



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I329130B1

(43)公告日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 21 日

(21)申請案號：093117276

(22)申請日：中華民國 93 (2004) 年 06 月 16 日

(51)Int. Cl. : C12N7/04 (2006.01)

A61K39/39 (2006.01)

A61K39/12 (2006.01)

(30)優先權：2003/06/19 世界智慧財產權PCT/NL03/00450

組織

(71)申請人：貝斯特維爾侯丁有限公司 (荷蘭) BESTEWIL HOLDING B.V. (NL)

芬蘭

(72)發明人：彤恩 J H 史代克曼 STEGMANN, TOON J.H. (NL) ; 漢斯 H G 凡柏克 VAN BERKUM, HANS H.G. (NL) ; 強 C 威爾斯闕特 WILSCHUT, JAN C. (NL)

(74)代理人：詹銘文；蕭錫清

(56)參考文獻：

Dijkstra et al., Activation of Murine Lymphocytes by Lipopolysaccharide Incorporated in Fusogenic, Reconstituted Influenza Virus Envelopes (Virosomes), 1996, Journal of Immunology, vol. 157, pp. 1028-1036.

Bron R et al: Preparation, Properties, and Applications of Reconstituted Influenza Virus Envelopes. (Virosomes). Methods in Enzymology, vol. 220, 1993, pp. 313-331.

Campagnon B et al: Targeting of Poly (RL)-Poly (RC) by Fusogenic (F Protein) Immunoliposomes. Experimental Cell Research, vol. 200, No. 2, Jun. 1992, pp. 333-338.

S. Ando, H. Tsuge, T. Mayumi, Preparation of influenza virosome vaccine with muramyldipeptide derivative B30-MDP. Journal of Microencapsulation, vol. 14, No. 1, 1997, pp. 79-90.

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：11 共 47 頁

(54)名稱

包含佐劑之功能重組病毒細胞膜

FUNCTIONALLY RECONSTITUTED VIRAL MEMBRANES CONTAINING ADJUVANT

(57)摘要

本發明是關於直接用對抗如病原或腫瘤細胞膜蛋白的抗原之疫苗。本發明亦關於一種形成具有膜融合活性的重組病毒細胞膜之方法。重組病毒細胞膜為雙脂質層細胞膜較佳者包含病毒的天然脂質、一種病毒融合蛋白、可另外包含一種或多種抗原及佐劑。包含該種重組病毒細胞膜的藥劑組合亦屬本發明之範圍內。

The present invention relates to vaccines directed against antigens such as membrane proteins from pathogens or tumor cells. The invention further relates to methods of forming reconstituted viral membranes, with membrane fusion activity, which are lipid bilayer membranes preferably containing natural lipids of a

virus, a viral fusion protein, one or more optional further antigens as well as amphiphilic adjuvants. Pharmaceutical compositions comprising such reconstituted viral membranes are also part of the invention.

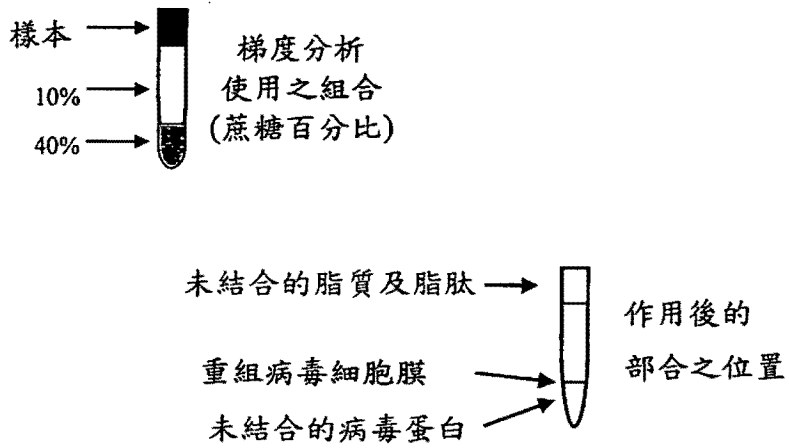


圖 1

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明提供直用以對抗如病原或腫瘤細胞膜蛋白的抗原之疫苗。本發明另提供形成具有膜融合活性的重組病毒細胞膜的方法，該重組病毒細胞膜中之雙層脂質膜包含一種病毒的天然脂質、兩性抗原和兩性佐劑，以及內含該重組病毒細胞膜的組合藥物。

### 【先前技術】

一般而言，對抗被膜病毒(enveloped virus)的疫苗包含死亡的病毒或是衰減的病毒活株，或是包含該病毒組合之製劑，例如：破裂的病毒或次單元(subunit)製劑。就施用疫苗的方式而言，這些製劑通常為注射劑，在注射之後，存在於該疫苗的病毒或蛋白被免疫系統中具有抗原表現的細胞(antigen-presenting cell)所吸收，如：樹突細胞或巨噬細胞，並且隨之將疫苗的抗原部份呈現給在免疫系統的效應細胞(effector cell)中產生作用。注射疫苗之所以會產生作用是因為具抗原表現的細胞大量存在於表皮下，但僅管如此，近來的研究發現，類似的細胞亦可在例如鼻腔黏膜中作用(Ogra et al. 2001)。為引發該吞噬細胞在黏膜中的作用以增加免疫反應，該刺激必須比注射在皮下的疫苗還要強(Janeway et al. 2001)。

在注射如流行性感冒或麻疹之含有病毒或蛋白的疫苗時，所誘發出的免疫反應是足以抵抗往後被該種病毒所感染，但是這種防疫的方法卻不適用在許多其他的情形，如

呼吸道融合病毒。多數以物理或化學方法來加強免疫反應的方式已有人嘗試過，而所得到最重要的原則為(1)使用物理刺激時必須在微粒中結合多種病毒蛋白，而該些微粒可為全病毒、重組病毒細胞膜或存在於微粒載體上之蛋白，以微粒刺激免疫系統比使用個別次單元的成效為佳(Ogra et al. 2001; Janeway et al. 2001)；(2)另外使用化學刺激時，免疫系統中的吞噬細胞必須經由受體接收到一定的訊息以作用，例如經由使用可被該受體所接受的化學合成佐劑。

藉由充足的物理化學刺激，即使是使用於如鼻腔黏膜中，病毒蛋白可衍生出強烈的免疫反應(Ogra et al. 2001)，近來多數使用上述方式用來刺激免疫系統的方法及化合物，不論是化學或物理，甚至兩者合併使用者，皆有如下述之明顯缺失。

一種包含病毒糖蛋白雙脂質層名為” Virosomes” 的習用疫苗混劑可包含重組病毒細胞膜，而該 Virosomes 疫苗通常是以使用清滌劑自被膜病毒中萃取膜蛋白及脂質的方式製成，隨後再增加脂質並從所萃取出來的病毒膜蛋白及脂質中去除該清滌劑，這種特殊的雙脂質層即由突出自該雙脂質層之蛋白一併形成(Stegmann et al. 1987)。Virosomes 亦可包含由純化的病毒蛋白及合成或天然脂質，或以其它物質所形成的雙脂質層所形成。Virosomes 的其中一種特性為 Virosomes 可以對天然的病毒封皮(native viral envelope)的組成物、表面結構及功能作用作相當程度的模仿，而 Virosomes 一種重要的特性則有關於保

存天然病毒封皮的受體結合及膜融合作用。該特性能使 Virosomes 進入病毒所能進入之細胞，並且藉由這些細胞作用於免疫系統中。受體結合及膜融合作用之保存對於整個使用 Virosomes 引起免疫反應物質的表現是有其必要的 (Arkema 2000; Bungener 2002)。

對於某些病毒抗原而言，在例如以鼻劑施用 Virosomes 時所引發的免疫反應是足以保護使用者的(如 WO88/08718 及 WO92/19267 中所佐證之)，儘管如此，相較於使用死亡病毒或次單元製劑(如 Gluck et al. 1994 中所佐證者)，其他使用 Virosomes 的處方只具有最小的免疫效果。在該例證中，Virosomes 是由一種包含外生脂質添加物的方法所製成，且在該 Virosomes 中的合成物及表面的結構所製成的結果有異於那些存在於天然病毒覆膜者。熟知本技藝者皆知，這種表面結構上的差異會影響製成 Virosomes 的膜融合特性以及其免疫性。

用一種取自大腸桿菌這種不耐熱毒素來加強使用鼻腔內用疫苗的免疫反應的佐劑蛋白與加強脂質的 Virosomes 流行性感冒疫苗混合(EP 0 538 437)，臨床測試顯示，該附加的毒素對於引發血清抗體對於所注射的疫苗之濃度等量具有其絕對的必要性(Gluck et al. 1994)。即使附加的毒素確實加強該疫苗的免疫力，但在本臨床實驗中也激發嚴重的副作用——貝氏顏面神經麻痺，一種暫時性的顏面神經麻痺。由於該毒素的佐劑作用(adjuvating effect)是由一種具抗原表現的細胞所認定的，並不確定在本個案中的毒素

及病毒蛋白會與同一個細胞接觸，也因此需要相關的高濃度毒素以確保每個細胞的活性作用，增加抗原被活化細胞接受的機會。因此這種包含多加脂質的 Virosome 製劑的確有明顯的缺點。

另外，亦有使用純化流行性感冒抗原混合胞壁戊基二肽的誘導劑的方法備製 Virosomes(EP 0 205 098 及 EP 0 487 909)，其中該胞壁戊基二肽的衍生物形成細胞膜，即使胞壁戊基二肽是為一種佐劑，且該配方確實可強對於流行性抗原的免疫反應；胞壁戊基二肽屬熱源性(Kotani et al., 1976; Dinarello et al., 1978)在注射後明顯快速地在體內產生並具有局部毒性因而會導致肉芽腫及感染(Ribi et al., 1979; Kohashi et al., 1980)。此外，胞壁戊基二肽在中性的酸鹼值中有一定的有效期限(Poqwll et al., 1980)，其維持結構完整性的最理想酸鹼值過低，以致於無法使疫苗中的配方與病毒的融合蛋白藉由受體媒介的內噬作用(如流行性病毒的血球凝集素(hemagglutinin))進入細胞，不僅如此，這種合成的細胞膜並無法有良好的模擬天然病毒細胞膜的表現，且因此對合成細胞膜所產生的免疫反應會與對病毒所產生者有其差異。

