

# 公告本

|      |                  |
|------|------------------|
| 申請日期 | 85.5.8           |
| 案 號  | 85105448         |
| 類 別  | A61K35/78, 39/39 |

A4  
C4

442293

(以上各欄由本局填註)

## 發明專利說明書

|        |               |                                                                                                                                                                 |
|--------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 一、發明名稱 | 中 文           | 皂樹皂苷佐劑與含該佐劑的疫苗配方                                                                                                                                                |
|        | 英 文           | QUILLAJA SAPONIN ADJUVANT AND VACCINE FORMULATION CONTAINING SAME                                                                                               |
| 二、發明人  | 姓 名           | (1)蘇 弘 燮<br>(2)尹 惠 星<br>(3)權 寧 仙<br>(4)曹 重 明                                                                                                                    |
|        | 國 籍           | 韓 國                                                                                                                                                             |
| 三、申請人  | 住、居所          | (1)大韓民國大田廣域市儒城區新城洞153番地幸運哈那公寓103棟501號<br>(2)大韓民國京畿道城南市盆唐區九美洞77番地卡芝瑪晤公寓110棟205號<br>(3)大韓民國大田廣域市西區屯山洞970番地鄉村公寓107棟504號<br>(4)大韓民國大田廣域市儒城區田民洞484-1番地艾克斯波公寓509棟401號 |
|        | 姓 名<br>(名稱)   | 韓商・L G 化學股份有限公司                                                                                                                                                 |
| 三、申請人  | 國 籍           | 韓 國                                                                                                                                                             |
|        | 住、居所<br>(事務所) | 大韓民國漢城特別市永登浦區汝矣島洞20番地                                                                                                                                           |
| 三、申請人  | 代 表 人 姓 名     | 成 在 甲                                                                                                                                                           |

裝

訂

線

承辦人代碼：  
大類：  
IPC分類：

B6

韓 國（地區）申請專利，申請日期：案號：☐有 ☒無主張優先權

|           |         |
|-----------|---------|
| 1995,4,13 | 95-8589 |
| 1995,4,13 | 95-8590 |

有關微生物已寄存於： \_\_\_\_\_，寄存日期： \_\_\_\_\_，寄存號碼： \_\_\_\_\_

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

壯

新

線

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS) A4規格 (210×297公釐)

## 五、發明說明 ( 1 )

### 發明領域

本發明是關於一種新的皂苷成分及一種含該相同成分之免疫佐劑的疫苗配方，更特別的，本發明是關於一種具有分子量約為956道爾頓的新皂苷成分，一種自皂樹樹皮分離皂苷成分的方法，一種以皂苷成分為免疫佐劑的疫苗配方，一種增加對抗原免疫反應的方法藉由此可採用一種含有皂苷成分之佐劑及第二佐劑而達到。

### 發明背景

生物工程技術在疫苗的發展上有非常顯著的貢獻，其可自各種不同的病毒外套蛋白中衍生多種重組抗原。但是疫苗的有效性，諸如防治一些由HIV(人類免疫缺乏病毒)及HCV(C型肝炎病毒)所引起的疾病時仍然效果不佳，其部分原因是缺乏佐劑以有效的提升重組抗原的弱抗原性。因此，須深入探討以發展適當的佐劑供該類疫苗使用。

目前，氫氧化鋁(礬)由於其毒性低，故為人類唯一採用之佐劑，但是當用於HIV，HCV，HSV(單純疱疹病毒)等所引起的疾病及吸血蟲病，百日咳及傷寒時，礬的有效性極低(Sanchez-Pescador et al., J. Immunol., 141, 1720-1727(1988); James, S. L., et al., ibid., 140, 2753-2759(1988); Edelman R., Rev. Infect. Dis., 2, 370-383(1980)。因此需發展一種新的佐劑，基於這種需求許多佐劑陸續的被提出，例如皂苷，油性乳劑，單磷脂質A及弗羅因德佐劑。然而這些佐劑均發現具有無法滿足佐劑活性，高毒性及／或不必要的不利效果等問題。例

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明(2)

如弗氏佐劑會導致肉芽腫性發炎，而前述之皂甘亦具有如下描述的毒性問題。

皂甘為植物糖甘，其可供多種商業上用途，諸如飲料之起泡劑，織物工廠之清潔劑等。最近研究顯示由南美洲皂樹樹皮萃取所得到的皂樹皂甘混合物，具有體液及細胞的免疫反應(Espinet R. G., Gac. Vet., 13, 268-273(1951); Dalsgaard K., Arch. Gesamte Virus Forsch., 44, 243-254(1974); Morein B., Nature, 322, 287-288(1988)。一種純化型式的皂樹皂甘，商業上以Quil-A名稱而使用(Iscotec AB, Sweden; and Superfos Biosector a/s, Frydenlundsvej 30, DK-Vedbaek, Denmark)。

但是Quil-A混合了大量同質糖甘，其可能以一般的化學結構加以表示，在其中三烯萜皂質酸及醣原藉由糖甘連接鍵結在不同型式及長度的部分糖上。一般所熟知的這些糖甘成分表現出各種不同佐劑的活性及毒性，因此，Quil-A並不適於人類的製藥學配方上之應用(Kersten et al., Infect. Immun., 56, 432-438(1988))。因此，必須檢定一種既安全又有效的皂樹皂甘，並發展其製備方法。

Kensil等人，將甲醇溶解部分的皂樹樹皮粗萃取液注入逆相高壓液相層析法(RP-HPLC)，並以含有40 mM醋酸的甲醇／水(58:42(v/v))為溶液，結果可得到數個純化的皂甘成分。其中，一個命名為QS-18的成分被發現具有高的溶血活性，即高毒性相反的。另一個命名為QS-21的成分具有低毒性但卻有高的佐劑活性。另外QS-7及QS-17亦同

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

### 五、發明說明(3)

樣具有佐劑效果(Kensil et al., J. Immunol., 146, 431-437(1991); Kensil et al., U. S. Pat. No. 5,057,540 (1991))。更進一步的報告指出QS-21可以增加HIV及其他病毒的抗原免疫性(Kensil et al., JAMA, 199, 1423-1427(1991); Wu, J. W., et al., J. Immunol., 148, 1519-1525(1992))。

但是Kensil等所揭露的製備方法過於繁雜，具需結合矽膠層析及RP-HPLC方法。另外分離所得到的QS-7，QS-17，QS-18及QS-21成分其分子量範圍自1800至2600道爾頓之間其僅為樹皮萃取物中部分的皂樹皂苷。

另一方面，Kersten等已經利用疏水性的RP-HPLC分離到多於23個成分的Quil-A，其中成分之一命名為QA-3，被發現當其與固醇，磷脂及一種二度或三度免疫錯合物形式之抗原共同使用時，不論其毒性及佐劑活性均較QS-21為優(Kersten et al., WO 92/06710)。

但是，如Kersten等所提出含有固醇的免疫錯合物並不適於注射的配方，更甚者，所有Kersten等所揭露的成分，包括QA-3，僅代表皂苷的分子量範圍在1300至2400道爾頓之間，因此當存在於皂樹樹皮萃取物中之其他成分，特別是低分子量的皂樹皂苷成分被發現可能為更有效且安全的佐劑時，前述的研究即不再活躍。

#### 發明之摘要

本發明的目的之一是提供一種新的皂苷成分，其不具毒性或毒性極低，且當用於疫苗時具有很高的佐劑活性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明(4)

本發明的另一個目的是提供一種方法，從皂樹樹皮中分離該皂苷成分。

本發明的額外目的是提供一種疫苗配方其包含有以該皂苷成分為佐劑並結合其他佐劑。

本發明進一步的目的是提供一種方法，此乃藉由採用該皂苷為佐劑並配合第二佐劑使用，以增加疫苗配方中對抗原的免疫反應。

根據本發明是為提供一種皂苷成分，命名為QS-L1，其分子量為956道爾頓，其自皂樹樹皮分離而得到，不具毒性或毒性極低，但與第二佐劑共同混合使用時卻具有極高的協同佐劑活性。

