



(21)申請案號：105141502

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 06 日

(51)Int. Cl.：

*A61K39/00 (2006.01)**A61K39/05 (2006.01)**A61K39/39 (2006.01)**C07H15/256 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2013/01/04 美國

61/748,880

(71)申請人：台灣浩鼎生技股份有限公司 (中華民國) OBI PHARMA INC (TW)

臺北市南港區園區街 3 號 F 棟 19 樓 W1907 室

(72)發明人：李威漢 LEE, WEI HAN (TW)；王南綸 WANG, NAN HSUAN (TW)；張忠豪 CHANG, CHUNG HAO (TW)；謝義簧 HSIEH, YIH HUANG (TW)；游丞德 YU, CHENG DER TONY (TW)；王正琪 WANG, CHENG CHI (TW)；林雨新 LIN, YU HSIN (TW)；林侑蓁 LIN, YU CHEN (TW)；陳怡如 CHEN, I JU (TW)

(74)代理人：楊長峯；李國光；張仲謙

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：14 項 圖式數：7 共 45 頁

(54)名稱

具有較高碳水化合物抗原密度之疫苗及其醫藥組成物

VACCINES WITH HIGHER CARBOHYDRATE ANTIGEN DENSITY AND NOVEL SAPONIN ADJUVANT

(57)摘要

本發明提供包含與作為載體蛋白之白喉毒素 (DT) 結合之碳水化合物抗原的疫苗，其中碳水化合物抗原分子與載體蛋白分子之數目比高於 5:1。本文亦揭示一種新穎皂素佐劑及藉由投與有效量之本文所揭示之疫苗抑制癌細胞之方法。

The present invention provides vaccines comprising carbohydrate antigen conjugated to a diphtheria toxin (DT) as a carrier protein, wherein the ratio of the number of carbohydrate antigen molecule to the carrier protein molecule is higher than 5:1. Also disclosed herein is a novel saponin adjuvant and methods to inhibit cancer cells, by administering an effective amount of the vaccine disclose herein.

【發明說明書】

【中文發明名稱】具有較高碳水化合物抗原密度之疫苗及其醫藥組成物
【英文發明名稱】VACCINES WITH HIGHER CARBOHYDRATE ANTIGEN DENSITY AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS THEREOF

【技術領域】

【0001】[相關申請案之交叉引用]

【0002】本申請案主張 2013 年 1 月 4 日申請之美國申請案第 61/748,880 號之權益，該美國申請案之全部揭示內容以引用之方式併入本文中。

【先前技術】

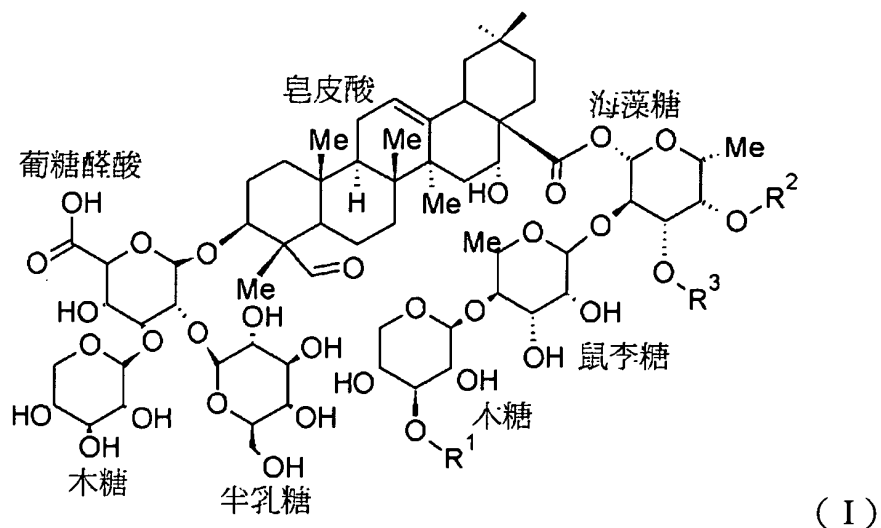
【0003】癌症疫苗經設計藉由免疫系統強化身體天然保護自身之能力來治療癌症。其始終代表一種極具吸引力之治療方法，尤其鑒於在癌症治療中習知的手術、輻射及化學療法存在許多缺點。然而，由於癌症碳水化合物抗原之低免疫原性及許多合成疫苗主要誘發 IgM 及較低程度的 IgG 抗體，該癌症疫苗之有效性仍為低的。已探索不同的方法（諸如使用佐劑）以促進免疫識別及活化。

