

公告本

發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97123928

※申請日期：97年06月26日

※IPC分類：

A61k 39/44 (2006.01)
 C07k 14/485 (2006.01)
 C07k 16/28 (2006.01)

一、發明名稱：

(中) 供腫瘤治療用之均質性疫苗組成物及其製備方法

(英) Homogeneous vaccine composition for the tumor treatment and its obtaining method

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) 分子免疫學中心

(英) CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

代表人：(中) 1. 奧古斯汀 達維拉

(英) 1. DAVILA, AGUSTIN B. LAGE

地址：(中) 古巴罕巴拿城普雷亞亞塔貝二一六及十五街

(英) Calle 216 Esq. A 15, Atabey, Playa, Ciudad de la Habana AP.
16040, Habana 12100, Cuba

國籍：(中英) 古巴 CUBA

三、發明人：(共 9 人)

1. 姓名：(中) 葛莉西亞 洛利加斯馬汀尼斯

(英) RODRIGUEZ MARTINEZ, GRYSSELL MARIA

國籍：(中) 古巴

(英) CUBA

2. 姓名：(中) 萊西 維娜洛利加斯

(英) VINA RODRIGUEZ, LISEL

國籍：(中) 古巴

(英) CUBA

3. 姓名：(中) 羅尼 卡佛岡薩雷

(英) CALVO GONZALEZ, LOANY

國籍：(中) 古巴

(英) CUBA

4.姓 名：(中) 亞里德那 裘瓦士費亞羅
(英) CUEVAS FIALLO, ARIADNA
國 籍：(中) 古巴
(英) CUBA

5.姓 名：(中) 恩內斯托 奇哥維利斯
(英) CHICO VELIZ, ERNESTO
國 籍：(中) 古巴
(英) CUBA

6.姓 名：(中) 奧古斯汀 拉吉達維拉
(英) LAGE DAVILA, AGUSTIN BIENVENIDO
國 籍：(中) 古巴
(英) CUBA

7.姓 名：(中) 塔尼亞 克羅貝特拉莫斯
(英) CROMBET RAMOS, TANIA
國 籍：(中) 古巴
(英) CUBA

8.姓 名：(中) 艾拉瑪 艾爾畢莎諾佛
(英) ALBISA NOVO, AIRAMA
國 籍：(中) 古巴
(英) CUBA

9.姓 名：(中) 吉賽勒 格沙雷茲瑪利尼洛
(英) GONZALEZ MARINELLO, GISELA MARIA
國 籍：(中) 古巴
(英) CUBA

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 ☐ 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 古巴 ; 2007/06/29 ; CU-2007-0154 ☒ 有主張優先權

五、中文發明摘要

發明之名稱：供腫瘤治療用之均質性疫苗組成物及其製備方法

本發明關於生物技術領域且特別關於人體健康。更具體地說，本發明關於供癌症病患治療用之疫苗組成物。

本發明之疫苗組成物具有作為活性成分之人重組表皮生長因子(hrEGF)與 P64K 重組蛋白質之化學共軛物。在另一實施態樣中，本發明關於在受控制及可重現之參數下製備化學共軛物之共軛方法。

在一較佳實施態樣中，本發明關於純化化學共軛物之方法，其生成較高純度之治療性疫苗組成物及意外地增加免疫原活性，且誘發人抗 EGF 抗體力價之顯著增加。

另外，本發明提供製備多種劑量表示法(每瓶中 EGF-P64K 共軛物之總毫克數)之疫苗組成物之方法。該劑量表示法之多樣性係使每位病患之免疫劑量得以提高，且無需增加注射頻率及/或免疫部位。

此外，本發明關於製備供癌症治療的非經腸途徑使用之疫苗組成物之衛生方法。

六、英文發明摘要

發明之名稱：

HOMOGENEOUS VACCINE COMPOSITION FOR THE TUMOR TREATMENT AND ITS OBTAINING METHOD

The present invention relates to the biotechnological field and particularly to the human health. More particularly, the present invention relates to a vaccine composition for therapeutic use in cancer patients.

The vaccine composition of the present invention has as active principle a chemical conjugated between the human recombinant Epidermal Growth Factor (hrEGF) and the P64K recombinant protein. In another embodiment, the present invention relates to the conjugation procedure to obtain, a chemical conjugated under controlled and reproducible parameters.

In a preferred embodiment, the present invention relates to the procedure for purifying the chemical conjugated with a higher purity of the therapeutical vaccine composition, and a surprisingly increased immunogenic activity, inducing a significant increase of the anti-EGF antibody titers in humans.

Additionally the present invention provides the methodology to obtain a vaccine composition in several dose presentations (total milligrams of conjugated EGF-P64K/vial). The versatility of the dose presentation allows increasing the immunization dose per patient, without increasing the frequency of injections and / or immunization sites.

Besides, the present invention relates to a sanitary procedure for obtaining a vaccine composition for parenteral route in the cancer therap.

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：第 6 圖。

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明關於生物技術，特別是與人體健康有關之生物技術。在一實施態樣中，本發明描述保護性及/或治療性癌症疫苗，特別是誘發對表皮生長因子（EGF）之免疫反應顯著增加之疫苗組成物，該表皮生長因子之腫瘤相關性已經經過廣泛證明，主要係對表皮來源之腫瘤生長。

【先前技術】

EGF 受體（EGFR）系統（包括配體）係一分子複合體，其特異性調節細胞生長且造成表皮腫瘤不受控制之生長。

在腫瘤發生過程中，為活化 EGFR 而對旁分泌及自分泌作用進行減低調節係涉及過度表現生長因子及增加受體之合成及/或突變。

EGF 係 53 個胺基酸之多肽，其表觀分子量為 6045 道爾頓。此肽最先係由 Cohen S., J. Biol. Chem. 20(1962) 237, 1.555 分離純化。

EGF 係 EGFR 配體家族之成員；此家族包含結構及功能相關性蛋白質。此家族之其他成員係轉化生長因子（TGF）、雙調蛋白（anmphyregulin, AR）、克普多-1（cripto-1, CR1）、肝素結合生長因子、 β 細胞素（betacelluline）、及表皮調節素（epireguline）。另一方面，痘病毒（poxvirus）家族包括與 EGF 相關之蛋白質；

其中最具特色的是牛痘病毒生長因子（VGF）。

所有這些分子均可與 EGFR 結合並引起後續之受體活化，因此它們被稱為 EGFR 配體且對於正常及腫瘤細胞之生長有所影響。

EGFR 係 170 千道爾頓之糖蛋白；其基因已被選殖及定序。此受體之細胞內結構域係與分子之酪胺酸激酶活性有關，該分子與該等由 v-erb-B 腫瘤基因所編碼之蛋白質具有結構同源性且與惡性轉化過程有關（HELDIN C.H. (1984), CELL 37, 9-20）。

