組合，並且然後可以添加 fHBP A，或可以將所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑同時與 fHBP A 和 fHBP B 二者組合。

[0112] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種用於穩定免疫原性組成物中的 fHBP A 和 NadA 蛋白中的至少一者的方法，所述方法至少包括以下步驟：

[0113] a) 選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑，以及

[0114] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與 fHBP A 或 NadA 蛋白組合，以及

[0115] c) 獲得其中所述 fHBP A 或 NadA 蛋白被穩定的免疫原性組成物。

[0116] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種用於製備包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的免疫原性組成物的方法，所述組成物誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原異源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應，所述方法至少包括以下步驟：

[0117] a) 選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑，以及

[0118] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與所述 fHBP B 抗原組合，以及

[0119] c) 獲得所述免疫原性組成物。

[0120] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種用於製備包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的免疫原性組成物的方法，所述組成物誘導針對表現與

所述組成物的所述 fHBP B 抗原同源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應，所述方法至少包括以下步驟：

[0121] a) 選擇 PZC 低於 5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑，以及

[0122] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑與所述 fHBP B 抗原組合，以及

[0123] c) 獲得所述免疫原性組成物。

[0124] 所述組成物可進一步包含 fHBP A、NadA 蛋白或 dOMV 中的至少一者。

[0125] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種用於製備包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 抗原的免疫原性組成物的方法，所述組成物誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 抗原異源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應，所述方法至少包括以下步驟：

[0126] a) 選擇 PZC 低於 5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑，以及

[0127] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑與所述 fHBP A 抗原組合，以及

[0128] c) 獲得所述免疫原性組成物。

[0129] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種用於製備包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 抗原的免疫原性組成物的方法，所述組成物誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 抗原同源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應，所述方法至少包括以下步驟：

[0130] a) 選擇 PZC 低於 5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑，以及

[0131] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑與所述 fHBP A 抗原組合，以及

[0132] c) 獲得所述免疫原性組成物。

[0133] 所述組成物可進一步包含 fHBP B、NadA 蛋白或 dOMV 中的至少一者。

[0134] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種在有需要的個體中誘導針對腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法，所述方法至少包括

向所述個體投予根據本公開文本的免疫原性組成物或疫苗的步驟，其中所述投予步驟誘導針對所述腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應。

**[0135]** 一種在有需要的個體中增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的組成物所誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原異源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法，所述方法至少包括向所述個體投予根據本公開文本的免疫原性組成物或疫苗的步驟，其中所述投予步驟誘導針對表現所述異源 fHBP B 的所述腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應。

**[0136]** 一種在有需要的個體中增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的組成物所誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原同源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法，所述方法至少包括向所述個體投予根據本公開文本的免疫原性組成物或疫苗的步驟，其中所述投予步驟誘導針對表現所述同源 fHBP B 的所述腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應。

**[0137]** 一種在有需要的個體中增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 抗原的組成物所誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 抗原異源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法，所述方法至少包括向所述個體投予根據本公開文本的免疫原性組成物或疫苗的步驟，其中所述投予步驟誘導針對表現所述異源 fHBP A 的所述腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應。

**[0138]** 一種在有需要的個體中增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 抗原的組成物所誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 抗原同源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法，所述方法至少包括向所述個體投予根據本公開文本的免疫原性組成物或疫苗的步驟，其中所述投予步驟誘導針對表現所述同源 fHBP A 的所述腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應。

### 【圖式簡單說明】



[0139] 圖 1：示出了針對在 D0（灰色）和 D42（黑色）從在 D0 和 D28 用採用  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 5.2）或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 4.5）配製的 MenB 免疫原性組成物免疫的兔中收集的血清（純化的 IgG）中的表現 A05 密切相關（也稱為同源）fHBP A56 的腦膜炎奈瑟氏菌株測量的 hSBA 的結果。

[0140] 圖 2：示出了針對在 D0（灰色）和 D42（黑色）從在 D0 和 D28 用採用  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 5.2）或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 4.5）配製的 MenB 免疫原性組成物免疫的兔中收集的血清（純化的 IgG）中的表現 B01 密切相關（同源）fHBP B44 的腦膜炎奈瑟氏菌株測量的 hSBA 的結果。

[0141] 圖 3：示出了針對在 D0（灰色）和 D42（黑色）從在 D0 和 D28 用採用  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 5.2）或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 4.5）配製的 MenB 免疫原性組成物免疫的兔中收集的血清（純化的 IgG）中的表現 A05 異源 fHBP A22 的腦膜炎奈瑟氏菌株測量的 hSBA 的結果。

[0142] 圖 4：示出了針對在 D0（灰色）和 D42（黑色）從在 D0 和 D28 用採用  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 5.2）或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 4.5）配製的 MenB 免疫原性組成物免疫的兔中收集的血清（純化的 IgG）中的表現 B01 異源 fHBP B24 的腦膜炎奈瑟氏菌株測量的結果。

[0143] 圖 5：示出了針對在 D0（灰色）和 D42（黑色）從在 D0 和 D28 用採用  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 5.2）或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 4.5）配製的 MenB 免疫原性組成物免疫的兔中收集的血清（純化的 IgG）中的表現 VR2-P1.2-PorA 的腦膜炎奈瑟氏菌株測量的 hSBA 的結果。

[0144] 圖 6：示出了針對在 D0（灰色）和 D42（黑色）從在 D0 和 D28 用採用  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 5.2）或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑（PZC 4.5）配製的 MenB 免疫原性組成物免疫的兔中收集的血清（純化的 IgG）中的表現 NadA 的腦膜炎奈瑟氏菌株測量的 hSBA 的結果。

**[0145] 圖 7：**示出了針對在 D0、D28 和 D42 從在 D0 和 D28 用在不採用 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（白色）或採用改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（PZC 4.5）（灰色）或採用 MenB 抗原和改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（PZC 4.5）（黑色）的情況下配製的 MenACWY 免疫原性組成物免疫的兔中收集的血清（純化的 IgG）中的腦膜炎奈瑟氏菌 A 菌株測量的 hSBA 的結果。

**[0146] 圖 8：**示出了針對在 D0、D28 和 D42 從在 D0 和 D28 用在不採用 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（白色）或採用改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（PZC 4.5）（灰色）或採用 MenB 抗原和改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（PZC 4.5）（黑色）的情況下配製的 MenACWY 免疫原性組成物免疫的兔中收集的血清（純化的 IgG）中的腦膜炎奈瑟氏菌 C 菌株測量的 hSBA 的結果。

**[0147] 圖 9：**示出了針對在 D0、D28 和 D42 從在 D0 和 D28 用在不採用 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（白色）或採用改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（PZC 4.5）（灰色）或採用 MenB 抗原和改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（PZC 4.5）（黑色）的情況下配製的 MenACWY 免疫原性組成物免疫的兔中收集的血清（純化的 IgG）中的腦膜炎奈瑟氏菌 W135 菌株測量的 hSBA 的結果。

**[0148] 圖 10：**示出了針對在 D0、D28 和 D42 從在 D0 和 D28 用在不採用 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（白色）或採用改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（PZC 4.5）（灰色）或採用 MenB 抗原和改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（PZC 4.5）（黑色）的情況下配製的 MenACWY 免疫原性組成物免疫的兔中收集的血清（純化的 IgG）中的腦膜炎奈瑟氏菌 Y 菌株測量的 hSBA 的結果。

**[0149] 圖 11** 示出了配製在具有 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（PZC 5.2）或改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑（PZC 4.5）的 MenPenta 免疫原性組成物中並且經受 45°C（或對於 NadA 是 37°C）的熱應力持續 20 天的 A05tmN、B01smN、NadA 和 dOMV 的相對抗原性（RA）的結果。

**[0150] 圖 12:** 示出了配製在具有  $\text{AlPO}_4$  佐劑 (PZC 5.2) 或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑 (PZC 4.5) 的 MenPenta 免疫原性組成物中並且經受  $5^\circ\text{C}$  的溫度或  $45^\circ\text{C}$  的熱應力持續 28 天的血清群 A、C、W-135 和 Y 的游離多糖變化百分比。

**[0151] 圖 13:** 示出了 A05tmN、B01smN、NadA 和 dOMV 在  $45^\circ\text{C}$  (對於 B01、A05 和 dOMV) 或  $37^\circ\text{C}$  (對於 NadA) 下在具有不同零電荷點 (PZC) 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑 ( $\text{AlPO}_4$  佐劑 (PZC 5.2) 或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑 (PZC 為 4.3、4.5 或 4.8)) 中持續 30 天的穩定性，表示為 A05tmN、B01smN、NadA 或 dOMV 的相對抗原性 (RA)。

## 序列說明

**[0152] SEQ ID NO: 1** 表示 fHBP A05 野生型序列，其不具有與負責脂化的信號肽對應的 N 端前 19 個胺基酸。

### [0153]

CSSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTL  
 TLSAQGAEKTFKVGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEF  
 QIYKQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLV SGLGGEHTAFNQLPSGKA  
 EYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADE  
 KSHAVILGDTRYGSEEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

**[0154] SEQ ID NO: 2** 表示突變 fHBP A05 序列，其不具有負責脂化的信號肽並且具有 G220S、L130R、G133D 的突變(編號是關於序列 SEQ ID NO: 6 (fHBP B24) 確定的)。

### [0155]

CSSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTL  
 TLSAQGAEKTFKVGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEF

QIYKQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSDLGGEHTAFNQLPSGKA  
EYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADE  
KSHAVILGDTRYGSEEKSTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

**[0156] SEQ ID NO: 3** 表示 fHBP B01 野生型序列，其不具有負責脂化的信號肽。

**[0157]**

CSSGGGGSGGGGV TADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNG  
TLTL SAQGA EKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQ  
VYKQSHSALTALQTEQE QDPEHSEKMVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVM  
ATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPD  
EKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGEKAQE VAGSAEVETANGIHHIGLAA  
KQ

**[0158] SEQ ID NO: 4** 表示突變 fHBP B01 序列，其不具有負責脂化的信號肽並且具有 H248L 的突變（編號是關於序列 SEQ ID NO: 6（fHBP B24）確定的）。

**[0159]**

CSSGGGGSGGGGV TADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNG  
TLTL SAQGA EKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQ  
VYKQSHSALTALQTEQE QDPEHSEKMVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVM  
ATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPD  
EKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGEKAQE VAGSAEVETANGIHLIGLAA  
KQ

**[0160] SEQ ID NO: 5** 表示來自 MenB MC58 菌株的 NadA1 序列，其中 N 端信號肽的 23 個胺基酸和 C 端的最後 55 個胺基酸已缺失。

**[0161]**

MTSDDDVKKAATVAIVAA YNNGQEINGFKAGETIYDIGEDGTITQKDAT

第 24 頁，共 145 頁(發明說明書)

AADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVNENKQNVDKVKAAESEIEKLTTKL  
 ADTDAALADTDAALDETTNALNKLGENITTF AEETKTNIVKIDEKLEAVADT  
 VDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAEETKQNVDKVKAA  
 ETAAGKAEAAAAGTANTAADKAEVA AAKVTDIKADIATNKADIAKNSARIDS  
 LDKNVANLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG

**[0162] SEQ ID NO: 6** 表示 fHBP B24 野生型序列，在此基礎上確定 A05 和 B01 中突變位置的編號。

**[0163]**

CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLK  
 AAQGAEKTYGNGDSLNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYK  
 QSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATY  
 RGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGNNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKR  
 HAVISGSVLYNQAEEKGSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

**[0164] SEQ ID NO: 7** 表示來自 MenB MC58 菌株的野生型 NadA1 序列。

**[0165]**

MKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAATVAIVAAYNNGQEIN  
 GFKAGETIYDIGEDGTITQKDATAADVEADDFKGLGLKKVVTNLTKTVNEN  
 KQNVDKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDETTNALNKLGENIT  
 TFAEETKTNIVKIDEKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTA  
 NEAKQTAEETKQNVDKVKAAETAAGKAEAAAAGTANTAADKAEVA AAKV  
 TDIKADIATNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETRQGLAEQAALSGLFQPY  
 NVGRFNVTA AVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYH  
 VGVNYEW

**[0166] SEQ ID NO: 8** 表示具有突變 G220S、L130R、G133D 的非脂化突變 fHBP A05 序列（編號是關於序列 SEQ ID NO: 6（fHBP B24）確定的），並且藉由將 ATG 起始密碼子直接融合至在編碼重組蛋白的 DNA 序列中的第二 5' 末端密碼子使得 N 端半胱胺酸被甲硫胺酸取代。

**[0167]**

MSSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGT  
 LTLAQAQGAEKTFKVGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASG  
 EFQIYKQDHS AVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSDLGGEHTAFNQLPSGK  
 AEYHGKAFSSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKA  
 DEKSHAVILGDTRYGSEEKSTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAG  
 KQ

**[0168] SEQ ID NO: 9** 表示具有突變 H248L 的非脂化突變 fHBP B01 序列（編號是關於序列 SEQ ID NO: 6（fHBP B24）確定的），並且藉由將 ATG 起始密碼子直接融合至在編碼重組蛋白的 DNA 序列中的第二 5' 末端密碼子使得 N 端半胱胺酸被甲硫胺酸取代。

**[0169]**

MSSGGGGSGGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNG  
 TLTLAQAQGAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVS RFD FIRQIEVDGQLITLESGEFQ  
 VYKQSHSALTALQTEQE QDPEHSEKMVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVM  
 ATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLK SPELNVDLAVAYIKPD  
 EKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVETANGIHLIGLAA  
 KQ

**【實施方式】**

## 定義

**[0170]** 除非本文另有定義，否則與本發明結合使用的科學和技術術語應當具有本領域具有通常知識者通常理解的含義。例如，*Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology*, Juo, Pei-Show, 第 2 版, 2002, CRC Press；*The Dictionary of Cell and Molecular Biology*, 第 3 版, 1999, Academic Press；以及 *Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology*, 修訂版, 2000, Oxford University Press，可為本領域具有通常知識者提供本公開文本中所使用的許多術語的一般解釋。下文描述了示例性方法和材料，但在本發明的實踐或測試中也可以使用與本文所述的那些類似或等效的方法和材料。在矛盾的情況下，將以包括定義在內的本說明書為準。通常，本文所述的結合細胞和組織培養、分子生物學、病毒學、免疫學、微生物學、遺傳學、分析化學、合成有機化學、醫學和藥物化學以及蛋白質和核酸化學和雜交使用的命名法以及其技術是本領域熟知且常用的那些。根據套組製造商的說明書，如本領域通常所實現的或如本文所述的那樣進行方法。此外，除非上下文另有要求，否則單數術語應包括複數，並且複數術語應包括單數。

**[0171]** 單位、首碼和符號均以其國際單位制（SI）可接受的形式表示。數值範圍包括定義所述範圍的數字。除非另有說明，否則胺基酸序列以胺基（N-）到羧基（-C）的方向從左到右書寫。本文提供的標題不是對本公開文本的各個方面的限制。因此，藉由從整體上參考說明書，可以更全面地定義下文緊接著定義的術語。

**[0172]** 將本文提及的所有出版物和其他參考文獻均藉由引用以其整體併入。儘管本文引用了許多文件，但此引用並不意味著承認這些文件中的任一個構成本領域公知常識的一部分。

[0173] 必須指出的是，除非上下文另外清楚地指出，否則如在本文以及在所附申請專利範圍中所用的，單數形式「一個/一種 (a)」、「一個/一種 (an)」以及「所述 (the)」包括複數指示物。因此，例如對「**抗原**」的提及包括多種此類抗原，並且對「**蛋白質**」的提及包括對一種或多種蛋白質的提及，等等。

[0174] 應理解，本文所述的本公開文本的方面和實施例包括「**具有**」、「**包含**」方面和實施例，「**由方面和實施例組成**」以及「**基本上由方面和實施例組成**」。詞語「**具有**」和「**包含**」或諸如「**具有**」（「has」、「having」）、「**包含**」（「comprises」或「comprising」）等變體應理解為暗示包含一種或多種所述要素（如物質組成物或方法步驟），但不排除任何其他要素。術語「**由.....組成**」暗示包含一種或多種所述要素，排除任何另外的要素。術語「**基本上由.....組成**」暗示包含所述要素以及可能的一種或多種其他要素，其中所述一種或多種其他要素不會對本公開文本的一種或多種基本和新穎特徵產生實質性影響。應理解，使用術語「**包含**」或等同術語的本公開文本的不同實施例涵蓋了其中該術語被替換為「**由.....組成**」或「**基本上由.....組成**」的實施例。

[0175] 此外，本文使用的「**和/或**」被視為兩個指定特徵或組分中的每一個與或不與其他特徵或組分的特定公開。因此，如在本文中以短語如「**A 和/或 B**」使用的術語「**和/或**」旨在包括「**A 和 B**」、「**A 或 B**」、「**A**」（單獨）和「**B**」（單獨）。同樣地，如以短語如「**A、B 和/或 C**」使用的術語「**和/或**」旨在涵蓋以下方面中的每一個：**A、B 和 C**；**A、B 或 C**；**A 或 C**；**A 或 B**；**B 或 C**；**A 和 C**；**A 和 B**；**B 和 C**；**A**（單獨）；**B**（單獨）；以及 **C**（單獨）。

[0176] 術語「**大約 (approximately)**」或「**約 (about)**」在本文中用於意指大約、大致、大概或在.....左右。當術語「**約**」與數值範圍結合使用時，它藉由擴展所述數值的上下邊界來修改該範圍。通常，術語「**約**」可以藉由方差（例如，**10%**、**向上或向下**）將數值修飾為高於和低於所述值（**更高或更低**）。在一



些實施例中，該術語表示與所示數值偏差 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.9\%$ 、 $\pm 0.8\%$ 、 $\pm 0.7\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.4\%$ 、 $\pm 0.3\%$ 、 $\pm 0.2\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.05\%$ 或 $\pm 0.01\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 10\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 5\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 4\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 3\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 2\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 1\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 0.9\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 0.8\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 0.7\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 0.6\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 0.5\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 0.4\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 0.3\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 0.1\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 0.05\%$ 。在一些實施例中，「約」表示與所示數值偏差 $\pm 0.01\%$ 。

**[0177]** 在本公開文本中，關於變化所使用的術語「**顯著**」旨在意指觀察到的變化是明顯的和/或它具有統計學意義。

**[0178]** 在本公開文本中，與本公開文本的特徵結合使用的術語「**基本上**」旨在定義與該特徵相關的在很大程度上類似於該特徵但不完全類似於該特徵的一組實施例。

**[0179]** 在本公開文本中，「**免疫原性組成物**」旨在指包含足夠量並且在合適的調配物中的至少一種抗原的組成物，所述組成物用於在被投予所述組成物的個體中誘導針對所述抗原的免疫反應。所述免疫反應可以是體液和/或細胞反應。

**[0180]** 在本公開文本中，「**PZC**」旨在意指零電荷點並且旨在指吸附劑的淨表面電荷等於零的 pH。

[0181] 在本公開文本中，「**pI**」旨在意指等電點並且旨在指特定分子不攜帶淨電荷的 pH。

[0182] 在本公開文本中，術語「**抗原**」包括任何分子，例如肽或蛋白質，其包含將引發免疫反應的至少一個表位和/或免疫反應針對其被引發的至少一個表位。例如，抗原是任選地在加工後誘導免疫反應的分子，所述免疫反應例如對抗原或表現抗原的細胞具有特異性。加工後，抗原可由 MHC 分子呈遞並與 T 淋巴細胞（T 細胞）特異性反應。根據本公開文本，可以設想任何合適的作為用於免疫反應的候選者的抗原。抗原可對應於或可源自天然存在的抗原。

[0183] 在本公開文本中，術語「**佐劑**」旨在指能夠增強針對抗原的免疫反應（包括增強由抗原產生的免疫反應的幅度和/或持續時間）的化合物。

[0184] 在本公開文本中，術語「**緩衝液**」旨在指含有弱酸及其鹽或弱鹼及其鹽並且對 pH 的變化具有抗性的水溶液。緩衝液用於維持溶液中 pH 的穩定，因為它們可以中和少量的另外的酸或鹼。適用於免疫原性組成物的緩衝液是本領域已知的。

[0185] 在本文中，表述「**免疫反應**」旨在指在受試者中發生的生物反應，在所述受試者中，身體識別並保護自身免受抗原（即細菌、病毒和顯現為外來和有害的物質）影響。免疫反應可以具有體液（即抗體）或細胞組分。

[0186] 在本文中，表述「**增強免疫反應**」旨在指在其體液和/或細胞組分中測量的由第一免疫原性組成物誘導的免疫反應大於以類似方式測量的由第二免疫原性組成物誘導的免疫反應，所述第一組成物與所述第二組成物的區別在於一個參數。所述差異可能是趨勢，或是統計學上顯著的。在本公開文本中，為了確定免疫反應的增強，將本公開文本的組成物與含有與本公開文本的  $\text{AlPO}_4$  不同的  $\text{AlPO}_4$  佐劑的組成物進行比較，所述組成物的其他參數在其他方面相同。

[0187] 在本文中，關於抗原使用的術語「**穩定**」（「**stabilize**」、「**stabilizing**」或「**stabilization**」）旨在指在一定時間段內將該抗原的免疫原性維持在特定或非波動水準。調配物對抗原的穩定作用通常可以藉由以下來顯示：與在不存在所述調配物或存在另一種調配物的情況下所述抗原的免疫原性的損失相比，在所述調配物的存在下在應力（物理、化學或機械（例如 pH 的變化、溫度的變化、表面相互作用、外來雜質、混合等））期間所述抗原的免疫原性或效力的損失的減少或不存在。可以將免疫原性或效力在一個時間點測量，或者在一定時間段內重複測量，例如在 3、6、9 或 12 個月的時間段內測量 2、3、4、6 或 8 次。抗原的免疫原性（或效力）是其誘導免疫反應的能力，並且可以藉由本領域中任何已知的方法來測量。

[0188] 蛋白抗原的不穩定性可由以下引起：分子的化學降解或聚集（以形成更高階聚合物）、異二聚體的解離為單體、去糖基化、糖基化的修飾或降低了所述抗原的至少一種生物活性的任何其他結構修飾。

[0189] 如本文所用，術語「**疫苗**」旨在意指被投予於受試者以誘導免疫反應的針對病原體的免疫原性組成物，旨在保護受試者免受病原體引起的疾患（即提供保護性免疫）或治療病原體引起的疾患。如本文公開的疫苗可用作預防（預防性）疫苗，以用於在感染之前投予於受試者，旨在預防或降低初始（和/或復發性）感染發生的可能性。

[0190] 在本公開文本的上下文中，術語「**保護性免疫**」意為投予於哺乳動物的疫苗或免疫接種方案誘導免疫反應，所述免疫反應預防、延緩由腦膜炎奈瑟氏菌引起的疾病的發展或降低所述疾病的嚴重性，或減弱或完全消除所述疾病的症狀。保護性免疫可伴隨殺細菌抗體的產生。應注意，針對腦膜炎奈瑟氏菌的殺細菌抗體的產生在本領域被接受作為對疫苗在人體內的保護作用的預測。

（Goldschneider 等人(1969) *J. Exp. Med.* 129:1307）。

第 31 頁，共 145 頁(發明說明書)

**[0191]** 「分離的」蛋白質或其片段、變體或衍生物是指不在其天然環境中的蛋白。不要求具體純化水準。例如，分離的蛋白質可以僅僅從其天然或自然環境中除去。出於本公開文本的目的，重組產生的在宿主細胞中表現的蛋白質被視為是分離的，已經藉由任何適當的技術分離、分級或部分或基本上純化的天然或重組多肽亦是如此。

**[0192]** 如本文所用，術語「**個體**」或「**受試者**」或「**患者**」可互換使用，並且旨在指代哺乳動物。哺乳動物包括但不限於家養動物（例如，牛、綿羊、貓、狗和馬）、靈長類動物（例如，人類和非人類靈長類動物如猴）、兔和嚙齒動物（例如，小鼠和大鼠）。在一些示例性實施例中，所述個體或受試者是人類。

**[0193]** 應理解，為了清晰起見，在單獨實施例的背景中描述的本發明的某些特徵也可以在單個實施例中組合提供。相反，為了簡潔起見，在單個實施例的背景中描述的本發明的多種特徵也可以單獨提供或以任何合適的子組合來提供。

**[0194]** 除非另外定義，否則本文所用的所有技術和科技術語均具有與本發明所屬領域具有通常知識者通常所理解的相同含義。但是與本文所述的類似或等同的任何方法和材料也可以用於實踐或測試本發明。將本文提及的所有出版物均藉由引用併入本文，以公開和描述與引用出版物相關的方法和/或材料。

**[0195]** 列出了如下文所述的來源、成分和組分的清單，它們的組合和混合物也被考慮並且在本文的範圍內。

**[0196]** 應理解在本說明書通篇中給出的每一個最大數值限包括每一個較低數值限，如同此類較低數值限被明確地書寫在本文中一樣。在本說明書通篇中給出的每一個最小數值限將包括每一個較高數值限，如同此類較高數值限被明確地書寫在本文中一樣。在本說明書通篇中給出的每一個數值範圍將包括落在這種較寬的數值範圍內的每一個較窄數值範圍，如同此類較窄數值範圍都被明確地書寫在本文中一樣。

[0197] 所有項列表，例如成分列表，旨在並且應解釋為馬庫西組。因此，所有列表都可以被閱讀和解釋為「選自項的列表」的項「及其組合和混合物」。

[0198] 本文引用的可以是包括在本公開文本中使用的各種成分的組分的商品名。本文的諸位發明人不意圖受到任何特定商品名下的材料的限制。與以商品名引用的材料等同的材料（例如，以不同名稱或參考編號從不同來源獲得的材料）可以在本文的描述中被取代和使用。

### 羥基磷酸鋁 ( $\text{AlPO}_4$ ) 佐劑

[0199] 本公開文本的組成物包括羥基磷酸鋁佐劑。

[0200] 由化學式  $\text{Al}(\text{OH})\text{PO}_4$  表示並在說明書中稱為  $\text{AlPO}_4$  佐劑的羥基磷酸鋁佐劑不是化學計量化合物，並且氫氧根和磷酸根部分的量取決於製備條件。氫氧根和磷酸根部分的對應比例影響佐劑的零電荷點 (PZC)。

[0201] PZC 對應於表面沒有淨電荷時的 pH。PZC 與磷酸根對氫氧根的取代程度 (P/Al 莫耳比) 負相關。用磷酸根陰離子取代氫氧根陰離子降低 PZC。PZC 可以藉由改變溶液中游離磷酸根離子的濃度 (更多的磷酸根 = 更具有酸性或更低的 PZC) 或藉由添加緩衝液 (如組胺酸緩衝液) 來改變 (這使 PZC 更具有鹼性或更高)。

[0202] 本公開文本中使用的  $\text{AlPO}_4$  佐劑被選擇為 PZC 低於 5。在將  $\text{AlPO}_4$  佐劑引入所述組成物中之前測量 PZC。因此，在將  $\text{AlPO}_4$  佐劑引入所述免疫原性組成物中之前，基於其 PZC 低於 5 選擇適用於本公開文本的  $\text{AlPO}_4$  佐劑。因此，在將所選  $\text{AlPO}_4$  引入所述組成物中之前，其 PZC 低於 5。

[0203] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑可以被選擇為 PZC 範圍是約 4.1 至小於 5、或範圍是約 4.2 至約 4.9、或範圍是約 4.3 至約 4.8、或範圍是約 4.4 至約 4.6 或 PZC 是約 4.5。

[0204] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑可以被選擇為 PZC 是約 4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8 或 4.9。

[0205] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑可以被選擇為 PZC 是約 4.3、4.5 或 4.8。

[0206] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑可以被選擇為 PZC 是約 4.5。

[0207] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑可以被選擇為 PZC 是 4.5。

[0208] 可以使用不同的方法來獲得具有目標 PZC 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑。

[0209] 為了製備具有目標 PZC 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑，可以使用具有高於所述目標 PZC 的 PZC 的氫氧化鋁 ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ) 佐劑或羥基磷酸鋁佐劑。此類  $\text{AlPO}_4$  佐劑可商購獲得。

[0210] 在一種方法中，可以將由 0.5 M 磷酸二氫鈉和 0.5 M 磷酸氫二鈉的組合調配的磷酸鹽緩衝液 pH 5.8 添加至氫氧化鋁中或添加至具有較高 PZC 的羥基磷酸鋁佐劑中以製備具有目標 PZC 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑。

[0211] 在另一種方法中， $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 可以藉由用 0.5 M 磷酸二氫鈉鹽的儲備溶液滴定具有較高 PZC 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑來改變。

[0212] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑可以用三種反應物藉由分批沉澱法製備：氯化鋁（或鋁的其他來源）、磷酸三鈉和氫氧化鈉。

[0213] 羥基磷酸鋁佐劑的 P/Al 莫耳比通常在 0.3 與 1.2 之間，優選在 0.8 與 1.2 之間、或在 0.85 與 1.0 之間，並且更優選為約 0.9。至少 0.5 的 P/Al 莫耳比可以提供具有更好的免疫原性和穩定性特性的佐劑。

[0214]  $\text{AlPO}_4$  佐劑通常是無定形的（即，對 X 射線是無定形的）。它們通常是微粒（例如，如在透射電子顯微圖中所見，它們展現出板狀形態）。板狀物的典型直徑可以是 10-100 nm，並且這些形成尺寸為 0.5-20  $\mu\text{m}$ （例如，約 1-10  $\mu\text{m}$ ）的聚集體。羥基磷酸鋁佐劑在 pH 7.4 下的吸附能力已報告為每 mg  $\text{Al}^{3+}$  0.7-1.5 mg 之間的蛋白質。

[0215] 典型的佐劑是具有在 0.84 與 0.92 之間的 P/Al 莫耳比的無定形羥基磷酸鋁，並且此佐劑可以以 0.8 mg Al<sup>3+</sup>/mL 被包含。

[0216] Al(Al<sup>3+</sup>)的濃度可以優選地小於 5 mg/mL，例如，< 4 mg/mL、< 3 mg/mL、< 2 mg/mL、< 1 mg/mL 等。合適的範圍可以是約 0.2 至約 1 mg/mL 或 0.2 至約 0.8 mg/mL。可以使用 0.8 mg/劑量的 Al 濃度。

[0217] 磷酸鋁佐劑可以以範圍為約 100 µg/劑量至約 1000 µg/劑量、或約 150 µg/劑量至約 900 µg/劑量、或約 200 µg/劑量至約 800 µg/劑量、或約 250 µg/劑量至約 700 µg/劑量、或約 300 µg/劑量至約 600 µg/劑量、或約 350 µg/劑量至約 550 µg/劑量、或約 400 µg/劑量至約 500 µg/劑量、或約 400 µg/劑量至約 800 µg/劑量的量或以約 400 µg/劑量、或以約 800 µg/劑量的量存在於本文公開的組成物中。

[0218] 磷酸鋁佐劑可以以約 400 µg/劑量的量存在於本文公開的組成物中。

[0219] 在本公開文本的組成物中，所述 fHBP 可以以所述組成物的 fHBP 總量的約 85%或更小的量或以所述組成物的 fHBP 總量的範圍為約 50%至小於 85%或約 70%至約 80%的量吸附到 AlPO<sub>4</sub>上。所述 fHBP 可以以所述組成物的 fHBP 總量的範圍為約 50%至約 85%或小於約 85%、或約 50%至約 80%、或約 50%至約 75%、或約 65%至約 75%的量吸附在 AlPO<sub>4</sub>佐劑上。

[0220] 在本公開文本的免疫原性組成物中，所述 fHBP B 可以以所述組成物中存在的 fHBP B 總量的約 85%或更小的量或以所述組成物中存在的 fHBP B 總量的範圍為約 50%至小於 85%的量吸附到所述 AlPO<sub>4</sub>佐劑上。所述 fHBP B 可以以所述組成物的 fHBP B 總量的範圍為約 50%至約 85%或小於約 85%、或約 50%至約 80%、或約 50%至約 75%、或約 65%至約 75%的量吸附到 AlPO<sub>4</sub>佐劑上。所述 fHBP B 可以以存在於組成物中的 fHBP B 總量的約 50%、55%、60%、65%、70%、75%或 80%或小於 85%的量吸附到 AlPO<sub>4</sub>佐劑上。

[0221] 在本公開文本的免疫原性組成物中，所述 fHBP A 可以以所述組成物中存在的 fHBP A 總量的約 85% 或更小的量或以所述組成物中存在的 fHBP A 總量的範圍為約 50% 至小於 85% 的量吸附到所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑上。所述 fHBP A 可以以所述組成物的 fHBP A 總量的範圍為約 50% 至約 85% 或小於約 85%、或約 50% 至約 80%、或約 50% 至約 75%、或約 65% 至約 75% 的量吸附到  $\text{AlPO}_4$  佐劑上。所述 fHBP A 可以以存在於組成物中的 fHBP A 總量的約 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80% 或小於 85% 的量吸附到  $\text{AlPO}_4$  佐劑上。

[0222] 吸附的 fHBP 的比例可以藉由在配製期間改變鹽濃度和/或 pH 來控制，例如，通常，較高的 NaCl 濃度可以降低  $\text{AlPO}_4$  佐劑對 fHBP 的吸附。任何調配物的吸附量將取決於參數的組合，包括佐劑的 PZC、配製期間的鹽濃度和 pH、佐劑濃度、抗原濃度和抗原的 pI。這些參數中的每一個對吸附的影響都可以容易地評估。吸附程度可以藉由將組成物中 fHBP 抗原的總量（例如，在吸附發生之前測量的，或藉由解吸吸附的抗原測量的）與離心後保留在上清液中的量進行比較來確定。合適的方法可以是在實例部分中公開的方法。

[0223] 在一些實施例中，本公開文本的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於 pH 範圍為約 5.5 至約 7.0 的組成物中。本公開文本的組成物的 pH 可以是約 6.0。

[0224] 在一些實施例中，本公開文本的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於具有某一 pH 的組成物中，使得所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述組成物的 pH 之間的差的範圍為約 0.6 至約 2.9。

[0225] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 0.6 至 2.9 個單位，或與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.0 至 2.8、或 1.2 至 2.5 或 1.4 至 2.1 個單位。

[0226] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差至少 0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8 或 2.9 個單位。



[0227] 在一些實施例中，本公開文本的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於具有某一 pH 的組成物中，使得所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述組成物的 pH 之間的差的範圍為約 1.0 至約 2.9 或約 1.2 至約 2.9。

[0228] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差至少 1.2 個單位。

[0229] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差不多於 2.9 個單位。

[0230] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8 或 2.9 個單位。

[0231] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6 或 2.7 個單位。

[0232] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.2、1.5、1.7、2.2、2.5 或 2.7 個單位。

[0233] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6 或 1.7 個單位。

[0234] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.2、1.5 或 1.7 個單位。

[0235] 所述組成物的 pH 可以是約 5.5 至約 7.0。所述組成物的 pH 可以是約 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或約 7.0。

[0236] 所述組成物的 pH 可以是約 5.5、6.0、6.5 或約 7.0。

[0237] 所述組成物的 pH 可以是約 6.0。

[0238] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 可以是約 4.5。

[0239] 在一些實施例中，將本公開文本的  $\text{AlPO}_4$  佐劑與等電點 (pI) 範圍為約 5 至約 7 的 fHBP 一起使用。

[0240] 在一些實施例中，所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP 抗原的 pI 之間的差的範圍可以是約 0.1 至約 2.8、或約 0.5 至約 2.5、或約 0.8 至約 2.1、或約 0.96 至約 1.36。

[0241] 在一些實施例中，所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP 抗原的 pI 之間的差可以是約 0.96 或約 1.66。

[0242] fHBP 抗原的等電點可以藉由如等電聚焦等技術憑經驗測定。然而，更便利的是，所述等電點是理論等電點。這可以使用 Bjellqvist 等人 ((1993) Electrophoresis 14:1023-31) 中描述的胺基酸的 pKa 值並且使用相關 ExPASy 工具 (Gasteiger 等人 (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server in The Proteomics Protocols Handbook (編輯 John M. Walker), Humana Press (2005)) 來計算。

## 抗原

[0243] 本文公開的免疫原性組成物包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合。所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B，以及羥基磷酸鋁 ( $\text{AlPO}_4$ ) 佐劑，所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的零電荷點 (PZC) 低於 5。

## *fHBP*

[0244] 腦膜炎球菌 fHBP 也稱為脂蛋白 2086 (LP2086)、ORF2086 和源自基因組的奈瑟氏菌抗原 (GNA) 1870 或「741」，是在幾乎所有侵襲性腦膜炎球菌分離株的表面表現的脂蛋白。fHBP 是一種重要的毒力因子，因為它與人類補體因子 H (fH) 結合，後者是補體旁路的負調節因子 (Seib 等人, Expert Rev Vaccines.