【0004】目前仍存在一種未滿足之需要，即開發一種具有改良免疫反應（尤其為 IgG 反應）之癌症疫苗及有效佐劑。本發明提供針對碳水化合物抗原之疫苗及佐劑以滿足此等及其他需要。

【發明內容】

【0005】在一個實施例中，本發明揭示一種包含碳水化合物抗原或其免疫原性片段及類毒素蛋白之疫苗，其中碳水化合物抗原與類毒素蛋白之比率在 5:1 至 39:1 範圍內，其中該比率表示碳水化合物抗原與類毒素蛋白之分子數比。已發現碳水化合物抗原與類毒素蛋白之比率在 5:1 至 39:1 範圍內之疫苗的 IgG 產量相比於碳水化合物抗原與類毒素蛋白之比率等於或小於 4:1 之疫苗的 IgG 產量較高。

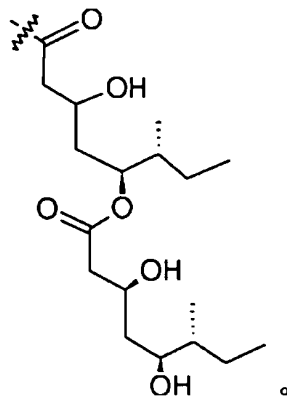
【0006】本發明之一個實施例提供經分離之式 (I) 化合物



或其醫藥學上可接受之鹽；

其中

R^1 係選自 β -D-芹菜糖或 β -D-木糖；



R^2 及 R^3 係選自 H、烷基或

—



苗進一步包含載體蛋白。已發現含有 OBI-821 皂素佐劑之疫苗的 IgG 產量、抗體依賴性細胞介導的細胞毒性 (ADCC) 及/或補體依賴性細胞毒性 (CDC) 活性相比於不含 OBI-821 皂素佐劑之疫苗較高。

【0010】本發明亦係關於用於以下之方法：(i) 抑制癌細胞，其包含向有需要之個體投與有效量之本文所述的疫苗，其中癌細胞受到抑制；及 (ii) 誘發免疫反應，其包含向有需要之個體投與有效量之本文所述的疫苗。

【0011】本發明亦揭示包含本文所述之疫苗及醫藥學上可接受之賦形劑或載劑之醫藥組合物。

【0012】含有此等術語之陳述應理解為不限制本文所述之主題或不限制以下專利申請專利範圍之涵義或範疇。此專利涵蓋之本發明的實施例藉由以下申請專利範圍而非此發明內容限定。此發明內容為本發明之各種態樣之高層次綜述且引入一些進一步描述於以下[實施方式]部分中之概念。此發明內容並不意欲確定所主張之主題之關鍵或基本特徵，亦不意欲孤立使用以確定所主張之主題的範疇。主題應參照整個說明書之適當部分、任一或所有圖式及各申請專利範圍來理解。

【0013】當閱讀以下附圖及[實施方式]時，本發明將變得更加清楚。

【圖式簡單說明】

【0014】以下圖式詳細描述本發明之說明性實施例：

圖 1 說明以下組合物第 24 天的抗 Globo H IgG 效價之柱狀圖：

Globo H/KLH/OBI-821 皂素、Globo H/DT/OBI-821 皂素、Globo

第 4 頁，共 32 頁(發明申請專利範圍)

H/DT/C34 及 Globo H/KLH/C34。

圖 1B 為說明圖 1A 中之組合物歷經 24 天時期的抗 Globo H IgG 效價之線繪圖。

圖 2 為顯示歷經 24 天時期在小鼠中 G2 疫苗 (Globo H/DT(8:1))、G3 疫苗 (Globo H/DT(8:1)/OBI-821) 及 G4 疫苗 (Globo H/DT(24:1)/OBI-821) 之活體內 ADCC 及 CDC 活性之柱狀圖組合。圖 2A 說明 ADCD 原始資料，圖 2B 說明 ADCD 標準化資料，圖 2C 說明 CDC 原始資料且圖 2D 說明 CDC 標準化資料。