### 圖的詳細描述

本發明之上述目的，可藉由配合圖之說明而能更為明瞭清晰，在其中：

第1圖表示皂樹樹皮萃取物之RP-HPLC掃描圖譜；

第2圖表示Quil-A之掃描圖譜；

第3圖矽膠薄層層析分析Quil-A，純化的皂苷成分QS-L1，QS-L2，QS-L3，QS-L4及QS-L5之結果；

第4圖為電子散射離子化-質譜儀(ESI-MS)分析QS-L1之結果；

第5圖表示QS-L1，QS-L2，QS-L3，QS-L4，QS-L5及Quil-A之磷酸緩衝液的山羊紅血球細胞的溶血活性；及

第6A與6B圖為比較QS-L1及QS-L1／響與其他響，弗氏完全佐劑等對HBsAg抗原之免疫性的佐劑活性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明( 5 )

發明的詳細描述

本發明的皂苷成分，即QS-L1可自皂樹樹皮中分離而得到，其具有低毒性或無毒性，但當與其他佐劑(例如，  
蠐)共同使用時具有極高的免疫佐劑活性。

本處所提之“免疫佐劑”是指一種化合物，當其與一種抗原共同給予人類或於試管內試驗時均能增加該抗原之免疫反應。

當以電子散射離子化方法(ESI-MS)的質譜儀分析時，QS-L1之分子離子為 $m/z$  979.4，而當以具有 $4.6 \times 250$  mm Vydac C4管柱，並採用含重量0.1%三氟醋酸之水/乙腈(7:3(v/v))溶液流速為1 ml/min之逆相高壓液相層析法分析時，其遲滯時間為13.98分鐘。

本發明亦提供一種可自皂樹樹皮中分離QS-L1之方法其可摘要如下。首先，皂樹樹皮萃取物之製備可藉由以水處理皂樹形成層再冷凍乾燥粗萃取物。

隨後QS-L1可自皂樹樹皮萃取物中純化而得到，其方法包含有：

- (a) 離心溶於醋酸溶液中的樹皮萃取液以得到上清液；
- (b) 以微透析膜於醋酸溶液中透析上清液；
- (c) 離心透析得到的成分而得到另一上清液；
- (d) 冷凍乾燥此上清液而得到皂苷萃取粉末；及
- (e) 將皂苷萃取粉末溶於適當的溶劑中並將此溶液注入RP-HPLC中而得到含有實質上純的QS-L1之部分。

步驟(a)中的醋酸水溶液的濃度範圍為10至100 mM，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明(6)

最好是 40 mM。步驟(b)中所使用的透析膜其分子量的控制值在 12至 14 kDa間，其可適於去除低分子量、水溶性的雜質。在步驟(e)中以 RP-HPLC分離時最好是採用 C4 RP-HPLC管柱且以含 0.1%三氟醋酸的溶液為沖提液，並在含有 0.1%三氟醋酸之 30至 40%的乙腈直線梯度濃度下進行。

由 RP-HPLC掃描樹皮萃取物之結果顯示有 32個高峯，部分的高峯可以很清楚分離並可得到各種高純度的皂苷，包括一新合成，低分子量的皂苷，其被命名為 QS-L1。當使用  $4.6 \times 250$  mm Vydac C4管柱時，QS-L1可在遲滯時間 13.98分時被沖提出來。ESI-MS的分析顯示 QS-L1的分子離子為  $m/z$  979.4，且當扣除 Na後 QS-L1的分子量約為 956道爾頓。

QS-L1亦可藉由前述之 RP-HPLC相同的方法，自其他皂樹萃取物，例 Quil-A中分離得到(Superfos Biosector a/s, Frydenlundsvej 30, DK-Vedbaek, Denmark)。

QS-L1之毒性測試可藉由導致老鼠 72小時內死亡的腹膜內注射劑量而得知。該試驗顯示 QS-L1之劑量達到 500  $\mu$ g時仍不會使老鼠致死。

QS-L1當與抗原單獨使用時，其免疫佐劑的活性與前述之皂苷成分一樣，諸如 QS-L1，均很低，但是當 QS-L1與另一種邊際佐劑，例如 蠟，共同使用時，則具有極顯著的免疫佐劑活性。這類介於二種或多種佐劑間的強烈的協同相互作用是從未報導過的。

本發明亦提供一種疫苗配方，其包含一種抗原及一種

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明(7)

組成份為QS-L1的佐劑及另一種佐劑，最好為礬。在此礬為較佳的型式，其中抗原可吸附在其上，本發明所適宜之抗原並未限制那些特別種類的抗原，且亦包括B型肝炎病毒表面抗原HIV及HCV抗原及其他。本發明配方中抗原之濃度依不同因子而調整，例如抗原專一性，抗原性之需求量，接種體之特性及免疫之需求程度等。

本發明之疫苗配方可為注射溶液或懸浮液之型式，其可經由任何傳統的方法製備而得，該配方亦可進一步包含有藥學上可接受的輔藥，攜帶劑或稀釋劑等。適當的輔藥可包含水，生理鹽水，葡萄糖，甘油，乙醇及上述之混合物等。更甚者，其組成可另外包含有濕劑，乳化劑，pH緩衝劑及類似物等。

一般疫苗的單一劑量多寡隨配方之型式而定，並且需依據上述的各項因子而定，本發明中之疫苗配方其QS-L1含量範圍為1至500  $\mu\text{g}$ /單一劑量，最好為10至50  $\mu\text{g}$ /單一劑量且礬的劑量最好為50至500  $\mu\text{g}$ /單一劑量。

更進一步，本發明提供一種方法以增加該疫苗配方中抗原之抗原性，其可藉由採用皂苷成分QS-L1為一種免疫佐劑並配合第二佐劑，最好是礬，而達到。

下列之參考例子及實例均為進一步說明本發明，但並不限於此。

另外，下列中固體混合物中之固體，液體中之液體及液體中之固體百分比分別以wt/wt，vol/vol及wt/vol為基準，除非特別指明。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明(8)

參考實例：皂苷成分之免疫佐劑活性測定。

以商業化之 EuVax 方法將 B 型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 吸附在礬上 (LG Chemical Ltd., Korean Patent No. 38837)。HBsAg 與礬 (含 3% 氫氧化鋁) 以 100  $\mu$ g 之 HBsAg 比 2500  $\mu$ g 之礬的比例混合於 10 mM 的磷酸鈉緩衝液中 (1.2 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8.8 mM  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , 0.8% NaCl, pH 6.3-6.5)。該混合物於振盪器 ("Red Rotor", Hoefer, USA) 上攪拌 6 小時，即可使 HBsAg 吸附在礬上。

隨後即利用吸附在礬上的 HBsAg 來檢定皂苷成分之免疫佐劑活性。將皂苷成溶於蒸餾水中使濃度為 2 mg/ml。HBsAg 注射疫苗之製備是將 50  $\mu$ l 的皂苷溶液加入 1 ml 吸附在礬上的 HBsAg 中 (100  $\mu$ g HBsAg / 2500  $\mu$ g 礬)。在 7 至 8 週齡的 Balb/c 雌鼠背部，皮下注射 50  $\mu$ l 之疫苗二處 (Charles's River Institute, Japan) 且在 3 個星期間即以相同劑量之注射疫苗補強，連續二次補強。最後一次補強經 17 天後由老鼠尾部採血樣，而抗 HBsAg 之抗體力價則以下列方法測定。

純化的 HBsAg 溶解在 50 mM 硼酸鈉緩衝液 (pH 9.0) 中，使終濃度為 0.5  $\mu$ g/ml，將此溶液分別加入微量平碟中 (Immulon type 1 microtiter plate, Dynatech, USA)，每天加 200  $\mu$ l，並在 37°C 下培育 2 小時，隨後每天加入 250  $\mu$ l 含 0.2% (w/v) 明膠的磷酸緩衝鹽水 (PBS)，再將此平碟在 37°C 下培育 1 小時以阻隔殘留的蛋白質可能吸附在任何位置上以避免後續任何可能發生的非專一性反應，將

