



(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 I683668 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：107103648

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl. : A61K39/385 (2006.01)

A61K39/39 (2006.01)

(30)優先權：2014/12/10 美國

62/090,180

(71)申請人：華西亞生醫股份有限公司 (中華民國) VAXSIA BIOMEDICAL INC. (TW)

臺北市南港區園區街 3 號 17 樓

(72)發明人：甘銘中 KAN,MING-CHUNG (TW)

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：12 共 62 頁

(54)名稱

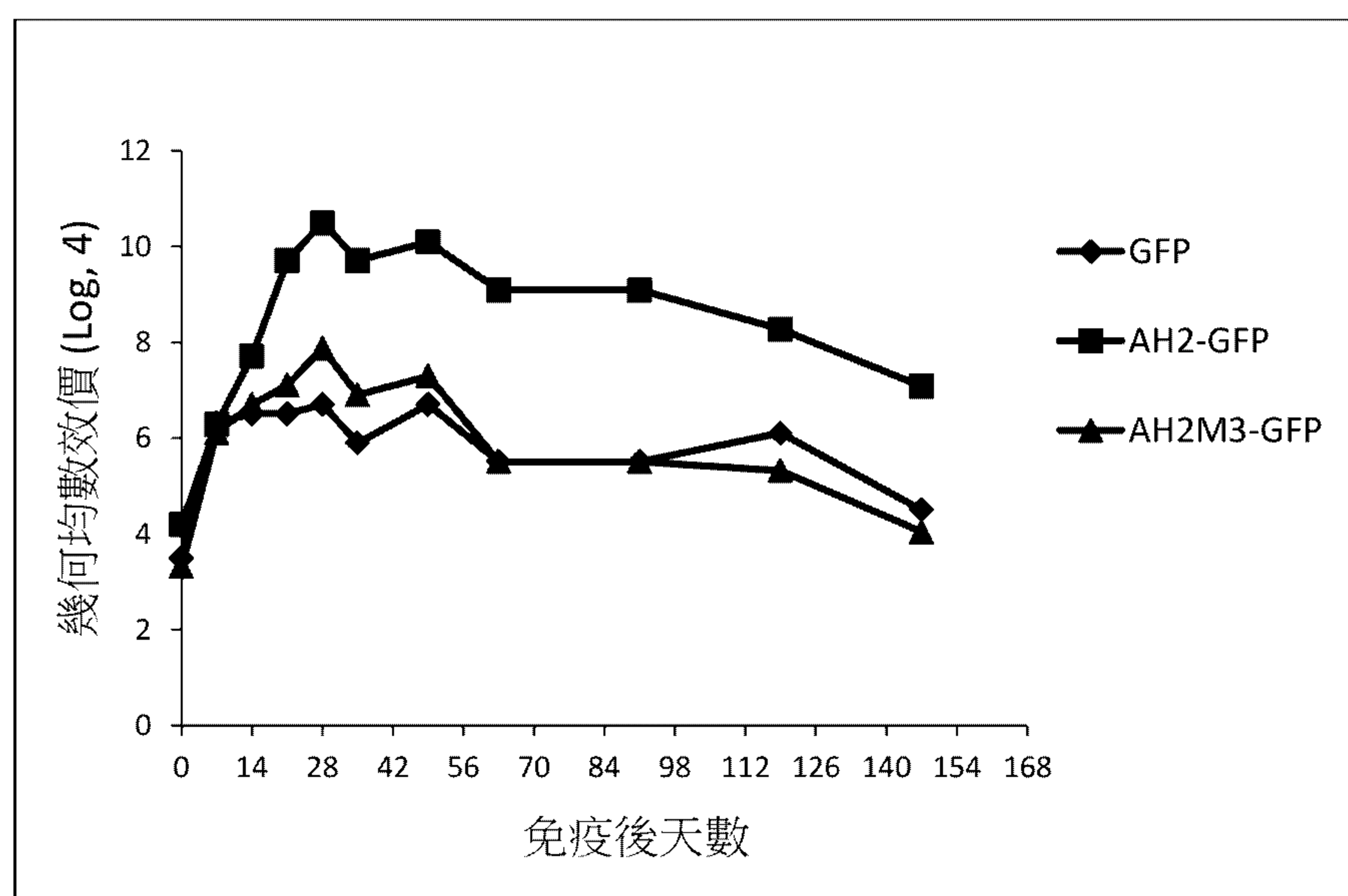
用於免疫作用中有效抗體生產的新穎蛋白質結構

(57)摘要

本發明提供一種增進免疫反應的方法，其包含將兩親性螺旋胜肽共價接合至抗原以形成抗原複合體組合物；以及給予抗原複合體組合物予受試者。此外，本發明亦提供有著兩親性螺旋結構的新穎抗原複合物，其增進抗原遞送的能力。

A method of enhancing immune response is provided, including covalent linking an amphipathic peptide to an antigen to form an antigen-complex composition; and administering the antigen-complex to a subject. In addition, a novel antigen-complex with amphipathic helical structure is provided as well, in which the ability of antigen delivery could be improved.

指定代表圖：



第3圖



I683668

【發明摘要】

公告本

【中文發明名稱】用於免疫作用中有效抗體生產的新穎蛋白質結構

【英文發明名稱】NOVEL PROTEIN STRUCTURE USED IN IMMUNIZATION

FOR EFFICIENTLY ANTIBODY PRODUCTION

【中文】

本發明提供一種增進免疫反應的方法，其包含將兩親性螺旋胜肽共價接合至抗原以形成抗原複合體組合物；以及給予抗原複合體組合物予受試者。此外，本發明亦提供有著兩親性螺旋結構的新穎抗原複合物，其增進抗原遞送的能力。

【英文】

A method of enhancing immune response is provided, including covalent linking an amphipathic peptide to an antigen to form an antigen-complex composition; and administering the antigen-complex to a subject. In addition, a novel antigen-complex with amphipathic helical structure is provided as well, in which the ability of antigen delivery could be improved.

【指定代表圖】 第3圖

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於免疫作用中有效抗體生產的新穎蛋白質結構

【英文發明名稱】 NOVEL PROTEIN STRUCTURE USED IN IMMUNIZATION
FOR EFFICIENTLY ANTIBODY PRODUCTION

【技術領域】

【0001】 相關申請案的交互參照

【0002】 本申請案聲明於2014年12月10日遞交申請的美國臨時專利申請案號62/090,180的優先權，其全部的揭露內容併入本文中作為參考。

【0003】 本發明的示範性實施例相關於一種增進免疫反應的方法。特別是，本發明的示範性實施例相關於一種藉由使用有著兩親性螺旋結構的抗原複合物用於增進免疫反應的方法。

【先前技術】

【0004】 隨著在微生物傳染機制的持續研究，與感染力有關的許多微生物分子，已經被鑒定出來並且被認為是具潛力的候選疫苗。這些候選疫苗囊括多種分子類型，包含來自病原微生物的胜肽、蛋白質、醣蛋白、以及多醣類。然而，當藉由合成或純化所產生的這些候選疫苗因為缺乏抗原性，使這些候選疫苗無法成為有用的疫苗。

【0005】 因此，目前有一些已知的方法可以增進這些候選疫苗的抗原性，其中包含在疫苗製劑中添加佐劑，或是藉由融合這些候選疫苗到一免疫原以增加這些候選疫苗的抗原性等等。然而，佐劑通常誘發會造成注射位置腫脹和疼

痛的先天性免疫反應。此外，因為在族群中對特定佐劑成分的反應的差異性會導致接種疫苗後的不同效果，或是因為添加高劑量的佐劑而造成嚴重不良事件。

【0006】 多種免疫原已經被發展使用於與潛在的候選疫苗融合以增加其抗原性。舉例來說，乙型肝炎核心抗原(Hepatitis B core antigen, HBcAg)、百日咳毒素(Pertussis toxin) CyaA、以及來自大腸桿菌的外毒素已經被用來透過不同的機制以增加所接合之蛋白的抗原性。然而，由於這些免疫原的質量較大，異源蛋白的插入或融合通常會干擾融合蛋白的正確折疊。雖然異常折疊的蛋白質可以經由數個程序重新折疊，但是卻會增加生產成本。因此，目前高度需要一種能夠提高融合蛋白的抗原性同時不會干擾蛋白質折疊的小胜肽。

【0007】 另一方面，在特異性免疫反應中，效應T細胞反應對於記憶T細胞以及記憶B細胞的建立很重要。效應T細胞反應的一種是2型輔助T細胞，在其中初始(naïve)T細胞是藉由接合在抗原呈現細胞上的MHC II類分子上的T細胞表位所刺激。這些表位是衍生自胞內體(endosome)途徑處理的抗原，其中該表位與MHC II類分子接合且輸出到細胞表面。如此在抗原呈現細胞中抗原到胞內體途徑的遞送是用於刺激2型輔助T細胞反應(或Th2反應)的必要程序。Th2反應的特徵在於增進IgG型切換至IgG1副型。另一方面，Th1反應增進IgG型切換至IgG2a及IgG3。如此IgG1效價與IgG2q/IgG3效價之間的比值可作為藉由特定免疫原誘發的效應T細胞反應的類型的替代標記。

【發明內容】

【0008】 本發明提供一種增進免疫反應的方法，其包含：結合兩親性胜肽與抗原以形成抗原複合物組合物；以及將抗原複合物組合物給予受試者。

【0009】 在一個實施例中，本發明提供增進免疫反應的方法，其中兩親性胜肽可涵蓋範圍從4至45個胺基酸。

【0010】 在一個實施例中，本發明提供所述增進免疫反應的方法，其中所述兩親性胜肽可包含SEQ ID NO: 1的胺基酸序列、SEQ ID NO: 2的胺基酸序列、或SEQ ID NO: 3的胺基酸序列。

【0011】 在另一個實施例中，本發明提供增進免疫反應的方法，其中兩親性胜肽包含含有 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序的胺基酸序列，其中， A_1 、 A_2 、 A_3 及 A_4 是每個個別地選自由精胺酸(R)及離胺酸(K)所組成的群組； B_1 是選自由離胺酸(K)、精胺酸(R)、異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組； B_2 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)、纈胺酸(V)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、及色胺酸(W)所組成的群組； B_3 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組； B_4 是選自由苯丙胺酸(F)、色胺酸(W)及酪胺酸(Y)所組成的群組；以及 B_5 是選自由苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)、蘇胺酸(T)、半胱胺酸(C)及絲胺酸(S)組成的群組。

【0012】 在另一個實施例中，本發明提供增進免疫反應的方法，其中兩親性胜肽可包含SEQ ID NO: 4的胺基酸序列、SEQ ID NO: 5的胺基酸序列、SEQ ID NO: 6的胺基酸序列、SEQ ID NO: 7的胺基酸序列、SEQ ID NO: 8的胺基酸序列、SEQ ID NO: 9的胺基酸序列、SEQ ID NO: 10的胺基酸序列或SEQ ID NO: 11的胺基酸序列。

【0013】 在另一個實施例中，本發明提供增進免疫反應的方法，其中抗原可為選自由A型流感病毒(Type A of Influenza virus)、B型流感病毒(Type B of Influenza virus)、C型流感病毒(Type C of Influenza virus)、登革病毒(Dengue

virus)、人類乳突病毒(Human papillomavirus)、甲型肝炎病毒(Hepatitis A virus)、乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus)、丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus)、水痘帶狀疱疹病毒(Varicella Zoster virus)、巨細胞病毒(Cytomegalovirus)、埃博拉病毒(Ebola virus)、B型流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae* type b)、幽門螺桿菌(*Helicobacter pylori*)、單純性疱疹病毒1及2型(Herpes simplex virus 1 and 2)、瘧原蟲物種(*Plasmodium* species)、麻疹病毒(Measles virus)、中東呼吸綜合症冠狀病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus)、腮腺炎病毒(Mumps virus)、百日咳博德特氏桿菌(*Bordetella pertussis*)、小兒麻痺病毒(Poliovirus)、狂犬病病毒(Rabies virus)、呼吸道合胞體病毒(Respiratory syncytial virus)、輪狀病毒(Rotavirus)、風疹病毒(Rubella virus)、嚴重急性呼吸綜合症冠狀病毒(SARS coronavirus)、破傷風桿菌(*Clostridium tetani*)、結核桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、西尼羅河病毒(West Nile virus)、肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、艱難梭菌(*Clostridium difficile*)、腦膜炎球菌(*Neisseria meningitidis*)以及沙門氏桿菌(*Salmonella enterica* subsp. *enterica*)所組成的群組的病原體的一部份。

【0014】 在另一個實施例中，本發明提供增進免疫反應的方法，其中抗原可選自由寡醣、多肽、蛋白質、多醣、胜肽及其組合所組成的群組。

【0015】 在另一個實施例中，本發明提供增進免疫反應的方法，其中受試者可為溫血動物。

【0016】 本發明提供一種抗原複合物組合物，其包含： $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序；第一胜肽，接合至 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序的N-端；第二胜肽，接合至 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序的C-端；抗原，共價接合至第一

胜肽或第二胜肽，其中： A_1 、 A_2 、 A_3 及 A_4 是每個個別地選自由精胺酸(R)及離胺酸(K)所組成的群組； B_1 是選自由離胺酸(K)、精胺酸(R)、異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組； B_2 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)、纈胺酸(V)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、及色胺酸(W)所組成的群組； B_3 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組； B_4 是選自由苯丙胺酸(F)、色胺酸(W)及酪胺酸(Y)所組成的群組；以及 B_5 是選自由苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)、蘇胺酸(T)、半胱胺酸(C)及絲胺酸(S)組成的群組；且 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序、第一胜肽以及第二胜肽形成兩親性螺旋二級結構。

【0017】 在另一個實施例中，本發明提供抗原複合物組合物，其中第一胜肽可範圍涵蓋從0至20個胺基酸，且第二胜肽可範圍涵蓋從0至20個胺基酸。

【0018】 在另一個實施例中，本發明提供抗原複合物組合物，其中抗原是選自由寡醣、多肽、蛋白質、多醣、胜肽以及其組合所組成的群組。

【0019】 本發明提供一種增進抗原遞送的方法，其包含：給予抗原複合物組合物予受試者，其中抗原複合物組合物包含： $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序；第一胜肽，接合至 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序的N-端；第二胜肽，接合至 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序的C-端；抗原，共價接合至第一胜肽或第二胜肽，其中： A_1 、 A_2 、 A_3 及 A_4 是每個個別地選自由精胺酸(R)及離胺酸(K)所組成的群組； B_1 是選自由離胺酸(K)、精胺酸(R)、異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組； B_2 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)、纈胺酸(V)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、及色胺酸(W)所組成的群組； B_3 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組； B_4 是選自由苯丙胺酸(F)、色胺酸(W)及酪胺酸(Y)所組成的群組；以及 B_5 是選自由苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)、蘇胺酸(T)、半胱胺

酸(C)及絲胺酸(S)組成的群組；且 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序、第一胜肽以及所述第二胜肽形成兩親性螺旋二級結構。

【0020】 在一實施例中，本發明提供增進抗原遞送的方法，其中第一胜肽可範圍涵蓋從0至20個胺基酸，且第二胜肽可範圍涵蓋從0至20個胺基酸。

【0021】 在一實施例中，本發明提供增進抗原遞送的方法，其中抗原是選自由寡醣、多肽、蛋白質、多醣、胜肽及其組合所組成的群組。

【0022】 本發明提供一種兩親性胜肽，其包含：SEQ ID NO: 1的胺基酸序列、SEQ ID NO: 2的胺基酸序列、SEQ ID NO: 3的胺基酸序列、SEQ ID NO: 4的胺基酸序列、SEQ ID NO: 5的胺基酸序列、SEQ ID NO: 6的胺基酸序列、SEQ ID NO: 7的胺基酸序列、SEQ ID NO: 8的胺基酸序列、SEQ ID NO: 9的胺基酸序列、SEQ ID NO: 10的胺基酸序列或SEQ ID NO: 11的胺基酸序列。

【0023】 有著這些與其他目的，本發明的優點及特徵可在下文中變得顯而易見，本發明的性質可藉由參考本發明的詳細描述、實施例以及參考本文的幾幅附圖而更清楚地被理解。

【圖式簡單說明】

【0024】 本發明的示範性實施例將從下述詳細描述以及本發明的多個實施例的附圖更全面地理解，然而本發明的實施例的描述以及附圖不應當被作為本發明對特定實施例的限制，而是僅用於解釋和理解。

【0025】 第1A圖顯示純化的His-GFP、AH1-GFP及AH2-GFP蛋白質的SDS-PAGE以及考馬斯藍染色(coomassie blue staining)結果。

【0026】 第1B圖顯示來自當藉由酶聯免疫吸附測定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)測定，來自被His-GFP、AH1-GFP或AH2-GFP使免疫的小鼠血清製品的抗-GFP IgG效價的結果。使用His-GFP、AH1-GFP或AH2-GFP融合蛋白任一的50 μ g的蛋白質，在連同完全弗氏佐劑(complete Freund's adjuvant)乳化後(第0天)或是與不完全弗氏佐劑(incomplete Freund's adjuvant)乳化後(第14、28及42天)透過腹膜腔注射以使小鼠免疫。促升劑量7日後收集血清(第21天、35及49天)，N=5。

【0027】 第2A圖顯示來自藉由接種在完全弗氏佐劑中乳化的20 μ g的His-GFP或AH2-GFP蛋白後，測量免疫小鼠的血清製品中抗-GFP IgG效價的結果。這些小鼠在第0天透過腹膜腔注射抗原且在第7、14、21、28及35天收集血清用於酶聯免疫吸附測定。幾何均數效價以Log4顯示(N=5)。

【0028】 第2B圖顯示來自藉由接種在不完全弗氏佐劑中乳化的每個20 μ g的His-GFP或AH2-GFP蛋白後，測量免疫小鼠的血清製品中抗-GFP IgG效價的結果。這些小鼠在第0天透過腹膜腔注射抗原且在第7、14、21、28及35天收集血清用於酶聯免疫吸附測定。幾何均數效價以Log4顯示(N=5)。

【0029】 第2C圖顯示來自藉由與10 μ g的TLR5配體，鞭毛蛋白，一起注射的每個20 μ g的His-GFP或AH2-GFP蛋白後，測量免疫小鼠的血清製品中抗-GFP IgG效價的結果。這些小鼠在第0天透過腹膜腔注射且在第7、14、21、28及35天收集血清用於酶聯免疫吸附測定。幾何均數效價以Log4顯示(N=5)。

【0030】 第2D圖顯示來自僅注射20 μ g的His-GFP或AH2-GFP蛋白後，測量免疫小鼠的血清製品中抗-GFP IgG效價的結果。這些小鼠在第0天透過腹膜腔

注射且在第7、14、21、28及35天收集血清用於酶聯免疫吸附測定。幾何均數效價以Log4顯示(N=5)。

【0031】 第3圖顯示來自注射每個20 μg 的His-GFP、AH2-GFP或AH2M3-GFP蛋白後，測量免疫小鼠的血清製品中抗-GFP IgG效價的結果。小鼠在第0天及第14天透過肌內注射兩次。幾何均數效價以Log4顯示(N=5)。

【0032】 第4A圖顯示在小鼠血漿中IL-6表現量的測定結果。小鼠透過肌內注射被注以50 μg 的AH2-GFP、50 μg 的GFP、20 μl 的PBS、10 μg 的鞭毛蛋白或1 μg 鞭毛蛋白。注射後兩小時，進行麻醉然後以心臟穿刺法取出全血製備血漿。血漿中IL-6表現量是藉由與雙抗原夾心酶聯免疫吸附測定得到的標準曲線比較來定量(N=5)。

【0033】 第4B圖顯示在小鼠中血漿中MCP-1表現量的測定結果。小鼠透過肌內注射被注以50 μg 的AH2-GFP、50 μg 的GFP、20 μl 的PBS、10 μg 的鞭毛蛋白或1 μg 鞭毛蛋白。注射後兩小時，進行麻醉然後以心臟穿刺法取出全血製備血漿。血漿中MCP-1表現量是藉由與雙抗原夾心酶聯免疫吸附測定得到的標準曲線比較來定量 (N=5)。

【0034】 第4C圖顯示兩親性螺旋肽對細胞凋亡的效應的測定結果。生長在6孔盤上的MDCK細胞，在細胞收集之前，以10 μM 、30 μM 或100 μM 濃度的AH2、AH2M3或Udorn肽處理24小時，並以SYTOX AADvanced死細胞染色培養且藉由流式細胞儀分析。每個實驗組採3重複，計算並平均Sub-G1百分比。

【0035】 第5圖顯示來自藉由注射His-GFP、AH2-GFP、AH3-GFP或AH5-GFP融合蛋白後，測量免疫小鼠血清中的抗-GFP IgG效價的結果。這些小

鼠接受相隔兩週的兩次免疫注射，每次經由肌內注射20 μg 的各種融合蛋白質。使用第28天的抗-GFP IgG效價做比較。幾何均數效價以Log4顯示(N=5)。

【0036】 第6A圖顯示純化的MAGE-A3、AH2-MAGE-A3、m2eX5及AH2-m2eX5的SDS-PAGE以及考馬斯藍染色的結果。

【0037】 第6B圖顯示藉由加入AH2胜肽，對抗-MAGE-A3及抗-m2eX5 IgG效價的刺激作用。在第0天及第14天，將20 μg 的MAGE-A3、20 μg 的AH2-MAGE-A3、8 μg 的m2eX5或8 μg 的AH2-m2eX5融合蛋白藉由肌內注射使小鼠免疫。在第28天收集血清以測量針對MAGE-A3或m2eX5蛋白的IgG效價。幾何均數效價以Log4顯示(N=5)。

【0038】 第7A圖顯示抗-GFP IgG效價的折線圖。分別在第0天及第14天，將20 μg 的His-GFP、AH2-GFP、NSP1-GFP、GRK5-GFP、HAfp23-GFP以及AH1-GFP藉由肌內注射使小鼠免疫。將在第0、14及28天所收集的血清用於酶聯免疫吸附測定以偵測抗-GFP IgG效價。幾何均數效價以Log4顯示(N=5)。

【0039】 第7B圖顯示在初次免疫之後第28天的抗-GFP IgG效價的條形圖。在第0天及第14天，將20 μg 的每個His-GFP、AH2-GFP、NSP1-GFP、GRK5-GFP以及HAfp23-GFP藉由肌內注射使小鼠免疫。第28天血清的抗-GFP IgG效價被用於比較。幾何均數效價以Log4顯示(N=5)。

【0040】 第8A圖顯示與AH2胜肽融合的GFP蛋白質與細胞結合及內在化的結果。純化的His-GFP、AH1-GFP及AH2-GFP融合蛋白以200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的濃度與MDCK細胞一起培養於96-孔盤4小時，之後以200 μl 的PBS洗滌兩次。附接至細胞的GFP融合蛋白數量接著藉由螢光計來測定。來自4個分開的孔的螢光表現量被用於定量以及統計分析。

【0041】 第8B圖顯示藉由螢光顯微鏡的GFP融合蛋白的偵測的結果。與GFP融合蛋白一同培養4小時的細胞被洗滌且被使用於在螢光顯微鏡下偵測GFP融合蛋白。從GFP途徑獲得的圖像與DIC影像在相同的視野合併以顯示GFP信號的位置。

【0042】 第8C圖顯示使用共聚焦顯微鏡來觀察內在化的GFP融合蛋白的結果。用200 $\mu\text{g/ml}$ 濃度的AH2-GFP蛋白與培養的MDCK細胞一同培養4小時，接著使用共聚焦顯微鏡來偵測AH2-GFP融合蛋白在細胞內的定位。