圖 3A 及圖 3B 為說明以下組合物歷經 24 天時期的總體 IgM 及 IgG 效價之線繪圖：G1(Globo H/KLH/OBI-821)、G2(Globo H/DT(3:1)/OBI-821)、G3 及 G4(Globo H/DT(8:1)/OBI-821)、G5(Globo H/DT(8:1)/C34)、G6(Globo H/KLH/C34)、G7(Globo H/DT(16:1)/OBI-821) 及 G8(PBS)。

圖 4 為顯示列於圖 3 中之組合物在第 10 天、第 17 天及第 24 天的 IgM 及 IgG 反應之柱狀圖組合：圖 (A) 至 (C) 說明列於圖 3 中之組合物分別在第 10 天、第 17 天及第 24 天之 IgM 反應。圖 (D) 至 (F) 說明列於圖 3 中之組合物分別在第 10 天、第 17 天及第 24 天之 IgG 反應。

圖 5A 至圖 5C 為 OBI-821 (包含化合物 1989 及 1857) 之質譜影像。

圖 6 為 OBI-821 之層析圖 LC-UV 影像。

圖 7 為 OBI-821 之層析圖 LC-MS 影像組合。

【實施方式】

【0015】為了清晰及迅速理解本發明，本文定義某些術語。

第 5 頁，共 32 頁(發明申請專利範圍)

除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有熟習本發明所屬技術者通常所理解之相同含義。

【0016】如本文所用，「有效量」係指疫苗或醫藥組合物之劑量足以減輕癌症之症狀及徵候，該等症狀及徵候包括(但不限於)體重減輕、疼痛及腫瘤塊，其可在臨床上由可觸知的塊狀物或在放射學上經由不同的成像方法來偵測。

【0017】術語「個體」可指患有癌症之脊椎動物或被認為需要癌症治療之脊椎動物。個體包括溫血動物，諸如哺乳動物，諸如靈長類動物且更佳為人類。非人類靈長類動物亦為個體。術語個體包括經馴養動物(諸如貓、狗等)、家畜(例如牛、馬、豬、綿羊、山羊等)及實驗動物(例如小鼠、兔、大鼠、沙鼠、天竺鼠等)。由此，本文中涵蓋獸醫用途及醫學調配物。

【0018】如本文所用，術語「烷基」係指直鏈或分支鏈單價烴，除非另外說明，否則其含有 1 至 20 個碳原子(例如 C_1 至 C_8 或 C_1 至 C_4)，可經取代或未經取代(本發明可包涵其他鏈長度，例如 21 至 30 個)。烷基之實例包括(但不限於)甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基及第三丁基。

【0019】術語「實質上純的」意謂實質上不含通常與呈自然狀態皂素締合的化合物且展現恆定且可重現的層析反應、溶離特徵及生物活性。術語「實質上純的」不意謂排除皂素與其他化合物之人造或合成混合物。

【0020】本文中之所有數字均可理解為由「約」修飾。

具有較高碳水化合物比率之疫苗

【0021】腫瘤相關之碳水化合物抗原通常展現不佳的免疫原

性。已採用與載體蛋白結合之碳水化合物抗原以提高該碳水化合物抗原之免疫原性。舉例而言，約 700 個 Globo H 分子與一個無毒匙孔螺血氰蛋白 (KLH) 蛋白質結合，平均約 2 至 4 個 Globo H 分子與白喉毒素 (DT) 結合，約 8 個 Globo H 分子與牛血清白蛋白 (BSA) 結合，且約 6 個 Globo H 分子與破傷風類毒素結合 (美國專利第 8,268,969 號之表 1)。

【0022】本發明提供一種包含碳水化合物抗原或其免疫原性片段及類毒素蛋白之疫苗，其中碳水化合物抗原與類毒素蛋白之比率在 5:1 至 39:1 範圍內，且該比率反映碳水化合物抗原或其免疫原性片段之分子數與類毒素蛋白分子數之比率。該疫苗比碳水化合物抗原分子數與類毒素蛋白分子數之比率等於或小於 4:1 之疫苗具有更佳的免疫原性。本發明亦包涵其他範圍，包括碳水化合物抗原或其免疫原性片段之分子數與類毒素蛋白分子數之比率為 4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、26:1、27:1、28:1、29:1、30:1、31:1、32:1、33:1、34:1、35:1、36:1、37:1、38:1 或 39:1。