2015;14(6):841-59)。fHBP 與人類 fH 的結合使得病原體能夠逃脫宿主先天免疫系統的替代性補體介導的殺傷，並在人類血清和血液中存活。

[0245] 已經描述了三種主要的遺傳學和免疫學 fHBP 變體：對應於亞家族 B 的變體 1，以及均劃分在亞家族 A 中的變體 2 和 3 (Seib 等人, *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(6):841-59)。除了 Pfizer (fHBP A 和 B) 和 Novartis (變體 1、2 和 3) 提供的命名法之外，fHBP 在 PubMLST 資料庫中使用唯一的 ID 號進行標識。儘管 fHBP 亞家族 A 與 B 之間存在顯著的抗原變異性，但在不同菌株中，每一個亞家族內的蛋白質序列是高度保守的(> 86%的序列同一性)。根據 [neisseria.org](http://neisseria.org) 或 [pubmlst.org/neisseria/fHBP/](http://pubmlst.org/neisseria/fHBP/) 網站，每個在腦膜炎奈瑟氏菌中發現的獨特 fHBP 也被分配了 fHBP 肽 ID。因為變體 2 (v.2) fHBP 蛋白 (來自菌株 8047, fHBP ID 77) 和變體 3 (v.3) fHBP (來自菌株 M1239, fHBP ID 28) 的長度與 MC58 (fHBP ID 1, 被選擇作為用於編號的參考序列) 的長度相比差異分別為-1 和+7 個胺基酸殘基，用於指代 v.2 和 v.3 fHBP 蛋白的殘基的編號不同於基於這些蛋白質的實際胺基酸序列的編號。因此，例如，對在 v.2 或 v.3 fHBP 序列的位置 166 處的白胺酸殘基 (L) 的提及指代在 v.2 蛋白的位置 165 處和在 v.3 蛋白的位置 173 處的殘基。變體 1、2 和 3 的成員分別存在於大約 65%、25%和 10%的導致侵襲性疾病的 MenB 臨床分離株中。在全球 MenB 菌株群體中呈現的十種最流行的 fHBP 變體占美國和歐洲總計的侵襲致病菌株的大約 80%(Bambini 等人, *Vaccine*. 2009;27(21):2794-803 ; Chang, *J Infect* 2019;S0163-4453(19):30272-5 ; Lucidarme, *Clin Vaccine Immunol* 2010;17(6):919-29 ; 以及 Murphy 等人, *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(3):379-89 ; Wang 等人, *Vaccine*. 2011;29(29-30):4739-44)。

[0246] 本公開文本中的 fHBP 可以是野生型（天然存在的）多肽或可以是非天然存在的（藉由胺基酸取代、插入或缺失進行修飾），只要所述多肽可以引發免疫反應即可。

[0247] 有待根據本公開文本使用的 fHBP 可以是脂化或非脂化 fHBP。脂化蛋白通常在其 N 端包含用於脂化的特定肽序列。該序列可在蛋白質的成熟階段被切割。脂化信號肽特定於每種蛋白質和產生所述蛋白質的宿主的細胞。

[0248] fHBP 多肽在腦膜炎奈瑟氏菌中表現為在其 N 端具有脂蛋白信號基序的前體蛋白。在加工期間，所述基序被切割留下 N 端半胱胺酸殘基，該殘基被共轉譯修飾為具有將蛋白質拴系至奈瑟氏菌外膜的脂質錨定物（McNeil 等人，(2013) MMBR 77(2):234-252）。對於脂化的 fHBP，附接在半胱胺酸上的脂質通常包括棕櫚醯基殘基，例如，三棕櫚醯基-S-甘油基-半胱胺酸（Pam3Cys）、二棕櫚醯基-S-甘油半胱胺酸（Pam2Cys）、N-乙醯基(二棕櫚醯基-S-甘油半胱胺酸)等。

[0249] 為了避免重組蛋白的脂化，可以使用本領域中已知的各種技術。作為例子，有可能使脂化信號肽缺失或用不會被產生蛋白質的細胞識別的信號肽替代脂化信號肽。US 10,300,122 B2 描述了這種技術用於 fHBP 的用途。

[0250] 此外，可以用編碼另一胺基酸的密碼子取代編碼 N 端半胱胺酸的密碼子，或者去除編碼 N 端半胱胺酸的密碼子。例如，US 10,300,122 B2 描述了 ATG（甲硫胺酸）密碼子在編碼成熟 fHBP 蛋白的開放閱讀框的 5'末端密碼子的 5'端插入。這導致多肽缺乏可脂化的 N 端半胱胺酸殘基。此外，US 9,724,402 B2 和 US 11,077,180 B2 揭露產生了其中 N 端半胱胺酸殘基被不是半胱胺酸殘基的胺基酸取代的非脂化 fHBP。

[0251] 有待根據本公開文本使用的 fHBP 可以是天然存在或非天然存在的蛋白質。「非天然存在的蛋白質」是指「人造蛋白」，並且涵蓋與天然存在的蛋白

質不同的未在自然界中發現的具有異源組分的 fHBP。非天然存在的蛋白質可以是嵌合蛋白或突變蛋白。在本公開文本的上下文中，「嵌合蛋白」旨在指代包含兩種或更多種不同組分的蛋白質，各組分源自不同 fHBP（例如，變體 1、2 或 3）。在突變蛋白中的突變可以包括胺基酸取代、插入或缺失。在一個實施例中，突變是胺基酸取代。

**[0252]** 適用於如本文公開的免疫原性組成物的非天然存在的 fHBP 仍然能夠引發針對 fHBP 的免疫反應。在一個實施例中，有待根據本公開文本使用的非天然存在的 fHBP 可以是突變的 fHBP。可以引入突變，如胺基酸取代，以減少或抑制所述 fHBP 抗原與正常存在於個體血液中的凝血因子 H(fH) 的結合。突變 fHBP 與 fH 結合的減少可能會增加免疫系統可用和可及的抗原的量。反過來，這可以提高針對這些抗原的免疫反應的功效和效率。有利地，突變 fHBP 可以引發針對 fH 結合位點內的 fHBP 表位的抗 fHBP 多株抗體，所述抗 fHBP 多株抗體導致與由靶向在 fH 結合位點之外的 fHBP 表位的野生型 (WT) fHBP 抗原引發的抗體相比更強的保護性補體沉積活性。

**[0253]** 在一些實施例中，所述 fHBP 可以是包含降低或抑制所述 fHBP 與人類 H 因子 (fH) 的結合的至少一個突變的突變 fHBP。

**[0254]** 考慮用於如本文公開的免疫原性組成物的非天然存在的 fHBP 可以呈現出與相應的天然存在的 fHBP 相比降低的對 fH 的親和力或改善的熱穩定性。對 fH 蛋白的親和力和熱穩定性可以如 WO 2016/014719 A1 中揭露的進行測量（如在本文件的實例 1 或 3 中）。

**[0255]** 為方便和清楚起見，除非另有特別說明，否則選擇具有序列 SEQ ID NO: 6 的 fHBP B24（或腦膜炎奈瑟氏菌菌株 MC58 的 fHBP ID 1 或 v.1 fHBP）的天然或天然存在的胺基酸序列作為本文中所有天然存在和非天然存在的 fHBP 胺基酸序列的參考序列。因此，在提及 fHBP 中的胺基酸殘基位置時，本文使用的

位置編號對應於 SEQ ID NO: 6 (fHBP B24) 的胺基酸殘基編號。因此，位置編號 1 指代 SEQ ID NO: 6 中所示的第一個胺基酸殘基，它是半胱胺酸。即使在 SEQ ID NO: 6 的 N 端，在該半胱胺酸之前添加另外的胺基酸的情況下，這仍然是正確的。

**[0256]** 在一個實施例中，在本公開文本中使用的 fHBP A 或 B 抗原中的突變(例如，胺基酸取代)可以是如 WO 2011/126863 A1、WO 2015/017817 A1 或 WO 2016/014719 A1 中揭露的。

**[0257]** 如本文公開的免疫原性組成物可以包含非天然存在的 fHBP，其在胺基酸序列方面與野生型腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP 的差異為 1 至 10 個胺基酸(例如，差異為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸)、10 個胺基酸至 15 個胺基酸、15 個胺基酸至 20 個胺基酸、20 個胺基酸至 30 個胺基酸、30 個胺基酸至 40 個胺基酸、或 40 個胺基酸至 50 個胺基酸。

**[0258]** 在一些實施例中，fHBP 抗原可以包含與參考 fHBP 序列具有至少約 80%、至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99% 或至少約 99.5% 胺基酸序列同一性的胺基酸序列。

**[0259]** 同一性(例如，同源性百分比)可以使用各種已知的序列比較工具來確定，例如，如藉由使用默認參數計算成對序列比對的任何同源性比較軟體，包括例如國家生物技術資訊中心(NCBI)的 Blast 軟體。同一性是全域同一性，即整個胺基酸或核酸序列上的同一性，而不是其部分上的同一性。成對全域比對由 Needleman 等人，Journal of Molecular Biology, 1970, 第 443-53 頁, 48 卷)定義。例如，當從多肽序列開始並與其他多肽序列進行比較時，EMBOSS-6.0.1 Needleman-Wunsch 演算法(可獲得於 <http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/needle.html>)可用於找到兩個序列沿其整個長度的最佳比對-「全域比對」。

第 42 頁，共 145 頁(發明說明書)

[0260] 可如 WO 2016/014719 A1 中揭露的獲得用於本文公開的免疫原性組成物中的 fHBP 抗原。fHBP 可以作為重組蛋白從轉染到用於生產的宿主細胞（例如大腸桿菌菌株）中的重組表現載體（或構築體）獲得。用於轉移和表現編碼 fHBP 的核酸的合適載體在組成方面可不同。整合載體可以是條件複製型質體、自殺質體、噬菌體等。

[0261] 構築體可以包括各種元件，所述各種元件包括例如啟動子、選擇性遺傳標記（例如，賦予抗生素（如康黴素、紅黴素、氯黴素或健他黴素）抗性的基因）、複製起點（以促進宿主細胞例如細菌宿主細胞中的複製）等。載體的選擇將取決於各種因素，如需要在其中增殖的細胞類型和增殖目的。某些載體可用於擴增和製造大量所需的 DNA 序列。其他載體適用於在培養的細胞中表現。適當載體的選擇完全在本領域的技術範圍內。許多此類載體是可商購的。

[0262] 在一個例子中，載體可以是基於游離型質體的表現載體，其包含選擇性耐藥性標記和提供在不同宿主細胞（例如，在大腸桿菌和腦膜炎奈瑟氏菌二者中）中自主複製的元件。這種「穿梭載體」的一個例子是質體 pFPIO（Pagotto 等人 (2000) *Gene* 244: 13-19）。載體可以提供用於在宿主細胞中的染色體外保持或可以提供用於整合到宿主細胞基因組中。載體在本領域具有通常知識者熟知的眾多出版物中得到充分描述，包括例如 *Short Protocols in Molecular Biology*, (1999) F. Ausubel, 等人, 編, Wiley & Sons。載體可以提供用於編碼主題 fHBP 的核酸的表現，可以提供用於主題核酸的增殖，或二者。

[0263] 可以使用的載體的例子包括但不限於源自重組噬菌體 DNA、質體 DNA 或黏粒 DNA 的那些。例如，可以使用質體載體如 pBR322、pUC 19/18、pUC 118、119 和 M13 mp 系列的載體。pET21 也是一種可以使用的表現載體。噬菌體載體可以包括  $\lambda$ gt10、 $\lambda$ gt11、 $\lambda$ gt18-23、 $\lambda$ ZAP/R 和 EMBL 系列的噬菌體載體。可以使用的另外的載體包括但不限於 pJB8、pCV 103、pCV 107、pCV 108、pTM、pMCS、

pNNL、pHSG274、COS202、COS203、pWE15、pWE16 和卡隆粒(charomid)9 系列的載體。

**[0264]** 重組表現載體可以包含與轉錄控制元件例如啟動子可操作地連接的編碼 fHBP 的核苷酸序列。啟動子可以是組成型的或誘導型的。啟動子可被改造以在原核宿主細胞或真核宿主細胞中使用。

**[0265]** 表現載體提供轉錄和轉譯調節序列，並且可以提供用於誘導型或組成型表現，其中編碼區在轉錄起始區和轉錄和轉譯終止區的轉錄控制下可操作地連接。這些控制區可以是衍生主題 fHBP 的 fHBP 的天然區域，或者可以源自外源來源。總體上，轉錄和轉譯調節序列可以包括但不限於啟動子序列、核糖體結合位點、轉錄起始和終止序列、轉譯起始和終止序列以及增強子或啟動子序列。啟動子可以是組成型或誘導型的，並且可以是強組成型啟動子（例如，T7 等）。

**[0266]** 表現載體通常具有位於啟動子序列附近的便利的限制位點，以提供編碼目的蛋白質的核酸序列的插入。構築體（重組載體）可以藉由例如將目的多核苷酸插入構築體主鏈中（通常藉由 DNA 連接酶附接至載體中切割的限制性酶切位點）來製備。可替代地，可以藉由同源重組或位點特異性重組插入所需的核苷酸序列。通常，同源重組可以藉由將同源區在所需核苷酸序列側翼附接至載體上來完成，而位點特異性重組可以藉由使用促進位點特異性重組的序列（例如 Cre-lox、att 位點等）來完成。可以藉由例如寡核苷酸的連接或藉由使用包含同源區和所需核苷酸序列的一部分的引物進行的聚合酶鏈式反應來添加包含此類序列的核酸。

**[0267]** 此外，表現構築體可以包含另外的元件。例如，表現載體可以具有一個或兩個複製系統，從而使其能夠維持在生物體中，例如在哺乳動物或昆蟲細胞中進行表現，並在原核宿主中進行選殖和擴增。此外，表現構築體可以包含選



擇性標記基因以允許選擇轉化的宿主細胞。選擇基因是本領域中熟知的，並且將隨著所用宿主細胞而變化。

**[0268]** 可以藉由本領域已知的任何技術向 fHBP 序列中引入胺基酸取代。例如，可以如 WO 2011/126863 A1、WO 2015/017817 A1 或 WO 2016/014719 A1 中揭露的獲得胺基酸取代。在其他示例性實施例中，可以如 WO 2015/128480、WO 2010/046715、WO 2016/008960、WO 2020/030782 或 WO 2011/051893 中揭露的獲得胺基酸取代。

**[0269]** 可以藉由本領域已知的任何純化方法從培養物中獲得純化形式的重組 fHBP，如例如在實例部分中描述的。

**[0270]** 在一個實施例中，fHBP A 和/或 fHBP B 可以以約 20 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 40 µg/劑量至約 140 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 120 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 100 µg/劑量的量存在於如本文公開的免疫原性組成物中。在一個實施例中，fHBP A 和/或 fHBP B 可以以約 25 µg/劑量、或約 50 µg/劑量、或約 100 µg/劑量的量存在。

### ***fHBP B***

**[0271]** 如本文公開的免疫原性組成物可以包含至少一種 fHBP B 變體抗原。所述至少一種 fHBP B 蛋白可以是脂化或非脂化蛋白。fHBP B 可以是脂化蛋白。fHBP B 可以是非脂化蛋白。

**[0272]** fHBP B 可以是天然或非天然存在的 fHBP。fHBP B 可以是天然存在的 fHBP。在另一個實施例中，fHBP B 可以是非天然存在的 fHBP。

**[0273]** fHBP B 可以是非脂化的、非天然存在的 fHBP。

**[0274]** fHBP B 蛋白可以是包含與 SEQ ID NO: 3 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、至少約 99.5%或約 100%的胺基酸序列同

一性的蛋白質。非天然存在的 fHBP B01 蛋白與 fHBP B01 或 SEQ ID NO: 3 不是 100%相同的。

**[0275]** 非天然存在的 fHBP B 可以是如 WO 2011/126863 A1 或 WO 2015/017817 A1 中揭露的嵌合蛋白或如 WO 2016/014719 A1、WO 2011/051893 或 WO 2020/030782 中揭露的突變 fHBP B 蛋白。在一個示例性實施例中，fHBP B 可以是突變蛋白。

**[0276]** 非天然存在的 fHBP B 可以是突變蛋白。突變 fHBP B 可以是非脂化蛋白。

**[0277]** 突變 fHBP B 蛋白與野生型腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 如 fHBP B01 的胺基酸序列的差異可為 1 至 10 個胺基酸（例如，差異為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸）、10 個胺基酸至 15 個胺基酸、15 個胺基酸至 20 個胺基酸、20 個胺基酸至 30 個胺基酸、30 個胺基酸至 40 個胺基酸、或 40 個胺基酸至 50 個胺基酸。

**[0278]** 突變 fHBP B 可以是包含降低或抑制所述 fHBP B 與所述人類 H 因子(fH) 的結合的至少一個突變的突變蛋白。

**[0279]** 突變 fHBP 可以包含與 SEQ ID NO: 3 至少約 85%的胺基酸序列同一性。

**[0280]** 突變 fHBP B 可以是包含與 SEQ ID NO: 3 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、或至少約 99%、或至少約 99.5%的胺基酸序列同一性的突變蛋白。突變 fHBP B 蛋白與 fHBP B01 或 SEQ ID NO: 3 不是 100%相同的。

**[0281]** 突變 fHBP B 基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以包含選自以下中至少一者的至少一個胺基酸取代：a) 在胺基酸 38 處的麩醯胺酸 (Q38) 的胺基酸取代；b) 在胺基酸 92 處的麩胺酸 (E92) 的胺基酸取代；c) 在胺基酸 130 處的精胺酸 (R130) 的胺基酸取代；d) 在胺基酸 223 處的絲胺酸 (S223) 的胺基酸取代；和 e) 在胺基酸 248 處的組胺酸 (H248) 的胺基酸取代。

**[0282]** 突變 fHBP B 關於如在 WO 2011/051893 中鑒定為 SEQ ID NO: 4 的 fHBP 序列 (fHBP B24 的成熟脂蛋白形式) 的編號可以包含如在 WO 2011/051893 中揭露的以下位置中的任一個處的至少一個胺基酸缺失或取代: D37、K45、T56、E83、E95、E112、K122、V124、R127、T139、F141、D142、K143、I198、S211、L213、K219、N43、D116、H119、S221 和 K241。

**[0283]** 突變 fHBP B 關於如在 WO 2020/030782 中鑒定為 SEQ ID NO: 2 的 fHBP 序列 (fHBP B09 的成熟脂蛋白形式) 的編號可以包含如在 WO 2020/030782 中揭露的以下位置中的任一個處的至少一個胺基酸取代: E211、S216 或 E232。

**[0284]** 突變 fHBP B 關於如在 WO 2020/030782 中鑒定為 SEQ ID NO: 2 的 fHBP 序列 (fHBP B09 的成熟脂蛋白形式) 的編號可以包含如在 WO 2020/030782 中揭露的以下位置中的任一個處的以下胺基酸取代中的至少一個: E211A、S216R 或 E232A。

**[0285]** 突變 fHBP B 關於如在 WO 2020/030782 中鑒定為 SEQ ID NO: 6 的 fHBP 序列 (fHBP B44 的成熟脂蛋白形式) 的編號可以包含如在 WO 2020/030782 中揭露的以下位置中的任一個處的至少一個胺基酸取代: E214、S219 或 E235。

**[0286]** 突變 fHBP B 關於如在 WO 2020/030782 中鑒定為 SEQ ID NO: 2 的 fHBP 序列 (fHBP B44 的成熟脂蛋白形式) 的編號可以包含如在 WO 2020/030782 中揭露的以下位置中的任一個處的以下胺基酸取代中的至少一個: E214A、S219R 或 E235A。

**[0287]** 突變 fHBP B 蛋白關於如在 WO 2010046715 中鑒定為 SEQ ID NO: 1 的 fHBP 序列 (fHBP 24 的成熟脂蛋白形式) 的編號可以包含如在 WO 2010046715 中揭露的以下位置中的任一個處的以下胺基酸取代中的至少一個: 103、106、107、108、109、145、147、149、150、154、156、157、180、181、182、183、184、185、191、193、194、195、196、199、262、264、266、267、268、272、

274、283、285、286、288、289、302、304、306、311 和 313。在一個實施例中，在 H 因子結合蛋白中可改變的一種或多種胺基酸關於如在 WO 2010046715 中鑒定為 SEQ ID NO: 1 的 fHBP 序列的編號可選自包含以下的群組：胺基酸編號 103、106、107、108、180、181、183、184、185、191、193、195、262、264、266、272、274、283、286、304 和 306。

**[0288]** 在胺基酸 38 處的麩醯胺酸 (Q38) 的胺基酸取代可以是 Q38R 取代 (R：精胺酸)。具有帶正電荷或芳香側鏈的其他胺基酸，如離胺酸、組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在該位置處取代。因此，在一些情況下，fHBP 可以包含 Q38K 取代、Q38H 取代、Q38F 取代、Q38Y 取代或 Q38W 取代。

**[0289]** 在胺基酸 92 處的麩胺酸 (E92) 的胺基酸取代可以是 E92K 取代。具有帶正電荷或芳香側鏈的其他胺基酸，如精胺酸、組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在該位置處取代。因此，例如，在一些情況下，fHBP 變體可以包含 E92R 取代、E92H 取代、E92F 取代、E92Y 取代或 E92W 取代。

**[0290]** 在胺基酸 130 處的精胺酸 (R130) 的胺基酸取代可以是 R130G 取代 (G：甘胺酸)。其他具有帶負電荷或芳香側鏈的胺基酸，如天門冬胺酸、麩胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在 R130 處取代。因此，例如，在一些情況下，fHBP 變體可以包含 R130D 取代、R130E 取代、R130F 取代、R130Y 取代或 R130W 取代。

**[0291]** 在胺基酸 223 處的絲胺酸 (S223) 的胺基酸取代可以是 S223R 取代 (R：精胺酸)。具有帶正電荷或芳香側鏈的其他胺基酸，如離胺酸、組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在該位置處取代。因此，例如，在一些情況下，fHbp 變體包含 S223K 取代、S223H 取代、S223F 取代、S223Y 取代或 S223W 取代。

**[0292]** 在一個示例性實施例中，在胺基酸 248 處的組胺酸（H248）的胺基酸取代可以是 H248L 取代（L：白胺酸）。具有非極性、帶負電荷或芳香側鏈的其他胺基酸，如異白胺酸、纈胺酸、天門冬胺酸、麩胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在 H248 處取代。因此，例如，在一些情況下，fHBP 可以包含 H248I 取代、H248V 取代、H248D 取代、H248E 取代、H248F 取代、H248Y 取代或 H248W 取代。

**[0293]** 在另一個實施例中，突變 fHBP B 可以至少包含胺基酸取代 H248L。突變 fHBP B 基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以僅包含胺基酸取代 H248L。

**[0294]** 突變 fHBP B 可以是基於 SEQ ID NO: 6 的編號包含選自以下的胺基酸取代中的至少一個的非脂化突變 fHBP B：a) 在胺基酸 38 處的麩醯胺酸（Q38）的胺基酸取代；b) 在胺基酸 92 處的麩胺酸（E92）的胺基酸取代；c) 在胺基酸 130 處的精胺酸（R130）的胺基酸取代；d) 在胺基酸 223 處的絲胺酸（S223）的胺基酸取代；和 e) 在胺基酸 248 處的組胺酸（H248）的胺基酸取代。

**[0295]** 突變 fHBP B 可以是基於 SEQ ID NO: 6 的編號包含選自以下的胺基酸取代中的至少一個的非脂化突變 fHBP B：Q38R 取代、Q38K 取代、Q38H 取代、Q38F 取代、Q38Y 取代、Q38W 取代、E92K 取代、E92R 取代、E92H 取代、E92F 取代、E92Y 取代、E92W 取代、R130G 取代、R130D 取代、R130E 取代、R130F 取代、R130Y 取代、R130W 取代、S223R 取代、S223K 取代、S223H 取代、S223F 取代、S223Y 取代、S223W 取代、H248L 取代、H248I 取代、H248V 取代、H248D 取代、H248E 取代、H248F 取代、H248Y 取代或 H248W 取代。

**[0296]** 突變 fHBP B 可以是基於 SEQ ID NO: 6 的編號至少包含胺基酸取代 H248L 的非脂化突變 fHBP B。在另一個示例性實施例中，非脂化突變 fHBP B 蛋白基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以僅包含胺基酸取代 H248L。

[0297] fHBP B 可以是如下非脂化且突變的蛋白，其包含與 SEQ ID NO: 3 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、或至少約 99%的胺基酸序列同一性並且基於 SEQ ID NO: 6 的編號至少包含胺基酸取代 H248L。非脂化突變 fHBP B 基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以僅包含胺基酸取代 H248L。

[0298] 突變非脂化 fHBP B 可以包含與 SEQ ID NO: 4 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、或至少約 99.5%的胺基酸序列同一性。

[0299] 在另一個實施例中，突變非脂化 fHBP B 可以包含 SEQ ID NO: 4 或由其組成。

[0300] 突變非脂化 fHBP B 可以包含與 SEQ ID NO: 9 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、或至少約 99.5%的胺基酸序列同一性。

[0301] 在另一個實施例中，突變非脂化 fHBP B 可以包含 SEQ ID NO: 9 或由其組成。

[0302] 所述 fHBP B 的等電點 (pI) 可以高於所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC。

[0303] 所述 fHBP B 的等電點 (pI) 的範圍可以是約 5.0 至約 7.0、或 5.2 至約 6.5、或約 5.3 至約 6.0 或等電點是約 5.5 或 5.46。

[0304] 所述 fHBP B 的等電點 (pI) 可以是約 5.46。

[0305] 在一些實施例中，所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP B 的 pI 之間的差的範圍可以是約 0.1 至約 2.9、或約 0.4 至約 2.7、或約 0.6 至約 2.2、或約 0.7 至約 1.7、或約 0.9 至約 1.2。

[0306] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP B 的 pI 之間的差可以是約 0.66 或約 1.16。

[0307] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP B 的 pI 之間的差可以是約 0.66。

[0308] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP B 的 pI 之間的差可以是約 0.96。

[0309] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP B 的 pI 之間的差可以是約 1.16。

[0310] 在一個實施例中，fHBP B 可以以約 20 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 40 µg/劑量至約 140 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 120 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 100 µg/劑量的量存在於如本文公開的免疫原性組成物中。

[0311] 在一個實施例中，fHBP B 可以以約 25 µg/劑量、或約 50 µg/劑量、或約 100 µg/劑量的量存在。

### ***fHBP A***

[0312] 本文公開的免疫原性組成物可以包含至少一種 fHBP A 變體抗原。所述至少一種 fHBP A 可以是脂化或非脂化蛋白。fHBP A 可以是脂化蛋白。fHBP A 可以是非脂化蛋白。

[0313] 所述 fHBP A 和所述 fHBP B 可以都是脂化的。在一個實施例中，所述 fHBP A 和所述 fHBP B 可以都是非脂化的。可替代地，所述 fHBP A 可以是脂化的，而所述 fHBP B 可以是非脂化的。再可替代地，所述 fHBP A 可以是非脂化的，而所述 fHBP B 可以是脂化的。

[0314] fHBP A 可以是天然或非天然存在的 fHBP。fHBP A 可以是天然存在的 fHBP。在另一個實施例中，fHBP A 可以是非天然存在的 fHBP。

[0315] 所述 fHBP A 和所述 fHBP B 可以都是天然存在的 fHBP。所述 fHBP A 和所述 fHBP B 可以都是非天然存在的 fHBP。可替代地，所述 fHBP A 可以是天然存在的 fHBP，而所述 fHBP B 可以是非天然存在的 fHBP。再可替代地，所述 fHBP A 可以是非天然存在的 fHBP，而所述 fHBP B 可以是天然存在的 fHBP。

[0316] fHBP A 可以是非脂化的、非天然存在的 fHBP。

[0317] 所述 fHBP A 和所述 fHBP B 可以都是非脂化的、非天然存在的 fHBP。

[0318] fHBP A 可以是包含與 SEQ ID NO: 1 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、至少約 99.5%或約 100%的胺基酸序列同一性的蛋白質。非天然存在的 fHBP A05 與 fHBP A05 或 SEQ ID NO: 1 不是 100%相同的。

[0319] 非天然存在的 fHBP A 可以是如 WO 2011/126863 A1 或 WO 2015/017817 A1 中公開的嵌合蛋白或如 WO 2016/014719 A1、WO 2011/051893、WO 2016/008960 或 WO 2015/128480 中公開的突變 fHBP A 蛋白。在一個示例性實施例中，fHBP A 可以是突變蛋白。

[0320] 非天然存在的 fHBP A 可以是突變蛋白。突變 fHBP A 可以是非脂化蛋白。

[0321] 突變 fHBP A 與野生型腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 蛋白（例如，fHBP A05）的胺基酸序列的差異可為 1 至 10 個胺基酸（例如，差異為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個胺基酸）、10 個胺基酸至 15 個胺基酸、15 個胺基酸至 20 個胺基酸、20 個胺基酸至 30 個胺基酸、30 個胺基酸至 40 個胺基酸、或 40 個胺基酸至 50 個胺基酸。