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明(9)

此平碟以含0.05% (v/v) Tween-20之PBS(清洗溶液)清洗2次，將老鼠之血樣以含0.25% (w/v)明膠，1 mM EDTA，1% (v/v) Triton X-100及0.02% (v/v)硫柳汞之PBS緩衝液(稀釋溶液)稀釋400倍。進一步再以稀釋溶液進行系列稀釋，使最後之稀釋倍數為819,200倍。

再將平碟置於37℃下培養2小時並以清洗溶液清洗5次並將含有抗-老鼠IgG抗體且標記有槲草根過氧化酶(HRP)之溶液以上述之稀釋溶液稀釋400倍，隨後加入平碟中，每穴200  $\mu$ l。

再於37℃下培育2小時並以清洗溶液清洗5次，隨後在每穴加入200  $\mu$ l的基質溶液，其乃經溶解鄰-苯二胺二氫氯酸(OPD)於50 mM檸檬酸／醋酸緩衝液(pH 5.5)，使濃度為2 mg/ml而配製得到。再將平碟置於室溫黑暗下培育30分鐘，隨後於每穴中加入50  $\mu$ l的4N硫酸以終止呈色，並以Titertech Multiscan Plus (Flowlab)測定每穴之492 nm的OD值。

抗體力價之決定為使OD值達到0.5時其稀釋倍數之倒數。

## 第1實例：自皂樹中分離皂苷成分

(步驟1) 製備純化的皂苷萃取物

皂樹樹皮以水萃取，萃取物含有大於50%購自Berghansen公司之皂苷，將皂苷粉末溶於40 mM的醋酸溶液中，使濃度為250 mg/ml。將此溶液於12,000 rpm下離心30分鐘以去除不可溶物質，上清液以微透析膜(Spectrum

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 10 )

Medical Industries Inc., Cat. No. 132676)及50倍體積的40 mM醋酸溶液透析2次，該微透析膜的分子量限制範圍為12至14 kDa，此可去除小分子水溶性物質。透析所得再一次離心以完全去除不溶的雜質，並將上清液冷凍乾燥而得到純化的皂苷粉末。

皂苷萃取物之矽膠薄層層析結果顯示萃取物之組成與純度與Quil-A非常相似。

(步驟2) 藉由C4 RP-HPLC分離皂苷成分

將步驟1所得到之皂苷萃取物溶於0.1%三氟醋酸(TFA)溶液，使濃度為20 mg/ml。將0.1 ml之該溶液注入C4 RP-HPLC管柱中(Vydac, 4.6×250 mm)，其已經以0.1% TFA溶液，流速1 ml/min進行前平衡。結合態的皂苷可藉由第1表中乙腈之濃度梯度而沖提出來，沖提物以214 nm之波長檢測。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明(11)

第 1 表

| No. | 時間    | 流速(毫升) | % A* | % B** |
|-----|-------|--------|------|-------|
| 1   | 0.00  | 1.00   | 70.0 | 30.0  |
| 2   | 5.00  | 1.00   | 70.0 | 30.0  |
| 3   | 30.00 | 1.00   | 60.0 | 40.0  |
| 4   | 35.00 | 1.00   | 0.0  | 100.0 |
| 5   | 40.00 | 1.00   | 0.0  | 100.0 |
| 6   | 41.00 | 1.00   | 70.0 | 30.0  |
| 7   | 51.00 | 1.00   | 70.0 | 30.0  |
| 8   | 52.00 | 0.00   | 70.0 | 30.0  |

A\* : 0.1% 之 TFA 溶於蒸餾水中。

B\*\* : 0.1% 之 TFA 溶於乙腈中。

大約有 32 種皂苷成分在不同的遲滯時間被沖提出來，根據不同的遲滯時間可收集許多份的純皂苷成分。每種皂苷成分在皂苷萃取物中所佔有之相對比自 0.13% 至 32%。

純化的皂苷成分其免疫佐劑活性測定乃根據參考實例的方法進行，有 5 種成份具有極高的免疫性增強活性，其分別被命名為 QS-L1，QS-L2，QS-L3，QS-L4 及 QS-L5。該五種成份之高峯面積(%)及其遲滯時間如第 2 表所示，此五種成份之高峯相對位置如第 1 圖。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 12 )

第 2 表

| 成份    | 遲滯時間(分) | 面積(%) |
|-------|---------|-------|
| QS-L1 | 13.967  | 4.23  |
| QS-L2 | 16.483  | 1.45  |
| QS-L3 | 28.900  | 2.01  |
| QS-L4 | 32.233  | 5.27  |
| QS-L5 | 35.500  | 2.40  |

將含有 QS-L1, QS-L2, QS-L3, QS-L4 及 QS-L5 之部份冷凍乾燥，並以上述之方法進行 RP-HPLC，使每部分之純度達到 90 至 97%。

當 Quil-A 以相同之 RP-HPLC 分析時，則可得到如上述之相同的五個部份，但成份之相對比率與萃取自樹皮之萃取物不同。

(步驟 3) 純化的皂苷成分之矽膠萃層層析

將 1  $\mu$ g 來自步驟 2 之 QS-L1, QS-L2, QS-L3, QS-L4 及 QS-L5 皂苷成分及 40  $\mu$ g 的 Quil-A，點在矽膠薄層層析板上 (Si60 HPLC, E. M. Science) 並以氯仿 / 甲醇 / 蒸餾水 (62:32:6 (v/v/v) 之混合液為展開液進行沖提 3 至 4 小時。

將該平板於 80℃ 下乾燥 1 小時，隨後在平板上噴灑 Bial 試劑 (Orcinol Ferric Chloride, Sigma, Cat. No. 0-7875) 呈色，再將此平板於 80℃ 下烘乾 30 分鐘以選擇性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 13 )

的將皂苷成分中部分的糖加以染色，此結果如第3圖所示，在其中第1行為Quil-A而2至6行分別為QS-L1，QS-L2，QS-L3，QS-L4及QS-L5。每種皂苷成分均只有一個條帶。

### 第2實例：質譜儀

QS-L1皂苷成分之分子量可以VG Quattro LC-MS來測定其乃藉由電子散射離子化(ESI)-MS方法並以乙腈／蒸餾水／醋酸(60:40:0.5(v/v/v)為沖提液而進行。

第4圖之結果顯示有一個 $[M+Na]^+$ 離子分子高峯在979.4(m/z)時被偵測出來。但其中包含有鈉離子，故m/z之值須再減去23，因此QS-L1之分子量約為956，其遠較Kersten等(WO 92/06710)所揭露之QA-3分子量1862道爾頓小很多。此外亦與Kensil等人(Vaccine, 92, 35-40, Cold Spring Harbor Laboratory Press)所揭露之QS-17，QS-18及QS-21的分子量2371，2174及2012不同。因此認為QS-L1為一新的皂苷成分。

### 第3實例：皂苷成分及Quil-A的毒性

給予老鼠粗皂苷成分時其所出現之主要症狀為肝臟的壞疽，為探討QS-L1，QS-L2，QS-L3，QS-L4，QS-L5及Quil-A之毒性，將8週齡CD-1雄鼠(Charle's River Institute, Japan)皮下注射125，250，500  $\mu$ g之不同劑量皂苷，如第3表所示，而對照組只注射生理鹽水。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 14 )

第 3 表

| 注射劑量<br>( $\mu$ g) | 注射老鼠數目 |        |       |       |       |       |
|--------------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
|                    | 生理鹽水   | Quil-A | QS-L1 | QS-L2 | QS-L4 | QS-L5 |
| 125                | -      | 5      | 5     | 5     | 5     | 5     |
| 250                | -      | 5      | 5     | 5     | 5     | 5     |
| 500                | 5      | 5      | 5     | 5     | 5     | 5     |