相反地，本技藝之研究學者亦製造與重組病毒細胞膜相異的複合抗原，例如：免疫刺激複方(Immunostimulatory Complexes)(ISCOMs, Morein et al. 1984)，該複合抗原包含病毒蛋白與佐劑(例如：植物皂素，Quil A<sup>®</sup>，多數自 *Quillaia sapanaria* Molina 的皮層分離而得)(EP 0231039B1; EP

0109942A1; EP 0180564A1)。這些佐劑與抗原及如膽固醇的脂質混合後形成介於 30 至 40nM 的籠狀結構，並在作用如佐劑時激發抗原微粒。儘管免疫刺激複方已用在許多動物之疫苗中，並加強對病毒細胞膜蛋白的免疫反應，這種人體所使用的疫苗的研發曾經因為其毒性及混劑的複雜性而停止(Cox et al. 1998)。

近來已研發出包含細菌(例如腦膜炎球菌)的純化外膜細胞蛋白的非共價複合物的蛋白酶流行感冒疫苗(美國專利 20010053368)，與例如流行性感感冒血球凝集素或人體免疫缺乏被膜糖蛋白之抗原蛋白混合，當這數種細菌蛋白可能作用為佐劑時，該包含多種蛋白之混合物的複雜天性會呈現地難以控制，另外，該蛋白及其它抗原所呈現的免疫反應則表現於溶液中，並且對病毒蛋白不具有明顯的反應。

另外一種由 Biovector Therapeutics 所研發的微粒處方包含一種碳水化合物之內核，該碳水化合物被內含抗原的脂質被膜所包圍，有流行性感感冒血球凝集素作為抗原可得到許多加強的免疫反應，但並不明顯到具有做進一步研發的價值。

呼吸道病毒的稀釋活株(例如在呼吸道中重覆最小的流行性感感冒適冷類型)曾被研發成鼻腔內用疫苗，在誘發近似於由因野生種病毒感染所引起的自然免疫力而言，這些疫苗在免疫反應方面具有顯著的優點。就流行性感感冒而言，這種疫苗在 1980 年代就已為人所知，而至今才幾乎被商業化地上市了。為何會有其中時間的延遲？是因為該疫苗的

防疫能力，在多種病毒快速變種的作用下，被稀釋的病毒逆化所有野生種病毒的部份，因此實際上反而引發了該疫苗所應當防止的疾病。

基於上述本技藝領域中所熟知的原因，特別是在於引發病原的免疫反應上，並不能以該病原本身來引發強勁的免疫反應；就鼻腔及其它黏膜所使用的疫苗而言，即使研發如免疫刺激複方及蛋白酶的組合，對於具有引發強效免疫反應的良好特性化不具病毒活株但有低毒性的疫苗組合仍有相當大的需求。

#### 【發明內容】

本發明提供新穎的方法以解決許多上述的問題及困難，本發明中的重組病毒細胞膜包含一種兩性佐劑及一種抗原，其中該佐劑及其抗原藉由疏水作用而相互作用，並呈現於重組病毒細胞膜的雙脂質層中，且在該重組病毒細胞膜中具有比依照 EP0538437 號專利備製之仿病毒粒(virosome)更佳的膜融合作用。該重組病毒細胞膜更相近地模仿衍生出該重組病毒細胞膜的病毒被膜的組成物、表面結構及功能性。本發明更提供一種製造這種重組病毒細胞膜的方法，其製造的步驟大致如下：1)將該病毒溶解於適用的清滌劑中；2)去除病毒遺傳物質及核心蛋白(core protein)；3)將一種或多種含有佐劑作用的兩性微粒及一種抗原置入含有清滌劑的溶液中；以及4)在適合重組該細胞膜的條件下去除該清滌劑。

另外，本發明亦提供一種根據本發明之技術所備製包含

重組病毒細胞膜的藥劑、一種藥理上可接受的載體，以及根據本發明所揭露之重組病毒細胞膜或藥劑在治療或預防上使用方法，其使用方法不限於鼻腔內、口服或非經腸之給藥方式。

為讓本發明之上述和其他目的、特徵和優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例，並配合所附圖式，作詳細說明如下。

### 【實施方式】

首先，本發明為有關一種重組病毒細胞膜，該重組病毒細胞膜包含：a)一種雙脂質層；b)一種病毒的融合蛋白；c)一種兩性佐劑；以及 d)可另外包含一種病原。在該重組病毒細胞膜中較理想的情形為該雙脂質層具有一個可與病毒自然宿主之細胞及該病毒細胞膜融合的脂質組成物，該融合是由融合蛋白所引發，而該脂質組成物融合的最理想條件為在最適當之酸鹼值時進行該融合；另外，較理想者為該融合蛋白和兩性佐劑或抗原與該雙脂質層之疏水內部相互作用，意即經由與該雙脂質層以及(或)互相的疏水作用合併、整合以及(或)埋入該病毒細胞膜的雙脂質層。更佳的情形為該融合蛋白及兩性佐劑為非共價連接，且該兩性佐劑及抗原亦為非共價連接。在本發明中的病毒細胞膜在作用上最理想者為該重組病毒細胞膜包含脂質，且最好為一種病毒的天然脂質、一種兩性佐劑、一種融合蛋白及一種或多種抗原，其中該兩性佐劑、脂質病毒融合蛋白以及抗原須經過主要的疏水相互作用，而其中兩性佐劑之疏

水部份較佳可形成雙脂質層膜的插入部份(integral part)，此雙層另外包含融合蛋白、抗原及脂質。作用上的重組指的是重組病毒細胞膜具有融合作用，較理想的重組病毒細胞膜是處在囊泡(vesicle)的形態中。

病毒的融合蛋白在此意為一個病毒的插入性膜蛋白(integral membrane protein)，若表現在適合的哺乳類或鳥類的細胞上，在適合的酸鹼值之條件下，通常一個被膜的病毒可以引發與可作為病毒天然宿主之細胞產生融合(詳見如 Hernandez et al., 1996)。病毒融合蛋白與重組毒細胞膜結合的例子包括如：聖利基森林病毒 E1 蛋白(Semliki Forest virus E1 protein)、流行性感冒病毒血球凝集素(hemagglutinin, HA)蛋白、人類免疫缺乏病毒(human immunodeficiency virus, HIV) gp120/gp41 蛋白、副黏液病毒(paramyxovirus)的 F 蛋白。可以區分出兩種病毒融合蛋白所引發的融合：第一種的融合，例如由 HIV gp120/gp41 蛋白所引發者，會在中性 pH 值的條件下發生在目標宿主細胞的表面上；第二種的融合，例如由流行性感冒病毒血球凝集素(HA)蛋白所引發者，會在酸鹼值較低時(如 pH5.0 到 pH6.5)內化(internalization)，而從宿主的內體部分(endosomal compartment)內發生。在本發明中具體地包括上述兩種融合。

由以上所述可知，本發明中的重組病毒細胞膜與宿主細胞的融合能力，是關係於適當的病毒融合蛋白的表現。儘管如此，這種融合能力更與重組病毒細胞膜的雙脂質層的

脂質組成物有關，就像在先前技術中曾揭露過的合成脂質及病毒融合蛋白所組成之 Virosome 就沒有融合的能力。由此可見重組病毒細胞膜的脂質組成物較理想應選擇能與適當宿主細胞在恰當的酸鹼條件下融合者。該重組病毒細胞膜的融合能力可用如以下例證三中所述之紅血球血影融合測試(erythrocyte ghost fusion assay)以測之。對於包含流行性感紅血球凝集素的重組病毒細胞膜而言，將  $1\mu\text{M}$  的 Virosome 與  $50\mu\text{M}$  的紅血球血影細胞膜磷脂(phospholipid)在本測試中對紅血球凝集素為最理想酸鹼值下混合，測試中之較佳融合作用在一分鐘後引發將至少 30% 的重組病毒細胞膜囊泡融合於紅血球血影中。

對於不能以上述的方法測試其的其它重組病毒細胞膜而言，較佳融合作用是將重組病毒細胞膜附加於能被病毒所感染的細胞的融合，而該融合蛋白即源自於該病毒。此時，該重組病毒細胞膜應與至少 10% 的可與病毒融合的細胞融合，從而衍生出融合蛋白。

一種使重組病毒細胞膜具融合作用的較佳脂質組成物包含一種病毒的天然脂質，所謂的天然脂質在此是為那些成長在細胞(較佳為哺乳類細胞)上的病毒細胞膜中所呈現的脂質，或成長在受精蛋(embryonated egg)中者。相對於合成的脂質，該病毒的天然脂質較佳為從病毒微粒中取得或分離而來者。但是，除了天然脂質外，在本發明中所作用的重組病毒細胞膜可包含由其它來源所純化的脂質，例如：合成脂質。準備用於融合作用的重組病毒細胞膜之脂

質組成物較佳者為取自(或可取自)於天然的病毒細胞膜。脂質組成物在本發明中包括僅由天然病毒脂質所組成之組成物、由天然病毒脂質與其它物質之脂質所組成之組成物，以及由許多物質之脂質所組成之組成物，以模仿天然病毒細胞膜的脂質組成物。

在本發明中的佐劑包括任何的物質或成份，該任何的物質或成份在與抗原組合而使用於人類或動物的免疫時，可刺激該免疫系統以加強或促進其免疫反應抵抗病原，其中該誘發的作用較理想者應為不會使免疫系統對該佐劑本身產生特異性免疫反應(specific immune response)。與產生免疫反應對抗在相同條件下但沒有佐劑的情況下做比較，較佳的佐劑能加強免疫系統對抗特定的抗原至少 1.5、2、2.5、5、10 或 20 倍。在先前的技術中有記述，在動物或人類組及控制組中，測試由佐劑所產生對抗特定抗原的免疫反應提升程度之統計平均值。佐劑應能加強免疫反應以對抗兩種以上的不同抗原。而在本發明中的佐劑通常為一種不屬於哺乳動物的混合物，並不包括哺乳動物內生的免疫刺激成份例如：介白素、干擾素及其它內分泌素。在本發明中用來與重組病毒細胞膜作用合併的佐劑較理想者為兩性的佐劑。