過去幾年，關於 EGFR 及其配體系統與癌症之關連性的實驗證據顯示，EGFR 係非常有吸引力的癌症免疫治療標的。

先前結果顯示，使用以 EGF 為底質之疫苗的主動免疫療法對癌症具有療效。事實上，使用與載體蛋白連接之 hrEGF 進行免疫已經得到相關的免疫原性及無毒性之臨床前及臨床證據（González and cols. (1996), Vaccine Research 5(4), 233-243）。

EP 0 657 175 描述包含與載體蛋白偶合之自體 EGF 之疫苗組成物，其藉由自體免疫作用抑制 EGF 依賴型腫瘤之生長。

EP 0 657 175 描述之疫苗組成物係共軛疫苗，其包含與載體蛋白（P64K 蛋白、霍亂毒素 B 鏈、欽類毒素蛋白及/或單株抗體）偶合之 EGF，且所製備得到的是異源性及低重現性之共軛物種混合物。

【發明內容】**[發明摘要]**

本發明所描述之新穎疫苗組成物包含作為活性成分之自體 EGF，其特徵為具有可定義純度之均質性化學組成物、誘發較高之免疫原性、實質上增加之臨床活性及以較少免疫次數達到治療效果。

本發明之疫苗組成物中較低之自體抗原含量意外地並不誘發較低之人 EGF 抗體力價，反而誘發抗 EGF 抗體力價顯著上升。疫苗組成物中較低含量之 EGF 內容物及其衍生物係藉由發展以膜過濾為基礎之純化方法製備，該方法亦為本發明之目的。

另外，相較於先前描述之疫苗組成物，本發明提供具有較高臨床效益及較少免疫次數之均質性及可重現之疫苗組成物，這對癌症治療及病患而言代表很大好處。

本發明之疫苗組成物亦可包含適當佐劑，諸如氫氧化鋁或孟特耐（Montanide）。

在另一實施態樣中，本發明關於製備適用於人之非經腸途徑之疫苗組成物之衛生方法。

該方法包含共價共軛 hrEGF 與載體蛋白 P64K 之適當方法，及利用介於 50-100 千道爾頓之超過濾膜純化該共軛物以移除不具生物活性之共軛物種（不具免疫原性）及其他化學雜質。

[本發明之詳細說明]

本發明揭示一種以自體 EGF 為底質之新穎疫苗組成物，其中該疫苗組成物係具有定義純度之均質性化學組成物，且可誘發有效的免疫原性及實質上增加之臨床活性。此外，當治療劑量必須增加時，使用本發明之疫苗組成物可達到較高之治療劑量而無需增加注射次數，因為依照本發明之方法製備疫苗組成物，增加共軛物種 hrEGF-rP64K 之濃度（所謂的強度）是有可能的。

意外的是，發明人發現當以新穎純化方法降低本發明之疫苗組成物中自體抗原之含量時，相較於先前報告之異源性 EGF 基質疫苗，本發明之疫苗組成物可誘發拮抗自體 EGF 之免疫反應顯著增加。

藉由膜超過濾純化方法降低自體抗原含量而製備之疫苗組成物係均質性組成物，其中免疫活性物種（共軛物種 hrEGF-rP64K）之分子量大於 60 千道爾頓。此疫苗組成物顯示分子排阻層析特徵，因為攜帶生物活性之物種佔超過 90% 之總層析面積（代表全體疫苗組成物），如圖 4 所示。

質譜分析顯示本疫苗組成物之結構特徵。二個不同批量之肽圖譜在批量位置及比例上顯示高度同源性（圖 5）。這種不同批量之高度同源性證實本發明所描述之化學共軛參數及純化方法之正確性。質譜分析進一步顯示衍生自本發明之疫苗組成物的主要肽序列（表 3）。

在本疫苗組成物中，EGF 與 P64K 蛋白質之共軛比例

係 1 : 2，這代表每個 P64K 分子結合 2 分子的 EGF。

[製備疫苗組成物之方法]

降低自體 EGF 含量之純化方法

從實驗觀察中發現，降低疫苗組成物中 hrEGF 之含量增加其免疫活性，因此發展出一種降低異源性共軛物混合物中之 hrEGF 含量的方法；使該疫苗組成物之高分子量共軛物種（免疫活性物種）富集及不含戊二醛。

本發明所發展及描述之純化方法使用介於 50-100 千道爾頓之超過濾膜，該方法由二階段組成：

在第一階段中，連續更換終止溶液（滲濾）以移除戊二醛及過剩之自體蛋白質（游離型或形成不同大小之 hrEGF-hrEGF 共軛物）。在此階段中，進行 10 至 15 次之更換終止溶液。

第二階段係濃縮該經純化之化學共軛物，其中超過 90% 之組成份係免疫原性物種 hrEGF-rP64K。在濃縮階段中，該化學共軛物之初始體積係經減少直到最終蛋白質濃度（共軛物種 hrEGF-rP64K）到達介於 1-12 毫克/毫升之範圍為止。此疫苗組成物中活性成分濃度範圍之多樣性（每毫升中 hrEGFrP64K 共軛物之總毫克數）係癌症療法之巨大優勢。如此可以增加治療劑量而不需增加免疫病患之頻率及/或增加免疫部位之數目。

爲了監測化學共軛物之純化品質，我們評估留滯物及滲濾物之 pH 值及導電性。同時亦利用 Lowry D.H. and

col. J. Biol Chem 191 : 495-498, 1951 中所描述之方法進行蛋白質濃度測定，均質性百分比係由膠體過濾層析法（HPLC-FG）分析測定。

此方法的獨特性確保所製備之疫苗組成物具有均質性組成物及定義純度，其特徵為主要存在的免疫活性物種：hrEGF-rP64K 共軛物。

意外的是，移除多餘之游離型或聚合性自體蛋白質（hrEGF）並不會降低抗 EGF 抗體之濃度，反而讓抗 EGF 抗體（1/1000 稀釋）之濃度顯著增加至以 hrEGF 聚合物及以游離型 hrEGF 免疫小鼠所得到者之 10 倍以上。疫苗組成物中自體蛋白質之含量降低造成病患之抗 EGF 抗體最高力價增加至少 2 倍。此抗體力價之增加甚至可在該些每次免疫接受一半劑量（2.4 毫克）之病患中發現（相較於 EP 0657 175 中描述之每次接受 4.8 毫克劑量之疫苗組成物之病患）。這些結果顯示，相較於其他疫苗組成物，本發明所描述之疫苗組成物每毫克免疫活性蛋白質具有更高之免疫活性。