[0322] 突變 fHBP A 可以包含與 SEQ ID NO: 1 至少約 85%的胺基酸序列同一性。

[0323] 突變 fHBP A 可以是包含降低或抑制所述 fHBP A 與人類 H 因子（fH）的結合的至少一個突變的突變蛋白。

[0324] 突變 fHBP A 可以包含與 SEQ ID NO: 1 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、或至少約 99%、或至少約 99.5%的胺基酸序列同一性。突變 fHBP A05 蛋白與 fHBP A05 或 SEQ ID NO: 1 不是 100%相同的。

[0325] 突變 fHBP A 基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以包含選自以下中至少一者的至少一個胺基酸取代：a) 在胺基酸 115 處的天門冬醯胺酸（N115）的胺基酸取代；b) 在胺基酸 121 處的天門冬胺酸（D121）的胺基酸取代；c) 在胺基酸 128 處的絲胺酸（S128）的胺基酸取代；d) 在胺基酸 129 處的苯丙胺酸（F129）的



胺基酸取代；e) 在胺基酸 130 處的白胺酸 (L130) 的胺基酸取代；f) 在位置 131 處的纈胺酸 (V131) 的胺基酸取代；g) 在位置 133 處的甘胺酸 (G133) 的胺基酸取代；h) 在位置 219 處的離胺酸 (K219) 的胺基酸取代；以及 i) 在位置 220 處的甘胺酸 (G220) 的胺基酸取代。

**[0326]** 突變 fHBP A 關於如在 WO 2011/051893 中鑒定為 SEQ ID NO: 5 的 fHBP 序列 (fHBP A19 的成熟脂蛋白形式) 的編號可以包含如在 WO 2011/051893 中揭露的以下位置中的任一個處的至少一個胺基酸缺失或取代：D37、K45、T56、E83、E95、E112、S122、I124、R127、T139、F141、N142、Q143、L197、D210、R212、K218、N43、N116、K119、T220 和/或 240。在一個實施例中，胺基酸缺失或取代如 WO 2011/051893 中公開的。

**[0327]** 突變 fHBP A 關於如在 WO 2016/008960 中鑒定為 SEQ ID NO: 17 的 fHBP 序列 (A124 或變體 3.28 或 ID28) 的編號可以包含如在 WO 2016/008960 中揭露的以下位置中的任一個處的至少一個胺基酸缺失或取代：S32、L126 和/或 E243。可以缺失一個、兩個或三個殘基。可替代地，它們可以被不同的胺基酸取代。例如，Leu-126 可以被其他 19 種天然存在的胺基酸中的任一種取代。當進行取代時，在一些實施例中替代胺基酸可以是簡單的胺基酸，如甘胺酸或丙胺酸。在其他實施例中，替代胺基酸是保守取代 (例如，它在以下四組內進行：(1) 酸性的，即天門冬胺酸、麩胺酸；(2) 鹼性的，即離胺酸、精胺酸、組胺酸；(3) 非極性的，即丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸；和 (4) 不帶電荷的極性的，即甘胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸)。在其他實施例中，取代是非保守的。在一個實施例中，指定殘基處的取代如下：S32V；L126R；和/或 E243A。

**[0328]** 突變 fHBP A 關於如在 WO 2016/008960 中鑒定為 SEQ ID NO: 5 的 fHBP 序列 (成熟脂蛋白形式) 的編號可以包含如在 WO 2016/008960 中揭露的以下位

置中的任一個處的至少一個胺基酸缺失或取代：S32、L123 和/或 E240。可以缺失一個、兩個或三個殘基。可替代地，它們可以被不同的胺基酸取代。例如，Leu-123 可以被其他 19 種天然存在的胺基酸中的任一種取代。當進行取代時，在一些實施例中替代胺基酸可以是簡單的胺基酸，如甘胺酸或丙胺酸。在其他情況下，替代胺基酸是保守取代（例如，它在以下四組內進行：(1) 酸性的，即天門冬胺酸、麩胺酸；(2) 鹼性的，即離胺酸、精胺酸、組胺酸；(3) 非極性的，即丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸；和 (4) 不帶電荷的極性的，即甘胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸）。在其他實施例中，取代是非保守的。在一個實施例中，指定殘基處的取代可以如下：S32V；L123R；和/或 E240A。

**[0329]** 突變 fHBP A 關於如在 WO 2015/128480 中鑒定為 SEQ ID NO: 5 的 fHBP 序列（fHBP A19 或 v2.16 或 ID16）的編號可以包含如在 WO 2015/128480 中揭露的以下位置中的任一個處的至少一個胺基酸缺失或取代：S32、V33、L39、L41、F69、V100、I113、F122、L123、V124、S125、G126、L127、G128、S151、H239 和/或 E240。在一個實施例中，突變的殘基可以是 S32、V100、L123、V124、S125、G126、L127、G128、H239 和/或 E240。與野生型 fHBP A 相比，在這些殘基處的突變產生具有良好穩定性的蛋白質。在一個實施例中，突變的殘基可以是 S32、L123、V124、S125、G126、L127 和/或 G128。在一個實施例中，突變的殘基可以是 S32、L123、V124、S125、G126、L127 和/或 G128。在另一個實施例中，殘基 S32 和/或 L123 可以發生突變，例如 S32V 和/或 L123。在 V100、S125 和/或 G126 中的一個或多個發生突變的情況下，也可以引入該三者之外的殘基的突變。

**[0330]** 指定的殘基可以缺失，但優選被不同的胺基酸取代。例如，Ser-32 可以被其他 19 種天然存在的胺基酸中的任一種取代。當進行取代時，在一些實施例

中替代胺基酸可以是簡單的胺基酸，如甘胺酸或丙胺酸。在其他實施例中，替代胺基酸是保守取代（例如，它在以下四組內進行：(1) 酸性的，即天門冬胺酸、麩胺酸；(2) 鹼性的，即離胺酸、精胺酸、組胺酸；(3) 非極性的，即丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸；和 (4) 不帶電荷的極性的，即甘胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸）。在其他實施例中，取代是非保守的。在一些實施例中，取代不使用丙胺酸。

**[0331]** 在指定殘基處的取代可以如下：S32V；V33C；L39C；L41C；F69C；V100T；I113S；F122C；L123R；V124I；S125G 或 S125T；G126D；L127I；G128A；S151C；H239R；或 E240H。

**[0332]** 突變 fHBP A 關於如在 WO 2015/128480 中鑒定為 SEQ ID NO: 17 的 fHBP 序列（A124 或變體 3.28 或 ID28）的編號可以包含如在 WO 2015/128480 中揭露的以下位置中的任一個處的至少一個胺基酸缺失或取代：S32、V33、L39、L41、F72、V103、T116、F125、L126、V127、S128、G129、L130、G131、S154、H242 和/或 E243。在一個實施例中，突變的殘基可以是 S32、V103、L126、V127、S128、G129、L130、G131、H242 和/或 E243。在一個實施例中，突變的殘基可以是 S32、L126、V127、S128、G129、L130 和/或 G131。在另一個實施例中，殘基 S32、L126、V127、S128、G129、L130 和/或 G131 可以發生突變，例如殘基 S32 和/或 L126，例如 S32V 和/或 L126R。

**[0333]** 指定的殘基可以缺失，但優選被不同的胺基酸取代。例如，Ser-32 可以被其他 19 種天然存在的胺基酸中的任一種取代。當進行取代時，在一些實施例中替代胺基酸可以是簡單的胺基酸，如甘胺酸或丙胺酸。在其他實施例中，替代胺基酸是保守取代（例如，它在以下四組內進行：(1) 酸性的，即天門冬胺酸、麩胺酸；(2) 鹼性的，即離胺酸、精胺酸、組胺酸；(3) 非極性的，即丙胺酸、纈

胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸；和 (4) 不帶電荷的極性的，即甘胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸）。在其他實施例中，取代是非保守的。在一些實施例中，取代不使用丙胺酸。

**[0334]** 在指定殘基處的取代可以如下：S32V；I33C；L39C；L41C；F72C；V103T；T116S；F125C；L126R；V127I；S128G 或 S128T；G129D；L130I；G131A；S154C；H242R；E243H。

**[0335]** 在胺基酸 115 處的天門冬醯胺酸 (N115) 的胺基酸取代可以是 N115I 取代 (I：異白胺酸)。具有非極性、帶正電荷或芳香側鏈的其他胺基酸，如纈胺酸、白胺酸、離胺酸、精胺酸、組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在該位置處取代。因此，在一些情況下，fHBP 可以包含 N115V 取代、N115L 取代、N115K 取代、N115R 取代、N115H 取代、N115F 取代、N115Y 取代或 N115W 取代。

**[0336]** 在胺基酸 121 處的天門冬胺酸 (D121) 的胺基酸取代可以是 D121G 取代 (G：甘胺酸)。具有非極性、帶正電荷或芳香側鏈的其他胺基酸，如白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、離胺酸、精胺酸、組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在該位置處取代。因此，例如，在一些情況下，fHBP 變體可以包含 D121L 取代、D121I 取代、D121V 取代、D121K 取代、D121R 取代、D121H 取代、D121F 取代、D121Y 取代或 D121W 取代。

**[0337]** 在胺基酸 128 處的絲胺酸 (S128) 的胺基酸取代可以是 S128T 取代 (T：蘇胺酸)。具有極性、帶電荷或芳香側鏈的其他胺基酸，如甲硫胺酸、天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、天門冬胺酸、麩胺酸、離胺酸、精胺酸、組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在該位置處取代。因此，例如，在一些情況下，fHBP

變體可以包含 S128M 取代、S128N 取代、S128D 取代、S128E 取代、S128K 取代、S128R 取代、S128H 取代、S128F 取代、S128Y 取代或 S128W 取代。

**[0338]** 突變 fHBP A 可以包含在胺基酸 130 處的白胺酸 (L130) 的胺基酸取代。在胺基酸 130 處的白胺酸 (L130) 的胺基酸取代可以是 L130R 取代 (R：精胺酸)。

**[0339]** 突變 fHBP A 可以包含在胺基酸 131 處的纈胺酸 (V131) 的胺基酸取代。具有帶電荷或芳香側鏈的其他胺基酸，如麩胺酸、離胺酸、精胺酸、組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在該位置處取代。因此，例如，在一些情況下，fHBP 可以包含 V131E 取代、V131K 取代、V131R 取代、V131H 取代、V131F 取代、V131Y 取代或 V131W 取代。

**[0340]** 突變 fHBP A 可以包含在胺基酸 133 處的甘胺酸 (G133) 的胺基酸取代。在胺基酸 133 處的甘胺酸 (G133) 的胺基酸取代可以是 G133D 取代 (D：天門冬胺酸)。

**[0341]** 突變 fHBP A 可以包含在位置 219 處的離胺酸 (K219) 的胺基酸取代。具有極性、帶負電荷或芳香側鏈的其他胺基酸，如麩醯胺酸、天門冬胺酸、麩胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在該位置處取代。因此，例如，在一些情況下，fHBP 可以包含 K219Q 取代、K219D 取代、K219E 取代、K219F 取代、K219Y 取代或 K219W 取代。

**[0342]** 在胺基酸 220 處的甘胺酸 (G220) 的胺基酸取代可以是 G220S 取代 (S：絲胺酸)。具有極性、帶電荷或芳香側鏈的其他胺基酸，如天門冬醯胺酸、麩醯胺酸、天門冬胺酸、麩胺酸、離胺酸、精胺酸、組胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸或色胺酸，也可以在該位置處取代。因此，例如，在一些情況下，突變 fHBP A 可以包含 G220N 取代、G220Q 取代、G220D 取代、G220E 取代、G220K 取代、G220R 取代、G220H 取代、G220F 取代、G220Y 取代或 G220W 取代。

[0343] 在一個示例性實施例中，在胺基酸 130 處的白胺酸 (L130) 的胺基酸取代可以是 L130R 取代 (R：精胺酸)。

[0344] 在一個示例性實施例中，在胺基酸 133 處的甘胺酸 (G133) 的胺基酸取代可以是 G133D 取代 (D：天門冬胺酸)。

[0345] 在一個示例性實施例中，在位置 220 處的甘胺酸 (G220) 的胺基酸取代可以是 G220S 取代 (S：絲胺酸)。

[0346] 在一個示例性實施例中，在位置 129 處的苯丙胺酸 (F129) 的胺基酸取代可以是 F129S 取代 (S：絲胺酸)。

[0347] 突變 fHBP A 基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以包含選自 G220S、L130R 和 G133D 的胺基酸取代中的至少一個。在另一個實施例中，突變 fHBP A 基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以至少包含選自 G220S、L130R 和 G133D 的三個胺基酸取代。在另一個實施例中，突變 fHBP A 蛋白基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以僅包含三個胺基酸取代 G220S、L130R 和 G133D。

[0348] 突變 fHBP A 可以是基於 SEQ ID NO: 6 的編號包含選自以下的胺基酸取代中的至少一個的非脂化突變 fHBP A：a) 在胺基酸 115 處的天門冬醯胺酸 (N115) 的胺基酸取代；b) 在胺基酸 121 處的天門冬胺酸 (D121) 的胺基酸取代；c) 在胺基酸 128 處的絲胺酸 (S128) 的胺基酸取代；d) 在胺基酸 130 處的白胺酸 (L130) 的胺基酸取代；e) 在位置 131 處的纈胺酸 (V131) 的胺基酸取代；f) 在位置 133 處的甘胺酸 (G133) 的胺基酸取代；g) 在位置 219 處的離胺酸 (K219) 的胺基酸取代；以及 h) 在位置 220 處的甘胺酸 (G220) 的胺基酸取代。

[0349] 突變 fHBP A 可以是基於 SEQ ID NO: 6 的編號包含選自以下的胺基酸取代中的至少一個的非脂化突變 fHBP A：N115I 取代、N115V 取代、N115L 取代、N115K 取代、N115R 取代、N115H 取代、N115F 取代、N115Y 取代、N115W 取

代、D121G 取代、D121L 取代、D121I 取代、D121V 取代、D121K 取代、D121R 取代、D121H 取代、D121F 取代、D121Y 取代、D121W 取代、S128T 取代、S128M 取代、S128N 取代、S128D 取代、S128E 取代、S128K 取代、S128R 取代、S128H 取代、S128F 取代、S128Y 取代、S128W 取代、L130R 取代、V131E 取代、V131K 取代、V131R 取代、V131H 取代、V131F 取代、V131Y 取代、V131W 取代、G133D 取代、K219Q 取代、K219D 取代、K219E 取代、K219F 取代、K219Y 取代、K219W 取代、G220S 取代、G220N 取代、G220Q 取代、G220D 取代、G220E 取代、G220K 取代、G220R 取代、G220H 取代、G220F 取代、G220Y 取代或 G220W 取代。

**[0350]** 突變 fHBP A 可以是基於 SEQ ID NO: 6 的編號包含選自 G220S、L130R 和 G133D 的胺基酸取代中的至少一個的非脂化突變 fHBP A。在另一個實施例中，突變非脂化 fHBP A 基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以至少包含選自 G220S、L130R 和 G133D 的三個胺基酸取代。在另一個示例性實施例中，非脂化突變 fHBP A 基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以僅包含三個胺基酸取代 G220S、L130R 和 G133D。

**[0351]** 在一個示例性實施例中，fHBP A 可以是如下非脂化且突變的蛋白，其包含與 SEQ ID NO: 1 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99% 或至少約 99.5% 的胺基酸序列同一性，並且基於 SEQ ID NO: 6 的編號包含選自 G220S、L130R 和 G133D 的胺基酸取代中的至少一個。突變非脂化 fHBP A 蛋白基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以至少包含選自 G220S、L130R 和 G133D 的三個胺基酸取代。在另一個示例性實施例中，非脂化突變 fHBP A 蛋白基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以僅包含三個胺基酸取代 G220S、L130R 和 G133D。

[0352] 在一個實施例中，突變非脂化 fHBP A 蛋白可以包含與 SEQ ID NO: 2 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、或至少約 99.5% 的胺基酸序列同一性。

[0353] 在另一個實施例中，突變非脂化 fHBP A 蛋白可以包含 SEQ ID NO: 2 或由其組成。

[0354] 在一個實施例中，突變非脂化 fHBP A 蛋白可以包含與 SEQ ID NO: 8 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、或至少約 99.5% 的胺基酸序列同一性。

[0355] 在另一個實施例中，突變非脂化 fHBP A 蛋白可以包含 SEQ ID NO: 8 或由其組成。

[0356] 所述 fHBP A 的等電點 (pI) 的範圍可以是約 5 至約 7、或 5.2 至約 6.5、或約 5.4 至約 6，或等電點是約 5.9 或 5.86。

[0357] 所述 fHBP A 的等電點 (pI) 可以是約 5.86。

[0358] 在一些實施例中，所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP A 的 pI 之間的差的範圍可以是約 0.1 至約 2.9、或約 0.4 至約 2.7、或約 0.6 至約 2.2、或約 0.7 至約 1.8、或約 0.9 至約 1.6。

[0359] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP A 的 pI 之間的差可以是約 1.06 或約 1.56。

[0360] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP A 的 pI 之間的差可以是約 1.06。

[0361] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP A 的 pI 之間的差可以是約 1.36。

[0362] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述 fHBP A 的 pI 之間的差可以是約 1.56。

[0363] fHBP A 抗原可以以約 20  $\mu\text{g}$ /劑量至約 200  $\mu\text{g}$ /劑量、或約 25  $\mu\text{g}$ /劑量至約 180  $\mu\text{g}$ /劑量、或約 40  $\mu\text{g}$ /劑量至約 140  $\mu\text{g}$ /劑量、或約 50  $\mu\text{g}$ /劑量至約 120  $\mu\text{g}$ /



劑量、或約 75 µg/劑量至約 100 µg/劑量的量存在於如本文公開的免疫原性組成物中。

[0364] fHBP A 蛋白可以以約 25 µg/劑量、或約 50 µg/劑量、或約 100 µg/劑量的量存在。

### *NadA*

[0365] 本公開文本的免疫原性組成物可以進一步包含至少一種奈瑟氏菌黏附素 A (NadA) 蛋白。

[0366] 奈瑟氏菌黏附素 A (NadA, 先前稱為 GNA1994) 是表面暴露的三聚體蛋白, 其形成藉由 C 端跨膜結構域錨定在外膜中的寡聚物。NadA 表現為具有信號肽, 並且具有三個主要結構域: (1) COOH 末端錨定結構域 ( $\beta$  結構), 其也是自動轉運到細菌表面所必需的; (2) 具有白胺酸拉鍊的可能捲曲的結構域, 其可能介導二聚化和寡聚化; (3) NH(2)-末端球狀頭部結構域。NadA 在上皮細胞的細胞外黏附和侵襲中起關鍵作用 (Capecchi 等人, Mol. Microbiol. 2005;55:(687-98))。來自許多腦膜炎奈瑟氏菌菌株的 NadA 蛋白的序列已經公佈, 並且所述蛋白質作為奈瑟氏菌黏附素的活性已得到充分證明。NadA 基因存在於大約 50% 的腦膜炎球菌分離株中。NadA 展現出生長階段依賴性表現, 在穩定階段具有最高表現水準。

[0367] NadA 蛋白作為基因 NMB1994 (GenBank 登錄號 GI:7227256) 包含在腦膜炎球菌血清群 B 菌株 MC58 的已公佈基因組序列中。

[0368] 根據本公開文本使用的 NadA 多肽可以是野生型多肽, 或者可以藉由胺基酸取代、插入或缺失進行修飾, 只要所述多肽可以引發針對 NadA 的免疫反應即可。

**[0369]** 待使用的 NadA 蛋白可以是 N 端和/或 C 端截短的 NadA 或包含胺基酸缺失或插入的 NadA 蛋白，例如如在參考文獻 WO 01/64920、WO 01/64922 或 WO 03/020756 中揭露的。

**[0370]** 有待用於如本文公開的免疫原性組成物中的重組 NadA 蛋白可以是 NadA1 變體。如實例中所示，NadA1 顯示可誘導強烈的 hSBA 反應。

**[0371]** NadA1 可以從 MenB MC58 菌株的 NadA 序列中獲得。

**[0372]** NadA 蛋白可以包含序列 SEQ ID NO: 7 或由其組成。

**[0373]** NadA 蛋白可以包含來自 SEQ ID NO: 7 的至少 190 個連續胺基酸，例如來自 SEQ ID NO: 7 的 200 或更多個、210 或更多個、220 或更多個、230 或更多個、240 或更多個、250 或更多個連續胺基酸，例如來自 SEQ ID NO: 7 的 260 或更多個、或 270 或更多個、或 280 或更多個、或 290 或更多個、或 300 或更多個、或 310 或更多個、或 320 或更多個、或 330 或更多個、或 340 或更多個、或 350 或更多個、或 360 或更多個胺基酸。

**[0374]** NadA 蛋白可缺少從例如 SEQ ID NO: 7 的 C 端和/或 N 端起的 5 至 10 個胺基酸，或 10 至 15 個、或 15 至 20 個、或 25 個、或 30 個或 35 個、或 40 個或 45 個、或 50 個或 55 個胺基酸。當 N 端殘基缺失時，這種缺失不應去除 NadA 黏附至人上皮細胞的能力。

**[0375]** NadA 蛋白可在 N 端缺少信號肽。例如，NadA 蛋白可在例如 SEQ ID NO: 7 的 N 端缺少 23 個胺基酸。

**[0376]** NadA 蛋白可在其 C 端缺少膜錨定肽。例如，NadA 蛋白可在例如 SEQ ID NO: 7 的 C 端缺少 55 個胺基酸。

**[0377]** NadA 可以以單體或寡聚體形式使用，例如以其三聚體形式使用。

**[0378]** 例如，NadA 蛋白可不具有其 C 端膜錨定物（例如，菌株 MC58 (SEQ ID NO: 7) 的殘基 308-362 缺失)。在大腸桿菌中表現不具有其膜錨定結構域的 NadA

可導致蛋白質分泌到培養上清液中，同時去除 23 個胺基酸的信號肽（例如，SEQ ID NO: 7 的殘基 2 至 24 缺失，留下 284 個胺基酸的蛋白質-SEQ ID NO: 5）。

**[0379]** NadA 蛋白可以包含與 SEQ ID NO: 5 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、或至少約 99.5% 的胺基酸序列同一性。在另一個實施例中，NadA 蛋白可以包含 SEQ ID NO: 5 或由其組成。

**[0380]** 可根據本領域已知的任何重組技術獲得用於本文公開的免疫原性組成物中的 NadA 蛋白，例如如先前公開的。所述 NadA 蛋白可以作為重組蛋白從轉染到用於生產的宿主細胞（例如大腸桿菌菌株）中的重組表現載體（或構築體）獲得。可以藉由本領域已知的任何純化方法從培養物中獲得純化形式的重組 NadA，例如在實例部分中描述的。

**[0381]** 在一個實施例中，NadA 蛋白可以以範圍為約 20 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 40 µg/劑量至約 140 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 120 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 100 µg/劑量的量存在。在一個實施例中，NadA 蛋白可以以約 50 µg/劑量存在。

### ***dOMV***

**[0382]** 本公開文本的免疫原性組成物可進一步包含至少一種去污劑提取的外膜囊泡（dOMV）。

**[0383]** 如本文公開的免疫原性組成物包含去污劑提取的外膜囊泡（dOMV），也稱為外膜蛋白複合物（Outer Membrane Protein Complex，OMPC）。通常，去污劑提取的外膜囊泡在用作抗原時稱為 dOMV 或 OMV。當用作蛋白質載體時，它們稱為 OMPC。

**[0384]** OMPC 用作磷酸多核糖基核糖醇（polyribosylribitol phosphate，PRP）接合疫苗 PedvaxHIB（B 型流感嗜血桿菌疫苗）（Einhorn 等人, Lancet (倫敦, 英  
第 63 頁, 共 145 頁(發明說明書)

格蘭). 1986;2(8502):299-302 ; Moro 等人, The Journal of pediatrics. 2015;166(4):992-7) 和 VAXELIS (白喉、破傷風、百日咳、脊髓灰質炎、B 型肝炎和 B 型流感嗜血桿菌疫苗) (Syed, *Paediatric drugs*. 2017;19(1):69-80) 的載體蛋白平臺。

**[0385]** dOMV 是大的蛋白脂質囊泡，包含在細菌外膜中發現的整合外膜蛋白和殘餘脂寡糖 (LOS) (Helting, *Acta Pathol Microbiol Scand C*, 1981;89(2):69-78) 。在 dOMV 中可鑒定出超過 300 種蛋白質。dOMV 的總蛋白含量的 75% 由 10 種最豐富的蛋白質代表，包括代表總蛋白高達 50% 的外膜蛋白孔蛋白 A (PorA) 和孔蛋白 B (PorB) 。

**[0386]** 腦膜炎奈瑟氏菌孔蛋白 (Por) 是血清變型分型的抗原決定簇。鑒定了兩類孔蛋白 PorA 和 PorB，以及每一類中由編碼表面暴露的環的 por 基因可變區 (VR) 中的序列變異引起的抗原性不同的變體。

**[0387]** 適用於本文公開的免疫原性組成物的 dOMV 可以從各種 MenB 菌株獲得。dOMV 可以從 MenB 菌株的去污劑提取物中分離出來。合適的 MenB 菌株可以是野生型 MenB 菌株或被工程化為過表現孔蛋白 (如 PorA 或 PorB 蛋白，並且例如 PorA 蛋白) 的 MenB 菌株。

**[0388]** dOMV 可以從表現 PorA 蛋白的 MenB 菌株獲得。

**[0389]** dOMV 可以從表現 PorA VR2 亞型的 MenB 菌株獲得。PorA VR2 亞型可以是 PorA VR2 型 P1.2、P1.4、P1.7、P1.10 或 P1.13 蛋白。

**[0390]** dOMV 可以從表現 PorA VR2 型 P1.2 蛋白的 MenB 菌株獲得。

**[0391]** dOMV 可以從表現 PorA VR2 亞型和 PorB P2.2a 的 MenB 菌株獲得。dOMV 可以從表現 PorA VR2 P1.2 和 PorB P2.2a 的 MenB 菌株獲得。

**[0392]** dOMV 可以包含 PorA VR2 亞型和 PorB P2.2a。dOMV 可以包含 PorA VR2 P1.2 和 PorB P2.2a。

[0393] dOMV 可以包含 PorA VR2 P1.2 和 PorB P2.2a 以及免疫型 LOS L3,7。PorA 和 PorB 可代表約 50% 的 dOMV 蛋白質。

[0394] dOMV 可以從單個 MenB 菌株獲得，或從不同的 MenB 菌株獲得。在後一種情況下，MenB 菌株可表現相同的 PorA 蛋白亞型，或不同的 PorA 蛋白亞型，或不同類型的孔蛋白，如 PorA 和 PorB 蛋白。

[0395] 可以例如從 PubMLST 資料庫 (<https://pubmlst.org/>) 中鑒定出呈現所尋找的孔蛋白的 dOMV 的可用 MenB 菌株。例如，合適的 MenB 菌株可以藉由在這種資料庫中從流行病爆發中選擇 MenB 菌株、然後在這種子集中選擇具有編碼目的孔蛋白如 PorA VR2 P1.2 蛋白的基因的 MenB 菌株來獲得。然後，可以用本領域已知的技術評價選擇的一種或多種菌株是否有效表現目的孔蛋白。

[0396] 作為適合於根據本公開文本獲得 dOMV 的 MenB 菌株的例子，可以提及以下菌株：NG H36、BZ 232、DK 353、B6116/77、BZ 163、0085/00、NG P20、0046/02、M11 40123、M12 240069、N5/99、99M 或 M07 240677。

[0397] 在一個示例性實施例中，MenB 菌株可以是表現 PorA VR2 P1.2 蛋白亞型的 MenB 菌株 99M。

[0398] 在一個實施例中，dOMV 可以包含孔蛋白 A (PorA) VR2 亞型 P1.2。

[0399] 在另一個實施例中，dOMV 可以包含外膜蛋白孔蛋白 A (PorA) 和/或外膜蛋白孔蛋白 B (PorB)。dOMV 可以包含外膜蛋白孔蛋白 A (PorA) 和外膜蛋白孔蛋白 B (PorB)。

[0400] 相對於所述 dOMV 中存在的總蛋白，PorA 可以以範圍為約 3% 至約 15% 的量、或以約 5% 至約 9% 或 10% 的量存在。相對於所述 dOMV 中存在的總蛋白，PorB 可以以範圍為約 30% 至約 70%、或約 35% 至約 65%、或約 38% 至約 58% 的量存在。

[0401] 在一個實施例中，可以用使用至少一個去氧膽酸鹽處理步驟的去污劑提取方法獲得 dOMV。

[0402] 獲得 dOMV 的合適方法可以如 Helting 等人 (Acta Pathol Microbiol Scand C. 1981 年 4 月;89(2):69-78) 或 US 4,695,624 的實例 2 中所揭露的。例如，可以將細菌培養物離心以獲得沉澱物，然後將沉澱物在加熱下，例如從約 50°C 至約 60°C 或在約 56°C 用去污劑例如去氧膽酸鹽或十二烷基硫酸鈉 (SDS) 提取，持續範圍為約 10 至約 20 分鐘或為約 15 分鐘的時間。然後可以將得到的材料離心，並且可以將沉澱物根據本領域已知的任何方法進一步懸浮和純化。

[0403] dOMV 可以以範圍為約 5 µg/劑量至約 400 µg/劑量、或約 10 µg/劑量至約 300 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 250 µg/劑量、或約 35 µg/劑量至約 225 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 100 µg/劑量至約 150 µg/劑量、或約 110 µg/劑量至約 125 µg/劑量的量存在。

[0404] 在一個實施例中，dOMV 可以以約 25 µg/劑量、或約 50 µg/劑量、或約 125 µg/劑量的量存在。

### *另外的抗原*

[0405] 本公開文本的免疫原性組成物可以包含至少一種另外的抗原。

[0406] 另外的抗原可以是與載體蛋白接合的來自腦膜炎奈瑟氏菌血清群 A、C、W135、Y 和/或 X 的糖類抗原。在一個實施例中，本公開文本的組成物可以進一步包含 MenA、MenC、MenW-135 和 MenY 莢膜多糖與載體蛋白的接合物的組合。

[0407] 在一個實施例中，所述另外的抗原可以是 MenA、MenC、MenW-135 和 MenY 莢膜多糖與載體蛋白的接合物的組合。

**[0408]** 不同莢膜多糖的載體蛋白可以不同或相同。載體蛋白可以包括滅活的細菌毒素，如白喉類毒素、CRM197、破傷風類毒素、百日咳類毒素、大腸桿菌 LT、大腸桿菌 ST 和來自銅綠假單胞菌的外毒素 A。也可以使用細菌外膜蛋白，如孔蛋白、轉鐵蛋白結合蛋白、肋膜纖維溶解術（pneumolysis）、肺炎球菌表面蛋白 A（PspA）或肺炎球菌黏附素蛋白（PsaA）。其他蛋白質，如卵清蛋白、鑰孔蟲戚血藍蛋白（KLH）、牛血清白蛋白（BSA）、或結核菌素的純化蛋白衍生物（PPD）也可以用作載體蛋白。它可以是 CRM197 蛋白、破傷風或白喉類毒素。在一個實施例中，它是破傷風類毒素。

**[0409]** 接合物可以是包含分子量在 700 kDa 至 1400 kDa 或 800 kDa 至 1300 kDa 範圍內的分子的群體。

**[0410]** 在每個劑量中，單獨糖類抗原以糖類品質測量的量可以在 1-50  $\mu\text{g}$  之間。例如，每劑量可投予總計 40  $\mu\text{g}$  的糖類。例如，可以投予 10  $\mu\text{g}$  的每種多糖和大約 55  $\mu\text{g}$  的載體蛋白（如破傷風類毒素蛋白）。

**[0411]** 所述另外的抗原可以是各自接合至破傷風類毒素載體蛋白的 MenA、MenC、MenW-135 和 MenY 莢膜多糖的組合，其中 MenA 多糖經由己二酸二醯肼（ADH）接頭接合至破傷風類毒素載體，而 MenC、MenW-135 和 MenY 多糖各自直接接合至破傷風類毒素載體（TT）。

**[0412]** 在一個實施例中，所述另外的抗原可以是 MenA、MenC、MenW-135 和 MenY 莢膜多糖與破傷風類毒素載體蛋白的接合物的組合。在示例性實施例中，來自腦膜炎奈瑟氏菌血清群 A、C、W135 和/或 Y 的接合糖類抗原可以如在 WO 2018/045286 A1 或 WO 2002/058737 A2 中揭露的。

**[0413]** 在一個實施例中，所述另外的抗原是可商購的 MenACYW-TT 接合物疫苗 MENQUADFI®的抗原。

## 免疫原性組成物

[0414] 本文公開的免疫原性組成物可以包含腦膜炎球菌抗原的組合，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 蛋白、至少一種 fHBP B 蛋白、至少一種奈瑟氏菌黏附素 A (NadA) 蛋白和至少一種去污劑提取的外膜囊泡 (dOMV)。