所謂的「兩性佐劑」指的是包括任何的佐劑，包括的成份如具有埋入的疏水膜及環境取向(environment oriented)的極性(頭組)部份的脂肽(lipopeptide)及醣脂(glycolipid)，具較理想者為可以自行與雙脂質層囊泡或微胞(micelle)在

水裡合併；甚至更理想者為能自行與該雙脂質層囊泡或微粒在水裡合併整合。另外，所謂的兩性佐劑亦包括任何能安定地以自身的疏水部份併入雙脂質層(包含病毒的天然脂質)而與雙脂質層內部疏水的部份接觸的兩性佐劑，且其極性頭組部份朝向和膜的外部極性表面接觸。但是有更多的疏水佐劑具有較不明顯的兩性特質，換言之，即不具有極性頭組的部份或是僅有微弱之極性頭組的部份，但有能力併聯或整合入雙脂質層囊泡，這些都包括在本發明中所謂的兩性佐劑。在本發明中所指的具有佐劑作用的兩性佐劑，包括自然發生或以(部份)合成之佐劑，其能與一個或多個抗原及病毒的天然脂質一起在水性的環境中且在允許重組病毒細胞膜形成的條件下形成重組病毒細胞膜。

在較佳的實施例中，相對於先前技術已測試過之具有佐劑作用的兩親分子例如 Quil ATM 或其它植物皂素(saponin)，該表現於重組病毒細胞膜的兩性佐劑在藥理上可施用於人體。本發明中的兩性佐劑較佳者為與抗原非共價連接，但一同表現於重組病毒細胞膜的雙脂質層中。事實上該抗原和佐劑並非共價連接以確定抗原的處理及表現其抗原決定基(epitope)在免疫系統與僅有天然蛋白本質一致，以確保在自然的病原體上表現的蛋白之良好辨識。另一方面，該抗原與佐劑和雙脂質層(及彼此)的相互疏水作用可允許佐劑及抗原在製劑中分佈於重組病毒細胞膜上，而該製劑中大部份的細胞膜囊泡單獨包含抗原及佐劑，較佳者為至少 60、70、80、90 或 95% 的囊泡包含抗原及佐

劑。該單細胞膜或囊泡中抗原及佐劑的組合可使抗原到達以佐劑活化之具抗原表現的細胞，以增加該重組病毒細胞膜的治療及(或)預防效力。

在本發明較佳的實施例中，該兩性的佐劑是由表現於具抗原表現的細胞上之類鐸受體(Toll-like receptor, TLR)所辨識，而許多已知由類鐸受體所辨識的成份例如：脂肽、脂多醣、肽聚糖(peptidoglycan)、脂壁酸(lipoteichoic acid)、(出自黴漿菌、分枝桿菌或螺旋體之)脂蛋白、雙股核醣核酸(聚肌苷酸-聚胞苷酸(polyinosine-polycytidylic acid, poly I:C))、未甲基化去氧核醣核酸、脂阿拉伯甘露聚糖(Lipoarabinomannan)、鞭毛蛋白、含 CpG 之去氧核醣核酸以及咪唑喹啉(imidazoquinoline)。並非所有可被類鐸受體辨識的成份都適合作為佐劑，例如：野生種革蘭氏陰性菌脂多醣具有過量的毒素以致不能被用來當作佐劑，在藥理上並不適用於人體。其它可被類鐸受體辨識的成份則或多或少可作為佐劑，而這種可被類鐸受體辨識的成份可以本身是兩性佐劑或可改良成兩性佐劑，例如：將疏水成份(詳見以下說明)與一種極性類鐸受體配體(ligand)配對。該兩性佐劑會鎖定其它的受體。較佳的兩性佐劑為可以合成或半合成方式製造之脂肽；而較適合用來做為兩性佐劑的脂肽具有佐劑活化作用並且為適用於人體者。在本發明中的一種脂肽一般為一種包含一種或多種(寡)胜肽((oligo)peptide)與一種或多種疏水成份共價配對的分子，而該一種或多種疏水成份可為脂肪酸、脂質、神經醯胺

(ceramide)、縮醛磷脂、烷基或烯鏈，或固醇等。一般而言，用在本發明中的脂肽較理想者為包含 3、4、5、6、7 或 8 個胺基酸，而較理想的胜肽包含 40 到 70% 的帶正電胺基酸，其中以離胺酸及精胺酸較為理想；而胜肽較佳者為包含一種或多種絲胺酸以及(或)半胱胺酸。最適合的脂肽詳見附表 1 所列。

本發明中的另一個較佳實施例的兩性佐劑為一種醣脂，而較適用於兩性佐劑中的醣脂應具有佐劑活性作用以及可適用於人體。醣脂為脂質(或其它疏水成份)與一種或多種糖共價連接者。在本發明更佳實施例之重組病毒細胞膜中，該醣脂為一種 半乳糖苷基神經醯胺(alpha-galactosylceramide) 或一種磷脂肌醇甘露糖苷(phosphatidyl inositol mannoside)。而一種 半乳糖苷基神經醯胺及一種磷脂肌醇甘露糖苷指的是包括彼此任何的衍生物，而這些分子的衍生物具有佐劑的活化作用且有助於說明本發明者則分別記述於例如美國專利 US5,936,076 以及 US4,542,212。其它適合於本發明的醣脂佐劑包括例如：革蘭氏陰性菌(Gram-negative bacteria)的內毒素性脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)的改良形式，而該革蘭氏陰性菌的內毒素性脂多醣(LPS)的改良形式具有減弱毒性的脂質 A (Lipid A) 部份但脂多醣(LPS)仍保留(部份的)佐劑活性作用，如專利 WO02/09746 中所記述之可從基因改良的革蘭氏陰性病原體取得者。

一種在本發明中作用為兩性佐劑的脂多醣具有減弱毒

性的改良脂質 A 部份，而該改良脂多醣的毒性較理想者為少於所配合使用的野生種脂多醣的毒性，更理想的改良脂多醣的毒性為少於野生種脂多醣的毒性的 90、80、60、40、20、10、5、2、1、0.5 或 0.2%。野生種脂多醣的毒性與多種具有減弱毒性之改良脂多醣可經由任何在本技藝中適當的測試來認定，而較佳的測試方法即為測試在 MM6 巨噬細胞株(MM6 macrophage cell line)中引發 TNF-alpha 的 WEHI 試驗以檢測其改良之脂多醣生物活性作用(Espevik and Niessen, 1986, J. Immunol. Methods 95:99-105; Ziegler-Heitbrock et al., 1988, Int. J. Cancer 41:456-461)。另一方面，含減弱毒性的改良脂多醣應仍保有足夠的免疫刺激作用，即為佐劑作用。含減弱毒性的改良脂多醣較佳具有對應之野生種脂多醣的至少 10、20、40、80、90 或 100% 的免疫刺激作用。此免疫刺激作用可由以上之說明或本發明中之例證於實驗之動物體內(in vivo)測定或於體外(in vitro)測定，例如：從受脂多醣刺激的樹突細胞中測試至少一種細胞激素的產物(例如：IL12、IL10、TNF-alpha、IL6 及 IL-1-beta 的其中一種)，或檢測在受脂多醣刺激的樹突細胞上之至少一種的協同刺激分子(costimulatory molecule)的表現(例如：CD40 或 CD86)，來測定以待測脂多醣共同培養而刺激之樹突細胞的成熟。

本發明的另一特點為在本發明中的 Virosome 之兩性佐劑是一種胜肽，較佳者為一種兩性的胜肽，而用作為兩性佐劑的較佳胜肽具有佐劑的活性作用且可為人體所接受。

具有佐劑作用的胜肽，特別是極性胜肽可能以(共價)連結至一種較適合的疏水成份(詳見上述說明)而成為兩性佐劑。另外，兩性的胜肽可包含一個胺基酸的疏水片段(hydrophobic stretch)，例如下述之穿膜序列。一種較佳的胜肽包含一個自 Notch ligand Jagged-1 的序列(詳見 Weijzen et al., 2002; Genbank accession no. AAC 52020)或一個自金黃色葡萄菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白 A 的序列。從序列 Notch ligand Jagged-1 或蛋白 A 的胜肽較佳者應與一種適合的疏水成份(詳見上述)共價配對且(或)包含一種穿膜序列(詳見下述)。而由 Notch ligand Jagged-1 或蛋白 A 衍生的胜肽的(極性)部份自雙脂質層突出且最佳者為包括不超過 3、4、5、6、7 或 8 個胺基酸。

本發明中的重組病毒細胞膜較佳者為適合做非經腸及黏膜(例如：鼻腔內膜或口腔黏膜)用劑，本發明中的一個特點在於該重組病毒細胞膜可施用於鼻腔內以將補強抗原在鼻劑中無法正常引起足夠免疫反應的不足，以避免由包含抗原的病原有機體所引起的感染。

而本發明中該重組的病毒細胞膜包含一種病毒融合蛋白，亦可另外包含一種抗原。因此本發明的一部分中該重組病毒細胞膜僅只包含一種病毒融合蛋白並無另外包含抗原，如此一來，該病毒融合蛋白在作用為融合蛋白以外亦作用為抗原。另一方面，該重組病毒細胞膜可因此另外在病毒融合蛋白中包含一種或多種的抗原。

在本發明中屬於重組病毒細胞膜一部份的抗原應具有

可以被安插進重組病毒細胞膜囊泡的雙脂質層細胞膜之疏水部份。許多例如病毒、細菌、酵母菌以及寄生蟲的病原體所帶外殼(capsid)、細胞壁或細胞膜、蛋白會引發宿主的免疫反應。具有疏水物質(例如：穿膜片段)及適合作為本發明中所述之部份重組病毒細胞膜的抗原為表現於病原細胞膜(亦稱為病毒的被膜)的蛋白。因此，在本發明中之重組病毒細胞膜內所表現的抗原較佳者為一種插入性膜蛋白(integral membrane protein)。而在本發明中之重組病毒細胞膜內之抗原蛋白則朝向它們在病毒或細胞膜上所出現的方向，但當呈現在細胞膜雙脂質層時，則可呈現正常部份地或至少暫時隱藏之抗原決定基(epitope)。或許由於免疫系統細胞對重組病毒細胞膜特異性辨識的結合、重組病毒細胞膜的特性、蛋白的呈現以及未覆蓋的隱藏抗原決定基，以使這些具抗原表現的重組病毒細胞膜刺激該免疫系統。較理想的情形為本發明中該使用於重組病毒細胞膜的抗原蛋白包含一個或多個保護之抗原決定基，意即在哺乳類中具引發免疫反應的抗原決定基以提供對抗衍生此抗原的病原感染或表現抗原的腫瘤。

