

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區)	申請專利，申請日期：	案號：	， <input type="checkbox"/> 有 <input type="checkbox"/> 無主張優先權
英國	1999年03月19日	GB 9906437.0	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
英國	1999年04月20日	GB 9909077.1	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
英國	1999年04月23日	GB 9909466.6	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
英國	1999年07月15日	GB 9916677.9	<input type="checkbox"/> 有 <input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

有關微生物已寄存於： ， 寄存日期： ， 寄存號碼：

裝
訂
線

五、發明說明(1)

發明範圍

本發明係有關細菌性多醣抗原疫苗，其製法及此等多醣於醫學上之用途。

特定言之，本發明係有關三個相關方面A-包含肺炎球菌多醣抗原之疫苗，典型指肺炎球菌多醣共軛物抗原，採用來自肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)之蛋白質抗原及視需要使用Th1誘發輔劑調配；B-以Th1輔劑為輔劑之專一性且有利之肺炎球菌多醣共軛物；及C-通常與來自流感嗜血桿菌(*H. influenzae*)之蛋白質D共軛之細菌性多醣共軛物。

發明背景

肺炎鏈球菌為格蘭陽性細菌，為相當高罹病率與死亡率(尤其對年幼及年長者)之肇因，會引起侵入性疾病如：肺炎、細菌血症及腦膜炎，及與菌落移生有關之疾病如：急性中耳炎。美國60歲以上罹患肺炎球菌肺炎之比例約每100,000人有3至8人。其中20%病例導致細菌血症，其他病症如：腦膜炎，即使使用抗生素治療仍使死亡率逼近30%。

肺炎球菌係利用化學連接之多醣包埋，賦與血清型專一性。已知之肺炎球菌血清型有90種，莢膜為肺炎球菌之主要毒力決定子，因為莢膜不僅保護細菌內表面與補體分隔，而且其本身之免疫原性低。多醣為不依賴T-細胞之抗原，且不會被處理或出現在MHC分子上與T-細胞交互作用。然而，其會透過另一種涉及與B細胞上表面受體交鏈

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明(2)

之機轉刺激免疫系統。

有數項實驗顯示，對抗侵入性肺炎球菌疾病之防護作用與莢膜之專一性抗體有最強烈相關性，且此防護作用為血清型專一性。

以多醣抗原為主之疫苗係相關技藝習知者。已核准人體使用之四種多醣抗原包括：傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhi*)之Vi多醣，流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)之PRP多醣，由血清型A, C, W135及Y組成之四價腦膜炎球菌疫苗，及由相當於血清型1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F及33之多醣組成之23價肺炎球菌疫苗(佔肺炎球菌血液單離株至少90%)。

後三者疫苗為嬰幼兒提供保護對抗造成嚴重罹患率及死亡率之呼吸性感染之細菌，但此等疫苗仍未核准用於二歲以下之幼兒，因為其免疫原性不適合這個年齡層(皮特拉(Peltola)等人(1984), *N. Engl. J. Med.* 310:1561-1566)。肺炎鏈球菌為嬰幼兒之侵入性細菌性疾病與中耳炎最常見原因。同樣地，較年長患者對肺炎球菌疫苗之反應較差[洛曼(Roghmann)等人，(1987), *J. Gerontol.* 42:265-270]，因此這個族群之細菌性肺炎發生率亦提高[維格希(Vergheese)與柏克(Berk), (1983) *Medicine (Baltimore)* 62:271-285]。

過去曾設計克服此嬰兒免疫原性缺陷之方法包括連接多醣與大型免疫原性蛋白質，以作為T-細胞之助手，並誘發對抗與其共軛之多醣抗原之免疫記憶。肺炎球菌醣蛋白共

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (3)

軛疫苗目前仍在評估其在不同年齡層之安全性、免疫原性及效力。

A) 肺炎球菌多醣疫苗

23價未共軛肺炎球菌疫苗之臨床效力有很大差異，由0%至81%(費森(Fedson)等人，(1994) Arch Intern Med. 154:2531-2535)。該效力似乎與已有免疫力之危險族群有關，如：老年人、霍金氏症(Hodgkin's disease)、脾切除、鐮刀狀細胞疾病及缺丙型球蛋白血症(費恩(Fine)等人，1994, Arch Intern Med. 154:2666-2677)，亦與疾病症狀有關。該23價疫苗並未對肺炎球菌肺炎(對某些高危險群如：老年人)及中耳炎疾病展現保護作用。

因此需要改良之肺炎球菌疫苗組合物，特定言之，可對老年人及幼兒更有效保護或改善肺炎球菌疾病(特定言之肺炎)之組合物。

本發明提供這種改良之疫苗。

B) 選定之肺炎球菌多醣共軛物+3D-MPL組合物

一般認為商業化未共軛之肺炎球菌疫苗之保護效力多少與接種時誘發之抗體濃度有關；事實上，各成份多醣之免疫原性只有23種多醣核准使用(威廉斯(Williams)等人編輯，New York Academy of Sciences 1995 pp. 241-249)。因此進一步加強對肺炎球菌多醣之抗體反應可提高嬰兒與老年人對第一次接受多醣或多醣共軛物注射後產生之抗體保護程度百分比，且可減少為了誘發對肺炎鏈球菌引起之感染之保護性免疫力所需之劑量與注射次數。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (4)

自20世紀初，研究者已試驗了許多種可加至抗原中之化合物，以改良其在疫苗組合物中之免疫原性[概述於M. F. 包威爾(Powell)與M. J. 紐曼(Newman)，紐約普雷門出版社(Plenum Press, NY)，"疫苗設計-亞單位與輔劑處理法"(Vaccine Design-the Subunit and Adjuvant Approach)(1995)，第7章，"疫苗輔劑與賦形劑概論"(A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients)]。有許多化合物很有效，但令引起顯著之局部與全身不良反應，而無法用於人類疫苗組合物中。以鋁為主之輔劑(如：礬土、氫氧化鋁或磷酸鋁)首先發表於1926年，為美國唯一核准用於人類疫苗之免疫輔劑。

以鋁為主之輔劑為透過其所誘發"貯積效應"而發揮作用之載體類輔劑實例。抗原係吸附在其表面上，且當注射組合物時，輔劑與抗原不會立即散佈在血流中，組合物反而停留在局部注射位置，造成更顯著之免疫反應。這種載體輔劑之另一項已知優點為適合穩定容易分解之抗原，例如：某些多醣抗原。

3D-MPL為非載體輔劑之實例。其全名為3-O-去醯基-單磷醯基脂質A(或3去-O-醯基單磷醯基脂質A或3-O-去醯基-4'-單磷醯基脂質A)且稱為3D-MPL，代表還原端葡糖胺之3-位置為去-O-醯基化。其製法參見GB 2220211 A。在化學上，其係具有4、5或6條醯基鏈之3-去醯基化單磷醯基脂質A之混合物。其最早於1990年代初期製造，當時脂質A之4'-單磷醯基衍生物(MPL)之3-O-去醯基化法產生之分

五、發明說明 (5)

子進一步減弱毒性，但未改變免疫刺激活性。

3D-MPL本身即已用為輔劑，或最好與貯積型載體輔劑組合如：氫氧化鋁、磷酸鋁或水包油性乳液：這種組合物中，抗原與3D-MPL含在相同粒狀結構中，可更有效傳送抗原性與免疫刺激性訊號。已有實驗顯示，3D-MPL可以進一步加強吸附在鋁上之抗原之免疫原性[特倫(Thoelen)等人, Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1]。這種組合亦較適於容易吸附之抗原(例如：細菌性多醣共軛物)，其中吸附在礬土上之作法可以穩定抗原。主要使用沈澱之以鋁為主之輔劑，因為其係目前人體疫苗唯一核准使用之輔劑。因此，含3D-MPL與以鋁為主之輔劑組合之疫苗由於容易在市面上發展及快速引介，因此係相關技藝上有利之疫苗。

MPL(非3-去醯基化)已評估為具有多種單價多醣-共軛物疫苗抗原之輔劑。於生理食鹽水中共同注射MPL可加強血清抗體對四種單價多醣共軛物之反應：肺炎球菌PS 6B-破傷風類毒素、肺炎球菌PS 12-白喉類毒素、及與銅綠假單胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)外毒素A共軛之金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)5型及金黃色葡萄球菌8型(史尼森(Schneerson)等人, J. Immunology (1991) 147:2136-2140]。所加強之反應據稱為抗原專一性。含在水包油性乳液中之MPL(一種載體型輔劑)與含在生理食鹽水中之MPL所加強之效應一致，因為MPL與抗原含在相同粒狀結構中，且被視為傳送其他多醣共軛物疫苗之輔劑系統之最佳選擇。

五、發明說明(6)

大衛(Devi)等人 [Infect. Immun. (1991) 59:3700-7] 分析含在生理食鹽水中之MPL(非3-去醯基化)對鼠類抗體針對新型隱球菌(Cryptococcus neoformans)莢膜多醣之TT共軛物之反應產生之輔劑效應。當MPL與共軛物同時使用時，對PS之IgM-及IgG-專一性反應均只有很有限地增加；然而，當投與共軛物2天後，MPL之效應即大幅提高。採用這種免疫接種計劃需要比抗原延後投與MPL，尤其對嬰兒接種時，使得其實用性令人存疑。MPL使用多醣及多醣-蛋白質共軛物之輔劑效應似乎與組成有關。此外，在合適之緩釋傳送系統中增加MPL(例如：使用載體輔劑)可提供更持久之輔劑效應，且解決投藥時間及延遲投藥之問題。

總言之，相關技藝已說明特定多醣或多醣-共軛物抗原使用MPL或3D-MPL作為輔劑時，宜與載體輔劑組合使用(例如：以鋁為主之輔劑)，以加強其免疫刺激效應至最大程度。

本發明者已驚人地發現，對某些肺炎球菌多醣共軛物而言，當抗原只使用3D-MPL調配而不使用3D-MPL配合載體輔劑(如：以鋁為主之輔劑)調配時，疫苗組合物之免疫原性顯著較高。此外，所觀察到之改善效果與3D-MPL之使用濃度無關，且不論該特定共軛物含在單價組合物或組合成多價組合物均然。

C) 細菌性多醣-蛋白質D共軛物

如上已述，以多醣抗原為主之疫苗係相關技藝習知者。上述核准使用之多醣疫苗已證實有不同臨床效力。據估

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (7)

計，Vi多醣疫苗在預防培養物確認傷寒上之效力在55%至77%之間(普洛金(Plotkin)與甘(Can), 1995, Arch Intern Med. 155:2293-99)。腦膜炎C多醣疫苗在流行病條件下之效力為79%(P.狄瓦(De Wals)等人(1996) Bull World Health Organ. 74:407-411)。23價肺炎球菌疫苗之臨床效力則有很大變化，由0%至81%(費森(Fedson)等人(1994) Arch Intern Med. 154:2531-2535)。如上已述，已認為肺炎球菌疫苗之保護效力或多或少與接種時誘發之抗體濃度相關。

在使用多醣進行接種之相關問題中，多醣本身為不良之免疫原。過去為了克服此免疫原性缺陷而設計之方法包括由多醣連接大型之高免疫原性蛋白質載體，該載體從旁協助T-細胞。

目前常用於製造多醣免疫原之此等高免疫原性載體包括白喉類毒素(DT或CRM197突變株)、破傷風類毒素(TT)、鑰孔戚血藍素(KLH)及結核菌素之純化蛋白質衍生物(PPD)。

與目前使用之載體相關之問題

目前使用之載體分別有許多相關問題，包括GMP共軛物之生產及共軛物之免疫特性。

儘管此等載體為常用載體且已成功誘發抗多醣抗體反應，但仍有幾項缺點。例如：已知抗原專一性免疫反應可能因已先存在針對載體之抗體而受到抑制(抗原決定基抑制作用)，如：破傷風毒素(戴強(Di John)等人(1989), Lancet, 2:1415-8)。在大型族群中，有極高比例之人口已對DT及TT二者先具有免疫力，因為這些人曾接受此等抗原

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(8)

例行接種。例如：在英國，95%兒童接受含DT與TT二種之DTP疫苗。其他作者已在動物模式中說明抗原決定基抑制肽疫苗之問題(薩德(Sad)等人, Immunology, 1991; 74:223-227; 舒茲(Schutze)等人, J. Immunol. 135:4, 1985; 2319-2322)。

此外，對需要定期追加接種之疫苗而言，採用高免疫原性載體(如：TT與DT)容易在數次注射後抑制多醣抗體反應。此等多重接種法亦可能出現不要的反應如：延滯型過度反應(DTH)。

已知KLH為強力免疫原，已在人體臨床試驗中用為IgE肽之載體。然而，已觀察到某些不良反應(似DTH反應或IgE敏化)及對抗抗體之抗體反應。

因此為以多醣為主之疫苗選擇載體蛋白質時，需要在採用適合所有患者之載體(寬廣之MHC辨識性)之必要性與誘發高度抗多醣抗體反應及對抗載體之低度抗體反應之間取得平衡。

載體過去曾用於以多醣為主之疫苗，因此有許多缺點。尤其當為組合疫苗時，其中若不同多醣抗原使用相同載體時，抗原決定基抑制作用問題特別嚴重，在WO 98/51339中，在組合疫苗中使用多重載體，試圖克服此問題。

本發明提供一種新載體用於製備以多醣/多肽為主之免疫原性共軛物，但沒有上述缺點。

本發明提供一種來自流感嗜血桿菌之蛋白質D(EP 0 594 610 B1)，或其片段，作為以多醣為主之免疫原性組合物(包括

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明(9)

疫苗)之載體。此載體之用法在組合疫苗中特別有利。

發明概述

A) 肺炎球菌多醣疫苗

因此本發明提供一種疫苗組合物，其包含至少一種肺炎鏈球菌多醣抗原(以共軛較佳)及肺炎鏈球菌蛋白質抗原或其免疫性功能同等物，視需要使用Th1輔劑(係一種誘發Th1免疫反應之輔劑)。最好包括肺炎球菌蛋白質與Th1輔劑二者。本發明組合物特別適合治療老年人肺炎。

肺炎球菌多醣疫苗(共軛或非共軛)可能無法保護老年人族群對抗肺炎，因為這種疾病之發生率極高。對抗肺炎球菌之重要防衛機轉為調理素細胞吞噬作用(一種由對抗肺炎球菌多醣而產生之抗體引起之液體B-細胞/嗜中性白血球所調節過程，細菌最後則被吞噬)然而老年人之涉及調性機轉之部份過程受損，亦即由PMN(多形核細胞)產生超氧化物，產生其他反應性氧物質，PMN之固定化，PMN之細胞凋亡，PMN之變形能力。老年人之抗體反應亦可能受損。

與一般接受之信條相反，抗莢膜多醣抗體之正常含量可能無法有效完全清除細菌，因為肺炎球菌可能侵入宿主細胞來逃避此分支之免疫系統。

本發明者驚人地發現，除了刺激免疫系統之體液分支系統(受B-細胞調節)外，尚同時刺激免疫系統受細胞調節之分支系統(例如：受T-細胞調節之免疫力)時，產生之增效(或協同)結果可以加強宿主清除肺炎球菌。這種發現有助

五、發明說明(10)

於防止(或治療)一般肺炎球菌感染，但對預防(或治療)老年人肺炎特別重要，因為以多醣為主之疫苗未展現效力。

本發明者已發現，若肺炎球菌多醣(以共軛較佳)與肺炎球菌蛋白質(以表現在肺炎球菌表面上、或為分泌或釋出之蛋白質較佳，其可在受感染之哺乳動物細胞表面上II級及MHC I級環境中處理及呈現)共同投藥時，免疫系統之二個分支可依此方式增強效用。雖然肺炎球菌蛋白質本身可啟動細胞調節之免疫力，但本發明者亦發現疫苗調配物中含有Th1誘發輔劑時，有利於此分支之免疫系統，且驚人地進一步加強二個免疫系統分支之增效性。

B)選定之肺炎球菌多醣共軛物+3D-MPL組合物

因此，本發明亦提供一種抗原性組合物，其包含一種或多種多醣共軛物，以3D-MPL為輔劑，且實質上不含以鋁為主之輔劑，其中至少一種肺炎球菌多醣共軛物在包含3D-MPL之組合物中之免疫原性顯著高於在含3D-MPL且採用以鋁為主之輔劑之組合物中之免疫原性。

較佳具體實施例提供抗原性組合物，其包含一種或多種下列肺炎球菌莢膜多醣之共軛物：血清型4、6B、18C、19F與23F。此等組合物中，各該多醣在僅含3D-MPL之組合物中之免疫原性驚人地高於在含3D-MPL及以鋁為主之輔劑之組合物中。

因此本發明一項具體實施例中，提供一種抗原性組合物，其包含與免疫原性蛋白質共軛之肺炎鏈球菌莢膜多醣血清型4、6B、18C、19F或23F及3D-MPL輔劑，其中該組合

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (11)

物實質上不含以鋁為主之輔劑。

第二項具體實施例中，本發明提供一種組合抗原性組合物，其實質上不含以鋁為主之輔劑，且包括3D-MPL輔劑及二種或多種選自下列之肺炎球菌多醣共軛物：血清型4；血清型6B；血清型18C；血清型19F；及血清型23F。