【0043】 第8D圖顯示使用穿透式電子顯微鏡來偵測內在化的AH2胜肽的鑑定結果。與AH2胜肽共軛的10 nm尺寸的奈米金顆粒與10 μM 的AH2胜肽混合且與培養的MDCK細胞一同培養4小時，之後經固定且處理後，用在穿透式電子顯微鏡下觀察。藉由AH2胜肽形成的囊泡以"V"標記。比例尺為0.5 μm 。

【0044】 第8E圖顯示藉由穿透式電子顯微鏡下觀察到的AH2胜肽/脂質複合物。在穿透式電子顯微鏡下，可觀察到在藉由AH2胜肽形成的囊泡裏有個網格狀的結構，如箭頭所指。比例尺為0.5 μm 。

【0045】 第8F圖顯示箭頭指向藉由AH2胜肽、與奈米金顆粒共軛的AH2胜肽以及膜形成的網格狀結構被分泌至胞外。比例尺為0.5 μm 。

【0046】 第8G圖顯示箭頭指向藉由AH2胜肽、與奈米金顆粒共軛的AH2胜肽以及膜所形成的網格狀結構被圍封進多泡體(multiple vesicle body, MVB)結構中，成為胞內體系統的一部份。比例尺為0.5 μm 。

【0047】 第9A圖顯示以FITC示踪的合成的兩親性胜肽與細胞結合及內在化的結果。合成相應於來自不同A型流感病毒株的M2蛋白的兩親性螺旋部位的胜肽，且所述胜肽與培養的MDCK細胞一同培養4小時，之後洗滌並在螢光計中

偵測。SEQ ID NO: 4，來自H1N1。SEQ ID NO: 5，來自H5N1。AH4，胺基酸序列：DRLFFKCVYRLFKHGLKRG，來自H3N2。SEQ ID NO: 6是來自H7N9。每個數據是從4重複樣品定量(N=4)。

【0048】 第9B圖顯示GFP融合蛋白的細胞結合測定的結果。從來自塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)的Nsp1蛋白的第245-264個胺基酸殘基衍生的兩親性螺旋胜肽，Nsp1；從 G-蛋白偶聯受體激酶5(G-protein coupled protein kinase 5)的第546-565個胺基酸殘基衍生的兩親性螺旋胜肽，Grk5；血細胞凝集素(hemagglutinin)的融合髮夾胜肽(fusion hairpin peptide)衍生的兩親性螺旋胜肽，HAfp23，使用DNA重組工藝在pET28a載體中與GFP融合。GFP融合蛋白被基因表達且純化並且用以與培養的MDCK細胞一同培養4小時，之後洗滌並在螢光計中偵測。每個數據是從4重複樣品定量(N=4)。

【0049】 第10A圖顯示可提供細胞結合與內在化活性的胜肽序列的排比。來自Grk5、AH2、AH3、AH5、SWS-AH、TYLCV-AH、ANMV-AH、以及AHV-AH的胜肽序列已經被對齊以顯示RLFK/RLFFK基序。

【0050】 第10B圖顯示被用以細胞結合與內在化測定的相應的AH2、ANMV-AH、TYLCV-AH、SWS-AH以及AHV-AH序列的合成胜肽的傳輸結果。所有的胜肽以FITC螢光基團標記N-端。MDCK細胞以10 μ M的每個測試胜肽一同培養4小時，之後以PBS洗滌兩次並藉由螢光計偵測螢光。背景螢光使用PBS陰性對照減去。

【0051】 第11A圖顯示負載GFP融合蛋白的細胞的螢光表現量的衰敗。MDCK細胞以AH2-GFP、GRK5-GFP或SWS-GFP融合蛋白培養4小時，之後洗滌

並以0.4U的凝血酶溶解20分鐘。經凝血酶處理之後，細胞以PBS洗滌且藉由螢光計偵測(4小時)或繼續培養另外24小時，之後在洗滌並偵測(4+24小時) (N=4)。

【0052】 第11B圖顯示在培養基中分泌GFP融合蛋白的偵測。將從4+24小時組別細胞培養移除的培養基用於在螢光計中測量螢光表現量。來自類比的PBS控制組的培養基用於測定背景螢光。將每組的背景螢光扣除。

【0053】 第12A圖顯示抗-GFP IgG效價的測定。8周大的BALB/c小鼠在第0天及第14天以肌內注射每個20 μ g的His-GFP、AH2-GFP或AH1-GFP以使免疫。在初次免疫作用後第28天收集血清以測定整體抗-GFP IgG的效價 (N=5)。

【0054】 第12B圖顯示抗-GFP IgG亞型的效價。8周大的BALB/c小鼠在第0天及第14天肌內注射每個20 μ g的His-GFP、AH2-GFP或AH1-GFP以使免疫。在初次免疫作用後第28天收集血清以測定IgG亞型對GFP的效價。與山羊抗小鼠IgG1、山羊抗小鼠IgG2a、山羊抗小鼠IgG2b及山羊抗小鼠IgG3的第二抗體共軛的HRP被使用在酶聯免疫吸附測定中。

【0055】 第12C圖顯示藉由SWS-GFP融合蛋白誘導的抗-GFP IgG亞型效價的測定。BALB/c小鼠在大腿藉由肌內注射20 μ g的His-GFP或SWS-GFP來使免疫。在免疫作用後第14天收集血清以藉由酶聯免疫吸附測定測定抗-GFP IgG或IgG亞型。結果以Log4顯示 (N=5)。

【實施方式】

【0056】 在藉由使用有著兩親性螺旋胜肽結構的抗原複合物以增進免疫反應的方法的內文中，在這裏描述本發明的示範性實施例。

【0057】 那些本領域技術人員將理解的是遵照示範性實施例的詳細描述僅僅是說明性的且非意圖以任何方式限制。其他實施例將使它們讓本領域技術人員可立即想到本發明公開的效益。如附圖圖式所說明的，可參考示範性實施例的詳細實施方式。在通篇圖式中將使用相同的附圖標記且下列詳細的描述將參考相同或相似的部份。

【0058】 如本文所使用的，冠詞「一」指稱冠詞的受詞對象的一個或多個(即，至少一個)。作為示範，「一元件」意思為一個元件或多於一個元件。

【0059】 術語「受試者」可指具有免疫反應的脊椎動物或是被認為需要免疫反應的脊椎動物。受試者包括所有溫血動物，諸如哺乳類，像是靈長類。術語受試者包括馴養動物，諸如貓、狗等，家畜(舉例來說，牛、馬、豬、綿羊、山羊等)以及實驗動物(舉例來說，小鼠、兔、大鼠、沙鼠、豚鼠等)。如此，獸醫用途和醫藥製劑是本文所預期的。

【0060】 如本文所使用的，「抗原複合物」指由各種兩親性胜肽以及與宿主生物相容的外源性分子，像是綠色螢光蛋白(GFP)，所組成的重組蛋白質。外源性分子可選自由，舉例來說，但不限於，寡醣、多肽、蛋白質、多醣、胜肽及其組合所組成的群組。

【0061】 本發明使用的術語「兩親性螺旋結構」、「兩親性胜肽」、「兩親性分子」、或「兩親性螺旋體」表明分子，特別是含有胺基酸的胜肽，形成 α 螺旋並擁有疏水元素與親水元素兩者。兩親性胜肽包含從，舉例來說但不限於，病毒的基因組、來自蛋白偶聯受體激酶的短片段以及融合胜肽域所獲得的胺基酸序列。

【0062】 在相關的實施例中，兩親性胜肽包含，舉例來說，病毒的基因組、來自蛋白偶聯受體激酶的短片段以及融合胜肽域。示範性實施例的胜肽列表於表1。

表1，SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 11

SEQ ID No.	序列	來源
1	胺基酸序列： TRGLLGCIITSLTGR	丙型肝炎病毒分離 H77、NS3 蛋白質
2	胺基酸序列： GSTLYTESRKLLRSWHLPSV	塞姆利基森林病毒複製酶 nsP1 蛋白質。
3	胺基酸序列： GLFGAIAGFIEGGWTGMIDGWYG	血細胞凝集素的融合髮夾胜肽
4	胺基酸序列： DRLFSKSIYRIFKHGLKRG	A 型流感病毒株 (A/TW/3355/97(H1N1)) M2 (M2) 及 M1 (M1) 基因，完整的編碼 DNA 序列
5	胺基酸序列： DRLFFKCIYRRLKYGLKRG	A 型流感病毒株 H5N1
6	胺基酸序列： DRLFFKCIYRRFKYGLKRG	A 型流感病毒株 H7N9
7	胺基酸序列： PKKGLLQRLFKRQHQNNSKS	G-蛋白偶聯受體激酶 5 的第 546-565 個胺基酸殘基
8	胺基酸序列： KRLFKLSYIETRYMASDK	來自對蝦白斑綜合症病毒的 WSV445 蛋白質的第 8-25 個胺基酸殘基
9	胺基酸序列： MPRLFKIYAKNYFLTYPN	來自番茄黃化曲葉病毒的複製相關蛋白的第 1-18 個胺基酸殘基
10	胺基酸序列： RTLSLLRRLFFKSDLGFL	來自艾德琳疱疹病毒 3 (Ateline herpesvirus 3) 的可讀框 48 的第 33-50 個胺基酸殘基
11	胺基酸序列： MHSATAAQLETLRLFKFP	來自 ANMV-1 病毒的假定蛋白 (gb AJP62030.1) 的第 17-34 個胺基酸殘基

材料與方法

【0063】 首先，使用轉殖技術以獲得融合蛋白。接著，蛋白純化之後，使用多黏黏桿菌素樹脂(polymyxin resin)移除內毒素以獲得有內毒素表現量小於5 EU/mg的蛋白製品。注射這些純化的蛋白質進入小鼠以誘導免疫。進而，在蛋白質注射後第7、14、21、28及35天，分離小鼠血清用於藉由酶聯免疫吸附測定做抗體效價測定。以下描述每個步驟的詳細流程。

不含內毒素蛋白的表達與純化

【0064】 蛋白表達

【0065】 承載標的蛋白的pET28a載體使用熱休克轉型進入BL21 (DE3)細胞。熱休克轉型作用的流程如下。

【0066】 第一天3:00 pm，1 ng的質體與50 μ l的解凍勝任細胞(competent cell)，BL21(DE3)混合，且靜置冰上10分鐘，之後以42°C熱休克處理40秒。熱休克之後，混合物置於冰上1分鐘，隨後加入1ml的LB並接著在220 rpm中37°C下振動1小時。接著將細菌在13000 rpm旋轉離心1分鐘。細菌沉澱物在100 μ l的LB中被重新回溶且塗在有著100 μ g/ml的胺苄青黴素(ampicillin)的LB平皿上並在37 °C培養。

【0067】 第二天，10:00 am，在平皿上應該有少於100個菌落。挑選一個菌落並接種3 ml的LB/胺苄青黴素培養基並在37°C/225 rpm下培養。到am 12:00，將3 ml的培養物轉移到500 ml的LB/胺苄青黴素培養基且藉由分光光度計監控培養物的生長。當光密度OD600到達0.5-0.7，添加1mM的IPTG至所述培養物以誘

導蛋白表達。蛋白表達之後3小時收成培養物。細菌藉由5000 rpm離心10分鐘來旋轉濃縮。移除上清液且保留沉澱物用於後續流程。

【0068】 蛋白純化

【0069】 用於蛋白純化及凝膠過濾(gel filtration, GF)的緩衝液：20mM的NaPO₄，pH 7.4、300mM的NaCl (GF緩衝液)。至於Ni-NTA樹脂純化：用於細菌溶菌的5mM的咪唑於GF中(裂解緩衝液)、用於洗滌的10mM咪唑於GF中(洗滌液)、用於蛋白質洗脫的200mM的咪唑於GF中(洗脫緩衝液)。從500ml的LB培養物的細菌沉澱物藉由漩渦振蕩器被重新回溶在40 ml的裂解緩衝液中，接著使用超音波的超音波震盪器(Misonix 3000)以啟動10秒/關閉5秒循環5分鐘來震碎細菌。在音波震動處理的過程中需將重新回溶的細菌保持於冰水中。藉由使用Sorval SS34轉子於4°C以10000 rpm 離心10分鐘將不溶的殘渣移除。將含有標的蛋白的上清液流經含有來自德國凱杰(Qiagen)的2ml的Ni-NTA樹脂的聚丙烯柱。當標的蛋白結合至Ni-NTA樹脂之後，以10倍樹脂體積(20 ml)的洗滌液洗滌所述聚丙烯柱。洗滌之後，使用5ml的洗脫緩衝液洗脫標的蛋白。使用Ni-NTA樹脂純化的標的蛋白進一步在蛋白純化儀(AKTA prime)上使用來自通用電氣醫療集團(GE Healthcare)的凝膠過濾柱(HiLoad 16/600 Superdex 200 pg)進行純化。

【0070】 凝膠過濾

【0071】 設定這些程序用於研究蛋白質的純化。程序30：針對標的蛋白的凝膠過濾純化。程序33：使用120 ml的0.5M NaOH對HiLoad 16/600 superdex 200 pg現場清潔。流速是0.8 ml/分鐘。程序34：現場清潔之後使用150 ml的GF緩衝液用於平衡管柱。每兩次蛋白質純化後洗滌管柱。5ml的樣品環連接至機器，AKTA

prime，用於控制蛋白樣品。樣品環首先使用25 ml的GF緩衝液沖洗以移除在先前純化過程中殘留的蛋白質。在填充標的蛋白進入樣品環之前，加入額外的0.5ml的GF緩衝液進入Ni-NTA純化蛋白質中。放置蛋白質溶液於5 ml的注射器中並裝填進樣品環中。在經洗脫的標的蛋白的相應部份中的玻璃管在每次純化之前以新管取代。在凝膠過濾實驗中使用的所有緩衝液藉由0.2 μm 的濾膜單元過濾以滅菌和去除雜質。這些緩衝液進一步以真空脫氣10分鐘。當UV280所監控的含有標的蛋白的快速液相層析部份被收集並被彙集在一起。彙集的蛋白質溶液藉由2nd Ni-NTA的管柱以與第一個相同的床體積濃縮。在蛋白從第二個Ni-NTA管柱洗脫之後，蛋白質濃度以BCA方法來測定。有著最高的蛋白質濃度的兩個部份被彙集並對1L的PBS透析隔夜。在透析之後，使用來自G-生物科學公司(G-Bioscience)的EndotoxinOUT™樹酯移除內毒素污染物。聚丙烯柱在裝載1.5 ml標的蛋白之前，先以4ml的EndotoxinOUT™樹酯填充並以1%的脫氧膽酸鈉的5倍床體積於LAL試劑水(LAL Reagent Water, LRW)中、LRW的5倍床體積及PBS/LRW的5倍床體積洗滌。在標的蛋白完全裝填之後，置放管柱於冷房中1小時，使內毒素被樹酯完全吸收。蛋白質使用逐步添加0.5 ml的第一部份以及1ml的PBS的隨後部份來洗脫。蛋白質在第三至第六部份中洗脫。

【0072】 鰲變形細胞溶解物(Limulus amoebocyte lysate, LAL)測定

【0073】 使用美國ACC公司(Associate of Cape Cod, Inc.)提供的PYROTELL-T LAL測定內毒素表現量。在凍乾粉中供應的每個LAL試劑首先先溶於5ml的LRW中，且接著等分至小體積並存在-80°C。使用PYROTELL-T的典型濁度測定中，供應包括內毒素標準品的100 μl 的樣品於微孔板中。使用反應動力學使用螢光VICTOR3 螢光讀取器於光密度OD405，且於37°C時測量。在每個

讀取之間的延時為70秒且讀取重複60次。樣品和空白品之間在光密度OD405中，以達成0.1的差異的反應所需的時間被記錄且與內毒素標準品比較以測定在樣品中的內毒素單位。內毒素活性的log對時間(秒)標示出位置以達成在OD405中的0.1的差異；使用對數趨勢線作為標準曲線。在蛋白樣品中的經鑒定內毒素活性進而與蛋白濃度結合，如藉由BCA測定，以測定特定的內毒素活性(單位為EU/mg)。在所有樣品中的特定內毒素活性的上限是5 EU/mg。

不含佐劑的小鼠的免疫作用

● **【0074】** 在免疫作用程序中使用的小鼠均在6至8周齡之間。小鼠在沒有麻醉的情況下藉由剪去2-3 mm的尾巴採血。對尾巴間歇按摩並使用自動移液器收集血液。每次採血收集大約100 µl的血液。血液留置室溫下2小時，接著在微型離心機中以2000 rpm離心10分鐘，在微型管中收集血清。在微型離心機中使用2000 rpm 10分鐘移除剩餘的紅血球細胞。在酶聯免疫吸附測定中使用以前將血清存放在-80 °C中。藉由加熱的焊鐵並且以拇指與食指加壓尾巴使小鼠尾巴止血。至於初次免疫作用，在大腿注射20 µg的純化蛋白質。免疫後第14天，從尾巴採血，且使用相同劑量的純化蛋白作為促升劑以相同的方式注射。

用於測定抗體效價的酶聯免疫吸附測定

● **【0075】** 以塗層緩衝液稀釋GFP蛋白並以10 µg/ml的濃度將GFP塗佈在酶聯免疫吸附測定平皿的孔中。以黏著性塑料覆蓋平皿並在4°C培養隔夜。以300 µl的洗滌液洗滌平皿三次。加入200 µl的封閉緩衝液以阻斷在塗層孔中的非特異性結合位點。以黏著性塑料覆蓋平皿並在37 °C培養1小時。以300 µl的洗滌液洗滌平皿三次。以封閉緩衝液稀釋一級抗體或抗血清，並在平皿的每個孔加入100 µl稀釋後的抗體。以黏著性塑料覆蓋平皿並在37 °C培養1小時。以300 µl的洗滌液

洗滌平皿三次。以封閉緩衝液稀釋與HRP共軛的二級抗體，並在平皿的每個孔中加入100 μ l稀釋後的二級抗體。以黏著性塑料覆蓋平皿並在37 $^{\circ}$ C培養30分鐘。以300 μ l的洗滌液洗滌平皿五次。以多通道吸量管將每個孔添加100 μ l的四甲基聯苯氨(Tetramethylbenzidine, TMB)試劑。在足夠的色彩顯影之後，添加100 μ l的終止緩衝液至孔中。使用450 nm讀取每個孔的吸光值。當測量抗MAGE-A3以及抗m2eX5的抗體效價時，使用有著組胺酸標籤(His-Tag)的MAGE-A3與m2eX5蛋白稀釋後以10 μ g/ml的濃度塗層平皿。塗層緩衝液包含0.2M的pH 9.4的碳酸鹽/重碳酸鹽緩衝液。洗滌液包含0.05%的吐溫乳化劑20(Tween 20)在1X的PBS中。封閉緩衝液包含1g的BSA溶在100 ml的洗滌液中。終止緩衝液包含2M的硫酸。

螢光標記的胜肽與GFP融合蛋白內在化及再循環測定

【0076】 藉由首先接種 4×10^4 個MDCK細胞於96孔板的一個孔上來測定GFP融合蛋白的內在化活性，且每個樣品以四重複來測定。第二天，在培養基中添加200 μ g/ml的GFP融合蛋白並培養4小時。在培養之後，移除培養基並以200 μ l的PBS洗滌三次。GFP融合蛋白被內在化的數量藉由螢光計測定。針對螢光標記的胜肽，用在內在化測定的胜肽濃度是10 μ M。為了估計GFP融合蛋白再循環回到培養基的效率，細胞首先以GFP融合蛋白共同培養，如上所述。以PBS洗滌之後，使用100 μ l的PBS與0.4單位的凝血酶將GFP從接合在細胞膜的胞外表面上的兩親性胜肽切割出。凝血酶酶切作用在37 $^{\circ}$ C培養相中執行20分鐘。細胞以200 μ l的PBS再次洗滌三次，接著在新鮮的培養基中培養24小時。藉由移除80 μ l的培養基用於螢光表現量的偵測以及使用PBS控制組設定以校正背景螢光，來測定再循環回到培養基中的GFP融合蛋白。

血漿細胞因子表現量測定

【0077】 為了測定血液細胞因子表現量，以肌肉注射方式注射小鼠實驗蛋白質。注射後兩小時，小鼠被麻醉，之後透過以預先充填10 μ l的0.5M Na₂EDTA的注射器對其心臟穿刺收集血液。收集的血液在桌上離心機中以2000 rpm離心20分鐘。所收集的血漿等分成20 μ l的部份且在乾冰上急速冷凍。藉由雙抗原夾心酶聯免疫吸附測定，用購自美國eBioscience公司的標準品來測定血漿細胞因子表現量。IL-6表現量是使用小鼠IL-6 ELISA Ready-SET-Go!(Mouse IL-6 ELISA Ready-SET-Go!)試劑組來偵測(目錄號#88-7064，eBioscience公司，USA)。MCP-1是使用小鼠CCL2 (MCP-1) ELISA Ready-SET-Go!(Mouse CCL2 (MCP-1) ELISA Ready-SET-Go!)試劑組來偵測(目錄號#88-7391，eBioscience公司，USA)。偵測程序遵照著供應商的標準流程。

藉由流式細胞儀的細胞凋亡測定

【0078】 MDCK細胞以3x10⁵ 細胞/孔的密度接種在6孔板上。接種後24小時，分別加入10 μ M、30 μ M及100 μ M的濃度的肽，並在藉由胰蛋白酶酶切收成細胞之前培養24小時。藉由在1000 rpm離心培養基5分鐘收集由於細胞凋亡產生的懸浮細胞。從胰蛋白酶酶切收集的細胞合從培養基收集的細胞混合，並且取1x10⁵個細胞在 -20度冷凍庫中以3ml的70%乙醇固定隔夜。固定之後，細胞在1 ml的PBS中洗滌並重新懸浮，且藉由SYTOX AADvanced死細胞染色試劑組(SYTOX AADvanced Dead Cell Stain kit)(賽默飛世爾科技公司(Thermo Fisher Scientific Inc.))，加入100 μ g的RnaseA後，於4度冷室中染色30分鐘，之後藉由流式細胞儀(BD FACSCalibur™)來分析。計算sub-G1部份比例且指定為凋亡細胞。

穿透式電子顯微鏡

【0079】 MDCK 細胞被種在 6 孔板中的 ACLAR 埋植膜 (ACLAR Embedding film) 上，以每孔 3×10^5 個細胞的密度種植。在隔夜培養之後，培養基的部份移除留下 0.5 ml 的培養基，之後加入 AH2 胜肽至 $10 \mu\text{M}$ ，並加入 $50 \mu\text{l}$ 與 AH2 胜肽共軛的 10 nm 的奈米金顆粒。使用 AH2 共軛的 10 nm 的奈米金顆粒濃度是 $4.78 \times 10^{12}/\text{ml}$ 。在 4 小時的培養之後，以無血清培養基於室溫下洗滌細胞，之後在 2.5% 的戊二醛/0.1% 的單寧酸/0.1M 的二甲胍酸緩衝液，pH 7.2 在室溫固定 30 分鐘。接著細胞在室溫下，於 0.1M 的二甲胍酸緩衝液 (pH 7.2)/0.2M 蔗糖/0.1% CaCl_2 中洗滌 5 分鐘。之後，細胞在含有 1% 的 OsO_4 /0.1M 的二甲胍酸緩衝液 (pH 7.2) 於室溫下後固定 30 分鐘。細胞在室溫下以 ddH_2O 洗滌三次，每次 5 分鐘。細胞進而在室溫下以 1% 的醋酸鉍醯染色 30 分鐘，之後以 ddH_2O 洗滌三次。細胞接著脫水並藉由在 60 度被聚合 24 小時而包埋在 EPON。接著將包埋的細胞切片以在透射電子顯微鏡下觀察。