結果，在皂苷組份與 Quil-A 之投藥後，於 72 小時內死亡的老鼠之數目，與 C.R. Kensil 等人 [J. Immunol., 146, 431-437 (1991)] 所揭示之結果作比較，顯示在表 IV 中。

第 4 表 皂苷成分對 CD-1 老鼠之毒性分析

(a) 本實例之結果

| 注射劑量<br>( $\mu$ g) | 死亡老鼠數目 / 注射老鼠數目 |        |       |       |       |       |
|--------------------|-----------------|--------|-------|-------|-------|-------|
|                    | 生理鹽水            | Quil-A | QS-L1 | QS-L2 | QS-L4 | QS-L5 |
| 125                | -               | 1/5    | 0/5   | 0/5   | 2/5   | 0/5   |
| 250                | -               | 1/5    | 0/5   | 0/5   | 4/5   | 0/5   |
| 500                | 0/5             | 5/5    | 0/5   | 0/5   | 5/5   | 3/5   |

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 15 )

(b) Kensil等所揭露的結果

| 注射劑量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 死亡老鼠數目／注射老鼠數目 |        |         |         |
|---------------------------|---------------|--------|---------|---------|
|                           | Quil - A      | QS - 7 | QS - 18 | QS - 21 |
| 125                       | 1 / 5         | 0 / 5  | 4 / 5   | 0 / 5   |
| 250                       | 2 / 5         | 0 / 5  | 5 / 5   | 0 / 5   |
| 500                       | 4 / 5         | 0 / 5  | 5 / 5   | 1 / 5   |

結果顯示，Quil-A具有一相當高的毒性且其主要的原因是在於被認為相應於QS-18的QS-L4。QS-L1與QS-L2在一為500  $\mu\text{g}$ 的劑量位準下展現出極低或無毒性。其被認為相等於QS-L1的QS-L5被認定是具有一高毒性者，因為有5隻老鼠在注射以500  $\mu\text{g}$ 劑量後，其中有3隻死亡。

第4實例：皂苷之溶血活性

QS-L1，QS-L2，QS-L3，QS-L4及QS-L5之溶血活性測定是利用山羊紅血球細胞(SRBC)並根據Kersten等人(WO 92/06710)或Kensil等人(USP 5,057,540(1991)方法進行。

首先分別將500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的QS-L1，QS-L2，QS-L3，QS-L4，QS-L5及Quil-A進行係列稀釋使終濃度為4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。將分散在阿爾塞弗氏溶液之5 ml的SRBC置於15 ml的圓錐底試管中並在2000 rpm下離心10分鐘，將SRBL之沈澱加入10 ml的生理鹽水，將此混合液在上述之離心條件下再離心一次，重覆相同的清洗步驟一次。收集SRBL之沈澱並分散在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 五、發明說明 ( 16 )

生理鹽水中使終濃度為4% (v/v)，在一96孔穴的圓底微量平碟中，每穴加入150  $\mu$ l的4% SRBC，而上述所稀釋的皂苷成分則每穴加50  $\mu$ l，隨後在37℃下培育30分鐘後，利用微量平碟離心機在2500 rpm下離心10分鐘以沈降未溶血的細胞，每穴取出150  $\mu$ l的上清液置入另一個平底的微量平碟，並以Dynatech微量平碟判讀機測定405 nm之吸光度，結果示於第5圖，在其中，QS-L3，QS-L4，及QS-L5在20  $\mu$ g/ml時出現極高的溶血活性，而QS-L1在500  $\mu$ g/ml時仍未出現溶血活性，此結果顯示QS-L1可以安全且有效的做為抗原的免疫佐劑，其可吸附在蠟上而使用濃度可達500  $\mu$ g/ml。

第5實例：皂苷成分之免疫佐劑活性

QS-L1，QS-L2，QS-L3，QS-L4及QS-L5之免疫佐劑活性可根據參考實例之相同方法測定之，抗體力價結果如第5表所示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 17 )

第 5 表 皂苷成分之免疫佐劑活性 (抗體力價)

| 老鼠<br>代號 | 佐 劑   |            |            |            |            |            |
|----------|-------|------------|------------|------------|------------|------------|
|          | 蟾     | 蟾<br>QS-L1 | 蟾<br>QS-L2 | 蟾<br>QS-L3 | 蟾<br>QS-L4 | 蟾<br>QS-L5 |
| 1        | 25600 | 102400     | 25600      | 51200      | 25600      | 51200      |
| 2        | 51200 | 204800     | 25600      | 204800     | 102400     | 25600      |
| 3        | 12800 | 102400     | 51200      | 51200      | 204800     | 204800     |
| 4        | 6400  | 51200      | 12800      | 51200      | 102400     | 102400     |
| 5        | 25600 | 204800     | 12800      | 51200      | 25600      | 102400     |
| 平均       | 24320 | 133120     | 25600      | 81920      | 92160      | 97280      |
| S.D.*    | 17173 | 68692      | 15677      | 68692      | 73753      | 68692      |

S.D.\* : 標準偏差

當皂苷成分 QS-L1, QS-L2, QS-L3, QS-L4 及 QS-L5 與蟾共同使用時, 其免疫佐劑活性遠較單獨使用蟾為高, 特別是蟾加上 QS-L1 呈現最高的免疫佐劑活性。因此由第 3 實例及本實例之結果可知蟾 + QS-L1 較以前之佐劑具有更佳之免疫佐劑活性, 只是稍有毒性而已。

第 6 實例: 以皂苷成分 QS-L1 為免疫佐劑的疫苗配方

疫苗配方中, 當 QS-L1 與其他佐劑共同使用時其免疫佐劑活性可以下列方法測定之。

首先將 1 ml 的 EuVax (LG Chemical Ltd., Korea), 其

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 18 )

為一種重組 B 型肝炎疫苗包含  $20 \mu\text{g}$  HBsAg /  $500 \mu\text{g}$  簪 / ml，與  $50 \mu\text{l}$  的 QS-L1 溶液混合，其中皂苷成分 QS-L1 溶於蒸餾水中使濃度為  $2 \text{ mg/ml}$ ，以配製含有簪及 QS-L1 免疫佐劑的 B 型肝炎疫苗配方 ( 配方 1 )，另一方面， $1 \text{ ml}$   $20 \mu\text{g}$  / ml 未吸附在簪上的自由態 HBsAg 與  $50 \mu\text{g}$  之  $2 \text{ mg/ml}$  QS-L1 混合以製備 B 型肝炎疫苗配方 ( 配方 2 )，在正對照組中，B 型肝炎疫苗配方 ( 配方 3 ) 含有弗氏完全佐劑 ( FCA )，其為水溶於油狀之乳化劑，並將 FCA 與等量的 HBsAg 互相混合而製備，使濃度為  $20 \mu\text{g/ml}$ 。

取  $50 \mu\text{l}$  之配方 1，2，3 及 EuVax 皮下注射於 7 至 8 週齡的雌性 Balb/c 老鼠背部，每種注射 2 處，取  $0.1 \text{ ml}$  的配方 3，即 FCA 配方進行老鼠腹腔注射。

老鼠免疫性及抗體力價之測定的根據前述之參考實例，只是在配方 3 中以弗氏不完全佐劑取代完全佐劑進行補強注射。結果列於第 6 表中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 19 )

第 6 表

| 老鼠<br>代號 | 佐劑 (疫苗配方)    |                     |                 |               |
|----------|--------------|---------------------|-----------------|---------------|
|          | 蟄<br>(EuVax) | 蟄 + QS-L1<br>(配方 1) | QS-L1<br>(配方 2) | FCA<br>(配方 3) |
| 1        | 51200        | 51200               | 12800           | 204800        |
| 2        | 51200        | 204800              | 6400            | 409600        |
| 3        | 51200        | 204800              | 6400            | 409600        |
| 4        | 102400       | 204800              | 51200           | 204800        |
| 5        | 25600        | 409600              | 25600           | 812000        |
| 平均       | 56320        | 215040              | 20480           | 408160        |
| S.D.*    | 28043        | 127487              | 18877           | 247892        |