[0415] 本文公開的免疫原性組成物可以包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A、至少一種 fHBP B、至少一種奈瑟氏菌黏附素 A (NadA) 蛋白和至少一種去污劑提取的外膜囊泡 (dOMV)。所述 fHBP A 和/或所述 fHBP B 可以是非脂化的。

[0416] 所述 fHBP A 可以是包含與 SEQ ID NO: 1 至少約 85% 的同一性的突變蛋白，和/或所述 fHBP B 可以是包含與 SEQ ID NO: 3 至少約 85% 的同一性的突變蛋白。

[0417] 所述 fHBP A 可以是包含降低或抑制所述 fHBP A 與人類 H 因子 (fH) 的結合的至少一個突變的突變蛋白，和/或所述 fHBP B 可以是包含降低或抑制所述 fHBP B 與人類 H 因子 (fH) 的結合的至少一個突變的突變蛋白。

[0418] 所述 fHBP A 基於 SEQ ID NO: 6 的編號可以包含選自以下中至少一者的至少一個胺基酸取代：a) 在胺基酸 115 處的天門冬醯胺酸 (N115) 的胺基酸取代；b) 在胺基酸 121 處的天門冬胺酸 (D121) 的胺基酸取代；c) 在胺基酸 128 處的絲胺酸 (S128) 的胺基酸取代；d) 在胺基酸 129 處的苯丙胺酸的胺基酸取代；e) 在胺基酸 130 處的白胺酸 (L130) 的胺基酸取代；f) 在位置 131 處的纈胺酸 (V131) 的胺基酸取代；g) 在位置 133 處的甘胺酸 (G133) 的胺基酸取代；h) 在位置 219 處的離胺酸 (K219) 的胺基酸取代；和 i) 在位置 220 處的甘胺酸 (G220) 的胺基酸取代，或包含 SEQ ID NO: 2 或由 SEQ ID NO: 2 組成，或包含 SEQ ID NO: 8 或由 SEQ ID NO: 8 組成，和/或所述 fHBP B 蛋白基於 SEQ ID NO:



6 的編號可以包含選自以下中至少一者的至少一個胺基酸取代：a) 在胺基酸 38 處的麩醯胺酸 (Q38) 的胺基酸取代；b) 在胺基酸 92 處的麩胺酸 (E92) 的胺基酸取代；c) 在胺基酸 130 處的精胺酸 (R130) 的胺基酸取代；d) 在胺基酸 223 (S223) 處的絲胺酸的胺基酸取代；和 e) 在胺基酸 248 處的組胺酸 (H248) 的胺基酸取代，或包含 SEQ ID NO: 4 或由 SEQ ID NO: 4 組成，或包含 SEQ ID NO: 9 或由 SEQ ID NO: 9 組成。

**[0419]** 所述 fHBP A 和/或所述 fHBP B 可以以範圍為約 20 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 40 µg/劑量至約 140 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 120 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 100 µg/劑量的量，或以 25 µg/劑量、或約 50 µg/劑量、或約 100 µg/劑量的量存在。

**[0420]** 所述 NadA 蛋白可以是 NadA1 蛋白或可包含與 SEQ ID NO: 5 至少約 85% 的同一性，或包含 SEQ ID NO: 5 或由 SEQ ID NO: 5 組成。

**[0421]** 所述 NadA 蛋白可以以範圍為約 20 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 40 µg/劑量至約 140 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 120 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 100 µg/劑量的量，或以約 50 µg/劑量的量存在。

**[0422]** dOMV 可以包含孔蛋白 A (PorA)。

**[0423]** 所述 dOMV 可以以範圍為約 5 µg/劑量至約 400 µg/劑量、或約 10 µg/劑量至約 300 µg/劑量、或約 25 µg/劑量至約 250 µg/劑量、或約 35 µg/劑量至約 225 µg/劑量、或約 50 µg/劑量至約 200 µg/劑量、或約 75 µg/劑量至約 180 µg/劑量、或約 100 µg/劑量至約 150 µg/劑量、或約 110 µg/劑量至約 125 µg/劑量的量，或以約 25 µg/劑量、或以約 50 µg/劑量、或以約 125 µg/劑量的量存在。

**[0424]** 所述組成物可以包含佐劑，例如鋁基佐劑，例如選自包含以下的群組的鋁基佐劑：氫氧化鋁佐劑、磷酸鋁佐劑、硫酸鋁鹽佐劑、羥基磷酸鋁硫酸鹽佐

劑、硫酸鋁鉀佐劑、羥基碳酸鋁、氫氧化鋁和氫氧化鎂的組合、以及其混合物，例如是磷酸鋁佐劑。

[0425] 所述組成物的 pH 與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 0.6 至 2.9 個單位，或與所述佐劑的 PZC 相差 1.2 至 2.9 個單位。所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 0.6 至 2.9 個單位，或與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.0 至 2.8、或 1.2 至 2.5 或 1.4 至 2.1 個單位。

[0426] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差至少 0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8 或 2.9 個單位。

[0427] 在一些實施例中，本公開文本的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於具有某一 pH 的組成物中，使得所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 與所述組成物的 pH 之間的差的範圍為約 1.0 至約 2.9 或約 1.2 至約 2.9。

[0428] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差至少 1.2 個單位。

[0429] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差不多於 2.9 個單位。

[0430] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8 或 2.9 個單位。

[0431] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6 或 2.7 個單位。

[0432] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.2、1.5、1.7、2.2、2.5 或 2.7 個單位。

[0433] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6 或 1.7 個單位。

[0434] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.2、1.5 或 1.7 個單位。

[0435] 所述組成物的 pH 可以是約 5.5 至約 7.0。所述組成物的 pH 可以是約 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9 或約 7.0。

[0436] 所述組成物的 pH 可以是約 5.5、6.0、6.5 或約 7.0。

[0437] 所述組成物的 pH 可以是約 6.0。

[0438] 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 可以是約 4.5。

[0439] 所述組成物的 pH 可以與所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 相差 1.5 個單位之內。

[0440] 所述組成物可以包含以下或由以下組成：約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的包含 SEQ ID NO: 2 或由其組成的非脂化 fHBP A 蛋白、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的包含 SEQ ID NO: 4 或由其組成的非脂化 fHBP B 蛋白、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的包含 SEQ ID NO: 5 或由其組成的 NadA 蛋白、約 20 至約 150  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 至約 600  $\mu\text{g}$ /劑量的磷酸鋁佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

[0441] 所述組成物可以包含以下或由以下組成：約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的包含 SEQ ID NO: 8 或由其組成的非脂化 fHBP A 蛋白、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的包含 SEQ ID NO: 9 或由其組成的非脂化 fHBP B 蛋白、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的包含 SEQ ID NO: 5 或由其組成的 NadA 蛋白、約 20 至約 150  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 至約 600  $\mu\text{g}$ /劑量的磷酸鋁佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

[0442] 所述組成物還可以包含來自腦膜炎奈瑟氏菌血清群 A、C、W135 和/或 Y 中的一種或多種的至少一種接合莢膜糖。

[0443] 還公開了包含如本文所述的組成物的疫苗。

[0444] 如本文公開的組成物或疫苗可用於防止腦膜炎球菌感染或可用於誘導針對腦膜炎球菌細菌的免疫反應。

**[0445]** 還公開了一種組成物，所述組成物包含以下或由以下組成：編碼 fHBP A 蛋白的 mRNA、編碼 fHBP B 蛋白的 mRNA、編碼 NadA 蛋白的 mRNA、和來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV，所述 fHBP A 蛋白包含與 SEQ ID NO: 2 至少約 85%、至少約 90%、至少 95%、至少約 98%、至少約 99%、至少約 99.5% 或約 100%的胺基酸序列同一性，所述 fHBP B 蛋白包含與 SEQ ID NO: 4 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、至少約 99.5%或約 100%的胺基酸序列同一性，所述 NadA 蛋白包含與 SEQ ID NO: 5 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、至少約 99.5%或約 100%的胺基酸序列同一性。

**[0446]** 還公開了一種組成物，所述組成物包含以下或由以下組成：編碼 fHBP A 蛋白的 mRNA、編碼 fHBP B 蛋白的 mRNA、編碼 NadA 蛋白的 mRNA、和來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV，所述 fHBP A 蛋白包含與 SEQ ID NO: 8 至少約 85%、至少約 90%、至少 95%、至少約 98%、至少約 99%、至少約 99.5% 或約 100%的胺基酸序列同一性，所述 fHBP B 蛋白包含與 SEQ ID NO: 9 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、至少約 99.5%或約 100%的胺基酸序列同一性，所述 NadA 蛋白包含與 SEQ ID NO: 5 至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 98%、至少約 99%、至少約 99.5%或約 100%的胺基酸序列同一性。

## 調配物

**[0447]** 如本文公開的免疫原性組成物可以被配製成固體、半固體、液體形式的製劑，如片劑、膠囊劑、散劑、氣霧劑、溶液、混懸劑或乳劑。製備此類劑型的實際方法對於本領域具有通常知識者是已知的或將是清楚的；例如參見 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版 (Philadelphia College of

第 72 頁，共 145 頁(發明說明書)

Pharmacy and Science, 2000)。組成物基於遞送方式被配製，包括例如組成物可以被配製用於經由腸胃外遞送（如肌內、皮內或皮下注射）來遞送。

**[0448]** 可以經由任何合適的途徑投予，如藉由黏膜投予（例如，鼻內或舌下）、腸胃外投予（例如，肌內、皮下、經皮或皮內途徑）或口服投予免疫原性組成物。投予此類組成物的典型途徑包括而不限於口服、局部、透皮、吸入、腸胃外、舌下、頰、鼻內。如本文所用的術語腸胃外包括皮下注射、靜脈內、肌內、皮內、胸骨內注射或輸注技術。在一些實施例中，可以藉由透皮、皮下、皮內或肌內途徑投予組成物。

**[0449]** 在一個實施例中，可以將如本文公開的免疫原性組成物配製為經由肌內途徑或皮內途徑或皮下途徑投予。在一個實施例中，可以將免疫原性組成物配製為經由肌內途徑投予。

**[0450]** 可以將免疫原性組成物與任何醫藥上可接受的賦形劑一起配製。所述組成物可以包含至少一種惰性稀釋劑或載劑。一種示例性的醫藥上可接受的媒劑是生理鹽水緩衝液。其他生理學上可接受的媒劑是本領域具有通常知識者已知的並且例如描述於 Remington's Pharmaceutical Sciences (第 18 版), 編輯 A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, 伊斯頓, 賓夕法尼亞州。如本文所述的免疫原性組成物可以任選地包含接近生理條件所需的醫藥上可接受的輔助物質，如 pH 調節劑和緩沖劑、張力調節劑、潤濕劑等，例如乙酸鈉、乳酸鈉、氯化鈉、氯化鉀、氯化鈣、脫水山梨醇單月桂酸酯、油酸三乙醇胺、人類血清白蛋白、必需胺基酸、非必需胺基酸、L-精胺酸鹽酸鹽、蔗糖、D-海藻糖脫水物、山梨醇、三(羥甲基)胺基甲烷和/或尿素。此外，疫苗組成物可以任選地包含醫藥上可接受的添加劑，包括例如稀釋劑、黏合劑、穩定劑和防腐劑。

**[0451]** 組成物可以是液體（例如溶液、乳液或懸浮液）的形式，旨在藉由注射進行遞送。旨在藉由注射投予的組成物可以包含以下中的至少一種：表面活性

劑、防腐劑、潤濕劑、分散劑、助懸劑、緩衝液、穩定劑和等滲劑。如本文公開的液體組成物可以包含以下中的至少一種：無菌稀釋劑如注射用水、鹽水溶液，如生理鹽水、林格氏溶液、等滲氯化鈉；固定油，如可用作溶劑或懸浮介質的合成甘油單酯或甘油二酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶劑；抗細菌劑，如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，如乙二胺四乙酸；緩衝液，如乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；以及用於調節張力的藥劑，如氯化鈉或右旋糖；作為冷凍保護劑的試劑，如蔗糖或海藻糖。

**[0452]** 在另一個實施例中，本公開文本的組成物可以具有約 5.5 至約 7.0 範圍內的 pH。

**[0453]** 本文公開的免疫原性組成物的 pH 範圍可為約 5.5 至約 7.0、或約 5.6 至約 6.9、或約 5.7 至約 6.7、或約 5.8 至約 6.5、或約 5.9 至約 6.3。在一個實施例中，如本文公開的組成物的 pH 可為約 6.0。藉由使用緩衝液可維持穩定的 pH。

**[0454]** 在一個實施例中，本公開文本的組成物還可包含緩衝液。可以列舉 Tris 緩衝液、乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液、HEPES 緩衝液或組胺酸緩衝液作為可能的可用緩衝液。

**[0455]** 組成物可包含乙酸鈉緩衝液。

**[0456]** 乙酸鈉緩衝液可以以範圍為約 10 mM 至約 300 mM，或範圍為約 10 mM 至約 250 mM，或範圍為約 20 mM 至約 250 mM，或範圍為約 20 mM 至約 150 mM、或約 20 mM 至約 130 mM、或約 30 mM 至約 120 mM、或約 40 mM 至約 100 mM、或約 50 mM 至約 80 mM、或約 50 mM 至約 60 mM 的濃度，或例如以約 50 mM 的濃度存在。

**[0457]** 免疫原性組成物對於哺乳動物如人類可以是等滲的。

**[0458]** 免疫原性組成物還可以包含一種或幾種另外的鹽，如鈉鹽、鈣鹽或鎂鹽。鈉鹽可以選自氯化鈉、磷酸鈉。鈉鹽可以是氯化鈉。鈣鹽可以是氯化鈣鹽。鎂鹽可以是氯化鎂鹽。

**[0459]** 鈉鹽可以以範圍為約 10 mM 至約 300 mM、或約 30 mM 至約 280 mM、或約 50 mM 至約 250 mM、或約 60 mM 至約 220 mM、或約 80 mM 至約 200 mM、或約 100 mM 至約 180 mM、或約 120 mM 至約 160 mM 的濃度存在，或可以是例如約 150 mM 的濃度。

**[0460]** 鈣或鎂可以以範圍為約 1 mM 至約 15 mM、或約 5 mM 至約 10 mM 的量存在。

**[0461]** 可以將用於腸胃外投予的免疫原性組成物封裝在由玻璃或塑膠製成的安瓿、一次性注射器或多劑量小瓶中。可注射的組成物是例如無菌的。

**[0462]** 免疫原性組成物可以藉由常規滅菌技術（例如用 UV 或  $\gamma$  輻射）滅菌，或者可以進行無菌過濾。在無菌過濾後獲得的組成物可以以液體形式或以凍乾的形式包裝和儲存。凍乾組成物可以在投予前用無菌水性載劑重構。乾組成物可以包含穩定劑，如甘露醇、蔗糖或十二烷基麥芽糖苷以及其混合物，例如乳糖/蔗糖混合物、蔗糖/甘露醇混合物等。

**[0463]** 將如本文公開的組成物以治療有效量向有需要的個體投予，所述治療有效量將取決於多種因素，包括所使用的具體治療劑的活性；治療劑的代謝穩定性和作用時間；患者的年齡、體重、一般健康狀況、性別和飲食；投予方式和時間；排泄率；藥物組合；具體障礙或病症的嚴重程度；和接受療法的受試者。

**[0464]** 本公開文本的免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：

**[0465]** - 包含 SEQ ID NO: 2 或由其組成的非脂化突變 fHBP A、包含 SEQ ID NO: 4 或由其組成的非脂化突變 fHBP B、包含 SEQ ID NO: 5 或由其組成的 NadA 蛋

白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、以及被選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑。所述組成物可以包含 50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0466]** - 由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、被選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0467]** - 約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA、約 20 至約 250  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 至約 800  $\mu\text{g}$ /劑量的被選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0468]** - 約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 的乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0469]** - 約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0470]** - 約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌



株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0471] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0472] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0473] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 200 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0474] - 約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 75 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 300 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0475] - 約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID

NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0476] - 約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0477] - 約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 800  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

[0478] 在一個實施例中，免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

[0479] 本公開文本的免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：

[0480] - 包含 SEQ ID NO: 2 或由其組成的非脂化突變 fHBP A、包含 SEQ ID NO: 4 或由其組成的非脂化突變 fHBP B、包含 SEQ ID NO: 5 或由其組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、以及被選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑。所述組成物可以包含 50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0481] - 由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、被選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0482] - 約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA、約 20 至約 250  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 至約 800  $\mu\text{g}$ /劑量的被選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0483] - 約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 的乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0484] - 約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0485] - 約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0486] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0487] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0488] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 200 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0489] - 約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 75 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 300 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0490] - 約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌

株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0491] - 約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0492] - 約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 800  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

[0493] 在一個實施例中，免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

[0494] 本公開文本的免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：

[0495] - 包含 SEQ ID NO: 2 或由其組成的非脂化突變 fHBP A、包含 SEQ ID NO: 4 或由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、包含 SEQ ID NO: 5 或由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、以及被選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑。所述組成物可以包含 50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0496] - 由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、被選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0497] - 約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA、約 20 至約 250  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 至約 800  $\mu\text{g}$ /劑量的被選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0498] - 約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 的乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0499] - 約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0500] - 約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0501] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0502] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0503] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 200 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0504] - 約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 75 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 300 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0505] - 約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌

株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0506]** - 約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0507]** - 約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 800  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0508]** 在一個實施例中，免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 4 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0509]** 本公開文本的免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：

**[0510]** - 包含 SEQ ID NO: 8 或由其組成的非脂化突變 fHBP A、包含 SEQ ID NO: 9 或由其組成的非脂化突變 fHBP B、包含 SEQ ID NO: 5 或由其組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、以及被選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑。所述組成物可以包含 50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0511]** - 由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2



的 MenB 的 dOMV、被選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0512]** - 約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA、約 20 至約 250  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 至約 800  $\mu\text{g}$ /劑量的被選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0513]** - 約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0514]** - 約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0515]** - 約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0516]** - 約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID

NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0517] - 約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0518] - 約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 200  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0519] - 約 75  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 75  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 75  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 75  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 300  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0520] - 約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0521]** - 約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的 PZC 是約 4.3 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0522]** - 約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 800 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0523]** 在一個實施例中，免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.3 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0524]** 本公開文本的免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：

**[0525]** - 包含 SEQ ID NO: 8 或由其組成的非脂化突變 fHBP A、包含 SEQ ID NO: 9 或由其組成的非脂化突變 fHBP B、包含 SEQ ID NO: 5 或由其組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、以及被選擇為 PZC 是約 4.5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑。所述組成物可以包含 50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0526]** - 由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、被選擇為 PZC 是約 4.5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0527] - 約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA、約 20 至約 250  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 至約 800  $\mu\text{g}$ /劑量的被選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0528] - 約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0529] - 約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0530] - 約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0531] - 約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌

株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0532]** - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0533]** - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 200 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0534]** - 約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 75 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 300 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0535]** - 約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0536]** - 約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID

NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0537]** - 約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 800  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0538]** 在一個實施例中，免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0539]** 本公開文本的免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：

**[0540]** - 包含 SEQ ID NO: 8 或由其組成的非脂化突變 fHBP A、包含 SEQ ID NO: 9 或由其組成的非脂化突變 fHBP B、包含 SEQ ID NO: 5 或由其組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、以及被選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑。所述組成物可以包含 50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0541]** - 由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 的 dOMV、被選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0542]** - 約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25 至約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25 至

約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA、約 20 至約 250 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 至約 800 µg/劑量的被選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0543]** - 約 25 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0544]** - 約 25 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0545]** - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 25 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0546]** - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0547] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0548] - 約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 200 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0549] - 約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 75 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 75 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 300 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0550] - 約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400 µg/劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

[0551] - 約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50 µg/劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50 µg/劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌



株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0，或

**[0552]** - 約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 800  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0553]** 在一個實施例中，免疫原性組成物可以包含以下或由以下組成：約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 50  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 125  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 400  $\mu\text{g}$ /劑量的選擇為 PZC 是約 4.8 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0554]** 劑量的範圍可以是約 0.1 mL 至約 1 mL，例如，約 0.2 mL 至約 0.8 mL、約 0.4 mL 至約 0.6 mL，或可以是約 0.5 mL。

**[0555]** 在一個實施例中，本公開文本涉及一種容器，所述容器包含如本文公開的組成物。容器可以包含免疫原性組成物，所述免疫原性組成物包含腦膜炎球菌抗原的組合和羥基磷酸鋁 ( $\text{AlPO}_4$ ) 佐劑，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A、至少一種 fHBP B，所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑被選擇為零電荷點 (PZC) 低於 5。

**[0556]** 容器可以進一步包含至少一種奈瑟氏菌黏附素 A (NadA) 蛋白和/或至少一種去污劑提取的外膜囊泡 (dOMV)。

**[0557]** 容器可以包含如前詳述的本公開文本的組成物。

**[0558]** 容器可以包含含有以下或由以下組成的組成物：約 25 至 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 2 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25 至 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO:

4組成的非脂化突變 fHBP B、約 25 至 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 20 至 250  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 至 800  $\mu\text{g}$ /劑量的被選擇為零電荷點 (PZC) 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0559]** 容器可以包含含有以下或由以下組成的組成物：約 25 至 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 8 組成的非脂化突變 fHBP A、約 25 至 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 9 組成的非脂化突變 fHBP B、約 25 至 100  $\mu\text{g}$ /劑量的由 SEQ ID NO: 5 組成的 NadA 蛋白、約 20 至 250  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現 PorA VR2 P1.2 的 MenB 菌株的 dOMV、約 100 至 800  $\mu\text{g}$ /劑量的被選擇為零電荷點 (PZC) 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑、50 mM 乙酸鹽緩衝液和 pH 6.0。

**[0560]** 此外，容器可以包含如以上詳述的另外的抗原。可替代地，可以將另外的抗原包裝在單獨的容器中。

**[0561]** 容器可以是小瓶。小瓶可以是多劑量小瓶或可以是單劑量小瓶。合適的小瓶可以是最合適的塞子和密封件密封的小玻璃或塑膠容器。

**[0562]** 可替代地，容器可以是載藥注射器。載藥注射器可以包括儲存如本文公開的液體組成物的注射器筒。墊片和柱塞插入注射器筒中。墊片以液密方式密封注射器筒以防止液體藥物洩漏，並且柱塞使墊片滑動。各種類型的載藥注射器在本領域中是已知的，如例如在 US 10,625,025 或 WO 2013/046855 中描述的。

**[0563]** 在本公開文本的組成物要與另一種疫苗組成物（例如作為四價 MenACWY 接合組成物）一起混合並注射的情況下，兩種組成物均可以被包裝在作為單個小瓶或載藥注射器的一個容器中或被包裝在雙室注射器中。雙室注射器也稱為順序或旁路注射器，可包括由隔膜分隔成近側和遠側兩個隔室的單個筒。注射器柱塞的下壓迫使兩種疫苗組成物在遠側隔室中混合。各種類型的雙室注射器在本領域中是已知的，如例如在 US 10,695,505 中描述的。雙室注射

器也可以在疫苗組成物被配製為乾燥形式如凍乾形式的情況下使用，並且與用於重構的液體媒劑一起儲存。在這種情況下，乾燥的疫苗儲存在一個室中，而用於重構和注射的液體儲存在第二室中。

**[0564]** 在一些實施例中，本公開文本涉及一種包含如本文公開的免疫原性組成物的疫苗。

**[0565]** 本公開文本的免疫原性組成物可以是疫苗。

### 多組分套組

**[0566]** 還公開了多組分套組。

**[0567]** 多組分套組可以包含至少兩個容器：包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B 的第一容器，和含有被選擇為零電荷點 (PZC) 低於 5 的羥基磷酸鋁 (AlPO<sub>4</sub>) 佐劑的第二容器。

**[0568]** 多組分套組可以至少包含：含有至少一種去污劑提取的外膜囊泡 (dOMV) 和/或至少一種奈瑟氏菌黏附素 A (NadA) 蛋白的另外的容器。dOMV 和 NadA 蛋白可以在單獨的容器中提供。

**[0569]** 可替代地，多組分套組可以至少包含：含有至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A、至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B 和被選擇為零電荷點 (PZC) 低於 5 的羥基磷酸鋁 (AlPO<sub>4</sub>) 佐劑的第一容器以及含有至少一種去污劑提取的外膜囊泡 (dOMV) 和/或至少一種奈瑟氏菌黏附素 A (NadA) 蛋白的第二容器。dOMV 和 NadA 蛋白可以在單獨的容器中提供。

**[0570]** 可替代地，多組分套組可以至少包含：含有至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A、至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B、被選擇為零電荷點 (PZC) 低於 5 的羥基磷酸鋁 (AlPO<sub>4</sub>) 佐劑、至少一種去污劑提取的外膜囊泡 (dOMV)

和至少一種奈瑟氏菌黏附素 A (NadA) 蛋白的第一容器以及含有另外的抗原的第二容器。

**[0571]** 可替代地，可以將抗原、fHBP A、fHBP B、NadA 和 dOMV、以及被選擇為零電荷點 (PZC) 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑中的每一者儲存在單獨的容器中。又可替代地，抗原和  $\text{AlPO}_4$  佐劑可以以不同的組合相關聯。可以設想所有類型的組合：fHBP A+B 和 NadA+dOMV 和  $\text{AlPO}_4$ ；fHBP A+B+ $\text{AlPO}_4$  和 NadA+dOMV；fHBP A+B+ $\text{AlPO}_4$  和 NadA+dOMV+ $\text{AlPO}_4$ ；fHBP A+NadA 和 fHBP B+dOMV 和  $\text{AlPO}_4$ ；fHBP B+NadA+ $\text{AlPO}_4$  和 fHBP A+dOMV+ $\text{AlPO}_4$ ；fHBP A+NadA+ $\text{AlPO}_4$  + fHBP B+ $\text{AlPO}_4$  和 dOMV+ $\text{AlPO}_4$ ；或 fHBP A+dOMV+fHBP B+ $\text{AlPO}_4$  和 NadA+ $\text{AlPO}_4$  等。

**[0572]** fHBP A 和 B、 $\text{AlPO}_4$  佐劑、NadA 蛋白和 dOMV 如上詳述。

**[0573]** 在一個實施例中，另外的抗原可以是接合 MenACWY 多糖的組合。

**[0574]** 接合 MenACWY 多糖可以如上詳述。

**[0575]** 在一個實施例中，多組分套組可包含含有如本文公開的免疫原性組成物的第一容器和含有接合 MenACWY 多糖的組合的第二容器。

**[0576]** 可以將本公開文本的免疫原性組成物的抗原和  $\text{AlPO}_4$  製備並儲存在單獨的容器或小瓶中。然後可以在投予於個體時將它們混合。

**[0577]** 可以將抗原以液體調配物或乾燥形式儲存。當以乾燥形式配製時，可以添加具有可注射液體的另外的容器，並且可以使用可注射液體來重懸浮和混合不同的抗原。合適的可注射液體載劑可以包括緩衝液。可注射液體可包含  $\text{AlPO}_4$  佐劑。

**[0578]** 在一個實施例中，多組分套組的容器可以含有可以是乾燥形式的抗原。抗原可以凍乾為餅狀或微丸粒。

**[0579]** 套組可以任選地包含含有生理學上可注射的媒劑的容器。可以使用生理學上可注射的媒劑重懸浮或溶解乾燥形式的抗原。

## 製造方法

**[0580]** 本公開文本涉及一種用於製造免疫原性組成物的方法，所述免疫原性組成物包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合和  $\text{AlPO}_4$  佐劑，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B，所述方法至少包括以下步驟：

**[0581]** a) 選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑，以及

**[0582]** b) 將在步驟 a) 中選擇的所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B 組合，所述組合以任何順序進行。

**[0583]** 所述方法允許獲得免疫原性組成物。

**[0584]** 所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與 fHBP A 和 fHBP B 的組合可以以任何順序進行。例如，可以將所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與 fHBP A 組合，並且然後可以添加 fHBP B，或可以將所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與 fHBP B 組合，並且然後可以添加 fHBP A，或可以將 fHBP A 和 fHBP B 組合並且然後可以添加  $\text{AlPO}_4$ ，或可以將所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑同時與 fHBP A 和 fHBP B 二者組合。

**[0585]** 在步驟 b) 中，可以首先將 fHBP A 和 fHBP B 組合，並且然後可以添加  $\text{AlPO}_4$  佐劑。

**[0586]** 可替代地，在步驟 b) 中，可以首先將  $\text{AlPO}_4$  佐劑和 fHBP A 組合，並且然後可以添加 fHBP B。

**[0587]** 可替代地，在步驟 b) 中，可以首先將  $\text{AlPO}_4$  佐劑和 fHBP B 組合，並且然後可以添加 fHBP A。

**[0588]** 可替代地，在步驟 b) 中，可以將  $\text{AlPO}_4$  佐劑的第一部分和 fHBP B 在第一混合物中組合，並且可以將  $\text{AlPO}_4$  佐劑的第二部分和 fHBP A 在第二混合物中組合，並且然後可以將第一和第二混合物組合。

**[0589]** 可替代地，在步驟 b) 中，可以將  $\text{AlPO}_4$  佐劑同時與 fHBP A 和 fHBP B 二者組合。

**[0590]** 本公開文本的方法可以進一步包括添加選自 NadA 蛋白和 dOMV 的至少一種抗原的步驟。所述組合可以以任何順序進行。

**[0591]** 例如，可以將 NadA 蛋白和/或 dOMV 在將  $\text{AlPO}_4$  與 fHBP A 和 fHBP B 組合的步驟之前或之後添加。可以將 NadA 和 dOMV 各自在單獨的步驟中添加，或可以在單個步驟中添加之前組合。

**[0592]** 在一些實施例中，在步驟 b) 中，可以將 fHBP A、fHBP B、NadA 蛋白和 dOMV 以任何順序組合，並且然後可以添加  $\text{AlPO}_4$  佐劑。

**[0593]** 在一些實施例中，在步驟 b) 中，可以將  $\text{AlPO}_4$  佐劑分成多個部分（2、3 或 4 個），並且可以將一個部分添加到每種抗原中：fHBP A、fHBP B、NadA 蛋白和 dOMV，並且然後可以將具有  $\text{AlPO}_4$  的抗原以任何順序組合在一起。

**[0594]** 可替代地，步驟 b) 可以包括將  $\text{AlPO}_4$  佐劑與 fHBP A、fHBP B 和 NadA 蛋白的組合進行組合。可以在後續步驟中添加 dOMV。

**[0595]** 可替代地，步驟 b) 可以包括將  $\text{AlPO}_4$  佐劑與 fHBP A、fHBP B 和 dOMV 的組合進行組合。可以在後續步驟中添加 NadA 蛋白。

**[0596]** 本公開文本的免疫原性組成物的製造方法可以至少包括以下步驟：

**[0597]** a) 選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑，

**[0598]** b) 將在步驟 a) 中選擇的所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與至少一種 H 因子結合蛋白（fHBP）A、至少一種 H 因子結合蛋白（fHBP）B、至少一種 NadA 蛋白、至少一種 dOMV 組合，所述組合以任何順序進行。

[0599] 在與  $\text{AlPO}_4$  佐劑組合之前，可以例如藉由無菌過濾（例如用  $0.22\ \mu\text{m}$  過濾器）來過濾腦膜炎奈瑟氏菌抗原 fHBP A、fHBP B、NadA 蛋白、dOMV。

[0600] 在將  $\text{AlPO}_4$  佐劑、fHBP A、fHBP B、NadA 蛋白和 dOMV 組合後，然後可以將獲得的組合分配在注射器或小瓶中。

[0601] 本公開文本涉及一種用於製備包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的免疫原性組成物的方法，所述組成物誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原異源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應，所述方法至少包括以下步驟：

[0602] a) 選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑，以及

[0603] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與所述 fHBP B 組合，以及

[0604] c) 獲得所述免疫原性組成物。

[0605] 所述方法允許獲得能夠誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 異源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應的免疫原性組成物。

[0606] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種用於製備包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的免疫原性組成物的方法，所述組成物誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原同源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應，所述方法至少包括以下步驟：

[0607] a) 選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑，以及

[0608] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與所述 fHBP B 組合，以及

[0609] c) 獲得所述免疫原性組成物。

[0610] 所述方法允許獲得能夠誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 同源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應的免疫原性組成物。

[0611] 所述組成物可進一步包含 fHBP A、NadA 蛋白或 dOMV 中的至少一者。

[0612] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種用於製備包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 抗原的免疫原性組成物的方法，所述組成物誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 抗原異源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應，所述方法至少包括以下步驟：

[0613] a) 選擇 PZC 低於 5 的  $AlPO_4$  佐劑，以及

[0614] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述  $AlPO_4$  佐劑與所述 fHBP A 組合，以及

[0615] c) 獲得所述免疫原性組成物。

[0616] 所述方法允許獲得能夠誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 異源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應的免疫原性組成物。

[0617] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種用於製備包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 抗原的免疫原性組成物的方法，所述組成物誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 抗原同源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應，所述方法至少包括以下步驟：