C) 細菌性多醣-蛋白質D共軛物

因此，本發明提供一種多醣共軛物抗原，其包含衍生自病原性細菌之多醣抗原，與表自流感嗜血桿菌之蛋白質D或其蛋白質D片段共軛。此外，本發明提供多價疫苗組合物，其中由一種或多種多醣抗原與蛋白質D共軛。

圖式簡要說明

圖1A：ELISA結果，其顯示Balb/c小白鼠於第III劑後，血清IgG抗體抗天然肺炎球菌自溶酶(PLY)或去毒性自溶酶(DPLY)之效價，其中之小白鼠於第0、14及21天時，經肌肉接種1微克PLY或DPLY(其與A：AlPO₄ 100微克或B：AlPO₄ 100微克+5微克3D-MPL共軛)。

圖1B：顯示Balb/c小白鼠於第III劑後，血清IgG抗體抗天然肺炎球菌自溶酶(PLY)或去毒性自溶酶(DPLY)之溶血抑制效價(HLI)，其中之小白鼠於第0、14及21天時，經肌肉接種1微克PLY或DPLY(其與A：AlPO₄ 100微克或B：AlPO₄ 100微克+5微克3D-MPL共軛)。於本分析中，自溶酶之濃度係選用4HU，即為可溶解50%紅血球細胞濃度之4倍。加入經稀釋之標準抗血清，該稀釋抗血清可抑制溶血活性之50%，即為溶血抑制效價。

五、發明說明 (12)

圖 1C : 12 組 OF1 小白鼠於第 0 及 14 天經皮下接種後肺炎球菌於肺之群集。該小白鼠接種含有 A : 50 微克 $AlPO_4$, B : 0.1 微克多醣 / 蛋白質 D 之血清型 - 共軛 11 價肺炎球菌多醣共軛疫苗 + 50 微克 $AlPO_4$, 或 C : 0.1 微克多醣 / 蛋白質 D 之血清型 - 共軛 11 價肺炎球菌多醣共軛疫苗 + 10 微克 PdB (滅毒突變株自溶酶) + 50 微克 $AlPO_4$ + 5 微克 3D-MPL 之調配物。該小白鼠於 21 天後接受血清型 6B 肺炎球菌之挑戰，並於挑戰 6 小時後測量群集之情況。粗線表示等差中項。

發明說明

A) 肺炎球菌多醣疫苗

本發明提供一種改良疫苗，特別用於預防或改善老年人(及/或嬰兒與幼兒)肺炎球菌感染。

本發明中，若患者為 55 歲或以上時，典型指超過 60 歲以上，更常指 65 歲以上，則視之為老年人。

因此，本發明一項具體實施例中，提供一種適用於老年人(及/或嬰兒與幼兒)之疫苗組合物，其包含至少一種肺炎鏈球菌多醣抗原及至少一種肺炎鏈球菌蛋白質抗原。

第二項較佳具體實施例，本發明提供一種疫苗(其適合預防老年人肺炎)，其包含至少一種肺炎鏈球菌多醣抗原及至少一種肺炎鏈球菌蛋白質抗原與 Th1 輔劑。

這種疫苗亦適用於為其他高危險群(如：嬰兒或幼兒)之肺炎球菌感染。

第三項具體實施例中，提供一種疫苗組合物，其包含肺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (13)

炎球菌多醣抗原與Th1輔劑。

本發明之肺炎鏈球菌多醣抗原

典型地，本發明肺炎鏈球菌疫苗將包含多醣抗原(以共軛較佳)，其中多醣衍生自至少四種肺炎球菌血清型。這四種血清型最好包括6B、14、19F與23F。更佳者，組合物包括至少7種血清型，例如衍生自血清型4、6B、9V、14、18C、19F及23F者。更佳者，組合物中包括至少11種血清型，例如：一項具體實施例中之組合物包括衍生自血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F及23F之莢膜多醣(以共軛較佳)。本發明較佳具體實施例中，包括至少13種多醣抗原(以共軛較佳)，但本發明亦包括其他多醣抗原，例如：23價(如：血清型1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F與33F)。

為老年人接種時(例如：預防肺炎)，宜在上述11價抗原性組合物中添加血清型8與12F(及最佳者15與22)，形成15價疫苗，而對嬰兒或幼兒(其中較著重於中耳炎)，宜包括血清型6A與19A，形成13價疫苗。

為了預防/減輕老年(55歲以上)族群之肺炎及嬰兒(至多18個月)及幼兒(典型為18個月至5歲)之中耳炎，本發明之較佳具體實施例係由本文說明之多價肺炎鏈球菌多醣與肺炎鏈球菌蛋白質或其免疫性功能同等物組合。

本發明肺炎球菌蛋白質

為了本發明之目的，"免疫性功能同等物"之定義為含有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 · 線

五、發明說明 (14)

至少一種來自本發明蛋白質之保護性抗原決定基之蛋白質之肽。這種抗原決定基之特徵為曝露在表面上，高度保留性，且可在宿主體內誘發殺細菌性抗體反應，或預防毒性效應。較佳者，功能性同等物具有來自本發明蛋白質之至少15個，且最好30個或更多個鄰接之胺基酸。最佳者，可使用蛋白質之片段、刪除(如、其穿膜刪除變異體，亦即使用蛋白質之細胞外區)、融合、化學或遺傳法去毒之衍生物，等等，但其限制條件為應可引起實質上與天然蛋白質相同之免疫反應。

本發明蛋白質較佳為彼等曝露在肺炎球菌外表面肺炎球菌蛋白質(在肺炎球菌之至少部份生命循環中，可被宿主之免疫系統辨識)，或為肺炎球菌分泌或釋出蛋白質。最佳者，蛋白質為肺炎鏈球菌之毒素、黏合素(adhesin)、兩成份之訊號轉導劑、或脂蛋白，或其免疫性功能同等物。

特別適合包括在這種組合疫苗中之蛋白質包括(但不限於)：肺炎球菌自溶酶(最好利用化學處理或突變法去除毒性)(米契爾(Mitchell)等人, Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11; 18(13):4010"來自肺炎鏈球菌1與2型之肺炎球菌自溶酶基因與蛋白質之比較"(Comparison of pneumolysin genes and proteins from Streptococcus pneumoniae types 1 and 2); 米契爾等人, Biochim Biophys Acta 1989 Jan 23; 1007(1): 67-72 "肺炎球菌自溶酶基因於大腸桿菌中之表現：迅速純化法與生物性質(Expression of the pneumolysin gene in Escherichia Coli: rapid purification and biological properties); WO

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (15)

96/05859 (A.賽米德(Cyanamid); WO 90/06951(巴頓(Paton)等人); WO 99/03884(NAVA)] ; PspA與其穿膜刪除變異體(US 5804193-布里爾(Briles)等人); PspC與其穿膜刪除變異體(WO 97/09994-布里爾等人); PsaA與其穿膜刪除變異體(貝里(Berry)與巴頓(Paton), Infect Immun 1996年12月; 64(12):5255-62, "PsaA之序列異源性, 係肺炎鏈球菌之毒性所必要之37 kD假想之黏合素"(Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of Streptococcus pneumoniae); 肺炎球菌膽鹼結合性蛋白質及其穿膜刪除變異體; CbpA與其穿膜刪除變異體(WO 97/41151; WO 99/51266); 甘油醛-3-磷酸酯-去氫酶(Infect. Immun. 1996 64:3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA(山茲-貝特(Sanchez-Beato)等人, FEMS Microbiol Lett 1998, 164:207-14); 似M蛋白質, SB專利申請案No. EP 0837130; 及黏合素18627, SB專利申請案No. EP 0834568。

本發明使用之蛋白質最好選自: 肺炎球菌自溶酶、PsaA、PspA、PspC、CbpA或其中二種或多種之組合。本發明亦包括這種蛋白質之免疫性功能同等物(如上述定義)。

組合物中, 蛋白質可協助誘發T-細胞調節之反應來對抗肺炎球菌疾病(此係保護對抗胺炎特別需要者), 此反應與免疫系統之體液分支系統合作抑制肺炎球菌入侵, 並刺激調理素細胞吞噬作用。

包括蛋白質抗原之另一項優點為對調性素細胞吞噬過程提供另一種抗原, 並抑制細胞黏合(若使用黏合素時)或中

五、發明說明 (16)

和毒素(若使用毒素時)。

因此本發明之具體實施例中，提供一種肺炎鏈球菌疫苗，其包含肺炎球菌多醣共軛物疫苗，包含衍生自至少四種血清型(最好至少7種血清型，至少11種血清型更佳)之多醣抗原，及至少一種(但最好二種)肺炎鏈球菌蛋白質。最好其中一種蛋白質為肺炎球菌自溶酶或PsaA或PspA或Cbpa(以去毒性之肺炎球菌自溶酶最佳)。較佳組合至少包含肺炎球菌自溶酶或其衍生物與PspA。

如上已述，與多醣接種法有關之問題為多醣本身即為不良之免疫原。為了克服此問題，多醣可與蛋白質載體共軛，作為T-細胞之助手。因此，本發明利用之多醣最好連接這種蛋白質載體。常用於製造多醣免疫原之此等載體實例包括白喉與破傷風類毒素(分別為DT，DT CRM197及TT)，鑰孔戚血藍素(KLH)、來自腦膜炎奈氏球菌(N. meningitidis)之OMPC及結核菌素之純化蛋白質衍生物(PPD)。

然而，有許多問題與此等常用之各載體有關(參見上述"與常用載體有關之問題"一節)。

本發明之較佳具體實施例中提供一種新穎載體用於製備以多醣為主之免疫原構築體，不會出現此等缺點。較適於以肺炎球菌多醣為主之免疫原性組合物(或疫苗)之載體為來自流感嗜血桿菌之蛋白質D(EP 594610-B)，或其片段。適用之片段包括含T-助手抗原決定基之片段。特定言之，蛋白質D最好包含蛋白質1/3 N-末端。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (17)

其他較適於肺炎球菌多醣之載體為肺炎球菌蛋白質本身 (如上述"本發明肺炎球菌蛋白質"一節所定義)。

本發明疫苗最好含有輔劑。合適輔劑包括鋁鹽如：氫氧化鋁凝膠(alum)或磷酸鋁，但亦可為鈣、鐵或鋅之鹽，或可為醃化酪胺酸、或醃化糖、陽離子性或陰離子性衍化之多醣或聚磷腈之不可溶懸浮液。

輔劑最好選自TH1型效應之優先誘發劑，以協助免疫反應之細胞所調節之分支系統。

本發明之TH1輔劑

高含量Th1-型細胞素似乎有利於誘發對特定抗原之受細胞調節之免疫反應，而高含量Th2-型細胞素則有利於誘發對抗原之體液免疫反應。

應記住，Th1與Th2-型免疫反應沒有絕對區分。事實上，某個體支持一種免疫反應，稱為主要Th1或主要Th2。然而，經常宜就莫斯曼(Mosmann)與考夫曼(Coffman)說明之鼠類CD4+ ve T細胞純系考量細胞素族群(T.R.莫斯曼與R.L.考夫曼(1989)，TH1與TH2細胞：造成不同功能性質之不同淋巴素分泌型態(TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173)。傳統上，Th1-型反應與T-淋巴球生產INF- γ 與IL-2細胞素有關係。其他經常與誘發Th1型免疫反應直接相關之細胞素則不由T-細胞產生，如：IL-12。反之，Th2-型反應與IL-4、IL-5、IL-6、IL-10之分泌有關係，促進主要Th1反應之合適輔劑系統包

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (18)

括：單磷醯基脂質A或其衍生物，特定言之3-去-O-醯基化單磷醯基脂質A，及單磷醯基脂質A，以3-去-O-醯基化單磷醯基脂質A(3D-MPL)較佳，與鋁鹽之組合。

一種加強系統涉及單磷醯基脂質A與皂角苷衍生物之組合，特定言之如WO 94/00153所述之QS21與3D-MPL之組合，或反應原性較低之組合物，其中如WO 96/33739所揭示，以膽固醇中止QS21之反應。

一種涉及QS21、3D-MPL及生育酚之水包油性乳液之特別強效輔劑調配物說明於WO 95/17210，且為較佳調配物。

較佳者，該疫苗另包含皂角苷，以QS21更佳。調配物亦可包含水包油性乳液及生育酚(WO 95/17210)。

本發明亦提供一種製造疫苗調配物之方法，其包括混合本發明蛋白質與醫藥上可接受之賦形劑，如：3D-MPL。

含未甲基化CpG之寡核苷酸(WO 96/02555)亦為TH1反應之優先誘發劑，且適用於本發明。

特別佳之本發明組合物包括一種或多種共軛之肺炎球菌多醣，一種或多種肺炎球菌蛋白質及Th1輔劑。採用這種Th-1輔劑可以協助肺炎球菌蛋白質(如上述)誘發受細胞調節之反應及二種免疫系統分支之間之合作，而形成對抗一般肺炎球菌疾病特別有效之疫苗，且重要的是，對抗老年人肺炎球菌肺炎特別有效之疫苗。

本發明另一方面係提供本文說明之免疫原或疫苗用於醫藥。

本發明另一方面提供一種組合物，其包含肺炎球菌多醣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (19)

共軛物與 Th1 輔劑 (以 3D-MPL 較佳) , 可以在無反應族群中血清轉化或誘發對抗多醣抗原之體液抗體反應。

已知 10-30% 族群對多醣免疫接種沒有反應 (對疫苗中 50% 以上血清型沒有反應) [康拉德森 (Konradsen) 等人, Scand. J. Immun 40:251 (1994) ; 洛奇格茲 (Rodriguez) 等人, JID, 173:1347 (1996)] 。 這種情形亦出現在共軛疫苗 (慕希 (Musher) 等人, Clin. Inf. Dis. 27:1487 (1998)) 。 此現象在高危險群 (嬰兒、幼兒及老年人) 特別嚴重。

本發明者已發現, 由共軛之肺炎球菌多醣 (其在特定族群中之反應低) 與 Th1 輔劑之組合 (見上述 "本發明之 Th1 輔劑) 可驚人地克服這種無反應性問題。應使用 3D-MPL 較佳, 且以不含以鋁為主之輔劑之 3D-MPL 最佳 (仍提供更佳反應)。因此本發明提供這種組合物, 並再提供一種對肺炎球菌多醣無反應之治療法, 其係投與這種組合物, 且尚提供一種使用 Th1 輔劑製造包含共軛之肺炎球菌多醣抗原之醫藥之用途, 供治療對多醣抗原無反應之個體對抗 (或預防) 肺炎球菌疾病。

在一項具體實施例中, 有一種預防或改善老年人肺炎之方法, 其包括對該老年患者投與安全且有效量之如本文所述之疫苗, 其包含肺炎鏈球菌多醣抗原及抑或 Th1 輔劑, 或肺炎球菌蛋白質 (以同時使用二者較佳)。

另一具體實施例中, 提供一種預防或改善嬰兒或幼兒中耳炎之方法, 其包括對該嬰兒或幼兒投與安全且有效量之疫苗, 其包含肺炎鏈球菌多醣抗原及抑或肺炎鏈球菌蛋白

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (20)

質抗原或Th1輔劑(以同時使用二者較佳)。

上述本發明方法中，多醣抗原最好呈多醣蛋白質共軛物。

本發明之疫苗製劑

本發明之疫苗製劑可用於保護或治療容易感染之哺乳動物，其係經由全身或黏膜途徑投與該疫苗。此等投藥法可包括經由肌內、腹膜內、皮內或皮下途徑注射；或經由黏膜投藥至口腔/消化道、呼吸道、生殖泌尿道。以鼻內投與疫苗治療肺炎或中耳炎較佳(因為可更有效預防肺炎球菌通過鼻咽道，進而在最早期減輕感染)。

各疫苗劑量中共軛物抗原之用量選擇在可誘發免疫保護性反應且沒有典型疫苗之顯著不良副作用時之用量。這種用量將依所採用之專一性免疫原及其呈現方式而定。通常，各劑量應包含0.1至100微克多醣，以0.1至50微克較佳，以0.1至10微克更佳，其中1至5微克為最佳範圍。

疫苗中蛋白質抗原含量典型在1至100微克範圍內，以5至50微克較佳，最典型在5至25微克之範圍內。

對特定疫苗之最適當成份用量可由觀察個體之適當免疫反應之標準實驗來決定。在初次接種後，該個體可在適當間隔下追加一劑或數劑疫苗。

疫苗製劑一般說明於"疫苗設計學"(Vaccine Design)("亞單位與輔劑處理法"(The subunit and adjuvant approach)，M.F.包威爾(Powell)與M.J.紐曼(Newman)編輯，1995，紐約普雷門出版社(Plenum Press New York)。包括在微脂粒中

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (21)

之方法說明於富樂頓(Fullerton)之美國專利案4,235,877中。

B) 特定之肺炎球菌多醣共軛物+3D-MPL組合物

為了本發明之目的，"本發明肺炎球菌多醣共軛物"說明彼等肺炎鏈球菌莢膜多醣之共軛物，其在含3D-MPL之組合物中之免疫原性比在含3D-MPL與以鋁為主之輔劑之組合物中之免疫原性高(例如：血清型4；血清型6B；血清型18C；血清型19F或血清型23F之共軛物)。