實例 1

【0080】 兩親性螺旋肽刺激針對融合蛋白的體液免疫反應。為了估算兩親性胜肽在刺激針對其融合抗原產生體液免疫的效果，來自 HCV NS3 (AH1) 及 A 型流感病毒株 H1N1 M2 蛋白質 (AH2) 的兩親性螺旋胜肽根據他們的融合蛋白的高溶解度而被挑選。首先合成寡核苷酸並使用在 PCR 反應中以產生這兩條胜肽的編碼序列，並轉殖進含有綠色螢光蛋白 (GFP) 的 pET28a 載體裏。兩親性螺旋胜肽和 GFP 融合蛋白是使用細菌表達系統來表達並且使用 Ni-NTA 瓊脂糖來純化。從 Ni-NTA 樹脂洗脫的融合蛋白進而在 HiLoad 16/600 superdex 200 管柱中使用凝膠過濾純化。來自凝膠過濾管柱洗脫的融合蛋白藉由以 10K 的切割分子量的

Amicon Ultra 15 來濃縮。同時使用來自G-生物科學公司(G-Bioscience)的EndotoxinOUTTM樹酯移除在蛋白質製品中的內毒素污染物。

【0081】 在標準完全-不完全弗氏佐劑範例中，首先測試在佐劑反應中兩親性胜肽對刺激抗體生產的能力。在初次免疫，濃度1 mg/ml的蛋白質與完全弗氏佐劑以1:1體積比混合直到乳化。經由腹膜注射50 µg的蛋白質到每隻C57BL/6小鼠，每種融合蛋白注射5隻小鼠。在第14、28及42天透過相同途徑，連同以1:1體積比與不完全弗氏佐劑混合的蛋白質作為促升劑給予小鼠。結果顯示於第1B圖，其中AH1-GFP與AH2-GFP兩者相較單獨GFP都促進更多抗-GFP的抗體。

實例2

【0082】 來自流感病毒H1N1 M2蛋白的AH2胜肽增強不用佐劑的抗體產生。先表達AH2-GFP並純化至含有小於5 EU/mg的內毒素表現量。純化的AH2-GFP蛋白分別與a)完全弗氏佐劑，b)不完全弗氏佐劑，c)鞭毛蛋白或d)PBS組合以免疫小鼠。控制組蛋白質是表達並純化至含有小於5 EU/mg的內毒素表現量的His-GFP。以乳化或是混合物形式的50 µg的蛋白質，每組注射5隻小鼠，且使用GFP蛋白塗層透過酶聯免疫吸附測定來監控抗-GFP抗體表現量。使用在注射後第0、7、14、21、28、35天所收集的血清。結果顯示，針對以完全弗氏佐劑乳化的蛋白質，在AH2-GFP及His-GFP之間的抗-GFP IgG表現量並沒有顯著差異(第2A圖)。針對以不完全弗氏佐劑乳化的蛋白質，在第7天，相較於His-GFP，誘導的AH2-GFP明顯有較高的抗-GFP IgG表現量。此在抗-GFP IgG產量上的差異持續到第35天(第2B圖)。針對與10 µg的鞭毛蛋白混合的蛋白質，抗-GFP IgG表現量在注射後第14天開始展現顯著的差異，且持續直到注射後的第35天(第2C圖)。當AH2-GFP或His-GFP與PBS一起注射時，抗-GFP IgG生產在注射後第14

天開始展現顯著的不同，且持續到第35天(第2D圖)。這些結果顯示僅添加AH2胜肽序列足以誘導針對抗原(GFP)的抗體產量。

實例3

【0083】 在小鼠中增強抗-GFP IgG的產生需要AH2胜肽的疏水殘基。為了測試AH2胜肽在抗-GFP IgG效價的增強的效應，以點突變將三個疏水的胺基酸：4F、8I、以及12F置換成丙胺酸(AH2M3)。完整的AH2M3的序列如下：DRLASKSAYRIAKHGLKRG。表達並純化AH2M3-GFP產物蛋白，使用AH2M3-GFP產物蛋白以免疫小鼠。使用AH2-GFP作為正控制組。結果顯示，以丙氨酸對3個疏水性胺基酸的置換，顯著地降低了融合蛋白對促進抗-GFP IgG生產的能力(第3圖)。因此兩親性胜肽的完整性對於AH2-GFP融合蛋白刺激體液免疫是重要的。此外，被AH2融合蛋白刺激的抗體效價在初次免疫之後至少維持5個月，這暗示因為AH2胜肽融合而活化的體液免疫是持久的。

實例4

【0084】 AH2-GFP融合蛋白刺激獨立於先天免疫反應的體液免疫反應。為了測試AH2胜肽是否首先藉由激活先天免疫反應來誘導體液免疫反應，使用酶聯免疫吸附測定測定在AH2-GFP融合蛋白的肌內注射之後兩小時的外周血中炎性細胞因子表現量。有著小於5 EU/mg內毒素表現量的His-GFP和AH2-GFP蛋白製品被以肌內注射進5隻小鼠，每隻小鼠注以50 µg的量。已知會誘導先天免疫反應的TLR5配位體鞭毛蛋白作為正控制組，每隻小鼠為10 µg，或1 µg/小鼠的劑量。在合適的麻醉條件下，透過心臟穿刺收集肌內注射後2小時的血液。用於血液收集的注射器以10 µl的0.5M的EDTA預先充填避免血液凝固。收集的血液以2000 rpm離心20分鐘以製備血漿。收集的血漿等分至20µl/管以及置放在乾冰頂

部以儲存。在室溫下解凍的血漿稀釋12倍，且每個血漿樣品放置兩份，根據製造商的指示藉由酶聯免疫吸附測定以測定IL-6或MCP-1細胞因子表現量。從eBioscience購得的酶聯免疫吸附測定試劑組，小鼠IL-6 Ready-SET-Go!試劑組(目錄號：88-7064-86)以及小鼠CCL2 (MCP-1) Ready-SET-Go!試劑組(目錄號：88-7391-86)。結果顯示，鞭毛蛋白注射誘導高表現量的IL-6和MCP-1兩者，分別是當注射10 μg 的鞭毛蛋白時是1200 pg/ml的表現量和3000 pg/ml的表現量，或是當注射1 μg 的鞭毛蛋白時是380 pg/ml及2600 pg/ml。對於PBS、His-GFP或AH2-GFP注射，IL-6和MCP-1的表達較低，顯示AH2-GFP蛋白不誘導先天免疫反應。

【0085】 從特定的A型流感病毒株H1N1衍生的M2兩親性胜肽、烏隆(Udom)k可透過造成質膜穿孔且造成質膜完整性的缺失而誘導細胞凋亡。為了測試是否AH2胜肽也可誘導細胞凋亡，三個不同濃度的AH2胜肽：10 μM 、30 μM 以及100 μM 與MDCK細胞一同培養24小時，之後收成細胞並以染色體DNA染色以偵測細胞凋亡。細胞凋亡表現量是使用流式細胞儀來測定，在乙醇固定24小時並以核糖核酸酶A處理之後，接著以SYTOX AADvanced死細胞染色1分鐘，隨後在流式細胞儀(BD FACSCalibur™)中執行。計算並表示有著sub-G1信號的細胞的百分比。結果顯示，如文獻所描述的，藉由添加烏隆胜肽可誘導MDCK細胞凋亡作用。而不論是添加AH2或AH2M3誘導的細胞凋亡作用程度，相似於PBS控制組，這表示被AH2或AH2M3誘導的細胞凋亡是與背景表現量一致的。

實例5

【0086】 藉由來自A型流感病毒株H5N1和H7N9的M2蛋白的兩親性胜肽誘導的體液免疫反應。從A型流感病毒株H5N1及H7N9衍生的M2兩親性螺旋肽

序列在pET28a載體中使用DNA重組與GFP融合。藉由熱休克將AH3-GFP及AH5-GFP融合蛋白表達載體轉殖進BL21(DE3)，挑選生長在LB/卡那黴素(50 $\mu\text{g/ml}$)平皿上的菌落並在用於接種在3ml的LB培養基中並隔夜培養。經隔夜的細菌培養基進而用於500ml的培養基的接種，並在同時以225 rpm振動，在15°C培養直到光密度OD600達到0.5。加入1mM的IPTG之後，細胞培養基繼續在相同的條件下培養隔夜使融合蛋白誘發。誘發之後，收成細胞並在裂解緩衝液中回溶用於超聲處理以將細菌打破。在超聲處理之後，細菌的溶菌液使用購自Sorvall的SS34 rotor以10000 rpm離心10分鐘。離心之後收集上清液。使用Ni-NTA樹脂進行可溶性蛋白質的純化，並使用BCA方法測定經純化蛋白質的整體量。藉由EndoFree樹脂來移除內毒素污染物。在小鼠大腿的肌肉注射以1 mg/ml的濃度的20 μg 的純化AH3-GFP及AH5-GFP。藉由剪去小鼠尾巴的頂端而從尾巴靜脈收集血液。收集的血液留在桌上幾個小時以凝血。接著將血液在2000 rpm離心15分鐘並收集血清。藉由使用使用GFP蛋白以10 $\mu\text{g/ml}$ 的濃度塗層的酶聯免疫吸附測定來測定血液中的抗-GFP IgG效價。結果顯示，AH3或AH5胜肽與GFP蛋白質協力地添加能夠增進抗-GFP IgG效價的上升，甚至比AH2胜肽更為顯著(第5圖)。此暗示了AH3與AH5具有比AH2要高的誘導體液免疫反應的活性，且可能對於用在誘導保護性的免疫反應所需的疫苗的整體劑量的減少是有用處的。總的而言，當這些從三個不同A型流感病毒株衍生的兩親性螺旋肽與蛋白抗原融合時，皆刺激體液免疫反應。

實例6

【0087】 藉由與AH2胜肽融合的MAGE-A3與m2eX5蛋白的體液免疫的誘導。已經顯示出，當與GFP融合時，來自A型流感疫苗株的AH2胜肽誘導出高的

抗-GFP IgG效價。為了估計AH2在刺激體液免疫中針對各種抗原的功效，AH2胜肽透過DNA重組技術與MAGE-A3或m2eX5任一蛋白融合。表達並純化AH2-MAGE-A3與AH2-m2eX5蛋白，以及他們個別的控制組蛋白。透過肌內注射將經純化的蛋白用以免疫C57BL/6小鼠。透過使用酶聯免疫吸附測定對抗-MAGE-A3或抗-m2eX5 IgG的效價的偵測來監控體液免疫反應。結果顯示，在MAGE-A3或m2eX5AH2蛋白質對AH2胜肽的添加，當相比於無AH2胜肽融合蛋白時，兩者在相應的IgG效價分別增加了50倍和7倍。結果顯示AH2胜肽以及其相關的兩親性螺旋肽是適合做為免疫平臺以誘導針對致病抗原的體液免疫的高表現量。

實例7

【0088】 來自GRK5、HA以及NSP-1的兩親性螺旋肽也刺激對融合蛋白的體液免疫。為了估算是否除了A型流感病毒的M2蛋白以外的兩親性螺旋也享有相似的對融合蛋白誘導體液免疫反應中的相似活性，發明人瀏覽文獻以鑒定當與螢光蛋白，GFP，融合時與膜互相作用的已知胜肽序列。鑒定出三條胜肽序列：從塞姆利基森林病毒的Nsp1蛋白的第245-264個胺基酸殘基衍生的兩親性螺旋肽，Nsp1；來自G-蛋白偶聯受體激酶5的第546-565個胺基酸序列Grk5；血細胞凝集素的融合髮夾胜肽，HAfp23。這些胜肽序列使用DNA重組技術與GFP融合，並且所述融合蛋白以如上述的方式表達和純化。使用His-GFP、AH2-GFP、NSP1-GFP、GRK5-GFP及HAfp23-GFP融合蛋白以免疫小鼠。在小鼠免疫作用期間，每隻小鼠在第0天和第14天以肌內注射20 µg的純化融合蛋白，且在每次注射後第14天收集血清。

【0089】 來自NSP1、GRK5、以及HA蛋白的兩親性螺旋肽的融合，所有皆潜在地增進了對綠螢光蛋白(GFP)的體液免疫反應(第7A、7B圖)。這些結果顯示具備兩親性螺旋特性的短胜肽的簡單附著可顯著地增加抗原在誘導體液免疫的能力。

實例8

【0090】 AH2能夠誘導融合蛋白的聚合作用以及內在化作用而進入細胞成為特殊的膜結構。表達並使用Ni-NTA瓊脂糖樹酯來純化AH1-GFP、AH2-GFP及His-GFP蛋白，並接著藉由凝膠過濾並藉由Ni-NTA瓊脂糖樹酯來濃縮。為了測試這些融合蛋白與培養細胞的細胞膜的結合能力，濃度為200 $\mu\text{g/ml}$ 的融合蛋白被用於與MDCK細胞一同培養。在4小時的培養之後，使用PBS緩衝液洗去未結合的GFP融合蛋白。藉由螢光計偵測結合的GFP融合蛋白。細胞僅與PBS培養作為背景螢光的校準。結果顯示，細胞膜與AH2-GFP結合但不與 AH1-GFP或His-GFP結合(第8A圖)。為了觀察與培養的細胞結合的GFP融合蛋白，在培養的CLI-5/pENO1細胞中加入100 $\mu\text{g/ml}$ 的蛋白並培養4小時。在培養結束後，以PBS洗滌細胞兩次並接著使用在螢光顯微鏡下觀察。針對與AH2-GFP培養的細胞，培養之後4小時觀察細胞上的螢光。當使用His-GFP培養時，在細胞表面上沒有觀察到螢光亮點(第8B圖)。在與AH2-GFP培養之後4小時，有超過50%的細胞含有螢光亮點。這些結果顯示，當AH2-GFP融合蛋白以可溶性蛋白提供於培養基內，其可聚合在細胞表面上。為了進而鑒定這些螢光亮點在細胞內的定位，而使用共聚焦顯微鏡。當在共聚焦顯微鏡下觀察時，這些螢光亮點似乎呈現胞內囊泡的形狀並主要為在細胞內而非質膜上(第8C圖)。這些結果顯示，AH2-GFP融合蛋白能夠經由內在化進入細胞的細胞質中並且形成囊泡狀的結構。為了追

踪這些形成在培養的細胞內的囊泡，在培養的細胞中加入相應於AH2的兩親性螺旋胜肽，連同與AH2胜肽共軛的奈米金顆粒，來追蹤形成的囊泡。AH2胜肽的添加誘導囊泡在細胞內成型，以V標記 (第8D圖)。在這些囊泡中有些網格狀結構，而奈米金顆粒沿著這些結構裝飾，如箭頭所指示，暗示著這些網格狀結構可能是由磷脂和AH2胜肽所構成(第8E圖)。一些奈米金顆粒所裝飾的網格狀結構可在多泡體(multiple vesicle body, MVB)狀的結構的中發現，暗示這些結構可被併入胞內體途徑(第8G圖)。這些網格狀結構也可在細胞外空間發現，一個指標是含有這些結構的囊泡可能與質膜融合且造成這些結構被分泌到培養基中(第8F圖)。

實例9

【0091】 來自三個不同類型的A型流感病毒株以及G-蛋白偶聯受體激酶5的兩親性螺旋肽也介導內在化。來自A型流感病毒的兩親性螺旋肽已經顯示出對於病毒顆粒的ESCRT-獨立出芽是重要的。同樣在體外也顯示，當從M2蛋白合成的兩親性螺旋肽與含有膽固醇的膜囊泡混合時，兩親性螺旋肽也介導出芽(羅斯曼·JS， 2010)。為了測試來自病毒株(除了H1N1)的M2兩親性螺旋肽是否也享有相似的與培養細胞結合的特性，發明人合成從H5N1、H3N2及H7N9衍生的三個M2兩親性螺旋肽，並分別命名為AH3、AH4及AH5。用以比較，雖然這三條胜肽與細胞膜結合力不及AH2，但他們均以不同的程度與細胞膜結合並內在化至細胞中(第9A圖)。這結果建議這些衍生自不同的A型流感病毒株的M2蛋白質的胞質兩親性螺旋肽的胜肽均可與培養細胞結合。顯示在所有A型流感病毒M2蛋白的同源區域共享誘導融合蛋白內在化的相似特性。為了鑒定其他也享有與細胞結合甚至內在化進入細胞的相似特性的兩親性螺旋肽，發明人使用文獻搜

索以鑒定當與GFP報告基因融合時已知會與膜互相作用的兩親性螺旋肽。透過此方式，發明人鑒定符合標準的三個兩親性螺旋肽，HAfp23、Grk5及Nsp1。HAfp23是從血細胞凝集素融合域衍生，是一個已知會誘導膜彎曲的兩親性螺旋髮夾蛋白。Grk5胜肽是從G蛋白偶聯受體激酶5(Grk5)的第546-565個胺基酸殘基衍生而來，已知可形成兩親性螺旋且足以用於Grk5蛋白對細胞膜的靶向。Nsp1是從塞姆利基森林病毒複製酶蛋白nsP1的第245-264個胺基酸殘基衍生，也已知可形成兩親性螺旋且是nsP1的膜定位所需。使用遺傳重組，發明人在pET28a載體中於GFP編碼序列之前重組這三胜肽的編碼序列。發明人表達並純化這三個GFP融合蛋白並在細胞結合測定中使用它們以測試其與培養細胞結合的能力。結果顯示在這三個融合蛋白中，只有Grk5-GFP可與培養細胞結合，其結合活性大約為AH2-GFP的活性的30%。HAfp23-GFP及Nsp1-GFP在此測定中無法與培養細胞結合(第9B圖)。

實例10

【0092】 將AH2、AH3、AH5及Grk5的兩親性螺旋肽序列比對，發明人鑒定出有著R-L/I/R-F-K的共有序列的功能基序。另外在AH2、AH3及AH5的第2-6個胺基酸中還有另一個相似的基序：R-L-F-S/F-K。為了測試這基序在兩親性螺旋肽對於結合及內在化進入細胞而言是重要與否，使用此基序的可能組合以搜尋病毒蛋白資料庫。含有此基序的經鑒定的蛋白質進而藉由二級結構預測程序來估計。只有在螺旋結構中包含此基序的那些蛋白質被挑選。四個胜肽序列包含這些RLFK或RLFFK基序是ANMV-AH、SWS-AH、TYLCV-AH及AHV-AH。合成有著相應序列的胜肽並以FITC標記。這些胜肽被使用於測試這些基序的存在是否足以用於細胞結合和內在化。在相同胜肽濃度的存在下，AHV-AH、

SWS-AH、ANMV-AH、TYLCV-AH胜肽分別以40%、24%、15%以及25%的活性(與AH2胜肽相比)結合至細胞(第10B圖)。這結果顯示在兩親性螺旋結構中的RLFK/RLFFK基序的存在是足以使兩親性螺旋結構肽以及其融合蛋白結合至膜並內在化。

實例11

【0093】 含有RLFFK/RLFK基序的胜肽融合的蛋白於內在化之後回到培養基。從電子顯微鏡的結果，其指出誘導膜囊泡的AH2胜肽可與質膜融合並造成脂質-蛋白質複合物的釋放。為了測試這個可能性，與AH2、GRK5或SWS兩親性胜肽融合的GFP與培養的MDCK細胞一同培養4小時，並以PBS洗滌，隨後以凝血酶酶切以移除來自胞外融合蛋白的GFP。酶切之後，洗滌細胞並使其在生長培養基中培養額外24小時。藉由螢光計測量從細胞釋放的GFP融合蛋白的螢光表現量。結果顯示，在24小時培養之後，仍有40%、45%及30%的融合蛋白保留在細胞內(第11A圖)。且從細胞釋放的融合蛋白可在培養基中偵測到(第11B圖)。

實例12

【0094】 AH2胜肽介導的的免疫刺激偏於2型輔助T細胞應答。同樣為了估計是否藉由含有RLFFK/RLFK基序的胜肽所刺激的免疫反應是偏向1型輔助T細胞(Th1)或2型輔助T細胞(Th2)反應，免疫之後的抗-GFP IgG的效價或IgG亞型的效價都藉由酶聯免疫吸附測定來測定。以不含有RLFFK/RLFK基序的AH1作為對照組。純化His-GFP、AH1-GFP以及AH2-GFP融合蛋白並在第0天和第14天將融合蛋白經肌內注射進入BALB/c品系的小鼠中，以誘導免疫反應。在第28天收集的血清用於酶聯免疫吸附測定分析，其使用山羊抗-小鼠總IgG (第12A圖)或抗-IgG1、抗-IgG2a、抗-IgG2b以及抗-IgG3(第12B圖)。藉由比較IgG1與IgG2a加IgG3

的比值，結果顯示藉由AH2-GFP觸發的免疫反應是偏向Th2，且顯示AH2胜肽可觸發T-細胞相關的體液免疫反應。

【0095】 為了測試當融合至抗原時，兩親性螺旋肽中RLFK的存在，是否足以刺激Th2型T細胞應答，則表達SWS-GFP且純化用於小鼠免疫作用。在免疫作用14天之後，從經免疫的小鼠收集血清且抗-GFP IgG的效價及IgG亞類的效價藉由酶聯免疫吸附測定來測定。在第12C圖中的結果顯示被SWS-GFP誘導的IgG亞型主要是IgG1，表示含有RLFK基序的SWS-AH胜肽的添加會活化2型輔助T細胞應答。這些結果表示在兩親性螺旋肽中的RLFK/RLFFK基序能夠將抗原遞送到在抗原呈現細胞的胞內體路徑，並誘導T細胞相關的體液免疫。

【0096】 雖然本發明的實施例已經顯示並描述，但對本領域技術人員顯而易見的是，基於本文的教示，變化和修飾可在不脫離本發明和較廣範疇的前提下進行。因此，附錄的權利要求書是旨在涵蓋其所有這樣的變化和修飾的範疇，如同本發明的示範性實施例的實際精神和範疇。

【符號說明】

【0097】 無

<120> 用於免疫作用中有效抗體生產的新穎蛋白質結構

<151> 2014-12-10

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus)

 $\langle 400 \rangle$ 1

Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg

1

5

10

15

$\langle 210 \rangle$ 2 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> PRT

<213> 塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)

<400> 2

Gly Ser Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Arg Lys Leu Leu Arg Ser Trp His

1

5

10

15

Leu Pro Ser Val

20

$\langle 210 \rangle$ 3

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 兩親性螺旋

<400> 3

Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly

1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly

20

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> A 型流感病毒，H1N1 (Influenza A virus, H1N1)

<400> 4

Asp Arg Leu Phe Ser Lys Ser Ile Tyr Arg Ile Phe Lys His Gly Leu

1 5 10 15

Lys Arg Gly

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> A 型流感病毒，H5N1 (Influenza A virus, H5N1)

<400> 5

Asp Arg Leu Phe Phe Lys Cys Ile Tyr Arg Arg Leu Lys Tyr Gly Leu

1 5 10 15

Lys Arg Gly

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> A 型流感病毒，H7N9 (Influenza A virus, H7N9)

<400> 6

Asp Arg Leu Phe Phe Lys Cys Ile Tyr Arg Arg Phe Lys Tyr Gly Leu

1 5 10 15

Lys Arg Gly

<210> 7

 $\langle 211 \rangle$ 20

<212> PRT

<213> 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

<223> 兩親性螺旋

<400> 7

Pro Lys Lys Gly Leu Leu Gln Arg Leu Phe Lys Arg Gln His Gln Asn

1

5

10

15

Asn Ser Lys Ser

20

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> 對蝦白斑綜合症病毒(Shrimp white spot syndrome virus)

<400> 8

Lys Arg Leu Phe Lys Leu Ser Tyr Ile Glu Thr Arg Tyr Met Ala Ser

1 5 10 15

Asp Lys

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> 番茄黃化曲葉病毒(Tomato yellow leaf curl virus)

<400> 9

Met Pro Arg Leu Phe Lys Ile Tyr Ala Lys Asn Tyr Phe Leu Thr Tyr

1 5 10 15

Pro Asn

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> 艾德琳疱疹病毒 3 (Ateline herpesvirus 3)

