

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：92121011

※申請日期：92-07-31

※IPC 分類：A61K39/095

壹、發明名稱：(中文/英文)

疫苗

VACCINE

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

比利時商葛蘭素史密斯克藍生物品公司

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S. A.

代表人：(中文/英文)

亞瑟 威廉 羅素 泰若

ARTHUR WILLIAM RUSSELL TYRRELL

住居所或營業所地址：(中文/英文)

比利時羅克桑薩爾市研究院路 89 號

RUE DE L' INSTITUT 89 B1330 RLXENSART, BELGIUM

國籍：(中文/英文)

比利時 BELGIUM

參、發明人：(共 6 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 洛夫 比曼斯

RALPH BIEMANS

2. 飛利浦 戴諾爾

PHILIPPE DENOEL

3. 克里斯汀 菲隆

CHRISTIANE FERON

4. 凱林 哥瑞傑

KARINE GORAJ

5. 詹 波爾曼

JAN POOLMAN

6. 文森 威南斯

VINCENT WEYNANTS

住居所地址：(中文/英文)

1.2.3.4.5.6. 均比利時羅克桑薩爾市研究院路 89 號葛蘭素史密斯克藍生
物品公司

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S. A., RUE DE L'

INSTITUT 89, B1330, RIXENSART, BELGIUM

國 籍：(中文/英文)

1.2.3.4.6. 均比利時 BELGIUM

5. 荷蘭 THE NETHERLANDS

肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項第一款但書或第二款但書規定之期間，其日期為：年 月 日。

本案申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 英國 2002 年 08 月 02 日 0218037.0
2. 英國 2002 年 08 月 02 日 0218036.2
3. 英國 2002 年 08 月 02 日 0218035.4
4. 英國 2002 年 08 月 02 日 0218051.1
5. 英國 2002 年 08 月 30 日 0220197.8
6. 英國 2002 年 08 月 30 日 0220199.4
7. 英國 2002 年 11 月 01 日 0225524.8
8. 英國 2002 年 11 月 01 日 0225531.3
9. 英國 2002 年 12 月 24 日 0230164.6
10. 英國 2002 年 12 月 24 日 0230168.7
11. 英國 2003 年 03 月 05 日 0305028.3
12. 英國 2002 年 12 月 24 日 0230170.3

主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1. 英國 2002 年 08 月 02 日 0218037.0
2. 英國 2002 年 08 月 02 日 0218036.2
3. 英國 2002 年 08 月 02 日 0218035.4
4. 英國 2002 年 08 月 02 日 0218051.1
5. 英國 2002 年 08 月 30 日 0220197.8
6. 英國 2002 年 08 月 30 日 0220199.4
7. 英國 2002 年 11 月 01 日 0225524.8
8. 英國 2002 年 11 月 01 日 0225531.3
9. 英國 2002 年 12 月 24 日 0230164.6
10. 英國 2002 年 12 月 24 日 0230168.7

11.英國 2003 年 03 月 05 日 0305028.3

12.英國 2002 年 12 月 24 日 0230170.3

主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關奈瑟氏球菌疫苗組合物、其製法及此等組合物於醫學上之用途之領域。更特定言之，其係有關製造新穎之基因工程處理之腦膜炎球菌菌株之方法，使其更適合用於生產奈瑟氏球菌(特定言之腦膜炎球菌)外膜囊胞(或大疱)疫苗。亦說明以採用對人類更安全且/或更有效之新穎之LOS次單位或腦膜炎球菌外膜囊胞(或大疱)疫苗為主之有利製法與疫苗產品。

【先前技術】

腦膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)(腦膜炎球菌)為經常自人類上呼吸道中單離出之格蘭陰性細菌。其係嚴重侵入性細菌疾病之肇因，如：細菌血症與腦膜炎。腦膜炎球菌疾病之發生隨地理位置、季節及年度而異(Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (補充本), S18-S24, 1989)。細菌通常依據其莢膜多醣之血清型分類。

溫帶地區之大多數疾病歸因於血清型B之菌株，其族群總發生率之變化為1-10/100,000/年-有時候達更高數值(Kaczmarek, E.B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T. et al. Clin. Infect. Dis. 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., et al. Epidemiol. Infect. 105: 119-126, 1990)。

以血清型A腦膜炎球菌為主之流行病主要發生在非洲，有

時候高達1000/100,000/年(Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989)。幾乎所有病例均為血清型A、B、C、W-135與Y腦膜炎球菌之腦膜炎球菌疾病，可採用四價A、C、W-135、Y莢膜多醣疫苗(Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10 : 335-339, 1982)。

過去幾十年來，歐洲國家之腦膜炎奈瑟氏球菌感染發生率已提高。其原因為社交活動增加以致傳染性提高所引起(例如：，游泳池、戲院，等等)。現已常單離出對有些標準抗生素之敏感性較低或產生抗性之腦膜炎奈瑟氏球菌菌株。此現象造成醫學需求不適當，及需要新的抗微生物劑、疫苗、藥物篩選法及此生物體之診斷試驗。

目前可採用之多醣疫苗已藉由其與載劑蛋白質之化學共軛法加以改善(Lieberman, J.M., Chin, S.S., Wong, V.K., et al. JAMA 275 : 1499-1503, 1996)。

然而，血清型B疫苗無法取得。已發現血清型B莢膜多醣為非免疫原性 - 最可能之原因為其與宿主成份有共通之相似結構(Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, M.L. et al. J. Infect. Dis. 126 : 514-522, 1972 ; Finne, J.M., Leinonen, M., Mäkelä, P.M. Lancet ii. : 355-357, 1983)。因此，著重於嘗試由外膜囊胞(或大疱)或其純化之蛋白質成分發展血清型B疫苗。

或者，用於發展疫苗之腦膜炎球菌抗原為腦膜炎球菌脂寡醣(LOS)。其係結合外膜之醣脂類，與腸桿菌之脂多醣

(LPS)之相異處在於缺乏O側鏈，因此類似LPS之未純化型(Griffiss et al. Rev Infect Dis 1988 ; 10 : S287-295)。LOS之寡糖部份體中之異質性造成不同腦膜炎球菌菌株之間之結構與抗原性之差異(Griffiss et al. Inf. Immun. 1987 ; 55 : 1792-1800)。此點已用於再細分菌株形成12種免疫型。免疫型L3、L7、L9具有相同碳水化合物結構，因此稱為L3,7,9 (或為了明確說明，通稱為"L3")。腦膜炎球菌LOS L3,7,9 (L3)、L2與L5可經唾液酸化而改造，或經添加胞嘧啶核苷5'-單磷酸-N-乙酰基神經胺糖酸而改造。已知LOS之抗體可於實驗大老鼠中保護防止感染，並於感染腦膜炎奈瑟氏球菌之兒童中產生殺細菌活性(Griffiss et al J Infect Dis 1984 ; 150 : 71-79)。

然而，有關腦膜炎球菌疫苗中使用LOS之問題為其毒性(因其脂質A部份體所致)。

LOS亦出現在腦膜炎球菌大疱之表面。許多年來之努力著重於發展以腦膜炎球菌外膜囊胞(或大疱)為主之疫苗(de Moraes, J.C., Perkins, B., Camargo, M.C. et al. Lancet 340 : 1074-1078, 1992 ; Bjune, G., Hoiby, E.A. Gronnesby, J.K. et al. 338 : 1093-1096, 1991)。此等疫苗之優點在於包括數個呈適當折疊構形之完整外膜蛋白質，當投至宿主体內時，可誘發保護性之免疫反應。此外，奈瑟氏球菌菌株(包括腦膜炎奈瑟氏球菌血清型B-menB)會排出大量外膜大疱，足以進行工業規模之製造。然而，大疱之製法更常包括使用清潔劑(例如：去氧膽酸鹽)萃取細菌細胞(例如：EP

11243)，其作用在於排除疫苗中大量之LOS。因為LOS如上述具有毒性(亦稱為內毒素)。

使用LOS作為疫苗抗原之另一個問題在於12種LPS免疫型出現不同之碳水化合物結構(M. P. Jennings et al, Microbiology 1999, 145, 3013-3021)。對其中一種免疫型產生之抗體卻無法辨識不同之免疫型。儘管已著重於製造LOS免疫型之寡糖部份之通屬"核心"區(例如：WO 94/08021)，但對抗已改造之LOS所產生之抗體已喪失其殺細菌活性。因此需要一種具有許多不同免疫型之LOS成分之有效疫苗。

使用LOS(亦稱為LPS或脂多糖)作為人類疫苗之抗原之另一個問題在於其帶有類似人類醣類結構之醣結構(例如：人類紅血球細胞)，因此出現使用上之安全問題。此外，由於LOS抗原之殺細菌有效性之結構敏感性，因此改變LOS結構亦有問題。

本發明提出改善上述一種或多種問題之方法，並提出製造以腦膜炎球菌LOS作為保護性抗原(特別當出現在外膜囊胞上時)為主之新穎疫苗。

【發明內容】

本說明書中述及之公告案與專利案或專利申請案中所揭示之主題與資料已以引用之方式併入本文中。

所提及之"脂寡糖"(或"LOS")亦可稱為"脂多糖"或"LPS"。

本文中"包括"、"包含"與"涵括"一詞均可由本發明者視需要分別改用"由---構成"、"由---組成"替代。

本發明者發現，因縮短LOS寡糖結構而喪失抗原決定基，會誘發殺細菌性免疫反應。本發明者因此反而發現，為了在疫苗調配物中最有效使用LOS，必須儘可能保留LOS寡糖結構，但僅有2種LOS抗原之組合可產生普遍有效之奈瑟氏球菌(較佳為腦膜炎球菌)疫苗。本發明第一方面為供預防或治療奈瑟氏球菌(較佳為腦膜炎球菌或腦膜炎球菌B)疾病之免疫原性組合物，其包含奈瑟氏球菌(較佳為腦膜炎球菌)LOS免疫型L2與LOS免疫型L3。LOS可依已知純化法單離，或可自L2與L3奈瑟氏球菌菌株中衍生出至少2種外膜囊胞(或大疱)製劑。為了排除大疱製劑中鬆散結合之毒性LOS，但仍保留大疱中高量之完整LOS抗原時，最好使用低濃度清潔劑：0-0.3%，較佳為0.05-0.2%，最佳為約0.1%之去氧膽酸鹽較佳(或DOC)萃取大疱。此等LOS抗原之組合在對抗90%以上之腦膜炎奈瑟氏球菌菌株上具有驚人有效性。

本發明者亦發現，若免疫顯性之外膜蛋白質之某些組合之表現可以向下調節(較佳為刪除)時，本發明上述大疱免疫原性組合物及事實上任何奈瑟氏球菌(較佳為淋病球菌或腦膜炎球菌)衍生之大疱免疫原性組合物均可加強其表面上保護性抗原(包括LOS)之效力。因此，本發明第二方面為一種衍生自奈瑟氏球菌菌株之奈瑟氏球菌大疱製劑，該菌株中2種或更多種下列外膜蛋白質之表現相較於天然未改造菌株已向下調節(較佳為刪除)：PorA、PorB、OpA、OpC或PilC。較佳為PorA與OpA、PorA與OpC、OpA與OpC、或

PorA與OpA與OpC 已向下調節或刪除。FrpB之表現向下調節(較佳為刪除)之現象已顯示有利於加強交叉保護性抗原(特定言之由在限制鐵之條件下生長之奈瑟氏球菌菌株製成之大疱製劑)之效力。因此，由具有此突變之菌株衍生之奈瑟氏球菌大疱，及由向下調節表現之FrpB與上述一種或多種向下調節表現之蛋白質之組合所衍生之大疱已成為本發明另一方面。此等突變有利於可衍生大疱免疫原性組合物之任何奈瑟氏球菌(較佳為腦膜炎球菌)菌株，然而最好使用L2或L3免疫型奈瑟氏球菌(較佳為腦膜炎球菌)菌株。較佳者，本發明大疱免疫原性組合物同時包含L2與L3大疱，其中上述免疫顯性外膜蛋白質(或OMPs)之組合則缺乏其中至少一種(較佳為兩種)。有關向下調節此等基因之技術討論於WO 01/09350(其內容已以引用之方式併入本文中)。已知其中四種不同Opa基因出現在腦膜炎球菌基因組中(Aho et al. 1991 Mol. Microbiol. 5 : 1429-37)，因此其中Opa之表現據稱已向下調節，亦即較佳為腦膜炎球菌中1、2、3或(較佳為)所有4種基因均已向下調節。此等向下調節之基因工程方法說明於WO 01/09350或可尋求Opa位置上沒有表現或表現低之容易發現之天然且安定之腦膜炎球菌菌株。此等菌株可採用Poolman等人(1985 J. Med. Micro. 19 : 203-209)所說之技術發展，其中可在培養盤上或於顯微鏡下，觀察細胞外觀，尋找其表型不同於表現Opa之細胞之Opa⁻細胞。一旦發現時，經過發酵操作後，以細胞內容物進行西方墨點分析法，確認其中缺乏Opa，即可證實該菌株為穩定