製備重組蛋白質 P64K（rP64K）與人重組表皮生長因子（hrEGF）之化學共軛物

從評估及最佳化蛋白質 hrEGF 與 rP64K 之化學共軛反應之條件開始，發展需要高莫耳比例之自體蛋白質（每莫耳之 rP64K 需要 10 莫耳之 hrEGF）之共軛方法，以確保二者之間的高共軛效率。在化學共軛過程中為了確保效率所必需之多餘自體蛋白質，係在之後透過如前所述之膜超

過濾純化方法清除，如此可製備具有高均質性之疫苗組成物。本發明所描述之確保二種蛋白質適當化學共軛之方法係由單一步驟組成，首先於共軛反應器中混合預先濃縮之 hrEGF 蛋白（ > 6 毫克/毫升）與 rP64K 蛋白（ ≥ 1 毫克/毫升）。對此蛋白質混合物加入 PBS/MgCl₂ 溶液（pH 6.8-7.2）及 0.5% 戊二醛之共軛溶液，且令該混合物於 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下經連續攪拌培養 2 小時。該反應混合物中之 hrEGF 蛋白質終濃度係 0.82 毫克/毫升，rP64K 蛋白質終濃度係 0.89 毫克/毫升。在共軛反應過程中之總蛋白質濃度係 2 毫克/毫升，在反應混合物中之戊二醛終濃度係 0.05%。

本發明之疫苗組成物可與適當佐劑一起使用，諸如氫氧化鋁或孟特耐（Montanide）。

在另一態樣中，本發明關於製備供非經腸途徑投服之疫苗組成物之衛生方法，該方法之優點包括最小化共軛過程中微生物污染該疫苗組成物之機會、使該化學共軛物之純化方法得以在數小時內完成且有助於增加所製備之疫苗組成物之體積等。下列實施例進一步詳細說明本發明。

【實施方式】

實施例 1 描述本發明之疫苗組成物之分子特徵。該分子特徵包括：在共軛反應過程中形成之共軛物種之 HPLC-FG 層析特性、測定蛋白質 hrEGF 與 rP64K 之共軛比例及特徵化此新穎疫苗組成物之肽圖譜定義。

實施例 2 描述在小鼠進行之生物測定法，以評估本發

明之新穎疫苗組成物之免疫原性。

實施例 3 描述本發明之疫苗組成物在臨床上用於治療表皮來源之肺腫瘤之有效性。

實施例 4 描述利用與本發明所述相同之共軛方法及純化方法製備不同強度（每瓶中 hrEGF-rP64K 共軛物之總毫克數）之疫苗組成物。

實施例 5 顯示藉由通過 50 千道爾頓超過濾膜純化該化學共軛物之方法移除共軛反應中所使用之戊二醛。

實施例 1：本發明所述之疫苗組成物（疫苗組成物 A）之分子特徵

1.1 本發明所述之疫苗組成物之層析特性

要了解經超過濾純化之疫苗組成物之層析特性，使用同型寡聚共軛物 hrEGF-hrEGF 及 rP64K-rP64K 作為指標。

同型寡聚共軛物（hrEGF-hrEGF 及 rP64K-rP64K）所顯示之層析圖係與經化學共軛反應製備但未經純化之蛋白質 hrEGF 與 rP64K 共軛物之層析圖比較。圖 1 顯示同型寡聚共軛物 rP64K-rP64K 之層析圖及蛋白質 hrEGF 與 rP64K 經化學共軛後（未經超過濾純化之化學共軛物）之層析圖。圈起部分屬於共軛物種 hrEGF-rP64K。由於 hrEGF 分子與 rP64K 共軛，因此共軛物 rP64K-rP64K 之層析圖與化學共軛物 hrEGF-rP64K 之圖形並非完全相同。

圖 2 顯示經超過濾純化之疫苗組成物在進行還原狀態變性電泳及西方墨點法後所得到之結果。利用與鹼性磷酸

酶共軛之抗 EGF 抗體進行呈色。EGF 係表觀分子量 6 千道爾頓之蛋白質，其應位於膠體之下方區域。利用抗 EGF 抗體免疫偵測對應蛋白質表觀分子量大於 6 千道爾頓之區域，證實 hrEGF 分子係與 rP64K 一起存在於對應共軛物種 hrEGF-rP64K 之膠體區域。

當比較未經純化之化學共軛物 hrEGF-rP64K 與同型寡聚共軛物 hrEGF-hrEGF 之層析圖時，可發現二者之間存在一致性。此證據證實在波谷之後存在對應 hrEGF 物種之共軛物（EGF 聚合物）及游離型 hrEGF 之區域（圖 3）。

本發明之疫苗組成物之分子排阻層析圖（圖 4）顯示，對應共軛物種 hrEGF-rP64K 之區域佔超過層析圖總面積之 90%（陰影區域），顯示該疫苗組成物具有高均質性。

1.2 本發明所述之疫苗組成物中蛋白質 hrEGF 與 rP64K 之共軛比例

爲了測定疫苗組成物中 hrEGF 與 rP64K 之共軛比例，測定每個組成蛋白質之莫耳數。取一自 50 千道爾頓超過濾方法製備之疫苗組成物，並收集對應 rhEGF-rP64K 共軛物種之層析份。取這些部份進行胺基酸分析。

共軛比例之測定係由 2 種方法進行。

1. 一種係以預估疫苗組成物中苯丙胺酸（Phe）及蘇胺酸（Thr）之量爲基礎之方法（僅存在於 rP64K 分子中之胺基酸）。這些胺基酸之量係用於測定 rP64K 之量。從 rP64K 之量開始，記住混合物中胺基酸之總量

，即可求出 EGF 之量。

2. 另一種方法係根據直接測定各種蛋白質之相對量，利用胺基酸序列，並以該些胺基酸天冬醯胺酸 + 天冬胺酸（Asx）、麩醯胺酸 + 麩胺酸（Glx）、甘胺酸（Gly）及丙胺酸（Ala）之量為基礎（對酸水解高度穩定及慣用於蛋白質定量之殘基）。

表 1 及 2 顯示每種方法得到之結果。

rP64K 之平均量	hrEGF 之平均量	平均共軛比例
12,07 奈莫耳	23,13 奈莫耳	1,92

表 1：根據測定苯丙胺酸（Phe）及蘇胺酸（Thr）之量之方法，進行測定經超過濾純化之疫苗組成物中之胺基酸組成以測定 hrEGF 與 rP64K 蛋白質之共軛比例。

蛋白質	蛋白質之量	共軛比例
rP64K	12,04 奈莫耳	2,00
hrEGF	24,05 奈莫耳	

表 2：根據測定胺基酸天冬醯胺酸 + 天冬胺酸（Asx）、麩醯胺酸 + 麩胺酸（Glx）、甘胺酸（Gly）及丙胺酸（Ala）之相對量之方法，進行測定經超過濾純化之疫苗組成物中之胺基酸組成以測定 hrEGF 與 rP64K 蛋白質之共軛比例。