S.D.\* : 標準偏差

由第 4 表可看出，當 QS-L1 單獨使用時其免疫佐劑活性較蟄單獨使用時為低，但是當 QS-L1 與蟄共同使用時則出現增強的免疫佐劑活性其為蟄單獨使用的 3 至 4 倍。顯示蟄 + QS-L1 可以做為免疫佐劑且較蟄單獨使用為優。此結果建議在蟄與皂苷成分之間可能存在有協同作用以增加免疫佐劑活性。

第 7 實例：QS-L1 在細胞免疫反應之效果

QS-L1 之細胞免疫反應效應檢定可藉由老鼠脾臟細胞增殖情形而測定，該老鼠乃注射依據第 6 實例所製備的 B

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明(20)

型肝炎疫苗配方並以HBsAg處理。增殖的脾臟細胞數量可依據Byars等人的方法測定。

首先，將老鼠依據參考實例之方法以第6實例所製備的疫苗進行免疫作用。於最後補強後2星期，將脾臟自老鼠身上無菌切除而得到脾臟細胞。

在96孔穴圓底微量平碟中，每穴加入 $2 \times 10^5$ 個脾臟細胞該孔穴中含有RPMI-1640培養基，其包含有10%胎牛血清及2 mM穀氨酸。每穴中加入1  $\mu\text{g/ml}$ 的HBsAg，但保留4個孔穴做為對照組，將平碟於37°C，7% CO<sub>2</sub>大氣下培育4天。

當培育結束後，每穴再加入0.5  $\mu\text{Ci}$ 的<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶，並在上述相同的情況下再培育24小時，利用細胞收集器收集細胞，並利用液體閃爍計數儀測定細胞併入之<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶的量，每種佐劑之免疫佐劑活性均以激發指標(SI)來表示其乃根據下列方程式計算：

$$SI = \frac{\text{處理 HBsAg 之樣品的 cpm}}{\text{未處理 HBsAg 之樣品的 cpm}}$$

第6A及6B圖所顯示的結果中，二個不同的試驗中每種疫苗配方分別以2隻(第6A圖)或4隻(第6B圖)老鼠進行試驗，“正常”表示脾臟細胞是來自未處理HBsAg者，由結果顯示疫苗中含有QS-L1及簪者其細胞免疫活性較只含簪的疫苗配方為高。

本發明已利用上述之特殊實例加以說明，但是本發明

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 21 )

之任何修正及改變均在本發明之範圍內如同申請專利範圍  
所定義者。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 四、中文發明摘要(發明之名稱： 皂樹皂甘佐劑與含該佐劑的疫苗配方 )

本發明揭示一種新的皂甘成分，其分子量約為956道爾頓，一種自皂樹樹皮分離皂甘成分的方法，一種包含有該皂甘成分以作為免疫佐劑之疫苗配方，一種藉由採用一種包含有該皂甘成分之佐劑及一第二佐劑來增加對一抗原之免疫反應的方法。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

## 英文發明摘要(發明之名稱： QUILLAJA SAPONIN ADJUVANT AND VACCINE FORMULATION CONTAINING SAME )

A novel saponin component having a molecular weight of about 956 daltons, a process for isolating the saponin component from the bark of Quillaja saponaria Molina, a vaccine formulation comprising the saponin component as an immune adjuvant, a method for increasing the immune response to an antigen by employing an adjuvant composition comprising saponin component and a second adjuvant.

訂

線

## 六、申請專利範圍

1. 一種分離自皂樹樹皮萃取物之實質純質的皂苷成分，

其被命名為 QS-L1，其特徵包含有：

當以  $4.6 \times 250$  mm Vydac C4 管柱並利用含 0.1 wt% 之三氟醋酸的水／乙腈 (7/3; v/v) 溶液，流速為 1 ml / 分鐘之逆相高壓液相層析法 (RP-HPLC) 予以分析時，其遲滯時間約為 14 分鐘；及

當以 ESI-MS 分析時，其分子離子為  $m/z$  979.4。

2. 一種用以從皂樹 (*Quillaja saponaria* Molina) 之樹皮萃取物中分離如申請專利範圍第 1 項之皂苷成分 QS-L1 的方法，其包含有：

(a) 離心一配於醋酸水溶液內之樹皮萃取物溶液以得到一上清液；

(b) 利用一具一分子限制範圍為 12 至 14 kDa 之超透析膜，於醋酸水溶液中進行該上清液之透析；

(c) 離心所形成之透析液以得到一第二上清液；

(d) 冷凍乾燥該第二上清液以得到皂苷萃取物粉末；

及

(e) 將該皂苷萃取物粉末溶於一適當的溶劑中，並將此溶液注入 RP-HPLC，其中使用在一含有 0.1% 三氟醋酸之 30 至 40% 乙腈的直線濃度梯度下之 C4 RP-HPLC 管柱，如此可得到一含有實質純質的 QS-L1 之分離部分。