之 Opa⁻。

【實施方式】

上述 LPS 免疫原性組合物之安全性

針對 L3 或 L2 LPS 產生之抗體之安全性尚有疑慮，因為其結構類似人類糖原鞘脂類中所出現之乳醯基-N-新丁糖寡醣類 ($\text{Gal } \beta 1-4 \text{GlcNAc } \beta 1-3 \text{Gal } \beta 1-4 \text{Glc } \beta 1-$ ；圖 1)。即使若許多人已安全地接受含有殘留量之 L3 LPS 之經去氧膽酸鹽萃取之囊胞疫苗接種 (G. Bjune et al, Lancet (1991), 338, 1093-1096；GVG. Sierra et al, NIPH ann (1991), 14, 195-210)，刪除 LOS 醣末端之作法仍有利於防止與人類組織之表面上所出現結構之任何交叉反應。較佳具體實施例中，lgtB 基因之去活性結果產生中間 LPS 結構，其中末端半乳糖殘基與唾液酸均不存在 (參見圖 1 與 2，突變結果在 L2 與 L3 LOS 中留下 $4 \text{GlcNAc } \beta 1-3 \text{Gal } \beta 1-4 \text{Glc } \beta 1-$ 結構)。此等中間物可在 L3 與 L2 LPS 菌株中得到。另一種可替代但較差之 (短) LPS 型可由關閉 lgtE 基因取得。另一種可替代但較差之 LPS 型可由關閉 lgtA 基因取得。若選拔這種 lgtA⁻ 突變時，最好亦關閉 lgtC 表現，以防止非免疫原性 L1 免疫型形成。

LgtB⁻ 突變株為最佳者，因為本發明者發現，其係解決安全問題之最佳截短法，同時可保留 LPS 保護性寡醣抗原決定基，仍可誘發殺細菌性抗體反應。

因此，上述本發明 L2 或 L3 製劑 (不論純化與否或是否呈單離之大疱) 或腦膜炎球菌大疱製劑通常均宜衍生自己經過基因工程處理之奈瑟氏球菌菌株 (較佳為腦膜炎球菌)，以顯

著向下調節(較佳為關閉，最佳為刪除基因之所有或部份發動子與/或開放讀碼框)來自lgtB、lgtA或lgtE基因之功能性基因產物之表現。

較佳之本發明奈瑟氏球菌菌株無法合成莢膜多醣。

若本發明上述大疱製劑衍生自腦膜炎球菌B菌株時，其亦最好脫除莢膜多醣(其中亦包含似人類之醣結構)。儘管可關閉許多基因以達成此目的，但本發明者已發現，生產大疱之菌株最好已經過基因工程處理，使之永久向下調節來自siaD基因之功能性基因產物之表現(亦即向下調節 α -2-8聚唾液基轉化酶活性)，較佳為關閉基因，最佳為刪除基因之所有或部份發動子與/或開放讀碼框。這種去活性法說明於WO 01/09350中。siaD(亦稱為synD)突變為自莢膜多醣中脫除類似人類之抗原決定基之許多突變法中最佳者，因為其係唯一不會影響LOS之保護性抗原決定基之生合成作用之突變法，因此有利於以最終使用LOS作為保護性抗原為目標之方法，且對細菌生長之影響最小。因此，本發明較佳方面為衍生自lgtE⁻siaD⁻、lgtA⁻siaD⁻或較佳之lgtB⁻siaD⁻腦膜炎球菌B突變株菌株之如上述大疱免疫原性製劑。菌株本身亦為本發明另一方面。

雖然基於上述理由，siaD⁻突變為較佳方式，但亦可使用其他關閉腦膜炎球菌B莢膜多醣合成作用之突變法。因此，生產大疱之菌株可經過基因工程處理，使之永久向下調節下列一種或多種基因之功能性基因產物之表現：ctrA、ctrB、ctrC、ctrD、synA(相當於synX與siaA)、synB(相當

於 siaB) 或 synC(相當於 siaC) 基因，較佳為關閉基因，最佳為刪除基因之所有或部份發動子與/或開放讀碼框。LgtE⁻突變法可與此等突變法中一種或多種方法組合，較佳為由 lgtB⁻突變法與其中一種或多種突變法組合。因此，本發明另一方面為如上述衍生自此等腦膜炎球菌B之組合突變菌株之大疱免疫原性製劑。該菌株本身亦為本發明另一方面。

含有不同 lgt 基因(包括 lgtB 與 lgtE)之奈瑟氏球菌位置及其序列係相關技藝已知(參見 M. P. Jennings et al. Microbiology 1999, 145, 3013-3021 與其中摘錄之參考文獻，與 J. Exp. Med. 180: 2181-2190 [1994])。

若終產物中使用全長度(未截短)LOS 時，LOS 不可經唾液基化(因為需要這種 LOS 產生免疫反應以對抗最危險之侵入性腦膜炎球菌B菌株亦未唾液基化)。此時所採用之莢膜陰性菌株宜刪除 synA(相當於 synX 與 siaA)、synB(相當於 siaB) 或 synC(相當於 siaC) 基因，因為這種突變亦使 menB LOS 無法唾液基化。

LOS 之毒性

上述本發明純化之 LOS 或大疱免疫原性組合物亦可經由向下調節其衍生來源之細菌生產菌株中某些基因之表現，而降低毒性。雖然此等去毒性法並非天然 OMV 之鼻內接種法所必要之作法(J.J. Drabick et al, 疫苗(2000), 18, 160-172)，但用於非經腸式疫苗接種時，仍宜去除毒性。本發明 LOS 純化之 LOS 或大疱免疫原性組合物之較佳去毒性法為由奈瑟氏球菌生產菌株進行基因工程處理，其係由涉及脂質 A

生合成之基因進行突變/改造/去活性，特別指由彼等涉及添加二級醯基鏈至脂質A上之基因，特定言之向下調節msbB與/或htrB基因之功能性基因產物之表現，較佳為關閉基因，最佳為刪除基因之所有或部份發動子與/或開放讀碼框。或者(或另外)純化之LOS或大疱免疫原性組合物可衍生自己經過基因改造以致向上調節下列一種或多種基因之奈瑟氏球菌菌株(經由引進較強力之發動子或整合另一套複製基因)：pmrA、pmrB、pmrE與pmrF。或者(或另外)，純化之LOS或大疱免疫原性組合物可經由添加多黏菌素B之無毒性肽功能性同等物[係一種對脂質A具有高親和性之分子]至組合物中而去除毒性。

參見WO 01/09350更詳細說明上述去毒性法，及相關之發動子/基因序列及向上調節與向下調節方法。奈瑟氏球菌之msbB與htrB基因亦分別稱為lpxL1與lpxL2(參見WO 00/26384)，此等基因之刪除突變法之表型特徵在於msbB⁻突變株LOS相對於野生型喪失一個二級醯基鏈(並保留4個一級與1個二級醯基鏈)，htrB⁻突變株LOS則喪失兩個二級醯基鏈。這種突變最好與可確定生產缺乏莢膜多醣之菌株(如上述)之突變法組合，以確保大疱上最適當地出現去毒性之LOS，或有助於純化去毒性之次單位LOS。參見WO 93/14115、WO 95/03327、Velucchi et al (1997) J Endotoxin Res 4: 1-12與EP 976402，供進一步詳細說明可用於本發明組合物之多黏菌素B之無毒性肽功能性同等物-特別使用肽SAEP 2(序列KTKCKFLKKC，其中2個半胱胺酸形成二硫化

物橋鍵)。

"向下調節功能性基因產物之表現"意指在所指定基因之發動子或開放讀碼框上進行添加、刪除或取代，以降低總基因產物之生合成活性(降低60、70、80、90、95%或最佳為降低100%)。當然可以引進移碼突變或取代較弱之發動子，然而最佳之作法為刪除大部份或所有開放讀碼框與/或發動子，以確保永久向下調節(活性)基因產物(說明於WO 01/09350)。

本發明另一方面包括可衍生本發明之LOS或大疱免疫原性製劑之上述基因改造之奈瑟氏球菌(較佳為腦膜炎球菌或淋病球菌或腦膜炎球菌B)菌株。

本發明之LOS或含LOS之大疱製劑

本發明另一方面為自本發明奈瑟氏球菌菌株中單離LOS製劑(特定言之彼等如上者)。較佳者，單離之LOS(或含LOS之大疱)為L2或L3免疫型，且較佳為本發明免疫原性組合物包含本發明L2與L3 LOS(或大疱)兩種製劑。

此等製劑亦可經由上述LOS之寡糖部份(不論純化與否或是否含在大疱製劑中)與包含T-細胞抗原決定基來源之載劑共軛而改良(因此可使LOS成為甚至更佳之[依賴T細胞]免疫原)。本發明之純化之LOS製劑或者(或另外)可經由形成相關技藝已知之微脂粒調配物而成為更佳抗原(參見例如：WO 96/40063及其中摘錄之參考文獻)。

自細菌中單離LOS之方法係相關技藝已知(參見例如：Wesphal與Jann之熱水-苯酚法[Meth. Carbo. Chem.1965,

5 : 83-91])。亦參見 Galanos et al. 1969, Eur J Biochem 9 : 245-249, 與 Wu et al. 1987, Anal Bio Chem 160 : 281-289。由單離之 LOS 進行共軛之技術亦係已知者(參見例如 : EP 941738, 其揭示內容已以引用之方式併入本文中)。

本發明之目的中, "包含 T-細胞抗原決定基來源之載劑" 一詞通常意指一種肽, 較佳為多肽或蛋白質。共軛技術係相關技藝已知。典型載劑包括來自非典型流感嗜血菌 (*H. influenzae*)、破傷風類毒素、白喉類毒素與 CRM197 之蛋白質 D。

本發明較佳之單離之 LOS 組合物為 : 包含 L2 與 L3 單離之 LOS 之組合物, 其中各 LOS 之寡糖部份可視需要與包含 T-細胞抗原決定基來源之載劑共軛 ; 包含 LOS 之組合物, 其結構符合其自 lgtB⁻ 腦膜炎球菌菌株衍生之結構, 其中各 LOS 之寡糖部份可視需要與包含 T-細胞抗原決定基來源之載劑共軛 ; 及最佳者為包含 L2 與 L3 單離之 LOS 之組合物, 其結構符合其自 lgtB⁻ 腦膜炎球菌菌株衍生之結構, 其中各 LOS 之寡糖部份可視需要與包含 T-細胞抗原決定基來源之載劑共軛。

較佳為本發明 LOS 組合物已經去除毒性。其作法為採用已知之醃胼或鹼水解化學處理技術, 脫除分子之醃基鏈(但可能降低分子之保護效力), 但較佳作法為自 htrB⁻ 或 msbB⁻ 腦膜炎球菌突變株(如上述; 特定言之無莢膜多醃菌株) 中單離出 LOS, 或添加多黏菌素 B 之無毒性肽功能性同等物[係一種對脂質 A 具有高親和性之分子]至組合物中, 特定言之

SAEP 2 (如上述)。

本發明之LOS可呈單離狀態投與(若脂質A部份體仍完整時，通常呈膠束型式投與)，或可呈微脂粒型式投與。此時，可添加外膜蛋白質至微脂粒中，LOS可於微脂粒內與此等外膜蛋白質共軛，使寡醣成為依賴T之抗原。其作法為採用類似下文所說明大疱內LOS交聯法之化學技術。

LOS之寡醣部份與大疱表面上所存在外膜蛋白質之大疱內交聯(共軛)法

若LOS(特定言之本發明之LOS)呈大疱調配物時，LOS最好於原位進行共軛，其方法應使LOS與亦存在於大疱製劑上之一種或多種外膜蛋白質(例如：腦膜炎球菌之PorA或PorB)共軛。

此方法有利於加強大疱調配物中LOS抗原之安定性與/或免疫原性(形成T-細胞助手)與/或抗原性-因而產生最高保護性構型之不依賴T細胞之寡醣免疫原之T-細胞助手-因為LOS之天然環境出現在腦膜炎球菌外膜表面上。此外，大疱中LOS之共軛作用會造成LOS去除毒性(脂質A部份安定地包埋在外膜中，因此較不容易引起毒性)。因此，可能不需要使自htrB⁻或msbB⁻突變株中單離之大疱進行上述之去毒性法或添加多黏菌素B之無毒性肽功能性同等物至組合物中(但為了進一步確定，亦可組合增加)。因此，本發明者發現，包含大疱之組合物中，若大疱中之LOS已以大疱內方式與亦存在於大疱中之外膜蛋白質共軛時，此組合物可形成疫苗之基礎，供治療或預防由可衍生該大疱之生物體