為了本發明之目的，"實質上不含以鋁為主之輔劑"一詞係指該組合物中以鋁為主之輔劑(例如：氫氧化鋁，及特定言之磷酸鋁)之含量不足以使本發明肺炎球菌多醣共軛物之免疫原性比含3D-MPL但未添加以鋁為主之輔劑之同等組合物有任何程度之下降。較佳者，該抗原性組合物應包含基本上由3D-MPL組成之輔劑。每個劑量中以鋁為主之輔劑添加量最好低於50微克，低於30微克更佳，低於10微克亦更佳，以未添加以鋁為主之輔劑至本發明抗原性組合物中最佳。

為了本發明之目的，應依實例2所述，判斷肺炎球菌多醣共軛物在含3D-MPL之組合物中之免疫原性是否顯著高於在含3D-MPL與以鋁為主之輔劑之組合物中之免疫原性。當僅含3D-MPL時，判斷組合物之免疫原性是否顯著較高之指標為僅含3D-MPL之組合物相對於含3D-MPL與磷酸鋁輔劑之同等組合物之間之GMC IgG濃度比例(依實例2決定)應大於2，大於5較佳，大於7更佳，大於9亦更佳，且大於14最佳。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (22)

與多醣接種法有關之問題中，多醣本身即為不良之免疫原。為了克服此免疫原性缺陷而設計之作法包括由多醣與大型蛋白質載體連接(共軛)，作為T-細胞之助手。本發明之肺炎球菌多醣最好連接可作為T-細胞之助手之蛋白質載體。可使用之這種載體實例包括白喉、白喉突變株、及百日咳類毒素(分別為DT、CRM197及TT)、鑰孔戚血藍素(KLH)、結核菌素之純化蛋白質衍生物(PPD)及腦膜炎奈氏球菌之OMPC。

最佳者，採用來自流感嗜血桿菌之蛋白質D(EP 0 594 610-B)或其片段(見C小節)用為本發明肺炎球菌多醣之免疫原性蛋白質載體。

本發明抗原性組合物之一項具體實施例中，包含與免疫原性蛋白質共軛之肺炎球菌多醣血清型(PS) 4，並使用3D-MPL輔劑調配，其中組合物實質上不含以鋁為主之輔劑。另一項具體實施例中，抗原性組合物分別包含PS 6B，18C，19F或23F，與免疫原性蛋白質共軛，並使用3D-MPL輔劑調配，其中組合物實質上不含以鋁為主之輔劑。

本發明另一項具體實施例中，提供一種組合之抗原性組合物，其包含選自PS 4，PS 6B，PS 18C，PS 19F及PS 23F之二種或多種肺炎球菌多醣共軛物，使用3D-MPL輔劑調配，其中組合物實質上不含以鋁為主之輔劑。

本發明肺炎球菌多醣共軛物之免疫原性不受與其他肺炎球菌多醣共軛物組合顯著影響(實例3)。因此，本發明較佳方面係提供一種組合之抗原性組合物，其包含一種或多

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (23)

種本發明肺炎球菌多醣共軛物與一種或多種其他肺炎球菌多醣共軛物之組合，其中組合物使用3D-MPL輔劑調配，但實質上不含以鋁為主之輔劑。

另一項較佳具體實施例中，提供組合之抗原性組合物，其包含選自PS 4，6B，18C，19F或23F肺炎球菌多醣共軛物中至少一種，且最好2，3，4或全部5種共軛物，及其他肺炎球菌多醣共軛物之任何組合，使用3D-MPL輔劑調配，但實質上不含以鋁為主之輔劑。

典型地，本發明肺炎鏈球菌組合抗原性組合物將包含多醣共軛物抗原，其中多醣衍生自至少4、7、11、13、15或23血清型(見上述"本發明肺炎鏈球菌多醣抗原"一節，血清型之較佳組合依待治療之疾病而定)。

本發明之抗原性組合物最好呈疫苗組合物使用，供預防(或治療)肺炎球菌感染，特別對老年人與嬰幼兒。

本發明其他具體實施例包括：提供上述抗原性組合物用於醫藥；一種誘發對肺炎鏈球菌莢膜多醣共軛物之免疫反應之方法，其包括對患者投與安全且有效量之上述一種抗原性組合物之步驟；及以上述一種抗原性組合物於製造醫藥用於預防(或治療)肺炎球菌疾病之醫藥上之用途。

為了預防/改善老年人(55歲以上)族群肺炎及嬰兒(至18個月)及幼兒(典型指18個月至5歲)之中耳炎，本發明另一項較佳具體實施例為組合依本文所述調配之多價肺炎鏈球菌多醣共軛物與一種肺炎鏈球菌蛋白質或其免疫原性功能同等物。較佳蛋白質/蛋白質組合可參見上述"本發明肺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (24)

炎球菌蛋白質"一節。

上文說明之抗原性組合物(與疫苗)最好經過冷凍乾燥，直到臨用前為止，此時使用稀釋劑臨時重新組成。更佳者，其係於3D-MPL之存在下冷凍乾燥，臨時使用生理食鹽水溶液重新組成。

組合物冷凍乾燥形成更安定組合物(例如：防止多醣抗原分解)。此方法亦驚人地造成較高之抗體效價，仍可對抗肺炎球菌多醣。此點對PS 6B共軛物特別重要。因此本發明另一方面為冷凍乾燥之抗原性組合物，其包含PS 6B共軛物，使用3D-MPL為輔劑，且實質上不含以鋁為主之輔劑。

疫苗之製法參見上述"本發明疫苗製法"一節。

C)細菌性多醣-蛋白質D共軛物

組合疫苗之趨勢有利於降低接受者之不適感，有助於計劃投藥，並確實完成療程；但同時有降低疫苗效力之風險(見上文有關過度使用載體蛋白質而抑制抗原決定基之討論)。因此，宜製造符合族群需求，且其成份之間沒有免疫原性干擾問題之疫苗組合。這些優點可由本發明之免疫原性組合物(或疫苗)達成，其特別有利於投與組合疫苗給高危險群，如：嬰兒、幼兒及老年人。

本發明提供一種來自流感嗜血桿菌之蛋白質D，或其片段，作為以多醣為主之免疫原性組合物(包括疫苗)之載體。適用之片段包括含T-助手抗原決定基之片段。特定言之，蛋白質D片段最好包含蛋白質1/3 N-末端。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (25)

蛋白質 D 為來自流感嗜血桿菌之 IgD-結合性蛋白質 (EP 0 594 610 B1) 且為一種潛在免疫原。

包括在本發明內之蛋白質 D 共軛之多醣包括 (但不限於) : 對抗傷寒沙門氏菌之 Vi 多醣抗原, 腦膜炎球菌多醣 (包括 A、C、W135 與 Y 型, 及 B 群腦膜炎球菌之多醣與改質多醣), 來自金黃色葡萄球菌之多醣, 來自無乳鏈球菌之多醣, 來自肺炎鏈球菌之多醣, 來自分支桿菌之多醣, 例如: 結核分枝桿菌 (如: 甘露糖磷酸肌醇海藻糖、徽菌酸, 甘露糖封端之阿拉伯甘露聚糖, 其莢膜與阿拉伯半乳聚糖), 來自新型隱球菌之多醣, 非典型流感嗜血桿菌之脂多醣, 來自流感嗜血桿菌 b 之莢膜多醣, 莫拉氏菌 (*Moraxella catharralis*) 之脂多醣, 索氏志賀氏菌 (*Shigella sonnei*) 之脂多醣, 克魯士氏錐蟲 (*Trypanosoma cruzi*) 之脂肽磷酸糖苷 (LPPG), 與癌症有關之神經節醣脂 GD3, GD2, 與腫瘤有關之黏蛋白, 尤指 T-F 抗原、及唾液 T-F 抗原, 及結構上與 T-F 抗原相關之 HIV 結合多醣。

該多醣可依任何已知方法與載體蛋白質連接 (例如: 萊克哈特 (Likhite), 美國專利案 4,372,945 及阿莫 (Armor) 等人, 美國專利案 4,474,757)。最好進行 CDAP 共軛法 (WO 95/08348)。

CDAP 法中, 最好使用氰酸化劑 1-氰基-二甲胺基吡啶鎘四氟硼酸鹽 (CDAP) 來合成多醣-蛋白質共軛物。氰酸化反應可於相當溫和條件下進行, 其中避免水解對鹼敏感之多醣。此合成法可直接偶合載體蛋白質。

五、發明說明 (26)

多醣溶於水或生理食鹽水溶液中。CDAP溶於乙腈中，立即加至多醣溶液中。CDAP與多醣之羥基反應，形成氰酸酯。活化步驟之後，添加載體蛋白質。離胺酸之胺基與活化之多醣反應，形成異脲共價鏈結。

偶合反應之後，添加大量過量甘胺酸，中止殘留之活官能基之反應。產物隨後通過凝膠滲透法，排除未反應之載體蛋白質與殘留試劑。因此本發明提供一種製造多醣蛋白質D共軛物之方法，其包括活化多醣及連接多醣與蛋白質D之步驟。

本發明較佳具體實施例中，提供一種免疫原性組合物(或疫苗)調配物，供預防肺炎鏈球菌感染。

肺炎球菌散播至肺部、腦脊髓液及血液中之機轉尚未明瞭。到達正常肺泡之細菌生長會因其中相當乾燥而受抑制且受到肺泡巨噬細胞之吞噬活性而抑制其生長。這些協調性防衛機轉有任何組織上或生理上變化時，均會加強肺部感染之敏感性。肺炎鏈球菌之細胞壁在肺泡中產生免疫反應上扮演重要角色(基樂斯皮(Gillespie)等人(1997)，I&I 65:3936)。

典型地，本發明肺炎鏈球菌疫苗包含蛋白質D多醣共軛物，其中多醣衍生自至少4、7、11、13、15或23血清型。依待治療之疾病選擇較佳血清型組合時，可參見上文"本發明之肺炎鏈球菌多醣抗原"一節。

本發明另一項具體實施例中，提供一種腦膜炎奈氏球菌疫苗；特定言之選自血清型A、B、C、W-135與Y。腦膜

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (27)

炎奈氏球菌為細菌性腦膜炎最重要原因之一。此等生物體之碳水化合物莢膜可作為毒性決定子，且為保護性抗體之標的。儘管如此，已知碳水化合物在幼童體內為不良之免疫原，本發明提供一種特別適合此等多醣之蛋白質載體，蛋白質D，其提供之T-細胞抗原決定基可活化T-細胞反應，協助多醣抗原專一性B-細胞增殖與成熟，並誘發免疫記憶。

另一項本發明具體實施例中，提供流感嗜血桿菌b (PRP)-之莢膜多醣-蛋白質D共軛物。

本發明亦包括組合疫苗，其提供對抗多種不同病原菌之保護。蛋白質D載體驚人地適用為組合疫苗中之載體，其中使多重多醣抗原共軛。如上已述，若各多醣均採用相同載體時，抗原決定基抑制作用容易發生。WO 98/51339提出之組合物試圖將這種干擾降至最低，其作法為將組合物中一部份多醣與DT共軛，其餘與TT共軛。

本發明者已驚人地發現蛋白質D特別適合使組合疫苗中這種抗原決定基抑制效應降至最低。組合中一種或多種多醣宜與蛋白質D共軛，且最好所有抗原均與這種組合疫苗中蛋白質D共軛。

較佳組合包括提供保護對抗腦膜炎奈氏球菌C與Y(以Y較佳)感染之疫苗，其中由來自血清型Y與C(以A最佳)之多醣抗原連接蛋白質D。

以流感嗜血桿菌為主之疫苗 (PRP最好與TT、DT或CRM197共軛，或與蛋白質D共軛最佳)可採用上述組合疫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (28)

苗調配。

目前許多小兒科用疫苗均為組合疫苗，以減少兒童接受注射之次數。因此小兒科用疫苗可使用本發明疫苗調配其他抗原。例如：本發明疫苗可使用習知之"三價"組合疫苗調配，或分開但同時投藥，該三價組合疫苗包括白喉類毒素(DT)、破傷風類毒素(TT)及百日咳成份[典型為去毒性百日咳類毒素(PT)與絲狀血球凝素(FHA)，視需要使用白泰丁(pertactin; PRN)及/或凝集素1+2]，例如：疫苗商品INFANRIX-DTPaTM(史必克占生化公司(SmithKlineBeecham Biologicals))，其包含DT、TT、PT、FHA與PRN抗原，或使用全細胞百日咳成份，例如：史必克占生化公司上市之商品，如TritanrixTM。組合疫苗亦可包含其他抗原，如：B型肝炎表面抗原(HBsAg)、灰質炎病毒抗原(例如：去活性三價灰質炎病毒-IPV)、莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)外膜蛋白質、非典型流感嗜血桿菌蛋白質、腦膜炎奈氏球菌外膜蛋白質。

可包括在組合疫苗中之較佳莫拉氏菌蛋白質抗原實例(尤其用在預防中耳炎)為：OMP 106[WO 97/41731 (Antex)與WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA & LbpB [WO 98/55606 (PMC)]; TbpA & TbpB [WO 97/13785 & WO 97/32980 (PMC)]; CopB [ME 赫明(Helminen)等人, 1993, Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1/2 [WO 93/03761(德州大學)]; 及OmpCD。可包括在組合疫苗(尤其用於預防中耳炎)之非典型流感嗜血桿菌抗原實例包括：Fimbrin蛋白

五、發明說明 (29)

質 [(US 5766608-俄亥俄州研究基金會)] 及含其肽之融合物 [例如: LB1(f)肽融合物; US 5843464 (OSU)或WO 99/64067]; OMP26 [WO 97/01638(寇狄斯 (Cortecs)]; P6 [EP 281673 (紐約州立大學)]; TbpA與TbpB; Hia; Hmw1, 2; Hap; 及D15。

本發明涵括之較佳小兒科用疫苗為：

- a) 腦膜炎奈氏球菌多醣共軛物與流感嗜血桿菌b多醣共軛物，視需要使用腦膜炎奈氏球菌A及/或Y多醣共軛物，但其限制條件為至少一種多醣抗原，最好所有多醣抗原均與蛋白質D共軛。
- b) 疫苗a)含DT、TT、百日咳成份(以PT、FHA及PRN較佳)、B型肝炎表面抗原及IPV(去活性三價灰質炎病毒疫苗)。
- c) 與蛋白質D共軛之肺炎鏈球菌多醣抗原。
- d) 疫苗c)含一種或多種來自莫拉氏菌 (*Moraxella catarrhalis*)及/或非典型流感嗜血桿菌之抗原。

所有上述組合疫苗均宜包含蛋白質D作為載體。顯然地，組合疫苗中涉及愈多載體(例如為了克服抗原決定基抑制作用時)，最終疫苗產品愈昂貴且愈複雜。若使組合疫苗之所有或大多數多醣抗原與蛋白質D共軛，即可提供相當大功效。

為了預防老年人(55歲以上)族群之肺炎及嬰兒或幼兒之中耳炎，本發明較佳具體實施例為組合如本文說明之多價肺炎鏈球菌多醣-蛋白質D抗原與肺炎鏈球菌蛋白質或其免疫性功能同等物。有關這種組合可包括之較佳蛋白質/

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明（30）

蛋白質組合可參見上文"本發明之肺炎球菌蛋白質"一節。

因此本發明提供一種免疫性組合物，其包含肺炎鏈球菌多醣-蛋白質D共軛物與肺炎鏈球菌蛋白質抗原。

本發明多醣-蛋白質D共軛物抗原在本發明之疫苗調配物中最好使用輔劑。合適輔劑包括鋁鹽如：氫氧化鋁凝膠(alum)或磷酸鋁，但亦可為鈣、鐵或鋅之鹽，或可為醯化酪胺酸、或醯化糖類、陽離子性或陰離子性衍化多醣、或聚磷腈之不可溶性懸浮液。

老年人用疫苗中，輔劑最好選自優先誘發TH1型反應之誘發劑。

對特定Th1輔劑，可參見上文"本發明Th1輔劑"。

本發明另一方面提供以本文說明之免疫原或疫苗用於醫藥。

有關共軛物之疫苗製劑/投藥可參見上文"本發明之疫苗製劑"一節。

蛋白質D亦宜用在對抗中耳炎之疫苗中，因為其本身為一種免疫原，可產生受B細胞調節之保護作用，來對抗非典型流感嗜血桿菌(ntHi)。ntHi可侵襲宿主細胞，並逃避由蛋白質抗原誘發之受B細胞調節之效應。本發明者已驚人地發現一種提高作為中耳炎疫苗之抗原之蛋白質D(其本身或作為多醣之載體)有效性之方法。其作法為輔助蛋白質D，在個體中誘發強烈Th1反應，使受細胞調節之免疫系統分支達到對蛋白質D之最佳狀況。此點可採用含蛋白質D與Th1輔劑(以3D-MPL較佳)之冷凍乾燥組合物達成，

五、發明說明（31）

投藥之前不久方重新組成。因此，本發明亦提供這種組合物，一種製造這種組合物之方法（由含蛋白質D與Th1輔劑之混合物冷凍乾燥），及以此等組合物治療中耳炎之用途。

廣義而言，本發明者認為在Th1輔劑（較佳為3D-MPL）之存在下（參見“本發明之Th1輔劑”），使免疫原冷凍乾燥時，通常會加強對抗免疫原之Th1免疫反應。因此本發明適用於需要更強烈Th1免疫反應之任何免疫原。這種免疫原包括細菌性、病毒性及腫瘤蛋白質抗原，及自身蛋白質與肽。