<400> 10

Arg Thr Leu Ser Leu Leu Arg Arg Leu Phe Phe Lys Ser Asp Leu Gly

1

5

10

15

Phe Leu

 $\langle 210 \rangle$ 11

<211> 18

<212> PRT

<213> ANMV-1 病毒(ANMV-1 virus)

<400> 11

Met His Ser Ala Thr Ala Ala Gln Leu Glu Thr Leu Arg Leu Phe Lys

1

5

10

15

Phe Pro

2019/11/18

【發明申請專利範圍】

108年11月18日 修正
補充

【第1項】一種抗原融合蛋白用於製備增進免疫反應的醫藥組成物之用途，其包含：

以基因重組方式結合兩親性胜肽與抗原並經由蛋白表現以形成抗原融合蛋白；以及

將該抗原複合物給予受試者。

【第2項】如申請專利範圍第 2 項所述之用途，其中該兩親性胜肽包含 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列、SEQ ID NO: 2 的胺基酸序列、或 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列。

【第3項】如申請專利範圍第 2 項所述之用途，其中該兩親性胜肽包含含有 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序的胺基酸序列，

其中，

A_1 、 A_2 、 A_3 及 A_4 是每個個別地選自由精胺酸(R)及離胺酸(K)所組成的群組；

B_1 是選自由離胺酸(K)、精胺酸(R)、異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組；

B_2 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)、纈胺酸(V)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、及色胺酸(W)所組成的群組；

B_3 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組；

B_4 是選自由苯丙胺酸(F)、色胺酸(W)及酪胺酸(Y)所組成的群組；以及

B₅ 是選自由苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)、蘇胺酸(T)、半胱胺酸(C)及絲胺酸(S)組成的群組。

【第4項】如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該抗原是選自由 A 型流感病毒、B 型流感病毒、C 型流感病毒、登革病毒、人類乳突病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、水痘帶狀疱疹病毒、巨細胞病毒、埃博拉病毒、B 型流感嗜血桿菌、幽門螺桿菌、單純性疱疹病毒 1 及 2 型、瘧原蟲物種、麻疹病毒、中東呼吸綜合症冠狀病毒、腮腺炎病毒、百日咳博德特氏桿菌、小兒麻痺病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞體病毒、輪狀病毒、風疹病毒、嚴重急性呼吸綜合症冠狀病毒、破傷風桿菌、結核桿菌、西尼羅河病毒、肺炎鏈球菌、金黃色葡萄球菌、艱難梭菌、腦膜炎球菌以及沙門氏桿菌所組成的群組的病原體的一部份。

【第5項】如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該抗原是選自由多肽、蛋白質、肽、綠色螢光蛋白及其組合所組成的群組。

【第6項】如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該受試者是溫血動物。

【第7項】一種抗原複合物，其包含：

A₁B₁B₂A₂ 及/或 A₃B₃B₄B₅A₄ 基序；

第一胜肽，接合至該 A₁B₁B₂A₂ 及/或 A₃B₃B₄B₅A₄ 基序的 N-端；

第二胜肽，接合至該 A₁B₁B₂A₂ 及/或 A₃B₃B₄B₅A₄ 基序的 C-端；

抗原，共價接合至該第一胜肽或該第二胜肽，

其中，

A_1 、 A_2 、 A_3 及 A_4 是每個個別地選自由精胺酸(R)及離胺酸(K)所組成的群組；

B_1 是選自由離胺酸(K)、精胺酸(R)、異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組；

B_2 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)、纈胺酸(V)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、及色胺酸(W)所組成的群組；

B_3 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組；

B_4 是選自由苯丙胺酸(F)、色胺酸(W)及酪胺酸(Y)所組成的群組；以及

B_5 是選自由苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)、蘇胺酸(T)、半胱胺酸(C)及絲胺酸(S)組成的群組；且

該 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序、該第一胜肽以及該第二胜肽形成兩親性螺旋二級結構，

其中該抗原複合物不包含棕櫚醯基油醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯膽鹼、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼、棕櫚醯基亞油烯基磷脂醯膽鹼及神經鞘磷脂。

【第8項】如申請專利範圍第 9 項所述之抗原複合物，其中該抗原是選自由寡醣、多肽、蛋白質、多醣、胜肽以及其組合所組成的群組。

【第9項】一種抗原複合物用於製備增進抗原遞送的醫藥組成物之用途，其包含：

給予抗原複合物予受試者，

2019/11/18

其中該抗原複合物包含：

$A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序；

第一胜肽，接合至該 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序的 N-端；

第二胜肽，接合至該 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序的 C-端；

抗原，共價接合至該第一胜肽或該第二胜肽，

其中：

A_1 、 A_2 、 A_3 及 A_4 是每個個別地選自由精胺酸(R)及離胺酸(K)所組成的群組；

B_1 是選自由離胺酸(K)、精胺酸(R)、異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組；

B_2 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)、纈胺酸(V)、苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、及色胺酸(W)所組成的群組；

B_3 是選自由異白胺酸(I)、白胺酸(L)及纈胺酸(V)所組成的群組；

B_4 是選自由苯丙胺酸(F)、色胺酸(W)及酪胺酸(Y)所組成的群組；以及

B_5 是選自由苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)、蘇胺酸(T)、半胱胺酸(C)及絲胺酸(S)組成的群組；且

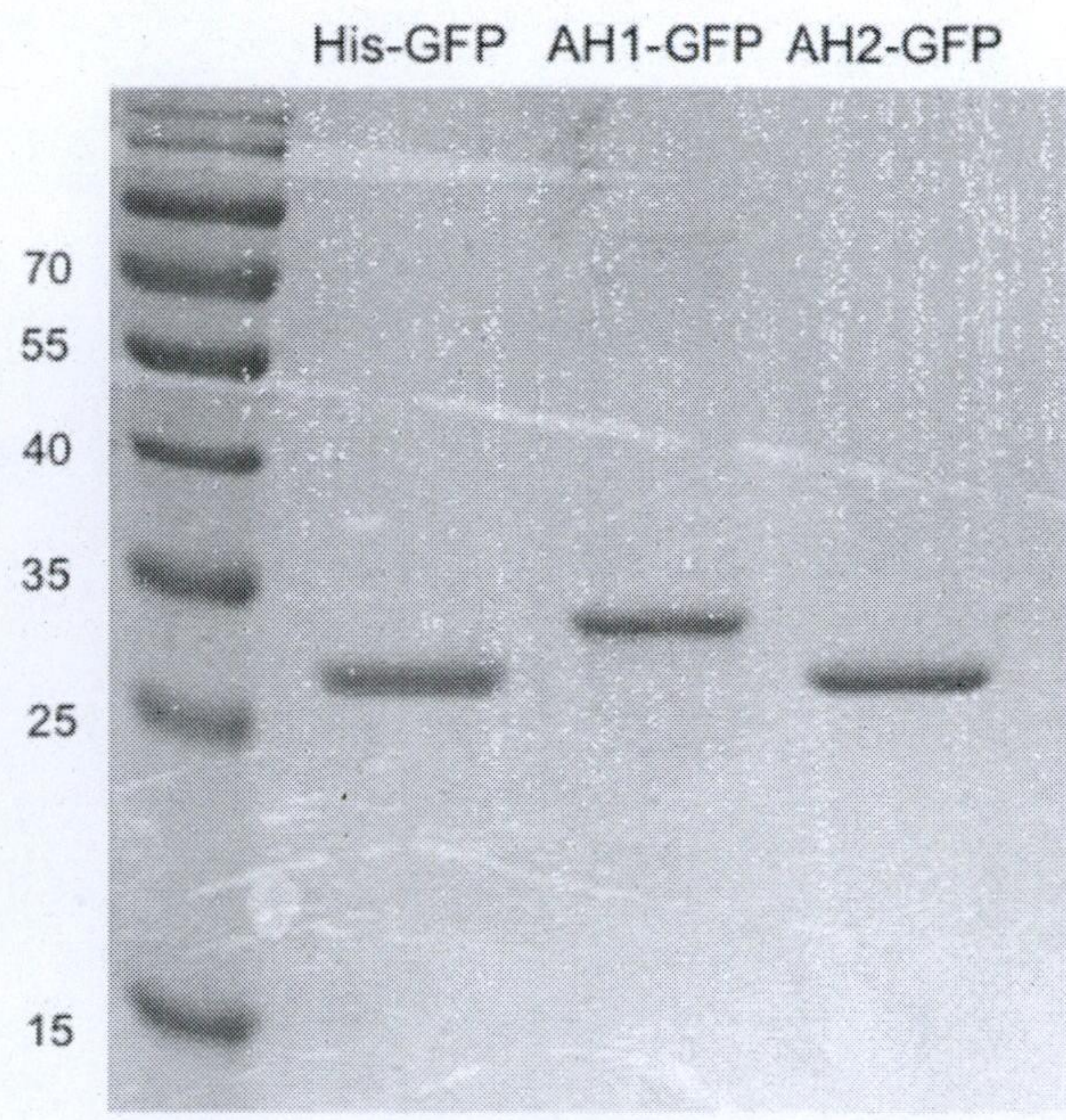
該 $A_1B_1B_2A_2$ 及/或 $A_3B_3B_4B_5A_4$ 基序、該第一胜肽以及該第二胜肽形成兩親性螺旋二級結構，

2019/11/18

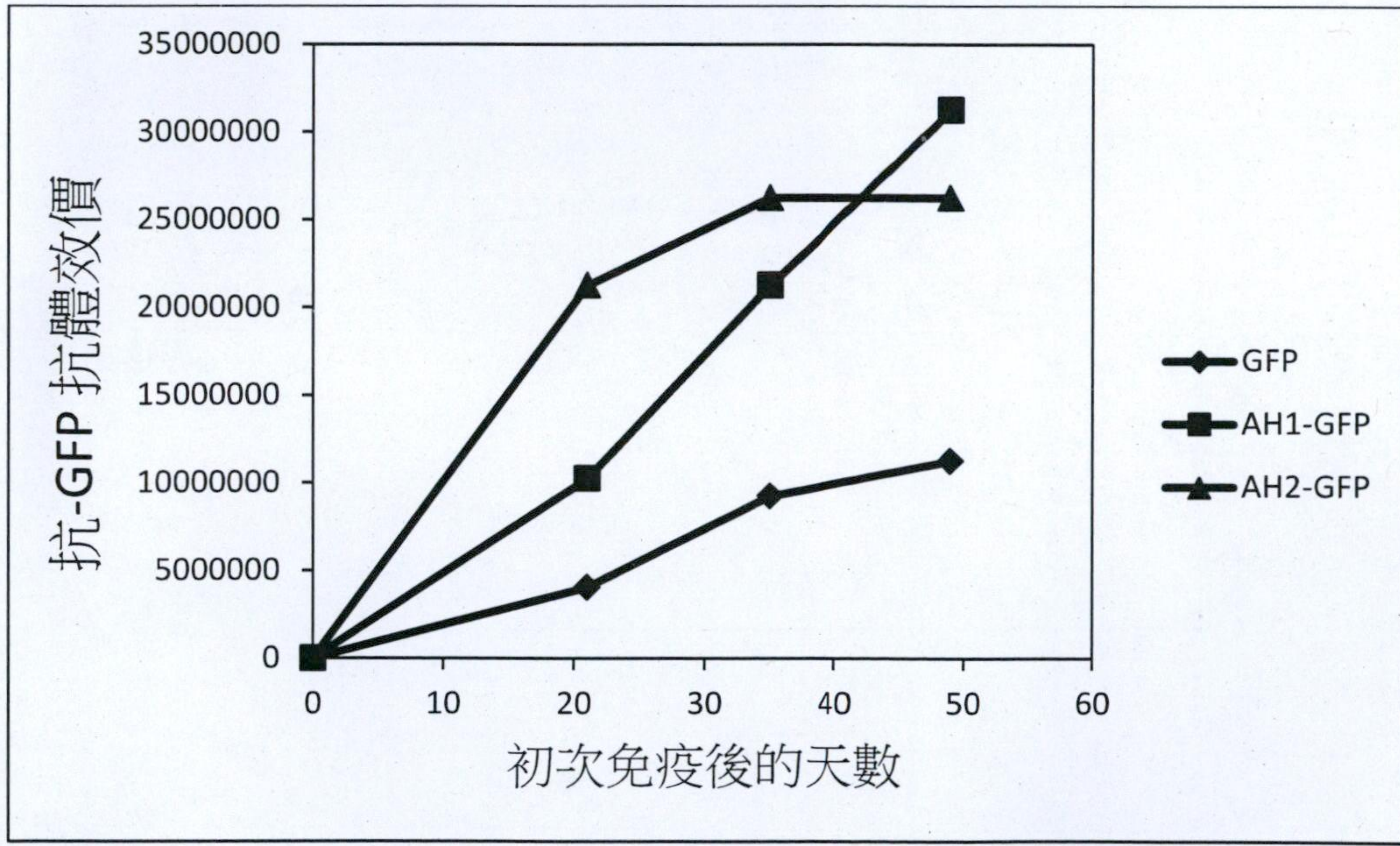
其中該抗原複合物不包含棕櫚醯基油醯基磷脂醯膽鹼、二油醯基磷脂醯膽鹼、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼、棕櫚醯基亞油烯基磷脂醯膽鹼及神經鞘磷脂。