在較佳的實施例中，該抗原係衍生自一種病毒、寄生蟲、真菌類或細菌，特別是重組病毒細胞膜中，該抗原即為衍生自流行性感冒病毒。流行性感冒病毒中較適用於本發明之重組病毒細胞膜的蛋白為單獨或於組合中之血球凝集素(HA)蛋白、神經胺酸酶(neuraminidase, NA)蛋白以及(或)M2蛋白。

可以用於形成重組病毒細胞膜的抗原在本發明中可為衍生自所有種類的病毒，例如：反轉錄病毒(如人體免疫缺乏病毒)、風疹病毒、副黏液病毒(如副流行性感冒病毒、麻疹腮腺炎、呼吸道融合病毒、人體間質肺病毒(HMPV))、黃病毒(如黃熱病病毒、登革熱、C 型肝炎病毒(HCV)、日本腦炎病毒(JEV)、森林腦炎病毒、聖路易斯腦炎或西尼羅河病毒)、疱疹病毒(如單純疱疹病毒、巨細胞病毒、鼻咽癌過濾性病毒(EBV))、布尼亞病毒、沙狀病毒、漢他病毒(如漢他)、冠狀病毒科、乳多瘤病毒科(如人類乳突病毒)、桿狀病毒科(如狂犬病毒)、冠狀病毒科(如人類冠狀病毒)、阿爾法病毒科(Alphaviridae)、披衣病毒科、線病毒科(如伊伯拉病毒)、沙狀病毒科及痘病毒科(如天花病毒以及非洲豬瘟病毒)。同樣地，這些抗原可能由帶病原的細菌、真菌(包括酵母菌)或寄生蟲所衍生。這些包括細菌性抗原的抗原例如：幽門螺旋桿菌(*Helicobacter*)，如 *Pylori* 幽門螺旋桿菌(*H. pylori*)；奈瑟氏雙球菌(*Neisseria*)，如腦膜炎雙球菌(*N. meningitidis*)；腦膜炎(*Haemophilus*)，如流行性感冒腦膜炎(*H. influenza*)；百日咳桿菌(*Bordetella*)，如 *Purtussis* 百日咳桿菌(*B. pertussis*)；衣原體(*Chlamydia*)；鏈球菌屬(*Streptococcus*)，如鏈球菌屬 sp.血清型 A (*Streptococcus* sp. serotype A)；弧菌(*Vibrio*)，如霍亂弧菌(*V. cholera*)；革蘭氏陰性腸病原包括例如：沙門氏菌(*Salmonella*)、志賀氏菌(*Shigella*)、彎曲桿菌(*Campylobacter*)以及大腸桿菌(*Escherichia*)；以及自引起炭疽病、癩病、肺結核、破傷風、

萊姆症、梅毒、傷寒熱以及淋病的細菌之抗原。來自寄生蟲之抗原例如包括來自原蟲(protozoan)之抗原，例如牛焦蟲(Babesiosis bovis)、瘧原蟲(Plasmodium)、利什曼原蟲屬弓蟲 (Leishmania spp. Toxoplasma gondii) 以及錐蟲 (Trypanosoma)(如：克氏錐蟲(T. cruzi))。真菌抗原可包括自真菌界，如麴菌(Aspergillus sp.)、腐化性細菌(Candida albicans)、隱球菌屬 (Cryptococcus) 例如新型隱球菌 (C. neoformans) 與荚膜組織漿菌(Histoplasma capsulatum)之抗原。

儘管疫苗一般是用來做預防性抵抗病原或治療因病原感染所引起的疾病，疫苗亦被用來治療腫瘤是在本技藝中為人所熟知者。另外，研究發現，越來越多的腫瘤特異性蛋白(tumor-specific protein)適合成為人類或人化抗體攻擊的目標，這種腫瘤特異性蛋白亦屬於本發明所揭露的範圍。許多的腫瘤特異性抗原在本領域中並不陌生，因此，在本發明之其中一個較佳實施例中，該重組病毒細胞膜即包含一個腫瘤特異性抗原。適合的腫瘤抗原包括，例如：胚性癌抗原、前列腺特異性膜抗原、前列腺特異性抗原、MZ2-E 蛋白、多形態上皮黏蛋白(polymorphic epithelial mucin, PEM)、併葉酸蛋白(folate-binding-protein)LK26、截平表皮生成因子受體(EGRF)、Thomsen-Friedenreich(T)抗原、GM-2 以及 GD-2 神經節苷脂、Ep-CAM、黏蛋白-1、上皮糖蛋白-2 以及結腸特異抗原。

來自上述病原的較佳抗原為插入性膜蛋白，但是具保護

抗原決定基的非膜蛋白抗原或其部份可在本發明中改變以融合於一穿膜序列中。在本技藝中已知的穿膜序列或撐膜序列(membrane-anchoring sequence)是以哺乳類的穿膜分子的基因幾合為基礎。大部份具有疏水側鏈的穿膜序列通常包含一個約 10 到 30 個胺基酸的片段，最常見的則是大約 20 個胺基酸，而穿膜序列被視為存在許多種類的蛋白且可被使用；而撐膜序列在本發明中的作用包括例如：自 CD8、ICAM-2、IL-8R、CD4 及 LFA-1 中所衍生者。穿膜序列較理想為由自然呈現於病毒細胞膜的病毒插入性膜蛋白所衍生者，例如：人類呼吸道融合病毒(RSV)糖蛋白 G 的穿膜部份(如胺基酸 38 到 63)或流行性感冒病毒神經胺酸酶的穿膜序列(如胺基酸 7 到 27)。

本發明的另外揭露製造一種重組病毒細胞膜的方法，包含以下部份或所有的步驟：1)在一含有清滌劑的溶液中混合一種兩性佐劑、一種病毒融合蛋白、另可選擇加入一種抗原，以及脂質；2)在容許重組包含雙脂質層的病毒細胞膜存於兩性佐劑及病毒融合蛋白與雙脂質層的疏水內部之交互作用的條件下減低該清滌劑的濃度，其中該兩性佐劑及病毒融合蛋白較理想為非共價連接，且該兩性佐劑及其可另外添加的抗原應亦非共價連接，另外該重組病毒細胞膜具有膜融合作用；3)另外，可選擇純化該重組病毒細胞膜；以及 4)亦可選擇將重組病毒細胞膜調入一藥劑組合中。在備製病毒脂質的程序中，其步驟可另包含：5)將病毒溶解於適當的清滌劑中，如：八乙二醇單-N-十二烷醚

(octaethyleneglycol mono-N-dodecylether); 6) 去除該病毒基因物質及核蛋白，例如：以離心法分離。該清滌劑的濃度應在疏水粒(以及/或進入尺寸排除法)上利用透析法、透析過濾法或吸收法以適當的速度除去清滌劑來降低，以達到重新形成該細胞膜的目的，其中該呈現於重組病毒細胞膜的兩性佐劑及病毒融合蛋白另外最好加入之抗原經由疏水相互作用而與雙脂質層的內部疏水部分一併起交互作用。該病毒較佳為含膜病毒，如大部份的被膜病毒，較適合被用作天然病毒脂質來源的病毒為流行性感感冒病毒、聖利基森林病毒或副黏液病毒(paramyxovirus)。

用來製造一種重組病毒細胞膜的較佳方法在本發明中所揭露者包含純化該重組病毒細胞膜的步驟，而純化該重組病毒細胞膜的方法在本領域中所知者包括鑑別及層次比重離心法及(或)層析法(尺寸排除色層分析法、離子交換色層分析法及(或)親和層析法)。清滌劑為具有表面活化作用的兩性分子，適當的清滌劑例如：兩性離子(Zwitterionic)清滌劑(如八乙二醇單-N-十二烷醚)，可以有效地溶解該病毒細胞膜的成份，但不會使該融合蛋白、病毒外殼以及(或)核蛋白變性。

疏水交互作用起因於呈現於水性的環境中之疏水物質間的非共價及非靜電引力。在本發明中更提供一種藥劑包含一種本發明所示之重組病毒細胞膜的活性成份及一種藥理上可接受的載體。藥理上可接受的安定劑、滲透劑、緩衝劑、分散劑以及其它相關者亦可作為該藥劑的成份，而

較佳的形式則視所欲製成的藥劑形態及給藥方式而定。在本發明中的藥用載體可為任何可相容及不具毒性的物質，只要適用於將該重組病毒細胞膜送至病患體內。而用在鼻內用劑之藥劑載體內含例如：水、含鹽緩衝溶液、甘油、聚山梨醇酯 20、聚氧乙烯蓖麻油(cremophor EL)，以及一種辛/癸甘油酯(caprylic/capric glyceride)之水性混合物，且可提供緩衝至中性 pH 值的環境。用於非經腸劑的藥劑載體內含例如無菌緩衝過之 0.9% 的氯化鈉或 5% 的葡萄糖，且另可再加 20% 的白蛋白。用於非經腸的製劑必須是無菌的，而在使用多胜肽或抗體的非經腸用劑之途徑與所知之方法相同，例如靜脈內、腹內膜、肌內、動脈內、病灶內之注射或點滴。施予該重組病毒細胞膜的較佳方法則為快速靜脈注射(bolus injection)。一種用在肌內注射的典型藥劑可再另加例如 1 到 10 毫升的磷酸鹽緩衝食鹽水及 1 到 100 微克(較佳者為 15 到 45 微克)本發明的重組病毒細胞膜(之抗原蛋白)。用於口服劑時，該活性成份可為液體型態，如香酒劑、糖漿及懸浮劑。口服的液態藥劑可添加顏料及口味以提高病患的接受度。製作非經腸、口服或鼻用藥劑的方法在本技藝中係為已知且在許多參考文獻中皆有記述者，例如：Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980)，在其中有詳細而完整的說明。另外，本發明更提供了一種以疫苗抵抗、預防或治療感染性疾病或腫瘤的方法，其中該方法為使用一種本發明所揭露之重組病毒細胞膜提供病患治療及防