【0023】在一個實施例中，類毒素蛋白為破傷風類毒素 (TT) 且碳水化合物-TT 疫苗中碳水化合物抗原與 TT 之比率在 7:1 至 12:1 範圍內。

【0024】本發明提供一種包含碳水化合物抗原或其免疫原性片段及白喉毒素 (DT) 之疫苗，其中碳水化合物抗原與 DT 之比率在 5:1 至 39:1 範圍內，其中該比率反映碳水化合物抗原或其免疫原性片段之分子數與 DT 分子數之比率。在另一實施例中，碳

水化合物-DT 疫苗中碳水化合物抗原與 DT 之比率在 8:1 至 24:1 範圍內。

【0025】碳水化合物抗原之實例包括（但不限於）Globo H、階段特異性胚胎抗原 3（SSEA3）（亦稱為 Gb5）、階段特異性胚胎抗原 4（SSEA-4）、Gb-4、Gb-3、路易斯抗原（諸如 sLe^x 、 Le^x 、 sLe^a 、 Le^a 、 Le^y ）、多醣抗原（諸如聚唾液酸（PSA）、sTn(c)、Tn(c)、Thomsen-Friedenreich 抗原（TF(c)）、神經節苷脂（諸如 GD1、GD2、GD3、海藻糖、GM1、GM1、GM2、GM3、GD1 α 及 GM2）。其他碳水化合物抗原包括（但不限於）： α -半乳糖、 α -甘露糖-6-磷酸鹽、 α -L-鼠李糖、 α -GalNAc(Tn)、 α -NeuAc-OCH₂C₆H₄-對 NHCOOCH₂-Fuca1-2Gal β 1-4GalNAc β （H 類型 3）、NeuAc α 2-8NeuAc α 、（NeuAc α 2-8）₂ 聚唾液酸、NeuAc α 2-6Galb、NeuAc β 2-6Gala(STn)、Gal α 1-3Galb1-4GlcNAcb（NeuAc α 2-8）₃、GalNAc α 3-3(Fuca1-2)Gal β （血型 A）、Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β （血型 B）、6Gal-HSO₃-SiaLex、6GlcNAc-HSO₃-SiaLex 及 α 2-6 唾液酸化雙觸角 N-聚糖。在一個實施例中，碳水化合物抗原為 Globo H。

「GloboH」為己醣（Fuca1 $\rightarrow$ 2Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc β 1 $\rightarrow$ 3Gal α 1 $\rightarrow$ 4Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1），其最初自人類乳癌細胞株 MCF-7 分離（Menard S、Tagliabue E、Canevari S、Fossati G、Colnaghi MI（1983）Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. *CancerRes*, 43, 1295-300；及 Bremer EG、Leverly SB、Sonnino S、Ghidoni R、Canevari S、Kannagi R、Hakomori S.（1984）Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by the

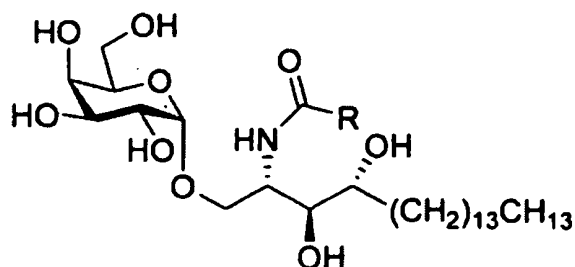
monoclonal antibody MBr1 expressed in normal and neoplastic epithelial cells of human mammary gland. *J BiolChem*, 259, 14773-7)。Globo H 在各種上皮細胞腫瘤（諸如結腸、卵巢、胃、胰臟、子宮內膜、肺、前列腺及乳房癌）中表現（Menard S 等人，前述；Bremer EG 等人，前述；Canevari S、Fossati G、Balsari A、Sonnino S、Colnaghi MI (1983)）。GloboH 為可市售的（例如 Carbosynth, UK）且可藉由使用此項技術中熟知之方法連接醣苷至神經醯胺而合成。