【第10項】如申請專利範圍第 12 項所述之用途，其中該抗原是選自由寡醣、多肽、蛋白質、多醣、胜肽及其組合所組成的群組。

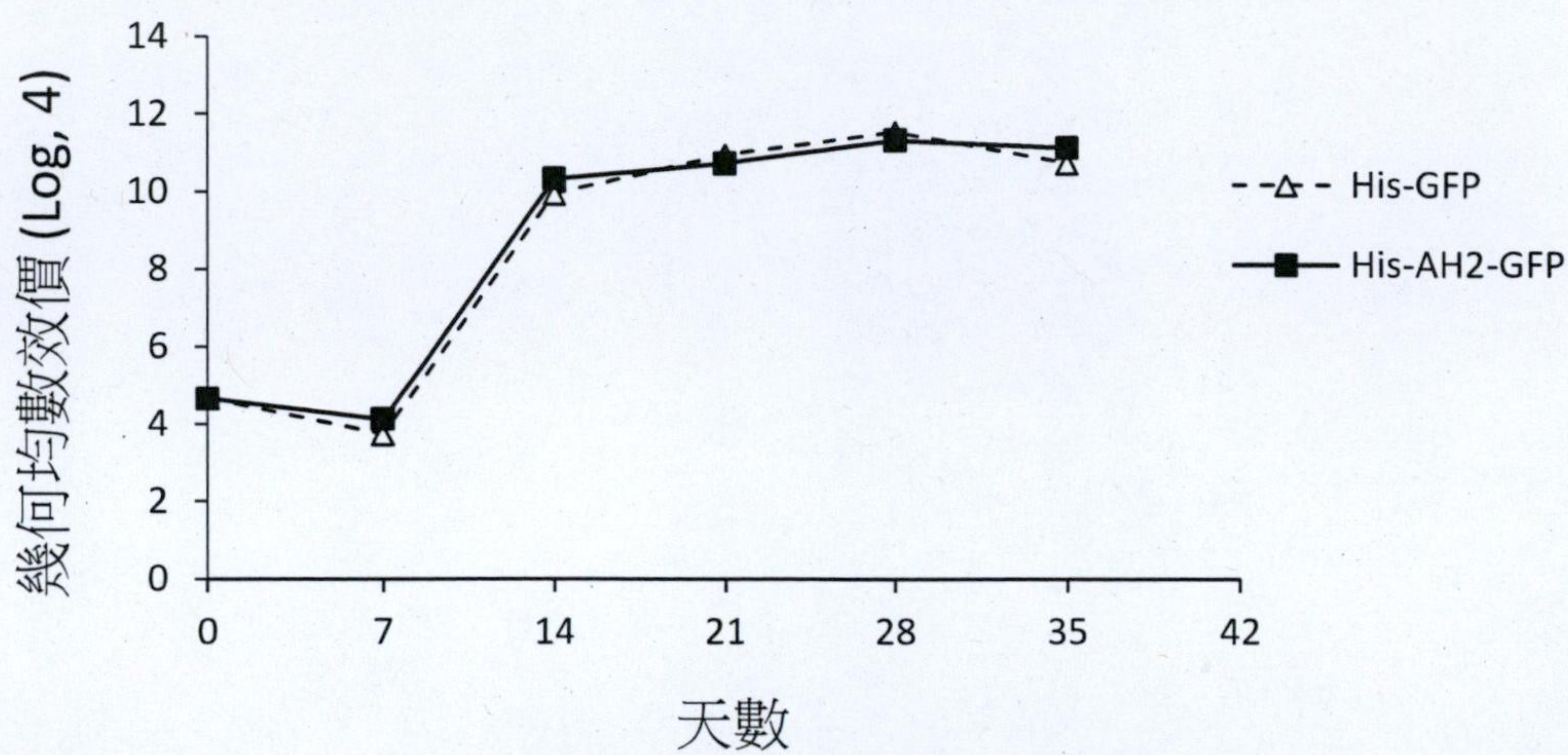
【發明圖式】



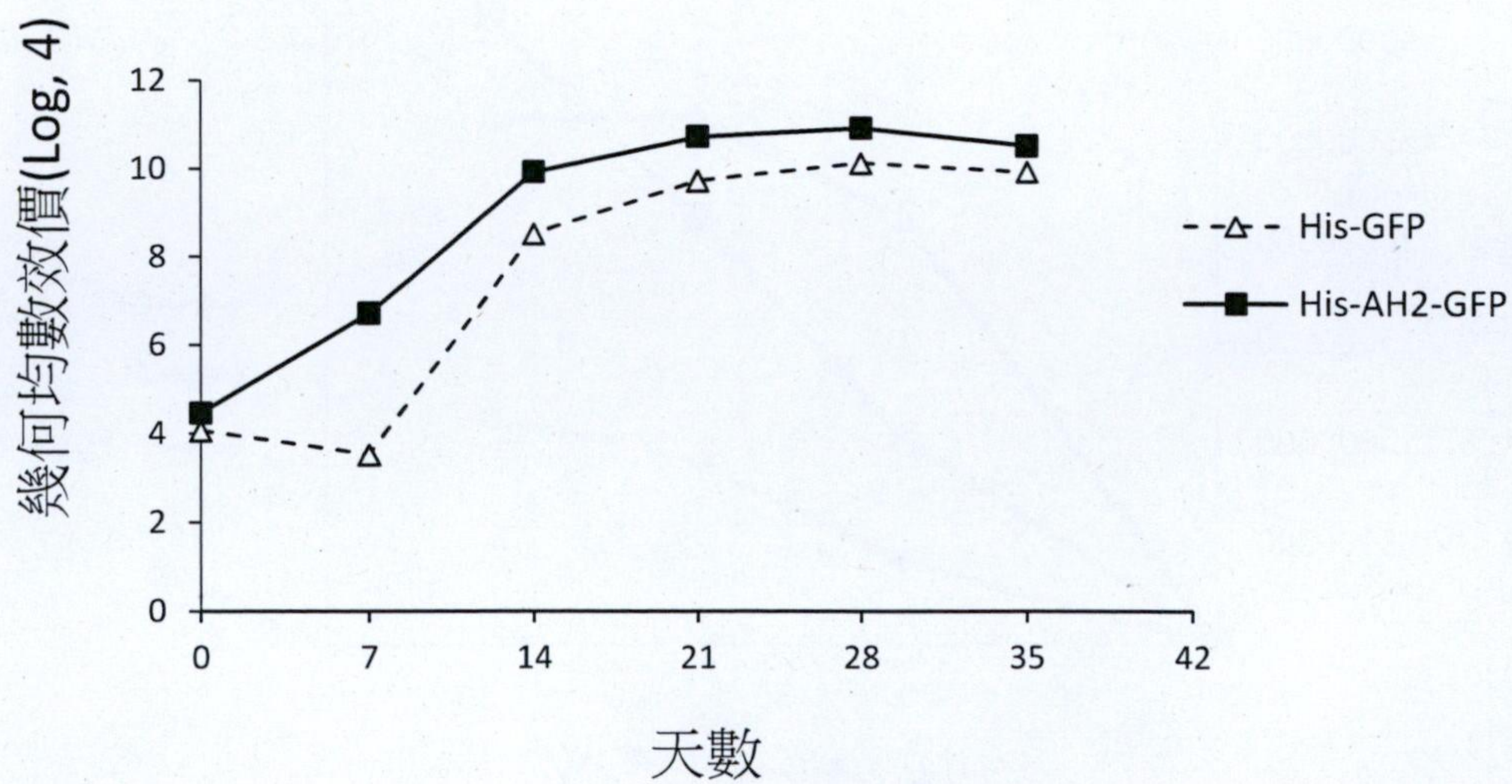
第 1A 圖



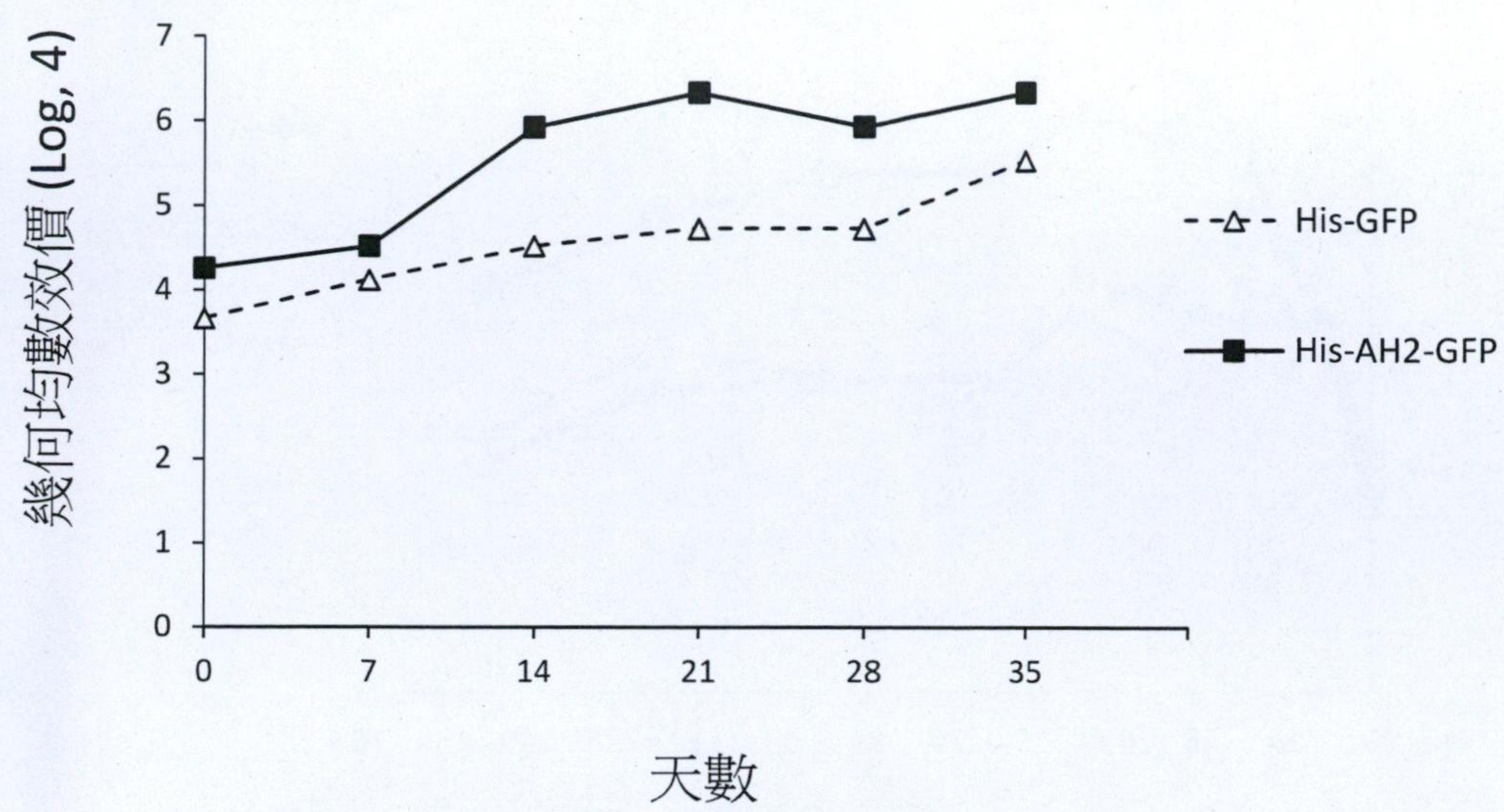
第1B圖



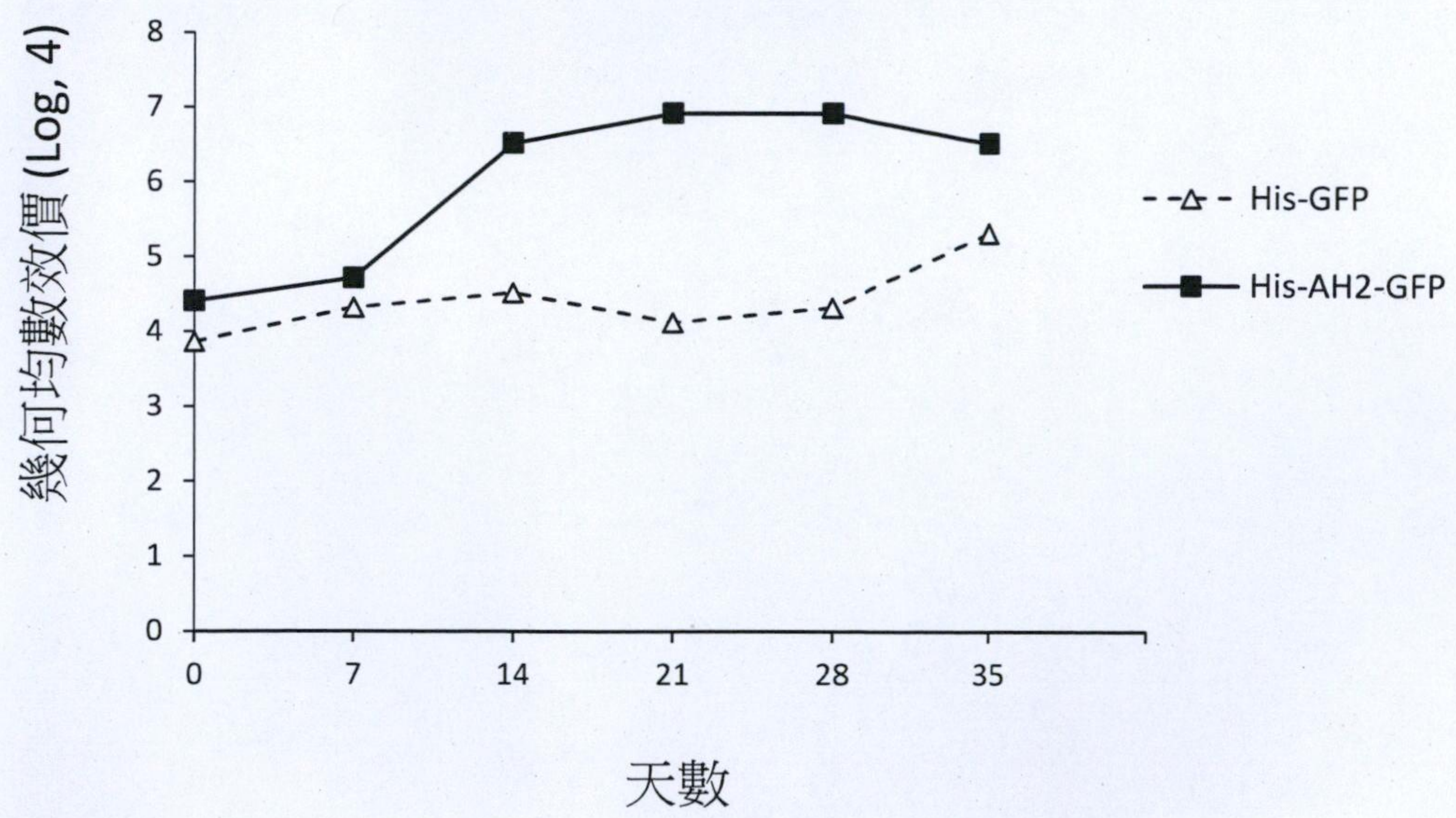
第2A圖



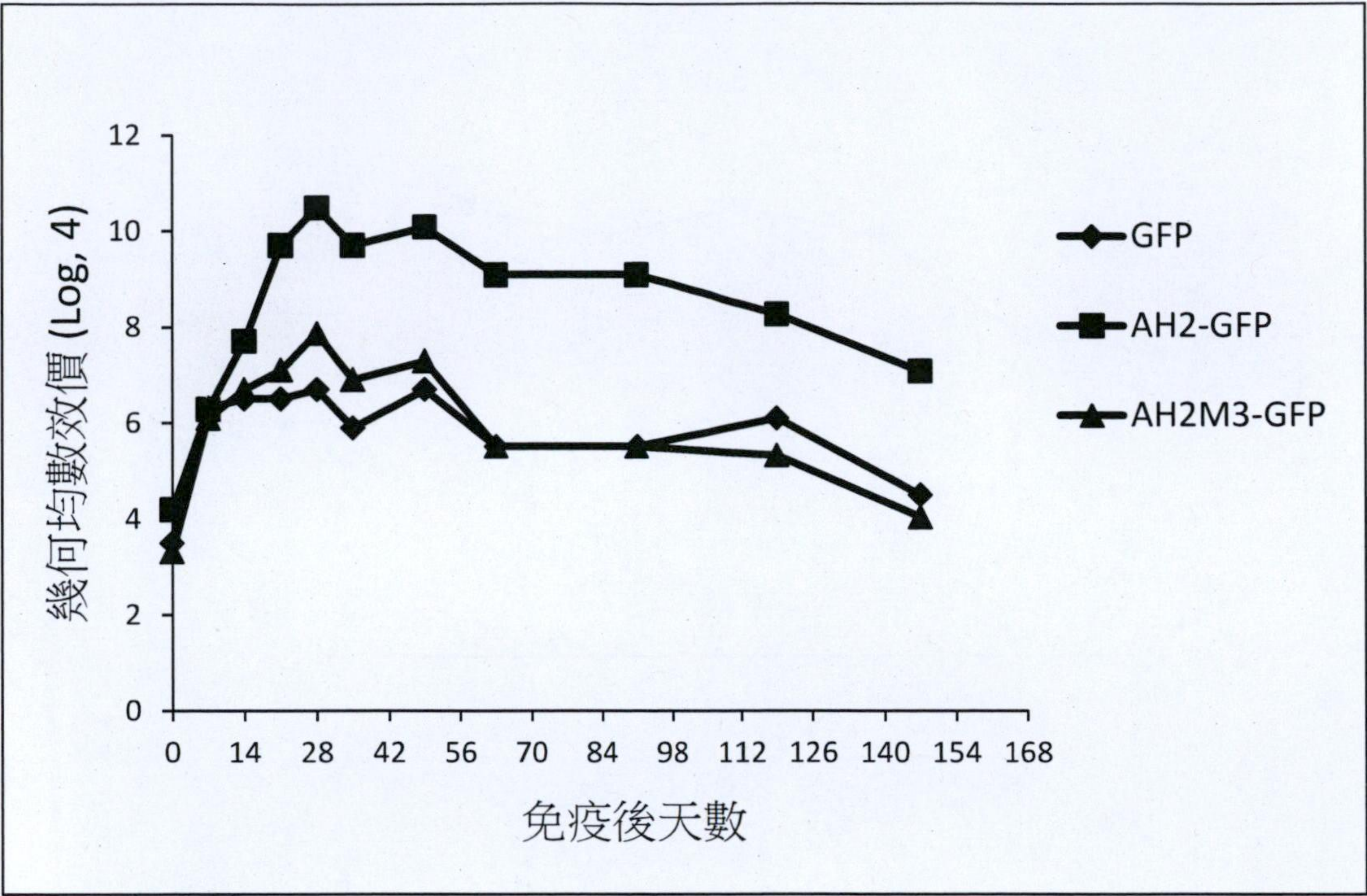
第2B圖



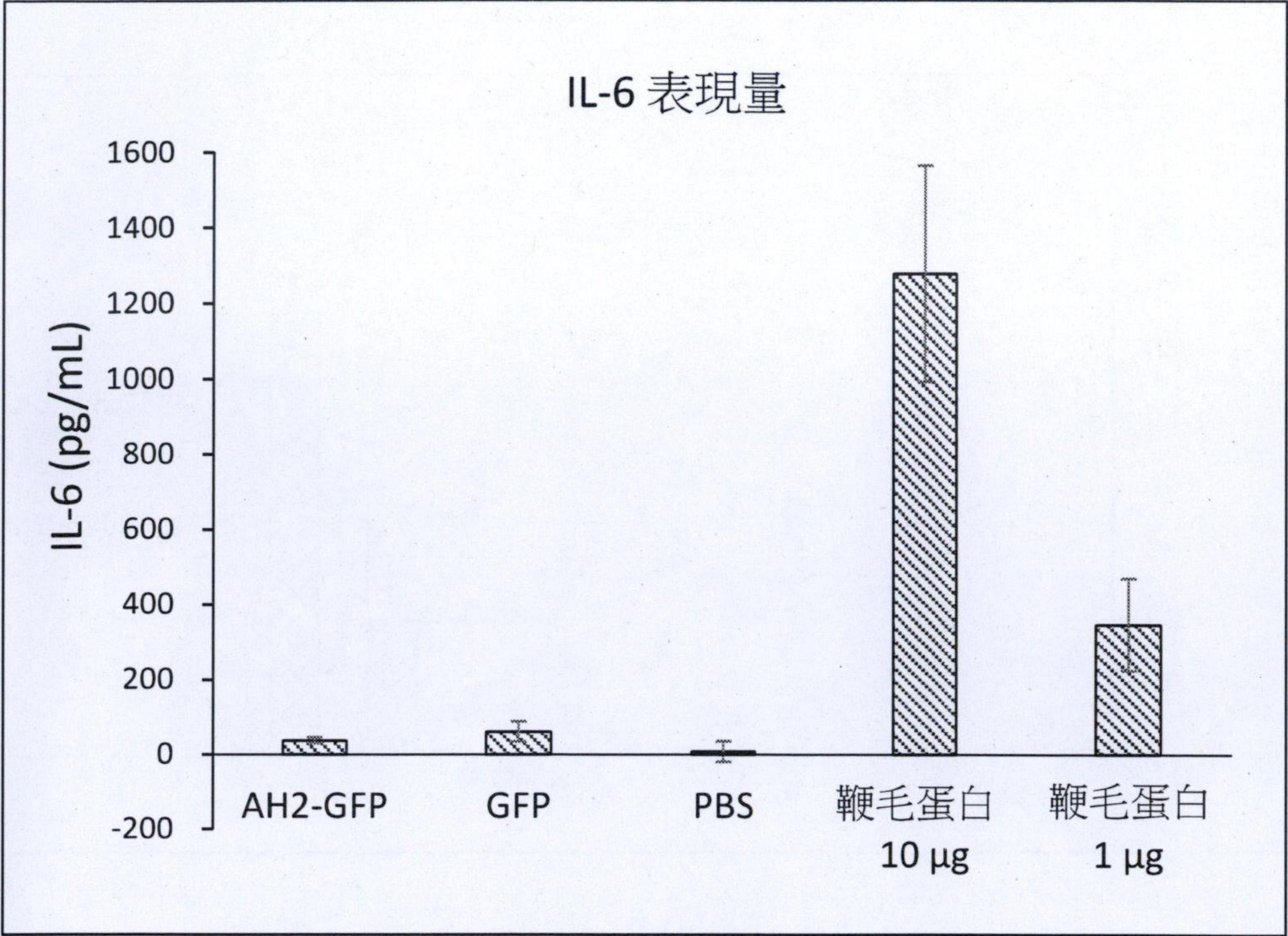
第2C圖



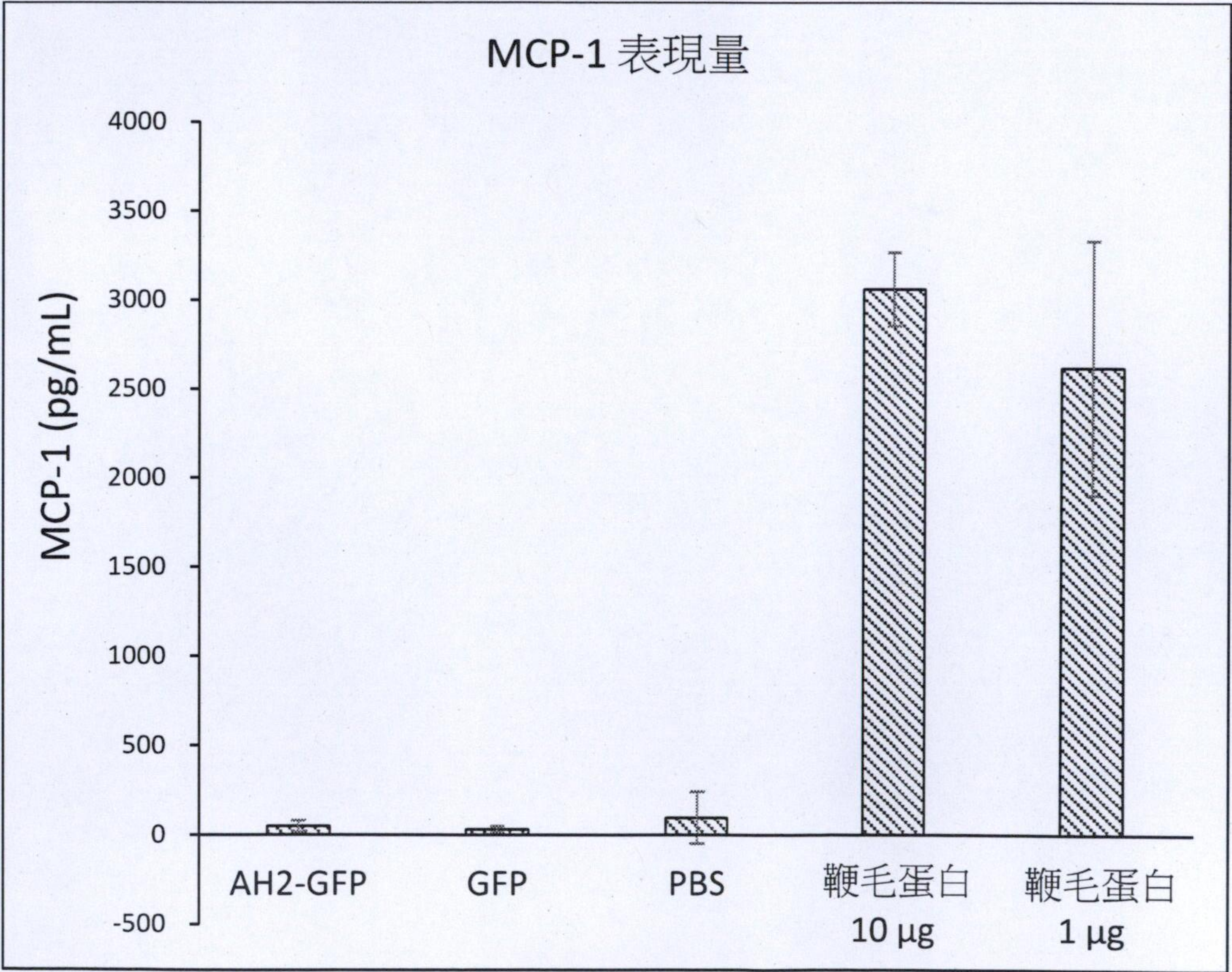
第2D圖