疫，而該重組病毒細胞膜在治療及預防上具有其有效劑量。本發明亦有關於使用該重組病毒細胞膜為一種藥劑，較佳者為一種用來抵抗、預防或治療感染性疾病或腫瘤的疫苗。本發明更有關使用該重組病毒細胞膜於製造一種用來抵抗、預防或治療感染性疾病或腫瘤的疫苗。

#### 例證說明

例證一：製造含脂肽 N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸(N-palmitoyl-S-2,3(bispalmitoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-(lysyl)<sub>3</sub>-lysine)、流行性感冒病毒之天然脂質及流行性病毒細胞膜蛋白的重組病毒細胞膜。

以 World Influenza Center 或 American Type Tissue Culture Collection (ATCC) 中所知之方法製造流行性感冒病毒，例如：在受精蛋或培養細胞上培養病毒，且之後以較理想的分離或密度梯度高速離心法或兩種方法併用純化該病毒，然後接著根據既有標準步驟以  $\beta$ -丙內脂或甲醛使其去活化。

將純化及濃縮的流行性感冒病毒 A/Panama/2007/9(含 1500nmol 的磷脂)培養於 1 毫升的八(乙二醇)-N-十二烷基單醚 (C12E8)100mM 濃度的清滌劑中 (Boehringer, Mannheim, Germany)，該濃度應在該清滌劑的臨界微胞濃度之上，並在 40C 的條件下置入中性 pH 值等張緩衝劑 10 分鐘，(緩衝劑 A：145mM 濃度的氯化鈉，2.5mM 濃度的 HEPES，1mM 濃度的 EDTA，酸鹼值為 7.4)。以 100,000x

g 的速率在 40C 的條件下將病毒核蛋白衣及基質蛋白(matrix protein)隨離心 30 分鐘之後去除。拋棄沈澱物，及將上清液與乾的脂肽混合(該脂肽為每 750nmol 的病毒脂質中含 0.5 毫克的脂肽)，直到該脂肽溶解為止。再於每 350 微升的混合液當中加入 128 毫克的生物微粒 SM-2(Bio-Rad)，並用力搖晃該混合液及微粒一小時以去除其清滌劑，然後再將 64 毫克的微粒加入液體中繼續搖晃 10 分鐘，即使沒有再進一步的純化動作，該混濁的上清液已包含可以用於疫苗的重組病毒細胞膜。

將包含重組病毒細胞膜的混濁混合液加在間斷的蔗糖梯度上，用以分析該脂質、脂肽及病毒蛋白之間的物理結合，該蔗糖梯度包含在緩衝劑 A 中 40%(w/v)蔗糖的 1 毫升襯墊組織(cushion)以及在緩衝劑 A 中 10%(w/v)蔗糖的 4 毫升上層組織，如圖 1 所示。將該梯度於 100,000 gmax 的速率離心 90 分鐘之後自 40%的襯墊組織、及介於該襯墊組織與 10%的上層組織之間的介面和該上層組織分別抽樣。在這些梯度中未結合的病毒蛋白在離心的過程進入該襯墊組織，未顯現於重組病毒細胞膜的脂質及脂肽則進入梯度的上層組織，而在介面中則可發現重組病毒細胞膜(詳見圖 1)。另外，在本測試中靠近梯度上層組織的地方發現 15%的病毒脂質及 6%的脂肽，結果呈現在梯度上之 85%的病毒脂質、94%的脂肽以及 60%的病毒細胞膜蛋白與重組病毒細胞膜帶結合。

接著分析帶的脂質組成物，根據以上的方式從上述之蔗

糖梯度 40/10% 的介面中準備兩份重組病毒細胞膜的樣本，或是不加脂肽，參考 Folch et al., (1957) 以氯仿/甲醇萃取。所萃取得到的脂質及脂肽以平面薄層色層分析譜分析，並以氯仿/甲醇/水比例 65/25/4 為第一次洗液(eluent)，隨後以 N-丁醇/醋酸/水比例 2/1/1 為洗液，再以寧海準染色衍生物染色(在測試片上的 N-丁醇噴上 2% 的寧海準，再於 80°C 的溫度下培養 10 分鐘)，實驗結果詳見圖 2，於圖 2 中清楚呈現該病毒的天然脂質與脂肽的物理結合。

由梯度帶所取得 Virosomes 的電子顯微照片則顯示於圖 3，其中可以很清楚地看到病毒的分子大小及作為流行性感  
冒病毒特徵的病毒抗原矛頭(spike)。

例證二：使用包含脂肽 N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、流行性感  
冒病毒之天然脂質及流行性病毒細胞膜蛋白的重組病毒細胞膜的鼻內疫苗試驗。

使用本發明之含流行性感  
冒病毒血球凝集素及脂肽 N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸的重組病毒細胞膜的鼻內疫苗與標準次單元疫苗的鼻劑或 EP0538437 專利之 Virosomes 疫苗做比較，在初始日(day 0)及第 14 日將 10 微升含 5 微克流行性感  
冒蛋白的抗原鼻劑滴入 Balb/C 老鼠的鼻中。在第 0、14、35 天採集血液樣本，再於第 35 天收集其鼻及肺清劑。每一隻老鼠各被以不同的病毒免疫，以比較數種不同的流行性感  
冒病毒之差異。將注射筒連接老鼠的氣管將 1.5

毫克的 PBS 注入老鼠的肺中清洗，然後再抽出 1 毫升的肺液；另外，將 0.5 毫克的 PBS 經由氣管注入老鼠的鼻腔中再於鼻孔中收集自鼻腔流出的沖洗液，再立刻以離心器將殘餘物及細胞成份自沖洗液中去除，再加入一種蛋白酶抑制劑的混合(包含 Chemstatin、antipain、leupeptine 以及 pepstatin，在乾燥的 DMSO 中的 1000 倍濃縮儲液中取最終濃度為 1 微克/毫升者)，接著以液態氮冷凍樣本並儲存於零下 20°C 直到分析步驟。分析老鼠鼻及肺中的 IgA 濃度及抗流行性感感冒蛋白的 IgG ELISA 濃度，其結果分別詳見圖 4 及圖 5。

例證三：包含脂肽 N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、流行性感感冒病毒之天然脂質及流行性病毒細胞膜蛋白的重組病毒細胞膜的細胞膜融合作用。

於 1 毫升的八(乙二醇)-N-十二烷基單醚(C12E8)100mM 濃度的清滌劑中，培養純化及濃縮的流行性感感冒病毒 A/Panama/2007/9(1500 nmol 磷脂)，並在 4°C 的條件下置入中性 pH 值等張緩衝劑 10 分鐘(緩衝劑 A：145mM 濃度的氯化鈉，2.5mM 濃度的 HEPES，1mM 濃度的 EDTA，酸鹼值為 7.4)，隨後在 4°C 的溫度條件下，以 100,000 x g 的速率離心 30 分鐘以去除病毒核蛋白衣及基質蛋白並丟棄殘渣。將上清液混合於乾的脂肽及莖標磷脂，以 0.5 毫克脂肽及 150 nmol 的 1-十六醯-2-(1-莖癸醯)-錫-甘油基-3-磷 脂 膽 鹼

(1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine)在每 750 nmol 的病毒脂質中的比例混合，直到該脂肽及芘標磷脂溶解為止。再加 128 毫克的 BioBeads SM-2(Bio-Rad) 進每 350 微升的混合液中，然後用力搖晃該混合液及微珠一小時以去除清滌液，之後再將 64 毫克的微粒加入液體中繼續搖晃 10 分鐘。

在量測細胞膜融合時，以 Steck and Kant (1974)的方法由舊的血液(B 型陰性 RH 因子)細胞中準備紅血球血影，在 0.06M 空磷脂(ghosts phospholipid)及 1 $\mu$ M 的仿病毒磷脂(virosomal phospholipid)中，及一含 140mM 氯化鈉及 15mM 檸檬酸鹽酸鹼值 5.1 的緩衝劑中進行融合測量，並以 pyrPC 的稀釋觀察脂質的混合。在本測試中亦分別在放射光束中 475nm 的截止濾光片下，於 345nm(帶通 2nm)的激發波長及 490nm(帶通 16nm)的放射波長下測量芘準分子螢光，背景螢光在含加 35 微升的 0.2M C12E8 的探針無限沖淡下評估。在螢光中的變化換算成融合的範圍(F)計算， $F = 100 \times (E_0 - E) / (E_0 - E_y)$ ，其中 E 代表任何時間的準分子螢光，E<sub>0</sub> 及 E<sub>y</sub> 分別代表強度 490nm 在時間 0 及在加 C12E8 之後，兩者皆因稀釋效果修正。在圖 6 中很清楚標示該重組病毒細胞膜的強烈融合作用。

例證四：使用包含脂肽 N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、流行性感冒病毒之天然脂質及流行性病毒細胞膜蛋白的重組病毒細胞膜的肌內疫苗試驗與根據專利 EP0538437 備製的

## Virosomes 疫苗。

在初始日(day 0)將 25 微升內含 5 微克蛋白的流行性感  
冒抗原注入 Balb/C 老鼠的後腿肌肉中，之後於當天(day 0)  
及第十四天取其血液樣本，其中使用 A/Panama/2007/99 種  
的病毒備製疫苗。以 IgG ELISA 對抗流行性感  
冒血球凝集素來分析樣本，結果詳見圖 7。

例證五：作用的重組病毒細胞膜的物理物特性以平衡密度  
梯度離心法包含 A/Wyoming 細胞膜蛋白。

以例證一中所述之方法備製包含脂肽 N-棕櫚醯  
-S-2,3(雙棕櫚醯氧醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺  
醯基)<sub>3</sub>-離胺酸的重組病毒細胞膜，加在 10-60%(w/v)的蔗  
糖梯度上並在 50,000rpm 的速率下於 Beckman SW55 中離  
心旋轉十六小時。在這種梯度中，當蛋白移至最下層的部  
份時，脂質及脂肽停留在上層。利用折射法、脂質及脂肽  
測定法分析梯度中的樣本。本結果顯示在圖 8，基本上所  
有的病毒蛋白及大部份的病毒脂質在一個單峰共純化，且  
脂肽僅由 4、5 及 6 部份取得，這些數據顯示該重組病毒細  
胞膜為密度約 1.12 g/ml 的分子。