所引起之疾病，其中此等疫苗實質上無毒，且可能誘發依賴T細胞之殺細菌反應，對抗天然環境中之LOS。

因此，本發明進一步提供此等大疱內LOS共軛大疱製劑。該大疱最好衍生自可產生該大疱之任何格蘭陰性生物體(參見WO 01/09350)，較佳為莫拉氏菌(*Moraxella catarrhalis*)、非典型流感嗜血菌(*non-typeable Haemophilus influenzae*)或奈瑟氏球菌(最佳為腦膜炎球菌)。

此等大疱製劑可自指定之細菌中單離(參見WO 01/09350)，然後依已知之共軛化學法，使LOS之寡糖部份上之基團(例如： NH_2 或 COOH)與大疱外膜蛋白質上之基團(例如： NH_2 或 COOH)連接。可採用利用戊二醛、甲醛或戊二醛/甲醛混合物進行交聯技術，但最好採用選擇性較高之化學劑，如：EDAC或EDAC/NHS (J.V. Staros, R.W. Wright and D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical chemistry* 156: 220-222 (1986); 與 *Bioconjugates Techniques*. Greg T. Hermanson (1996) pp173-176)。其他可用於在LOS與蛋白質分子之間形成共價鏈結之共軛化學或處理法說明於EP 941738中。

較佳為使大疱製劑於沒有莢膜多醣下共軛。大疱可自不會產生莢膜多醣之菌株(天然或經過突變)中單離出，或可自大部份(較佳為所有)污染之莢膜多醣中純化。以此方式進行大疱內LOS共軛反應之效率高得多。

較佳為使大疱中超過5、10、20、30、40、50、60、70、

80、90、95%之LOS已交聯/共軛。

若大疱內共軛之大疱衍生物自腦膜炎球菌時，該衍生物來源菌株最好為無法產生莢膜多醣之突變菌株(例如：上述一種突變菌株，特定言之siaD⁻)。亦最好使可有效對抗腦膜炎球菌疾病之免疫原性組合物同時包含L2與L3兩種大疱，其中L2與L3 LOS均與大疱外膜蛋白質共軛。此外，大疱內共軛之大疱中LOS結構最好與自lgtB⁻腦膜炎球菌菌株衍生之結構一致。最佳免疫原性組合物包含大疱內-共軛之大疱：衍生自無法產生莢膜多醣且為lgtB⁻之突變株腦膜炎球菌菌株；包含衍生自無法產生莢膜多醣之突變株腦膜炎球菌菌株之L2與L3大疱；包含衍生自lgtB⁻之突變株腦膜炎球菌菌株之L2與L3大疱；或最佳為包含衍生自無法產生莢膜多醣且為lgtB⁻之突變株腦膜炎球菌菌株之L2與L3大疱。

本發明可使用之典型L3腦膜炎球菌菌株為H44/76 menB菌株。典型之L2菌株為B16B6 menB菌株或39E腦膜炎球菌C型菌株或菌株760676。

如上述，本發明之大疱可經由共軛作用去除毒性至某一程度，並不需要再進行任何去毒性作用，然而，可再進行去毒性法以進一步確保其安全性，例如：使用衍生自htrB⁻或msbB⁻腦膜炎球菌菌株之大疱，或添加多黏菌素B之無毒性肽功能性同等物[係一種對脂質A具有高親和性之分子](較佳為SAEP2)至大疱組合物中(如上述)。LOS之共軛作用(尤其以大疱內方式)因而使LOS相較於包含等量未共軛之LOS之製劑具有令人驚訝之較低毒性。因此進一步

提供去除大疱毒性之方法，其係採用LOS與大疱外膜蛋白質之大疱內共軛作用。

上述方法中，提出腦膜炎球菌大疱與包含該大疱之免疫原性組合物，其具有作為重要抗原之LOS，實質上沒有毒性、沒有免疫安全問題，具有依賴T細胞之特性，存在於其天然環境中，且可以針對90%以上之腦膜炎球菌菌株(當使用L2+L3組合物時)誘發殺細菌性抗體反應。

一種或多種MenA、C、Y或W莢膜多醣或寡醣(較佳為至少MenC、或MenA與MenC、或MenC與MenY)亦可與本發明大疱之外膜蛋白質共軛。雖然其可與LOS交聯作用於相同反應中進行，但最好於另外分開之反應進行。

最適當之大疱內LOS共軛法為本發明另一方面。

大疱內共軛法應包括1、2或所有3個下列步驟：共軛法之pH應超過pH 7.0，較佳為超過或等於pH 7.5(最佳為pH 9以下)；反應期間應保持約1-5%蔗糖之條件，較佳為2-4%，最佳為約3%；共軛反應中之NaCl應儘量降低，較佳為低於0.1M、0.05M、0.01M、0.005M、0.001M，最佳為完全沒有。所有此等製法之特色為確保共軛過程中之大疱保持安定且呈溶液狀。

EDAC/NHS共軛法為較佳之大疱內共軛法。EDAC/NHS優於甲醛之處在於後者造成之交聯程度太高，以致負面影響可過濾性。EDAC會與羧酸反應，形成活性酯中間物。當含有胺親核物時，形成醯胺鍵，同時釋出異肋副產物。然而，EDAC-媒介之反應效率可能因形成磺基-NHS酯中間物

而提高。磺基-NHS酯在水溶液中之存留時間比EDAC單獨與羧酸酯反應所形成之活性酯之存留時間長。因此，採用此兩步驟方法可形成較高收量之醯胺鍵。EDAC/NHS共軛法說明於J.V. Staros, R.W. Wright and D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220-222 (1986); 及 Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) ppl73-176。最好在反應中使用0.01-5 mg EDAC/mg大疱，較佳為0.05-1 mg EDAC/mg大疱。EDAC之用量依樣本中LOS含量而定，後者則依用於萃取大疱之DOC%而定。%DOC低時，則使用高量EDAC (1 mg/mg及以上)，然而在較高%DOC下，則使用較低量EDAC (0.05-0.1 mg/mg)，以避免太多大疱之間交聯。

因此本發明較佳方法為一種製造大疱內共軛之LOS(較佳為腦膜炎球菌)之方法，其包括之步驟為在EDAC/NHS之存在下，於pH 7.0至pH 9.0之間(較佳為約pH 7.5)，於1-5%(較佳為約3%)蔗糖下，可視需要於實質上不含NaCl之條件下(如上述)，使大疱進行共軛，並自反應混合物中單離共軛之大疱。

繼該反應後，由該反應混合物使用抗-LOS(例如：抗-L2或抗-L3)mAbs進行西方凝膠分離法，以顯示大疱中較大比例之LOS之分子量隨反應時間提高。

採用此技術可回收99%大疱。

已發現EDAC為一種優越之大疱內交聯劑，因為其使LOS

與OMP充分交聯，以改善LOS依賴T細胞之免疫原性，但不會達到造成如過濾性差、凝集及發生大疱之間交聯等問題之高度交聯程度。大疱所產量之形態類似未共軛之大疱。此外，上述方法避免發生過高之交聯程度(此點可能降低天然存在於大疱表面上之保護性OMPs，例如：TbpA或Hsf之免疫原性)。

單離大疱之技術

外膜囊胞(OMVs或大疱)可採用已知技術單離(Fredriksen et al, NIPH Annals (1991), 14, 67-79; Zollinger et al, J. Clin Invest (1979), 63, 836-848; Saunders et al. Infect Immun (1999), 67, 113-119; J.J.Drabick et al. Vaccine (1999), 18, 160-172)。其分成兩大類-使用去氧膽酸鹽(約0.5%)在腦膜炎球菌中萃取大疱之技術，及使用低量去氧膽酸鹽(DOC)或完全不使用去氧膽酸鹽之技術。無DOC法製成之大疱之有利特色為在OMV中保持高量LOS-此點有利於以LOS為保護性抗原之疫苗。相較於使用DOC萃取之大疱，採用無DOC法製得之OMV中L3 Ags濃度高出約10倍。基於此理由，以無清潔劑(較佳為無DOC)之方法製備大疱之方法較適於本發明方法之目的，但以含低量清潔劑(較佳為DOC)進行之萃取法亦有利，因為此步驟將會在大疱中留下緊密交互作用之LOS，同去除任何毒性較高但鬆散結合之LOS。典型地採用0-0.5%清潔劑(較佳為DOC)萃取大疱，較佳為0.02-0.4%、0.04-3%或0.06-2%清潔劑，更佳為0.08-0.15%，最佳為約0.1%或0.1%整，以使最適量之LOS安定存留在大

疤中。無DOC(或低DOC)萃取法特別佳，其中LOS已經由上述詳細說明之一種或多種方法去除毒性。

疫苗組合物

本發明免疫原性組合物很容易經由添加醫藥上可接受之賦形劑調配成疫苗組合物。

本發明尚提供一種製備本發明奈瑟氏球菌(較佳為腦膜炎球菌)免疫原性組合物或疫苗之方法，其包括之步驟為依上述單離、純化本發明之LOS(較佳為L2或L3)或依上述產生本發明之單離大疤(較佳為L2或L3免疫型)，並使用醫藥上可接受之賦形劑調配LOS或大疤。較佳為由本發明免疫型L2與L3之純化LOS，或本發明免疫型L2與L3之大疤，或L2之純化LOS與L3之大疤(或反之亦然)於混合步驟中組合。較佳為由本發明之純化LOS或大疤於單離後，依上述進行共軛。純化之LOS亦可增加另一個調配微脂粒之步驟(採用相關技藝已知之技術-參見例如：WO 96/40063及其中摘錄之參考文獻)。較佳之大疤製劑係利用低濃度(或無濃度)DOC(如上述)單離者。

此等L2與L3組合法可產生有效對抗幾乎所有腦膜炎球菌B菌株之疫苗。

上述免疫原性組合物(或方法)可添加一種或多種(2、3或4種)選自血清型A、C、Y或W之腦膜炎球菌多醣或寡醣(可未共軛或已與包含T-細胞抗原決定基之載劑共軛，如上述)至組合物中。較佳為至少添加C型(以共軛最佳)，更佳為A與C或Y與C(較佳為均共軛)及最佳為A、C、Y與W(較佳為均共

軌)。上述組合物中宜亦包括共軌之流感嗜血菌B莢膜多醣或寡醣，以產生通用之腦膜炎疫苗。

較佳者，包括WO 94/08021中明確說明之組合物或由此組合物組成之組合物並非本發明之申請專利範圍。

本發明之疫苗調配物

本發明免疫原性組合物可使用合適輔劑調配，以產生本發明疫苗組合物。

合適輔劑包括鋁鹽，如：氫氧化鋁凝膠(明礬)或磷酸鋁(較佳為氫氧化鋁)，但亦可使用鈣之鹽類(特定言之碳酸鈣)、鐵或鋅，或亦可使用醯基化酪胺酸之不可溶懸浮液，或醯基化糖類、陽離子性或陰離子性衍化之多醣或聚磷腈。

適合添加之Th1輔劑系統包括單磷醯基脂質A，特定言之3-去氧-醯基化單磷醯基脂質A(或其他無毒性之LPS衍生物)，及單磷醯基脂質A，較佳為3-去氧-醯基化單磷醯基脂質A (3D-MPL)[或無毒性LPS衍生物]與鋁鹽(較佳為磷酸鋁)之組合。加強之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QS21[或其他皂角苷]與3D-MPL[或無毒性LPS衍生物](揭示於WO 94/00153中)之組合，或反應性較低之組合物，其中QS21[或皂角苷]依WO 96/33739所揭示之方法，使用膽固醇淬息反應。一種涉及含QS21、3D-MPL與生育酚之水包油性乳液之特別有效輔劑調配物說明於WO 95/17210中，且為可添加之較佳調配物。其他可添加之輔劑包括皂角苷，更佳為QS21與/或水包油性乳液及生育酚。亦可添加含未甲基化CpG之寡核苷酸(WO 96/02555)。

疫苗製劑一般說明於"疫苗設計"(Vaccine Design)一書中 ("The subunit and adjuvant approach"(編輯 Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York)。

疫苗之免疫保護劑量可經由全身或黏膜途徑投與。此等投藥法包括經由肌內、腹膜內、皮內或皮下等途徑之注射法；或經由黏膜投藥至口/消化道(較佳為鼻內投藥法)、呼吸道、生殖泌尿道。各疫苗劑量中典型之大疱含量選擇在可誘發免疫保護性反應且沒有典型疫苗中所出現之顯著不良副作用之用量。此等用量將依所採用之明確免疫原及其所呈現之方式而定。通常希望各劑量中各大疱含量為1-100 μg ，較佳為5-50 μg ，最典型在5-25 μg 之範圍內。