3. 一種疫苗配方，其包含一種抗原，如申請專利範圍第

1 項之皂苷成分 QS-L1 以作為免疫佐劑以及一種第二

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

衣

訂

## 六、申請專利範圍

佐劑。

4.如申請專利範圍第3項之疫苗配方，其中該第二佐劑為蠐。

5.如申請專利範圍第4項之疫苗配方，其中該抗原被吸附在蠐上。

6.如申請專利範圍第3項之疫苗，其中該抗原為B型肝炎病毒之表面抗原(HBsAg)。

7.如申請專利範圍第3項之疫苗，其所含QS-L1之含量範圍為自1至500  $\mu\text{g}$ /單一劑量。

8.一種增加一疫苗配方內之一抗原之抗原性的方法，其包含採用如申請專利範圍第1項之皂苷成分QS-L1以作為一種免疫佐劑並與一種第二佐劑組合使用。

9.如申請專利範圍第8項之方法，其中該第二佐劑為蠐。

10.如申請專利範圍第8項之方法，其中該疫苗配方中的QS-L1之含量範圍為自1至500  $\mu\text{g}$ /單一劑量。

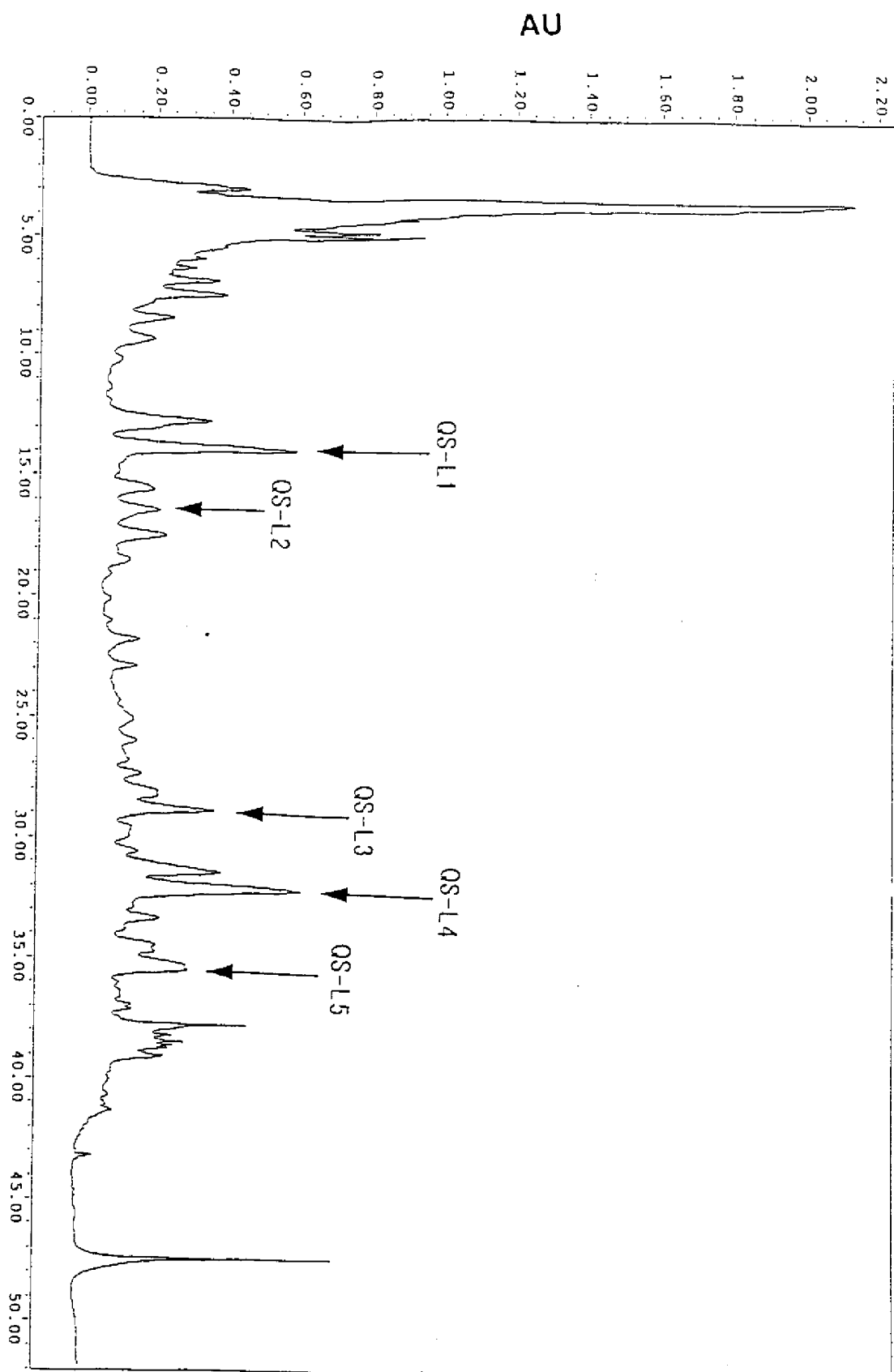
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