實例

實例係說明本發明，但未限制本發明。

實例1

肺炎鏈球菌莢膜多醣

11-價候選疫苗包括莢膜多醣血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F與23F，其基本上依EP 72513所述製備。各多醣使用CDAP化學法活化及衍化(WO 95/08348)並與蛋白質載體共軛。所有多醣均呈其天然型共軛，但血清型3除外（其經過縮小，以降低其黏度）。

蛋白質載體：

選用之蛋白質載體為來自非典型流感嗜血桿菌且於大腸桿菌中表現之重組蛋白質D(PD)。

蛋白質D之表現

流感嗜血桿菌蛋白質D

五、發明說明 (32)

供表現蛋白質D之基因構築體

起始材料

編碼蛋白質D之DNA

蛋白質D在流感嗜血桿菌所有血清型及非典型菌株中均高度保留。含有編碼整個蛋白質D基因之DNA序列之媒介體 pHC348 來自瑞典 A、弗葛倫博士 (Dr. A. Forsgren, Department of Medical Microbiology, University of Lund, Malmo General Hospital, Malmö, Sweden)。蛋白質D之DNA序列已由強森 (Janson) 等人 (1991) 公開於 *Infect. Immun.* 59:119-125。

表現媒介體 pMG1

表現媒介體 pMG1 為 pBR322 之衍生物 (葛羅斯 (Gross) 等人, 1985), 其中引進用於轉錄及轉譯外來嵌插基因之衍生自細菌噬菌體 λ 之控制元素 (蕭茲曼 (Shatzman) 等人, 1983)。此外, 胺苳青黴素抗性基因改成康黴素抗性基因。

大腸桿菌菌株 AR58

大腸桿菌菌株 AR58 係由預先於 SA500 衍生物 (galE::TN10, λ Kil⁻ cI857 Δ H1) 上生長之 P1 噬菌體保存株轉導 N99 產生。N99 與 SA500 為大腸桿菌 K12 菌株, 來自國家衛生研究所馬丁洛森柏格實驗室 (Dr. Martin Rosenberg's laboratory at the National Institute of Health)。

表現媒介體 pMG 1

製造蛋白質D時, 編碼蛋白質D之DNA已選殖至表現載體 pMG 1 中。此質體利用來自 λ -噬菌體DNA之訊號指揮嵌

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (33)

插之外來基因進行轉錄與轉譯。該媒介體含有發動子 PL，操縱子 OL 及二個利用位置 (NutL 與 NutR)，當產生 N 蛋白質時，可解除轉錄之極性效應 (葛羅斯 (Gross) 等人，1985)。在大腸桿菌溶素原宿主中引進含 PL 發動子之媒介體，以安定質體 DNA。溶素原宿主菌株含有整合至基因組內之複製缺陷 λ -噬菌體 DNA (蕭茲曼等人，1983)。染色體 λ -噬菌體 DNA 指揮 cI 抑制劑蛋白質合成，該蛋白質與媒介體之 OL 抑制劑結合，且預防 RNA 聚合酶與 PL 發動子結合，藉以轉錄嵌插之基因。表現菌株 AR58 之 cI 基因含有對溫度敏感之突變株，因此 PL 指揮之轉錄作用可利用溫度變遷來調節，亦即提高培養溫度可使抑制劑不活化，並開始合成外來蛋白質。此表現系統控制外來蛋白質之合成，尤其對細胞有毒性之蛋白質 (Shimataka 與洛森柏格，1981)。

大腸桿菌菌株 AR58

用於製造蛋白質 D 載體之 AR58 溶素原大腸桿菌菌株為標準 NIH 大腸桿菌 K12 菌株 N99 之衍生物 (F^- su^- $galK2^-$ $lacZ^-$ thr^-)。其包含有缺陷之溶素原 λ -噬菌體 ($galE::TN10^-$ λ Kil^- $cI857^-$ $\Delta H1$)。Kil⁻ 表型防止宿主大分子停止合成。cI857 突變株使 cI 抑制劑對溫度敏感性受損。 $\Delta H1$ 刪除作用排除 λ -噬菌體右邊操縱子及宿主 bio、uvr3 與 chlA loci。AR58 菌株係由預先生長在 SA500 衍生物上之 P1 噬菌體保存株轉導 N99 產生 ($galE::TN10^-$ λ Kil^- $cI857^-$ $\Delta H1$)。利用出現在鄰接之 galE 基因中編碼四環素抗性之 TN10 基因移轉子，使用四環素選拔引進有缺陷溶素原之 N99。

五、發明說明 (34)

媒介體 pMGMDPPrD 之構築

採用含有編碼流感病毒之非結構性 S1 蛋白質 (pMGNSI) 之基因之 pMG 1 媒介體來構築 pMGMDPPrD。採用 PCR 法，由 pHC348 媒介體 (強森等人，1991) 使用 5' 及 3' 端分別含有 NcoI 與 XbaI 限制酶切割位置之 PCR 引子來擴增蛋白質 D 基因。在 pMGNSI 之 NcoI 與 XbaI 之間引進 NcoI/XbaI 片段，形成在 PD 蛋白質後含有 NS1 蛋白質之 N 末端 81 個胺基酸之融合蛋白質。此媒介體稱為 pMGNS1PrD。

根據上述構築體，產生表現蛋白質 D 之最終構築體。自 pMGNS1PrD 排除 BamHI/BamHI 片段。這種 DNA 水解作用排除] NS1 編碼區，但頭三個 N-末端殘基除外。當重新黏接媒介體時，產生具有下列 N-末端胺基酸序列之編碼融合蛋白質之基因。

-MDP SSHSSNMANT-

NS1 蛋白質 D

蛋白質 D 不含脂質鏈通常連接之前導肽或 N-末端半胱胺酸。因此蛋白質既未被排泄至胞外質亦未脂基化，而呈可溶型留在細胞質中。

利用 37°C 下之熱震盪，將最終構築體 pMG-MDPPrD 引進 AR58 宿主菌株中。於康黴素之存在下選拔含質體之細菌。由含特定內核酸酶之單離質體 DNA 分解，證明含有編碼 DNA 嵌段之蛋白質 D。重組體大腸桿菌菌株稱為 ECD4。

蛋白質 D 之表現係在 λP_L 發動子 / O_L 操縱子之控制下。宿主菌株 AR58 在基因組中含有對溫度敏感之 cI 基因，在低

五、發明說明 (35)

溫度下與 O_L 結合而阻斷 λP_L 表現。一旦溫度提高時，則自 O_L 釋出 cI ，且表現蛋白質 D。發酵結束時，細胞濃縮及冷凍。

依下列方法自所收集之細胞中萃取及純化蛋白質 D。冷凍之細胞培養物集結塊解凍，再懸浮於細胞瓦解溶液中（檸檬酸鹽緩衝液 pH 6.0），最後 $OD_{650}=60$ 。懸浮液在 $P=1000$ 巴下通過高壓均質器 2 次。細胞培養物均質液離心澄清，過濾排除細胞碎塊。在第一個純化步驟中，添加過濾之溶胞液至陽離子交換層析管柱（SP Sephadrose Fast Flow）。PD 利用離子交互作用與凝膠基質結合，並利用逐段提高離子強度之溶離緩衝液溶離。

第二個純化步驟中，雜質保留在陰離子交換基質上（Q Sepharose Fast Flow）。PD 不會結合在凝膠上，而於通過之流出液中收集。

這二個管柱層析步驟均以 OD 追蹤溶離份之收集情形。通過陰離子交換管柱層析法而含純蛋白質 D 之流出液經過超過濾法濃縮。

含蛋白質 D 之超過濾法保留液最後通過 0.2 微米膜。

化學：

活化與偶合作用化學：

各多醣具有特定活化及偶合條件。其示於表 1。取天然多醣（PS3 除外）溶於 2M NaCl 或注射用水中。評估所有血清型之最適當多醣濃度。

自 100 毫克 / 毫升乙腈之保存溶液中，取 CDAP (CDAP/PS

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂
線

五、發明說明 (36)

比例為 0.75 毫克 / 毫克 PS) 加至多醣溶液中。1.5 分鐘後，添加 0.2M 三乙胺，得到專一性活化 pH。多醣之活化作用在此 pH 下，25°C 下進行 2 分鐘。添加蛋白質 D (其用量依初始之 PS/PD 比例而定) 至活化多醣中，於此專一性 pH 下進行偶合反應 1 小時。於 25°C 下添加甘胺酸中止反應 30 分鐘，於 4°C 下過夜。

共軛物經凝膠過濾法使用 Sephacryl 500HR 凝膠過濾管柱 (先經 0.2M NaCl 平衡) 純化。

測定溶離份之碳水化合物與蛋白質含量。收集共軛物，經 0.22 微米無菌膜過濾除菌。測定共軛物製劑中 PS / 蛋白質比例。

特性：

鑑別各共軛物之特性且符合述於表 2 之說明。利用間苯二酚試驗法測定多醣含量 (微克 / 毫升)，利用勞瑞試驗法 (Lowry test) 測定蛋白質含量 (微克 / 毫升)。由濃度比例測得最終 PS/PD 比例 (w/w)。

殘留 DMAP 含量 (毫微克 / 微克 PS)：

使用 CDAP 活化多醣時，在多醣內引進一個氰酸根，釋出 DMAP (4-二甲胺基-吡啶)。利用於 SB 下展開之專一性分析法測定 DMAP 殘留量。

游離多醣含量 (%)：

保存在 4°C 下或在 37°C 下保存 7 天之共軛物經過與 α -PD 抗體及飽和硫酸銨培養後，離心，由得到之上澄液測定游離多醣含量。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明（37）

採用 α -PS/ α -PS ELISA 定量上澄液中之游離多醣。不含共軛物之對照組亦進行 α -PD/ α -PS ELISA。減少游離多醣含量時，可改善共軛物疫苗。

抗原性：

以夾心型 ELISA 分析相同共軛物上之抗原性，其中抗體之捕捉與檢測分別為 α -PS 與 α -PD。

游離蛋白質含量(%)：

採用 SDS 處理樣本，測定"游離"之殘留蛋白質 D 含量。共軛物於 SDS 0.1% 之存在下，於 100°C 下加熱 10 分鐘，注入 SEC-HPLC 凝膠過濾管柱 (TSK 3000-PWXL)。由於蛋白質 D 為二聚體，因此有可能因 SDS 解離結構而過度估計"游離"蛋白質 D 之含量。

分子大小 (K_{av})：

分子大小係於 SEC-HPLC 凝膠過濾管柱上進行 (TSK 5000-PWXL)。

安定性：

為保存在 4°C 下及保存在 37°C 下 7 天之共軛物，於 HPLC-SEL 凝膠過濾法上測定安定性 (TSK 6000-PWXL)。

11 價特性示於表 2。

蛋白質共軛物吸附於磷酸鋁上，收集形成最終疫苗。

結論：

已製成之免疫原性共軛物已證明為有成效之疫苗之成份。已為 11 價分別發現要得到最佳品質之最終共軛肺炎球菌多醣產品之最適當 CDAP 條件。依上述改良(最適化)

五、發明說明 (38)

CDAP法(無關載體蛋白質，但以蛋白質D較佳)得到之此等肺炎球菌多醣共軛物因而成為本發明另一方面。

實例2-改進輔劑對11價肺炎球菌PS-PD共軛物疫苗在嬰兒期老鼠體內之免疫原性之影響

對嬰兒期老鼠接種11價肺炎球菌PS-PD共軛物疫苗，劑量為各0.1微克多醣(根據實例1方法製造)，且採用下列輔劑調配：無、 $AlPO_4$ 、3D-MPL、3D-MPL吸附在 $AlPO_4$ 上。

11種抗原中，有5種僅使用3D-MPL之調配物在統計上(且驚人地)比使用其他調配物時具有更高免疫原性(最高GMC IgG)。此現象亦同時出現在高及低溫度3D-MPL時。

調理素細胞吞噬作用證實GMC結果。

材料與方法

免疫接種法

使嬰兒期OFA老鼠隨機分配給不同母親，於7天大時接受第一劑接種。14及28天後再接受2劑。第56天時，抽血(第III劑後28天)。所有疫苗均經皮下注射，每種疫苗組有10隻老鼠。

為老鼠接種11價肺炎球菌共軛物疫苗，其包含下列多醣血清型共軛在蛋白質D上：1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F、32F。

調配物

為了檢視不同改進輔劑之影響，共軛物劑量保持恆定在含0.1微克各多醣，輔劑 $AlPO_4$ 及3D-MPL則依不同劑量與組合調配，包括完全不使用輔劑。表3中以數字列表以供參

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 · 線

五、發明說明（39）

考。

吸附在 AlPO_4 上

根據下列方法製備濃縮之吸附單價。由 50 微克 AlPO_4 (pH 5.1) 與 5 微克共軛多醣混合 2 小時。pH 調至 5.1，混合物再靜置 16 小時。添加 1500 mM NaCl，使鹽濃度達 150 mM。5 分鐘後，添加 5 毫克/毫升 2-苯氧乙醇。再過 30 分鐘後，pH 調至 6.1，再置於 4°C 下 3 天以上。

稀釋液之製法

於 NaCl 150 mM/5 毫克/毫升苯氧乙醇中製備三種稀釋液：

A： AlPO_4 1 毫克/毫升

B：3D-MPL 吸附在 AlPO_4 上，分別為 250 及 1000 微克/毫升。3D-MPL/ AlPO_4 重量比 = 5/20

C：3D-MPL 吸附在 AlPO_4 上，分別為 561 及 1000 微克/毫升。3D-MPL/ AlPO_4 重量比 = 50/89

吸附之 11 價之製法

依正確比例混合 11 種濃縮之吸附 PS-PD 單價。以稀釋液 A 形式添加 AlPO_4 之補體。當需要時，以水溶液（未吸附，見下文方法 1）或稀釋液 B 或 C（3D-MPL 吸附在 AlPO_4 上，2 種劑量，見下文方法 2）添加 3D-MPL。

方法 1

以水性懸浮液形式添加 3D-MPL 至組合之吸附共軛物上。於室溫下與 11 價混合 10 分鐘，保存在 4°C 下直到投藥時為止。

方法 2

五、發明說明 (40)

先使3D-MPL吸附在 $AlPO_4$ 上，然後加至組合之吸附共軛物中(稀釋液B與C)。製備1毫升稀釋液時，取3D-MPL水性懸浮液(250或561微克)與1毫克 $AlPO_4$ 於150 mM NaCl pH 6.3中，於室溫下混合5分鐘。此溶液於NaCl pH 6.1/苯氧基中稀釋，於4°C下培養一夜。

未吸附之11價之製法

混合11種PS-PD共軛物，依正確比例於150 mM NaCl pH 6.1，苯氧基中稀釋。當需要時，以溶液形式(未吸附)添加3D-MPL。

所有注射用調配物均於第一次投藥前18天製備。

ELISA

採用WHO工作小組為了定量人體血清中對抗肺炎鏈球菌莢膜多醣之IgG抗體而採行之ELISA法來測定老鼠IgG。基本上，直接塗佈純化之莢膜多醣至微滴定板上。血清樣本先與所有肺炎球菌共有之細胞壁多醣(物質C)培養，根據文獻指出(EP 72513 B1)，其含量佔純化之肺炎球菌多醣約0.5%。採用傑克森免疫實驗室(Jackson ImmunoLaboratories Inc.)試劑檢測已結合之鼠類IgG。效價曲線係參考內標準(單株抗體)，依對數方程式構成。採用SoftMax Pro軟體進行計算。此等結果之最大絕對誤差應在因數2以內。相對誤差小於30%。

調理素細胞吞噬作用

採用CDC法(採用分化HL60細胞，1.1版進行肺炎鏈球菌調理素細胞吞噬作用)，使用純化之人類PMN及幼兔補體測定血清型3、6B、7F、14、19F與23F之調理素效價。修飾

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (41)

法包括使用內部自有之肺炎球菌菌株，吞噬細胞性HL60細胞改為純化之人類嗜中性PMN(其與吞噬性細胞之間有高度相關性)。此外，添加3毫米玻璃珠至微滴定孔中，提高混合效果，此作法可使吞噬細胞：細菌比例降至建議之400。

結果

IgG濃度

為每種血清型測定IgG濃度幾何平均值，且PD示於表4至10。對血清型6B、14、19F及23F，過去採用四價調配物得到之結果亦包括在內，以供比較。

表4至10中特別加黑標出最高IgG濃度。3D-MPL組合物對3D-MPL/ $AlPO_4$ 組合物之統計p值示於表11。輔劑調配物4號(含高劑量3D-MPL之未吸附共軛物)在11項中使9項產生最高GMC。11項中有5項使低劑量MPL為第二天免疫原。此外，對所血清型而言，使用輔劑提供之GMC高於改變劑量所得之GMC(未出示數據)，此點在血清型4、6B、7F、18C及23F中具統計顯著性(95% CI $p < 0.05$)。

調理素細胞吞噬作用

所收集血清於血清型3、6B、7F、14、19F與23F進行之調理素細胞吞噬作用結果示於表4至8。此等調理素效價確認了GMC IgG。的確，血清型6B、19F、23F與IgG濃度之相關性大於85%(未出示數據)。對血清型3而言，應注意只有3D-MPL組誘發之調理素活性超過閾值。