[0618] a) 選擇 PZC 低於 5 的  $AlPO_4$  佐劑，以及

[0619] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述  $AlPO_4$  佐劑與所述 fHBP A 組合，以及

[0620] c) 獲得所述免疫原性組成物。

[0621] 所述方法允許獲得能夠誘導針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 同源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應的免疫原性組成物。

[0622] 所述組成物可進一步包含 fHBP B、NadA 蛋白或 dOMV 中的至少一者。



[0623] 本公開文本的方法可以進一步包括添加選自 fHBP A、NadA 蛋白和 dOMV 的至少一種抗原。AlPO<sub>4</sub> 佐劑、fHBP B、fHBP A、NadA 蛋白和 dOMV 的添加可以以任何順序進行。

[0624] 本公開文本的免疫原性組成物的製造方法可以至少包括以下步驟：

[0625] a) 選擇 PZC 低於 5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑，

[0626] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑與至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A、至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B、至少一種 NadA 蛋白和至少一種 dOMV 組合，所述組合以任何順序進行。

[0627] fHBP A 和 B、NadA 蛋白和 dOMV 可以如上詳述。

[0628] 可以將 fHBP A 和 B、NadA 蛋白和 dOMV 在組合在一起並與 AlPO<sub>4</sub> 佐劑組合之前進行無菌過濾。

[0629] 此外，本公開文本的方法可以包括添加另外的抗原的步驟。另外的抗原可以是與如上詳述的蛋白質載體接合的 MenACWY 多糖的組合。

[0630] 本公開文本涉及一種用於穩定免疫原性組成物中的 fHBP A 和奈瑟氏菌黏附素 (NadA) 蛋白中的至少一者的方法，所述方法至少包括以下步驟：

[0631] a) 選擇 PZC 低於 5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑，以及

[0632] b) 將在步驟 a) 中選擇的所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑與 fHBP A 或 NadA 蛋白組合，以及

[0633] c) 獲得其中所述 fHBP A 或 NadA 蛋白穩定的免疫原性組成物。

[0634] 所述方法允許獲得其中 fHBP A 和/或 NadA 穩定的免疫原性組成物。

[0635] 本公開文本的方法可以進一步包括添加至少一種抗原的步驟。

[0636] 對於包含 NadA 蛋白的組成物，所述至少一種另外的抗原可以選自 fHBP A、fHBP B 和 dOMV。

[0637] 對於包含 fHBP A 的組成物，所述至少一種另外的抗原可以選自 fHBP B、NadA 蛋白和 dOMV。

[0638] 可以在將  $AlPO_4$  與 fHBP A 或 NadA 蛋白組合的步驟之前或之後添加所述至少一種另外的抗原。

[0639] 可以將所述另外的抗原在單獨的步驟中添加到 fHBP A 或 NadA 蛋白中，或者可以在單個步驟中添加之前組合。在後一種情況下，可以將它們作為抗原的亞組合添加。

[0640] 可以在將  $AlPO_4$  與 fHBP A 或 NadA 蛋白組合之前或之後進行添加另外的抗原的一個或多個步驟。

[0641] 在一些實施例中，步驟 b) 可以包括將  $AlPO_4$  佐劑與 fHBP A、fHBP B、NadA 蛋白和 dOMV 的組合進行組合，所述組合以任何順序進行。

[0642] fHBP A 和 B、NadA 蛋白和 dOMV 可以如上詳述。

[0643] 此外，所述方法可以包括添加與如上詳述的蛋白質載體接合的 MenACWY 多糖的組合的步驟。

[0644] 抗原在本公開文本的組成物中的穩定性可以藉由本領域熟知的方法來評估，包括測量樣品的光散射、光的表觀衰減（吸光度或光密度）、尺寸（例如，藉由尺寸排阻層析）、藉由差示掃描量熱法（DSC）得出的體外或體內生物活性和/或特性。

[0645] 例如，抗原（如 NadA 或 fHBP A）在本公開文本的組成物中的穩定性可以藉由在 45°C（隨著時間的變化，例如 0、7、14 和 28 天）下培育免疫原性組成物測量熱應力下所考慮的抗原的抗原性來測定。

[0646] 在本公開文本的組成物中的抗原相對於參考標準（例如在  $T_0$ （即，配製日期或儲存條件變更日期）處測量的抗原性），在 4°C 至 8°C 的溫度範圍內可以保持其抗原性的至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、

97%、98%、99%或 100%持續至少 1 個月、2 個月、3 個月、4 個月、5 個月、6 個月、9 個月、12 個月、18 個月、24 個月、30 個月、36 個月、42 個月、48 個月。

**[0647]** 本公開文本的  $\text{AlPO}_4$  佐劑與 fHBP A 和 B 的組合在適於獲得 fHBP A 和 B 在  $\text{AlPO}_4$  上的吸附的條件下進行。

**[0648]** 所吸附的 fHBP A 和 B 的%如上所指示。

**[0649]** 所述 fHBP A 和 B 可以各自以所述組成物中存在的 fHBP B 總量的小於 85% 的量或以所述組成物中分別存在的 fHBP A 或 fHBP B 總量的範圍為約 50% 至約 85% 的量吸附到  $\text{AlPO}_4$  上。

**[0650]** 確保 fHBP A 和 B 在  $\text{AlPO}_4$  上吸附的合適條件包括 pH、溫度和  $\text{AlPO}_4$  的 PZC。這些條件可以如上所指示。

**[0651]** 例如，pH 的範圍可以是 5.5 到 7.0。

**[0652]** 溫度的範圍可以是  $4^\circ\text{C}$  至  $25^\circ\text{C}$ 。

**[0653]** 可以將本公開文本的組成物在約  $4^\circ\text{C}$  至約  $25^\circ\text{C}$  的溫度範圍內儲存。例如，可以將本公開文本的組成物在約  $4^\circ\text{C}$  或在約  $8^\circ\text{C}$  或在約  $4^\circ\text{C}$  的溫度下儲存。

**[0654]** 本公開文本涉及一種用於製備免疫原性組成物的方法，所述免疫原性組成物包含至少一種腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原並且沉降開始時間 ( $T_{\text{開始}}$ ) 範圍為約 3.5 min 至約 10 min，所述方法至少包括以下步驟：

**[0655]** a) 選擇 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑，以及

**[0656]** b) 將在步驟 a) 中選擇的所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑與所述至少一種腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原組合，以及

**[0657]** c) 獲得所述免疫原性組成物。

**[0658]** 所述至少一種抗原可以是 fHBP A、fHBP B、NadA 蛋白或 dOMV 及其組合。

[0659] 沉降開始時間 ( $T_{\text{開始}}$ ) 的範圍可以是約 4 min 至約 9 min、或約 4.5 min 至約 8.5 min。

[0660] 有利地，至少或大於 3.5 min 的沉降開始時間確保所述組成物的組分在製造過程期間保持懸浮，並且因此允許更持續的製造。

[0661] 可以將另外的抗原（如與蛋白質載體接合的 MenACWY 多糖）與如本文公開的組成物混合。就在向患者投予前，可以任選地藉由在投予之前將本公開文本的組成物與至少另外的抗原混合的雙室注射器將所述另外的抗原添加至本公開文本的免疫原性組成物中。

[0662] 本公開文本的製造方法可以用於製造疫苗。

## 用途和方法

[0663] 本公開文本涉及一種用作藥物、特別是用作疫苗的如本文公開的免疫原性組成物。

[0664] 本公開文本的免疫原性組成物或包含本公開文本的免疫原性組成物的疫苗可以用於預防腦膜炎球菌感染的方法中。腦膜炎球菌感染可能是由腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株引起的。

[0665] 本公開文本的免疫原性組成物或疫苗可以用於誘導針對腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法中。

[0666] 本公開文本的免疫原性組成物或疫苗可用於保護個體免受腦膜炎球菌感染的方法中，所述方法至少包括向所述個體投予所述免疫原性組成物的步驟。

[0667] 本公開文本涉及一種用於保護個體免受腦膜炎球菌感染的方法，所述方法至少包括向所述個體投予所述免疫原性組成物或包含所述免疫原性組成物的疫苗的步驟。

[0668] 本公開文本的免疫原性組成物或疫苗可用於降低由個體中腦膜炎球菌感染引起的侵襲性腦膜炎球菌病的發生風險的方法中，所述方法至少包括向所述個體投予所述免疫原性組成物或所述疫苗的步驟。

[0669] 本公開文本涉及一種用於降低由個體中腦膜炎球菌感染引起的侵襲性腦膜炎球菌病的發生風險的方法，所述方法至少包括向所述個體投予本公開文本的免疫原性組成物或疫苗的步驟。

[0670] 本公開文本的免疫原性組成物或疫苗可用於在個體中引發針對腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法中，所述方法至少包括向所述個體投予所述免疫原性組成物或所述疫苗的步驟。

[0671] 本公開文本涉及一種用於在個體中引發針對腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法，所述方法至少包括向所述個體投予本公開文本的免疫原性組成物或疫苗的步驟。

[0672] 腦膜炎球菌感染可以是腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 感染。免疫原性組成物可以是疫苗。

[0673] 本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的組成物誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原異源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的用途。

[0674] 本公開文本涉及一種在包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的免疫原性組成物中 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑，所述  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於在增強由所述組成物誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原異源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法中。

[0675] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的組成物誘導的針對表

現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原同源的 fHBP B 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的用途。

[0676] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑用於增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 抗原的組成物誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 抗原異源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的用途。

[0677] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑用於增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP A 抗原的組成物誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP A 抗原同源的 fHBP A 的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的用途。

[0678] 根據本公開文本的另一個目的，本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑用於穩定免疫原性組成物中的至少一種 fHBP A 的用途。

[0679] 本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑用於穩定免疫原性組成物中的至少一種奈瑟氏菌黏附素 A (NadA) 抗原的用途。

[0680] 本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的 AlPO<sub>4</sub> 佐劑用於將包含至少一種腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組成物的沉降開始時間 ( $T_{\text{開始}}$ ) 穩定在約 3.5 min 至約 10 min 的範圍內、或在約 4 min 至約 9 min 的範圍內、或在約 4.5 min 至約 8.5 min 的範圍內的用途。

[0681] 所述至少一種腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原可以來自包含 fHBP A、fHBP B、NadA 蛋白、dOMV 及其組合的群組。

[0682] 所述至少一種腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原可以是 fHBP A 和 fHBP B 的組合。

**[0683]** 本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於充當包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物的佐劑的用途，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B。

**[0684]** 本公開文本涉及一種 PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑用於製造包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原的組合的免疫原性組成物的用途，所述組合包含至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) A 和至少一種 H 因子結合蛋白 (fHBP) B。

**[0685]** 本公開文本涉及一種在有需要的個體中誘導針對腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法，所述方法至少包括向所述個體投予根據本公開文本的免疫原性組成物的步驟，其中所述投予步驟誘導針對所述腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應。

**[0686]** 本公開文本涉及一種在有需要的個體中增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌 fHBP B 抗原的組成物所誘導的針對表現與所述組成物的所述 fHBP B 抗原異源的 fHBP 抗原的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的免疫反應的方法，所述方法至少包括向所述個體投予根據本公開文本的免疫原性組成物的步驟，其中所述投予步驟誘導針對所述異源腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株的增強的免疫反應。

**[0687]** 與本公開文本的方法和用途相關的個體可以是哺乳動物，例如人，並且例如是嬰兒、幼兒、兒童、青少年、年輕人、成年人和老年人。在一個實施例中，個體可以是從 6 周或更大、2 個月或更大、或 10 歲或更大。作為示例性實施例，個體可以是 6 周至 55 歲或更大，例如 2 個月至 55 歲或更大，或例如 10 歲至 55 歲或更大。

**[0688]** 所述方法總體上涉及向有需要的個體投予有效量的主題免疫原性組成物。用於治療用途的有效量將取決於例如抗原組成物、投予方式、患者的體重和一般健康狀況、以及處方醫師的判斷。根據患者所需和耐受的劑量和頻率以及投予途徑，可以投予單劑量或多劑量的抗原組成物。

**[0689]** 可以將如本文公開的免疫原性組成物以 2、3、2+1 或 3+1 劑方案投予。

**[0690]** 在一個實施例中，可以將如本文公開的免疫原性組成物以 2 劑或 3 劑投予。可以將後續劑與前一劑相隔約一個月、約兩個月、約三個月、約四個月、約五個月、約六個月、約七個月、約八個月、約九個月、約十個月、約十一個月、約十二個月、約十三個月、約十四個月、約十五個月、約十六個月、約十七個月、約十八個月、約十九個月或約二十個月投予。在一個實施例中，可以將後續劑與前一劑相隔約一個月、約兩個月、約五個月、約六個月、約八個月、約十個月、約十二個月、約十四個月或約十六個月投予。在一個實施例中，可以將後續劑與前一劑相隔約一個月、約兩個月、約五個月、約六個月或約八個月投予。在一個實施例中，可以將後續劑與前一劑相隔約 30 天、約 60 天或約 180 天投予。

**[0691]** 在兩劑方案中，可以將第二劑在第一劑後約一個月、或在第一劑後約 2 個月或在第一劑後 6 個月投予。可替代地，在兩劑方案中，可以將第二劑在第一劑後約 30 天、或在第一劑後約 60 天或在第一劑後約 180 天投予。這種兩劑方案可適用於成人和/或青少年。

**[0692]** 在兩劑方案中，可以將第二劑在第一劑後約 2 個月投予。可替代地，在兩劑方案中，可以將第二劑在第一劑後約 60 天投予。這種兩劑方案可適用於幼兒。

**[0693]** 在三劑方案中，可以將第二劑在第一劑後約一個月投予，並且可以將第三劑在第一劑後約 6 個月投予。可替代地，在三劑方案中，可以將第二劑在第一劑後約 30 天投予，並且可以將第三劑在第一劑後約 180 天投予。這種三劑方案可適用於成人和/或青少年。

**[0694]** 在三劑方案中，可以將第二劑在第一劑後約兩個月投予，並且可以將第三劑在第一劑後約 10 個月投予。可替代地，在三劑方案中，可以將第二劑在



一劑後約 60 天投予，並且可以將第三劑在約 12 月齡時投予。這種三劑方案可適用於嬰兒。

**[0695]** 在一個實施例中，除了 2 劑或 3 劑之外，可以投予第三劑或第四劑。該後續劑可以在 2 劑或 3 劑的最後一劑之後至少一年投予，例如在最後一劑之後 16 個月投予。在這種方案中，前兩劑或前三劑可定性為初始劑，並且隨後的一劑 (+1) 可定性為加強劑。

**[0696]** 在一個實施例中，例如從 6 周或 2 月齡至 2 歲的嬰兒和幼兒可以接受 2+1 或 3+1 劑方案。在另一個實施例中，例如從 2 歲至 10 歲的兒童可以接受 2 劑方案。在另一個實施例中，例如從 10 歲至 55 歲的青少年和成人可以接受 2+1 劑方案。

**[0697]** 可以藉由任何合適的途徑投予如本文公開的免疫原性組成物。例如，可以考慮藉由肌內途徑投予。

## 實例

**[0698]** 下面的實例說明了目前最熟知的本公開文本的實施例。然而，應當理解，以下僅是本公開文本的原理的應用的示例或說明。本領域具有通常知識者可以在不脫離本公開文本的精神和範圍的情況下設計多種修改和替代組成物、方法和系統。

### 實例 1：材料&方法

#### *具有低零電荷點的 $AlPO_4$ (改性 $AlPO_4$ 佐劑) 的調配*

**[0699]** 用磷酸鹽緩衝液/鹽溶液滴定 PZC 範圍在 5 至 7 之間的磷酸鋁佐劑凝膠，所述磷酸鹽緩衝液/鹽溶液允許所述緩衝液或鹽溶液上的磷酸基團與磷酸鋁佐劑

表面上的羥基交換。可以藉由使用任何正磷酸鹽或磷酸供體鹽或緩衝溶液來降低  $\text{AlPO}_4$  的 PZC。

[0700] 可以使用不同的方法來獲得具有目標 PZC 的  $\text{AlPO}_4$ 。

[0701] 在一種方法中，添加由 0.5 M 磷酸二氫鈉和 0.5 M 磷酸氫二鈉的組合配製的磷酸鹽緩衝液 pH 5.8 以製備具有不同 PZC 的  $\text{AlPO}_4$ 。

[0702] 在第二種方法中，藉由用 0.5 M 磷酸二氫鈉鹽的儲備溶液滴定  $\text{AlPO}_4$  來改變  $\text{AlPO}_4$  的 PZC。

[0703] PZC 低於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑是改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑，並且在下文實例部分稱為「改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑」。為了製備 100 mL 的改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑（改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑）、將 80 mL 的  $\text{AlPO}_4$ （濃度為 4.8 mg Al/mL）與 20 mL 的 0.5 M 磷酸鈉緩衝液 pH 5.8 在室溫下組合並攪拌不少於 30 分鐘。將改性  $\text{AlPO}_4$ （改性的  $\text{AlPO}_4$  或改性  $\text{AlPO}_4$ ）在 2°C-8°C 下儲存直至使用。

[0704] PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑是非改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑，並且在下文實例部分稱為「 $\text{AlPO}_4$  佐劑」。

[0705] 在以下研究中，將改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑如上所述進行修飾以將 PZC 設定為約 4.5，而將  $\text{AlPO}_4$  佐劑設定為 PZC 是約 5.2。

### ***MenB 免疫原性組成物 (MenB) 的製備***

#### ***非脂化突變 fHBP A05 (A05tmN)***

[0706] 為了製備非脂化 A05tmN，將三個點突變（關於 SEQ ID NO: 6 的 G220S、L130R 和 G133D 編號）引入野生型 fHBP A05 序列中。此外，在 N 端的可脂化半胱胺酸殘基被甲硫胺酸殘基替代（非脂化 A05tmN：SEQ ID NO: 8）。合成編碼 A05tmN 抗原的 DNA 序列，並且然後將其選殖到質體構築體中。簡言之，在 A05tmN 序列的兩端添加了 Xba1 和 Xho 1 位點的 DNA 序列。為了產生表現質

體，消化含有 Xba I/Xho I 的 pET28a(+)質體。將編碼 A05tmN 及 Xba I 和 Xho I 位點的 DNA 序列連接至 Xba I/Xho I 消化的 pET28a(+)中，並轉化到 Top10 感受態細胞中。藉由 Xba I/Xho I 消化鑒定並且確認陽性選殖。將 A05tmN 質體轉化到大腸桿菌中，並且經過三輪菌落純化後製備細胞庫。

**[0707]** 將用 A05tmN 表現構築體轉化的大腸桿菌菌株在半組合培養基中在 37°C 下在攪拌下擴增 (pH 6.8 - 溶解氧：20%)。藉由添加異丙基  $\beta$ -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷 (IPTG) 誘導抗原的表現。

**[0708]** 將培養物作為未加工的大批量物質收穫，並藉由離心將細菌生物質與培養基分離。將所得細胞沉澱重懸浮於緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.5) 中。藉由勻漿器處理重懸浮的沉澱以產生細胞勻漿。隨後將勻漿離心以收集沉澱部分。將勻漿沉澱物重懸浮於緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.5) 中並進行 pH 衝擊處理 (pH 12, 在室溫下伴混合持續 1 小時)。用 85%的磷酸將 pH 降至 8.5。離心後收集 pH 衝擊物質的上清液部分，然後過濾以獲得經過濾的上清液。

**[0709]** 將上清液調節至 pH 8.5 和 < 5.0 mS/cm 電導率，並載入至捕獲柱 GigaCap Q-650M 上。將洗脫池調節至 0.9 M 硫酸銨 (AmS)，然後用中間層析 Toyopearl Phenyl 600M 進一步純化。在疏水相互作用層析之後，將洗脫的池調節至 pH 8.5 和 < 8.0 mS/cm 電導率，並藉由 Nuvia aPrime 4A 層析進一步純化。隨後為使用 5 kDa 再生纖維素切向流過濾 (TFF) 膜的最終超濾和滲濾，以及 0.2  $\mu$ m 過濾。

### **非脂化突變 fHBP B01 (B01smN)**

**[0710]** 為了製備非脂化 B01smN，將單點突變 (關於 SEQ ID NO: 6 的 H248L 編號) 引入野生型 fHBP B01 序列中。此外，在 N 端的可脂化半胱胺酸殘基被甲硫胺酸 (非脂化 B01smN: SEQ ID NO: 9) 替代。合成 B01smN 的 DNA 序列，並且然後將其選殖到質體構築體中。簡言之，在 B01smN 序列的兩端添加了 XbaI

和 Xho 1 位點的 DNA 序列。為了產生表現質體，消化含有 Xba 1/Xho 1 的 pET28a(+)質體。將編碼 B01smN 及 Xba 1 和 Xho 1 位點的 DNA 序列連接至 Xba 1/Xho 1 消化的 pET28a(+)中，並轉化到 Top10 感受態細胞中。藉由 Xba 1/Xho 1 消化確認陽性選殖。將 B01smN 質體轉化到大腸桿菌中，並且經過三輪菌落純化後製備細胞庫。

**[0711]** 將用 B01smN 表現構築體轉化的大腸桿菌菌株在半組合培養基中在 37°C 下在攪拌下擴增（pH 6.8 - 溶解氧：20%）。藉由添加異丙基  $\beta$ -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷（IPTG）誘導抗原的表現。

**[0712]** 將培養物作為未加工的大批量物質收穫，並藉由離心將細菌生物質與培養基分離。將所得細胞沉澱重懸浮於緩衝液（20 mM Tris-HCl，pH 8.5）中。藉由勻漿器處理重懸浮的沉澱以產生細胞勻漿。隨後將勻漿離心以收集上清液部分。然後過濾上清液部分。

**[0713]** 將經過濾的上清液調節至 pH 8.5 和  $< 5.0$  mS/cm 電導率，並載入至層析 CaptoQ ImpRes 上，並以結合和洗脫模式純化。然後將 CaptoQ ImpRes 洗脫池調節至 1.8 M AmS，以便載入至第二層析苯基 Sepharose HP 上。洗脫後，使用 5 kDa Ultracel TFF 膜將材料濃縮並滲濾到乙酸鹽緩衝液（50 mM 乙酸钠，150 mM NaCl，pH 6.0）中，然後進行 0.2- $\mu$ m 過濾。

### ***NadA***

**[0714]** 從 NadA\_MC58 製備 NadA 的截短形式。截短的 NadA 缺乏 NadA\_MC58 的前導序列（殘基 1 至 23）和錨定結構域（殘基 308 至 362）（截短 NadA：SEQ ID NO: 5）。在 NadA\_MC58 的截短序列中，前導序列之後的第一個胺基酸是丙胺酸，它被甲硫胺酸替代。合成編碼截短的 NadA 的 DNA 序列，並且然後將其選殖到質體構築體中。在 NadA 序列的兩端添加了 Xba 1 和 Xho 1 位點的 DNA

序列。為了產生表現質體，消化含有 Xba 1/Xho 1 的 pET28a(+)質體。將編碼 NadA 及 Xba 1 和 Xho 1 位點的 DNA 序列連接至 Xba 1/Xho 1 消化的 pET28a(+)中，並轉化到 Top10 感受態細胞中。藉由 Xba 1/Xho 1 消化確認陽性選殖。將 NadA 質體轉化到大腸桿菌中，並且經過三輪菌落純化後製備細胞庫。

**[0715]** 將用 NadA1 轉化的大腸桿菌菌株在半組合培養基中在 37°C 下在攪拌下擴增(pH 6.8 - 溶解氧:20%)。藉由添加異丙基  $\beta$ -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(IPTG) 誘導抗原的表現。

**[0716]** 將培養物作為未加工的大批量物質收穫，並藉由離心將細菌生物質與培養基分離。將所得細胞沉澱重懸浮於緩衝液(20 mM Tris-HCl, pH 8.5)中。藉由勻漿器處理重懸浮的沉澱以產生細胞勻漿。隨後將勻漿離心以收集上清液部分。然後過濾上清液部分。

**[0717]** 將上清液部分載入至 Capto DEAE 柱上。將 Capto DEAE 洗脫級分用粉末狀 AmS 調節，直到達到 500 mM AmS 的濃度。將經調節的 Capto DEAE 洗脫級分載入至 Toyopearl Butyl-650M 柱上。將 Toyopearl Butyl-650M 洗脫級分載入至 CHT Type I 40  $\mu$ m 柱上，並使用 30 kDa 再生纖維素 TFF 膜濃縮 CHT 洗脫級分，隨後滲濾到 50 mM 乙酸钠、150 mM NaCl (pH 6.0) 中。在 TFF 之後，將產物經 0.2- $\mu$ m 過濾以產生 NadA 抗原。

### ***dOMV***

**[0718]** dOMV 是從野生型腦膜炎奈瑟氏菌(*Nm*)血清型 B 菌株 99M 中純化的，所述菌株由沃爾特·裡德陸軍研究所(Walter Reed Army Institute of Research, WRAIR)提供。

[0719] 將 *Nm B 99M* 在 Fu 等人 (*Biotechnology (N Y)*. 1995 年 2 月;13(2):170-4) 和 US 5,494,808 中所述的化學成分確定的培養基中在 1 g/L 的酵母提取物和 Hepes 1 M 的存在下，在 37°C、CO<sub>2</sub> 5% 下培養。

[0720] 使用經熱處理的懸浮液的低速離心(55°C 持續 2 小時)進行培養物收穫，以回收濕細菌沉澱。用由去污劑(去氧膽酸鈉)構成的提取緩衝液進行兩個連續的去污劑介導的提取步驟(56°C 持續 15 分鐘)，以從細菌外膜提取 dOMV 並耗盡脂寡糖(如 Helting 等人, *Acta Pathol Microbiol Scand C*. 1981 年 4 月;89(2):69-78 揭露)。去氧膽酸鈉和 EDTA 溶解細菌外膜，然後它們自身重組為 dOMV(囊泡和微粒)。藉由使用 Ultra-Turrax(轉子-定子設備)將懸浮於提取緩衝液中的顆粒均質化來完成重懸浮。將 dOMV 上清液彙集，之後在 MgCl<sub>2</sub> 的存在下用全能核酸酶處理(37°C 持續 15 分鐘)。

[0721] 在 dOMV 提取之後，使用中空纖維在 300 kDa 的改性聚醚砜(mPES)中濃縮 dOMV。幾個超速離心步驟用於將 dOMV 從「可溶性」內容物(如核酸、胞質蛋白、提取的脂多糖或緩衝液組分)中分離出來。然後使用 Ultra-Turrax(轉子-定子設備)以最低速度持續幾秒將所得沉澱重懸浮在提取緩衝液中。初次重懸浮後，使用高壓均質化將 dOMV 完全重懸浮在提取緩衝液中，並增加去污劑對 dOMV 表面的可及性。

[0722] 然後進行離心，之後用 0.45/0.2- $\mu$ m 乙酸纖維素過濾器對上清液進行最終過濾。將 dOMV 收穫於注射用水(WFI)中。

### ***MenB 免疫原性組成物***

[0723] MenB 免疫原性組成物中的 MenB 抗原是純化的非脂化突變 A05 fHBP (A05tmN)、非脂化突變 fHBP (B01smN)、NadA 和 dOMV。將 A05tmN、

B01smN、NadA 和 dOMV 抗原與磷酸鋁佐劑 (AlPO<sub>4</sub>) (PZC 5.2) 或與改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑 (PZC 4.5) 組合。

[0724] 媒劑由乙酸鹽緩衝液 (50 mM 乙酸钠, 150 mM NaCl, pH 6.0) 組成。

[0725] 所述 AlPO<sub>4</sub> 佐劑是如上所指示製備的非改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑 (PZC 5.2; 1.00 mg Al/mL) 或改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑 (PZC 4.5; 1.00 mg Al/mL)。

[0726] 為了配製免疫原性組成物調配物, 將非改性 (PZC 5.2) 或改性 AlPO<sub>4</sub> (PZC 4.5) 佐劑、B01smN、A05tmN、NadA 蛋白、dOMV 和乙酸鹽緩衝液 (50 mM 乙酸钠, 150 mM NaCl, pH 6.0) 共混在一起以達到目標抗原和鋁濃度 (B01smN 為 100 µg/mL, A05tmN 為 100 µg/mL, NadA 為 100 µg/mL, dOMV 為 250 µg/mL, 並且 AlPO<sub>4</sub> 為 1.00 mg Al/mL)。

[0727] 為了穩定性資料和 PZC 比較 (4.5 和 4.8), 保留了 0.8 mg Al/mL AlPO<sub>4</sub> 的最終鋁濃度。藉由使用 RP-HPLC (用於 MenB 抗原) 和 HPAEC-PAD (用於 ACYW 接合物) 測定抗原的未吸附量來測量吸附的抗原。

[0728] 最終組成物中殘留磷酸鹽緩衝液的估計量為約 24 mM。

### ***MenACWY 和 MenPenta 免疫原性組成物的製備***

#### ***MenACWY 免疫原性組成物的製備***

[0729] MenACWY 免疫原性組成物獲自 MENQUADFI<sup>®</sup>。MENQUADFI<sup>®</sup> 是一種可商購的疫苗, 其包含如 WO 2018/045286 A1 中公開發的獲得並與破傷風類毒素 (TT) 接合的 ACWY 多糖抗原。該調配物包含來自血清群 A、C、Y 和 W135 的腦膜炎奈瑟氏菌莢膜多糖, 它們單獨與破傷風類毒素蛋白接合。目標活性成分濃度為每 0.5 mL 劑量 10 µg 每種多糖和大約 55 µg 破傷風類毒素蛋白。將抗原配製於含有 30 mM 乙酸钠緩衝液 (1.23 mg/劑量) 和氯化鈉 (0.67%, 3.35 mg/劑量) 的無菌水性溶液中。

### ***MenPenta 免疫原性組成物 (MenPenta) 的製備***

**[0730]** 藉由將如上所指示製備的靶向腦膜炎奈瑟氏菌 B 菌株的來自亞家族 A 和 B 的兩種非脂化 H 因子結合蛋白 (fHBP)、奈瑟氏菌黏附素 A (NadA) 和去污劑提取的外膜蛋白囊泡 (dOMV) 以及如上所指示獲得的與作為載體的破傷風類毒素接合的血清群多糖 A、C、Y 和 W135 與 (i) 磷酸鋁佐劑 (AlPO<sub>4</sub>) (PZC 5.2) 或 (ii) 改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑 (PZC 4.5) 組合來製備 MenPenta 調配物。

**[0731]** 藉由在環境溫度下攪拌不少於 30 分鐘將製劑混合，並且在 2°C 至 8°C 下儲存直至使用。

### ***沉降開始時間***

**[0732]** 使用 TURBISCAN LAB™ 進行沉降研究，其中將 1.5 mL 體積的待測定的組成物填充到 4-mL 玻璃管中，並且裝入與小瓶尺寸匹配的適配器中。每 25 至 30 秒監測具有 PZC 為 5.2 或 4.5 的 AlPO<sub>4</sub> 的 MenB 或 MenPenta 組成物的樣品(如上所指示獲得) 的透射和後向散射長達 30 分鐘。測量了透射和後向散射。藉由從測量細胞的底部到頂部掃描進行測量。用於測量的溫度設定為 28°C。

### ***免疫原性組成物的致熱原性 (IL-6 EC<sub>50</sub> 的測量)***

**[0733]** 使用單核細胞啟動試驗 (MAT) 測定所測試的免疫原性組成物 (如上所指示製備的具有 AlPO<sub>4</sub> PZC 5.2 或改性 AlPO<sub>4</sub> PZC 4.5 的 MenB) 的致熱原性。

**[0734]** MAT 基於人單核細胞響應於檢測到的測試樣品中含有的外源性熱原分泌內源性熱原 (促炎性細胞因子) 的能力。單核細胞啟動試驗 (MAT) 藉由預測人對在人發熱期間產生的相同內源性細胞因子上熱原的反應而起作用。對於





品稀釋度（約 0.95X）的樣品中 0.1% w/v Zwittergent 3-14 的最終濃度。然後將樣品在微管加熱器中在 300 rpm 振盪下在 60°C 下加熱 1 小時。為了製備總樣品，藉由用 5% w/v 檸檬酸鹽、鋁螯合劑和 0.1% Zwittergent 3-14 處理整個吸附的樣品（總）來實現抗原的解吸。將所有樣品和標準品在 300 rpm 振盪下在 60°C 下加熱 1 小時，並且在 3000 rcf 下在 22°C 下離心 5 min，然後在 10°C 下在 HPLC 自動進樣器中儲存，然後進行 HPLC 分析。

**[0743]** 藉由將 A05tmN、B01smN 和 NadA 的抗原參考標準品在 150 mM 乙酸钠加 50 mM 氯化鈉 pH 6.3 緩衝液以及 0.1% Zwittergent 3-14 中稀釋至適當的濃度而在測試當天新鮮製備參考標準工作溶液。使用 NadA 作為異源參考標準品對 dOMV 蛋白組分進行定量。