這二種方法得到之結果顯示本發明所述之疫苗組成物中 hrEGF 與 rP64K 蛋白質之共軛比例之預估值具一致性。

經計算之共軛比例係 1 : 2，這表示每個 rP64K 蛋白質分子與二個 hrEGF 分子共軛。

1.3 本發明所述之疫苗組成物之肽圖譜特徵

爲了特徵化本發明之疫苗組成物之結構，並證實該方法之可重現性，發展及特徵化以內切蛋白酶 Glu-C 消化共軛份 hrEGF-rP64K 之後所製備之肽圖譜。該製備圖譜之每個部份係經質譜儀辨識及定序。圖 5 顯示自二個獨立製備之疫苗組成物開始製備之肽圖譜，其中出現之肽及其相對比例具有高度相似性。該些自二個疫苗組成物開始製備之肽圖譜之間的重現性代表對於化學共軛方法及（本發明所描述之）純化發生之條件有所控制。

在圖譜各部份所包含之肽的識別係藉由 MALDI 法（介質輔助雷射脫附離子化）及 ESI-MS 法（電噴灑離子化 / 電噴霧離子化）分析它們每一個以得到。表 3 顯示主要肽之序列。

波峰	肽
HG05	LDID QAAPTGE
HG06	SIGMAAE AEGTAAAPKAE
HG08	AEGTAAAPKAE
HG09	KISE SIGMAAE
HG11	AAAAPAQEAPKAA GANAPKEPQRYD
HG12	SIGMAAE
HG14	VKVKVGDKISE
HG15	VAWVGE
HG16	VAWVGETE VSLTAGDAYE
HG17	VCLAIE
HG18	VRHLAANGIKYPEPE
HG19	AAAAPAQEAPKAAAPAPQAAQFG VRHLAANGIKYPEPE
HG20	LKVPDIGGHE RVIPGVAYTSPE TGRIIGGGIVGPN VRHLAANGIKYPEPE
HG21	KAGVAVTDRGFIE LIFDAE GGPGGYSAAFAADE
HG22	ARVIPGVAYTSPE GLKVAIVE
HG23	AAAAPAQEAPKAAAPAPQAAQFGGSADAIEY D MGCDAAIDIGKTIHPHPTLGE PKEPQRYDAVLVAAGR
HG24	NVDIIAVE YDVVVLG

波峰	肽
HG25	AVLVAAGRAPNGKLISAE MGCDAAIDIGKTIHPHTLGE TGRIGGGIVGPNGGDMIGE
HG26	TGRIGGGIVGPNGGDMIGE VRHLAANGIKYPEPELD
HG27	TGRIGGGIVGPNGGDMIGE RCQYRDLKWE
HG28	GGLIVVE
HG29	GGLIVVE TGRIGGGIVGPNGGDMIGE YRFDNIMVNTKTVAVEPKED
HG30	AIGDIVGQPMLAHKAVHE AIGDIVGQPMLAHKAVHE
HG31	ALDKYACNCVVG YIGE ALDKYACNCVVG YIGE
HG32	ARVIPGVAYTSPE LDIDMLRAY MDVPAEVAGV VKE
HG33	TGRIGGGIVGPNGGDMIGE ALDKYACNCVVG YIGE GYCLHDGVCMYIE RCQYRDLKWE
HG34	NCAGHKAYFDARVIPGVAYTSPE
HG35	GANAPKEPQRYDAVLVAAGRAPNGKLISAE
HG36	GANAPKEPQRYDAVLVAAGRAPNGKLISAE NCAGHKAYFDARVIPGVAYTSPE VIDEVRHLAANGIKYPE
HG37	MGTVYSTLGSRLDVE
HG38	IIGGGIIGLE MDVPAEVAGV VKEVK NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIE
HG39	VVVLGGGPGGYSAAF AADE
HG40	MGTVYSTLGSRLDVE
HG41	LKVDPDIGGHENVDIIAVE

波峰	肽
HG42	RCQYRDLKWWEL
HG43	VDKQMRTNVPHIYAIGDIVGQPMLAHKAVHE ASGRAIANGCDNGFTKLIFDAE
HG44	VDKQMRTNVPHIYAIGDIVGQPMLAHKAVHE
HG47	YRFDNIMVNTKTVAVEPKEDGVYVTFE AIANGCDNGFTKLIFDAE
HG48	RYKTLGGVCLNVGCIPSKALLHNAVIDE
HG49	VNVGDTIAVDDTLITLD RYKTLGGVCLNVGCIPSKALLHNAVIDE YRFDNIMVNTKTVAVEPKEDGVYVTFE IVGQPMLAHKAVHEGHVAAENCAGHKAYFD NGFTKLIFDAETGRIIGGGIVGPNGGDMIGE
HG50	TGRIIGGGIVGPNGGDMIGEVCIAIEMGCD
HG51	RCQYRDLKWWEL

表 3：以內切蛋白酶 Glu-C 消化共軛份 EGF-P64K 之後所製備之主要肽之胺基酸組成。胺基酸組成係由 MALDI 及 ESI-MS 測定。

實施例 2：本發明所述之疫苗組成物之免疫原性

此實施例描述為評估先前描述之疫苗組成物（疫苗組成物 A）相較於 EP 0657 175 描述之疫苗組成物（稱為疫苗組成物 B）之免疫原性所進行之生物活性分析。

要進行此項分析，以 200 微升獨特劑量之免疫原（以透析製備之傳統疫苗組成物、以超過濾膜純化製備之疫苗組成物及其中存有共軛物種 hrEGF-hrEGF 之以 UF/DF 純化方法製備之滲透物）之水在油中乳劑（50/50%體積/體

積) 與孟特耐 ISA 51 佐劑接種 10 隻小鼠。每種免疫原之蛋白質施用劑量係顯示於表 4。

在接種 14 天後，抽取動物之血清並利用 ELISA 方法測定抗 EGF 之抗體力價。該分析之陽性標準係在 405 奈米處測得之光學密度必須高於空白組所得之平均值的二倍。空白組係在槽中添加終止緩衝液以取代血清。資料之分析係利用統計程式進行曼-惠特尼 (Mann-Whitney) 檢驗。

免疫原	蛋白質濃度(羅利法)
疫苗組成物 A	1.5 mg/mL
疫苗組成物 B	1.5 mg/mL
以 UF/DF 純化疫苗組成物 A 時所得之同型聚合共軛物 hrEGF 及游離型 hrEGF	0.6 mg/mL