例證六：使用包含脂肽 N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-  
半胱胺醯基-絲胺醯基-(脯胺醯基)<sub>3</sub>-脯胺酸、流行性感  
冒病毒之天然脂質及流行性病毒細胞膜蛋白的重組病毒細胞  
膜的鼻內疫苗試驗。

以例證一中所述之方法自 A/Panama/2007/99 備製該細  
胞膜，並如例證二所述將該疫苗用於老鼠中，血清中 ELISA

IgG 濃度及鼻及肺中 IgA 的濃度分別詳見圖 9 及圖 10 所示。這些數據顯示該離胺酸及脯胺酸之 N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-的衍生物在免疫反應上具有相同的加強功效。

附表一 根據本發明所述，特別適合用來製造重組病毒細胞膜之脂肽。

N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-絲胺酸

(N-palmitoyl-S-2,3(bispalmitoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-serine)

S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-絲胺酸

(S-2,3(bispalmitoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-serine)

N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸

(N-palmitoyl-S-2,3(bispalmitoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-(lysyl)<sub>3</sub>-lysine)

S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸

(S-2,3(bispalmitoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-(lysyl)<sub>3</sub> - lysine)

N-棕櫚醯-S-2,3(雙油醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸

(N-palmitoyl-S-2,3(bisoleoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-(lysyl)<sub>3</sub>-lysine)

S-2,3(雙油醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸

(S-2,3(bisoleoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-serine-(lysyl)<sub>3</sub>-lysine)

N-棕櫚醯-S-2,3(雙肉荳蔻醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基

<p>-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸 (N-palmitoyl-S-2,3(bismyristoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-(lysyl)<sub>3</sub>-lysine)</p>
<p>S-2,3(雙肉荳蔻醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸 (S-2,3(bismyristoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-(lysyl)<sub>3</sub>-lysine)</p>
<p>N-棕櫚醯-S-3(棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸 (N-palmitoyl-S-3(palmitoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-(lysyl)<sub>3</sub>-lysine)</p>
<p>N-棕櫚醯-S-2,3 羥基-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸 (N-palmitoyl-S-2,3hydroxy-propyl-cysteinyl-seryl-(lysyl)<sub>3</sub>-lysine)</p>
<p>N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(脯胺醯基)<sub>3</sub>-脯胺酸 (N-palmitoyl-S-2,3(bispalmitoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-(prolyl)<sub>3</sub>-proline)</p>
<p>N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(麩醯胺醯基)<sub>3</sub>-麩胺酸 (N-palmitoyl-S-2,3(bispalmitoyloxy)-propyl-cysteinyl-seryl-(glutaminylyl)<sub>3</sub>-glutaminic acid)</p>

## 參考資料

Arkema, A. (2000) Vaccine 18: 1327-1333

- Böttcher C.J.F, Van Gent C.M., Fries C.J. (1961) *Anal Chim Acta* 24:203-204
- Bungener, L (2002) *Vaccine* 20: 323-338
- Cox J.C., Sjolander A., Barr I.G. (1998) *Adv Drug Delivery* 32:247-271
- Dinarello, C.A. (1978) *J. Infect. Dis.* 138: 760-767
- Folch, H. et al. (1957) *J. Biolo. Chem* 226, 497-509
- Glück, R. et al. (1957) *J. Infect. Dis* 181: 1129-1132
- Hernandez, L.D.: et al., (1996) *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:627-661
- Janeway, C. et al. (2001) *Immunobiology*, 5th edition, Garland Publishing, New York
- Kohashi, O. et al. (1980) *Infect. Immun.* 20: 70-75
- Kotani, S. et al., (1976) *Biken J.* 19:9-13
- Morein et al., (1984) *Nature* 308: 457-460
- Ogra PL, Faden H, Welliver RC (2001) *Clin Microbiol Rev* 14: 430-445
- Powell, M.F. et al., (1988) 5:528-532
- Ribi, E.E. (1979) *Cancer Res.* 39:4756-4759
- Steck, T. L. and Kant, J.A. (1974) *Meth. Enzym.* 31:172-180
- Stegmann T., Morselt H.W.M., Booy F.P., Van breemen J.F.L., Scherphof G.,
- Wilschut J. (1987) *EMBO J* 6:2651-2659
- Weijzen S, et al., (2002) *J Immunol* 169:4237-4238

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作些許之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

### 【圖式簡單說明】

圖 1 係為蔗糖梯度解釋圖，用以分析在含佐劑的重組病毒細胞膜之脂肽、蛋白及脂質間之物理締合。

圖 2 係為平面薄層色層分析譜，用於說明脂質及脂肽出自 10 到 40% 在圖 1 中所述之成份上的蔗糖介面。其中 A 段為控制段，呈現具寧海準反應的天然病毒脂質，而該重組病毒細胞膜不含脂肽；B 段中之重組病毒細胞膜包含脂肽，呈現該天然病毒脂質與寧海準之反應，且另加具寧海準反應的脂肽。該色層分析譜以平面發展：系統 1 氯仿/甲醇/水 65/25/4，系統 2N-丁醇/醋酸/水 2/1/1，以及以含寧海準染料之衍生作用着色。樣品區以點作標記。

圖 3 係為本發明中包含脂肽的重組病毒細胞膜之電子顯微照片，以鉍磷鉬酸鹽作陰性着色。其中的細胞膜直徑約為 100 到 200 奈米。

圖 4 顯示在使用過兩劑含 A/Panama/2007/99 的鼻用疫苗後(兩劑前後相隔十四天)，鼻腔及肺部中的 IgA 濃度；該濃度是在用過最後一劑的三週後測得的，其中，先前的疫苗濃度已扣除。在本發明中所使用的疫苗為包含脂肽的標準商用次單元疫苗，測試群組為 10 隻白鼠。

圖 5 顯示在使用過兩劑鼻用疫苗後於血液中 IgG 濃度(兩劑

前後相隔十四天), 該濃度是在用過最後一劑的三週後測得的, 其中, 先前的疫苗濃度已扣除。該疫苗是使用根據 EP0538437 專利案所備製的 Virosomes, 或使用重組病毒細胞膜, 且為本發明中所述含脂肽者。四種不同的疫苗製劑, 如圖所示, 每一種都含有取自病毒的一片段之抗原, 並測試於四組各 10 隻白鼠。

圖 6 顯示本發明之重組病毒細胞膜的融合作用, 該重組病毒細胞膜包含與紅血球血影混合的芘-磷脂, 並根據說明量測其融合度。

圖 7 顯示在使用過一劑鼻用疫苗後於血液中 IgG 濃度, 該濃度是在用劑過的三週後測得的, 其中, 先前的疫苗濃度已扣除。該疫苗是使用根據 EP0538437 專利案所備製的 Virosomes, 或使用重組病毒細胞膜, 且為本發明中所述含脂肽者, 測試群組為 10 隻白鼠。

圖 8 係為自 A/W 系病毒之重組病毒細胞膜的均衡密度蔗糖梯度分析, 顯示重組物質的單一密度高峰, 而脂肽係取自 4, 5 及 6 的部份。

圖 9 顯示在尚未使用鼻用疫苗及使用過劑鼻用疫苗十四天後於血液中 IgG 濃度, 測試群組為 10 隻白鼠。其中, 抗原係取自病毒的 A/Panama/2007/99 段, 該細胞膜包含 N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(脯胺醯基)<sub>3</sub>-脯胺酸。

圖 10 顯示在使用過兩劑含 A/Panama/2007/99 種之重組細胞膜的鼻用疫苗後, 鼻腔及肺部中的 IgA 濃度; 測試群組

為 10 隻白鼠。其中該疫苗含脂肽 N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(脯胺醯基)<sub>3</sub>-脯胺酸，兩劑前後相隔十四天，該濃度是在用過最後一劑的三週後測得的，其中，先前的疫苗濃度已扣除。

**【主要元件符號說明】**

**無**

# 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： 93117276

※ 申請日期： 93. 6. 16

※IPC 分類：

C12N 7/04 (2006.01)

A61K 39/12, 39/39 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

包含佐劑之功能重組病毒細胞膜

FUNCTIONALLY RECONSTITUTED VIRAL  
MEMBRANES CONTAINING ADJUVANT

二、中文發明摘要：

本發明是關於直接用對抗如病原或腫瘤細胞膜蛋白的抗原之疫苗。本發明亦關於一種形成具有膜融合活性的重組病毒細胞膜之方法。重組病毒細胞膜為雙脂質層細胞膜較佳者包含病毒的天然脂質、一種病毒融合蛋白、可另外包含一種或多種抗原及佐劑。包含該種重組病毒細胞膜的藥劑組合亦屬本發明之範圍內。

### 三、英文發明摘要：

The present invention relates to vaccines directed against antigens such as membrane proteins from pathogens or tumor cells. The invention further relates to methods of forming reconstituted viral membranes, with membrane fusion activity, which are lipid bilayer membranes preferably containing natural lipids of a virus, a viral fusion protein, one or more optional further antigens as well as amphiphilic adjuvants. Pharmaceutical compositions comprising such reconstituted viral membranes are also part of the invention.