442293

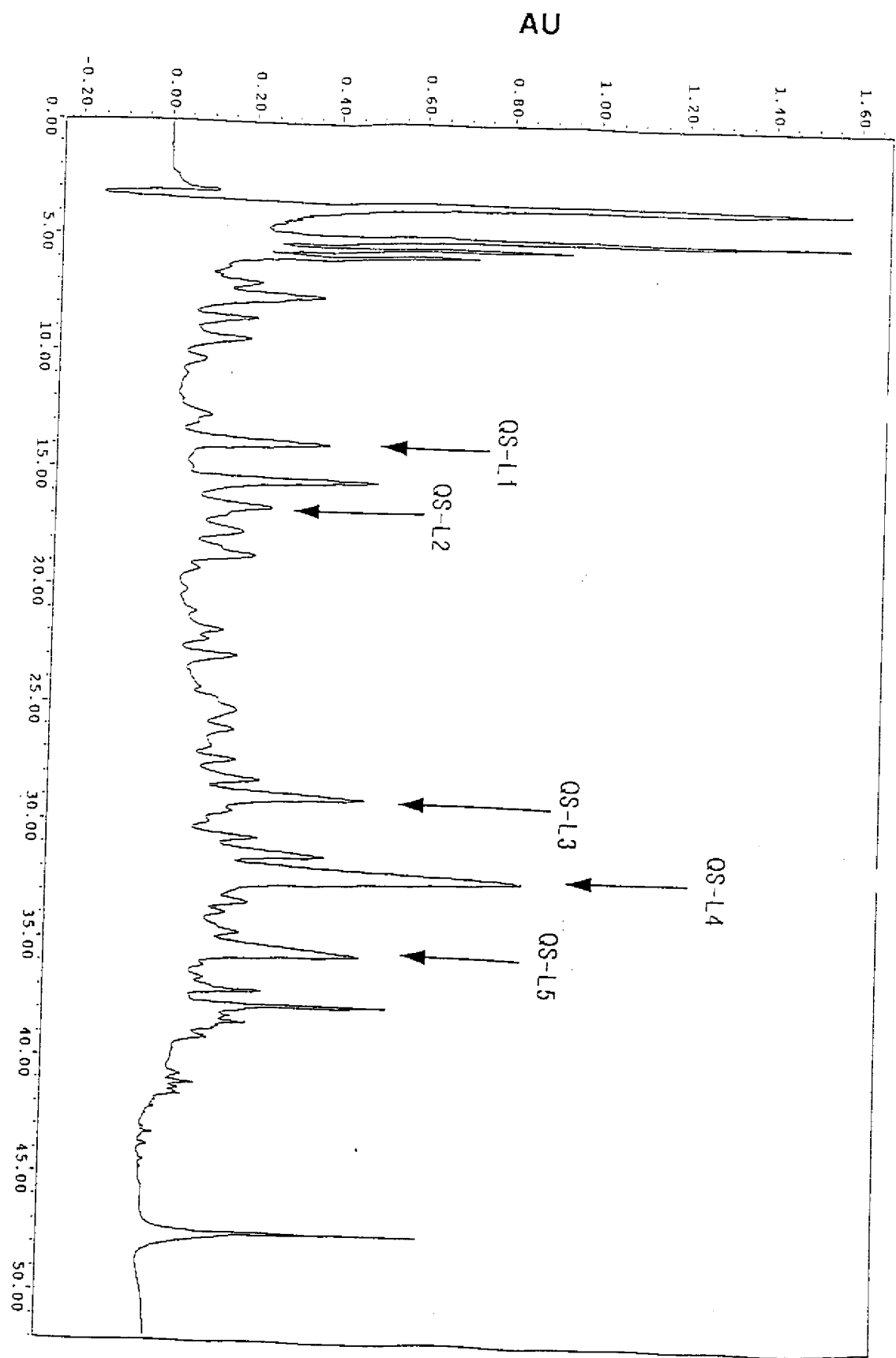
85105448

第 1 圖



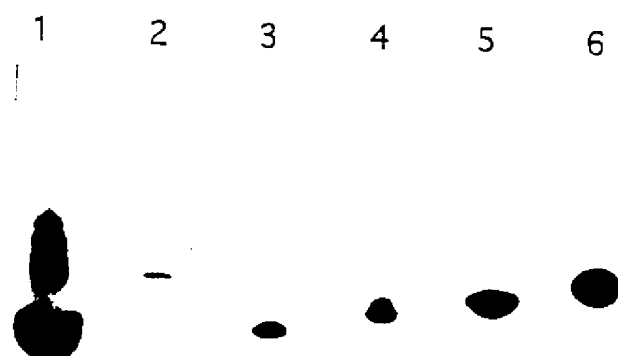
442293

第 2 圖



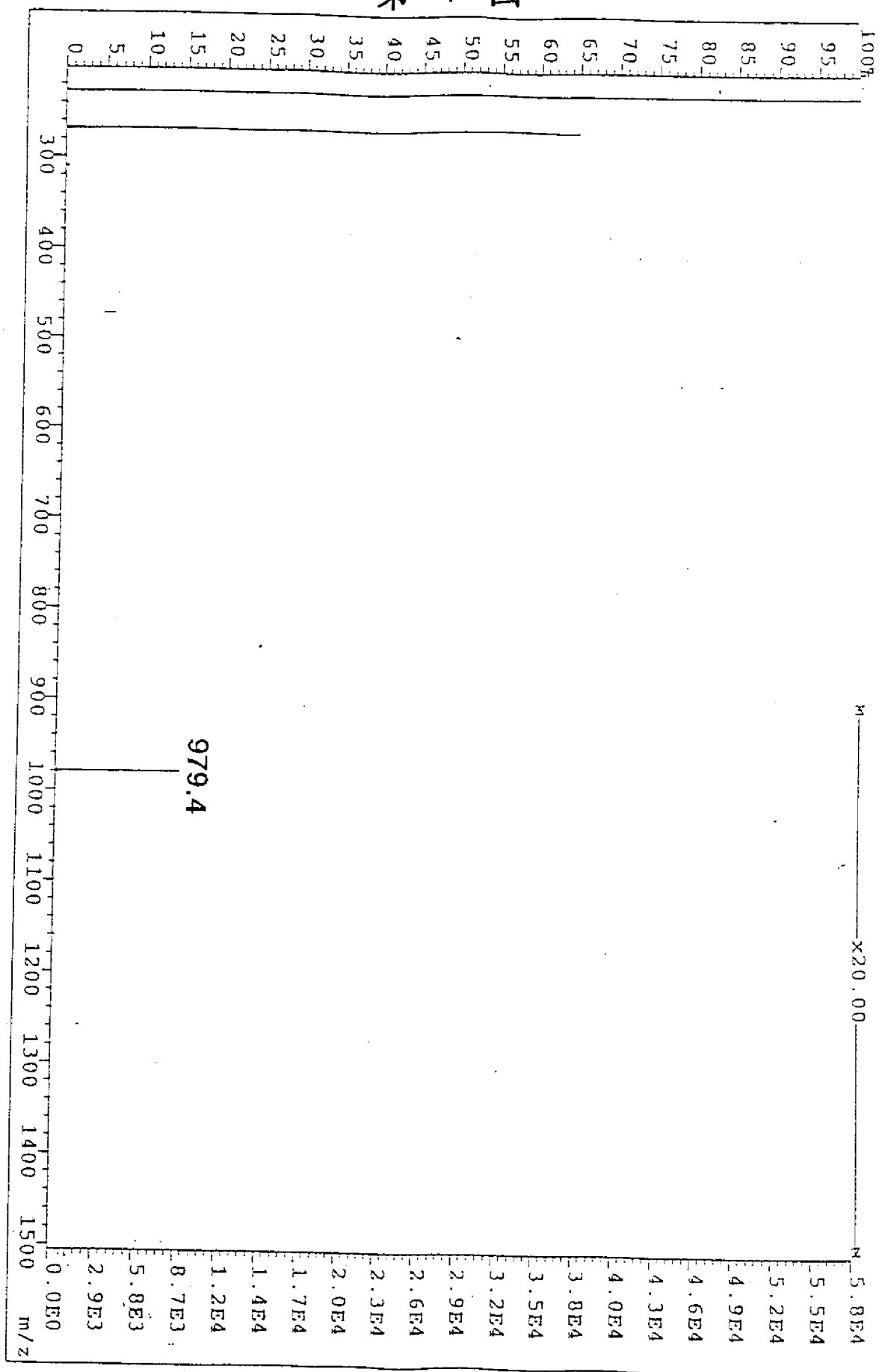
442293

第 3 圖

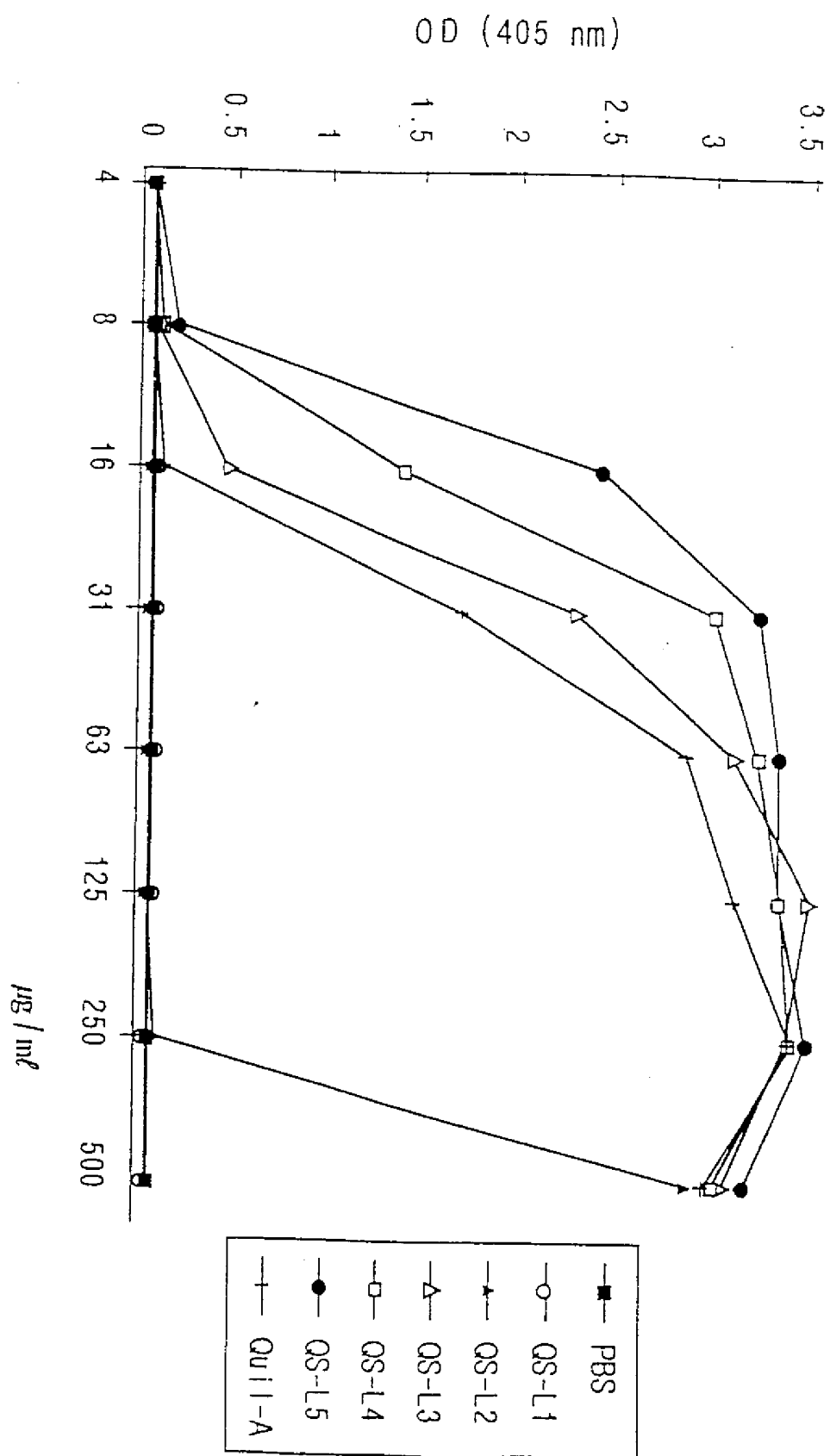


442293

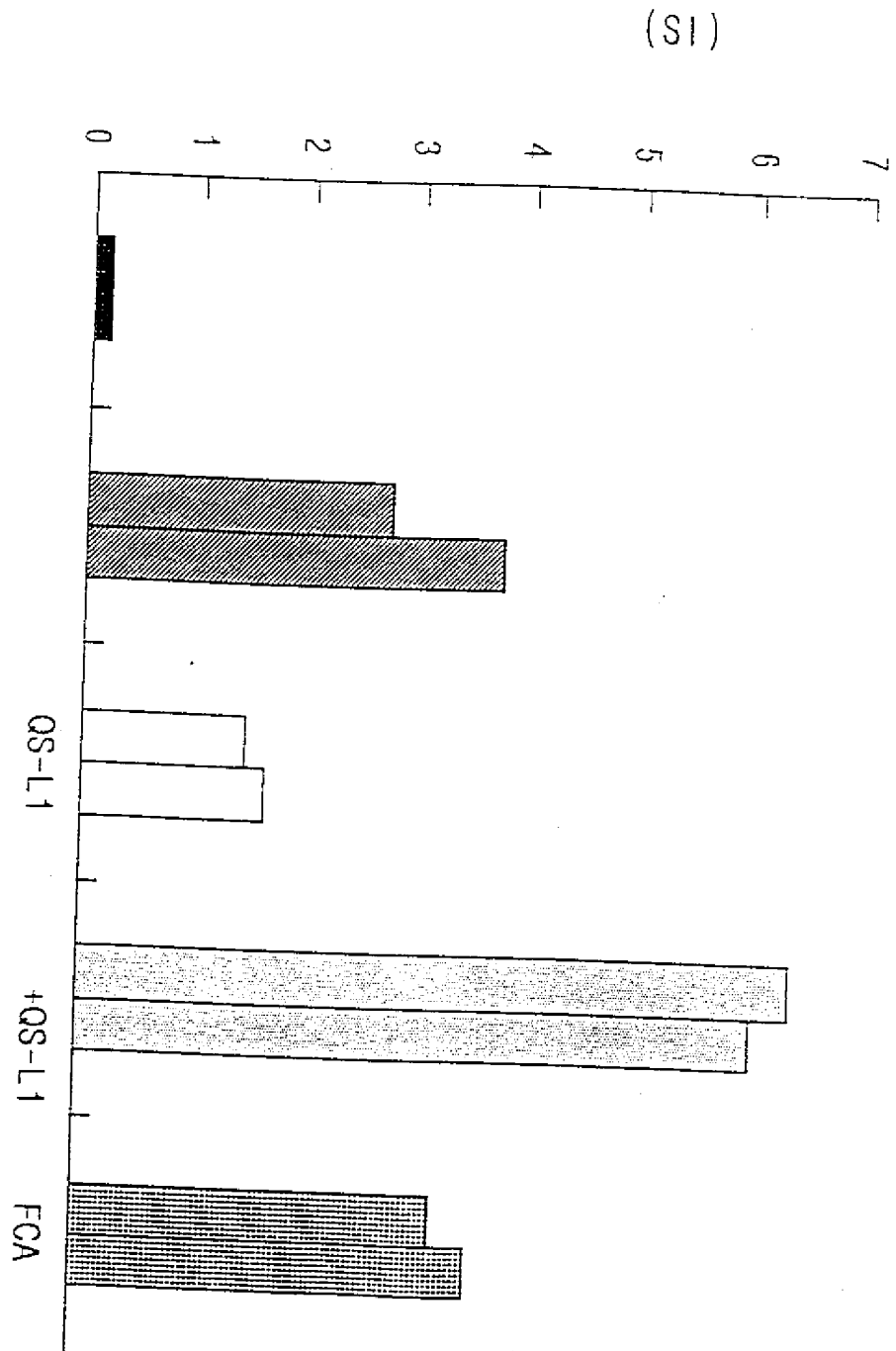
第 4 圖



第 5 圖

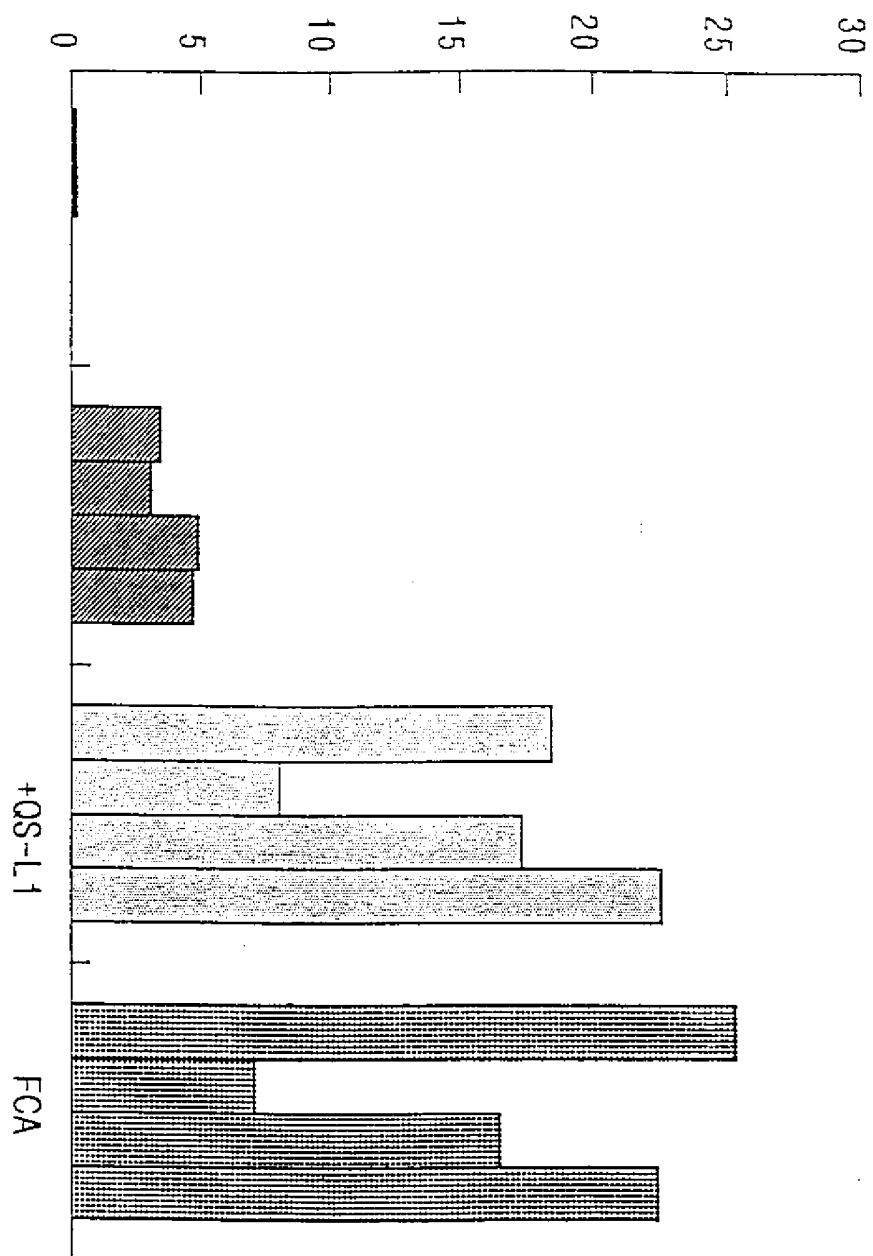


第 6A 圖



第 6B 圖

(SI)



## 五、發明說明 ( 11 )

第 1 表

| No. | 時間    | 流速 (毫升) | % A* | % B** |
|-----|-------|---------|------|-------|
| 1   | 0.00  | 1.00    | 70.0 | 30.0  |
| 2   | 5.00  | 1.00    | 70.0 | 30.0  |
| 3   | 30.00 | 1.00    | 60.0 | 40.0  |
| 4   | 35.00 | 1.00    | 0.0  | 100.0 |
| 5   | 40.00 | 1.00    | 0.0  | 100.0 |
| 6   | 41.00 | 1.00    | 70.0 | 30.0  |
| 7   | 51.00 | 1.00    | 70.0 | 30.0  |
| 8   | 52.00 | 0.00    | 70.0 | 30.0  |

A\* : 0.1% 之 TFA 溶於蒸餾水中。

B\*\* : 0.1% 之 TFA 溶於乙腈中。

大約有 32 種皂苷成分在不同的遲滯時間被沖提出來，根據不同的遲滯時間可收集許多份的純皂苷成分。每種皂苷成分在皂苷萃取物中所佔有之相對比自 0.13% 至 32%。

純化的皂苷成分其免疫佐劑活性測定乃根據參考實例的方法進行，有 5 種成份具有極高的免疫性增強活性，其分別被命名為 QS-L1，QS-L2，QS-L3，QS-L4 及 QS-L5。該五種成份之高峯面積 (%) 及其遲滯時間如第 2 表所示，此五種成份之高峯相對位置如第 1 圖。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