**[0744]** 使用來自 Waters 的 BioResolve RP mAb Polyphenyl Column，450Å，2.7 μm，2.1 mm × 150 mm 實現所有抗原的最佳分離。液相層析質譜（LC-MS）級的在水中的 0.1% TFA 和在 ACN 中的 0.1% TFA 分別用作水性和有機流動相。在 70°C 的柱溫下，層析梯度從 10%有機相開始到最終的 80%有機相。使用的檢測波長為 215 nm。藉由以下方式確定蛋白質濃度：根據適當的校準曲線插值得出以奈克（ng）計的每種抗原的量，然後將其除以注射體積（以 μL 計）得出 ng/μL 或 μg/mL。

**[0745]** 藉由高效陰離子交換層析/脈衝安培檢測（HPAEC-PAD）測定破傷風類毒素蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌莢膜多糖血清群 A、C、Y 和 W135 的濃度。

**[0746]** 藉由樣品製備、酸水解以產生單糖、以及使用藉由 HPAEC-PAD 進行的層析法進行的單獨單糖分析來評價藥物產物疫苗內多糖含量和對  $AlPO_4$  的吸附 % 的定量。

**[0747]** 藉由將藥物產物樣品的等分試樣在室溫下以 14000 rpm 離心 30 min 來製備解吸樣品。將上清液除去並且使用乙酸钠/氯化鈉緩衝液在標準曲線範圍內稀

釋。還使用乙酸鈉/氯化鈉緩衝液將藥物產物樣品（吸附的）的等分試樣稀釋到標準曲線範圍內。在樣品集中制備了稀釋和吸附的藥物產物、上清液和多糖的參考標準品。

[0748] 水解和層析條件改編自 Gudlavalleti 等人 (*Anal Chem.* 2014 年 6 月 3 日;86(11):5383-90. doi: 10.1021/ac5003933. Epub 2014 年 5 月 20 日. PMID: 24810004.) 中描述的水解和層析條件。

[0749] 使用線性回歸從基於四價多糖的參考標準品計算每個血清群 A、C、W、Y 的校準曲線。從各自的曲線中插值得出 A、C、W、Y 的吸附和解吸（上清液）樣品的多糖濃度。吸附%計算為解吸/藥物產物樣品 x 100。

### 對用改性 $AlPO_4$ 佐劑 (PZC 4.5) 或用 $AlPO_4$ 佐劑 (PZC 5.2) 配製的 MenB 免疫原性組成物的免疫原性的評價

#### 測試產物

表 1：測試產物

調配物	濃度
不具有 $AlPO_4$ 的 MenB-A 組	100 $\mu$ g/mL 的 fHBP A05 tmN
	100 $\mu$ g/mL 的 fHBP B01smN
	100 $\mu$ g/mL 的 NadA
	250 $\mu$ g/mL 的 dOMV
MenB + $AlPO_4$ 佐劑 (PZC 5.2) -B 組	100 $\mu$ g/mL 的 fHBP A05 tmN
	100 $\mu$ g/mL 的 fHBP B01smN
	100 $\mu$ g/mL 的 NadA
	250 $\mu$ g/mL 的 dOMV
	0.8 mg/ml 的 $AlPO_4$ 佐劑
MenB + 改性 $AlPO_4$ 佐劑 (PZC 4.5) -C 組	100 $\mu$ g/mL 的 fHBP A05 tmN
	100 $\mu$ g/mL 的 fHBP B01smN
	100 $\mu$ g/mL 的 NadA
	250 $\mu$ g/mL 的 dOMV

調配物	濃度
	0.8 mg/ml的改性AlPO <sub>4</sub> 佐劑

### 用劑方案

[0750] 使用三個組（A、B和C），每組八隻兔子（雌性；菌株：NZW KBL；在D0時9-10周大）。A組接受不具有AlPO<sub>4</sub>的MenB免疫原性組成物，而B組和C組分別接受用400 µg的AlPO<sub>4</sub>佐劑（PZC 5.2）或改性AlPO<sub>4</sub>佐劑（PZC 4.5）調配的MenB免疫原性組成物。在D0和D28藉由肌內（IM）注射投予這些調配物（第一次注射在右大腿中500 µL，並且第二次注射在左大腿中500 µL）。對於所有組，在D0、D28和D42（最後一次注射後兩周），在局部麻醉下在兔耳正中動脈處收集血液樣品。

表 2：用劑方案

組	抗原 數量/劑量	佐劑	注射途徑/體積	動物/組
A	50 µg 的 fHBP A05 tmN 50 µg 的 fHBP B01smN 50 µg mL的NadA 125 µg的dOMV	無	IM - 500 µL	8
B	50 µg 的 fHBP A05 tmN 50 µg 的 fHBP B01smN 50 µg mL的NadA 125 µg的dOMV	AlPO <sub>4</sub> (PZC 5.2)	IM - 500 µL	8
C	50 µg 的 fHBP A05 tmN 50 µg 的 fHBP B01smN 50 µg mL的NadA 125 µg的dOMV	改性AlPO <sub>4</sub> (PZC 4.5)	IM - 500 µL	8

## **生物採樣和 hSBA**

### *生物採樣*

**[0751]** 在 D0 和 D42，在局部麻醉下從耳朵的正中動脈採集血液樣品。藉由在採集血液樣品前 5 min 在兔耳上塗抹麻醉膏(Elma®)進行局部麻醉。還用 Rompun 和 Imalgene 產品對兔子維持化學麻醉。

**[0752]** 將血液樣品收集在含有促凝劑 (clot activator) 和血清分離劑 (BD Microtainer SST 5 mL, 參考號 15388989) 的管中。將管以 3500 rpm 離心 15 min，以將血清與血球分離。將血清轉移到 Deepwell (ritter) 板中，並且在 56°C 下熱滅活 30 min。將血清在 -20°C 下儲存直至用於 IgG 純化和細菌殺傷測定。

### *hSBA*

#### *用於 hSBA 測試的兔血清 IgG 純化*

**[0753]** 為避免由在 D0 和 D42 收集的兔血清誘導的非特異性殺細菌殺傷，有必要純化 IgG。

**[0754]** 使用 rProtein A GraviTrap™ 柱 (GE healthcare GE28-9852-54) 和 Ab 緩衝液套組 GE Healthcare 參考號 28-9030-59) 進行兔血清的純化。

**[0755]** 首先，用結合緩衝液 (磷酸鈉 20 mM pH = 7) 平衡柱。在用結合緩衝液 (V/V) 將 pH 血清調節至 7 後，將血清添加至柱以進行 IgG 結合。將柱用結合緩衝液洗滌。然後將洗脫緩衝液 (甘胺酸 HCl 0.1 M pH 2.7) 添加至柱以收集 IgG。為了保持 IgG 的活性，將中和緩衝液 (Tris-HCl 1 M, pH 9.0) 添加至洗脫級分以獲得大約 7 的最終 pH。藉由 Nanodrop 進行 IgG 濃度的定量。

### *血清殺細菌活性*

**[0756]** 藉由體外定量抗體依賴性補體介導的對腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 的殺傷來測量來自經免疫兔的單獨純化血清（純化的 IgG）的殺細菌力價（或血清殺細菌活性-SBA）。在人類補體的存在下進行此測定（hSBA）。在補體和一些類別的免疫球蛋白的存在下，在標靶細菌的表面獲得導致標靶細菌死亡的裂解性抗原-抗體複合物。藉由觀察血清中存在的靶候選特異性抗體導致的殺細菌作用，可以確定血清的 SBA 水準。

**[0757]** 殺細菌力價是產生 $\geq 50\%$ 的稀釋度。孔中存在的所得細菌菌落的數量與血清中存在的功能性抗體的水平成反比，血清中存在的功能性抗體的水平與動物或人類受試者的免疫反應成正比。

**[0758]** SBA 測定測量抗體在補體的存在下裂解細菌的能力。血清的殺細菌力價定義為與不含血清的補體對照孔相比，導致至少 50%殺傷時的測試血清的最高稀釋度的倒數。

**[0759]** 孔中存在的所得細菌菌落的數量與血清中存在的功能性抗體的水平成反比，血清中存在的功能性抗體的水平與動物或人類受試者的免疫反應成正比。

**[0760]** 補體的來源是人類補體（Ig 耗盡的人類血清）。簡而言之，將血清在 56°C 下熱滅活 30 min，並且隨後在含有  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  以及 0.2%明膠的 Dulbecco PBS 緩衝液中或含有  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 、0.1%右旋糖和 0.5%牛血清白蛋白的 Dulbecco PBS 緩衝液中，在 96 孔微板中以兩倍連續稀釋（9 次）。

**[0761]** 將在 SBA 測定中評估的所有血清在 56°C 水浴中熱滅活 30 min，以滅活固有補體活性。

**[0762]** 在 37°C 下在 5%  $\text{CO}_2$  中，在 Mueller Hinton 瓊脂（培養皿）上進行細菌預培養 18 h，以獲得匯合的細菌生長。

[0763] 此後，使細菌在腦心浸液 (BHI) 培養基 (補充有用於菌株 n°6 的 4-HPA 5 mM-參見表 3-以誘導 NadA 表現) 中在+ 37°C 下振盪 (100 rpm) 生長 2 小時 30 分。

[0764] 稀釋腦膜炎球菌以獲得  $1.4 \times 10^4$  CFU/mL。將 25  $\mu$ L 工作細菌懸浮液、50  $\mu$ L 預稀釋血清和 25  $\mu$ L 稀釋人類補體(最終濃度 15%)置於 96 孔微板中，並在+ 37°C 下振盪 (100 rpm) 培育 1 小時。Zephyr 機器手應用程式自動地將每孔的 40  $\mu$ L 置於具有 Mueller Hinton 瓊脂的方形板上(40\*40)。將瓊脂板在+ 37°C 與 5% CO<sub>2</sub> 下培育  $12 \pm 4$  小時。

[0765] 培育後，使用來自 Microvision 公司的 Cybele 軟體計算每孔的菌落數。

[0766] 殺細菌力價定義為與補體對照孔相比，導致每 mL 細菌的菌落形成單位 (CFU) 減少至少 50%時的測試血清的稀釋度。使用集成在 Sanofi Universal Exporter (SUE) 中的 Softmax Pro v6.5.1 GXP 並藉由選擇 SBA WARP 模組進行分析。

用於 SBA 評價的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株

表 3：用於 SBA 評價的腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 菌株

菌株n°	fHBP變體	PorA變體	NadA變體
1	B44	1.14	不存在
2	A56	1.14	移碼丟失
3	B24	1.16	不存在
4	A22	1.1	不存在
5	A10	1.2	不存在
6	B79	1.15	NadA1

資料分析

[0767] 對作為固定因子的產物進行方差(ANOVA)分析。

對用改性  $AlPO_4$  佐劑 (PZC 4.5) 調配的 MenACWY 或 MenPenta 免疫原性組成物的免疫原性的評價

測試產物

表 4：測試產物

調配物	濃度
不具有 $AlPO_4$ 的 MenACWY-1 組	20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 A 多糖
	20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 C 多糖
	20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 W 多糖
	20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 Y 多糖
(總破傷風類毒素載體蛋白 110 $\mu\text{g/mL}$ )	
MenACWY + 改性 $AlPO_4$ 佐劑 (PZC 4.5)-2 組	20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 A 多糖
	20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 C 多糖
	20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 W 多糖
	20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 Y 多糖
(總破傷風類毒素載體蛋白 110 $\mu\text{g/mL}$ )	
0.8 mg/ml 的改性 $AlPO_4$ 佐劑	
MenPenta (MenACWY + MenB) + 改性 $AlPO_4$ 佐劑 (PZC 4.5)-3 組	100 $\mu\text{g/mL}$ 的 fHBP A05 tmN
	100 $\mu\text{g/mL}$ 的 fHBP B01 smN
	100 $\mu\text{g/mL}$ 的 NadA
	250 $\mu\text{g/mL}$ 的 dOMV
	20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 A 多糖
20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 C 多糖	
20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 W 多糖	
20 $\mu\text{g/mL}$ 與破傷風類毒素載體蛋白接合的腦膜炎奈瑟氏菌群 Y 多糖	



調配物	濃度
	菌群Y多糖 (總破傷風類毒素載體蛋白110 µg/mL)
	0.8 mg/ml的改性AlPO <sub>4</sub> 佐劑

### 用劑方案

[0768] 使用三個組（1、2和3），每組六隻兔子（雌性；菌株：NZW KBL；在D0時9-10周大）。第1組接受不具有AlPO<sub>4</sub>的MenACWY免疫原性組成物，並且第2組和第3組分別接受不具有或具有MenB免疫原性組成物且具有400 µg改性AlPO<sub>4</sub>（PZC 4.5）佐劑的MenACWY免疫原性組成物。在D0和D28藉由IM注射投予這些調配物（第一次注射在右大腿中500 µL，並且第二次注射在左大腿中500 µL）。在D0、D28和D42（在D42，最後一次注射後兩周，對於所有組），在局部麻醉下在兔耳正中動脈處收集血液樣品。

表5：用劑方案

組	抗原 數量/劑量	佐劑	注射途 徑/體積	動物/組
1	10 µg與破傷風類毒素載體蛋白接 合的腦膜炎奈瑟氏菌群A多糖 10 µg與破傷風類毒素載體蛋白接 合的腦膜炎奈瑟氏菌群C多糖 10 µg與破傷風類毒素載體蛋白接 合的腦膜炎奈瑟氏菌群W多糖 10 µg/mL與破傷風類毒素載體蛋白 接合的腦膜炎奈瑟氏菌群Y多糖 (總破傷風類毒素載體蛋白55 µg/mL)	無	IM - 500 µL	6
2	10 µg與破傷風類毒素載體蛋白接 合的腦膜炎奈瑟氏菌群A多糖 10 µg與破傷風類毒素載體蛋白接	改性AlPO <sub>4</sub> (PZC 4.5)	IM - 500 µL	6

組	抗原 數量/劑量	佐劑	注射途 徑/體積	動物/組
	合的腦膜炎奈瑟氏菌群C多糖 10 µg與破傷風類毒素載體蛋白接 合的腦膜炎奈瑟氏菌群W多糖 10 µg/mL與破傷風類毒素載體蛋白 接合的腦膜炎奈瑟氏菌群Y多糖 (總破傷風類毒素載體蛋白 55 µg/mL)			
3	10 µg與破傷風類毒素載體蛋白接 合的腦膜炎奈瑟氏菌群A多糖 10 µg與破傷風類毒素載體蛋白接 合的腦膜炎奈瑟氏菌群C多糖 10 µg與破傷風類毒素載體蛋白接 合的腦膜炎奈瑟氏菌群W多糖 10 µg/mL與破傷風類毒素載體蛋白 接合的腦膜炎奈瑟氏菌群Y多糖 (總破傷風類毒素載體蛋白 55 µg/mL) 50 µg的fHBP A05 tmN 50 µg的fHBP B01smN 50 µg mL的NadA 125 µg的dOMV	改性AlPO <sub>4</sub> (PZC 4.5)	IM - 500 µL	6

### 生物採樣和hSBA

#### 生物採樣

[0769] 根據上述程式在 D0、D28 和 D42 進行生物採樣，用於評價 MenB 免疫原性組成物的免疫原性。

#### 針對 MenB 抗原的hSBA

[0770] 如以上所述進行針對 MenB 抗原的 hSBA，用於評價 MenB 免疫原性組成物的免疫原性。

*針對 MenACWY 抗原的 hSBA**用於 hSBA 測試的兔血清 IgG 純化*

**[0771]** 為避免由在 D0 和 D42 收集的兔血清誘導的非特異性殺細菌殺傷，有必要純化 IgG。

**[0772]** 使用 rProtein A GraviTrap™ 柱（GE healthcare GE28-9852-54）和 Ab 緩衝液套組 GE Healthcare 參考號 28-9030-59）進行兔血清的純化。

**[0773]** 首先，用結合緩衝液（磷酸鈉 20 mM pH = 7）平衡柱。在用結合緩衝液（V/V）將 pH 血清調節至 7 後，將血清添加至柱以進行 IgG 結合。將柱用結合緩衝液洗滌。然後將洗脫緩衝液（甘胺酸 HCl 0.1 M pH 2.7）添加至柱以收集 IgG。為了保持 IgG 的活性，將中和緩衝液（Tris-HCl 1 M，pH 9.0）添加至洗脫級分以獲得大約 7 的最終 pH。藉由 Nanodrop 進行 IgG 濃度的定量。

*血清殺細菌活性*

**[0774]** 藉由體外定量抗體依賴性補體介導的對腦膜炎奈瑟氏菌血清群 A、C、W135 或 Y 的殺傷來測量來自經免疫兔的單獨純化血清（純化的 IgG）的殺細菌力價。SBA 測定測量抗體在補體的存在下裂解細菌的能力。

**[0775]** 補體的來源是人類補體（Ig 耗盡的人類血清）。簡而言之，將血清在 56°C 下熱滅活 30 min，並且隨後在含有 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>、0.1% 右旋糖和 0.5% 牛血清白蛋白的 Dulbecco PBS 緩衝液（稀釋緩衝液）中，在 96 孔微板中以兩倍連續稀釋（9 次）。

**[0776]** 使細菌的預培養物在 PVX 培養基板（巧克力瓊脂+ PolyViteX）上在 +37°C 下在 5% CO<sub>2</sub> 中生長 15 h（對於血清群 Y）或生長 18 h（對於血清群 A、C 和 W-135），以獲得分離的菌落。將來自隔夜板的細菌塗布到新鮮的 PVX 培養基板上，以在 5% CO<sub>2</sub> 中在 +37°C 下 4 h 後獲得匯合細菌生長的淺菌幕(light veil)。

培育後，將細菌稀釋以獲得  $8.10^3$  CFU/mL。將 50  $\mu$ L 的預稀釋的血清、25  $\mu$ L 的人類補體和 25  $\mu$ L 的細菌工作懸浮液置於 96 孔微板中，並且在 +37°C 下振盪 (100 rpm) 培育 60 min (對於血清群 C、W-135 和 Y) 或 90 min (對於血清群 A)。在適當的培育時間之後，將每孔的 50  $\mu$ L 轉移到平底板中，並且將 100  $\mu$ L 的 TSB 瓊脂添加至所有孔中。將板在 +37°C 與 5% CO<sub>2</sub> 下培育 6 至 8 小時。

[0777] 培育後，使用 Cytation 7 設備和 Gen5 軟體 (Biotek) 計算每孔的菌落數。

[0778] 殺細菌力價定義為與補體對照孔相比，導致每 mL 細菌的菌落形成單位 (CFU) 減少至少 50% 時的測試血清的稀釋度。使用集成在 Sanofi Universal Exporter (SUE) 中的 Softmax Pro v6.5.1 GXP 並藉由選擇 Gen5 WARP 模組進行分析。

### 資料分析

[0779] 以時間、產物和其相互作用作為固定因子進行雙因素方差分析 (ANOVA)。資料按時間配對。

## ***MenB、MenACWY 和 MenPenta (MenB + MenACWY) 免疫原性組成物中抗原穩定性的測量***

### ***MenB 抗原的抗原性的測量***

[0780] 藉由測量在熱應力 (45°C 或 37°C (用於 NadA)) 下培育的 MenPenta 免疫原性組成物中的 MenB 抗原 (A05tm、B01sm、NadA 和 dOMV) 和血清群 A、C、W 和 Y 的游離多糖的抗原性來測量在熱應力下的隨時間變化的抗原穩定性。

[0781] 使用直接酶聯免疫吸附測定 (ELISA) 測定 MenPenta 免疫原性組成物中腦膜炎奈瑟氏菌血清群 B 抗原 (B01smN、A05tmN 和 NadA) 的相對抗原性。

**[0782]** 簡而言之，將 96 孔微量滴定板用根據熱應力方案獲得的免疫原性組成物（NadA 除外-見下文）的樣品包被，並且在碳酸鹽-碳酸氫鹽緩衝液中以優化的起始抗原濃度稀釋。將樣品以 8 點連續稀釋在板上進行連續稀釋，並且在 2°C 至 8°C 下培育隔夜。第二天，將板用洗滌緩衝液（PBS 1X + 0.1% Tween-20）洗滌 3 次，隨後在室溫下用與辣根過氧化物酶（HRP）接合的特異性單株檢測抗體（B01smN：JAR5 mAb，和 A05tmN：JAR13 mAb，兩者均由兒童醫院奧克蘭研究所（CHORI）提供）；dOMV：獲自國家生物標準和控制研究所（NIBSC）的 P1.2 mAb）培育 1 小時。

**[0783]** 在 NadA 的情況下，將 96 孔微量滴定板用內部抗 NadA 特異性單株抗體包被，在碳酸鹽-碳酸氫鹽緩衝液中稀釋，並且在 2°C 至 8°C 下培育隔夜。第二天，將板用洗滌緩衝液（PBS 1X + 0.1% Tween-20）洗滌 3 次，隨後進行 45 分鐘的封閉步驟。封閉後，將根據熱應力方案獲得的免疫原性組成物的樣品在板上以 8 點連續稀釋進行連續稀釋，並且在室溫下培育 2 小時。將板洗滌並且在室溫下和與 HRP 接合的第二內部 NadA 特異性單株檢測抗體一起培育 1 小時。

**[0784]** 在板洗滌步驟之後，使用 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺（TMB）作為基質使板顯色。

**[0785]** 在 15 分鐘（對於 NadA 為 12 分鐘）後用 2N 硫酸（H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>）停止反應，並且使用分光光度計讀板。藉由測量每個孔在 450 nm 的波長（參考波長是 540 nm）下的吸光度來定量顯色。顯色的程度與從 MenPenta 免疫原性組成物樣品中捕獲的抗原的濃度成正比。藉由與參考標準批次比較，使用 SoftMax Pro 軟體計算樣品的相對抗原性（RA）。相對抗原性是此測定的可報告值。

### **血清群 A、C、W-135 和 Y 的游離多糖變化的測量**

[0786] 如上所指示，藉由高效陰離子交換層析/脈衝安培檢測（HPAEC-PAD）測量游離多糖。

### 實例 2：沉降開始時間（ $T_{\text{開始}}$ ）

[0787] 沉降開始時間（ $T_{\text{開始}}$ ）與懸浮液的絮凝特性相關。超過 60 分鐘的  $T_{\text{開始}}$  表明高水準的解絮凝，這可導致調配物的更密的餅狀物和更差的餅狀物重懸浮特性。 $T_{\text{開始}}$  低於 20 分鐘的  $\text{AlPO}_4$  調配物報告絮凝良好，展現出更好的餅狀物形成特性（Muthurania，2015）。

[0788] 發現與用 PZC 高於 5 的  $\text{AlPO}_4$  製備的調配物相比，用 PZC 是 4.5 的改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑配製的 MenB 和 MenPenta 免疫原性組成物在 50 mM 乙酸鈉、150 mM NaCl 和 pH 6.0 中顯示出更好的懸浮特性，具有更長的沉降開始時間。

[0789] 雖然所有調配物的  $T_{\text{開始}}$  低於 20 分鐘，表明為良好的絮凝調配物，但藉由減少  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 導致的增加的  $T_{\text{開始}}$  具有一些包括更好的佐劑和調配物混合和重構在內的優點，這繼而降低填充操作過程的複雜性。較長的  $T_{\text{開始}}$  支援在診所容易處理產物，這使得在混合、吸入注射器和注射之間保持持續較長保持時間的均勻性。

表 6：包含  $\text{AlPO}_4$  佐劑或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑的 MENB 和 MENPENTA 調配物的沉降開始時間

調配物	$T_{\text{開始}}$ (min)
MENPENTA + $\text{AlPO}_4$ 佐劑 (PZC 5.2)	1.5
MENPENTA + 改性 $\text{AlPO}_4$ 佐劑 (PZC 4.5)	4.5
MENB + $\text{AlPO}_4$ 佐劑 (PZC 5.2)	3.0
MENB + 改性 $\text{AlPO}_4$ 佐劑 (PZC 4.5)	8.5

### 實例 3：用改性 $\text{AlPO}_4$ 佐劑相比於 $\text{AlPO}_4$ 佐劑配製的 dOMV 的致熱原性

第 130 頁，共 145 頁(發明說明書)

[0790] 如上公開地製備具有  $\text{AlPO}_4$  PZC 5.2 或具有改性  $\text{AlPO}_4$  PZC 4.5 的 MenB。如上所指示，評價組成物的致熱原性。

[0791] 已知溫度和致熱原性的升高與 dOMV 組分相關。已知鋁佐劑的吸附會降低 dOMV 的致熱原性 (Rosenqvist, 1998)。

[0792] dOMV 吸附幾乎為 100%，與  $\text{AlPO}_4$  的 PZC 無關 (參見實例 7)。與吸附在  $\text{AlPO}_4$  佐劑上的 dOMV 相比，在 PZC 是約 4.5 的改性  $\text{AlPO}_4$  上的 dOMV 吸附顯示出相似的 IL-6  $\text{EC}_{50}$  值，而與使用的 dOMV 劑量 (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的高劑量或 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的低劑量) 無關。這些結果揭示， $\text{AlPO}_4$  佐劑的 PZC 的改變對致熱原性沒有影響。

表 7：dOMV 在兩種不同 dOMV 劑量下被吸附到兩種  $\text{AlPO}_4$  (非改變的和改變的 PZC) 上時的  $\text{EC}_{50}$  值

調配物	$\text{EC}_{50}$ (ng/ml)	
	低劑量	高劑量
dOMV + $\text{AlPO}_4$ 佐劑	13	12
dOMV + 改性 $\text{AlPO}_4$ 佐劑	15	13

#### 實例 4：MenB 免疫原性組成物的血清殺細菌活性

##### 對 fHBP 的 hSBA 反應

[0793] 使用最終濃度為 15% 的人 IgG/IgM 耗盡的補體，在從所有經免疫兔在 D0 和 D42 收集的單獨血清中純化的 IgG 中測量殺細菌活性。

##### 針對密切相關的 fHBP A56 和異源 fHBP A22 菌株的 hSBA

[0794] 如圖 1 和圖 3 所描繪，在不具有  $\text{AlPO}_4$  佐劑的情況下，MenB 免疫原性組成物的 A05 tmN 能夠誘導針對密切相關的變體 fHBP A (A56；圖 1) 菌株的

中度 fHBP 特異性 hSBA 反應（62.5%的反應者且幾何平均力價（GMT）是 9），以及針對異源變體 fHBP A（A22；圖 3）菌株的低 fHBP 特異性 hSBA 反應（25%的反應者且 GMT 是 4）。

[0795] 此外，如圖 1 和圖 3 所示，與對照（不具有佐劑的組成物）相比，MenB 免疫原性組成物中  $\text{AlPO}_4$  佐劑的存在使得由 A05 tmN 誘導的針對密切相關的 A56 菌株的 hSBA 反應增加至 5.1（p 值 = 0.001）倍（GMT 是 46）並且針對異源 A22 菌株的 hSBA 反應增加至 2.8（p 值 = 0.049）倍（GMT 是 12），而改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑使得針對密切相關的 A56 菌株的反應進一步增加至 8.4（p 值 < 0.001）倍（GMT 是 76）並且針對異源 A22 菌株的反應進一步增加至 4.9（p 值 = 0.004）倍（GMT 是 22）。

[0796] 最後， $\text{AlPO}_4$  佐劑誘導針對密切相關的 A56 菌株的 87.5%的反應者%和針對異源菌株 A22 的 62.5%的反應者%，而改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑誘導針對密切相關的 A56 菌株的 100%的反應者%和針對異源菌株 A22 的 87.5%的反應者%。

[0797] 結果匯總在下表 8 中：

[0798] 表 8

參數	密切相關的-fHBP A56			異源-fHBP A22		
	組成物A (對照)	組成物B (+ $\text{AlPO}_4$ )	組成物C (+改性 $\text{AlPO}_4$ )	組成物A (對照)	組成物B (+ $\text{AlPO}_4$ )	組成物C (+改性 $\text{AlPO}_4$ )
GMT	9	46	76	4	12	22
hSBA倍數	-	5.1	8.4	-	2.8	4.9
反應者%	62.5	87.5	100	25	62.5	87.5

[0799] 如圖 1 和圖 3 中所觀察到的，使用包含改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑的調配物，觀察到針對 fHBP A 的更高且更均勻的 hSBA 反應（GMT 和反應者的數量），但在改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑與  $\text{AlPO}_4$  佐劑之間沒有統計學上的差異。



### 針對密切相關的fHBP B44 菌株和異源fHBP B24 菌株的hSBA

[0800] 如圖 2 和圖 4 所描繪，在不具有  $\text{AlPO}_4$  佐劑的情況下，MenB 免疫原性組成物的 B01smN 能夠誘導針對密切相關的變體 fHBP B (B44；圖 2) 菌株的中度 fHBP 特異性 hSBA 反應（75% 的反應者且幾何平均力價 (GMT) 是 10），以及針對異源變體 fHBP B (B24；圖 4) 菌株的低 fHBP 特異性 hSBA 反應（25% 的反應者且 GMT 是 4）。

[0801] 此外，如圖 2 和圖 4 所示，與對照（不具有佐劑的組成物）相比，MenB 免疫原性組成物中  $\text{AlPO}_4$  佐劑的存在使得由 B01 smN 誘導的針對密切相關的 B44 菌株的 hSBA 反應增加至 3.8 (p 值 = 0.011) 倍 (GMT 是 43)，而不誘導針對異源 B24 菌株的反應的增加 (GMT 是 5)。相比之下，改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑使得針對密切相關的 B44 菌株的反應進一步增加至 6.2 (p 值 = 0.001) 倍 (GMT 是 64) 並且針對異源 B24 菌株的反應進一步增加至 3.2 (p 值 = 0.019) 倍 (GMT 是 14)。

[0802]  $\text{AlPO}_4$  佐劑誘導針對密切相關的 B44 菌株的 100% 的反應者% 和針對異源菌株 B24 的 25% 的反應者%，而改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑誘導針對密切相關的 B44 菌株的 100% 的反應者% 和針對異源菌株 B24 的 87.5% 的反應者%。

[0803] 結果匯總在下表 9 中：

[0804] 表 9

參數	密切相關的-fHBP B44			異源-fHBP B24		
	組成物A (對照)	組成物B (+ $\text{AlPO}_4$ )	組成物C (+改性 $\text{AlPO}_4$ )	組成物A (對照)	組成物B (+ $\text{AlPO}_4$ )	組成物C (+改性 $\text{AlPO}_4$ )
GMT	10	43	64	4	5	14
hSBA倍數	-	5.1	6.2	-	0.8	3.2
反應者%	75	100	100	25	25	87.5

[0805] 如圖 2 和圖 4 中所觀察到的，使用包含改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑的調配物，觀察到針對 fHBP B 的更高 hSBA 反應，並且對於變體 B24，與具有  $\text{AlPO}_4$  佐劑相比具有統計學上的差異 ( $p$  值 = 0.043)。

### **對 dOMV 和 NadA 的 hSBA 反應**

#### *針對同源 VR2-P1.2-PorA 菌株的 hSBA (dOMV 反應)*

[0806] 如圖 5 所描繪，在沒有佐劑的情況下，dOMV 能夠誘導針對同源 PorA VR2 P1.2 菌株的高 hSBA 反應 (100% 的反應者且 GMT 是 206)。

[0807]  $\text{AlPO}_4$  佐劑或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑在 MenB 免疫原性組成物中的存在顯著增加了由 dOMV 誘導的針對同源 VR2-P1.2-PorA 菌株的 hSBA 反應，分別為增加至 4.9 ( $p$  值 = 0.007) 倍和 4 ( $p$  值 = 0.015) 倍，GMT 為 875 和 775 以及反應者 % 是 100%。

[0808] 在  $\text{AlPO}_4$  佐劑或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑反應之間沒有觀察到統計學上的差異。

#### *針對同源 NadA 菌株的 hSBA*

[0809] 如圖 6 所描繪，在沒有  $\text{AlPO}_4$  佐劑的情況下，NadA 能夠誘導針對同源 NadA1 菌株的高 hSBA 反應 (100% 的反應者且 GMT 是 107)。

[0810]  $\text{AlPO}_4$  佐劑或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑在 MenB 免疫原性組成物中的存在顯著增加了由 NadA 誘導的針對同源 NadA 菌株的 hSBA 反應，分別為增加至 6.4 ( $p$  值 < 0.001) 倍和 5.7 ( $p$  值 < 0.001) 倍，GMT 為 698 和 652 以及反應者 % 是 100%。

[0811] 在  $\text{AlPO}_4$  佐劑或改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑反應之間沒有觀察到統計學上的差異。

### **結論**

[0812] 本研究的目的是基於 hSBA 反應比較在紐西蘭 (NZ) 白兔中用或不用非改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑 (PZC 5.2) 或用磷酸鹽改性 AlPO<sub>4</sub> (PZC 4.5) 配製的 MenB 免疫原性組成物 (A05tmN + B01smN + NadA + dOMV) 的免疫原性。