表 4：生物活性分析中受評估之免疫原及所欲接種至動物之蛋白質濃度

在圖 6 中，生物活性分析之結果係顯示為每個受評估之免疫原之免疫原活性之證據。對應同型聚合 hrEGF 共軛物及游離型 hrEGF 之免疫原的成份並未顯示相關之生物活性，因為它們的反應係在該測試之陽性標準水準或更低。這些結果證實 EGF 本身並不誘發免疫反應之假設。

將所有結果應用於「曼-惠特尼檢驗」之統計分析時顯示(表 5)，接種疫苗組成物 A 之動物組相較於接種疫苗組成物 B 之動物的抗 hrEGF 抗體力價具有高度顯著差異性，在 1/1000 稀釋時 $p=0.0004$ 及 1/100 稀釋時 $p=0.0006$ 。這表示以超過濾膜方式純化之疫苗組成物 A 之每毫克蛋

白質相較於以透析膜純化製備之疫苗組成物 B 具有較高之免疫原活性。

相較於以聚合型 hrEGF 共軛物及游離型 hrEGF 免疫時所達到之抗體濃度，疫苗組成物 A 產生之抗 EGF（1/1000 稀釋）抗體濃度增加 10 倍。當與先前 EP 0657175 所描述之疫苗組成物比較時，本發明之疫苗組成物令抗 rhEGF 抗體濃度增加二倍。

小鼠抗 hrEGF 抗體力價統計分析（稀釋 1/1000）			
曼-惠特尼檢驗及信賴區間：G1 1/1000; G3 1/1000			
		N	中位數
G1（疫苗組成物 B）	1/1000	20	0.4300
G3（疫苗組成物 A）	1/1000	20	0.7120
ETA1-ETA2 之點估計值係-0.3115			
ETA1-ETA2 之 95.0%信賴區間係（-0.4500; -0.1790）			
W=278.0			
ETA1=ETA2 與 ETA1≠ETA2 之檢定在 0.0004 時具顯著意義			
檢定在 0.0004 時具顯著意義（調整同等級）			
小鼠抗 hrEGF 抗體力價統計分析（稀釋 1/100）			
曼-惠特尼檢驗及信賴區間：G1 1/100; G3 1/100			
		N	中位數
G1（慣用方法製備之疫苗組成物）	1/100	20	1.0785
G3（經超過濾製備之疫苗組成物）	1/100	20	1.3040
ETA1-ETA2 之點估計值係-0.2590			
ETA1-ETA2 之 95.0%信賴區間係（-0.4389; -0.1149）			
W=282.5			
ETA1=ETA2 與 ETA1≠ETA2 之檢定在 0.0006 時具顯著意義			
檢定在 0.0006 時具顯著意義（調整同等級）			

表 5：統計報告：透過小鼠抗 hrEGF 抗體力價評估二種疫苗組成物之免疫原性之曼－惠特尼檢定

實施例 3：評估本發明所揭示之疫苗組成物在治療表皮來源之肺腫瘤之臨床療效

此實施例之目的係評估疫苗組成物 A 相較於以透析膜法純化製備之疫苗組成物 B 在病患所誘發之免疫原性。

在此試驗中，具有末期非小細胞肺癌（NSCLC）腫瘤之病患接受治療。定義二組病患（接受製劑 B 免疫之病患及接受本發明所描述之製劑 A 免疫之病患）。各組中每位病患接受之疫苗組成物劑量如下：以製劑 B 免疫之病患每個免疫部位接受 1.2 毫克之總蛋白質，以製劑 A 免疫之病患每個免疫部位接受 0.6 毫克之總蛋白質。二組之免疫部位皆為 4 個。所有病患在試驗開始前接受至少 4 週之腫瘤特異性治療。免疫係經肌肉內途徑進行，每月持續免疫。透過二組病患之血清評估他們的體液免疫反應。結果評估之主要變項係特異性抗 EGF 抗體力價。此參數係透過 ELISA 測定。陽性數值係該些光學密度讀數高於陰性對照組 2 倍者。報告之抗體力價係陽性血清之最高稀釋倍數。

表 6 為各組病患的免疫反應分析，其顯示以製劑 A 治療之病患組別的最高抗體力價之幾何平均值為 1：56421，而以製劑 B 免疫之病患組別為 1：23515。這表示本發明描述之疫苗組成物所誘發之最高抗體力價之幾何平均值係為製劑 B 達成力價之二倍。

過去的資料顯示，未經免疫之病患顯示 1：500 之抗自體 EGF 抗體力價。因此本發明描述之疫苗組成物（疫苗

組成物 A) 在未經免疫之病患中造成抗 EGF 抗體力價增加至少 100 倍。

	病患總人數	幾何平均值
疫苗組成物 A	11	56421
疫苗組成物 B	9	23515

表 6：二種疫苗組成物之免疫原性透過測量病患血清中之抗 EGF 抗體力價之幾何平均值之分析結果。

重要的是強調以本發明所描述之疫苗組成物 A 免疫之病患組別顯示較高之抗 EGF 抗體力價幾何平均值，他們每次免疫所接受之蛋白質總量（2.4 毫克）是疫苗組成物 B 免疫病患組別（4.8 毫克之總蛋白質）之一半，這個結果令人意外。這些結果證實過多之自體蛋白質 hrEGF，不論是聚合或游離形式，皆無法導致疫苗組成物更高之免疫原性，反而會稀釋化學共軛物 hrEGF-rP64K 之免疫作用。

實施例 4：製備不同強度之疫苗組成物（每瓶中總蛋白質之濃度）

爲了證實具有製備不同強度（每瓶中總蛋白質濃度）疫苗組成物之能力，進行下述之純化方法：

試驗 1：當進行滲濾時，經純化之化學共軛物被濃縮至蛋白質終濃度 2 毫克/毫升。

試驗 2：當進行滲濾時，經純化之化學共軛物被濃縮至蛋白質終濃度 5 毫克/毫升。

試驗 3：當進行滲濾時，經純化之化學共軛物被濃縮

至蛋白質終濃度 12 毫克/毫升。

在所有試驗中，所使用之化學共軛物的總體積係 1500 毫升，滲濾時之操作條件為透膜壓力 1.5 巴及更換 7 次終止溶液。為了進行此項評估，建立二項選擇標準：

第一項是疫苗組成物之均質性百分比達到 > 80%。第二項標準是在純化操作過程中不存在沉澱之蛋白質。

表 7 的結果顯示，調整為每毫升不同蛋白質濃度之疫苗組成物具有高度均質性（90.92%、96.79%及 95.50%之共軛物種 hrEGFrP64K）且不產生蛋白質沉澱。