結論

此實驗中，意外發現僅使用3D-MPL時可誘發最高IgG濃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (43)

PS肺炎鏈球菌-蛋白質D共軛物之專一性活化/偶合/中止

反應條件

血清型	1	3 (μ fluid.)	4	5	6B	7F
PS濃度 (毫克/毫升)	2.0	3.0	2.0	7.5	5.4	3.0
PS溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	H ₂ O	NaCl 2M	NaCl 2M
PD濃度 (毫克/毫升)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
PS/PD初比例 (w/w)	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
CDAP濃度 (毫克/毫克PS)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _e =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0

血清型	9V	14	18C	19F	23F
PS濃度 (毫克/毫升)	2.5	2.5	2.0	4.0	3.3
PS溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	H ₂ O	NaCl 2M	NaCl 2M
PD濃度 (毫克/毫升)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
PS/PD初比例 (w/w)	1/0.75	1/0.75	1/1	1/0.5	1/1
CDAP濃度 (毫克/毫克)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
pH _a =pH _e =pH _q	8.5/8.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	10/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0

表 2：11 價肺炎球菌 PS-PD 疫苗說明(第一排批號代表血清型)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (44)

標準	D01PDJ227	D03PDJ236	D4PDJ228	D5PDJ235	D6PDJ209	
PS/蛋白質比例(w/w)	1/0.66	1/1.09	1/0.86	1/0.86	1/0.69	
游離多醣含量(%) <10%	1	1	7	9	0	
游離蛋白質含量 (%)<15%	8	<1	19	21	9	
DMAP含量(毫微克/微克PS) <0.5毫微克/微克PS	0.2	0.6	0.4	1.2	0.3	
分子大小(K _{av})	0.18	0.13	0.12	0.11	0.13	
安定性	無變遷	無變遷	無變遷	低度變遷	無變遷	
	D07PDJ225	D09PD222	D14PDJ202	D18PDJ221	D19PDJ206	D23PDJ212
PS/蛋白質比例(w/w)	1/0.58	1/0.80	1/0.068	1/0.62	1/0.45	1/0.74
游離多醣含量(%) <10%	1	<1	<1	4	4	0
游離蛋白質含量 (%)<15%	8	0.3	3	21	10	12
DMAP含量(毫微克/微克PS) <0.5毫微克/微克PS	0.1	0.6	0.3	0.2	0.1	0.9
分子大小(K _{av})	0.14	0.14	0.17	0.10	0.12	0.12
安定性	無變遷	無變遷	無變遷	無變遷	有變遷	無變遷

表 3：11 價肺炎球菌 PS-PD 於嬰兒期老鼠體內之輔劑調配物試驗綜合表

組別	AIPO4	MPL	方法	說明
1				無
2	100			AIPO4
3		5		MPL 低
4		50		MPL 高
5	100	5	方法 1	方法 1 低
6	100	50	方法 1	方法 1 高
7	100	5	方法 2	方法 2 低
8	100	50	方法 2	方法 2 高

五、發明說明 (45)

表 4. 嬰兒期老鼠接受使用不同輔劑之 11 價 PS-PD 接種第 III 劑後 28 天時血清型 6B IgG 濃度幾何平均值、血清轉化率、及平均調理素效價 (與四價接種疫苗比較)

組別	AIPO4 微克	MPL 微克	方法	6B GMC IgG (微克/毫升)	6B 血清轉 化率	6B 調理素 效價*	6B GMC IgG (微克/毫升)	6B 血清轉 化率	6B 調理素 效價*
				四價			十一價		
1				0.047	2/10	12.5	0.004	1/10	<6.25
2	100			0.048	4/10	65	0.019	4/10	<6.25
3		5					1.345	10/10	43
4		50					4.927	10/10	192
5	100	5	1				0.042	7/10	<6.25
6	100	50	1				0.255	10/10	<6.25
7	100	5	2	0.033	3/10	<6.25	0.048	8/10	<6.25
8	100	50	2				0.057	8/10	<6.25

表 5. 嬰兒期老鼠接受使用不同輔劑之 11 價 PS-PD 接種第 III 劑後 28 天時血清型 14 IgG 濃度幾何平均值、血清轉化率、及平均調理素效價 (與四價接種疫苗比較)

組別	AIPO4 微克	MPL 微克	方法	14 GMC IgG (微克/毫升)	14 血清轉 化率	14 調理素 效價*	14 GMC IgG (微克/毫升)	14 血清轉 化率	14 調理素 效價*
				四價			十一價		
1				0.046	3/10	64	0.022	3/10	<6.25
2	100			0.99	10/10	88	0.237	8/10	27
3		5					0.233	10/10	41
4		50					0.676	10/10	81
5	100	5	1				0.460	9/10	67
6	100	50	1				0.477	10/10	98
7	100	5	2	0.81	10/10	49	0.165	8/10	81
8	100	50	2				1.611	10/10	133

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (46)

表 6. 嬰兒期老鼠接受使用不同輔劑之 11 價 PS-PD 接種第 III 劑後 28 天時血清型 19F IgG 濃度幾何平均值、血清轉化率、及平均調理素效價 (與四價接種疫苗比較)

組別	AlPO4 微克	MPL 微克	方法	19F GMC IgG (微克/毫升)	19F 血清轉 化率	19F 調理素 效價*	19F GMC IgG (微克/毫升)	19F 血清轉 化率	19F 調理素 效價*
				4價			11價		
1				0.04	2/10	64	0.021	2/10	<6.25
2	100			1.07	9/10	367	0.222	7/10	79
3		5					4.028	10/10	296
4		50					21.411	10/10	1276
5	100	5	1				1.649	10/10	172
6	100	50	1				2.818	10/10	208
7	100	5	2	1.09	10/10	193	0.766	10/10	323
8	100	50	2				3.539	10/10	241

表 7. 嬰兒期老鼠接受使用不同輔劑之 11 價 PS-PD 接種第 III 劑後 28 天時血清型 23F IgG 濃度幾何平均值、血清轉化率、及平均調理素效價 (與四價接種疫苗比較)

組別	AlPO4 微克	MPL 微克	方法	23F GMC IgG (微克/毫升)	23F 血清轉 化率	23F 調理素 效價*	23F GMC IgG (微克/毫升)	23F 血清轉 化率	23F 調理素 效價*
				4價			11價		
1				0.06	2/10	<6.25	0.152	3/10	<6.25
2	100			0.29	10/10	70	0.56	8/10	<6.25
3		5					2.296	9/10	389
4		50					4.969	10/10	>1600
5	100	5	1				0.462	5/10	17
6	100	50	1				0.635	8/10	54
7	100	5	2	0.38	10/10	<6.25	0.203	3/10	18
8	100	50	2				0.501	7/10	43

五、發明說明 (47)

表 8. 嬰兒期老鼠接受使用不同輔劑之 11 價 PS-PD 接種第 III 劑後 28 天時血清型 3 與 7F IgG 濃度幾何平均值、血清轉化率、及平均調理素效價

組別	AIPO4 微克	MPL 微克	方法	3 GMC IgG (微克/毫升)	3 血清轉 化率	3 調理素 效價*	7F GMC IgG (微克/毫升)	7F 血清轉 化率	7F 調理素 效價*
1				0.003	1/10	<6.25	0.040	7/10	<6.25
2	100			0.008	6/10	<6.25	0.25	9/10	43
3		5		0.070	10/10	<6.25	2.435	10/10	477
4		50		0.108	10/10	18	2.569	10/10	332
5	100	5	1	0.015	10/10	<6.25	0.579	10/10	54
6	100	50	1	0.027	10/10	<6.25	0.611	9/10	59
7	100	5	2	0.006	10/10	<6.25	0.154	8/10	30
8	100	50	2	0.034	10/10	<6.25	0.638	9/10	140

表 9. 嬰兒期老鼠接受使用不同輔劑之 11 價 PS-PD 接種第 III 劑後 28 天時血清型 3 與 1, 4 與 5 IgG 濃度幾何平均值、血清轉化率、及平均調理素效價

組別	AIPO4 微克	MPL 微克	方法	1 GMC IgG (微克/毫升)	1 血清轉 化率	4 GMC IgG (微克/毫升)	4 血清轉 化率	5 GMC IgG (微克/毫升)	5 血清轉 化率
1				0.026	4/10	0.005	0/10	0.040	3/10
2	100			0.282	8/10	0.052	5/10	0.774	9/10
3		5		1.614	10/10	3.452	10/10	7.927	10/10
4		50		2.261	10/10	7.102	10/10	13.974	10/10
5	100	5	1	0.568	10/10	0.676	10/10	3.015	10/10
6	100	50	1	1.430	10/10	0.419	9/10	5.755	10/10
7	100	5	2	0.478	10/10	0.267	9/10	2.062	10/10
8	100	50	2	1.458	10/10	0.423	10/10	5.009	10/10

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (48)

表 10. 嬰兒期老鼠接受使用不同輔劑之 11 價 PS-PD 接種第 III 劑後 28 天時血清型 9V、18C 與 PD IgG 濃度幾何平均值、血清轉化率、及平均調理素效價

組別	AIPO4 微克	MPL 微克	方法	9V GMC IgG (微克/毫升)	9V 血清轉 化率	18C GMC IgG (微克/毫升)	18C 血清轉 化率	PD GMC IgG (微克/毫升)	PD 血清轉 化率
1				0.018	0/10	0.013	1/10	0.003	0/10
2	100			0.489	6/10	0.092	5/10	0.993	10/10
3		5		0.482	7/10	6.560	10/10	3.349	10/10
4		50		11.421	10/10	14.023	10/10	5.446	10/10
5	100	5	1	2.133	9/10	0.690	10/10	11.407	10/10
6	100	50	1	2.558	10/10	1.771	10/10	1.258	10/10
7	100	5	2	1.536	10/10	0.528	10/10	1.665	8/10
8	100	50	2	2.448	9/10	0.980	10/10	5.665	10/10

表 11. 當單獨使用 3D-MPL 相對於使用 3D-MPL/AIPO4 來調配時是否改良某些肺炎球菌多醣共軛物之免疫原性之統計顯著性 (p 值)。p 值小於 0.01 則視為高顯著性。方法 1 與方法 2 代表調配方法。

血清型	50 μ g 3D-MPL v 3D-MPL/AIPO4		50 μ g 3D-MPL vs 3D-MPL/AIPO4	
	方法 1	方法 2	方法 1	方法 2
1	0.3	0.05	0.079	0.11
3	0.075	0.01	0.27	0.008
4	0.002	0.0003	0.02	0.003
5	0.04	0.002	0.1	0.12
6B	0.001	0.0001	0.001	0.0006
7F	0.13	0.15	0.01	0.005
9V	0.02	0.02	0.1	0.04
14	0.65	0.21	0.3	0.66
18C	0.0008	0.0002	0.006	0.004
19F	0.0009	0.006	0.21	0.04
23F	0.002	0.0004	0.01	0.004

五、發明說明 (49)

表12：對成鼠單獨接種1.0微克多醣-蛋白質D共軛物或與四價、五價、七價或十價疫苗組合接種第2劑後14天時IgG濃度幾何平均值(微克/毫升)。這些數據係來自5次分開實驗之組合。

血清型	4	6B	18C	19F	23F
疫苗	H	T	H	T	T
單獨	9.3	0.11	15	5.2	2.5
組合	4	0.23	3.7	3.7	2.8

T：與四價(T)(PS 6B、14、19F、23F)、五價(T加PS 3)、七價(H)(T加PS 4、9V與18C)及十價(H加PS 1、5與7F)組合之疫苗。
H：與七價(H)(T加PS 4、9V與18C)及十價(H加PS 1、5與7F)組合之疫苗。

實例4-添加肺炎球菌自溶酶與3D-MPL對PD-共軛11價多醣疫苗對抗肺炎球菌於小白鼠肺部群集之保護性效力之效益免疫解析

肺炎球菌自溶酶-專一性血清IgG之ELISA劑量

於37°C下在Maxisorp Nunc免疫分析板上，以於PBS中稀釋之2微克/毫升重組體天然肺炎球菌自溶酶(PLY)塗佈2小時，每孔100微升。以NaCl 0.9% Tween-20 0.05%緩衝液洗滌板子3次。然後添加一系列2倍稀釋液(含於PBS/Tween-20 0.05%，每孔100微升)之抗PLY血清參考物作為標準曲線(自670毫微克/毫升IgG開始)及添加血清樣本(自1/10稀釋度開始)，於20°C及攪拌下培養30分鐘。依前述方法洗滌後，取於PBS/Tween-20 0.05%中稀釋5000x之過氧化酶共軛山羊抗-小白鼠IgG(傑克森(Jackson)公司)於20°C及攪拌

五、發明說明 (50)

下培養30分鐘(100微升/孔)。洗滌後，板子於室溫下與100微升/孔展開緩衝液(revelation buffer)(OPDA 0.4毫克/毫升與H₂O₂ 0.05%含於100 mM pH 4.5檸檬酸緩衝液中)培養15分鐘。添加50微升/孔1N HCl中止展開反應。於490及620 nm下，利用Emax免疫讀數機(分子儀器公司(Molecular Devices))讀取光密度。採用SoftMaxPro軟體進行四參數計算法計算抗體效價。

溶血抑制作用

進行此分析法，測定血清抗體抑制肺炎球菌自溶酶(PLY)溶血活性之能力。為了去除膽固醇(容易與PLY交互作用)，依下列方法處理血清樣本2次：與1份等體積氯仿混合後，於攪拌下培養45分鐘。於1000 rpm下離心10分鐘後收集上澄液。於96孔微滴定板(Nunc公司)中稀釋已清除膽固醇之血清(於1 mM二硫代異赤蘚糖醇，0.01% BSA，15 mM TRIS，150 mM NaCl，pH 7.5中系列稀釋2倍)。在各孔中添加50微升含4 HU(溶血單位)PLY之溶液，於37°C下培養15分鐘。然後添加100微升綿羊紅血球細胞(1%溶液)，於37°C下30分鐘。於1000 rpm下離心10分鐘後，收集上澄液(150微升)，置入另一個96孔微滴定板中，於405 nm下讀取吸光度。結果以中點稀釋效價表示。

肺炎球菌自溶酶化學去毒性法

取重組體天然肺炎球菌自溶酶(PLY)相對於50 mM磷酸鹽，500 mM NaCl pH 7.6緩衝液透析。下列所有步驟均於39.5°C下，在偶爾攪拌下完成。第1天，添加Tween 80

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (51)

10%(1/250 v/v)，N-乙醯基色胺酸 57.4 mM PH 7.6(3/100 v/v)，2.2 M甘胺酸之磷酸鹽緩衝液溶液(1/100 v/v)及10%甲醛之磷酸鹽緩衝液溶液(3/100 v/v)至PLY溶液中。第2及3天時，再依3/100與2/100 v/v比例分別添加10%甲醛。續於39.5°C下及偶爾攪拌下培養至第7天。最後由PLY相對於50 mM磷酸鹽500 mM NaCl pH 7.6緩衝液透析。於溶血分析法中證明PLY完全不活化。

由OF1小白鼠經鼻內接受肺炎球菌挑戰

取7週大OF1雌性小白鼠於麻醉下經鼻內接種 5×10^5 CFU經小白鼠適應之肺炎鏈球菌血清型6B。接種後6小時，取出肺部，於妥德-海威特營養液(Todd Hewith Broth)(THB，奇布可公司(Gibco))培養基中均質化(Ultramax, 24000 rpm, 4°C)。將一系列稀釋10倍之肺均質液於37°C下塗佈在補充酵母萃物之THB洋菜之培養皿上一夜。以CFU/隻小白鼠數值測定肺炎球菌肺部感染程度，以對數重量平均值表示。檢測限值為2.14 log CFU/隻。

實例4A 3D-MPL輔劑對於抗肺炎球菌自溶酶免疫反應之影響

本實例中，評估3D-MPL輔劑對針對天然重組肺炎球菌自溶酶(PLY，由澳洲北亞大萊德兒童醫院之J.培頓(J. Paton, Children's Hospital, North Adelaide, Australia)提供)及其化學性去毒性相對物質之免疫反應之影響(DPLY)。化學去毒性法如上述。

每組10隻6週大Balb/c小白鼠於第0、14及21天時，經

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

五、發明說明 (52)

肌內接種1微克PLY或DPLY，其含在A：AlPO₄ 100微克；或B：AlPO₄ 100微克+5微克3D-MPL(3-去-O-醯基單磷醯基脂質A，由里必免疫化學公司(Ribi Immunochem)供應)中。圖1A與1B出示第III劑之後血清中測得之ELISA IgG與溶血抑制作用。

無論何種抗原，接受補充3D-MPL之調配物接種之動物可誘發最佳免疫反應。值得注意的是，當投與AlPO₄+3D-MPL時，DPLY與PLY同樣具免疫原性，而在AlPO₄調配物中，DPLY則為較弱之免疫原。此點表示3D-MPL有能力改善對去毒性之肺炎球菌自溶酶之抗體反應。