本發明大疱免疫原性組合物之進一步改良法

若衍生上述本發明大疱組合物之奈瑟氏球菌菌株(包括淋病球菌，較佳為腦膜炎球菌，最佳為腦膜炎奈瑟氏球菌B)具有下列一種或多種基因(編碼保護性抗原)，經由嵌插其他基因之複製本至基因組中，或引進現存基因上游之較強發動子，或依WO 01/09350中所討論之任何其他方式向上調節，可誘發改造菌株之抗原製造量達未改造菌株之1.2、1.5、2、3、5或10倍時：NspA (WO 96/29412)、Hsf或其截短體 (WO 99/31132 & WO 01/55182；亦稱為NhhA)、Hap(PCT/EP99/02766)、OMP85 (WO 00/23595)、PilQ (PCT/EP99/03603)、P1dA (PCT/EP99/06718)、FrpB (WO 96/31618)、TbpA (WO 92/03467、US 5912336、WO 93/06861與EP586266)、TbpB(WO 93/06861與EP586266)、NadA (Comanducci

et al J. Exp. Med. 2002 195 ; 1445-1454)、FrpA/FrpC或此等抗原之間涉及5個或更多個重覆序列之共通部份(WO 92/01460; Thompson et al., (1993)J. Bacteriol. 175: 811-818; Thompson et al., (1993)Meet. Immun.. 61: 2906-2911)、LbpA、LbpB(PCT/EP98/05117)、FhaB (WO 98/02547 SEQ ID NO 38 [核苷酸3083-9025])、HasR (PCT/EP99/05989)、lipo02 (PCT/EP99/08315)、Tbp2 (WO 99/57280)、MltA (WO 99/57280)、TspA (WO 00/03003)、TspB (WO 00/03003)與ctrA (PCT/EP00/00135), 上述本發明大疱組合物可進一步改善本發明疫苗之效力。若本文中述及Hsf時, 該名詞可於各例中替代Hsf截短體-特定言之彼等揭示於WO 01/55182中者。

特別佳之作法為同時向上調節Hsf與TbpA(低或高分子量型, 或低分子量型與高分子量型[EP 586266]), 或Hsf與OMP85, 或OMP85與TbpA(低或高分子量型, 或低分子量型與高分子量型), 或NspA與Hsf, 或NspA與OMP85, 或NspA與TbpA((低或高分子量型, 或低分子量型與高分子量型)兩者。若2種大疱均涵括在組合物中時, 各大疱最好具有不同之向上調節作用。若TbpA高與低分子量型均向上調節時, 最好在分別存在於由兩種天然包含2種TbpA型之菌株衍生之組合物中向上調節。最佳者, 2種菌株具有L2與L3 LOS免疫型。TbpA可經基因工程處理而向上調節或由生產奈瑟氏球菌/腦膜炎球菌之菌株於限制鐵之條件下生長, 例如: 於50-70 μ M Desferal(去鐵胺甲磺酸鹽, 來自Sigma藥廠)之存在下生長。若採用後項方法時, 最好向下調節FrpB基因

表現(較佳為刪除),因為這種可變抗原可能在於限制鐵之條件下所單離之腦膜炎球菌菌株中單離之大疤中轉呈免疫顯性。

較佳具體實施例中,本發明組合物包含來自IgtB⁻莢膜多醣⁻msbB⁻之L3大疤(最好向上調節TbpA高分子量型與Hsf)及來自IgtB⁻莢膜多醣⁻msbB⁻之L2大疤(最好向上調節TbpA低分子量型與Omp85)。更佳為兩種大疤均再向下調節PorA與/或FrpB表現,及可視需要向下調節OpC與/或OpA表現。大疤最好經由上述低DOC法單離,且兩種大疤中之LOS均與外膜蛋白質進行大疤內交聯。

空殼或已殺死之完整細胞疫苗

本發明者提出上述相關大疤之組合物與疫苗很容易延伸至有關空殼或已殺死之完整細胞製劑與疫苗(具有相同優點)。由格蘭陰性菌株製備空殼製劑(具有完整外套之空細胞)之方法係相關技藝已知(參見例如:WO 92/01791)。殺低完整細胞以製備用於疫苗之去活性細胞製劑之方法亦已知者。因此,涉及本文獻所述大疤之組合物與疫苗可應用於包含本發明同等空殼與已殺死之完整細胞製劑之相同組合物或疫苗。

血清殺細菌分析法

血清殺細菌分析法係分析抗原之間於本發明免疫原性組合物中組合時之增效關係。

此等增效反應特徵為由抗原之組合所誘發SBA高於各抗原分開使用時所誘發SBA之至少50%、2倍、3倍,較佳為4

倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍及最佳為10倍。較佳為對抗衍生該抗原之同源性菌株來測定SBA，最好亦對抗一組異源性菌株(代表性菌株群為例如下列：屬於A-4群之BZ10(B：2b：P1.2)；屬於ET-37複合物之B16B6 (B：2a：P1.2)；與H44/76 (B：15：P1.7,16))。SBA為可用於預估腦膜炎球菌疫苗效力之最受到認同之免疫標記物(Perkins et al. J Infect Dis. 1998, 177：683-691)。可採用任何已知方法確認令人滿意之SBA。可使用得自動物模式或人體之血清進行SBA。

使用人類血清進行SBA之較佳方法如下：在第一次接種之前、第二次接種後2個月及第三次接種後1個月取血樣(一年內接種疫苗3次為典型之人類初次接種疫苗程序，例如：於第0、2及4個月時，或於第0、1與6個月時)。此等人類初次接種疫苗計畫可施用於1歲以下嬰兒(例如：與接種Hib同時進行)或亦可在2-4歲大時或青春期時，依此初次接種疫苗計畫接種試驗SBA。若可行時，可進一步於初次接種後6至12個月及追加接種後1個月時取血樣。

若第三次接種後1個月(依初次免疫接種計畫)(2-4歲大或青春期，但以一歲以內嬰兒較佳)，受試者對抗衍生本發明抗原之腦膜炎球菌菌株之SBA(抗體稀釋液)效價(相較於接種前效價)提高4倍之人數百分比超過30%，較佳為超過40%，更佳為超過50%，最佳為超過60%時，則具有同源性殺細菌活性之抗原或大疱製劑具有令人滿意之SBA。

具有異源性殺細菌活性之抗原或大疱製劑若亦可針對其

腦膜炎球菌菌株衍生來源亦誘發令人滿意之SBA時，當然亦可用於形成具有同源性殺細菌活性之大疱製劑。

若第三次接種後1個月(依初次免疫接種計畫)(2-4歲大或青春期，但以一歲以內嬰兒較佳)，受試者對抗三種腦膜炎球菌異源性菌株之SBA(抗體稀釋液)效價(相較於接種前效價)提高4倍之人數百分比超過20%，較佳為超過30%，更佳為超過35%，最佳為超過40%時，則具有異源性殺細菌活性之抗原或大疱製劑具有令人滿意之SBA。此等試驗為指示該具有異源性殺細菌活性之抗原或大疱製劑是否可針對多種腦膜炎球菌菌株誘發交叉殺細菌抗體之良好指標。這三種異源性菌株最好應具有相異電泳型(ET)-複合物或多位置序列型(MLST)圖形(參見Maiden et al. PNAS USA 1998, 95: 3140-5)，且最好不同於製備或衍生該具有異源性殺細菌活性之抗原或大疱製劑之菌株。習此相關技藝之人士咸了解如何決定三種具有不同ET-複合物之菌株，其可反映腦膜炎球菌之間之遺傳差異，特定言之腦膜炎球菌B型菌株之間之差異可因引起顯著疾病負擔而辨識及/或代表已辨識之MenB過高毒性細胞系(參見如上述Maiden等人之文獻)。例如：可使用下列三種菌株：屬於A-4群之BZ10(B: 2b: P1.2)；屬於ET-37複合物之B16B6 (B: 2a: P1.2)；與屬於ET-5複合物之H44/76(B: 15: P1.7,16)，或任何其他屬於相同ET/群落之菌株。此等菌株可用於測試例如：由屬於ET-5複合物之腦膜炎球菌菌株CU385 (B: 4: P1.15)製備或衍生之具有異源性殺細菌活性之抗原或大疱製劑。另一種可使

用之菌株樣本來自細胞系3流行性純系(例如：NZ124[B:4:P 1.7,4])。另一種ET-37 菌株為NGP165 (B:2a:P1.2)。

測定SBA活性之方法係相關技藝已知。例如：可採用之一種方法說明於WO 99/09176之實例10C。一般而言，取試驗菌株培養物生長(最好於消耗鐵之條件下-添加鐵螯合物如：EDDA至生長培養基中)至對數生長期。培養物可懸浮於含BSA之培養基中(如：含0.3%BSA之漢克氏培養基(Hanks medium))，以得到經調整至約20000 CFU/ml之操作細胞懸浮液。一系列反應混合物之製法為混合一系列試驗血清之兩倍稀釋液(最好於56°C下加熱30分鐘去除活性)[例如：體積50 μ l/孔]與20000 CFU/ml腦膜炎球菌試驗菌株懸浮液[例如：體積25 μ l/孔]。反應瓶應振盪(例如：210 rpm下)培養(例如：37°C 15分鐘)。最終反應混合物[例如：100 μ l體積]另含有補體源[如：預備試驗之幼兔血清體積或人類血清學用人類血清終體積之25%]，依上述培養[例如：37°C下60分鐘]。此分析法可使用無菌聚苯乙烯U型底96孔微滴定板。使用多管式定量吸管，自各孔中取一小份[例如：10 μ l]滴加至Mueller-Hinton洋菜盤中(較佳為包含1%Isovitalex與1%經加熱去活性之馬血清)，並培養(例如：於37°C及5%CO₂下培養18小時)。較佳為每份可計數達80 CFU之個別群落。可使用下列三種試驗樣本作為對照組：緩衝液+細菌+補體；緩衝液+細菌+去活性之補體；血清+細菌+去活性之補體。SBA效價可採用程式直接計算，其係處理數據，由迴歸計算法得到相當於50%細胞殺死率之稀釋度。

本專利說明書所摘錄之所有參考文獻或專利申請案已以引用之方式併入本文中。

實例

下列實例採用標準技術進行，其係習此相關技藝之人士習知之例行技術，除非另有詳細說明。

實例係供說明用，並未限制本發明。

實例 1：

說明涉及腦膜炎球菌B生產B莢膜多醣之蛋白質之編碼基因之刪除法，PorA基因之刪除法，腦膜炎球菌大疱表面上多種保護性外膜蛋白質之向上調節法，免疫顯性蛋白質或生合成酵素之向下調節法，及大疱之單離法等之實例說於WO 01/09350。

實例 2：LOS：一種關鍵性交叉保護性抗原

為了分析LOS作為潛在交叉保護性抗原之角色，使用H44/76野生型(WT)腦膜炎球菌B菌株(表現L3 LOS)與表現"似gale⁻ LOS"之改造H44/76菌株(相較於lgtE⁻ LOS呈短結構)，根據兩種不同方法產生大疱。第一種方法使用0.1% DOC，以使大疱中含有高量LOS，第二種使用0.5%DOC，使所得大疱中含低量LOS。

使小白鼠經肌內途徑接受3次注射(於第0、21與28天)，每劑含有5 μg吸附在Al³⁺鹽(磷酸鋁)上之大疱與3D-MPL。第三次注射後14天，取血樣。

於收集之血清上，使用純化之L3 LOS進行抗-L3 LOS ELISA。圖3A清楚顯示0.1%DOC法所產生之大疱可誘發小

白鼠抗-LOS反應。結果證實 $galE^-$ LOS與 L3 LOS可誘發產生抗體。另一方面，0.5%DOC萃取出太多LOS，以致無法在大疱疫苗中作為關鍵性抗原。

血清殺細菌分析法

使用下列不同NmehB菌株為個別血清進行SBA：同源性WT H44/76菌株、PorA(-)H44/76菌株、及兩種異源性菌株(以血清亞型為主)Cu385與NZ124。這四種菌株表現L3 LOS。添加第五種菌株。相較於H44/76，此菌株(B16B6)對PorA及LOS而言均為異源性(其係免疫型L2菌株)。

圖3B之結果顯示僅對抗L3菌株之交叉殺細菌反應，但僅可使用DOC 0.1%WT大疱。DOC 0.1% $galE^-$ 大疱與DOC 0.5%WT大疱之處理沒有觀察到交叉殺細菌反應。此外，已知因PorA抗體引起之殺細菌反應會隨血清型而異。亦在此實驗中使用DOC 0.5重量%大疱或 $galE^-$ 大疱，及使用PorA(-)H44/76菌株之SBA數據觀察到此結果。

所有此等結果均顯示，由含高百分比L3 LOS之大疱誘發之交叉殺細菌反應係歸因於針對LOS抗原直接產生Abs。

僅有L3 LOS(並非 $galE^-$ LOS)可誘發產生殺細菌抗體。雖然ELISA中，使用DOC 0.1% $galE^-$ 大疱可觀察到良好之抗-LOS反應，但此反應與生物性無關(無SBA)。