【0026】在鹼性條件下，亦即在超過或等於 8、超過或等於 9、超過或等於 10、超過或等於 11 或超過或等於 12 之 pH 下，製造碳水化合物抗原與類毒素蛋白之比率大於或等於 5:1 之疫苗。可藉由此項技術中已知之方法，例如 MALDI-TOF 質譜分析來測定碳水化合物抗原與類毒素蛋白之比率。美國專利第 8,268,969 號；亦參見 Morelle W, Faid V, Chirat F, Michalski JC. *Methods Mol Biol*. 2009; 534: 5-21. doi: 10.1007/978-1-59745-022-5_1. Analysis of N- and O-linked glycans from glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry。

【0027】疫苗可進一步包含佐劑，其中該佐劑為諸如 OBI-821 之皂素，其在本文中描述或為 α -半乳糖基-神經醯胺之合成類似物（ α -GalCer 或 C1）。

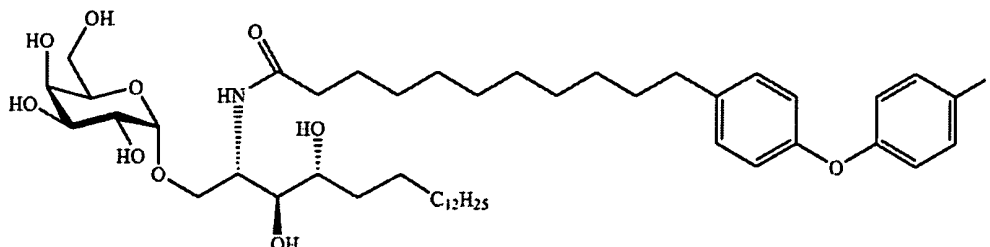
【0028】術語「 α -半乳糖基-神經醯胺」及「 α -GalCer」係指刺激自然殺手 T 細胞來產生 T 輔助 (TH)1 及 TH2 細胞激素之醣脂，如美國專利第 8,268,969 號中所述，該美國專利之內容以全文引用之方式併入本文中。在一個實施例中， α -GalCer 佐劑具有以下

結構：



其中 R 為 $(\text{CH}_2)_{24}\text{CH}_3$ 、 $(\text{CH}_2)_7\text{PhF}$ 、 $(\text{CH}_2)_{10}\text{PhOPhF}$ 或 $(\text{CH}_2)_{10}\text{PhF}$ 。

【0029】在一個實施例中，R 為 $(\text{CH}_2)_{10}\text{PhOPhF}$ ，稱為 C34 佐劑，具有以下結構：



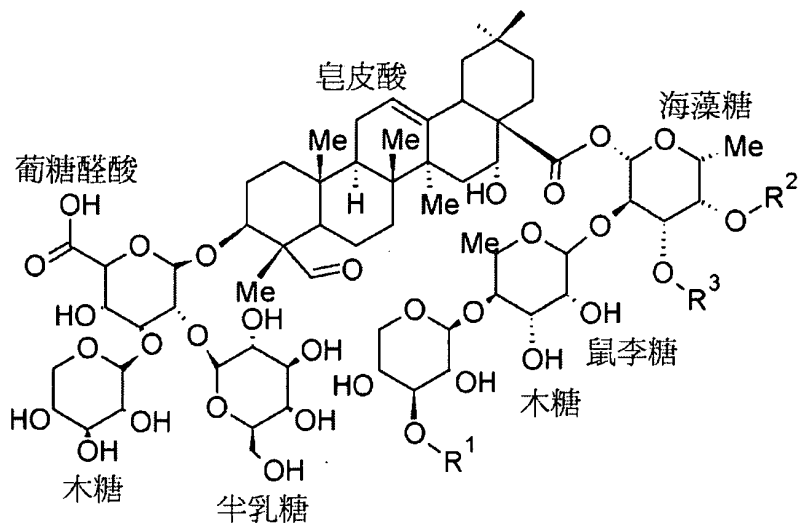
新穎皂素佐劑

【0030】本發明提供可實質上純的 OBI-821 皂素。本發明包涵實質上純的 OBI-821 皂素以及生物活性片段。本發明亦可包涵不純形式之 OBI-821 皂素。經純化之 OBI-821 皂素當與本文所述之疫苗一起投與或與其他實質上純的皂素或非皂素佐劑混合時，展現增強之佐劑效應。