在含肺炎球菌自溶酶之組合物中，可能最好使用經化學方法去毒性之肺炎球菌自溶酶，而不使用經突變法去毒性之肺炎球菌自溶酶。此乃因目前可得到之去毒性突變株仍有殘留毒素活性，而經化學方法去毒性之肺炎球菌自溶酶則沒有。因此本發明另一方面一般而言為包含經化學方法去毒性之肺炎球菌自溶酶(或肺炎球菌自溶酶突變株)之組合物於疫苗中之用途，應以Th1輔劑(以3D-MPL較佳)為輔劑。這種組合物由本發明提供。亦涵括一種在免疫原性組合物中，提高經化學方法去毒性之肺炎球菌自溶酶之免疫反應之方法，其包括添加Th1輔劑(以3D-MPL較佳)至組合物中之步驟。

實例4B 添加肺炎球菌自溶酶之減毒突變株與3D-MPL輔劑對PD-共軛11價多醣疫苗對抗肺炎球菌在經鼻內接種血清型6B挑戰之OF1小白鼠肺內群集之保護效力之影響

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (53)

本實例中，吾等評估含11價多醣-蛋白質D共軛物、滅毒突變株肺炎球菌自溶酶抗原(PdB, WO 90/06951)與AIPO4+3D-MPL輔劑之疫苗之預防效力，與傳統之吸附AIPO4 11價多醣-蛋白質D共軛物調配物之預防效力比較。

於第0及14天，對每組12隻4週大OF1雌性小白鼠經皮下接種調配物，其含A：50微克AIPO4；及B：0.1微克PS/PD之血清型-共軛11價多醣疫苗+50微克AIPO4；或C：0.1微克PS/PD之血清型-共軛11價多醣疫苗+10微克PdB(由澳洲北亞大萊德兒童醫院J.培頓提供)+50微克AIPO4+5微克3D-MPL(由里必免疫化學公司供應)。依上述，於第21天時接受挑戰。

如圖1C所示，由補充PdB且以AIPO4+MPL為輔劑之11價多醣共軛物疫苗提供極顯著保護作用($p < 0.007$)(黑長條代表算術平均值)。反之，接受11價多醣共軛物/AIPO4調配物接種之動物未觀察到顯著保護作用。此結果證明添加肺炎球菌自溶酶抗原(甚至經過滅毒)及3D-MPL輔劑可加強11價多醣共軛物疫苗對抗肺炎之效力。

實例4C 實例4B所示保護作用與免疫性之相關性

為了建立實例4B，由滅毒突變株肺炎球菌自溶酶(PdB)與3D-MPL補充11價多醣共軛物疫苗所提供保護作用與免疫性之相關性，依上述說明測定預先經過挑戰之血清對多醣6B與PdB之抗體反應。

然後在挑戰後6小時，在所收集之相應動物肺部所測定抗體效價與細菌群落數比較。於對數/對數線性迴歸上計算 R^2 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (54)

由抗PdD與抗-6B抗體反應計算得到之 R^2 分別等於0.18與0.02。此結果顯示體液免疫反應與二種抗原之保護作用之間沒有相關性。接受11價共軛物疫苗(GMT=0.318毫微克/毫升)接種或接受此相同疫苗並補充PdD與3D-MPL(GMT=0.458毫微克/毫升)接種之試驗組中，抗-6B抗體效價並沒有顯著不同。因此，出現在調配物C之改良之保護作用並不只因為其對多醣6B具有較高抗體反應所致。

總言之，其結果顯示該保護作用不只受到體液免疫反應單獨調節，亦受到3D-MPL存在下PdB抗原所誘發之細胞調節之免疫性調節。此點進一步支持添加蛋白質抗原與強力輔劑至肺炎球菌多醣共軛物疫苗中之作法，使二個免疫系統分支互相協調達最適當保護作用。

實例5-經肺炎球菌自溶酶主動免疫及經對抗肺炎球菌PS之抗體被動免疫之小白鼠之免疫系統二種分支之協同性

實例5A-探討被動接種抗6B-多醣(抗-PS)抗體提供保護對抗肺炎之濃度

方法

疫苗組：取4組各16隻小白鼠於第-1天，根據下列分組(共64隻)，接受100微升未稀釋之老鼠抗多醣抗血清被動免疫(i.p.)。

組別	專一性	抗血清中IgG濃度
G1	α -PS-6B	5微克/毫升
G2	α -PS-6B	2微克/毫升
G3	α -PS-6B	0.75微克/毫升
G4	對照組	0微克/毫升

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

五、發明說明 (55)

動物：來自加拿大查理士李佛公司(Charles River)之64隻雄性CD-1小白鼠，重約35克(約10週大)。

麻醉：以異氟烷(3%)加O₂(1升/分鐘)麻醉小白鼠。

生物體：自補充5%馬血之胰蛋白酶大豆洋菜板(TSA)中收集肺炎鏈球菌N1387(血清型6)，懸浮於6毫升PBS中。在即將感染之前，取1毫升細菌懸浮液稀釋至9毫升冷卻融化之營養培養基(BBL)中，保存在41°C。小白鼠接受含在50微升體積中之約6.0 log₁₀ cfu/小白鼠。

感染：第0天時，依上述麻醉小白鼠，經由非手術性之氣管內插管，在支氣管內滴入肺炎鏈球菌N1387(50微升冷卻之細菌懸浮液)進行感染。此方法說明於伍納德(Woodnut)與貝里(Berry)(Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43:29 (1999))。

樣本：感染後第3天時，以過度劑量CO₂殺死8隻小白鼠/組，切下肺部1於1毫升PBS中均質化。於PBS中製備10倍之系列稀釋液，來計算存活之細菌數目。樣本依三重覆接種(20微升)至補充5%馬血之TSA板上，於37°C下培養一夜後才分析。其他組小白鼠則於第7天殺死，並如上述取樣。

結果：

老鼠血清IgG濃度 (微克/毫升)	細菌數(感染後天數之log ₁₀ cfu/個肺)	
	3	8
5	6.7 ± 0.7(1/7)	7.2 ± 0.7(5/8)
2	6.5 ± 0.7(1/7)	6.9 ± 1.8(4/7)
0.75	7.7 ± 0.5(5/8)	4.8 ± 1.4(2/8)
0	6.7 ± 1.5(3/6)	6.3 ± 1.5(3/9)

括號中之數據為在取樣時間之前死亡之動物數目。

結論：一般而言，任何處理組之間之細菌單離株數目沒有

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (56)

顯著差異。此顯示抗多醣在至高(含)5微克/毫升之濃度下仍無可測得之保護作用。

此點同樣出現在有些人體臨床試驗中，亦即抗多醣抗體不足以在某些族群中保護對抗肺炎球菌肺炎。

實例5B-測定使用或不使用輔劑主動接種Ply(肺炎球菌自溶酶)時，及使用次佳之抗PS抗體作為增效劑時，對抗肺炎之保護作用

方法

動物：128隻雄性CD-1小白鼠(接種時6週大，感染時10週大)來自加拿大查理士李佛公司(Charles River, St Constant, Quebec, Canada)。動物在6週大時重約20克，10週大時重38克。

免疫接種：6組各16隻小白鼠於第-22天及-14天時，經皮下注射100微升下說明之疫苗(共128隻小白鼠)。PdB(WO 90/06951)得自澳洲J.培頓博士之贈與。3D-MPL則來自里必/柯利沙公司(Ribi/Corixa)。

第-1天時，以濃度4.26微克/毫升(4毫升5微克/毫升+1.3毫升2微克/毫升)小白鼠抗多醣抗體為特定處理組(見下表)被動免疫接種(i.p. 100微升)。

組別	主動免疫 注射體積	於第-22天及-14天投與疫 苗(劑量微克)	被動免疫 注射體積	被動免疫IgG (第-1天)
1-1	100微升s.c.	PdB/AIPO4(10/50)		無
1-2	100微升s.c.	PdB/MPL/AIPO4(10/5/50)		無
1-3	100微升s.c.	PdB/AIPO4(10/50)	100微升i.p.	α -PS
1-4	100微升s.c.	PdB/MPL/AIPO4(10/5/50)	100微升i.p.	α -PS
1-5	100微升s.c.	PdB/AIPO4(5/50)	100微升i.p.	α -PS
1-6	100微升s.c.	PdB/AIPO4(5/50)		無

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (57)

感染：第0天時，麻醉小白鼠(3%異氟烷加1升/分鐘O₂)。細菌接種菌之製法為自補充5%馬血之胰蛋白酶大豆洋菜板(TSA)中收集肺炎鏈球菌N1387(血清型6)，懸浮在6毫升PBS中。即將感染之前，於冷卻之融化營養素洋菜中(保持41°C)製備10倍稀釋液(1毫升加9毫升)。小白鼠經由氣管內插管，在支氣管內滴注，接受含於50微升體積中約6.0 log₁₀ cfu/隻小白鼠感染。此方法說明於伍納德(Woodnut)與貝里(Berry)(Antimicrob. Ag. Chemotherap. 43:29 (1999))。

樣本：感染後72小時，以過度劑量CO₂殺死8隻小白鼠/組，切下肺部1於1毫升PBS中均質化。於PBS中製備10倍之系列稀釋液，來計算存活之細菌數目。樣本依三重覆接種(20微升)至補充5%馬血之TSA板上，於37°C下培養一夜後才分析。其他組小白鼠則於感染後第8天殺死，並如上述取樣。

數據分析

以感染後3天及7天時肺部中細菌數目來比較處理結果。結果以組平均值與標準偏差表示。採用史都登氏t-試驗(Students t-test)進行統計分析，其中p<0.05則視為顯著。

結果：

感染後72小時

I-4組之細菌數顯著低於I-3組(p<0.05)。

I-4組之細菌數顯著低於I-5組(p<0.05)。

感染後168小時

第8天時，各組之細菌數比第3天時低約2 logs，此表示

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (58)

已消除感染。

I-2 組之細菌數顯著低於 I-5 組 ($p < 0.05$)。

組別	第3天		第8天	
	Log CFU/個肺	標準偏差	Log CFU/個肺	標準偏差
I-1	6.93	0.61	5.23	1.28
I-2	6.59	1.25	4.08	1.34
I-3	7.09	0.8	5.32	1.26
I-4	6.09	1.43	4.46	2.32
I-5	7.19	0.89	5.42	1.05
I-6	6.68	1.14	5.01	1.48

如上所示，單獨抗多醣抗體一者 (I-5 組) 無法提供對抗肺中肺炎球菌生長之保護。以 AIPO4 為輔劑之 PdB 亦未產生保護作用，但當 PbB 與 3D-MPL 組合時，於第 8 天時則有保護傾向 (I-2 組)。

第 3 天時，保護作用最顯著之 I-4 組含有所有三種元素 PdB、3D-MPL 及被動接種之抗多醣抗體。死亡率即可支持此結論。I-4 組有 2/8 死亡，而 I-5 與 I-3 組則為 5/10。

結論：

由於本實驗採用被動免疫之動物進行，因此亦經肺炎球菌自溶酶與 MPL 主動免疫之增效效應之原因可能不是對抗多醣抗原之抗體含量增加所致。

當動物僅接受對抗肺炎球菌多醣被動免疫時，這種抗體在第 8 天時之含量已自宿主體內大部份消除。

儘管如此，接受肺炎球菌自溶酶加 3D-MPL 免疫接種之試驗組仍可能有對抗肺炎球菌肺之顯著保護作用，尤其在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (59)

接種肺炎球菌自溶酶加3D-MPL加被動免疫接種多醣抗體之試驗組，此表示此組合有增效作用。

若抗多醣免疫接種為主動免疫接種(最好使用共軛多醣)，該效應可能會顯著，如同B細胞記憶效應，且恆定之抗PS抗體含量將會造成免疫反應協同效果(見例如：圖1C，其中許多接受多醣與蛋白質之動物在接受細菌挑戰後，肺部並未出現細菌)。

實例6-11價肺炎球菌-多醣蛋白質D共軛物疫苗以3D-MPL為輔劑時，在1歲大BalB/C小白鼠體內之免疫原性

緒言與目的

對抗肺炎球菌感染之保護作用係利用血清型專一性抗體透過調理素細胞吞噬作用調節。據推測，抗體濃度增加將產生更大保護效果，因此更積極尋求可提高體液反應之方法。其中一種在臨床前試驗中已成功用於共軛物疫苗之方法為使用免疫刺激性輔劑(其概論可參見普曼(Poolman)等人，1998，"以碳水化合物為主之細菌性疫苗"(Carbohydrate-Based Bacterial Vaccines)，述於"實驗醫藥學手冊"(Handbook of Experimental Pharmacology)，P. 普爾曼(Perlmann)與H. 威希爾(Wigzell)編輯，德國海德堡史普林格出版社(Springer-Verlag))。

此小節出示之數據顯示在模擬臨床試驗而設計之方法中採用臨床套組得到之最近實驗結果。

方法：

以1/10人類劑量之肺炎球菌-多醣蛋白質D共軛物疫苗或23價單純多醣疫苗為1歲大balb/c小白鼠免疫接種。採用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明(60)

之疫苗為臨床套組DSP009、DSP013或DSP014，分別相當於1微克劑量血清型6B與23F及5微克11-價共軛物疫苗中其餘血清型，0.1微克劑量11-價共軛物疫苗，或0.1微克劑量11-價共軛物疫苗使用5微克3D-MPL為輔劑。所有11-價共軛物疫苗亦以50微克AlPO₄為輔劑。

每組20隻小白鼠經肌內免疫接種。於第0及21天時，依下表所示為各組注射接種。第35天(第II劑之後14天)時得到試驗血樣。

表：接受肺炎球菌-多醣蛋白質D共軛物疫苗之臨床套組免疫接種之1歲大Balb/c小白鼠之接種計劃

組別	第0天 疫苗 第1劑	第21天 疫苗 第2劑	小白鼠 數目
1	Pneumovax-23 2.5微克	緩衝液	20
2a	11價Pn-PD 0.1微克	緩衝液	20
2b	11價Pn-PD 0.1微克	11-價Pn-PD 0.1微克	20
3a	11價Pn-PD+MPL 0.1微克+5微克	緩衝液	20
3b	11價Pn-PD+MPL 0.1微克+5微克	11-價Pn-PD+MPL 0.1微克+5微克	20
4a	11價Pn-PD 1/0.5微克	緩衝液	20
4b	11價Pn-PD 1/0.5微克	11-價Pn-PD 1/0.5微克	20
對照組	緩衝液	緩衝液	20

依CDC/WHO一致同意之方法，亦即以細胞壁多醣中和血

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂線

五、發明說明 (61)

清後，由血清進行ELISA測定針對肺炎球菌多醣之IgG抗體。採用血清型專一性IgG1單株抗體校正ELISA，產生之抗體濃度以微克/毫升表示。

採用UNISTAT 5.0 B版進行統計分析比較。依Tukey-HSD法進行ANOVA分析換算成對數值之IgG濃度。採用費雪準確試驗法(Fisher's exact test)成對比較血清轉化率。

結果：

第2次接種(第II劑)後14天針對11種血清型及蛋白質D誘發之GMC IgG與95%可信區間示於下表。所示出血清轉化率之95%可信區間無法計算。

第1組出示接受單純多醣免疫接種後之效果，其通常在動物體內只誘發IgM。大多數IgG含量在檢測閾值以下；儘管如此，balb/c小白鼠仍可針對少數幾種肺炎球菌多醣製造IgG，尤指血清型3、19F與14。

接種共軛物疫苗時，可針對除了23F以外之所有血清型誘發IgG抗體，且具高度血清轉化率。

僅在血清型7F與19F觀察到隨劑量變化之反應(第4組對第2組)，但這些結果均無統計顯著性。血清型3、6B、7F與19F、及PD在接種兩劑(b組對a組)後，觀察到更大反應，使用所有三種調配物之許多情形下之結果均具統計顯著性。

最值得注意的是3D-MPL之效應。兩劑使用3D-MPL調配之疫苗(3b組)誘發專一性IgG之最高GMC，且除了血清型23F外，對所有血清型均具統計顯著性，此時之血清轉化率顯著較高(3b組對2b組 $p=0.02$ ，費雪準確試驗)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (62)

表：1歲大 Balb/c 小白鼠接受 11-價 PS-PD 共軛物疫苗免疫接種第 II 劑後 14 天時，對特定肺炎球菌血清型與蛋白質 D 產生之 [IgG] 幾何平均值與 95% 可信區間

組別	1	2a	2b	3a	3b	4a	4b
血清型	GM [IgG] 微克/毫升 (95% CI)	GM [IgG] 微克/毫升 (95% CI)	GM [IgG] 微克/毫升 (95% CI)	GM [IgG] 微克/毫升 (95% CI)	GM [IgG] 微克/毫升 (95% CI)	GM [IgG] 微克/毫升 (95% CI)	GM [IgG] 微克/毫升 (95% CI)
3	0.24 (0.16-0.6)	0.18 (0.11-0.27)	0.84 (0.47-1.5)	0.72 (0.51-1.0)	4.84 (3.0-7.9)	0.22 (0.14-0.35)	0.95 (0.19-1.8)
6B	0.02 0/20 [#]	0.04 8/19	0.19 (0.09-0.41)	0.14 (0.07-0.27)	0.74 (0.29-1.9)	0.09 (0.05-0.16)	0.11 (0.05-0.23)
7F	0.04 0/20 [#]	0.07 (0.04-0.12)	0.19 (0.10-0.39)	0.15 (0.10-0.22)	0.97 (0.49-2.0)	0.09 (0.06-0.14)	0.45 (0.20-1.02)
14	0.15 3/20 [#]	4.5 (2.5-8.1)	6.2 (3.6-10.5)	12.9 (7.8-21.2)	13.6 (9.4-19.7)	4.0 (2.0-8.0)	6.9 (4.6-10.6)
19F	1.2 (0.56-2.6)	6.7 (3.6-12.5)	12.1 (7.6-19.3)	10.1 (5.5-18.5)	58.5 (42-81)	5.9 (3.5-9.9)	22.0 (16.0-30.2)
23F	0.07 1/20 [#]	0.08 3/20 [#]	0.08 2/19 [#]	0.07 2/10 [#]	0.17 9/20 [#]	0.06 1/18 [#]	0.10 4/20 [#]
PD*	0.25 1/20 [#]	5.2 (3.3-8.3)	11.9 (6.9-20.7)	13.5 (9.5-19.0)	98.0 (49.1-195.)	10.9 (6.4-18.4)	38.7 (21.3-70.3)