此外，該反應似乎為專一性LOS免疫型，因為抗-L3 LOS Abs僅殺死L3菌株，但不殺L2菌株，此表示最適當之疫苗理想上應包含L3與L2 LOS，以達到最適當之涵蓋範圍。

耗損實驗

為了證實 WT DOC 0.1% 大疱所誘發之反應主要歸因於抗-LOS 抗體，使用不同濃度之純化 L3 LOS 在所收集之血清中進行耗損處理。耗損後，於殺細菌分析法中使用血清對抗同源性 WT H44/76 菌株。

使用血清對抗 DOC 0.1% WT 大疱所得結果(見圖 3C)顯示清楚之劑量範圍抑制作用，此證實此製劑所誘發之大部份抗體均針對 LOS(符合使用 PorA(-)H44/76 菌株產生之 SBA 結果)。反之，由 WT DOC 0.5% 誘發之反應經使用 PorA(-)H44/76 菌株進行之 SBA 及由 LOS 耗損實驗顯示，並非針對 LOS。

L2 LOS 亦得到類似結果。

實例 3：使用 L3 與中間物 (lgtB⁻) 無 DOC 大疱 (非去毒性之 LOS) 誘發交叉殺細菌抗體之實驗

所使用之 MC58 腦膜炎球菌衍生物菌株為 B: P1.7.16, opc⁻, siaD⁻。此菌株經基因改造後，表現 L3(菌株 2G2) 或中間抗原決定基(菌株 2G EcoN1b-1, 如同 2G2, 但另加 lgtB⁻) 或短型 LPS(菌株 C6, 其係 lgtE⁻)。根據一般高(0.5%)DOC 法或無 DOC 法製造 OMV。

於第 0、20 及 28 天時，採用肌內途徑為小白鼠(每組 10 隻)免疫接種 3 次。其接受於 Al(OH)₃ 上調配之 1 或 10 μg(蛋白質含量)大疱。於第 28 天(第 II 劑之後)與第 42 天(第 III 劑之後)抽血。

使用收集之血清與同源性菌株(MC58 與 H44/76)及兩種異源性菌株(M97250687 與 M9725078)，以幼兔血清作為外因

性補體來源，進行殺細菌分析法。

下表綜合說明其結果(殺死50%時之殺細菌效價)：

抗原	血樣	菌株與血清型			
		MC58 P1.7.16	H44/76TT P1.7.16	M97250687 P1.19.15	M97252078 P1.4
c6 no doc 10ug IM	Post II	>2560	>2560	>2560	98
c6 no doc 10ug IM	Post III	1 353	>2560	>2560	90
c6 no doc 1ug IM	Post II	247	620	247	<20
c6 no doc 1ug IM	Post III	411	878	748	<20
2g2 no doc 10ug IM	Post II	>320	>2560	>2560	>2560
2g2 no doc 10ug IM	Post III	>2560	>2560	>2560	1407
2g2 no doc 1ug IM	Post II	>2560	>2560	>2560	119
2g2 no doc 1ug IM	Post III	>2560	>2560	>2560	348
2gecoN1b-1 no doc 10ug IM	Post II	>2560	>2560	>2560	1162
2gecoN1b-1 no doc 10ug IM	Post III	>2560	>2560	>2560	1213
2gecoN1b-1 no doc 1ug IM	Post II	1 151	>2560	1 696	22
2gecoN1b-1 no doc 1ug IM	Post III	2 220	>2560	1 947	135
c6 doc 10ug IM	Post II	308	248	341	<20
c6 doc 10ug IM	Post III	189	104	400	<20
c6 doc 1ug IM	Post II	33	43	63	<20
c6 doc 1ug IM	Post III	NC (>20)	24	156	<20
2g2 doc 10ug IM	Post II	NC (>20)	25	360	<20
2g2 doc 10ug IM	Post III	201	<20	647	<20
2g2 doc 1ug IM	Post II	275	<20	299/644	<20
2g2 doc 1ug IM	Post III	237	<20	728	<20
2gecoN1b-1 doc 10ug IM	Post II	573	31	685	<20
2gecoN1b-1 doc 10ug IM	Post III	NC (>40)	21	1 140	<20
2gecoN1b-1 doc 1ug IM	Post II	261	NC	118	<20
2gecoN1b-1 doc 1ug IM	Post III	348	NC	692	<20

L3(2g2)或中間(2gecon1b-1)抗原決定基之存在顯然可誘發交叉殺細菌抗體，而來自截短之LPS菌株(C6)之大疤則誘發較低量之交叉殺細菌抗體。特別當注射1 μg OMV時。

此外，當使用經DOC純化之OMV時，降低大疤之LPS含量可降低誘發交叉殺細菌抗體。除了提高LPS外，無DOC之大疤亦可能有利地保留一些與OMV鬆散地交互反應之蛋白質，如：脂蛋白。

實例4：L3 LOS與外膜蛋白質之大疤內交聯作用

所使用之MenB大疤係衍生自SiaD⁻(因此不表現莢膜多糖)與PorA⁻之H44/76菌株(LOS免疫型L3)。使用兩種不同菌株：完整L3(菌株B1717, siad(-)PorA(-)完整L3)與截短之

L3(菌株 B 1727, siad(-)PorA(-)lgtB(-)TrL3)。

根據已知方法，使用EDAC/NHS共軛法，使大疱內LOS與OMP進行交聯，以賦與LOS之寡糖成分成為依賴T細胞之抗原(EDAC/NHS優於甲醛，因為後者造成之交聯程度太高，以致負面影響可過濾性)。EDAC會與羧酸反應，形成活性酯中間物。當含有胺親核物時，形成醯胺鍵，同時釋出異肋副產物。然而，EDAC-媒介之反應效率可能因形成磺基-NHS酯中間物而提高。磺基-NHS酯在水溶液中之存留時間比EDAC單獨與羧酸酯反應所形成之活性酯之存留時間長。因此，採用此兩步驟方法可形成較高收量之醯胺鍵。EDAC/NHS共軛法說明於J.V. Staros, R.W. Wright and D. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156 : 220-222 (1986) ; 及 Bioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996)ppl73-176。

反應混合物為體積1 mL之3%蔗糖(供安定大疱)中包含1.5 mg磺基-NHS與5 mg EDAC。大疱之含量比為0.025 mg EDAC/mg大疱。大疱濃度為2 mg/ml，以0.1N HCl調至pH 7.5。

於室溫下反應4小時，混合物相對於含3%蔗糖之pH 7.5，2 mM磷酸鹽緩衝液透析。混合物經Sterivex G10 0.22 μ m過濾。回收99%大疱。

使用抗-L3 mAb進行西方墨點分局法追蹤反應。反應後低分子量LOS轉呈模糊，凝膠上出現一條較高分子量之新條

帶。此較高分子量之條帶似乎為主要條帶，代表大多數共軛LOS已與PorB共價連接。

已發現EDAC為一種極優秀之大疱內交聯劑，因為LOS將與OMP進行不可逆之交聯，足以改善LOS依賴T細胞之免疫原性，但其交聯程度不會造成如：過濾性不良、凝集與發生大疱之間交聯等問題。所產生之大疱外形類似未共軛之大疱(由電子顯微鏡觀察)。此外，上述方法避免發生過度交聯之問題(此點可能降低天然存在於大疱表面上保護性OMPs，例如：TbpA之免疫原性)。

實例5：L3與截短(中間物，lgtB⁻)L3可誘發產生可辨識截短(中間物lgtB⁻；TrL3)L3 LOS之殺細菌性Abs

OMV(大疱)係由MenB菌株H44/76 siaD⁻ PorA⁻ L3或H44/76 siad⁻ porA⁻ TrL3產生。進行兩種不同萃取法；所使用DOC之百分比為0.1或0.5%。亦分析兩種不同輔劑調配物：Al(OH)₃或磷酸鋁+3D-MPL。採用肌內途徑為小白鼠(OF1雌性小白鼠，6-8週大，每組30隻)注射3次(第0、20及28天時)(每次注射5 μg大疱)。於第II劑之後(第28天)與第III劑之後(第42天)之血清中收集SBA。

以0.1%DOC萃取之大疱所誘發血清之幾何平均效價及所收集血清殺死50%細胞時之效價高於使用0.5%DOC萃取時。其可能原因為前者大疱中LOS含量為後者之2.5倍。使用含完整L3 LOS或截短之L3 LOS之大疱所誘發血清之SBA之間沒有顯著差異。若大疱增加磷酸鋁+3D-MPL作為輔劑時，其SBA比使用氫氧化鋁時提高。

亦進行血清耗損實驗。使用1 mg/mL純化之L3或trL3 LOS耗損血清，然後於此等已耗損之血清上進行SBA。結果顯示殺細菌之Abs(包含抗-L3抗體)幾乎完全被血清之trL3 LOS前處理耗損，殺細菌之Abs(包含抗-trL3抗體)幾乎完全被血清之L3 LOS前處理耗損。因此抗-L3殺細菌性Abs可與trL3 LOS反應，且抗-trL3殺細菌性Abs可與L3 LOS反應。此外，可證實殺細菌性Abs對出現在L3及trL3 LOS兩者中之LOS結構之專一性。

結論為證實TrL3結構(OMVs中)可針對L3菌株誘發產生殺細菌性Abs。與耗損實驗組合時，發現TrL3與L3 LOS之結構在免疫學基礎上極為相近，可用於產生可殺死L3菌株之Ab。

實例6：TrL3解決完整L3結構潛在之自體免疫性問題

若L3與trL3結構在保護性抗體之免疫學上如此相近，則這兩種結果之間與L3(及L2)LOS有關之可能自體免疫問題[透過乳醯基-N-新丁糖部份體]是否會有任何差異?吾等現在探討冷凝集素是否可辨識trL3 LOS來闡明此問題。

已知MAb 1B2-1B7 (J Bio Chem 256(1981)10967-10972; ATCC寄存編號TIB-189)可使成年人類紅血球(RBC)在低溫下凝集，並與LNnT(乳醯基-N-新丁糖)反應。其係一種典型之冷凝集素。

下列實驗中使用此單株抗體與可殺死L3腦膜炎球菌菌株之MabL3.7.9單株抗體組合。

以這兩種mAbs用於ELISA中，以預先塗覆聚-L-離胺酸之

微分析板分析(1 µg/ml, 37°C 下2小時), 然後塗覆純化之L3或純化之TrL3 LOS(5 µg, 於4°C 下一夜)。分析板經BSA飽和(1%, 於室溫下30分鐘)。然後以這兩種抗體分別進行標準ELISA。

結果(圖4)清楚顯示Mab L379會與L3及TrL3反應(圖4B), 但1B2-1B7僅與L3 LOS反應(圖4A)。因此, 吾等認為TrL3不會被會與含LNnT四糖類結構(如:L3 LOS與人類紅血細胞)反應之冷凝集素辨識。

因此, TrL3 LOS具有最適當之特性, 亦即其長度夠長至足以保留保護性抗原決定基, 但夠短至喪失可能引起人類自體免疫之抗原決定基。

此點當然亦適用於本專利申請案所提出之截短之L2(lgtB⁻)LOS結構。

實例7: 交聯作用對B1820 DOC 0.1%大疱之熱原性/抗原性之影響

採用不同濃度之EDAC(EDAC含量愈多, 進行交聯之大疱愈多), 使大疱(來自菌株B 1820; 其係衍生自H44/76, 其中siaD(-)PorA(-)FrpB(-)截短之Hsf向上調節, 透過lbtB(-)突變菌株截短L3, 於去鐵胺甲磺酸鹽(desferral)之存在下培養, 以DOC 0.1%萃取大疱)。大疱經過濾殺菌後顯示該交聯作用在大疱內。

使用純化之Nmen L3 LOS作為標準物(Tsai, J. Biol. Standardization (1986)14: 25-33), 經SDS-PAGE電泳分析法後, 由銀染色測得大疱中LOS含量為18%。通常, 使用

0.1%DOC萃取法得到之大疱中LOS含量為約20%LOS，使用0.2%DOC萃取法得到約15%LOS，使用0.3%DOC萃取法得到約10%LOS，及使用0.5%DOC萃取法得到約5%LOS。通常，包含10%或更多未共軛LOS之大疱即為無法接受之熱原。

於兔子中之熱原性

於依歐洲藥典所述進行之熱原性試驗中，測試兩種調配物(吸附在 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 或 AlPO_4 上之大疱)，且兔子經由IV途徑接受500 ng/kg。

結果顯示(下表)，大疱內交聯對大疱之熱原性有正面影響力。使用同一批大疱作為對照組或與不同濃度之EDAC交聯。進行交聯之大疱愈多時(愈多EDAC)，熱原性愈低。此結果亦出現在兩種不同調配物中。

處理	調配物		
	$\text{Al}(\text{OH})_3$	AlPO_4	兩種調配物 ^s
未交聯	3.1*	2.8	5.9
EDAC 0.05 [£]	2.7	2.2	4.9
EDAC 0.2	1.7	1.7	3.4
EDAC 1	1.5	1.4	2.9