蛋白質濃度	疫苗組成物之均質性百分比
2 毫克/毫升	92.00%
5 毫克/毫升	96.79%
12 毫克/毫升	95.50%

表 7：調整為不同蛋白質終濃度之疫苗組成物之均質性百分比值

實施例 5：自本發明之疫苗組成物中移除戊二醛

要評估共軛劑（戊二醛）之移除，使用反相層析分離法（HPLC-RP），以 C-8 管柱定量疫苗組成物 B 及疫苗組成物 A 中殘留之戊二醛含量。

此方法首先需要將樣本中包含之蛋白質以過氯酸沉澱，接著與苯肼（phenylhydrazine）反應。

圖 7 顯示此雜質在二種疫苗組成物中之殘留量皆小於 0.2 微克/毫升或小於 0.002 ppm（此雜質之規定最高濃度限制），其初濃度係 530 毫克/毫升或 530 ppm。即使二種

製劑皆達到此雜質之規定規格，圖 7 顯示疫苗組成物 A（以超過濾法純化化學共軛物製備）含有較少之戊二醛，這表示病患使用此疫苗組成物時具有較高的安全性。

【圖式簡單說明】

圖 1，同型寡聚共軛物 rP64K-rP64K 之層析圖與未經純化之化學共軛物 EGF-P64K 之層析圖重疊。圓圈處顯示二個層析圖之間相同的部份。X 軸代表到樣本中各成分被溶析出之時間，Y 軸代表樣本中各成分在 216 奈米波長處之強度值，其顯示蛋白質之濃度。

圖 2，經超過濾製備之疫苗組成物在以 SDS-PAGE 電泳分離後，使用與鹼性磷酸共軛之抗 EGF 抗體進行免疫偵測。第一行：分子量標記，第二行：疫苗組成物。

圖 3，同型寡聚共軛物 hrEGF-hrEGF 之層析圖與未經純化之化學共軛物 hrEGF-rP64K 之層析圖重疊。圓圈處顯示二層析圖之間相同的部份。X 軸代表各成分之溶析時間，Y 軸代表樣本中各成分在 216 奈米波長處之強度值，其顯示蛋白質之濃度。

圖 4，本發明所揭示之疫苗的層析圖。陰影區域代表 hrEGF-rP64K 共軛物種。X 軸代表各部分之溶析時間，Y 軸代表樣本中各成分在 216 奈米波長處之強度值，其顯示蛋白質之濃度。

圖 5，共軛物 hrEGF-rP64K 之層析份的肽圖譜。這些是經超過濾膜分別純化之二個疫苗組成物的結果。X 軸代

表時間，Y 軸代表毫強度單位。

圖 6，經不同免疫原免疫之小鼠的抗 hrEGF 抗體力價：傳統疫苗組成物、經超過濾純化之疫苗組成物及經超過濾純化法得到之滲透物。X 軸代表來自各動物之血清稀釋倍數，Y 軸代表各樣本在 405 奈米波長處之光學密度值，其為蛋白質濃度之指標。

圖 7，經 50 千道爾頓超過濾膜純化製備之疫苗組成物（疫苗組成物 A）及經透析法純化之疫苗組成物（疫苗組成物 B）中之戊二醛殘留定量之 HPLC-RP 層析圖。

十、申請專利範圍

1. 一種疫苗組成物，其包含作為活性成分之人重組表皮生長因子(hrEGF)與 P64K 重組蛋白(rP64K)之蛋白質共軛物 hrEGF-rP64K，其中 rP64K 載體蛋白與 hrEGF 之共軛比例係 12.04：24.05 奈莫耳，總蛋白質之終濃度係介於 1-12 毫克/毫升，且該疫苗組成物係共軛物 hrEGF-rP64K 之均質性混合物，其包含至少 90%該活性成分且不含如 hrEGF 聚合物、游離 hrEGF 或戊二醛之其他分子物種。

2. 如申請專利範圍第 1 項之疫苗組成物，其中該共軛物 hrEGF-rP64K 之均質性混合物另含有選自氫氧化鋁或孟特耐(Montanide)之適當佐劑。

3. 如申請專利範圍第 2 項之疫苗組成物，其中該佐劑係孟特耐。

4. 如申請專利範圍第 1 項之疫苗組成物，其中該共軛物 hrEGF-rP64K 之均質性混合物可誘發人體血清中抗 EGF 抗體力價增加至少 10 倍。

5. 如申請專利範圍第 1 項之疫苗組成物，其中該共軛物 hrEGF-rP64K 之均質性混合物可誘發人體血清中抗 EGF 抗體力價增加至少 100 倍。

6. 一種製備如申請專利範圍第 1 項之疫苗組成物之方法，其包含共軛反應步驟，該步驟起始於共軛反應器中混合預先濃縮之 hrEGF 蛋白(> 6 毫克/毫升)和 P64K 蛋白(≥ 1 毫克/毫升)，隨後對該混合溶液加入 PBS/MgCl₂ (pH 6.8-7.2) 和 0.5%戊二醛，且令該混合物於 22°C $\pm$ 2°C 和連

續攪拌下經培養 2 小時。

7. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中蛋白 hrEGF 與 rP64K 之共軛參數係固定共軛比例為每個 P64K 分子共軛 2 個 hrEGF 分子。

8. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該共軛蛋白係藉由使用孔徑大小介於 50 至 100 千道爾頓之膜的超過濾/滲濾方法純化。

9. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該共軛蛋白係藉由使用孔徑大小為 50 千道爾頓之膜的超過濾/滲濾方法純化。

10. 如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該共軛蛋白係藉由使用孔徑大小為 100 千道爾頓之膜的超過濾/滲濾方法純化。