## 七、申請專利範圍：

1. 一種重組病毒細胞膜，包括一雙脂質層，該雙脂質層包含一病毒的一融合蛋白、一兩性佐劑以及可另包含一抗原，該兩性佐劑為一脂肽，其中：

a). 該雙脂質層包含一脂質組成物，其適於使該病毒之細胞膜與一細胞之細胞膜進行由該融合蛋白所引發的融合作用，該細胞可與衍生出該融合蛋白之病毒融合；

b). 該融合蛋白及該兩性佐劑與該雙脂質層的疏水內部交互作用；以及

c). 該融合蛋白、該兩性佐劑及可另包含的該抗原為非共價連接。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之重組病毒細胞膜，其中該雙脂質層包含一病毒之細胞膜的天然脂質。

3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之重組病毒細胞膜，其中該兩性佐劑為一種哺乳類的類鐸受體(TLR)的配體。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之重組病毒細胞膜，其中該脂肽為以下成份所構成之群組：N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-絲胺酸、S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-絲胺酸、N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、N-棕櫚醯-S-2,3(雙油醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、S-2,3(雙油醯

氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、N-棕櫚醯-S-2,3(雙肉荳蔻醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、S-2,3(雙肉荳蔻醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、N-棕櫚醯-S-3(棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、N-棕櫚醯-S-2,3 羥基-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(離胺醯基)<sub>3</sub>-離胺酸、N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(脯胺醯基)<sub>3</sub>-脯胺酸、N-棕櫚醯-S-2,3(雙棕櫚醯氧)-丙基-半胱胺醯基-絲胺醯基-(麩醯胺醯基)<sub>3</sub>-麩胺酸。

5. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之重組病毒細胞膜，其中該抗原為一種插入性膜蛋白(integral membrane protein)。

6. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之重組病毒細胞膜，其中該抗原為一種病毒抗原。

7. 如申請專利範圍第 6 項所述之重組病毒細胞膜，其中該抗原來自一種流行性感冒病毒。

8. 如申請專利範圍第 7 項所述之重組病毒細胞膜，其中該抗原是一種血球凝集素(HA)、一種神經胺酸酶或一種 M2 蛋白。

9. 如申請專利範圍第 6 項所述之重組病毒細胞膜，其中該抗原衍生自一種病毒，而該種病毒是選自於由反轉錄病毒、風疹病毒、黃病毒、副黏液病毒、疱疹病毒、布尼亞病毒、沙狀病毒、漢他病毒、冠狀病毒科、乳多瘤病毒科、桿狀病毒科、阿爾病毒科(Alphaviridae)、披衣病毒科、

線病毒科、痘病毒科以及非洲豬瘟病毒所組成的群組。

10. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之重組病毒細胞膜，其中該抗原由一種寄生蟲、細菌、蕈、酵母菌所引發，或該抗原為一種腫瘤特異性抗原。

11. 一種製造重組病毒細胞膜的方法，其中該方法包括以下步驟：

a). 將一種兩性佐劑、一種病毒融合蛋白、或再加一種抗原，以及脂質混合於包含一種清滌劑的一溶液中，其中該兩性佐劑為一脂肽；

b). 在容許包含一雙脂質層的一病毒細胞膜重組的條件下減少該清滌劑的濃度，而該雙脂質層的疏水內部與該兩性佐劑及該病毒融合蛋白相互作用，其中該兩性佐劑及該病毒融合蛋白為非共價連接，且該兩性佐劑及可以選擇再加入之該抗原亦為非共價連接，另外該重組病毒細胞膜具有膜融合作用；

c). 另外，可選擇將該重組病毒細胞膜純化；以及

d). 另外，可選擇將該重組病毒細胞膜調配併入一種藥劑組合。

12. 一種藥劑組合，包含一種如申請專利範圍第 1 項到第 10 項中之任何一項所述之重組病毒細胞膜以及一種藥理上可接受之載體。

13. 如申請專利範圍第 12 項所述之藥劑組合，其中該組合適合作為鼻劑、口服劑或非經腸的用劑。

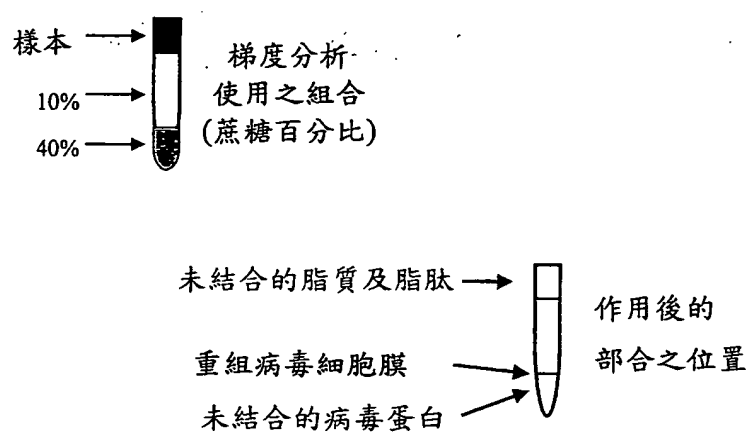
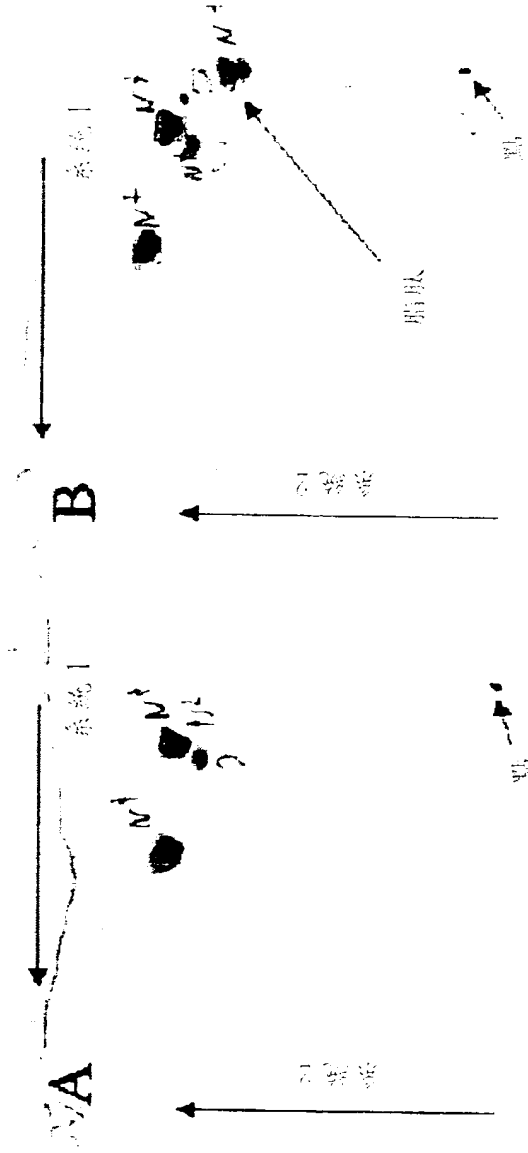