[£] EDAC濃度：每毫克大疱之EDAC毫克量

* 個體溫度(°C)上升總和(每組3隻兔子)

^s 6隻兔子之總和(3隻來自 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 組，3隻來自 AlPO_4 組)

交聯大疱之抗原性

分析上述大疱(未吸附)之抗原性，以決定交聯作用是否影響大疱之抗原性。取不同之大疱製劑(有交聯或未交聯)塗覆在微分析板上(10 $\mu\text{g/ml}$ ，於4°C下一夜)。經洗滌及飽和後，添加MAb L379或來自接受B1820 DOC 0.1或0.5%免疫接種之小白鼠之血清之一系列稀釋液至分析板中(於室溫下振盪30分鐘)。使用與生物素偶合之抗小白鼠Ig，然後使用抗生物鏈菌素-過氧化酶複合物後，使用OPD與 H_2O_2 顯露所塗覆之大疱上所固定之抗體。使用微分析板讀數器測定各微孔中密度。

結果顯示MAb L379(針對L3 LOS，但不會與TrL3 LOS (lgtB⁻突變株)反應，且對L3菌株具有殺細菌性)可辨識同樣未處理(未共軛)之B1820大疱及不同之已交聯大疱(不受EDAC之使用濃度影響)。參見圖5A。使用EDAC 0.2與1所得反應愈高時，可能反映大疱中LOS之固定性較佳，或至少已交聯之大疱中LOS在此等EDAC濃度下具有較佳安定性。

亦使用小白鼠血清分析此等大疱之抗原性。使用兩種不同血清；第一種來自接受B1820 DOC 0.5%大疱免疫接種之小白鼠(大疱之LOS含量低於或等於8%，主要誘發抗蛋白質抗體)。第二種血清得自接受B1820 DOC 0.1%大疱免疫接種之小白鼠(大疱之LOS含量大於或等於15%，主要針對LOS誘發交叉殺細菌性Abs)。使用L379 MAb觀察時，由這兩種血清得到之結果(分別為圖5B與5C)並未顯示未處理(未共軛)大疱與交聯大疱之間有任何差異(不受EDAC之使用濃

度影響)。

其結論為LOS之抗原性似乎不受交聯作用影響，且大疱之"通用"抗原性亦不受EDAC處理影響。繼續進行小白鼠之免疫原性實驗，以證實交聯作用(使用高濃度EDAC時)不會破壞關鍵性之保護性抗原之免疫原性。儘管如此，預備實驗結果(實例8)顯示，若DOC 0.5%萃取之大疱使用EDAC 0.05進行交聯作用時，此等大疱經過EDAC處理後之免疫原性提高。

實例8：交聯之大疱之免疫原性(EDAC 0.05 mg化學處理)

此實驗中，自B1727菌株製造大疱。此菌株為基因改造之H44/76菌株，係siaD(-)PorA(-)trL3 (lgtB⁻)Hsf+TbpA向上調節)。使用0.5%DOC萃取大疱。經由肌內途徑為小白鼠接種三次(第0、21與28天時)。每次注射均接受吸附在Al(OH)₃上之5 µg大疱。

於第三次注射後14天，抽取各個體之血清，針對H44/76菌株進行血清殺細菌性分析法。結果顯示EDAC處理對反應者之數目(SBA效價>100之小白鼠數目)有正面影響：經EDAC處理之大疱組中，有反應之比例為37%，未經處理之大疱組中僅17%有反應。

調配物中不含3D-MPL，且0.5%DOC萃取後之大疱製劑中LOS百分比相當低(約5%)即可解釋這種低反應性之結果。

	B1727 SiaD(-)PorA (-) TrL3 TbpA-Hsf 交聯"EDAC" 處理法"UF/GPC/UF"	大疱B1727 SiaD(-)PorA (-) TrL3 TbpA-Hsf 無處理 處理法"UF/GPC/UF"
小白鼠		
GMT	52	27
收集血清之SBA	249	60
反應隻數	11/30	5/30

亦進行抗-Hsf ELISA分析法，以決定交聯作用是否影響此蛋白質之免疫原性。結果(由所收集之血清得到)顯示交聯作用不影響IgG抗-Hsf反應。未檢測IgM。

	抗-Hsf ELISA	
	IgM	IgG
B1727 Siad(-)PorA(-) TbpA-Hsf TrL3 交聯EDAC	50	18140
B1727 Siad(-)PorA(-) TbpA-Hsf TrL3	50	15627
陰性對照組	50	50

實例9：TrL3 LOS數據

分析下列實驗：

- TrL3 (lgtB(-)L3 LOS)對誘發可與LNnT(乳醯基-N-新丁

糖)反應之Abs之影響；

- 誘發上述構築體之殺細菌性抗體。

由兩種基因改造之H44/76菌株製造大疱。這兩種均為siaD(-)PorA(-)，但其中一種產生WT L3 LOS，另一種產生TrL3 LOS (lgtB(-))。此等大疱係依據兩種不同製法製成，以具有高量LOS(約18%，使用DOC 0.1%萃取法)或低量LOS(接近5%，使用DOC 0.5%萃取法)。

經由肌內途徑為小白鼠接種三次(第0、21與28天時)，每次注射含或不含3D-MPL之吸附在Al(OH)₃上之5 μg大疱。

抗-LNnT ELISA

方法：使用利用間隔基(ADH)與人類血清白蛋白共軛之LNnT塗覆微分析板((每ml PBS含5 μg共軛物，每微孔100 μl)。於4°C下培養一夜後，以PBS-BSA 1%洗滌分析板並使之飽和(於室溫下40分鐘)。洗滌後，於PBS-0.2% BSA- 0.05%中進行一系列稀釋，添加Tween20(於室溫下30分鐘)。由小白鼠-IgG與過氧化酶(Jackson藥廠)偶合後，與OPDA及H₂O₂培養，顯露IgG已被LNnT固定。

結果：陽性對照組為1B2-1B7 MAb。此MAb會與LNnT反應，及與L3 LOS(但不與TrL3 LOS)反應(參見前述實例)，會使人類紅血球凝集。陰性對照組(-)為來自僅接受輔劑接種之小白鼠。

其結果(圖6)清楚顯示，僅高LOS含量之L3大疱(DOC 0.1%)誘發可與LNnT反應之IgG產生。LOS含量類似之Tr L3大疱不會針對LNnT誘發產生IgG，兩種LOS含量低之大疱製

劑(DOC 0.5%)亦不會誘發。

H44/76 菌株之 SBA

以第三次注射後14天所取得之個別血清，針對H44/76菌株進行SBA分析法。其結果清楚顯示，trL3 (lgtB(-))LOS大疤所誘發之殺細菌性抗體量類似L3 LOS(參見GMT及SBA效價>1/100 (=SC)之小白鼠隻數)

調配物		L3大疤		TrL3大疤	
		DOC	DOC	DOC	DOC
		0.5%	0.1%	0.5%	0.1%
Al(OH) ₃ +MPL	GMT	331	4125	1029	3204
	SC	19/30	29/30	27/30	30/30
Al(OH) ₃	GMT	169	2029	138	828
	SC	14/30	29/30	13/30	30/30

實例 10：FrpB 擊倒試驗

下列數據綜合說明兩種臨床前實驗法。

此等實驗中，使用兩種基因改造之H44/76菌株，使用0.1%DOC製造大疤。依此方式得到之大疤中LOS含有接近20%。

這兩種H44/76菌株如下：

- B1733：siaD(-)PorA(-)Tr(截短)Hsf向上調節lgtB(-)
- B1820：siaD(-)PorA(-)TrHsf向上調節lgtB(-)FrpB(-)

大疤之製法為由菌株於去鐵胺甲磺酸鹽(desferral)之存在

下生長，向上調節依賴鐵之蛋白質如：LbpA/B、TbpA/B、FrpB(B1733中)，等等之產量。

此等不同大疱製劑係吸附在Al(OH)₃上，經由肌內途徑注射至小白鼠體內兩次，其間間隔3週。第二次投藥後7天取血樣。每次為小白鼠注射5 µg大疱。

SBA結果

於三種L3菌株(同源性野生型菌株H44/76及兩種異源性L3菌株：NZ124與M97250687)上進行殺細菌分析法。結果清楚顯示FrpB(-)(擊倒)(B1820)大疱比FrpB(+)大疱(B1733)誘發較佳之異源性交叉殺細菌反應(高效價及較佳血清轉化率SC)。該同源性反應雖然因刪除FrpB而下降，但仍令人滿意。

此等數據顯示，FrpB為大疱所誘發免疫反應之主要驅動者，但由於此外膜蛋白質呈高度變化，因此，針對此蛋白質之抗體僅可誘發殺死同源性菌株。因此，在生產大疱之菌株中刪除FrpB為一種改善所製造大疱疫苗之涵蓋範圍之有利方法。

大疱	H44/76		M97250687		NZ124	
	GMT	SC	GMT	SC	GMT	SC
B1733	1518	30/30	151	11/30	70	4/29
B1820	781	19/30	1316	24/30	276	19/30

實例 11：msbB(lpxL1)突變對大疱之熱原性之影響

此分析法中使用兩種NmfnB菌株：

- 對照組菌株，其係galE(-)[因此無法製造莢膜多醣]
- msbB突變菌株：其係galE(-)與msbB(-)

由這兩種菌株，使用0.1%DOC生產大疱，以使OMVs(大疱)中之LOS含量超過15%。如上述實例所說明，LOS含量超過10%之大疱在熱原性之觀點上並不令人滿意，且無法通過歐洲藥典上之兔子熱原性分析法。

上述大疱係於Al(OH)₃(50 µg OMVs/500 µg Al³⁺鹽類)上調配，供於兔子體內進行熱原性分析法(經IV途徑注射500 ng大疱/kg)。

下表清楚證實，刪除msbB(特別用於無法製造莢膜多醣之菌株)後，可使所產生之大疱即使在LOS含量高於15%下亦不會在兔子體內產生熱原性。

大疱	稀釋度	個體體溫上升度數 ⁰ (°C)	t ⁰ 總和	結論對照組
DOC 0.1%	0.5µg/kg	0.7-1.4-1.2	3.3	不通過
msbB(-)DOC 0.1%	0.5µg/kg	0.1-0.2-0.2	0.5	通過

歐洲藥典規定：

"通過"-若個體t⁰總和<1.15°C

"在未重覆下不通過"-若個體t⁰總和在1.15°C至2.65°C之間

"不通過"-若個體t⁰總和>2.65°C

結論：

包含衍生自lgtB(-)與msbB(-)突變之腦膜炎球菌菌株且

經較低濃度(例如：0.1%)去氧膽酸鹽萃取之L3與L2大疱之組合物成為對抗腦膜炎球菌B之有效且安全疫苗之強力基礎。生產大疱之菌株理想上為有莢膜多醣合成缺陷，且其LOS為在大疱內與外膜蛋白質交聯。PorA(-)與FrpB(-)均對改善交叉殺細菌效力有額外助益，同時向上調節Hsf與/或TbpA抗原。

【圖式簡單說明】

圖1顯示L3及L2免疫型(H44/76, MC58菌株)。

圖2顯示L3及L1免疫型(例如：126E菌株)。

圖3A顯示經不同H44/76菌株所製大疱免疫小鼠血清之抗-L3 LOS ELISA。

圖3B顯示不同NmenB菌株之血清殺細菌分析。

圖3C顯示經不同濃度純化L3 LOS耗損之血清之血清殺細菌分析。

圖4顯示使用Mab 1B2-1B7(圖4A)及Mab L379 (圖4B)進行之L3及TrL3 LOS ELISA。

圖5A至5C顯示未共軛及交聯B1820大疱之抗原性。

圖6顯示在3D-MPL存在(圖6A)或不存在(圖6B)下經吸附於AL(OH)₃之大疱免疫小鼠之抗-LNnT ELISA。

伍、中文發明摘要：

本發明係有關奈瑟氏球菌疫苗組合物、其製法及此等組合物於醫學上之用途之領域。更特定言之，其係有關製造新穎之基因工程處理之腦膜炎球菌菌株之方法，使其更適合用於生產奈瑟氏球菌(特定言之腦膜炎球菌)外膜囊胞(或大疱)疫苗。亦說明以採用對人類更安全且/或更有效之新穎之LOS次單位或腦膜炎球菌外膜囊胞(或大疱)疫苗為主之有利製法與疫苗產品。特定言之，其說明向下調節基因產物之組合，如：PorA與OpA、PorA與OpC、OpA與OpC、及PorA與OpA與OpC。或者，或另外，已發現lgtB⁻為奈瑟氏球菌疫苗組合物中可安全且有效使用L3與/或L2 LOS之最適當突變。亦進一步說明由lgtB⁻與缺乏莢膜多醣之腦膜炎球菌突變株衍生之大疱疫苗；並有關製備大疱製劑之有利方法，其中保留LOS作為重要抗原。

陸、英文發明摘要：

The present invention relates to the field of neisserial vaccine compositions, their manufacture, and the use of such compositions in medicine. More particularly it relates to processes of making novel engineered meningococcal strains which are more suitable for the production of neisserial, in particular meningococcal, outer-membrane vesicle (or bleb) vaccines. Advantageous processes and vaccine products are also described based on the use of novel LOS subunit or meningococcal outer-membrane vesicle (or bleb) vaccines which have been rendered safer and/or more effective for use in human subjects. In particular combinations of gene downregulations are described such as PorA & OpA, PorA and OpC, OpA and OpC, and PorA and OpA and OpC. Alternatively, or in addition, lgtB⁻ is shown to be an optimal mutation for effectively and safely using L3 and/or L2 LOS in Neisseria vaccine compositions. Bleb vaccines derived from lgtB⁻ and capsular polysaccharide deficient meningococcal mutants are further described; as are advantageous methods of making bleb preparations where LOS is to be retained as an important antigen.