* EU/毫升；# 血清轉化率，其定義為超過陰性對照組平均值二個標準偏差。

組別之定義請參照前述各表。

結論：

本文出示之數據證明添加 3D-MPL 至 11-價肺炎球菌-多醣蛋白質 D 共軛物疫苗時，可使年老 balb/c 小白鼠對所有試驗血清型之免疫反應提高。

大多數情況下，兩劑疫苗誘發之 IgG 濃度幾何平均值高

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂線

五、發明說明 (63)

於一劑疫苗時。由於此現象未出現在使用單純多醣疫苗時(即使在人體內)，因此認為此係依賴T-細胞之免疫反應，且誘發免疫記憶。

這些數據支持使用以Th1輔劑(以3D-MPL較佳)為輔劑之共軛肺炎球菌多醣之疫苗接種計劃，其係投與至少兩劑有輔劑之疫苗，最好間隔1至12週，以間隔3週最佳。這種接種計劃為本發明另一方面。

實驗中採用之小白鼠對PS 23(單純或共軛)無反應。值得注意的是，雖然不論使用何種疫苗組合物，對抗多醣產生之抗體量仍舊低，當使用3D-MPL作為輔劑時，更多小白鼠則對PS 23有反應(血清轉化率顯著較高)。本發明另一方面為在含共軛之肺炎球菌多醣之疫苗組合物中使用Th1輔劑，特定言之3D-MPL，以解除對疫苗中肺炎球菌多醣之無反應性問題。本發明又另一方面為採用上述之兩劑投藥計劃，使用上述組合物解除無反應性之方法。

實例7-腦膜炎奈氏球菌C多醣-蛋白質D共軛物(PSC-PD)

A：蛋白質D之表現

如實例1。

B：多醣C之製造

C族多醣之來源為腦膜炎奈氏球菌之菌株C11。其係使用傳統發酵技術發酵(EP 72513)進行發酵。共軛法中使用之乾粉多醣與Mencevax(SB生化公司)相同。

取一份C11菌株解凍，取0.1毫升懸浮液在補充酵母萃物透析液(10%，v/v)之慕勒亨頓(Mueller Hinton)培養基培養

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (64)

皿上依條狀塗佈，於飽含水之通風培養箱中，在36°C下培養23至25小時。

表面生長物再懸浮於無菌醱酵培養基中，取此懸浮液接種至含有補充酵母萃物透析液(10%，v/v)之慕勒亨頓培養基與無菌玻璃珠之洛克斯瓶(Roux bottle)上。洛克斯瓶在飽含水之通風培養物中，於36°C下培養23至25小時後，表面生長物再懸浮於10毫升無菌醱酵培養基中，取0.2至0.3毫升此懸浮液接種至另12支慕勒亨頓培養基洛克斯瓶中。

於飽含水之通風培養箱中，於36°C下培養23至25小時後，表面生長物再懸浮於10毫升無菌醱酵培養基中。於圓錐瓶中收集細菌懸浮液。

此懸浮液再於無菌下使用無菌針筒移至醱酵槽中。

腦膜炎球菌之醱酵係於位於負壓下之無菌室之醱酵槽中進行。醱酵過程通常在10至12小時後完成，相當於約 10^{10} 個細菌/毫升(亦即前穩定期)，且由pH提高程度來檢測。

在此階段，整個營養液先加熱去活性(56°C下12分鐘)，然後離心。去活性之前與之後，自營養液中取樣，依條狀塗在慕勒亨頓培養基培養皿上。

C：PS純化法

該純化法為一種多段式法，於整個醱酵營養液上進行。第一個純化階段中，去活性之培養物經離心澄清化，回收上澄液。

多醣純化法係以利用四級銨鹽進行之沈澱法為主(鯨蠟

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (65)

基三甲基銨化溴/CTAB, CETAVLON R)。CTAB與聚陰離子(如：多醣、核酸與蛋白質，依其pI而定)形成不可溶複合物。依離子控制條件，可採用此方法使雜質(低導電性)或多醣(高導電性)沈澱。

含在澄清之上澄液中之多醣使用矽藻土(CELITE^R 545)作為母質進行沈澱，以避免在不同沈澱/純化期間形成不可溶之惰性物質。

腦膜炎奈氏球菌多醣C之純化法：

步驟1：使PSC-CTAB複合物固定在CELITE^R 545上，以CTAB 0.05%洗滌，排除細胞碎塊、核酸及蛋白質。

步驟2：以EtOH 50%溶離PS。第一個溶離份混濁且包含雜質與LPS，棄置不要。利用凝絮試驗法證明下一個溶離份中含有PS。

步驟3：使PS-CTAB複合物再固定於CELITE R 545上，以0.05% CTAB洗滌排除較小型核酸及蛋白質。

步驟4：以50% EtOH溶離PS。第一個混濁溶離份棄置不要。以凝絮試驗法證明下一個溶離份中含有PS。

溶出液過濾，收集含粗多醣之濾液。添加乙醇至終濃度80%，使多醣自濾液中沈澱。回收多醣之白色粉末，真空乾燥，保存在-20°C下。

D. CDAP共軛法

PSC與PD之共軛法

使PSC與PD共軛時，以CDAP共軛技術較適於傳統CNBr活化法，並利用間隔基與載體蛋白質偶合。首先活化多

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (66)

醣，其係與1-氰基-4-二甲胺基吡啶鎘四氟硼酸鹽(CDAP)進行氰酸化作用。CDAP為水溶性氰酸化試劑，其中氰基之親電子性高過CNBr之親電子性，使得氰酸化反應得以在相當溫和條件下進行。活化後，多醣可利用其胺基與直接與載體蛋白質偶合，不需要引進任何間隔基分子。未反應之酯氰酸酯基團則利用與甘胺酸積極反應而中止其反應。製備共軛物疫苗之步驟總數減少，最重要的是可能具免疫原性之間隔基分子不出現在終產物中。

以CDAP活化多醣可在多醣中引進一個氰酸酯基團，釋出二甲胺基吡啶(DMAP)。氰酸酯基於下一個偶合過程中與蛋白質中之NH₂-基團反應，轉化成胺甲酸酯。

PSC活化作用與PSC-PD偶合法

活化作用與偶合法均在+25°C下進行。

取120毫克PS於WFI中至少溶離4小時。

添加CDAP溶液(於乙腈中新鮮製備100毫克/毫升)，使CDAP/PS(w/w)比例達0.75。

1分鐘30秒後，添加三乙胺提高pH至活化pH (pH 10)，並且保持安定至添加PD時。

3分鐘30秒後，添加NaCl至終濃度2M。

4分鐘後，添加純化之PD至PD/PS比例為1.5/1；立即調整pH至偶合pH (pH 10)。在調整pH下靜置溶液1小時。

中止反應

添加6毫升2M甘胺酸溶液至PS/PD/CDAP混合物中。調整pH至中止反應pH (pH 8.8)。於操作溫度下攪拌溶液30

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (67)

分鐘，然後在持續緩緩攪拌下，於+2-8°C下一夜。

PS-PD純化法

過濾後(5微米)，PS-PD共軛物在低溫室中，於S400HR Sephacryl凝膠上進行凝膠滲透層析法純化，以排除小型分子(包括DMAP)與未共軛之PD：溶離-NaCl 150 mM pH 6.5；追蹤-UV 280 nm，pH與導電性。

根據反應成份之不同分子大小，首先溶離出PS-PD，接著為游離PD及最後DMAP。收集含有由DMAB (PS)及 μ BCA (蛋白質)檢測到之共軛物之溶離份。收集之溶離份無菌過濾(0.2微米)。

E. PSC-PD吸附之共軛物疫苗之調配物

以 AlPO_4 洗滌

為了使PSC-PD共軛物在 AlPO_4 上有最佳吸附作用，洗滌 AlPO_4 以降低 PO_4^{3-} 濃度：

- 以 150 mM NaCl洗滌 AlPO_4 並離心(4x)；
- 離心塊再懸浮於150 nM NaCl中後，過濾(100微米)；及
- 濾液加熱除菌。

此洗滌後之 AlPO_4 稱為WAP(經洗滌及高壓釜殺菌之磷酸鹽)。

調配法

最後調配終產物之前，使鬆散之PSC-PD共軛物吸附在 AlPO_4 WAP上。 AlPO_4 WAP於室溫下與PSC-PD攪拌5分鐘。調整pH至5.1，混合物於室溫下攪拌18小時。添加NaCl溶液至150 mM，混合物於室溫下攪拌5分鐘。添加2-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (68)

苯氧乙醇至 5 毫克 / 毫升，混合物於室溫下攪拌 15 分鐘後，調至 pH 6.1。

最終組成 / 劑

- PSC-PD :	10 微克 PS
- AIPO ₄ WAP :	0.25 毫克 Al ³⁺
- NaCl :	150 mM
- 2-苯氧基乙醇	2.5 毫克
- 注射用水	至 0.5 毫升
- pH	6.1

F : 臨床前資料

多醣共軛物於小白鼠體內之免疫原性

以 6 至 8 週大 Balb/C 小白鼠分析 PSC-PD 共軛物之免疫原性。以單價疫苗形式注射單純 (未吸附) 共軛物或吸附在 AIPO₄ 上之共軛物。利用 ELISA 測定誘發之抗 PSC 抗體，利用細菌試驗分析功能性抗體，這二種方法均以 CDC (美國亞特蘭大疾病防治中心 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) 方法為依據。由進行二種不同實驗所得結果來評估劑量與輔劑 (AIPO₄) 對反應之影響。

劑量範圍實驗

本實驗中，為 Balb/C 小白鼠注射二次 PSC-PD (間隔 2 週)。採用於 AIPO₄ 上調配之四種不同共軛物劑量：0.1；0.5；2.5；及 9.6 微克 / 隻動物。於第 14 天 (第 I 劑後 14 天)，28 天 (第 II 劑後 14 天) 及 42 天 (第 II 劑後 28 天) 為小白鼠 (每組 10 隻) 抽血。採用 ELISA 測定多醣 C 專一性抗體之濃度幾

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

五、發明說明 (69)

何平均值(GMCs)，以微克IgG/毫升表示，以純IgG為參考物。於收集之血清上，於幼兔補體之存在下使用腦膜炎奈氏球菌C11菌珠測定殺細菌性抗體，以可以殺死50%細菌之稀釋度倒數為效價表示。

所得到劑量-反應自2.5微克劑量起形成一個平頂期。結果顯示，在第I劑後14天至第II劑後14天之間有良好之追加反應。在第II劑後28天時之抗體含量至少與第II劑後14天時之含量相同。殺細菌性抗體效價與ELISA濃度一致，且證實PSC-PD共軛物之免疫原性。

輔劑之影響

本實驗中，分析一批於 $AlPO_4$ 上調配之PSC-PD共軛物，注射單純(無輔劑)共軛物供比較。每組10隻小白鼠，間隔2週經皮下途徑共注射2次，各2微克共軛物。於第14天(第I劑後14天)、28天(第II劑後14天)、及42天(第II劑後28天)為小白鼠抽血，測定ELISA與功能性抗體效價(僅於第II劑後14天及第II劑後28天時進行殺細菌試驗)。 $AlPO_4$ 調配物誘發之抗體效價比無輔劑之調配物高達10倍。

結論

由上述實驗之結果得到下列一般結論：

- PSC-PD共軛物誘發之記憶反應證明當PSC共軛時，即成為依賴T細胞之抗原。
- 由ELISA測定之抗PSC抗體濃度與殺細菌性抗體效價有良好相關性，此表示由PSC-PD共軛物誘發之抗體具有對抗腦膜炎奈氏球菌血清型C之功能。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (70)

- 吸附在 $AlPO_4$ 之約 2.5 微克共軛物似乎可在小白鼠體內誘發最佳抗體反應。

- CDAP 化學似乎為製造免疫原性 PSC-PD 共軛物之適當方法。

實例 8 - 由腦膜炎奈氏球菌血清型 A-PD 共軛物製備多醣之方法

取多醣 A (PSA) 乾粉於 0.2 M NaCl 溶液中溶解 1 小時，至終濃度 8 毫克/毫升。以 HCl 或 NaOH 固定 pH 值在 6，溶液於 25°C 加溫調節。添加 0.75 毫克 CDAP/毫克 PSA (製成 100 毫克/毫升乙腈) 至 PSA 溶液中。在未調節 pH 下 1.5 分鐘，添加 0.2 M NaOH 至 pH 10。2.5 分鐘後，根據 PD/PSA 比例約 1 之下，添加蛋白質 D (濃縮至 5 毫克/毫升)。在 1 小時之偶合反應期間保持 pH 10。然後添加 10 毫克甘胺酸 (2 M pH 9.0)/毫克 PSA，調節 pH 至 9.0，於 25°C 下 30 分鐘。混合物先於 4°C 下保留一夜後，利用排斥管柱層析法純化 (Sephacryl S400HR，法馬藥廠 (Pharmacia))。首先溶離出共軛物，隨後為未反應之 PD 與副產物 (DMAP，甘胺酸，鹽)。收集共軛物，經 0.2 微米 Sartopore 膜過濾 (薩特里斯公司 (Sartorius)) 除菌。

實例 9 - 實例 7 與 8 產物之試管內特性：

主要特性綜合說明於下表：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (71)

No	共軛物 說明	蛋白質與PS含 量(微克/毫升)	PS/蛋白質 比例(w/w)	游離蛋白質 (%)	游離 PS (%)
1	PSC-PD 以NaOH調節pH	PS:210 PS:308	1/0.68	<2	8-9
2	PSC-PD 以TEA調節pH	PS:230 PS:351	1/0.65	<2	5-6
3	PSA-PD 以NaOH調節pH	PS:159 PS:149	1/1.07	5	5-9

試管內結果

以 Balb/c 小白鼠為動物模式測試共軛物之免疫原性。共軛物係吸附在 $AlPO_4$ 或 $Al(OH)_3$ 上 (10 微克 PS 吸附在 500 微克 Al^{3+} 上) 或未吸附。依下列方式注射小白鼠：間隔 2 週，注射 2 次 (2 微克 PS / 次注射)。

由此等結果得到之第一個結論為游離 PS 對免疫反應有極大影響。游離 PS 含量小於 10% 之共軛物可得到較佳結果。上述 CDAP 方法之改良法亦為本發明另一方面。

調配物亦重要。 $AlPO_4$ 似乎為此模式中最適當輔劑。共軛物可誘發之追加效應則未出現在僅注射多醣時。

結論

所得到腦膜炎奈氏球菌 A 與 C 之共軛物中最終 PS / 蛋白質比例分別為 1 與 0.6-0.7 (w/w)。游離 PS 與游離載體蛋白質分別在 10% 及 15% 以下。多醣回收率高於 70%。由上述改良 (最適化) CDAP 法 (不論何種載體蛋白質，但以蛋白質 D 較佳) 得到之 PSA 與 PSC 之共軛物為本發明另一方面。

實例 10 - 由流感嗜血桿菌 b-PD 共軛物製備多醣之方法

流感嗜血桿菌 b 為 2 歲以下幼兒腦膜炎之主因之一。流感

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明（72）

嗜血桿菌 (PRP) 之莢膜多醣與破傷風類毒素之共軛物係習知者 (依 J. 洛賓斯 (Robbins) 發展之化學進行共軛)。CDAP 為一種改良之化學法。下文說明使 PRP 共軛，最好與 PD 共軛之最佳 CDAP 條件。

影響共軛反應之參數如下：

多醣初濃度 (對游離多醣終濃度及無菌過濾步驟有雙重影響)。

載體蛋白質初濃度。

多醣對蛋白質之初比例 (其亦對游離多醣終含量及無菌過濾步驟有雙重影響)。

CDAP 之用量 (通常大量過量)。

反應溫度 (其會影響多醣降解，反應動力學，及反應性基團之降解)。

活化及偶合之 pH。

中止反應之 pH (影響殘留 DMAP 之含量)。

活化、偶合及中止反應之時間。

本發明者已發現使終產物達最佳品質之三種最重要參數為：多醣/蛋白質之初比例；多醣之初濃度；及偶合作用 pH。

反應空間之設計以上述三條件為三個軸。這三個軸之中心點 (及實驗值範圍) 為：PS/蛋白質比例 -1/1 ($\pm 0.3/1$)；[PS]=5 毫克/毫升 (± 2 毫克/毫升)；及偶合 pH=8.0 (± 1.0 pH 單位)。