圖 1



[19] 2



圖 3

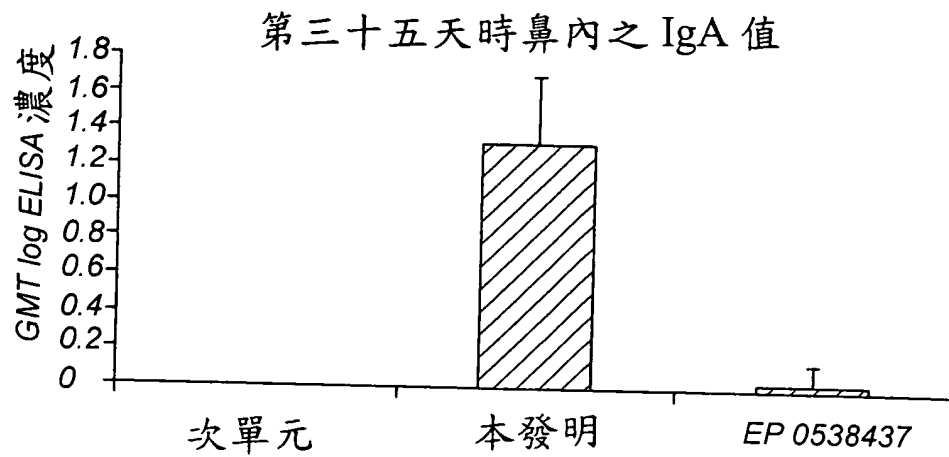


圖 4A

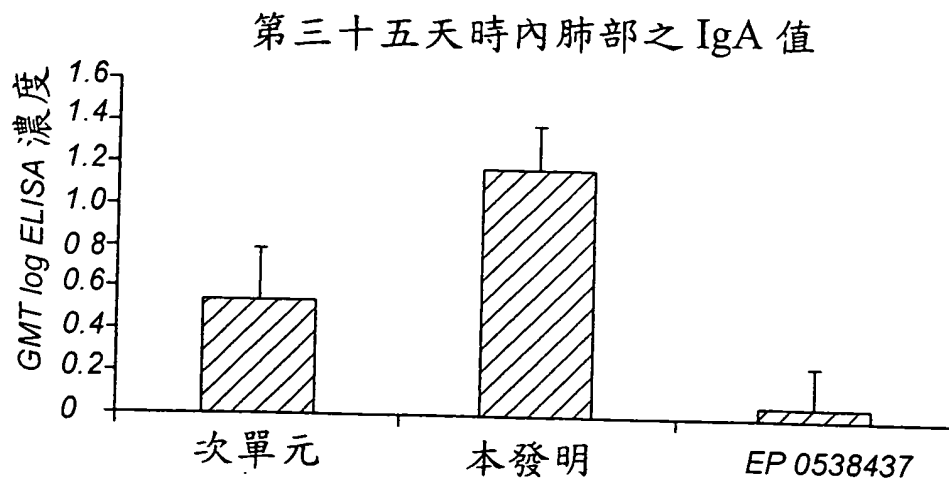


圖 4B

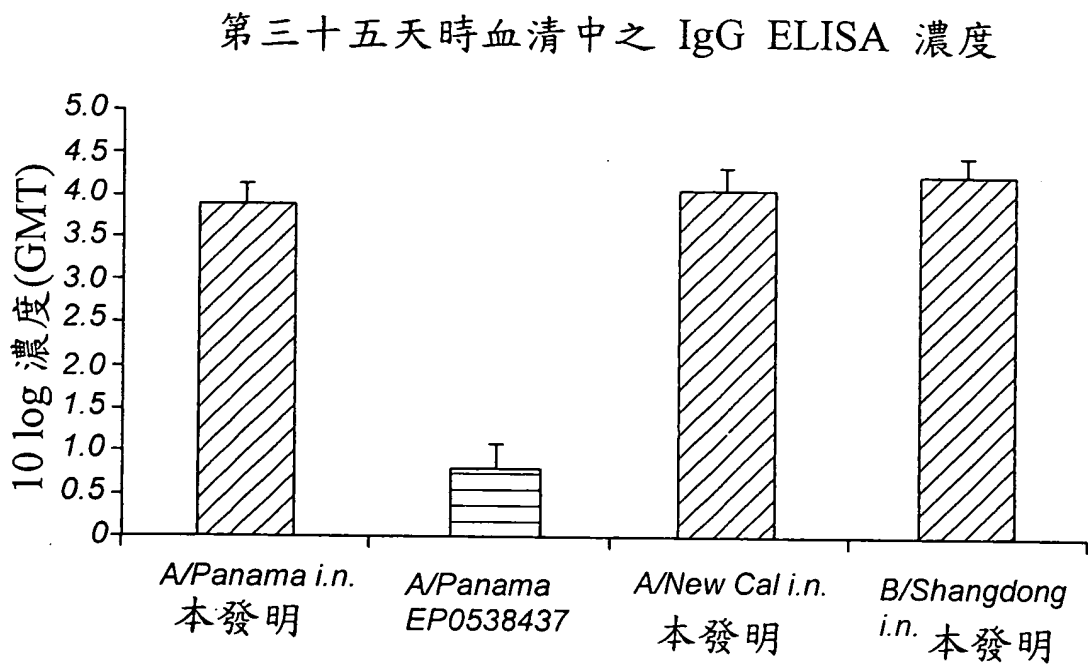


圖 5

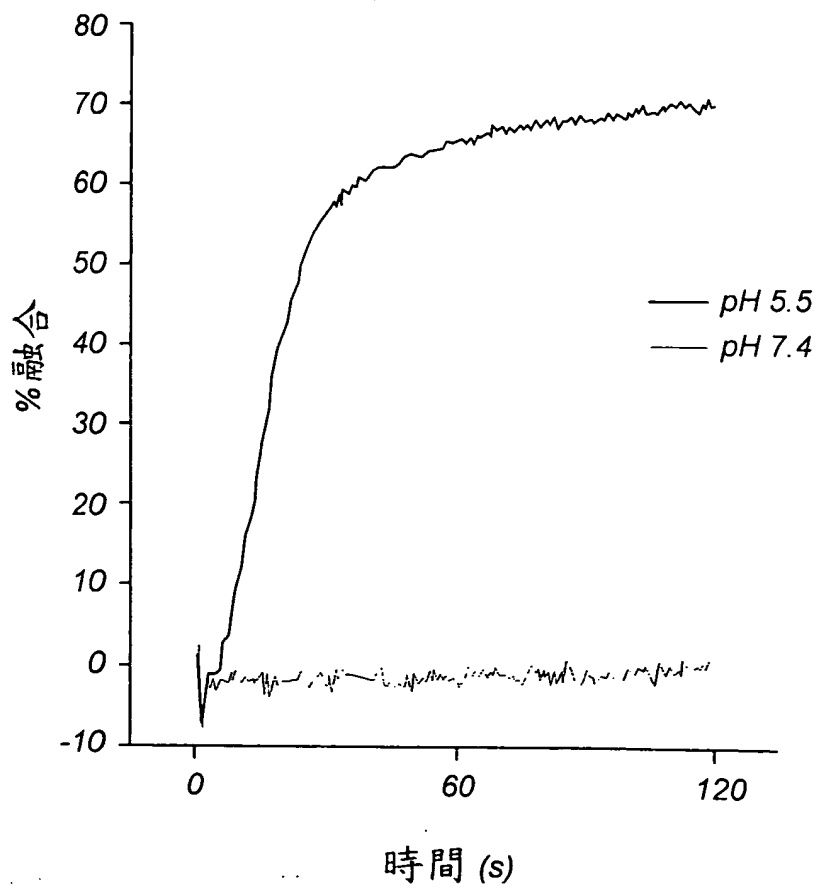


圖 6

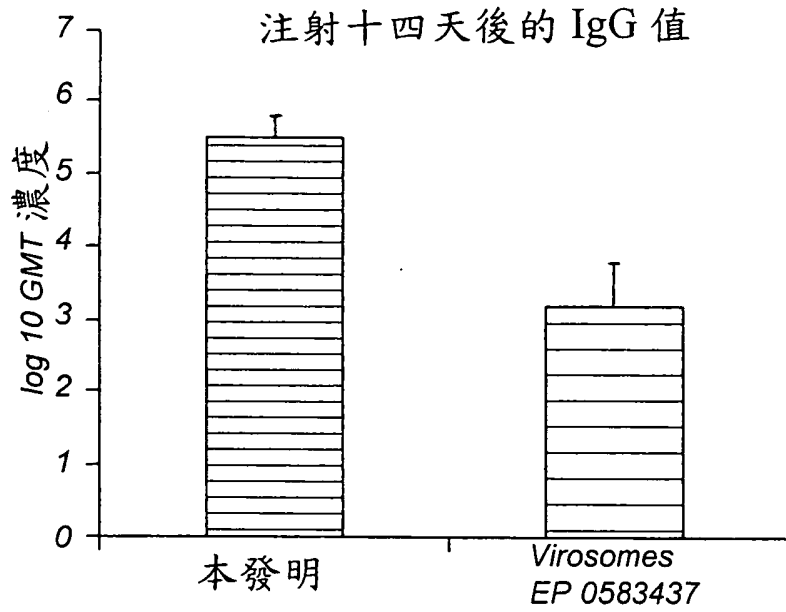


圖 7

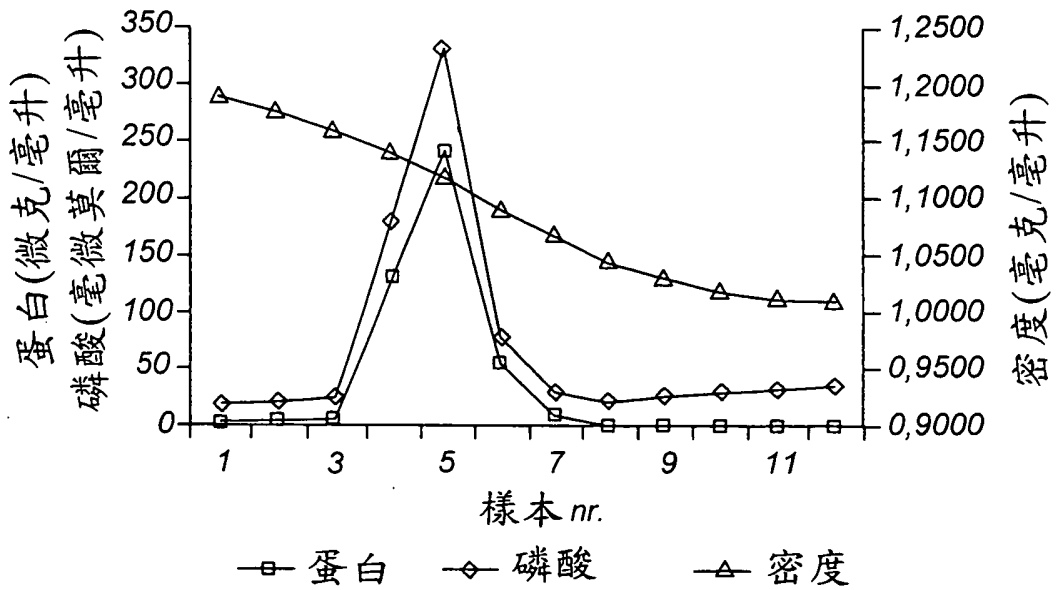


圖 8

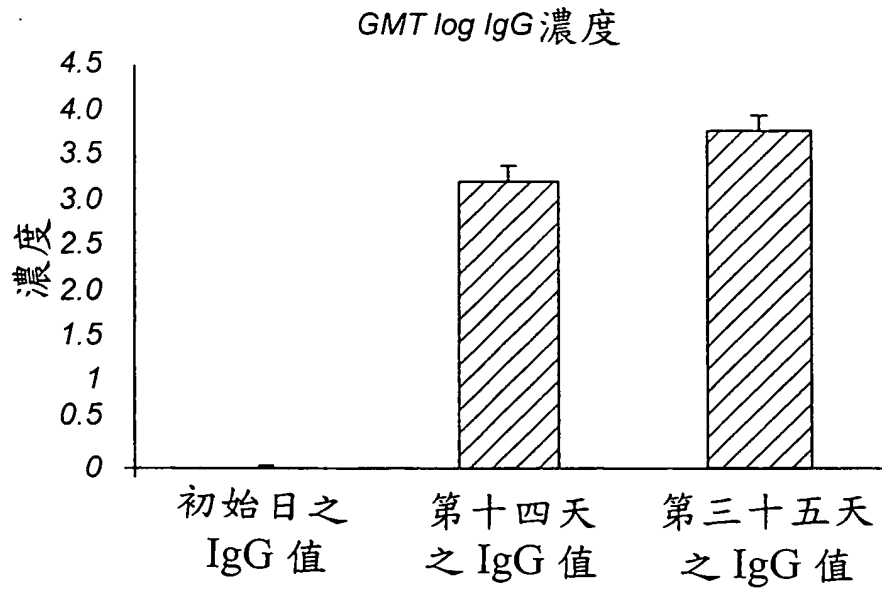


圖 9

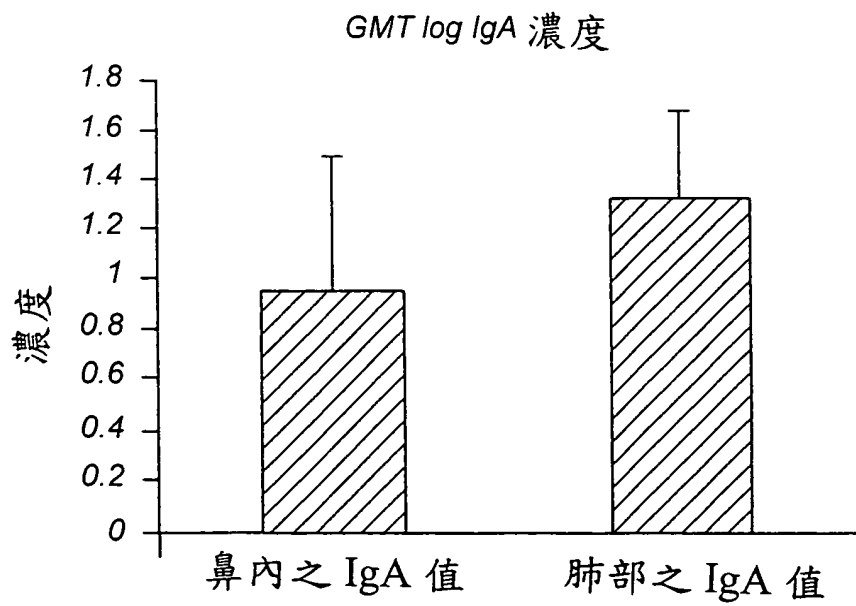


圖 10

**四、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：圖(1)。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

**五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

無。