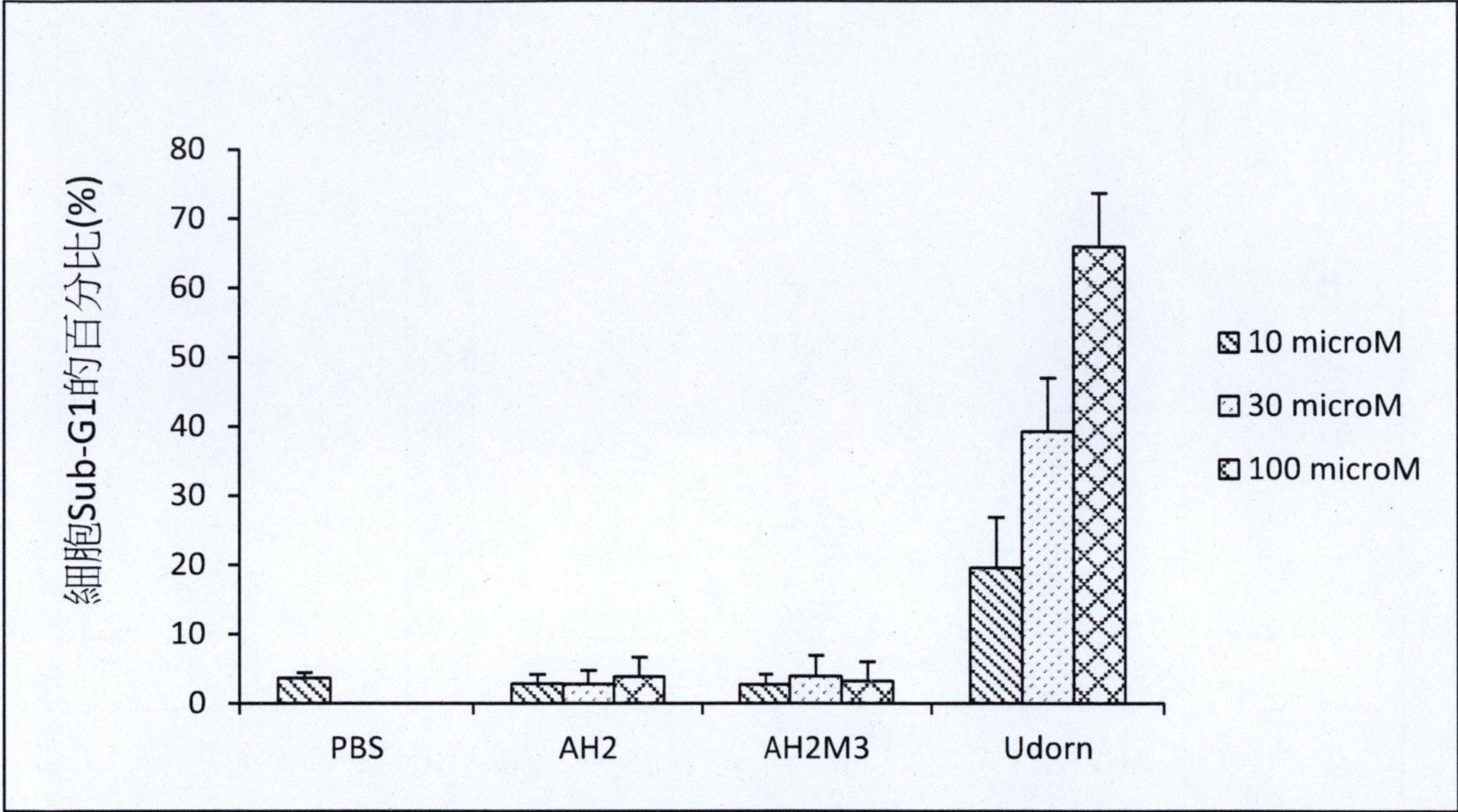
第3圖



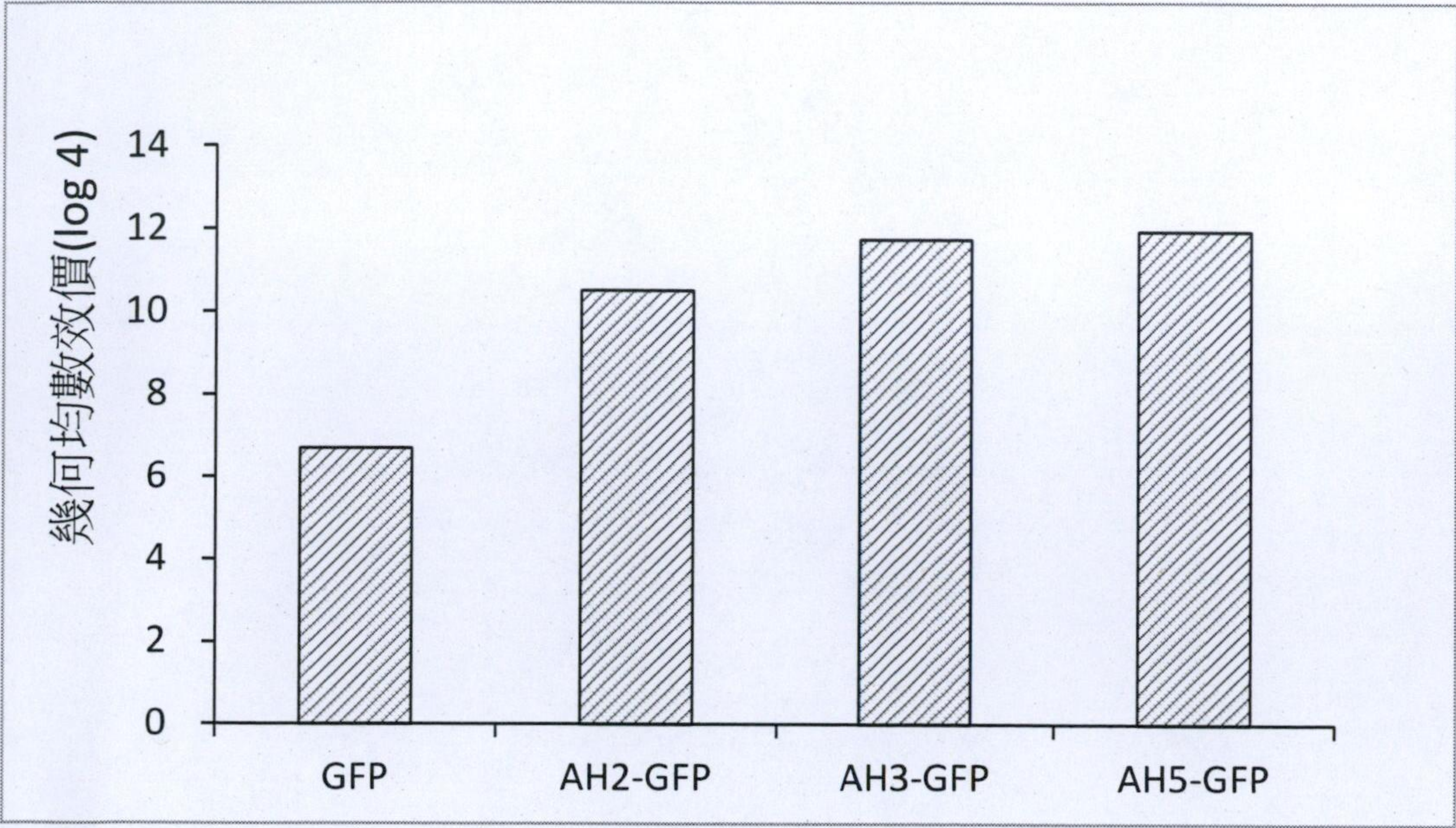
第 4A 圖



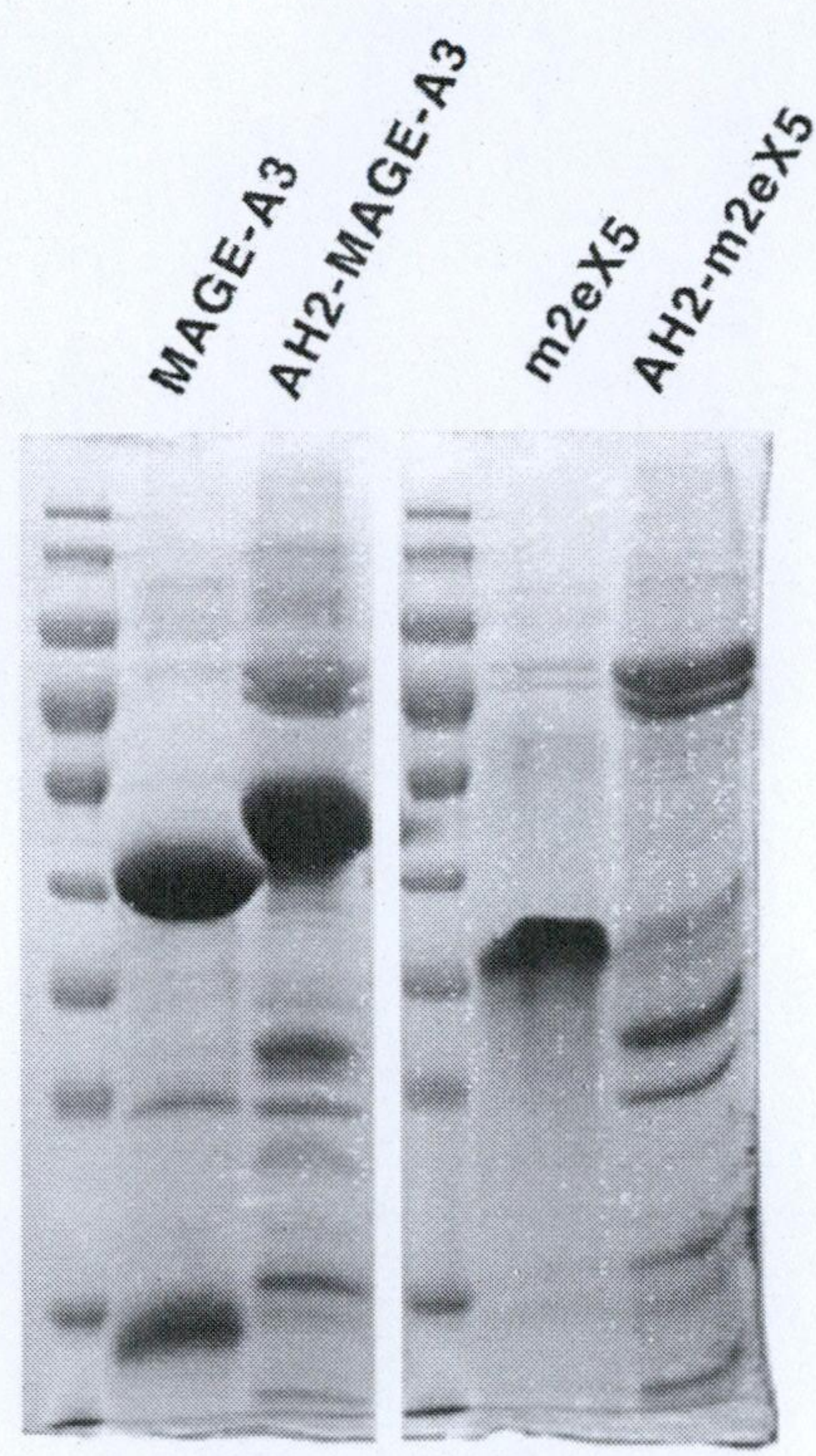
第 4B 圖



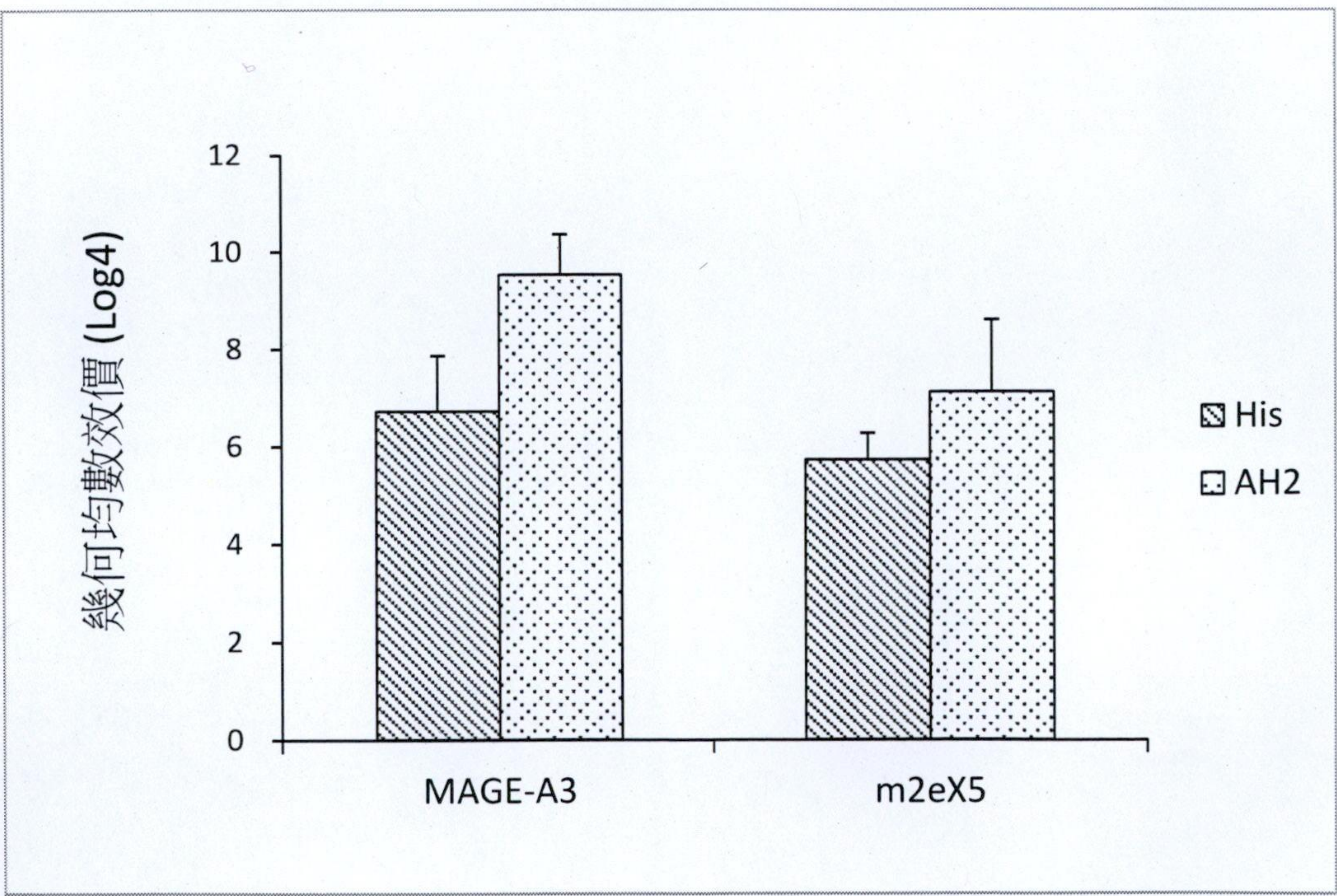
第 4C 圖



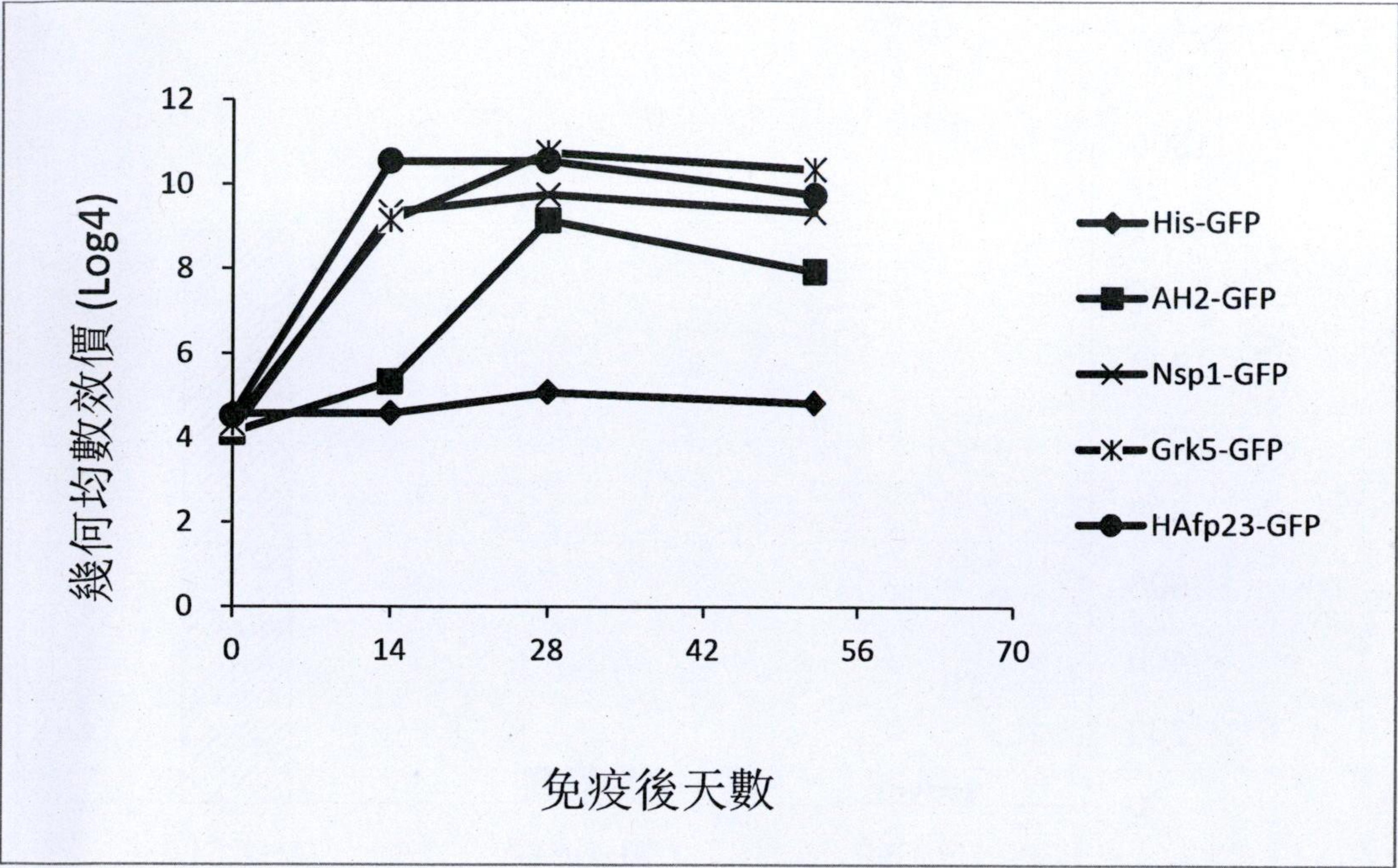
第 5 圖



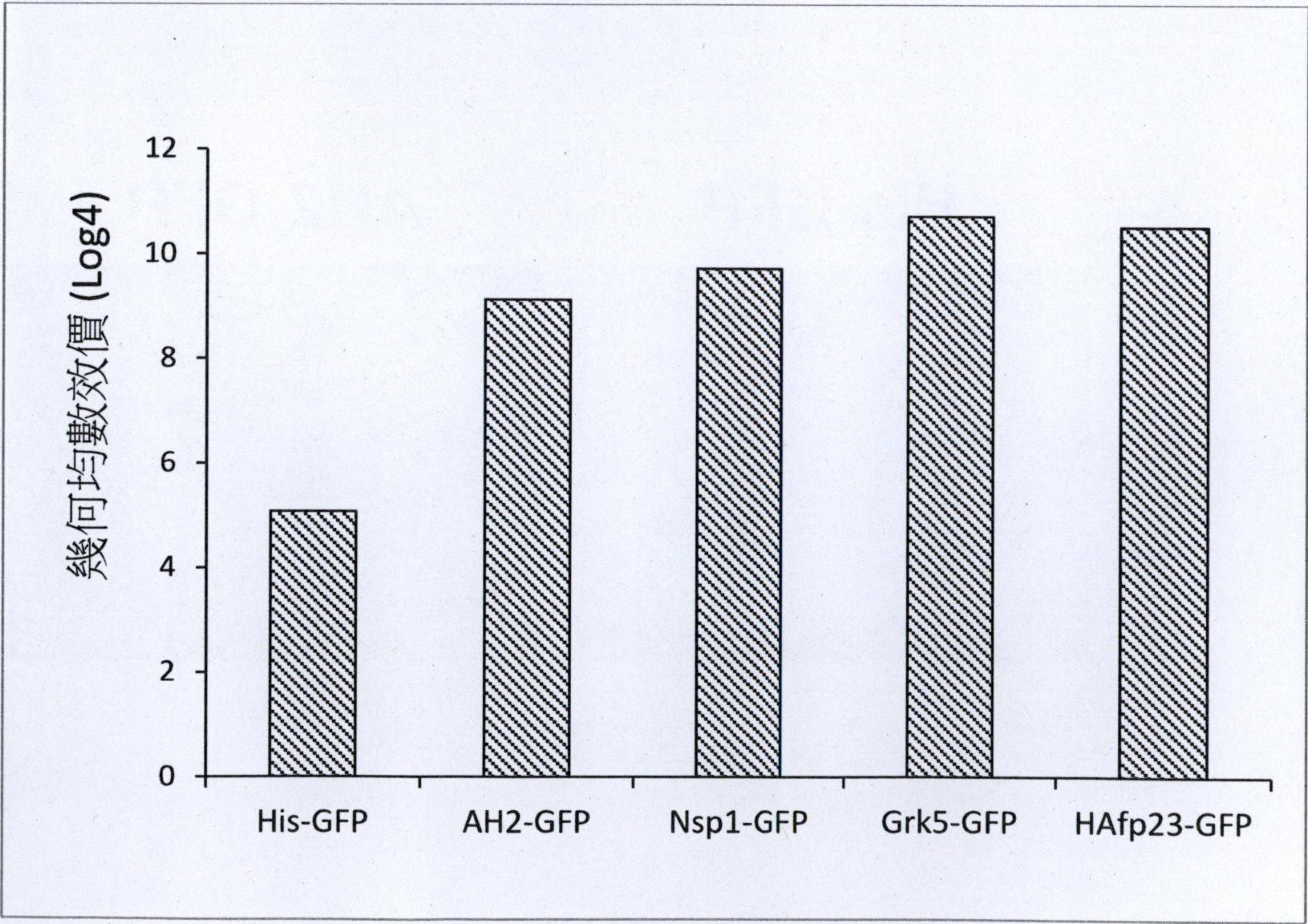
第 6A 圖



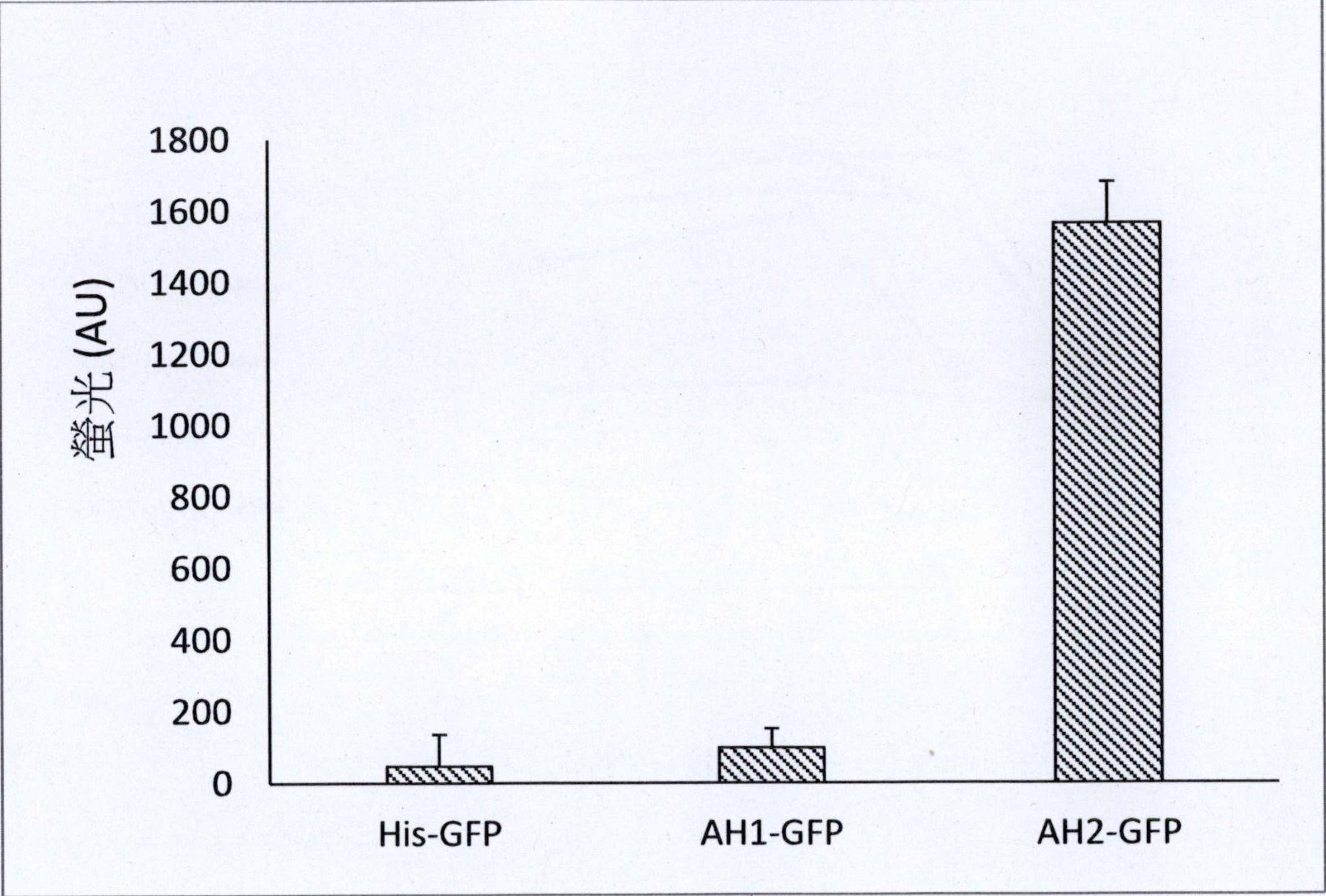
第 6B 圖



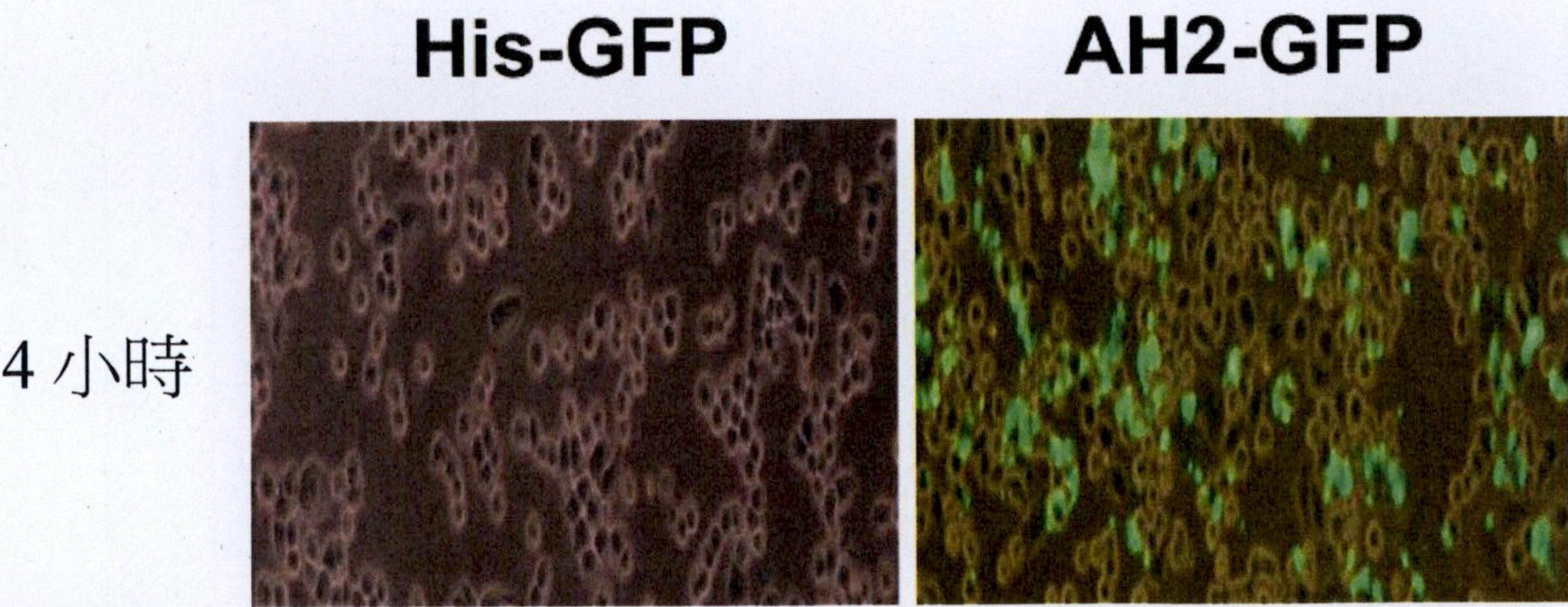
第 7A 圖



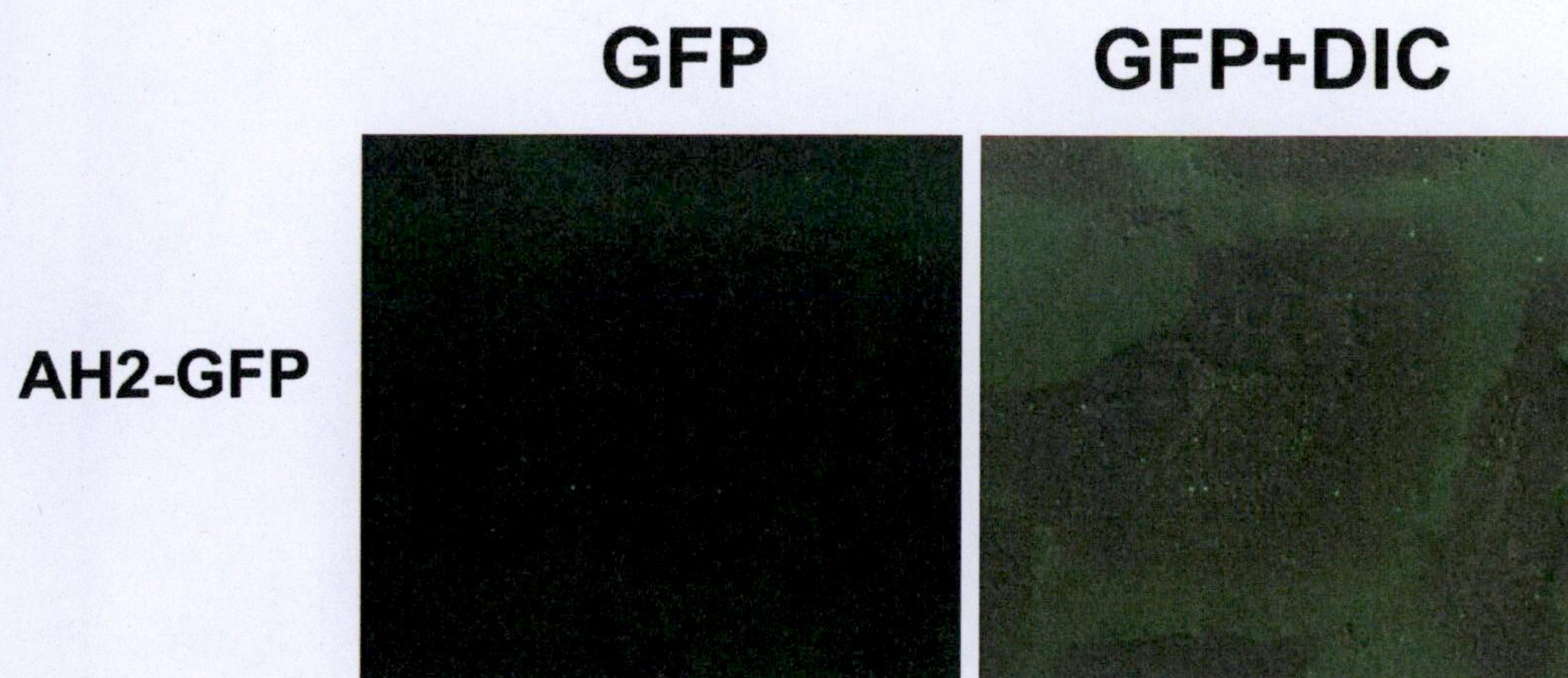