拾壹、圖式：

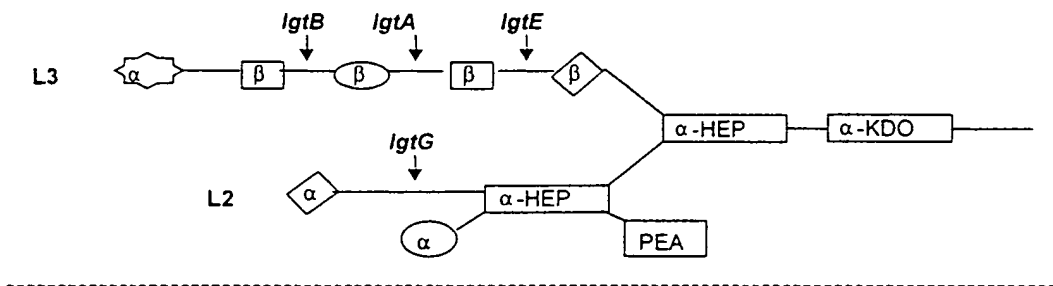
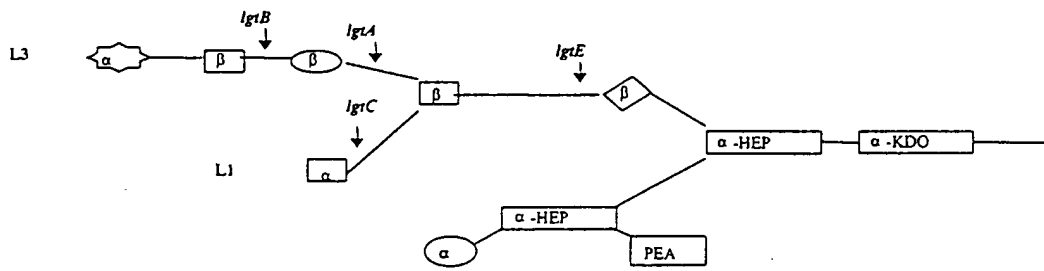


圖 1：L3與L2免疫型(H44/76，MC58菌株)



- 唾液酸
- 葡萄糖
- 半乳糖
- 乙醯基葡萄糖胺
- 磷酸乙醇胺

圖 2：L3與L1免疫型(例如：126E菌株)

圖 3A

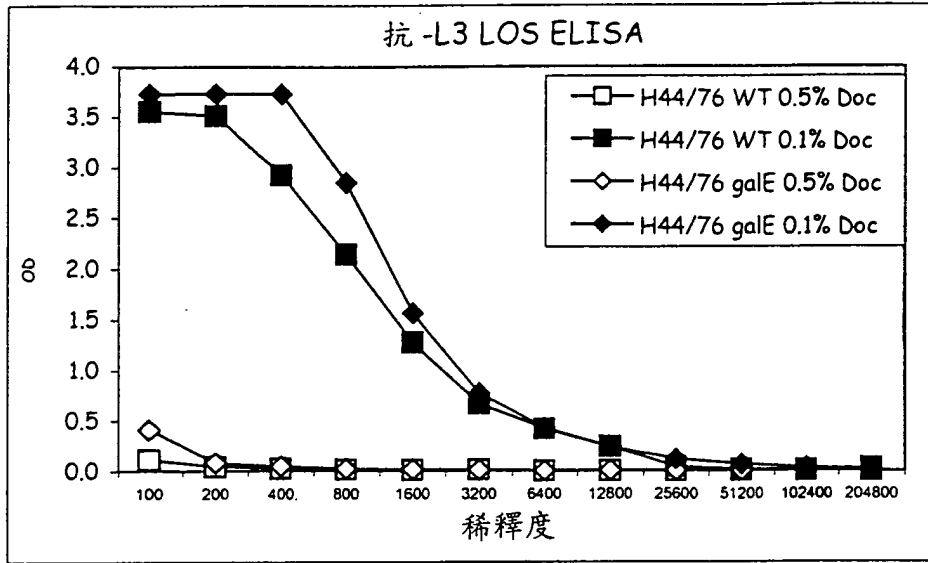


圖 3B

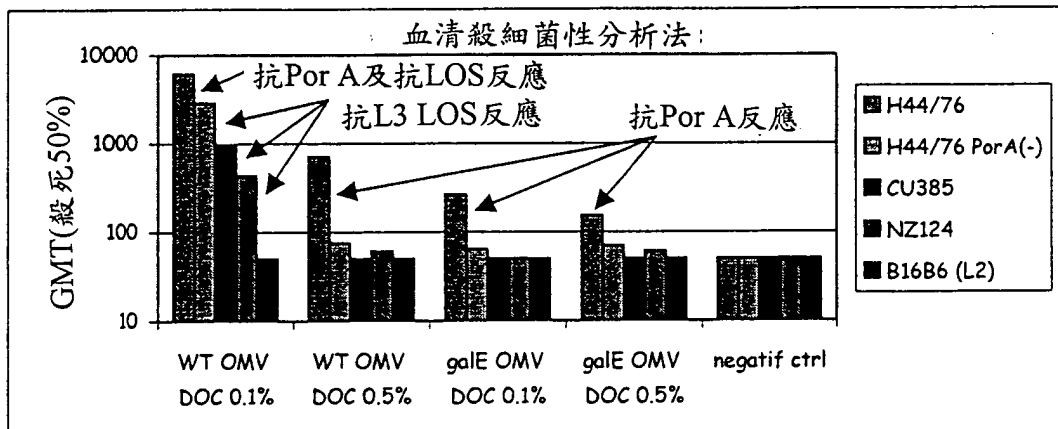
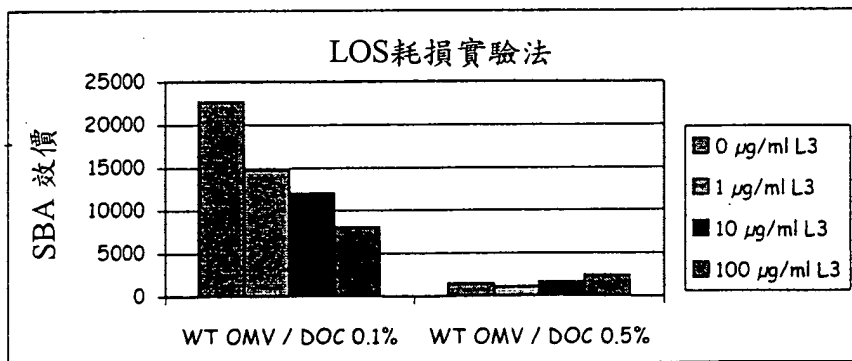
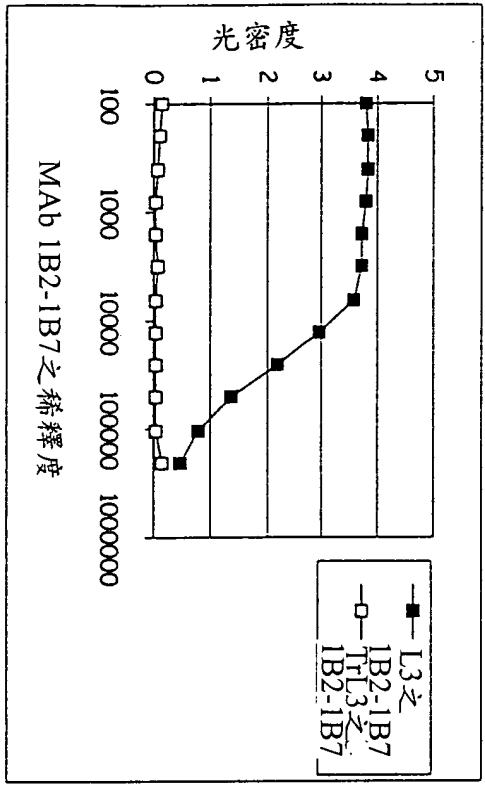