次要參數固定如下：採用 30 毫克多醣；溫度 25℃；

五、發明說明 (73)

[CDAP]=0.75毫克/毫克PS；以0.2 M NaOH滴定pH；活化pH=9.5；活化時間=1.5分鐘；偶合時間=1小時；[蛋白質]=10毫克/毫升；中止反應pH=9.0；中止反應時間=1小時；PS於溶劑中溶解時間=1小時，於2M NaCl中；於Sephacry S=400HR上純化，以150 mM NaCl溶離，12公分/小時；及依5毫升/分鐘，經SARTOLAB P20過濾除菌。

當在上述反應空間中製造產物時，建立最佳條件之數據為：加工數據-過濾後之最大收量，蛋白質之最大添加量；及產物品質數據-PS/蛋白質之終比例，游離PS含量，游離蛋白質含量，殘留DMAP之最低含量(係CDAP之降解產物)。

過濾產量

影響過濾產量之因素為初[PS]與偶合pH及初PS/蛋白質比例之間之交互作用。[PS]低時，與後2個因素之交互作用不大，經常得到良好之可過濾性(所有產物均可達約95%)。然而，在高濃度下，若pH及初比例提高時，可過濾性即下降(高[PS]，最低比例，最低pH=99%過濾性；但高[PS]，最高比例與pH=19%過濾性]。

蛋白質添加量

PS/蛋白質最終比例對初比例之比值為偶合效力之測定值。高[PS]下，pH不影響比例之比值。然而，初比例則會影響比例之比值(初比例低時為1.75，初比例高時為1.26)。[PS]低時，比例之比值大多較低，但此時pH之影響較大[低pH，低比值=0.96；低pH，高比值=0.8；高pH，低比值

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (74)

=1.4；及高 pH，高比值=0.92)。

PS/蛋白質終比例

終比例依初比例與 [PS] 而定。當組合高初比例與高 [PS] 時，可得到最大終比例。pH 對終比例之影響不如在弱 [PS] 下之影響。

游離蛋白質 D 之含量

在高 pH 及高 [PS] 下可見到最少量游離蛋白質 D (達 0.0)。當 pH 低時，高 [PS] 之影響特別顯著。提高初比例對提高游離蛋白質 D 之影響不大。

殘留 DMAP

初比例並沒有顯著影響。反之，DMAP 含量隨 [PS] 提高，當 pH 提高時則下降。

結論

最佳偶合條件如下：偶合 pH=9.0；[PS]=3 毫克/毫升；且初比例=1/1。在此等條件下得到終產物之特性如下：

PS/蛋白質 終比例		過濾後 PS 產量(%)		比例之 比值		游離蛋白質 D (%)		DMAP 含量 (毫微克/10 微克 PS)	
值	範圍	值	範圍	值	範圍	值	範圍	值	範圍
1.10	0.91- 1.30	92.6	50- 138	1.16	1.03- 1.29	0.71	0- 10.40	4.95	2.60- 7.80

由上述改良(最適化)CDAP法(無關何種載體蛋白質，但以蛋白質 D 較佳)得到之 PRP 共軛物為本發明另一方面。

實例 11：以蛋白質 D 為抗原-使用 3D-MPL 調配時，如何改

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (75)

善其對抗非典型流感嗜血桿菌之保護效力

取雌性Balb/c小白鼠(每組10隻)，於20週大時(D0)第一次接種(經肌內)11價肺炎球菌多醣-蛋白質D共軛物疫苗，2週後(D14)接種第2劑。第2劑接種後7天抽血。以IgG1、IgG2a與IgG2b型抗體測定對抗蛋白質D之抗體效價。

冷凍乾燥之11價疫苗(不含 $AlPO_4$)之製法為組合共軛物與15.75%乳糖，於室溫下攪拌15分鐘，調至pH 6.1 ± 0.1 ，冷凍乾燥(該循環通常在 $-69^\circ C$ 下開始，在3小時內逐漸調至 $-24^\circ C$ ，然後保持此溫度18小時，然後在1小時內逐漸調至 $-16^\circ C$ ，然後保持此溫度6小時，再於3小時內逐漸調至 $+34^\circ C$ ，最後保持此溫度9小時)。

調配物組成及冷凍乾燥物之再組成法示於表13。

判斷Th1型細胞調節之免疫反應是否發生之最具特色之測定值已知與IgG2a抗體相關。由數據可見，若蛋白質D與Th1輔劑(此時為3D-MPL)冷凍乾燥時，IgG2a驚人地大量增加。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表 13：調配物之組成(每個人類劑量)，及在小白鼠體內對抗蛋白質 D 之抗體效價(1/10 劑量)

物理狀態	PS (500微升)	PS (500微升)	免疫刺激物	結塊劑	防腐劑	再組成劑	IgG 效價					
							IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG1	IgG2a	IgG2b
液體	1微克	500微克	無	無	2-PE ³	無	76	0.425	0.24	99.1	0.554	0.313
液體	5微克	500微克	無	無	2-PE	無	66	0.284	0.176	99.3	0.427	0.265
液體	1微克	0微克	無	無	2-PE	無	66	0.207	0.036	96.4	3.02	0.526
液體	5微克	0微克	無	無	2-PE	無	52	0.169	0.043	96.1	3.12	0.795
冷凍乾燥	1微克	0微克	無	乳糖 3.15%	無	NaCl 150 mM ¹	52	0.147	0.046	96.4	2.73	0.853
冷凍乾燥	5微克	0微克	無	乳糖 3.15%	無	NaCl 150 mM ¹	11.1	0.11	0.168	97.6	0.967	1.477
冷凍乾燥	1微克	0微克	無	乳糖 3.15%	無	AlPO ₄ 500微克 ²	45	1.86	0.075	95.9	3.96	0.160
冷凍乾燥	5微克	0微克	無	乳糖 3.15%	無	AlPO ₄ 500微克 ²	19	0.077	0.119	99.0	0.401	0.620
冷凍乾燥	1微克	0微克	無	乳糖 3.15%	無	MPL 50微克 ¹	45	2.6	3.5	88.1	5.09	6.849
冷凍乾燥	5微克	0微克	無	乳糖 3.15%	無	MPL 50微克 ¹	135	25	5.1	81.8	15.1	3.089
冷凍乾燥	1微克	0微克	MPL(50微克)	乳糖 3.15%	無	緩衝液 ¹	43	22	5.7	60.8	31.1	8.062
液體	1微克	500微克	MPL(50微克)	無	2-PE	無	441	7.1	9.1	96.5	1.55	1.990
液體	5微克	500微克	MPL(50微克)	無	2-PE	無	299	1.4	0.899	99.2	0.465	0.298

¹ 注射前；² 注射前+/-2小時；³ 2-苯氧乙醇

89.104978

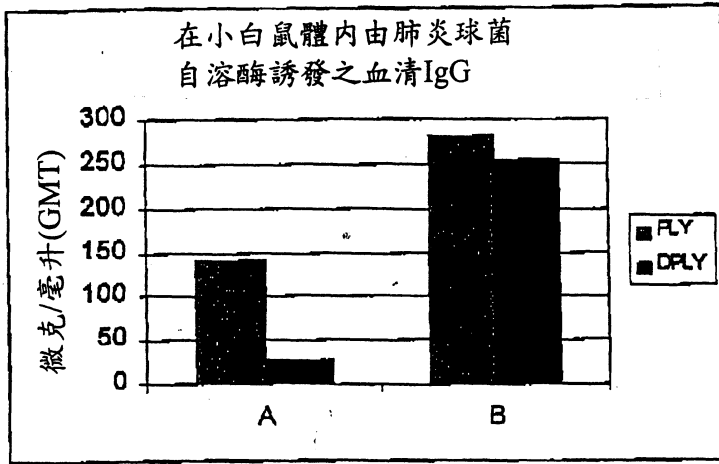


圖 1A

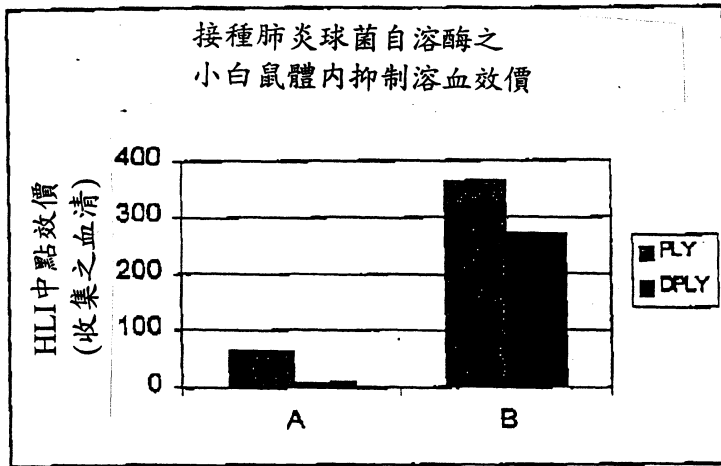


圖 1B

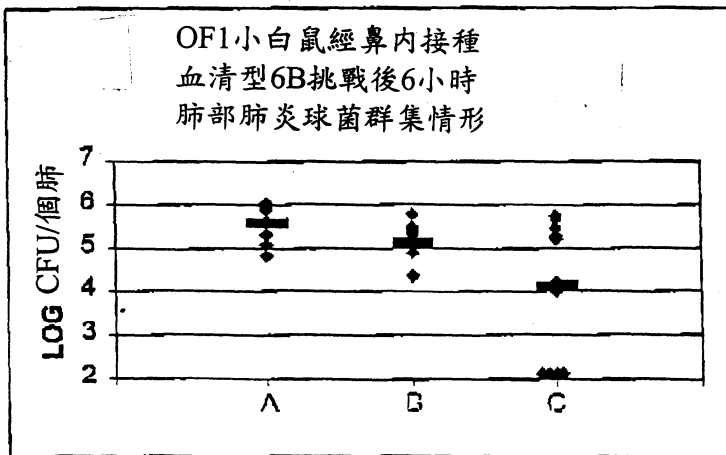


圖 1C

95. 5. 18
年 月 日修(更)正替換頁

公告 I286938

申請日期	89. 3. 17
案 號	089104978
類 別	AGK 39/395, 39/39, 39/02, 39/005, 39/116

A4
C4

(以上各欄由本局填註) 中文說明書替換頁(95年5月)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明名稱	中 文	含有多醣共軛抗原及來自流感嗜血桿菌之蛋白質D之免疫原組合物，其製備方法以及含有此等組合物之疫苗
	英 文	IMMUNOGENIC COMPOSITIONS COMPRISING POLYSACCHARIDE CONJUGATE ANTIGENS AND PROTEIN D FROM HAEMOPHILUS INFLUENZAE, METHODS OF PREPARING THE SAME AND VACCINES COMPRISING THE SAME
二、發明人	姓 名	1.卡琳 卡皮歐 2.瑪格麗特 迪絲崔沛絲 3.皮爾 麥克 迪斯蒙斯 4.克里格 安東尼 約瑟夫 拉菲利爾 5.貞 普爾曼 6.貞-保羅 皮利爾斯
	國 籍	1.2.3.6.均比利時 4.加拿大 5.荷蘭
三、申請人	住、居所	1-6.均比利時利克森沙特市第一學院路89號
	姓 名 (名稱)	比利時商史密斯克萊美占生物公司
	國 籍	比利時
	住、居所 (事務所)	比利時利克森沙特市第一學院路89號
	代 表 人 名 姓 名	詹恩 史帝芬

63290-950518.doc

裝 訂 線

五、發明說明 (42)

度。

比較改變輔劑所得到之最大 GMC IgG 與改變 PS 劑量所得到最大 GMC，且發現 3D-MPL 在 5/11 血清型中可誘發顯著較大反應。

表 11 出示 3D-MPL 與 3D-MPL/AIPO₄ 組合物之比較結果 (比較調配過程，及 3D-MPL 劑量)，其中 5 種多醣共軛物，當只使用 3D-MPL 調配時，其免疫原性比使用 3D-MPL 加 AIPO₄ 調配時有顯著改善：PS 4，PS 6B，PS 18C，PS 19F 及 PS 23F。

實例 3 - 組合對 PS 4，PS 6B，PS 18C，PS 19F 及 PS 23F 共軛物在成鼠體內之免疫原性之影響

對成鼠接種肺炎球菌多醣-蛋白質 D 共軛物疫苗，其係個別接種或組合成多價組合物接種 (四、五、七或十價)。每組 10 隻老鼠，均間隔 28 天，接種 2 天，於第 28 天及 42 天 (第 2 劑後 14 天) 抽血樣。

利用 ELISA 測試血清中針對肺炎球菌多醣產生之 IgG 抗體。所有共軛物誘發之專一性 IgG 抗體係以 ELISA 測定。表 12 表示單價 PS 6B、PS 18C、PS 19F 及 PS 23F 蛋白質 D 共軛物之組合在成鼠體內對其免疫原性之影響，其係在第二劑後 14 天時測定 IgG 濃度。

為所有樣本進行統計分析以決定是否組合時之抗體濃度有顯著差異。多價疫苗中任何血清型 PS 6B、PS 18C、PS 19F 及 PS 23F 蛋白質 D 共軛物之組合均不會顯著改變其免疫原性。

表 1

四、中文發明摘要(發明之名稱：含有多醣共軛抗原及來自流感嗜血桿菌之蛋白質D之免疫原組合物，其製備方法以及含有此等組合物之疫苗)

本發明係有關細菌性多醣抗原疫苗。特定言之，本發明係有關與來自流感嗜血桿菌(*H. influenzae*)之蛋白質D共軛之細菌性多醣。

英文發明摘要(發明之名稱：

IMMUNOGENIC COMPOSITIONS COMPRISING
POLYSACCHARIDE CONJUGATE ANTIGENS AND PROTEIN
D FROM HAEMOPHILUS INFLUENZAE, METHODS OF
PREPARING THE SAME AND VACCINES COMPRISING THE
SAME

The present invention relates to the field of bacterial polysaccharide antigen vaccines. In particular, the present invention relates to bacterial polysaccharides conjugated to protein D from *H. influenzae*.

六、申請專利範圍

#7671

1. 一種免疫原性組合物，其包含複數個衍生自病原性細菌之多醣抗原，該多醣抗原共軛至來自流感嗜血桿菌之蛋白質D或其蛋白質D片段，該片段包括該蛋白質之1/3 N-末端。
2. 根據申請專利範圍第1項之免疫原性組合物，其中多醣抗原選自下列：傷寒沙門氏菌之Vi多醣抗原，腦膜炎球菌多醣，B群腦膜炎球菌之多醣與改質多醣，來自金黃色葡萄球菌之多醣，來自無乳鏈球菌之多醣，來自肺炎鏈球菌之多醣，來自分支桿菌之多醣，來自新型隱球菌之多醣，非典型流感嗜血桿菌之脂多醣，來自流感嗜血桿菌b之莢膜多醣，莫拉氏菌 (*Moraxella catharralis*) 之脂多醣，索氏志賀氏菌之脂多醣，克魯士氏錐蟲之脂肽磷酸糖苷(LPPG)。
3. 根據申請專利範圍第2項之免疫原性組合物，其包含來自至少四種肺炎鏈球菌血清型之肺炎鏈球菌多醣抗原。
4. 根據申請專利範圍第2項之免疫原性組合物，其中共軛於蛋白質D之多醣抗原係衍生自腦膜炎奈氏球菌血清型A、C或Y或其組合。
5. 根據申請專利範圍第1項之免疫原性組合物，其包含流感嗜血桿菌b、腦膜炎球菌C及腦膜炎球菌Y之共軛莢膜多醣，其中該莢膜多醣抗原係與來自流感嗜血桿菌之蛋白質D共軛，且其限制條件為來自流感嗜血桿菌b之莢膜多醣係與破傷風類毒素共軛。

六、申請專利範圍

6. 根據申請專利範圍第1項之免疫原性組合物，其包含肺炎鏈球菌、流感嗜血桿菌b、腦膜炎球菌C及腦膜炎球菌Y之共軛莢膜多醣，其中該莢膜多醣抗原係與來自流感嗜血桿菌之蛋白質D共軛，且其限制條件為來自流感嗜血桿菌b之莢膜多醣係與破傷風類毒素共軛。
7. 根據申請專利範圍第1項之免疫原性組合物，其另包含一種輔劑。
8. 根據申請專利範圍第7項之免疫原性組合物，其中多醣蛋白質D共軛物抗原係吸附在磷酸鋁上。
9. 根據申請專利範圍第7項之免疫原性組合物，其中輔劑為TH1反應之優先誘發劑。
10. 根據申請專利範圍第9項之免疫原性組合物，其中輔劑包含下列至少一者：3D-MPL、皂角苷免疫刺激劑、或免疫刺激性CpG寡核苷酸。
11. 一種疫苗，其包含根據申請專利範圍第1至10項中任一項之免疫原性組合物。
12. 一種製造針對複數個病原性細菌之根據申請專利範圍第1項之免疫原性組合物之方法，其包括下列步驟：
 - 自該病原性細菌分離出複數個多醣抗原；
 - 活化該多醣；
 - 使多醣與來自流感嗜血桿菌之蛋白質D共軛；以及
 - 將共軛的多醣混合在一起。