【0031】OBI-821 皂素為天然存在的醣苷，藉由如例如美國專利第 5,057,540 號及美國專利第 6,524,584 號（其內容以全文引用之方式併入本文中）中所描述之高壓液相層析（HPLC）、低壓液體二氧化矽層析及親水性交互層析（HILIC）自奎拉雅屬皂樹（*Quillajasaponaria* Molina tree）之樹皮以高純度提取。高壓液相層析分析顯示 OBI-821 為結構相關之異構化合物的混合物。

OBI-821 皂素不同的純化異構化合物在本文中揭示。

【0032】 OBI-821 皂素包含至少一種如下經分離之式 I 化合物：

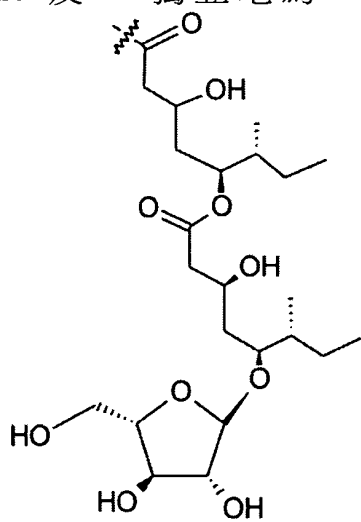


式 (I)

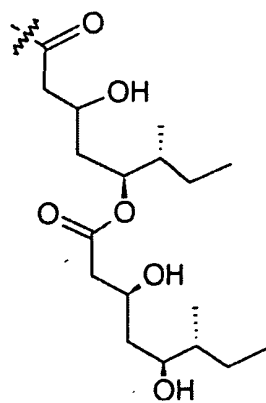
其中

R^1 為 β -D-芹菜糖或 β -D-木糖；及

R^2 及 R^3 獨立地為 H、烷基、



(1989 化合物之脂肪醯基部分)，或



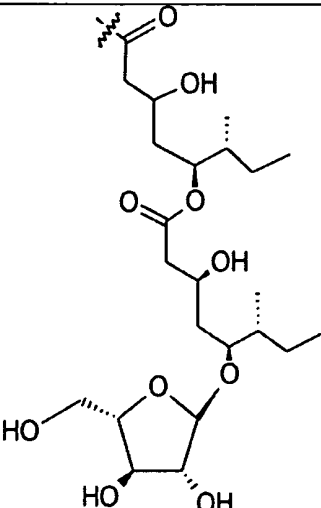
(1857 化合物之脂肪醯基部分)。

【0033】 OBI-821 皂素亦可包含經分離之式 I 化合物，其中(i) R^1 為 β -D-芹菜糖， R^2 為上文所描繪之 1989 化合物之脂肪醯基部分，及 R^3 為 H (1989 化合物 V1A)；(ii) R^1 為 β -D-芹菜糖， R^2 為 H，及 R^3 為上文所描繪之 1989 化合物之脂肪醯基部分 (1989 化合物 V1B)；(iii) R^1 為 β -D-木糖， R^2 為上文所描繪之 1989 化合物之脂肪醯基部分，及 R^3 為 H (1989 化合物 V2A)；或 (iv) R^1 為 β -D-木糖， R^2 為 H，及 R^3 為上文所描繪之 1989 化合物之脂肪醯基部分 (1989 化合物 V2B)。總之，1989 化合物 V1A、1989 化合物 V1B、1989 化合物 V2A 及 1989 化合物 V2B 稱為「1989 化合物混合物」。

【0034】 表 1 概述 1989 化合物之官能基及 1989 化合物混合物中之各 1989 化合物之莫耳%。

表 1

莫耳%	R ¹	R ²	R ³
1989 化合物 V1A 64.5%	β-D-芹菜糖		H
1989 化合物 V1B 1.5%	β-D-芹菜糖	H	
1989 化合物 V2A 33.3%	β-D-木糖		H