圖 3C



A



B

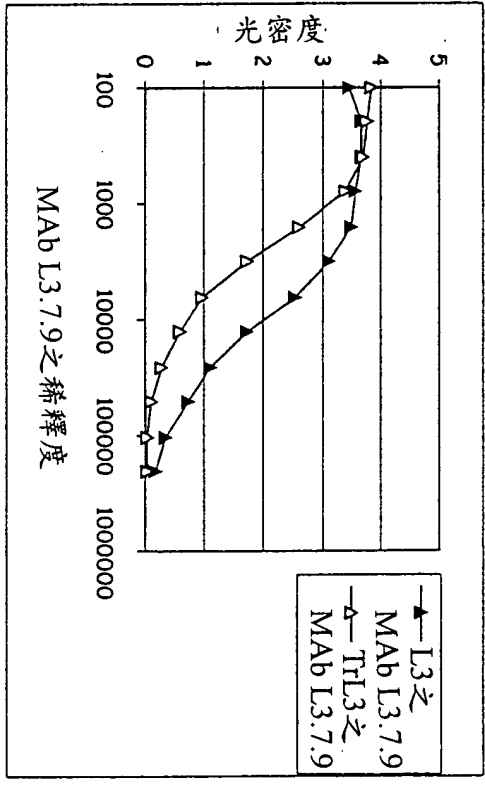


圖 4

圖 5A

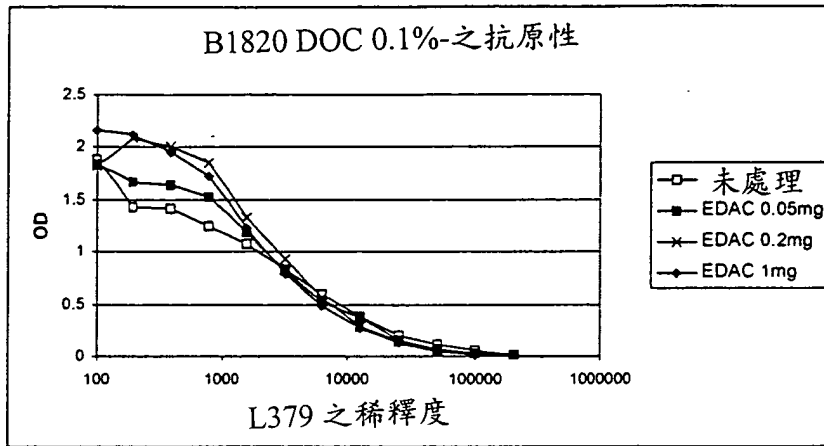


圖 5B

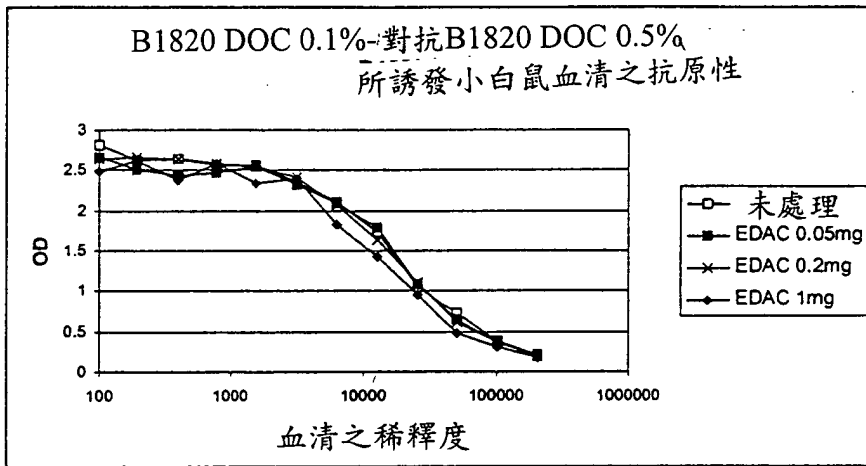


圖 5C

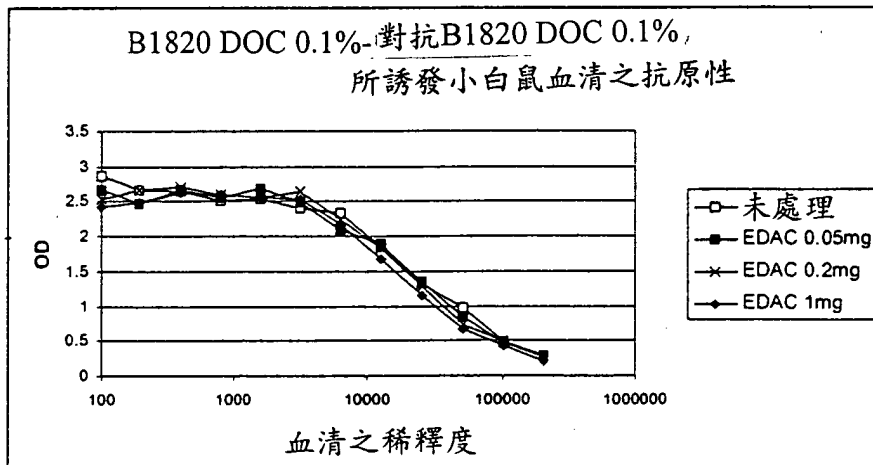


圖 6A

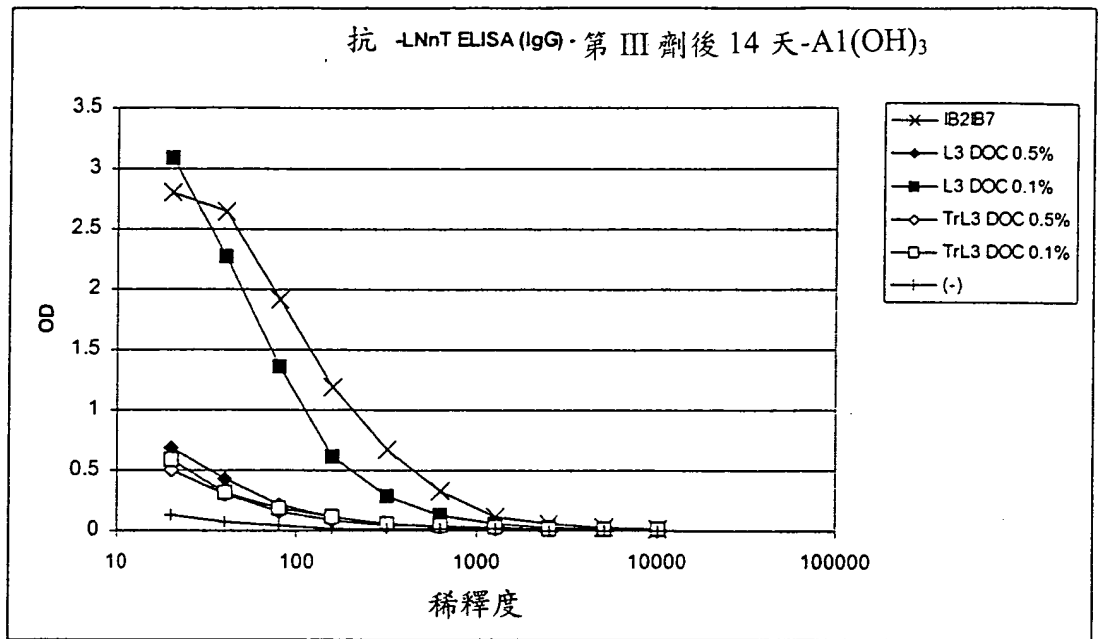
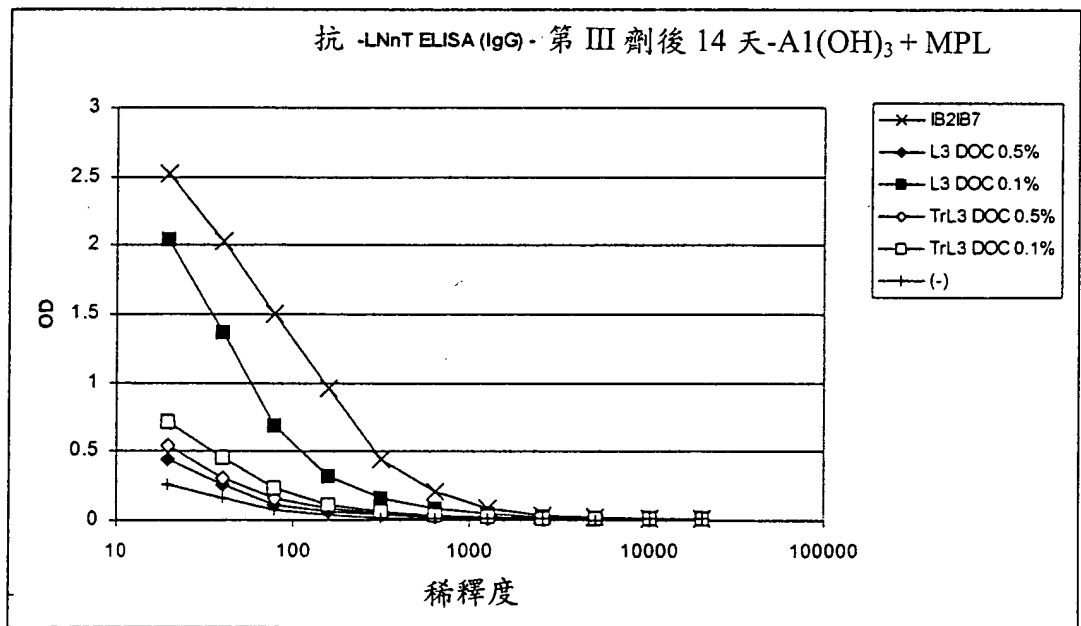


圖 6B



柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

拾、申請專利範圍：

1. 一種奈瑟氏球菌大疱製劑，其係衍生自具有L2 LOS免疫型之奈瑟氏球菌菌株或具有L3 LOS免疫型之奈瑟氏球菌菌株且其中該菌株為1gtB⁻；或一種奈瑟氏球菌大疱製劑，其包含衍生自具有L2 LOS免疫型之奈瑟氏球菌菌株與具有L3 LOS免疫型之奈瑟氏球菌菌株之大疱組合，其中各菌株為1gtB⁻。
2. 根據申請專利範圍第1項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該奈瑟氏球菌菌株(群)為腦膜炎球菌。
3. 根據申請專利範圍第2項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該奈瑟氏球菌菌株(群)為腦膜炎球菌血清型B。
4. 根據申請專利範圍第1、2或3項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該奈瑟氏球菌菌株(群)無法合成莢膜多醣。
5. 根據申請專利範圍第1、2或3項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該奈瑟氏球菌菌株(群)相較於該衍生自該大疱之天然菌株(群)已向下調節下列之一種莢膜多醣基因之表現：ctrA、ctrB、ctrC、ctrD、synA、synB、synC，或siaD。
6. 根據申請專利範圍第5項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該已向下調節表現之莢膜多醣基因係siaD。
7. 根據申請專利範圍第5項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該已向下調節表現之莢膜多醣基因係經刪除。
8. 根據申請專利範圍第5項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中若L2與L3兩種大疱均存在時，該衍生自該大疱之菌株在各菌株中具有相同向下調節表現之莢膜多醣基因。
9. 根據申請專利範圍第1、2或3項之奈瑟氏球菌大疱製劑，

其中該奈瑟氏球菌菌株(群)相較於該衍生自該大疱之天然菌株(群)已向下調節下列之一或兩種脂質A基因之表現：msbB或htrB。

10. 根據申請專利範圍第9項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該已向下調節表現之脂質A基因係msbB。
11. 根據申請專利範圍第9項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該已向下調節表現之脂質A基因係經刪除。
12. 根據申請專利範圍第9項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中若L2與L3兩種大疱均存在時，該衍生自該大疱之菌株在各菌株中具有相同向下調節表現之脂質A基因。
13. 根據申請專利範圍第1、2或3項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該奈瑟氏球菌菌株(群)相較於該衍生自該大疱之天然菌株(群)已向下調節下列之一或多種外膜蛋白質基因之表現：porA、porB、opA、opC、pilC或frpB。
14. 根據申請專利範圍第13項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該已向下調節表現之外膜蛋白質基因係經刪除。
15. 根據申請專利範圍第13項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中若L2與L3兩種大疱均存在時，該衍生自該大疱之菌株在各菌株中具有相同向下調節表現之外膜蛋白質基因。
16. 根據申請專利範圍第13項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該奈瑟氏球菌菌株(群)相較於該衍生自該大疱之天然菌株(群)已向下調節下列任一種外膜蛋白質基因組合之表現：PorA與OpA、PorA與OpC、OpA與OpC、PorA與OpA與OpC、PorA與FrpB、OpC與FrpB、OpA與FrpB、PorA與OpA及OpC與FrpB。

17. 根據申請專利範圍第16項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該已向下調節表現之外膜蛋白質基因組合係經刪除。
18. 根據申請專利範圍第1、2或3項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該奈瑟氏球菌菌株(群)已向上調節下列之一或多種外膜蛋白質抗原之表現：NspA、TbpA低分子量型、TbpA高分子量型、Hsf、Hap、OMP85、PilQ、NadA、LbpA、MltA。
19. 根據申請專利範圍第18項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中若L2與L3兩種大疱均存在時，該衍生自該大疱之菌株在各菌株中具有向上調節表現之一或多種不同之外膜蛋白質抗原。
20. 一種衍生自奈瑟氏球菌之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中相較於該衍生自該大疱之天然菌株已向下調節下列之二或多種外膜蛋白質之表現：PorA、PorB、OpA、OpC、PilC或FrpB。
21. 根據申請專利範圍第20項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中已向下調節表現之外膜蛋白質係經刪除。
22. 根據申請專利範圍第20或21項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中該奈瑟氏球菌菌株相較於該衍生自該大疱之天然菌株已向下調節下列任一種外膜蛋白質組合之表現：PorA與OpA、PorA與OpC、OpA與OpC、PorA與OpA與OpC、PorA與FrpB、OpC與FrpB、OpA與FrpB、PorA與OpA及OpC與FrpB。
23. 根據申請專利範圍第22項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中已向下調節表現之外膜蛋白質組合係經刪除。

24. 根據申請專利範圍第1、2、3或20項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中所含之LOS係與T-助手細胞抗原決定基來源共軛。
25. 根據申請專利範圍第24項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中所含之LOS係與蛋白質或外膜蛋白質共軛。
26. 根據申請專利範圍第24項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其係經由大疱內交聯作用製得。
27. 一種單離自奈瑟氏球菌菌株(群)之LOS製劑，其中根據申請專利範圍第1至26項中任一項之奈瑟氏球菌大疱製劑係自該菌株(群)所衍生，其包含免疫型L2及/或L3 LOS。
28. 根據申請專利範圍第27項之LOS製劑，其係呈微脂粒調配物。
29. 根據申請專利範圍第27或28項之LOS製劑，其中所含之LOS係與T-助手細胞抗原決定基來源共軛。
30. 根據申請專利範圍第29項之奈瑟氏球菌大疱製劑，其中所含之LOS係與蛋白質或外膜蛋白質共軛。
31. 一種免疫原性組合物或疫苗，其包含根據申請專利範圍第1至26項中任一項之奈瑟氏球菌大疱製劑或27至30項中任一項之LOS製劑，及醫藥上可接受之賦形劑。
32. 根據申請專利範圍第31項之疫苗，其另包含輔劑。
33. 根據申請專利範圍第32項之疫苗，其中該輔劑為氫氧化鋁，或3D-MPL與磷酸鋁。
34. 根據申請專利範圍第31、32或33項之疫苗，其另包含衍生自下列菌株之一或多種共軛之莢膜多醣或寡醣：腦膜炎球菌血清型A、腦膜炎球菌血清型C、腦膜炎球菌血清型W-135、腦膜炎球菌血清型Y、及流感嗜血菌b型。

35. 一種製造根據申請專利範圍第31至34項中任一項之奈瑟氏球菌大疱製劑疫苗之方法，其包括之步驟為培養奈瑟氏球菌菌株(群)，其中根據申請專利範圍第1至26項中任一項之奈瑟氏球菌大疱製劑係自該菌株(群)所衍生，自其中單離大疱，若適當時可視需要組合L2與L3，並使用醫藥上可接受之賦形劑調配大疱。
36. 根據申請專利範圍第35項之方法，其中該單離步驟係使用0-0.5、0.02-0.4、0.04-0.3、0.06-0.2或0.08-0.15%去氧膽酸鹽萃取。
37. 根據申請專利範圍第36項之方法，其中該單離步驟係使用0.1%左右或0.1%整之去氧膽酸鹽萃取。