第 7B 圖



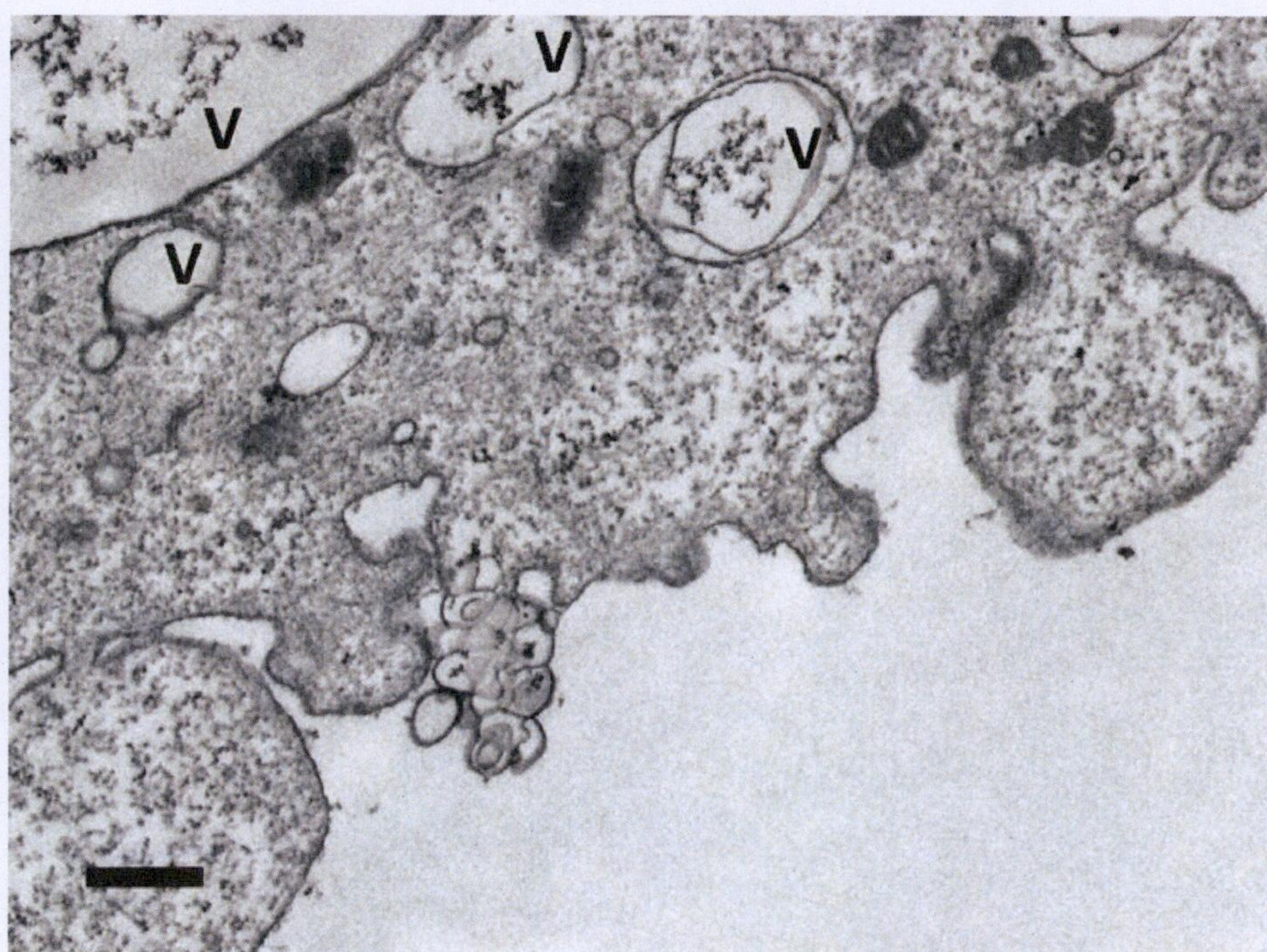
第 8A 圖



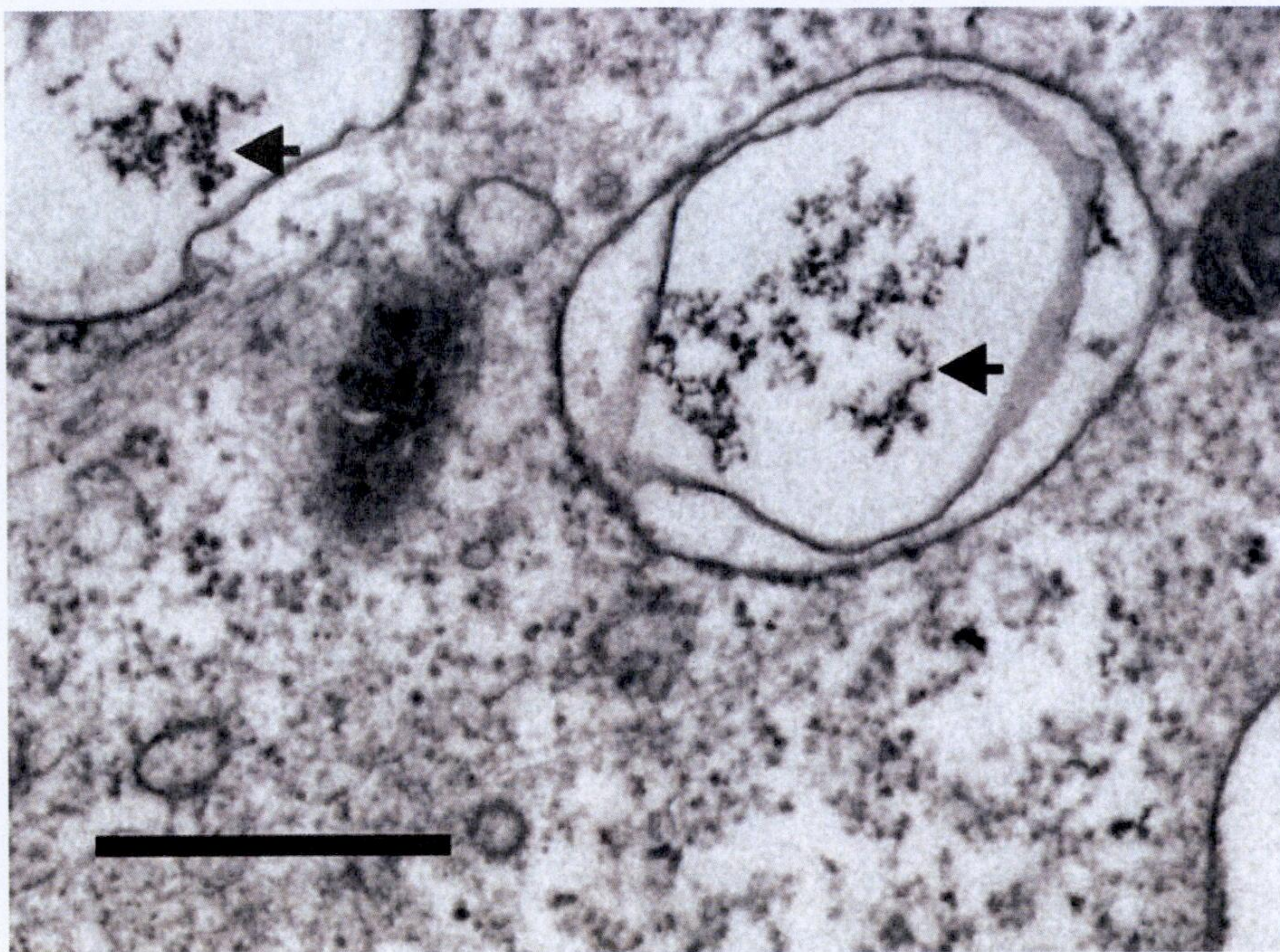
第 8B 圖



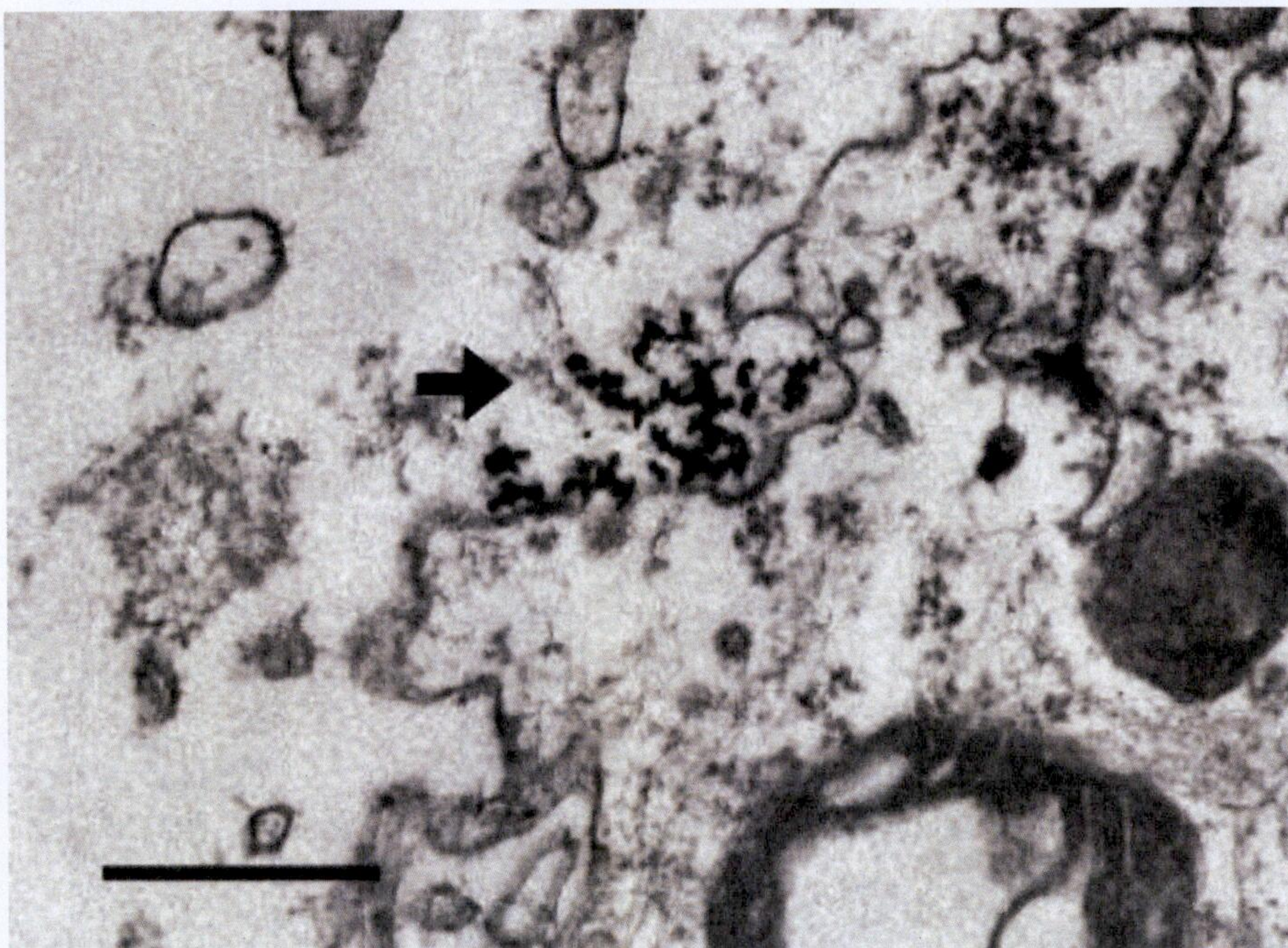
第 8C 圖



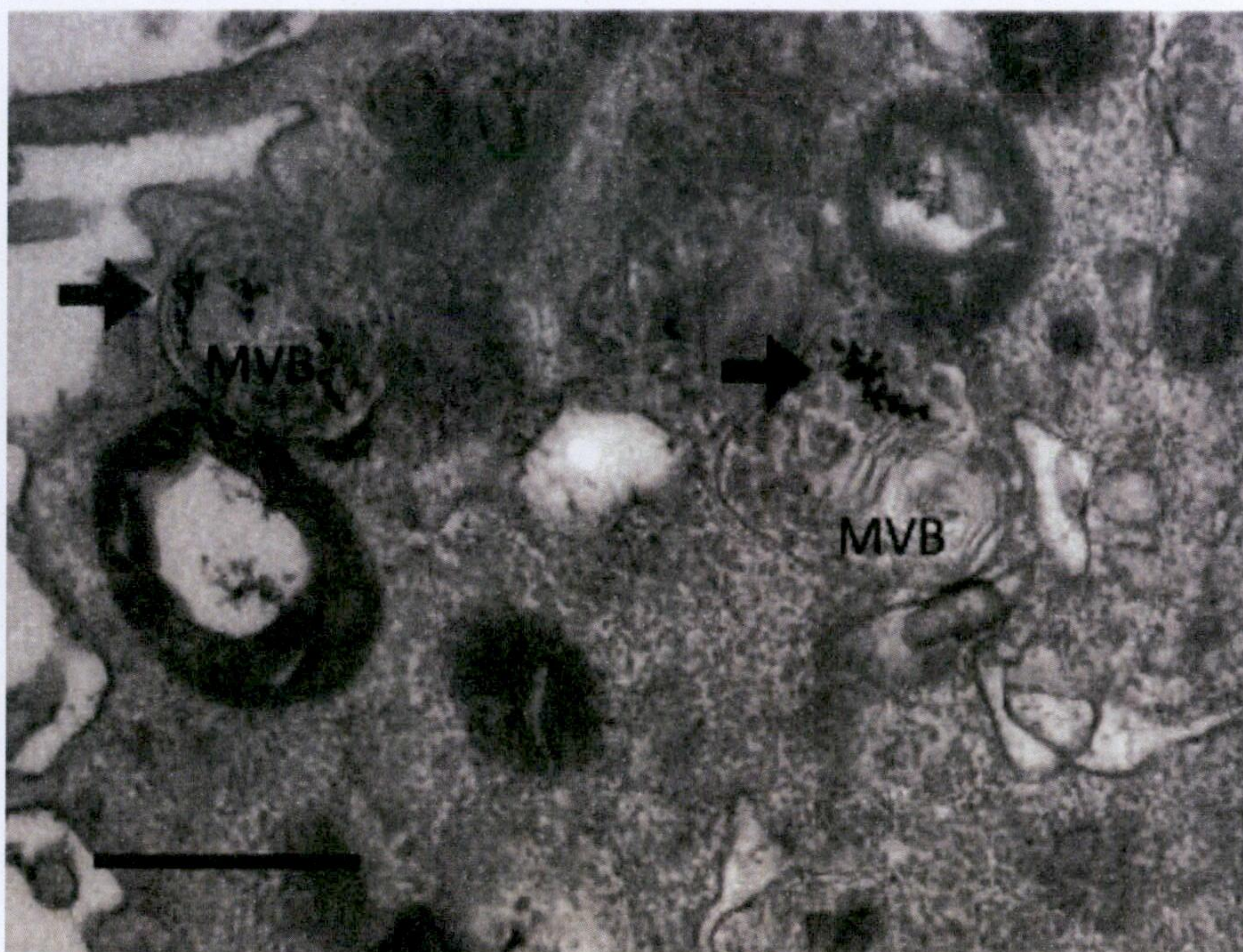
第 8D 圖



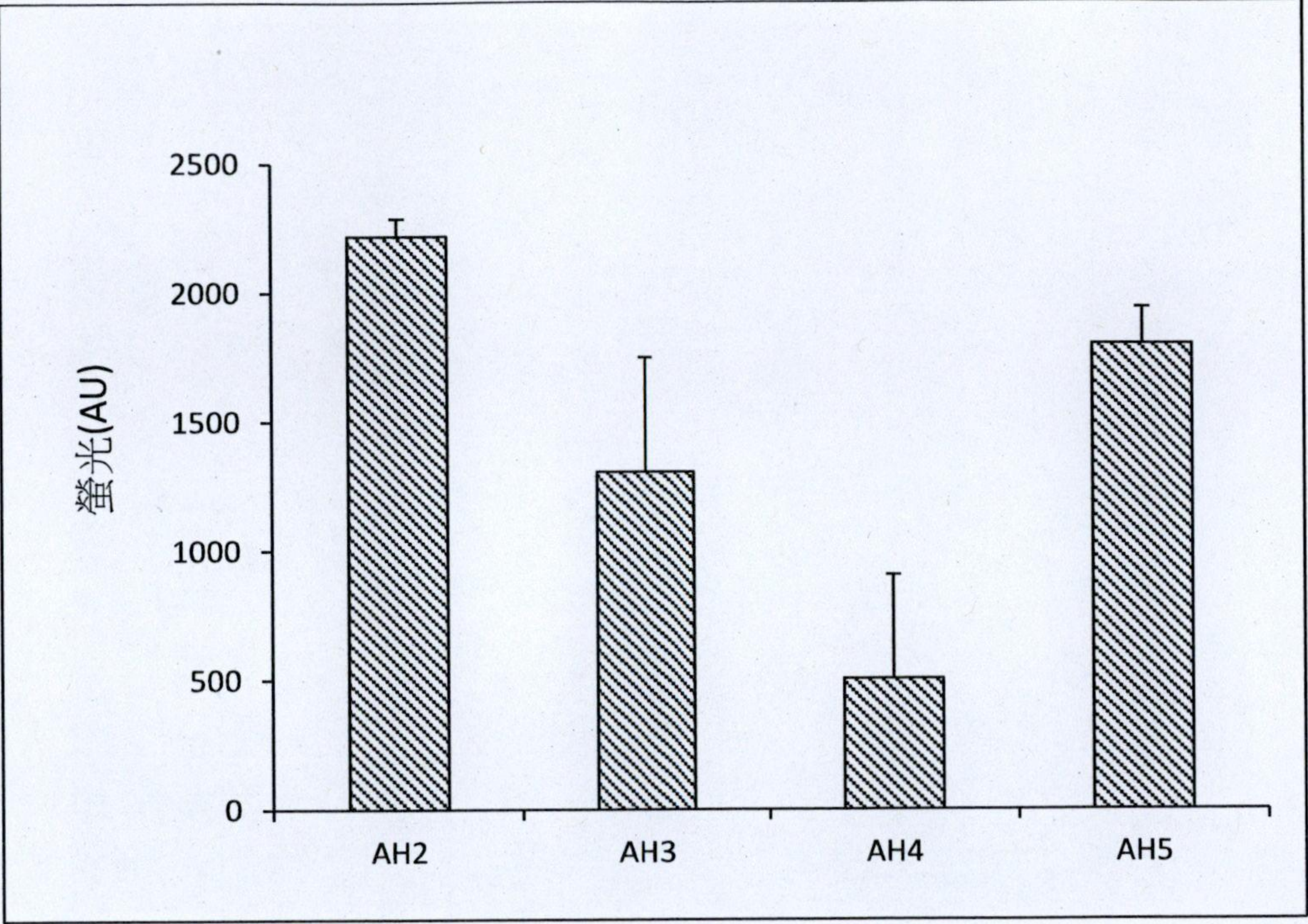
第 8E 圖



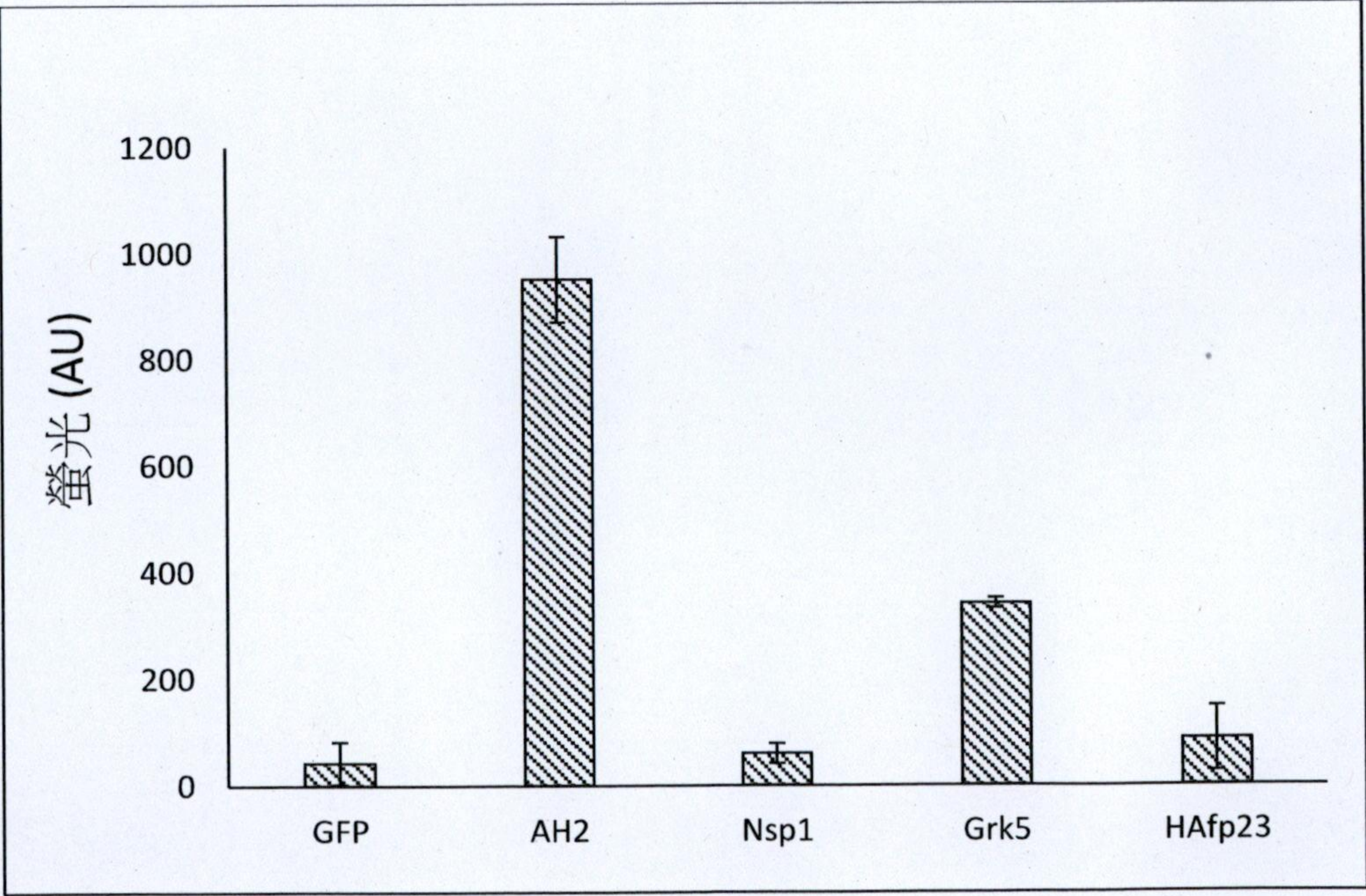
第 8F 圖



第 8G 圖



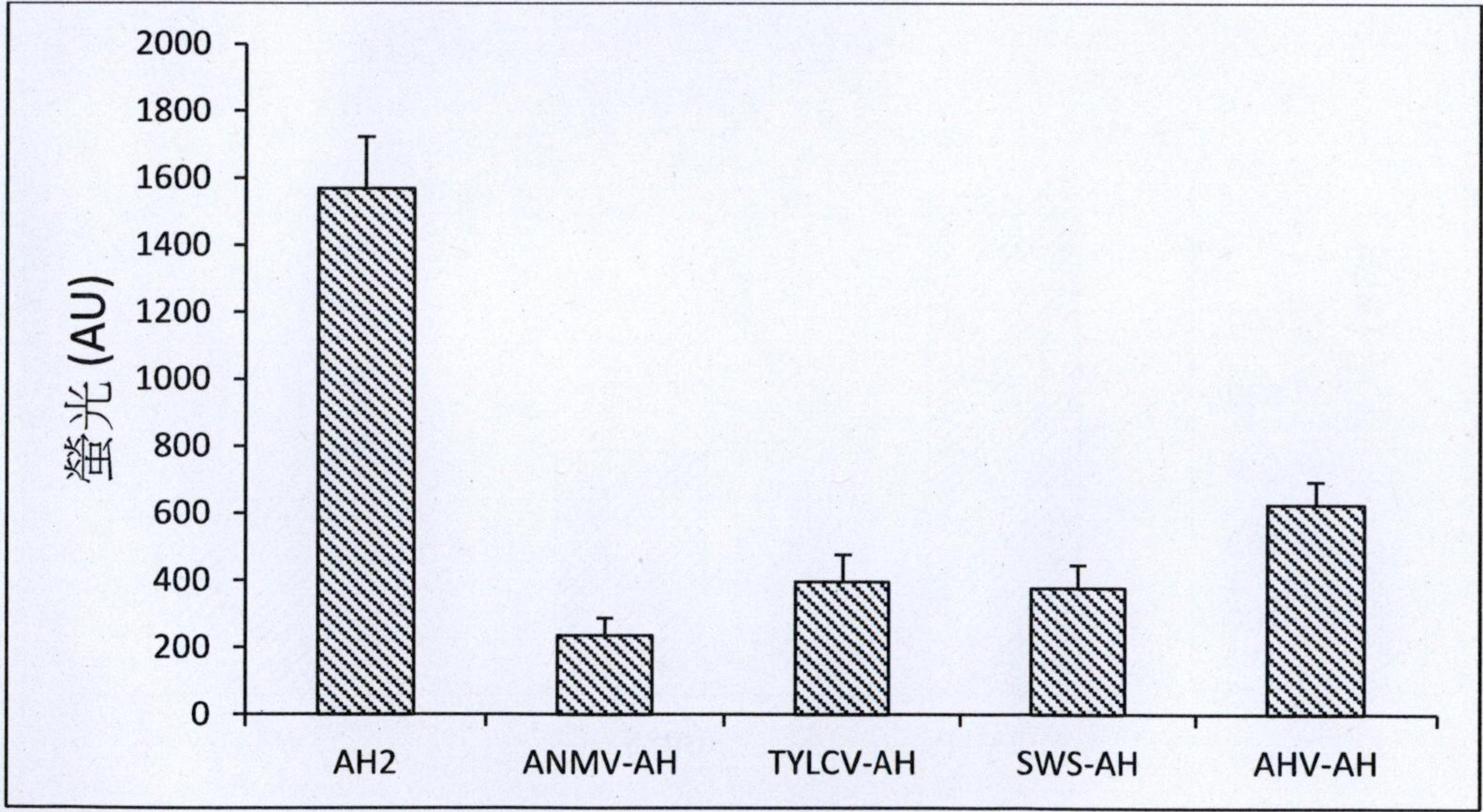
第 9A 圖



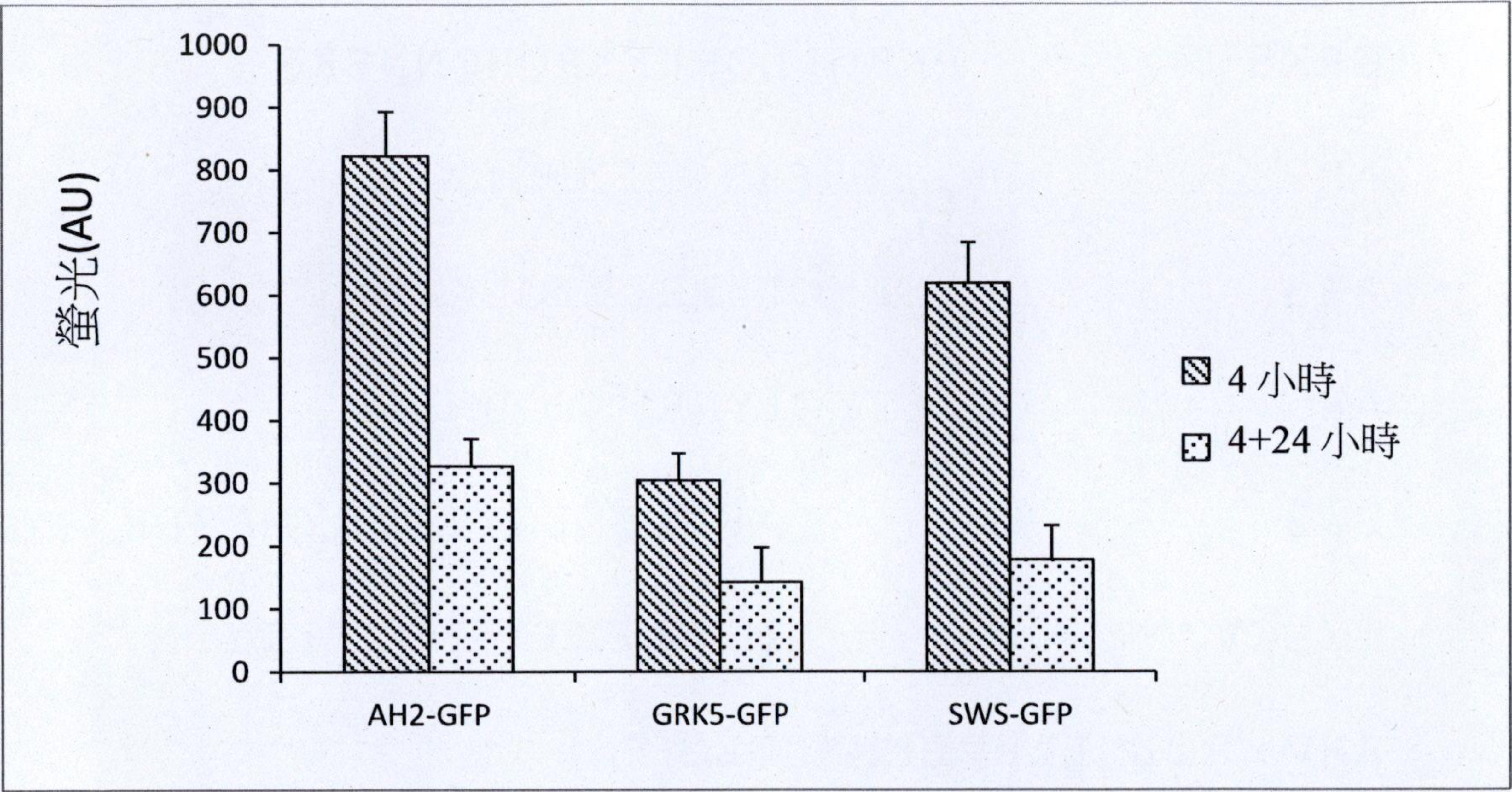
第 9B 圖