[0813] 在不用 AlPO<sub>4</sub> 的情況下配製的 MenB 免疫原性組成物能夠誘導殺細菌活性，反應者%的範圍為 25% 至 100%。與不具有 AlPO<sub>4</sub> 的組相比，當在 AlPO<sub>4</sub> 或改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑的存在下配製時，MenB 免疫原性組成物能夠誘導顯著更高的 hSBA 力價 (所有 p 值 ≤ 0.049)，根據所用菌株增加至 2.8 至 8.4 倍。對於 B24 菌株，在改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑的存在下，觀察到與具有 AlPO<sub>4</sub> 的調配物相比顯著更高的反應 (p 值 = 0.019，增加至 3.2 倍)。總體而言，在改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑的存在下，觀察到由 A05tmN 和 B01smN fHBP 誘導的更高且更均勻的 hSBA 反應。反應者%和幾何平均力價 (GMT) 取決於所用的菌株：

[0814] 與具有 AlPO<sub>4</sub> 佐劑的 MenB 組成物情況下的 25% 至 100% 相比，具有改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑的 MenB 組成物為 87.5% 至 100%。

[0815] 在改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑情況下 GMT 的範圍是 14 至 76，而相比之下在 AlPO<sub>4</sub> 佐劑情況下是 5 至 46。

### **實例 5: 具有或不具有改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑 (PZC 4.5) 的 MenACWY 以及 MenPenta 免疫原性組成物的血清殺細菌活性**

[0816] 如圖 7 至圖 10 所示，在第 1 劑和第 2 劑後，MenACWY 免疫原性組成物在改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑 (PZC 4.5) 上的吸附對針對 ACWY 菌株的 hSBA 沒有負面影響。

[0817] 對於 MenACWY 免疫原性組成物，需要 2 個劑量以在兔子中誘導有效的 hSBA 反應。在 D28 和 D42，觀察到在改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑 (PZC 4.5) 的存在下，MenACWY 免疫原性組成物的 hSBA 增加。

[0818] 如圖 7 所示，在第 1 劑和第 2 劑後，改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑 (PZC 4.5) 在 MenACWY 免疫原性組成物中的存在增加針對 A 菌株的 hSBA。與單獨的 MenACWY 相比，在改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑的存在下，觀察到針對 A 菌株的 hSBA 力價顯著增加 (在 D28  $p < 0.001 \times 21.2$ ；在 D42  $p < 0.001 \times 5.8$ )。此外，觀察到用  $\text{AlPO}_4$  佐劑配製的 MenPenta (MenACWY + MenB) 免疫原性組成物的更顯著的 hSBA 反應 (在 D28  $p < 0.001 \times 15.4$ ；在 D42  $p < 0.001 \times 10.1$ )。

[0819] 與 MenACWY + 改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑相比，未觀察到添加 MenB 抗原 (MenACWY + 改性  $\text{AlPO}_4$  + MenB) 對針對 A 菌株的 hSBA 力價的顯著影響。

[0820] 如圖 8 所示，在第 1 劑和第 2 劑後，改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑 (PZC 4.5) 在 MenACWY 免疫原性組成物中的存在顯著增加針對 C 菌株的 hSBA。與單獨的 MenACWY 相比，在改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑的存在下，觀察到針對 C 菌株的 hSBA 力價顯著增加 (在 D28  $p < 0.001 \times 14.6$ ；在 D42  $p = 0.008 \times 3.6$ )。此外，觀察到用  $\text{AlPO}_4$  佐劑配製的 MenPenta (MenACWY + MenB) 免疫原性組成物的更顯著的 hSBA 反應 (在 D28  $p < 0.001 \times 12.5$ ；在 D42  $p < 0.022 \times 3$ )。

[0821] 與 MenACWY + 改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑相比，未觀察到添加 MenB 抗原 (MenACWY + 改性  $\text{AlPO}_4$  + MenB) 對針對 C 菌株的 hSBA 力價的顯著影響。

[0822] 如圖 9 所示，在第 1 劑和第 2 劑後，改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑 (PZC 4.5) 在 MenACWY 免疫原性組成物中的存在增加針對 W 菌株的 hSBA。與單獨的 MenACWY 相比，在改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑的存在下，觀察到針對 W 菌株的 hSBA 力價顯著增加 (在 D28  $p < 0.001 \times 32.4$ ；在 D42  $p = 0.001 \times 8.1$ )。此外，觀察到用  $\text{AlPO}_4$  佐劑配製的 MenPenta (MenACWY + MenB) 免疫原性組成物的更顯著的 hSBA 反應 (在 D28  $p < 0.001 \times 64.3$ ；在 D42  $p < 0.022 \times 3.1$ )。

[0823] 與 MenACWY + 改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑相比，未觀察到添加 MenB 抗原 (MenACWY + 改性  $\text{AlPO}_4$  + MenB) 對針對 W 菌株的 hSBA 力價的顯著影響。

[0824] 如圖 10 所示，在第 1 劑後，改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑 (PZC 4.5) 在 MenACWY 免疫原性組成物中的存在增加針對 Y 菌株的 hSBA。與單獨的 MenACWY 相比，在改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑的存在下，觀察到針對 Y 菌株的 hSBA 力價顯著增加 (在 D28  $p < 0.001 \times 35.4$ ；在 D42 不顯著)。此外，觀察到用  $\text{AlPO}_4$  佐劑配製的 MenPenta (MenACWY + MenB) 免疫原性組成物的更顯著的 hSBA 反應 (在 D28  $p < 0.001 \times 35$ ；在 D42  $p = 0.01 \times 4.4$ )。

[0825] 與 MenACWY + 改性  $\text{AlPO}_4$  佐劑相比，未觀察到添加 MenB 抗原 (MenACWY + 改性  $\text{AlPO}_4$  + MenB) 對針對 Y 菌株的 hSBA 力價的顯著影響。

### 實例 6：MenB 和 MenPenta 免疫原性組成物中的抗原穩定性

#### *MenB 抗原 (A05tm、B01sm、NadA 和 dOMV)*

[0826] 藉由 ELISA 在 37°C (NadA) 和 45°C (B01smN、A05tmN 和 dOMV) 下在  $\text{AlPO}_4$  或改性  $\text{AlPO}_4$  中評估了 MenB 調配物中單獨抗原的穩定性。結果表明，相比於在  $\text{AlPO}_4$  中配製，在改性  $\text{AlPO}_4$  中配製時，A05tmN 顯著更穩定 ( $p = 0.0003$ )。還發現，相比於  $\text{AlPO}_4$ ，在改性  $\text{AlPO}_4$  中 NadA 顯著更穩定 ( $p = 0.0082$ )。在改性  $\text{AlPO}_4$  中配製的 B01smN 顯示穩定性略有提高，但是在改性  $\text{AlPO}_4$  中與在  $\text{AlPO}_4$  中配製的 B01smN 之間沒有檢測到顯著差異 (圖 11)。在改性  $\text{AlPO}_4$  中與在  $\text{AlPO}_4$  中配製的 dOMV 之間沒有檢測到差異 (結果未示出)。

[0827] 這顯示 MenB 免疫原性組成物在加速溫度條件下隨時間推移具有更好的抗原性/效力，這導致改善的保質期。

#### *MenACWY 或 MenPenta 免疫原性組成物中 A、C、W 和 Y 血清群的游離多糖*

[0828] 如圖 12 所示，在 45°C 的加速熱應力下，與未吸附的血清群 A、C、W 和 Y (不具有佐劑的 MenACWY) 相比，未觀察到  $\text{AlPO}_4$  佐劑 PZC 改變對血清

群 A、C、W-135 和 Y 接合物在 MenACWY 或 MenPenta 組成物中的穩定性（藉由游離多糖含量百分比監測）的影響。

**[0829]** 未吸附的 A、C、W-135 和 Y 接合物在 2°C 至 8°C 下穩定長達 4 年，因此表明 A、C、W-135 和 Y 具有良好的長期穩定性。在 fHBP、NadA 和 dOMV 的存在下，未吸附的 A、C、W-135、Y 與吸附至具有改變的 PZC (4.5) 的 AlPO<sub>4</sub> 的 A、C、W-135、Y 在加速熱應力下的相似降解特徵表明血清群 A、C、W-135 和 Y 在 MenPenta 免疫原性組成物中具有有良好的長期穩定性（圖 12）。

### 實例 7：抗原在 AlPO<sub>4</sub> 上的吸附

**[0830]** 測定在採用具有不同 PZC (5.2，或 4.5 -改性 AlPO<sub>4</sub>) 的 AlPO<sub>4</sub> 和 pH 6 的組成物 MenB 或 MenPenta 中 MenB 抗原在 AlPO<sub>4</sub> 上的吸附。結果呈現於表 8 中。

表 8：吸附在 AlPO<sub>4</sub> (非改變的和改變的 PZC) 上的 MENB 抗原的百分比

調配物	吸附%			
	A05tmN	B01smN	NadA	dOMV (基於 PorB)
<b>MenB PZC 5.2</b>	88	82	99	99
<b>MenB PZC 4.5</b>	74	73	7	99
<b>MenPenta PZC 5.2</b>	88	83	99	99
<b>MenPenta PZC 4.5</b>	71	70	7	92

### 實例 8：

#### 實例 8：MenB 免疫原性組成物中的抗原穩定性

**[0831]** 在 37°C (NadA) 和 45°C (B01smN、A05tmN 和 dOMV) 下，對在 50 mM 乙酸鈉、150 mM NaCl (pH 6.0) 中用 PZC 為 4.3、4.5、4.8 的改性 AlPO<sub>4</sub> 佐劑

以及 PZC 為 5.2 的  $\text{AlPO}_4$  佐劑配製的 MenB 免疫原性組成物 (A05tm、B01sm、NadA 和 dOMV) 中的抗原穩定性進行評估，持續 30 天。根據以下方案藉由夾心 ELISA 測量 MenB 抗原的抗原性來評價穩定性：

**[0832]** 將 96 孔微量滴定板用內部抗 fHBP A05、內部抗 fHBP B01、內部抗 NadA 特異性單株抗體或抗孔蛋白 B 單株抗體 (針對 dOMV，來自 NIBSC) 進行包被，並在 2°C 至 8°C 之間培育隔夜。第二天，將板用洗滌緩衝液洗滌 3 次，隨後進行封閉步驟。封閉後，將根據熱應力方案獲得的樣品在板上以 8 點連續稀釋進行連續稀釋，並且在室溫下培育 2 小時。將板進行洗滌，並在室溫下與接合至 HRP 的檢測單株抗體一起培育 1 小時，所述檢測單株抗體由以下組成：第二內部抗 fHBP A05 單株抗體、第二內部抗 fHBP B01 單株抗體、第二內部抗 NadA 單株抗體或抗孔蛋白 A 單株抗體 (針對 dOMV，來自 NIBSC)。

**[0833]** 在板洗滌步驟之後，使用 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺 (TMB) 作為基質使板顯色。

**[0834]** 在適當的培育時間之後，用 2 N 硫酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 終止反應，並且使用分光光度計讀板。藉由測量每個孔在 450 nm 的波長 (參考波長是 540 nm) 下的吸光度來定量顯色。顯色的程度與從 MenB 免疫原性組成物樣品中捕獲的抗原的濃度成正比。

**[0835]** 使用 SoftMax Pro GxP v6.5.1 軟體分析資料。等效方法是評估參考標準品和陽性對照之間以及參考標準品與每個測試樣品之間的平行度。使用 SMP 軟體中可用的平行線分析 (PLA) 模組以確定陽性對照和每個測試樣品的相對抗原性 (在 SoftMax Pro 中報告為相對效力)。基於相對於參考標準品的任意單位轉換，使用所確定的樣品的相對效力值生成「抗原性單位/mL」(AU/mL) 的可報告值。

**[0836]** 如可從圖 13 中注意到的，觀察到：

**[0837]** - A05tmN 在含有  $PZC \leq 4.8$  的  $AlPO_4$  的調配物中是顯著更穩定的 (ANCOVA :  $p < 0.0001$ ) 。

**[0838]** - NadA 在含有  $PZC \leq 4.5$  的  $AlPO_4$  的調配物中是顯著更穩定的 (ANCOVA :  $p = 0.023$ ) 。

**[0839]** - dOMV 在含有  $PZC \leq 4.5$  的  $AlPO_4$  的調配物中是顯著更穩定的 (ANCOVA :  $p < 0.0169$ ) 。

**[0840]** 在不同的調配物中，對於 B01sm 未觀察到顯著差異。

**[0841]** 總之，結果表明，A05tmN 在配製於  $PZC \leq 4.8$  的  $AlPO_4$  中時是顯著更穩定的。發現 NadA 和 dOMV 在  $PZC \leq 4.5$  的  $AlPO_4$  中是顯著更穩定的。未檢測到在  $PZC$  範圍為 4.3 與 5.2 之間的  $AlPO_4$  中配製的 B01smN 的穩定性的顯著差異。

**[0842]** 綜上，該結果顯示，用  $PZC$  低於 5.0 的改性  $AlPO_4$  佐劑配製的 MenB 免疫原性組成物在加速溫度條件下隨時間推移具有更穩定的抗原性/效力，這導致改善的保質期。



## [參考文獻]

Alving, C. R. (1993). Novel adjuvant strategies for experimental malaria and AIDS vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 690, 265-275. doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb44015.x

Batista RS, Gomes AP, Dutra Gazineo JL, Balbino Miguel PS, Santana LA, Oliveira L, et al. Meningococcal disease, a clinical and epidemiological review. *Asian Pac J Trop Med*. 2017;10(11):1019-29.

Bijlsma MW, Brouwer MC, Spanjaard L, van de Beek D, van der Ende A. A decade of herd protection after introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccination. *Clin Infect Dis*. 2014;59(9):1216-21.

Bruce MG, Rosenstein NE, Capparella JM, Shutt KA, Perkins BA, Collins M. Risk factors for meningococcal disease in college students. *JAMA*. 2001;286(6):688-93.

Campsall PA, Laupland KB, Niven DJ. Severe meningococcal infection: a review of epidemiology, diagnosis, and management. *Crit Care Clin*. 2013;29(3):393-409.

Caron F, du Chatelet IP, Leroy JP, Ruckly C, Blanchard M, Bohic N, et al. From tailor-made to ready-to-wear meningococcal B vaccines: longitudinal study of a clonal meningococcal B outbreak. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(6):455-63.

Christensen H, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter CL. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(12):853-61.

Diminsky, D. M. (1999). Physical, chemical and immunological stability of CHO-derived hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles. *Vaccine*, 18(1-2), 3-17. doi:10.1016/s0264-410x(99)00149-8

Dyett KH, Martin DR. Clonal analysis of the serogroup B meningococci causing New Zealand's epidemic. *Epidemiol Infect.* 2006;134(2):377-83.

Folaranmi T, Rubin L, Martin SW, Patel M, MacNeil JR, Centers for Disease C. Use of Serogroup B Meningococcal Vaccines in Persons Aged  $\geq 10$  Years at Increased Risk for Serogroup B Meningococcal Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64(22):608-12.

Fredriksen JH, Rosenqvist E, Wedege E, Bryn K, Bjune G, Froholm LO, et al. Production, characterization and control of MenB-vaccine "Folkehelse": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. *NIPH Ann.* 1991;14(2):67-79; discussion -80.

Germinario C, Tafuri S, Napoli C, Montagna MT, Balducci MT, Fortunato F, et al. Young-adult carriers of *Neisseria meningitidis* in Puglia (Italy): will the pattern of circulating meningococci change following the introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccines? *Hum Vaccin.* 2010;6(12):1025-7.

Grodet C, Dequin PF, Watt S, Lanotte P, de Gialluly C, Taha MK, et al. Outbreak in France of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.12 belonging to sequence type 1403. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(9):845-8.

Harrison L, Granoff D, Pollard A. Meningococcal capsular group A, C, W, and Y conjugate vaccines. [ed.] Orenstein WA, Offit PA, Edwards KM Plotkin SA. *Vaccines*. 7. Philadelphia (PA): Elsevier; 2018. p. 619-43.

Harrison OB, Claus H, Jiang Y, Bennett JS, Bratcher HB, Jolley KA, et al. Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(4):566-73.

Hem, S. L. (2007). Imject Alum is not aluminum hydroxide adjuvant or aluminum phosphate adjuvant. *Vaccine*, 25(27), 4985-4986. doi:10.1016/j.vaccine.2007.04.078

Hem, S. L. (2007). Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert Rev Vaccines*, 6(5), 685-698. doi:10.1586/14760584.6.5.685

Iyer, S. R. (2004). Mechanism of adsorption of hepatitis B surface antigen by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine*, 22(11-12), 1475-1479. doi:10.1016/j.vaccine.2003.10.023

Jones, L. S. (2005). Effects of adsorption to aluminum salt adjuvants on the structure and stability of model protein antigens. *The Journal of biological chemistry*, 280(14), 13406-13414. doi:10.1074/jbc.M500687200

Kvalsvig AJ, Unsworth DJ. The immunopathogenesis of meningococcal disease. *J Clin Pathol*. 2003;56(6):417-22.

Maa, Y. F. (2003). Stabilization of alum-adjuvanted vaccine dry powder formulations: mechanism and application. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(2), 319-332. doi:10.1002/jps.10294

MacLennan J, Kafatos G, Neal K, Andrews N, Cameron JC, Roberts R, et al. Social behavior and meningococcal carriage in British teenagers. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(6):950-7.

Maiden MC, Ibarz-Pavon AB, Urwin R, Gray SJ, Andrews NJ, Clarke SC, et al. Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. *J Infect Dis*. 2008;197(5):737-43.

Muthurania, K. I. (2015). Investigation of the Sedimentation Behavior of Aluminum Phosphate: Influence of pH, Ionic Strength, and Model Antigens. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(11), 3770-3781. doi:10.1002/jps.24584

Pace D, Pollard AJ. Meningococcal disease: clinical presentation and sequelae. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 2:B3-9.

Rinella, J. V. (1996). Treatment of aluminium hydroxide adjuvant to optimize the adsorption of basic proteins. *Vaccine*, 14(4), 298–300. doi:10.1016/0264-410x(95)00194-6

Rodriguez AP, Dickinson F, Baly A, Martinez R. The epidemiological impact of antimeningococcal B vaccination in Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(4):433-40.

Rosenqvist, E. H. (1998). Effect of aluminium hydroxide and meningococcal serogroup C capsular polysaccharide on the immunogenicity and reactogenicity of a group B *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine. *Developments in biological standardization*, 92, 323-333.

Rouphael NG, Stephens DS. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. *Methods Mol Biol*. 2012;799:1-20.

Seeber, S. J. (1991). Predicting the adsorption of proteins by aluminium-containing adjuvants. *Vaccine*, 9(3), 201-203. doi:10.1016/0264-410x(91)90154-x

Stephens DS, Apicella MA. *Neisseria meningitidis*. [ed.] J.E. Bennett, R. Dolin and M.J. Blaser. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015. p. 2425-45.

Stephens DS. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*. 2009;27 Suppl 2:B71-7.

Trotter CL, Andrews NJ, Kaczmarek EB, Miller E, Ramsay ME. Effectiveness of meningococcal serogroup C conjugate vaccine 4 years after introduction. *Lancet*. 2004;364(9431):365-7.

Vuocolo S, Balmer P, Gruber WC, Jansen KU, Anderson AS, Perez JL, et al. Vaccination strategies for the prevention of meningococcal disease. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(5):1203-15.

Warren, H. S. (1986). Current status of immunological adjuvants. 4, 369-388. doi:10.1146/annurev.iy.04.040186.002101

Zheng, Y. L. (2007). The structural stability of protein antigens adsorbed by aluminium hydroxide in comparison to the antigens in solutions. *Spectroscopy*, 21(5-6), 257-268.

【符號說明】無。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="112235-發明序列
表.xml" softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0"
productionDate="2024-01-10">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>TW</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>112128851</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2023-08-01</FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>S17_TW_SANOFI
PASTEUR_BR95423/DC1/HGJ/mo</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/370, 333</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-08-03</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">法商賽諾菲巴斯德公司</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>SANOFI PASTEUR INC.</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="zh">針對腦膜炎奈瑟氏菌B的含佐劑免疫原性組成物
</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>9</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>261</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..261</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier id="q1">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>fHbp A05</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```

</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..261</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q15">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Neisseria meningitidis</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>腦膜炎奈瑟氏菌</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>CSSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQAQAEKTFK
VGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQITLASGEFQIYKQDHSVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLG
GEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGS
EEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>261</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..261</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q16">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>fHbp A05tmN</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..261</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q17">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>Neisseria meningitidis</INSDQualifier_value>
      <NonEnglishQualifier_value>腦膜炎奈瑟氏菌</NonEnglishQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>CSSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQAQAEKTFK
VGDKDNSLNTGKLNKDKISRFDFVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSDLG
GEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGS
EEKSTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>260</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..260</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q18">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>fHbp B01</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</INSDSeq>

```



```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..260</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q19">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Neisseria meningitidis</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>腦膜炎奈瑟氏菌</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>CSSGGGGSGGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTY
GNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMOVAKRRFRIGDIAGE
HTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQD
EKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>260</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..260</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q20">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>fHbp B01smN</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</INSDSeq>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```

<INSDFeature_location>1..260</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q21">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Neisseria meningitidis</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>腦膜炎奈瑟氏菌</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>CSSGGGGSGGGV TADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLSAQGAEKTY
GNGDSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMKVAKRRFRIGDIAGE
HTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQD
EKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVETANGIHLIGLAAKQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>284</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..284</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q22">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>NadA1 C-terminally truncated</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>NadA1 C-末端截短</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  </INSDFeature>
</SequenceData>

```

```

<INSDFeature_location>1..284</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q23">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Neisseria meningitidis</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>腦膜炎奈瑟氏菌</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MTSDDDVKKAATVAIVAAYNNGQEINGFKAGETIYDIGEDGITQKDATAADVEADDFKGLG
LKKVVTNLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDETTNALNKLGENITTFEETKTNI VKID
EKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAETKQNVDAKVKAAETAAGKAEAAAAGTANTAADKA
EAVAAKVTDIKADIATNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETRQGLAEQAALSGLFQPYNVG</INSDSeq_sequence
>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>255</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..255</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q24">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>fHbp B24</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```

<INSDFeature_location>1..255</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q25">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Neisseria meningitidis</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>腦膜炎奈瑟氏菌</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>CSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQAEKTYGNGDS
LNTGKLNKDKVSRFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFAQTEQIQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFD
KLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEEKGSY
SLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>362</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>REGION</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..362</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier id="q26">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>NadA1</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..362</INSDFeature_location>

```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q27">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>Neisseria meningitidis</INSDQualifier_value>
    <NonEnglishQualifier_value>腦膜炎奈瑟氏菌</NonEnglishQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MKHFPSKVLTTAILATFCSGALAATSDDDVKKAATVAIVAAAYNNGQEINGFKAGETIYDIGE
DGTITQKDATAADVEADDFKGLGLKVVNTLTKTVNENKQNVDAKVKAAESEIEKLTTKLADTDAALADTDAALDETTNA
LNKLGENITTFEETKTNIIVKIDKLEAVADTVDKHAEAFNDIADSLDETNTKADEAVKTANEAKQTAETKQNVDAKVK
AAETAAGKAEAAAGTANTAADKAEVAAKVTDIKADIATNKADIAKNSARIDSLDKNVANLRKETRQGLAEQAALSGLFQ
PYNVGRFNVTAAVGGYKSESAVAIGTGFRFTENFAAKAGVAVGTSSGSSAAYHVGVNVEW</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>261</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..261</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q28">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>non-lipidated fHbp A05tm</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>非脂質化fHbp A05tm</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

<INSDQualifier id="q29">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>Neisseria meningitidis</INSDQualifier_value>
  <NonEnglishQualifier_value>腦膜炎奈瑟氏菌</NonEnglishQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>MSSGSGSGGGGVAADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQAQAEKTFK
VGDKDNSLNTGKLKNDKISRFDVQKIEVDGQTITLASGEFQIYKQDHSAVVALQIEKINNPDKIDSLINQRSFRVSDLG
GEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAQGHGKIEHLKTPEQNVELASAELKADEKSHAVILGDTRYGS
EEKSTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>260</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..260</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q30">
            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>non-lipidated fHbp B01sm</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>非脂質化fHbp B01sm</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q31">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Neisseria meningitidis</INSDQualifier_value>
            <NonEnglishQualifier_value>腦膜炎奈瑟氏菌</NonEnglishQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
</INSDFeature>  
</INSDSeq_feature-table>  
<INSDSeq_sequence>MSSGGGGSGGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSISQNGTLTLAQAQAEKTY  
GNGDSLNTGKLKNDKVSRLFDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQDPEHSEKMKVAKRRFRIGDIAGE  
HTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQD  
EKGSYSLGIFGEKAQEVAGSAEVETANGIHLIGLAAKQ</INSDSeq_sequence>  
</INSDSeq>  
</SequenceData>  
</ST26SequenceListing>
```

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種免疫原性組成物，該免疫原性組成物包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群B抗原的組合和羥基磷酸鋁（ $\text{AlPO}_4$ ）佐劑，該組合包含至少一種H因子結合蛋白（factor H binding protein, fHBP）A和至少一種H因子結合蛋白（fHBP）B，該 $\text{AlPO}_4$ 佐劑被選擇為零電荷點（PZC）低於5。

【請求項2】 如請求項1所述的免疫原性組成物，其中該 $\text{AlPO}_4$ 佐劑被選擇為PZC範圍是約4.1至小於5、或範圍是約4.2至約4.9、或範圍是約4.3至約4.8或PZC是約4.5。

【請求項3】 如請求項1至2中任一項所述的免疫原性組成物，其中該 $\text{AlPO}_4$ 佐劑的PZC與該組成物的pH之間的差的範圍為約0.6至約2.9。

【請求項4】 如請求項1至3中任一項所述的免疫原性組成物，其中該組成物的pH範圍是約5.5至約7.0或pH是約6.0。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項所述的免疫原性組成物，該免疫原性組成物進一步包含至少一種去污劑提取的外膜囊泡（detergent-extracted Outer Membrane Vesicle, dOMV）和/或至少一種奈瑟氏菌黏附素A（NadA）蛋白。

【請求項6】 如請求項1至5中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP以該組成物的fHBP總量的85%或更小的量或以該組成物的fHBP總量的範圍為約50%至小於85%的量吸附到 $\text{AlPO}_4$ 上。

【請求項7】 如請求項1至6中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP B的等電點（pI）的範圍是約5.0至約7.0、或5.2至約6.5、或約5.3至約6或等電點是約5.46。

【請求項8】 如請求項1至7中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP B



是非脂化的。

【請求項9】 如請求項1至8中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP B是突變fHBP B，該突變fHBP B包含降低或抑制該fHBP B與人類H因子（fH）的結合的至少一個突變。

【請求項10】 如請求項1至9中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP B是包含與SEQ ID NO: 3至少約85%的同一性的突變fHBP B。

【請求項11】 如請求項1至10中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP B是基於SEQ ID NO: 6的編號包含選自以下中至少一者的至少一個胺基酸取代的突變fHBP B：a) 在胺基酸38處的麩醯胺酸（Q38）的胺基酸取代；b) 在胺基酸92處的麩胺酸（E92）的胺基酸取代；c) 在胺基酸130處的精胺酸（R130）的胺基酸取代；d) 在胺基酸223處的絲胺酸（S223）的胺基酸取代；和e) 在胺基酸248處的組胺酸（H248）的胺基酸取代，或包含SEQ ID NO: 4或由SEQ ID NO: 4組成，或包含SEQ ID NO: 9或由SEQ ID NO: 9組成。

【請求項12】 如請求項1至11中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP A的等電點（pI）的範圍是約5至約7、或5.2至約6.5、或約5.4至約6或等電點是約5.86。

【請求項13】 如請求項1至12中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP A是非脂化的。

【請求項14】 如請求項1至13中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP A是突變fHBP A，該突變fHBP A包含降低或抑制該fHBP A與該人類H因子（fH）的結合的至少一個突變。

【請求項15】 如請求項1至14中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP

A是包含與SEQ ID NO: 1至少約85%的同一性的突變蛋白。

【請求項16】 如請求項1至15中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP A是基於SEQ ID NO: 6的編號包含選自以下中至少一者的至少一個胺基酸取代的突變fHBP A：a) 在胺基酸115處的天門冬醯胺酸（N115）的胺基酸取代；b) 在胺基酸121處的天門冬胺酸（D121）的胺基酸取代；c) 在胺基酸128處的絲胺酸（S128）的胺基酸取代；d) 在胺基酸129處的苯丙胺酸（F129）的胺基酸取代；e) 在胺基酸130處的白胺酸（L130）的胺基酸取代；f) 在位置131處的纈胺酸（V131）的胺基酸取代；g) 在位置133處的甘胺酸（G133）的胺基酸取代；h) 在位置219處的離胺酸（K219）的胺基酸取代；以及i) 在位置220處的甘胺酸（G220）的胺基酸取代，或包含SEQ ID NO: 2或由SEQ ID NO: 2組成，或包含SEQ ID NO: 8或由SEQ ID NO: 8組成。

【請求項17】 如請求項1至16中任一項所述的免疫原性組成物，其中該fHBP A和/或該fHBP B各自以範圍為約20 µg/劑量至約200 µg/劑量、或約25 µg/劑量至約180 µg/劑量、或約40 µg/劑量至約140 µg/劑量、或約50 µg/劑量至約120 µg/劑量、或約75 µg/劑量至約100 µg/劑量的量，或以約50 µg/劑量、或約100 µg/劑量的量存在。

【請求項18】 如請求項5至17中任一項所述的免疫原性組成物，其中該NadA蛋白是NadA1蛋白，或包含與SEQ ID NO: 5至少約85%的同一性，或包含SEQ ID NO: 5或由SEQ ID NO: 5組成。

【請求項19】 如請求項5至18中任一項所述的免疫原性組成物，其中該NadA蛋白以範圍為約20 µg/劑量至約200 µg/劑量、或約25 µg/劑量至約180 µg/劑量、或約40 µg/劑量至約140 µg/劑量、或約50 µg/劑量至約120 µg/劑量、或約75 µg/

劑量至約100 µg/劑量的量，或以約50 µg/劑量的量存在。

【請求項20】 如請求項5至19中任一項所述的免疫原性組成物，其中該dOMV包含孔蛋白A (PorA) 蛋白。

【請求項21】 如請求項20所述的免疫原性組成物，其中該孔蛋白A (PorA) 蛋白選自PorA VR2亞型或是PorA VR2 P1.2。

【請求項22】 如請求項5至21中任一項所述的免疫原性組成物，其中該dOMV以範圍為約5 µg/劑量至約400 µg/劑量、或約10 µg/劑量至約300 µg/劑量、或約25 µg/劑量至約250 µg/劑量、或約35 µg/劑量至約225 µg/劑量、或約50 µg/劑量至約200 µg/劑量、或約75 µg/劑量至約180 µg/劑量、或約100 µg/劑量至約150 µg/劑量、或約110 µg/劑量至約125 µg/劑量的量，或以約25 µg/劑量、或以約50 µg/劑量、或以約125 µg/劑量的量存在。

【請求項23】 如請求項1至22中任一項所述的免疫原性組成物，其中該組成物還包含緩衝液。

【請求項24】 如請求項23所述的免疫原性組成物，其中該緩衝液選自Tris緩衝液、乙酸鹽緩衝液、檸檬酸鹽緩衝液、磷酸鹽緩衝液、HEPES緩衝液或組胺酸緩衝液。

【請求項25】 如請求項23或24所述的免疫原性組成物，其中該緩衝液是乙酸钠緩衝液。

【請求項26】 如請求項1至25中任一項所述的免疫原性組成物，該免疫原性組成物包含以下或由以下組成：25至100 µg/劑量的由SEQ ID NO: 2組成的非脂化突變fHBP A或由SEQ ID NO: 8組成的非脂化突變fHBP A、25至100 µg/劑量的由SEQ ID NO: 4組成的非脂化突變fHBP B或由SEQ ID NO: 9組成的非脂化突變

fHBP B、25至100  $\mu\text{g}$ /劑量的由SEQ ID NO: 5組成的NadA蛋白、20至250  $\mu\text{g}$ /劑量的來自表現PorA VR2 P1.2的MenB菌株的dOMV、100至800  $\mu\text{g}$ /劑量的被選擇為PZC是約4.5的 $\text{AlPO}_4$ 佐劑、50 mM的乙酸鹽緩衝液和pH 6.0。

【請求項27】 如請求項1至26中任一項所述的免疫原性組成物，該免疫原性組成物進一步包含來自腦膜炎奈瑟氏菌血清群A、C、W135和/或Y中的一種或多種的接合至載體蛋白的至少一種莢膜糖。

【請求項28】 如請求項27所述的免疫原性組成物，其中該接合的莢膜糖接合至破傷風類毒素載體。

【請求項29】 如請求項1至28中任一項所述的免疫原性組成物，該組成物的沉降開始時間（ $T_{\text{開始}}$ ）的範圍是約3.5 min至約10 min。

【請求項30】 如請求項1至29中任一項所述的免疫原性組成物，該免疫原性組成物增強針對表現與該組成物的fHBP B異源的fHBP B的腦膜炎奈瑟氏菌血清群B菌株的免疫反應。