11. 一種如申請專利範圍第 1 項之疫苗組成物於製備試劑之用途，該試劑係用於誘發拮抗人 EGF 之免疫反應。

12. 一種如申請專利範圍第 6 項之方法所製備之疫苗組成物於製備試劑之用途，該試劑係用於誘發拮抗人 EGF 之免疫反應。

13. 一種如申請專利範圍第 1 項之疫苗組成物於製備試劑之用途，該試劑係用於治療表皮腫瘤。

14. 一種如申請專利範圍第 6 項之方法所製備之疫苗組成物於製備試劑之用途，該試劑係用於治療表皮腫瘤。

十一、圖式

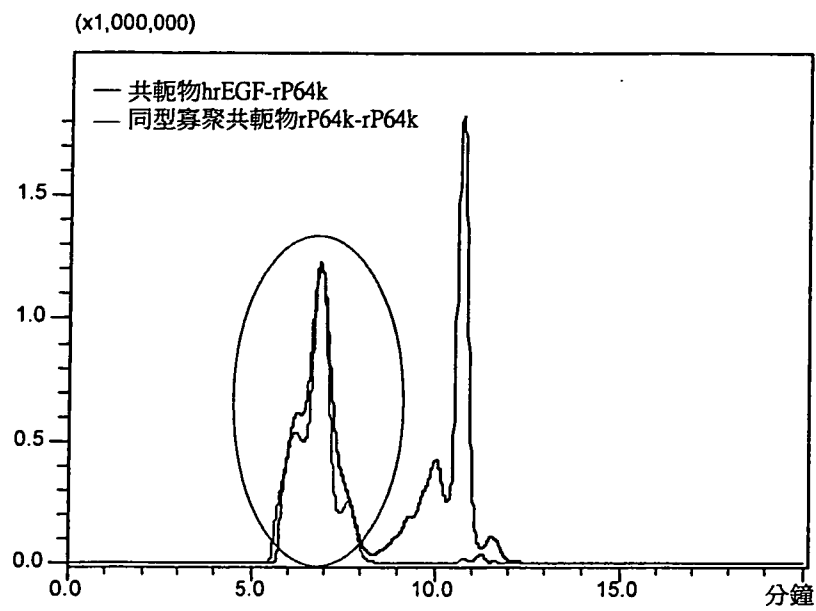


圖 1

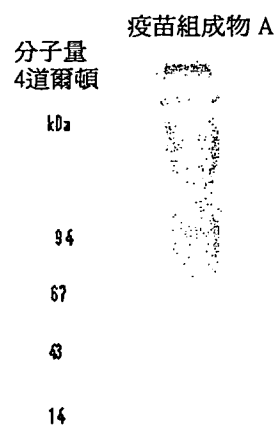