GRK5	PKKGLLQRLFKRQHQNNSKS
AH2	DRLFSKSIYRIFKHGLKRG
AH3	DRLFFKCIYRRLKYGLKRG
AH5	DRLFFKCIYRRFKYGLKRG
SWS	KRLFKLSYIETRYMASDK
TYLCV	MPRLFKIYAKNYFLTYPN
AHV	RTLSLLRRLFFKSDLGFL
ANMV	MHSATAAQLETLRLFKFP

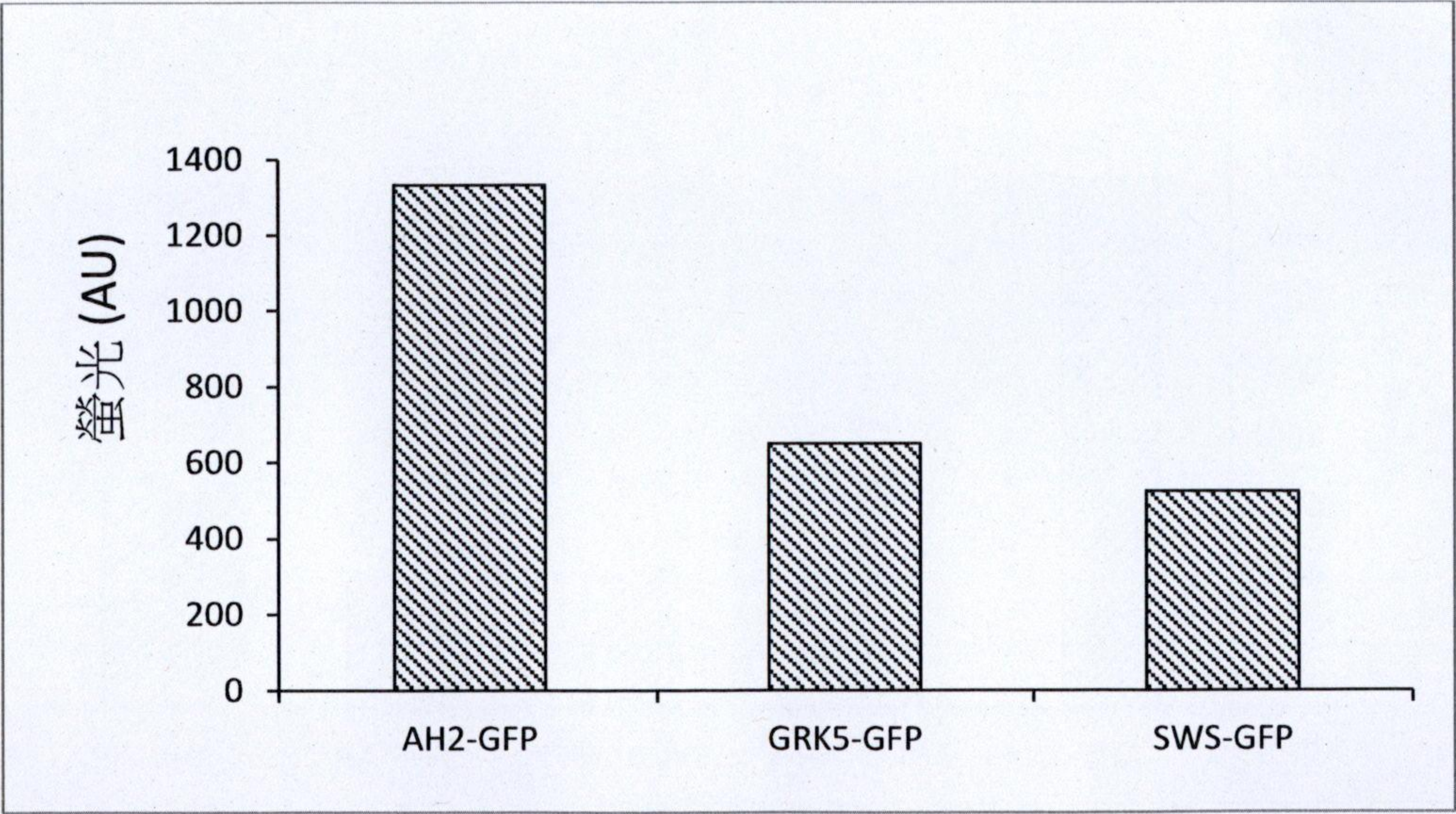
第 10A 圖



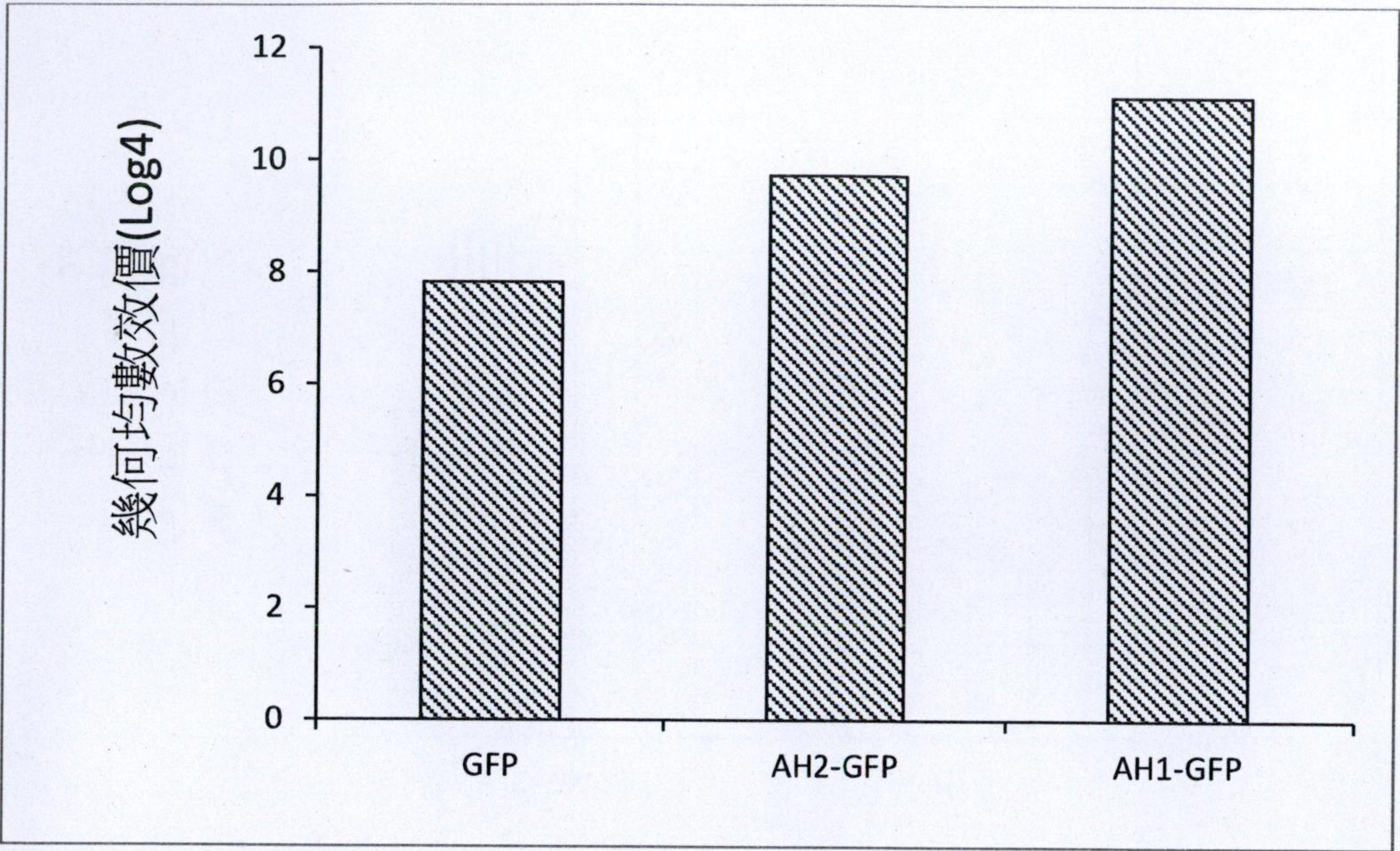
第 10B 圖



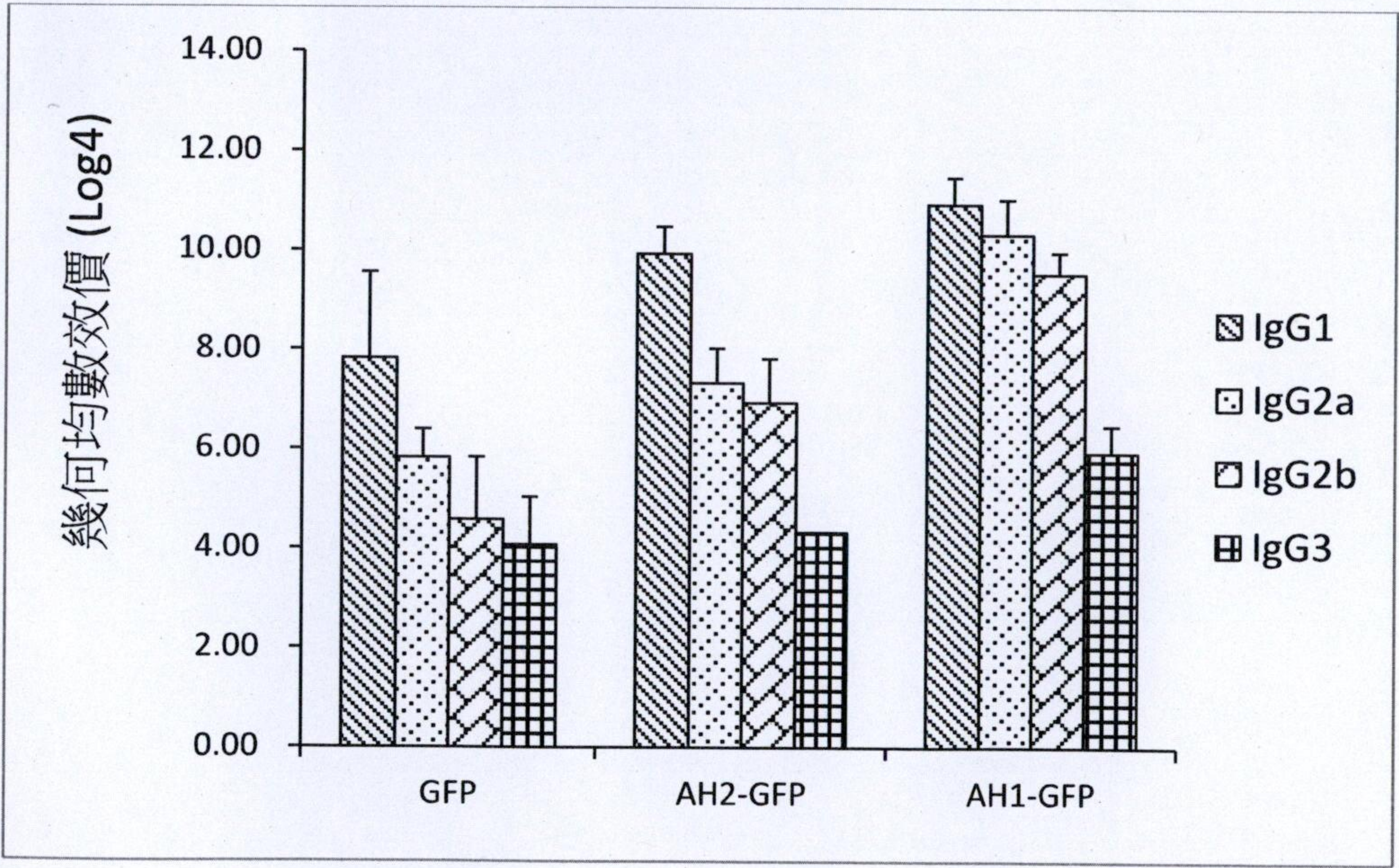
第 11A 圖



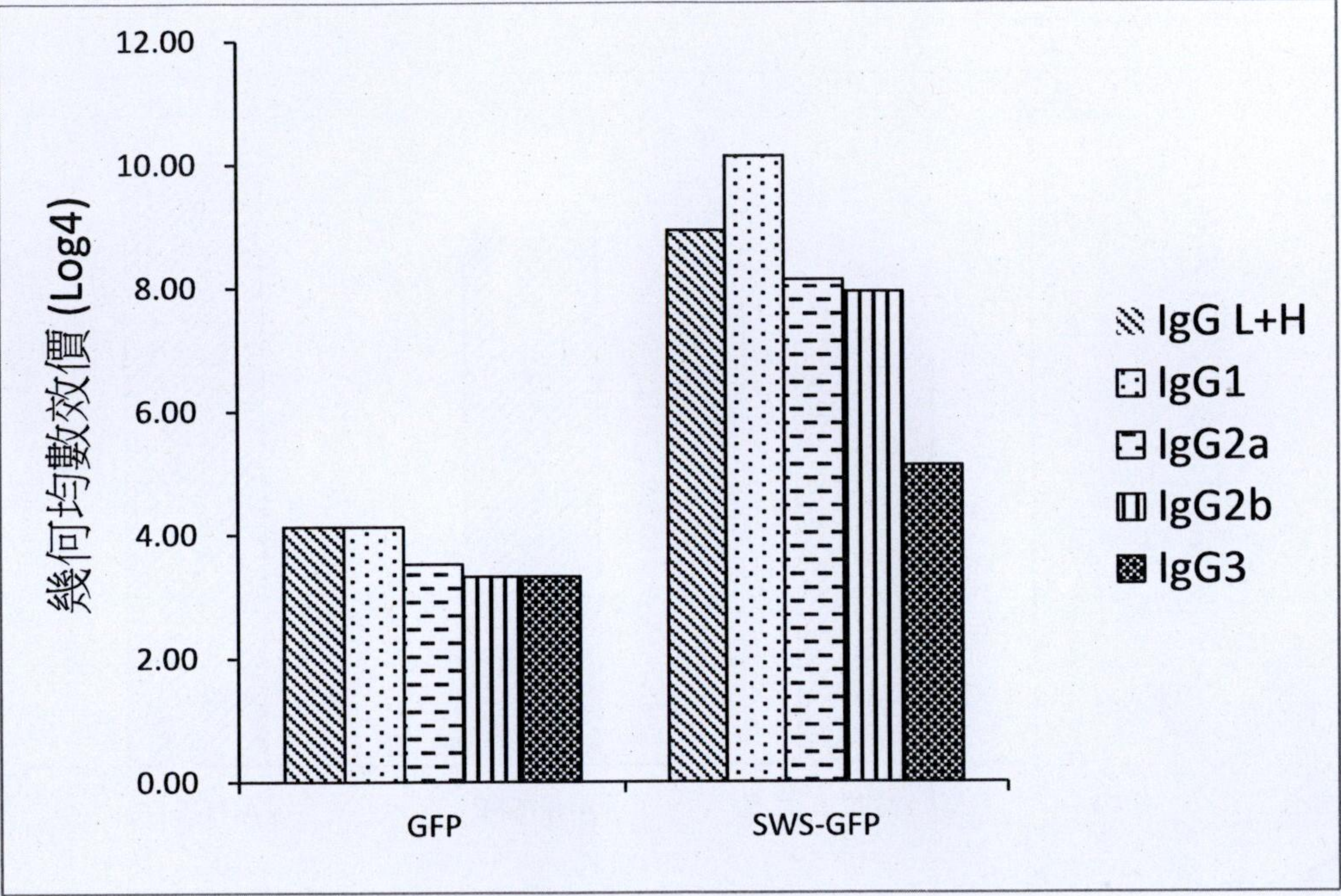
第 11B 圖



第 12A 圖



第 12B 圖



第 12C 圖