【請求項31】 如請求項6至30中任一項所述的免疫原性組成物，該免疫原性組成物增強fHBP A和NadA蛋白中的至少一者的穩定性。

【請求項32】 一種包含如請求項1至31中任一項所述的免疫原性組成物的疫苗。

【請求項33】 如請求項1至31中任一項所述的免疫原性組成物或如請求項32所述的疫苗，係用於誘導針對腦膜炎奈瑟氏菌B菌株的免疫反應的方法中。

【請求項34】 一種PZC低於5的 $\text{AlPO}_4$ 佐劑用於增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌fHBP B抗原的組成物誘導的針對表現與該組成物的該fHBP B抗原異源的fHBP B抗原的腦膜炎奈瑟氏菌血清群B菌株的免疫反應的用途。

【請求項35】 一種PZC低於5的 $\text{AlPO}_4$ 佐劑用於穩定免疫原性組成物中的fHBP A和NadA蛋白中的至少一者的用途。

【請求項36】 一種PZC低於5的 $\text{AlPO}_4$ 佐劑用於將包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群B抗原的組合的組成物的沉降開始時間 ( $T_{\text{開始}}$ ) 穩定在約3.5 min至約10 min範圍內的用途，該組合包含至少一種H因子結合蛋白 (fHBP) A和至少一種H因子結合蛋白 (fHBP) B。

【請求項37】 一種PZC低於5的 $\text{AlPO}_4$ 佐劑用於充當包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群B抗原的組合的免疫原性組成物的佐劑的用途，該組合包含至少一種H因子結合蛋白 (fHBP) A和至少一種H因子結合蛋白 (fHBP) B。

【請求項38】 一種PZC低於5的 $\text{AlPO}_4$ 佐劑用於製造包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群B抗原的組合的免疫原性組成物的用途，該組合包含至少一種H因子結合蛋白 (fHBP) A和至少一種H因子結合蛋白 (fHBP) B。

【請求項39】 如請求項34至38中任一項所述的用途，其中該 $\text{AlPO}_4$ 佐劑係如請求項2或3所述的。

【請求項40】 如請求項34至39中任一項所述的用途，該用途用於如請求項1至31中任一項所述的免疫原性組成物中。

【請求項41】 一種用於製造免疫原性組成物的方法，該免疫原性組成物包含腦膜炎奈瑟氏菌血清群B抗原的組合和 $\text{AlPO}_4$ 佐劑，該組合包含至少一種H因子結合蛋白 (fHBP) A和一種H因子結合蛋白 (fHBP) B，該方法至少包括以下步驟：

- a) 選擇PZC低於5的 $\text{AlPO}_4$ 佐劑，以及
- b) 將在步驟a) 中選擇的該 $\text{AlPO}_4$ 佐劑與至少一種H因子結合蛋白 (fHBP) A

和至少一種H因子結合蛋白（fHBP）B組合，該組合以任何順序進行。

**【請求項42】** 一種用於穩定免疫原性組成物中的fHBP A和NadA蛋白中的至少一者的方法，該方法至少包括以下步驟：

- a) 選擇PZC低於5的AlPO<sub>4</sub>佐劑，以及
- b) 將在步驟a) 中選擇的該AlPO<sub>4</sub>佐劑與fHBP A或NadA蛋白組合，以及
- c) 獲得該免疫原性組成物，其fHBP A或NadA蛋白係被穩定的。

**【請求項43】** 一種用於製備包含腦膜炎奈瑟氏菌fHBP B抗原的免疫原性組成物的方法，該組成物誘導針對表現與該組成物的該fHBP B抗原異源的fHBP B的腦膜炎奈瑟氏菌血清群B菌株的增強的免疫反應，該方法至少包括以下步驟：

- a) 選擇PZC低於5的AlPO<sub>4</sub>佐劑，以及
- b) 將在步驟a) 中選擇的該AlPO<sub>4</sub>佐劑與該fHBP B抗原組合，以及
- c) 獲得該免疫原性組成物。

**【請求項44】** 如請求項41至43中任一項所述的方法，其中該AlPO<sub>4</sub>佐劑係如請求項2或3所述的。

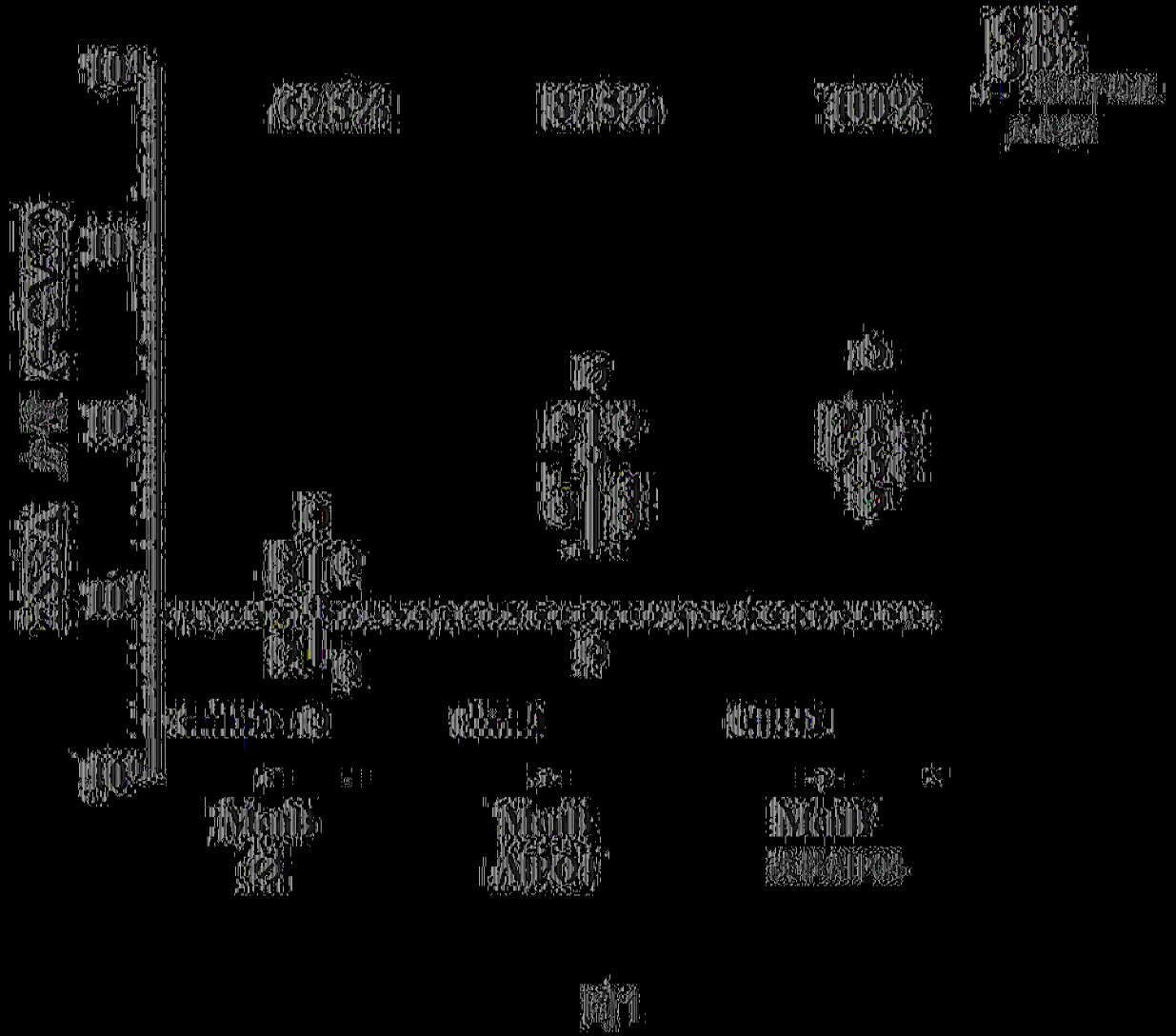
**【請求項45】** 如請求項42至45中任一項所述的方法，其中該免疫原性組成物係如請求項1至31中任一項所述的。

**【請求項46】** 一種在有需要的個體中誘導針對腦膜炎奈瑟氏菌血清群B菌株的免疫反應的方法，該方法至少包括向該個體投予如請求項1至31中任一項所述的免疫原性組成物或如請求項32所述的疫苗的步驟，其中該投予步驟誘導針對該腦膜炎奈瑟氏菌血清群B菌株的免疫反應。

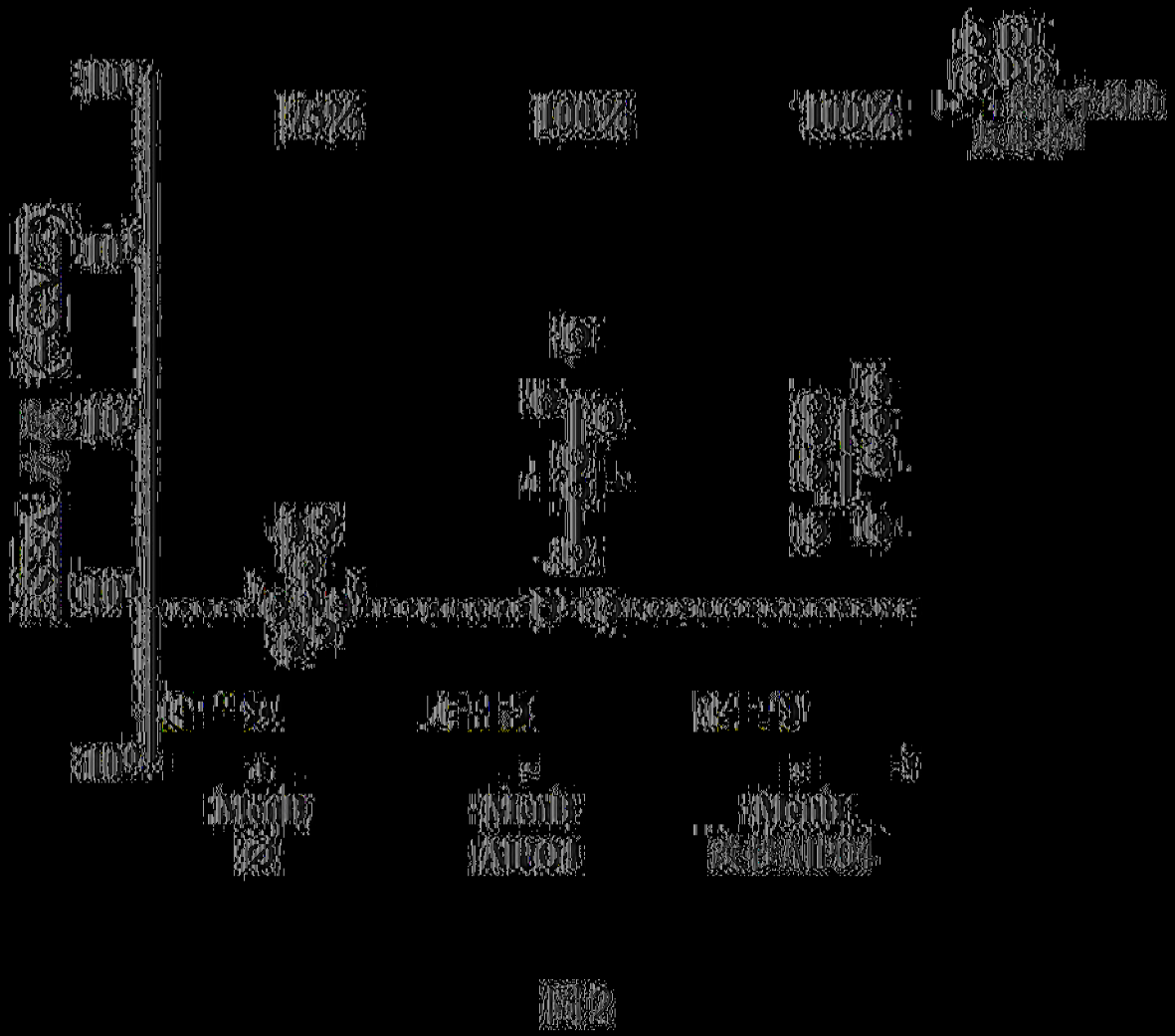
**【請求項47】** 一種在有需要的個體中增強由包含腦膜炎奈瑟氏菌fHBP B抗原的組成物所誘導的針對表現與該組成物的該fHBP B抗原異源的fHBP B的腦膜炎

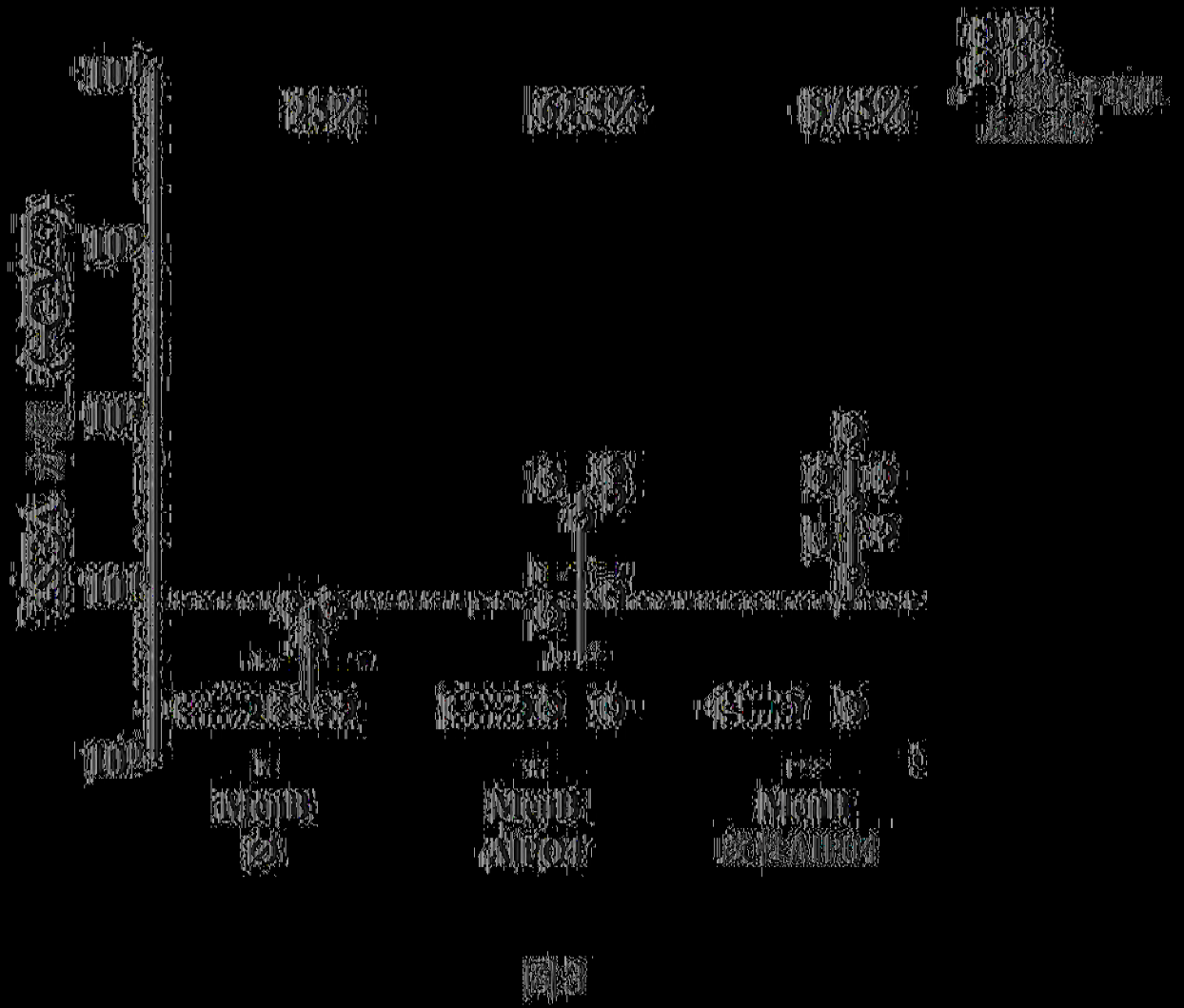
炎奈瑟氏菌血清群B菌株的免疫反應的方法，該方法至少包括向該個體投予如請求項1至31中任一項所述的免疫原性組成物或如請求項32所述的疫苗的步驟，其中該投予步驟誘導針對表現該異源fHBP B的該腦膜炎奈瑟氏菌血清群B菌株的增強的免疫反應。

(發明圖式)

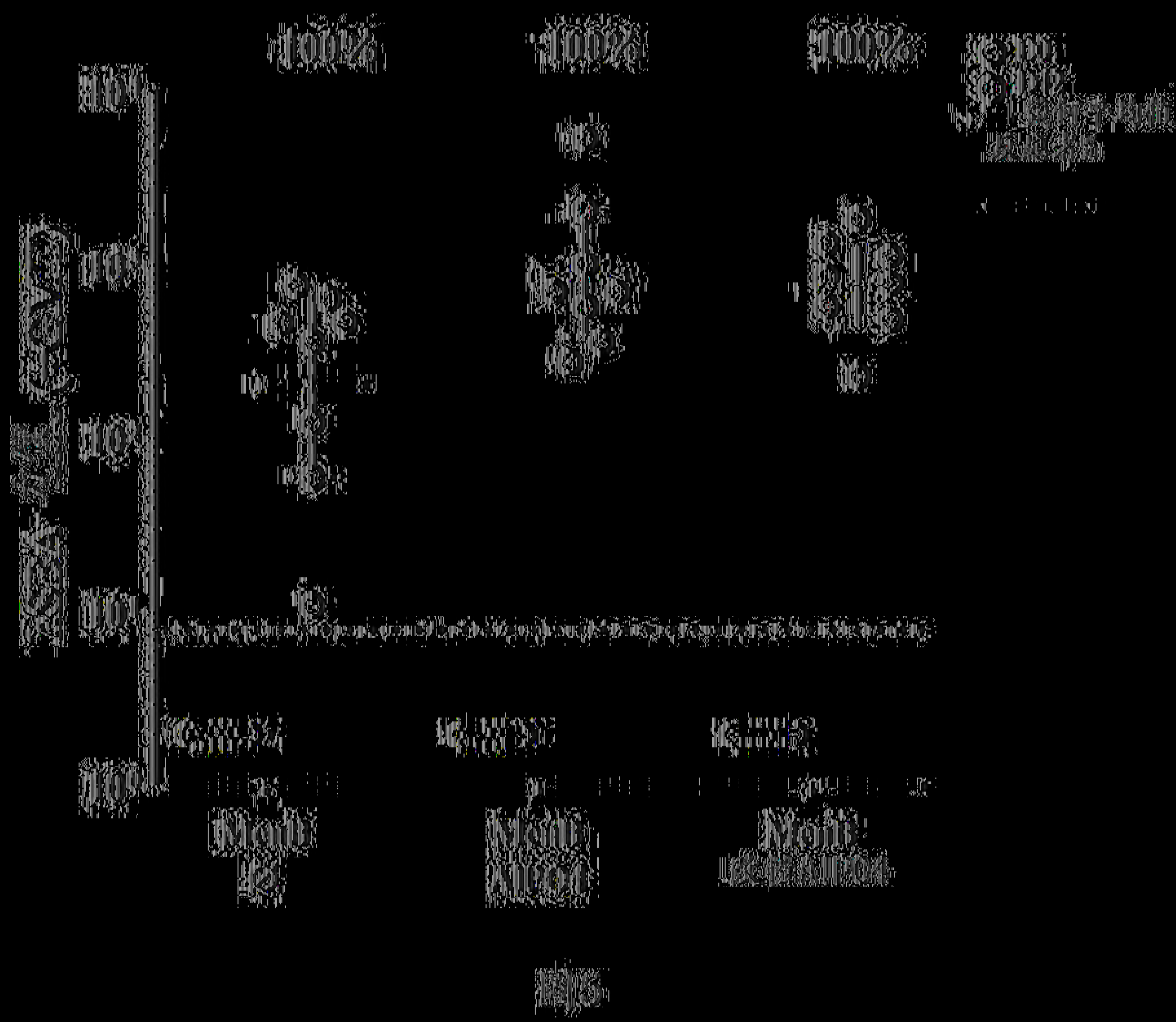


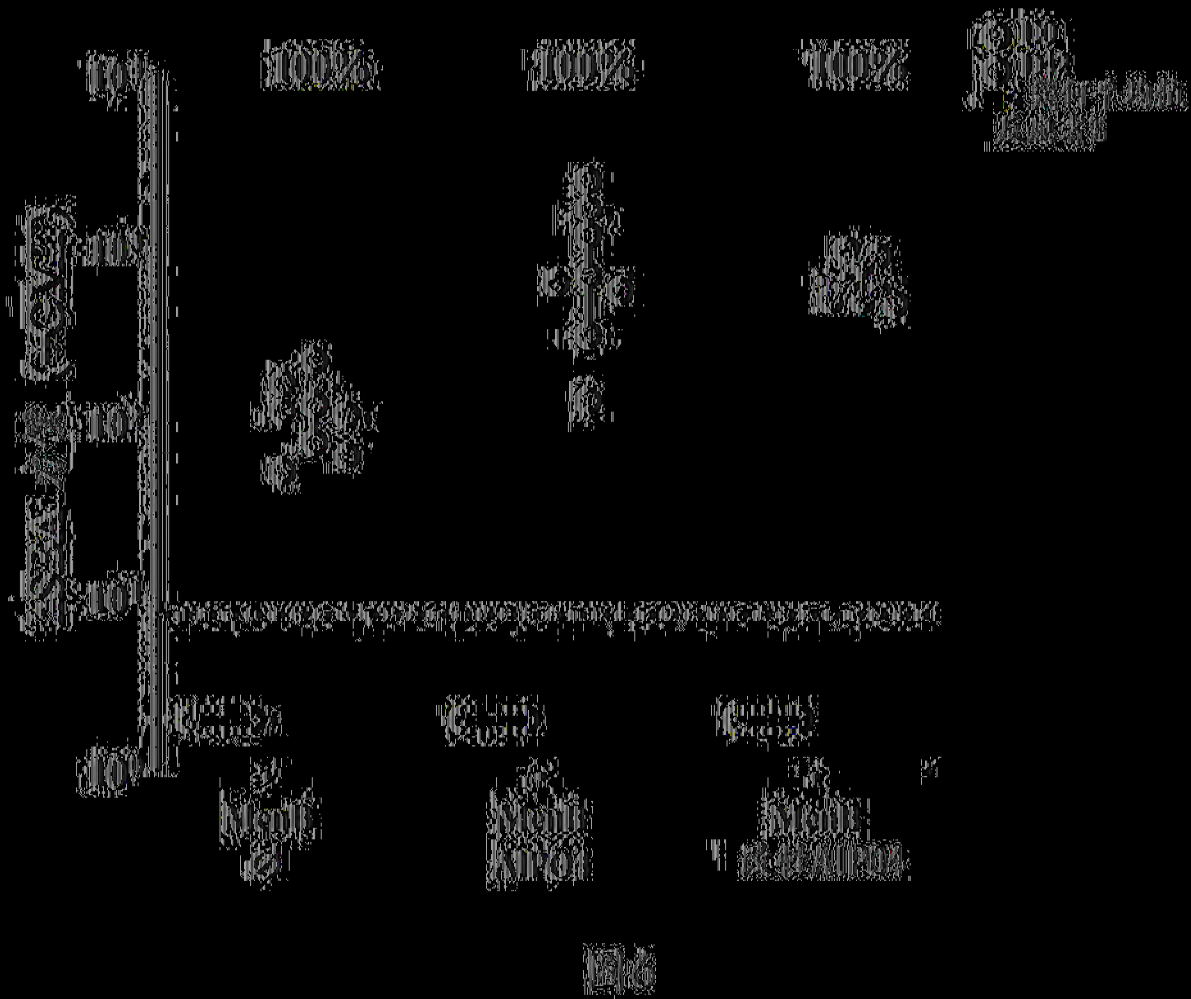


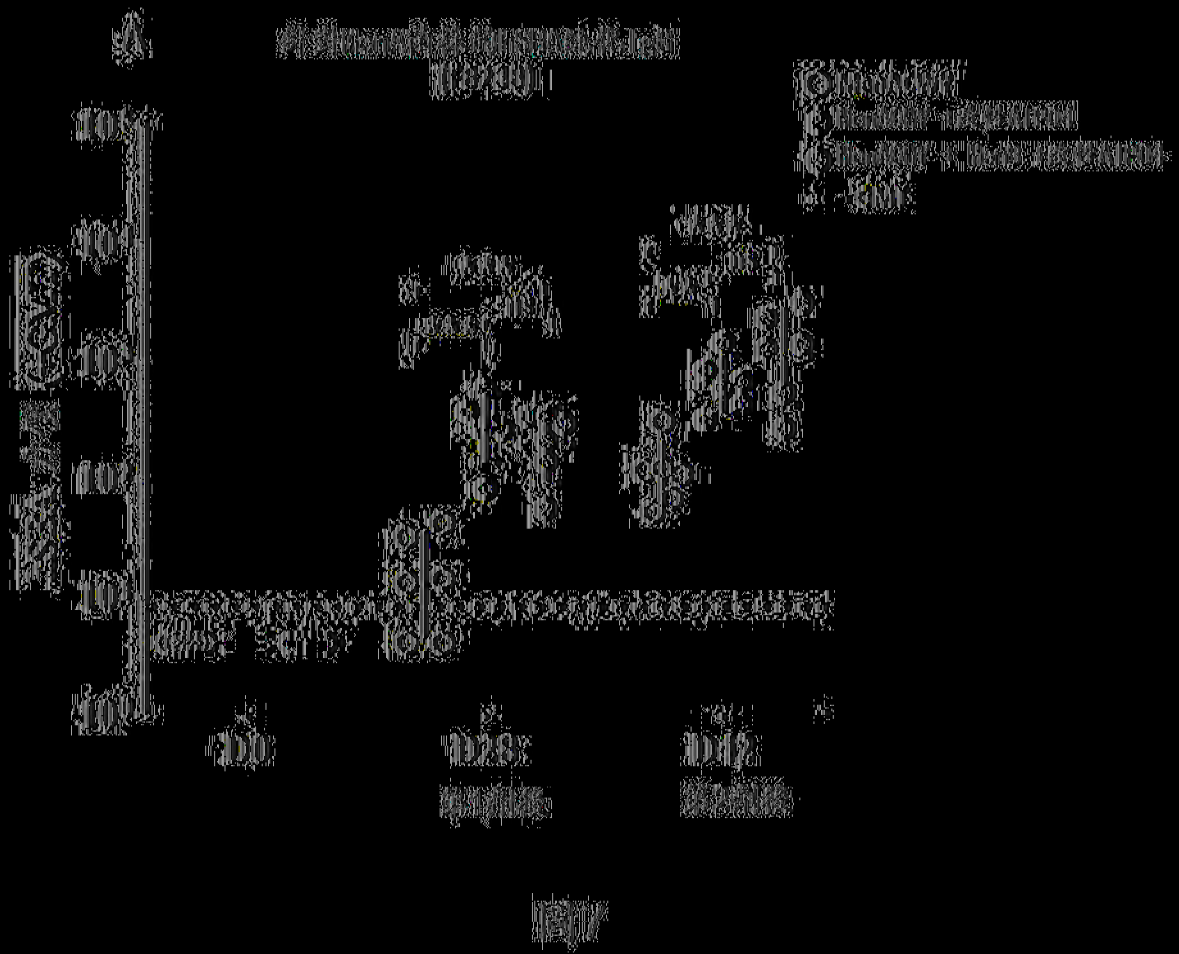


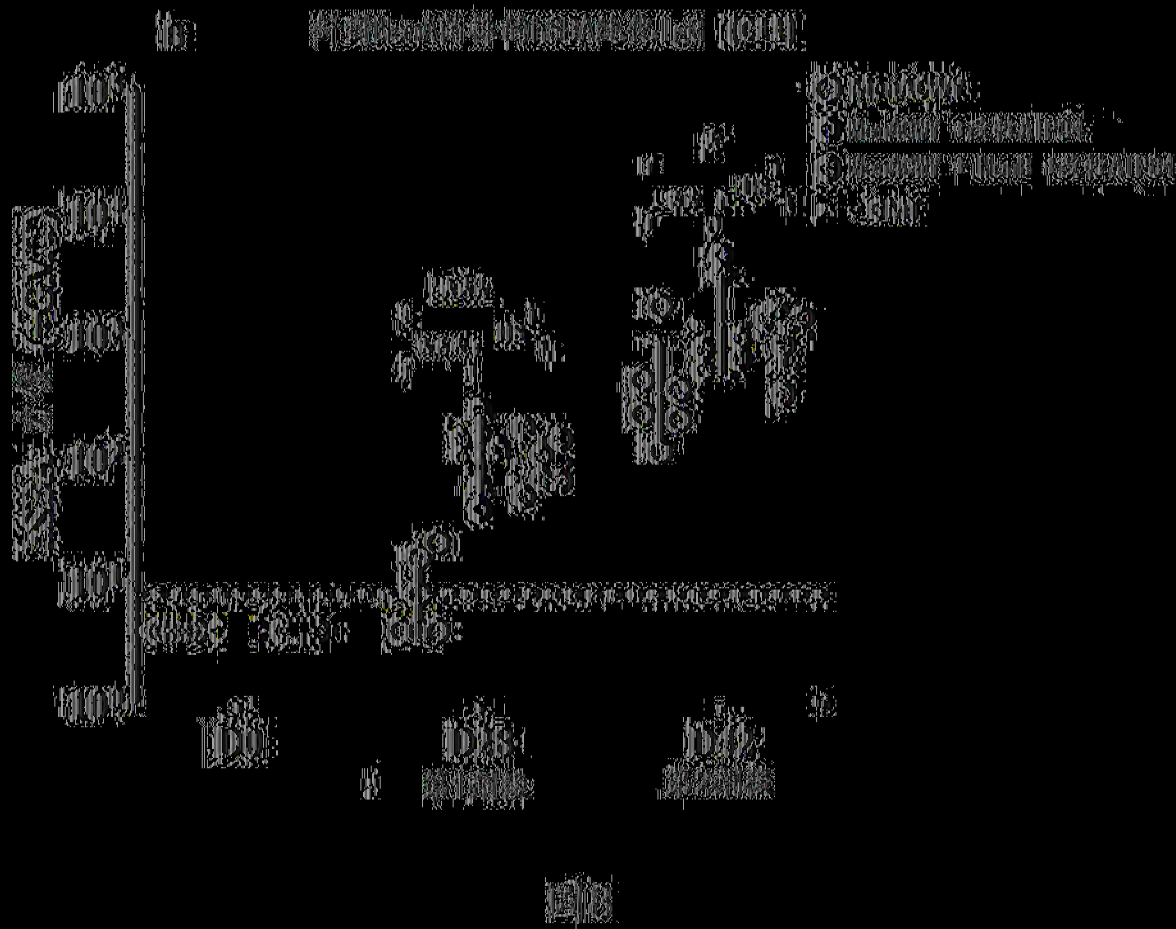


















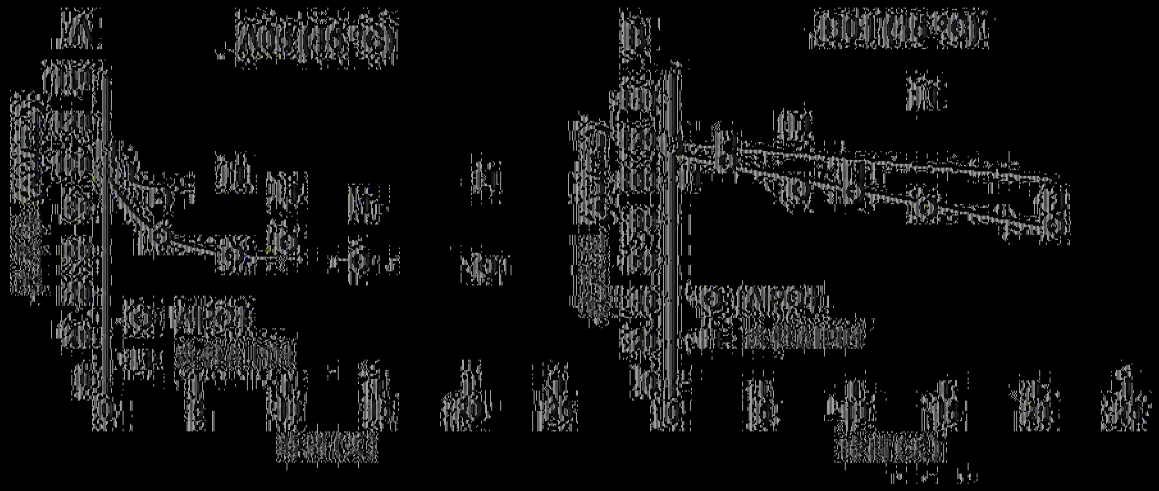


圖 4