圖 2

102年3月25日修正替換頁

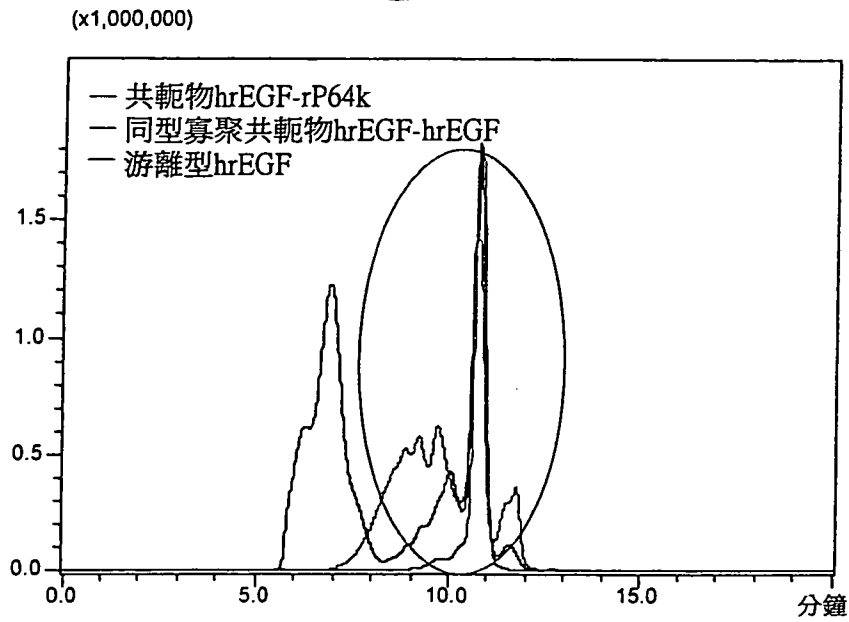


圖 3

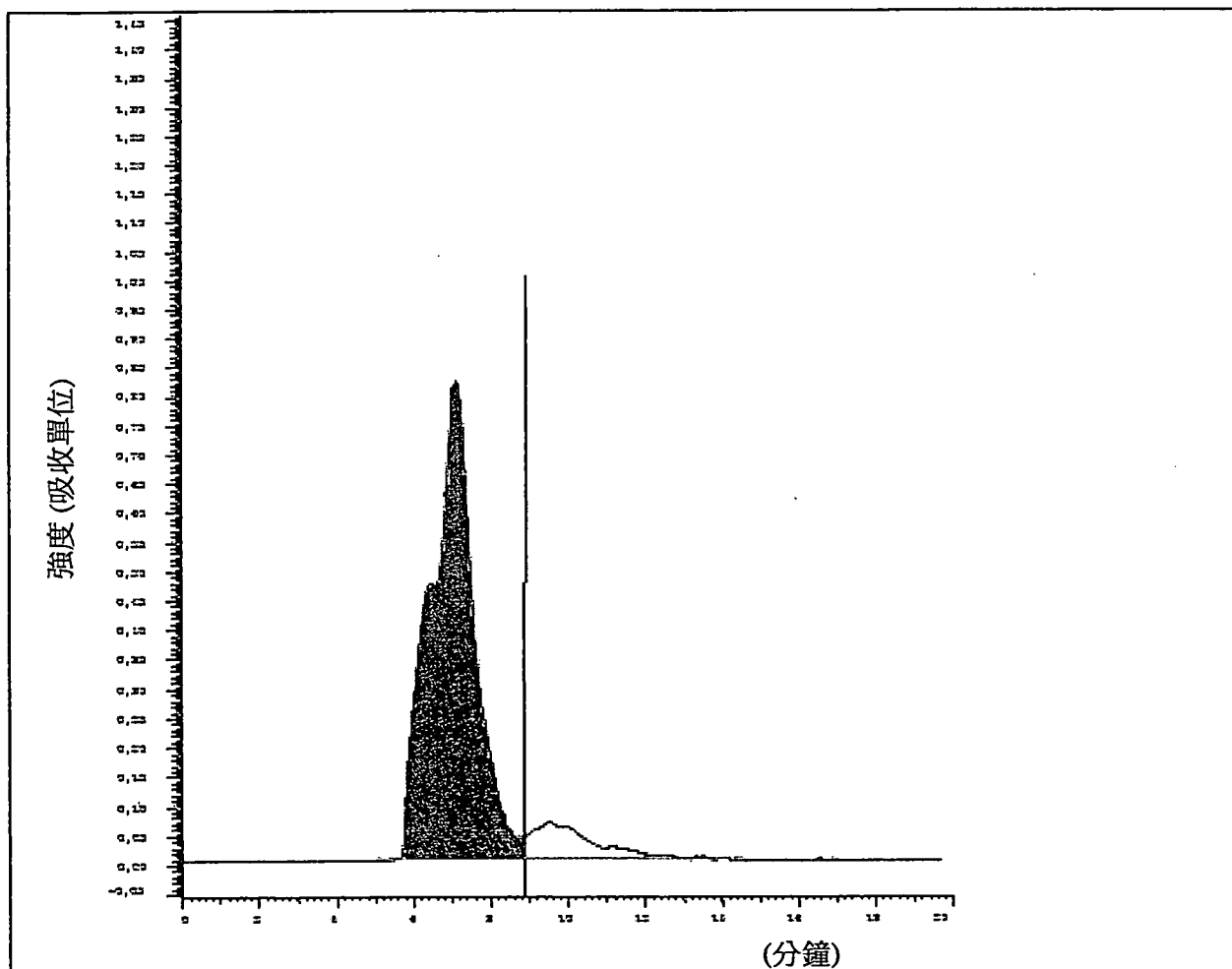


圖 4

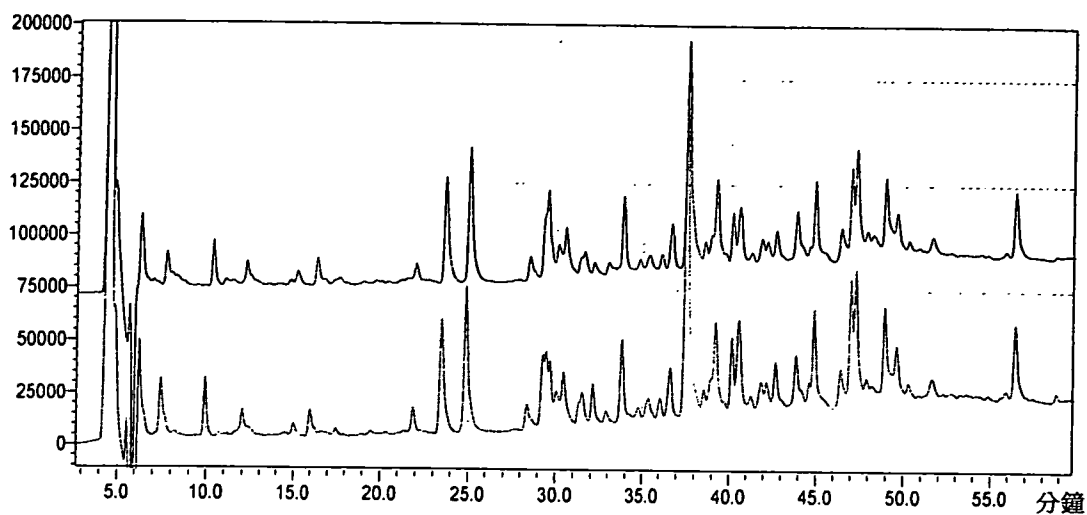


圖5

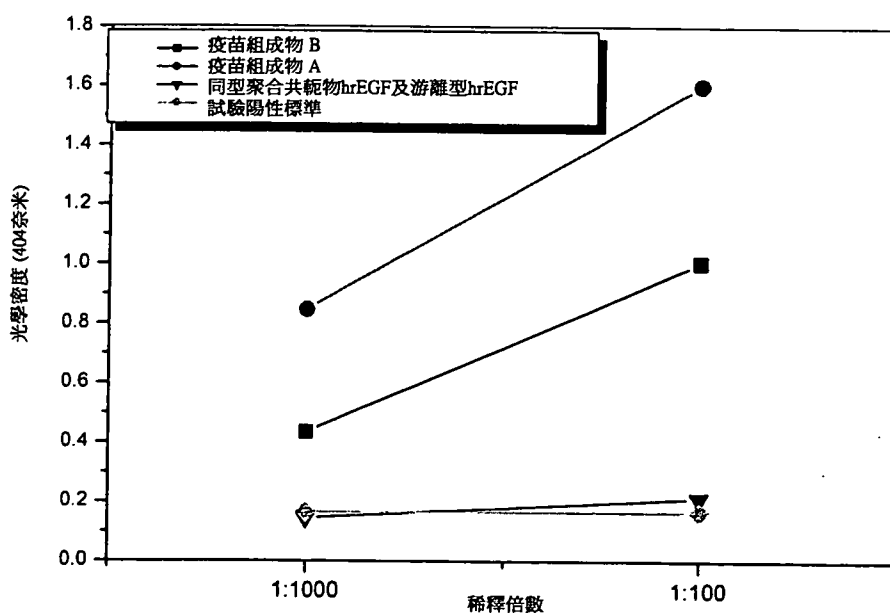


圖6

標準曲線：0-0.2-0.4-0.6-0.8-1 毫克/毫升戊二醛

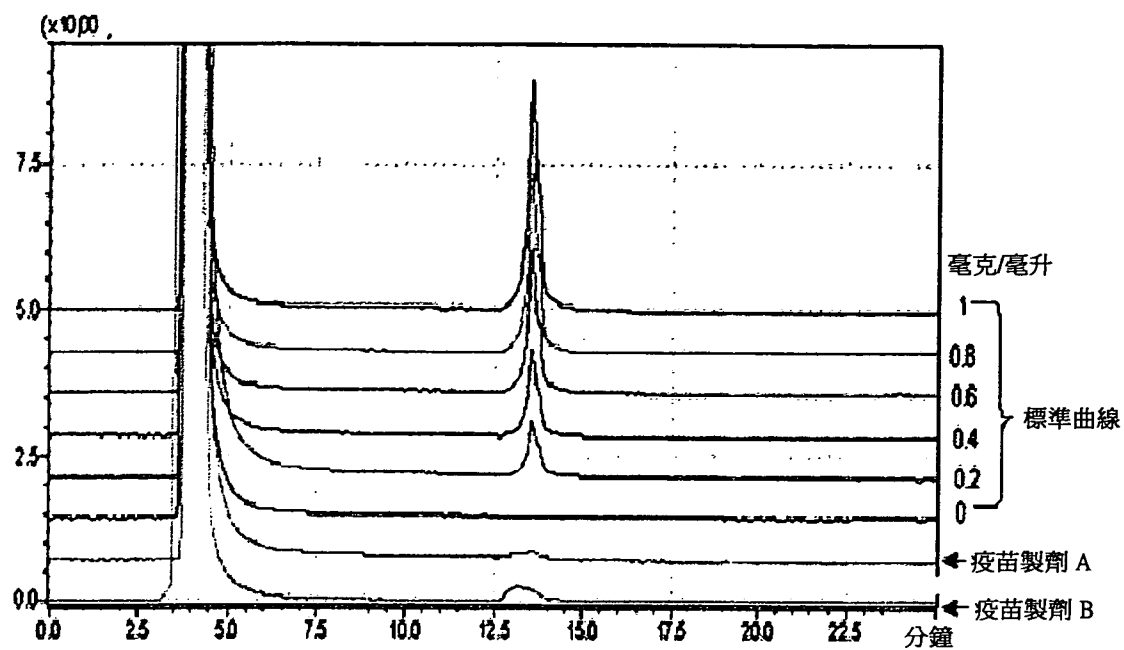


圖 7