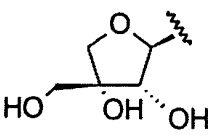
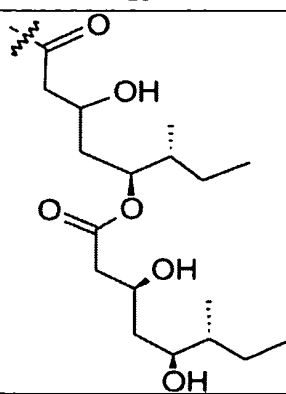
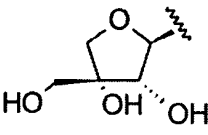
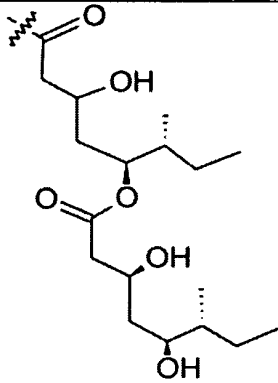
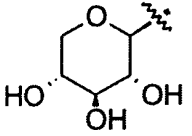
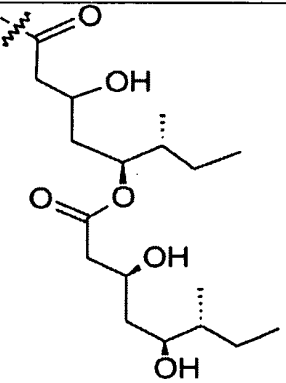
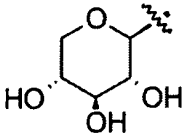
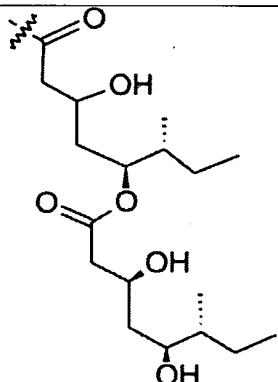
1989 化合物 V2B 0.7%	 β-D-木糖	H	
----------------------	---	---	---

【0035】 OBI-821 皂素可包含經分離之式 I 化合物，其中：(i)

● R^1 為 β-D-芹菜糖， R^2 為上文所描繪之 1857 化合物之脂肪醯基部分，及 R^3 為 H (1857 化合物 V1A)；(ii) R^1 為 β-D-芹菜糖， R^2 為 H，及 R^3 為上文所描繪之 1857 化合物之脂肪醯基部分 (1857 化合物 V1B)；(iii) R^1 為 β-D-木糖， R^2 為上文所描繪之 1857 化合物之脂肪醯基部分，及 R^3 為 H (1857 化合物 V2A)；或 (iv) R^1 為 β-D-木糖， R^2 為 H，及 R^3 為上文所描繪之 1857 化合物之脂肪醯基部分 (1857 化合物 V2B)。總之，1857 化合物 V1A、1857 化合物 V1B、1857 化合物 V2A 及 1857 化合物 V2B 稱為「1857 化合物混合物」。

● 【0036】 表 2 概述 1857 化合物之官能基及 1857 化合物混合物中之各 1857 化合物之莫耳%。

表 2

莫耳%	R ¹	R ²	R ³
1857 化合物 V1A 64.7%	β -D-芹菜糖 		H
1857 化合物 V1B 1.3%	β -D-芹菜糖 	H	
1857 化合物 V2A 33.4%	β -D-木糖 		H
1857 化合物 V2B 0.6%	β -D-木糖 	H	

【0037】 OBI-821 皂素包含以下化合物中之一或多者：(i) 1857 化合物 V1A；(ii) 1857 化合物 V1B；(iii) 1857 化合物 V2A；

(iii) 1857 化合物 V2B ; (iv) 1989 化合物 V1A ; (v) 1989 化合物 V1B ; (vi) 1989 化合物 V2A ; 或 (vii) 1989 化合物 V2B。OBI-821 皂素中之 1857 化合物混合物與 1989 化合物混合物之百分比在如下範圍內：

(i) 約 1 莫耳%至約 15 莫耳%之 1857 化合物混合物；及

(ii) 約 85 莫耳%至約 99 莫耳%之 1989 化合物混合物。

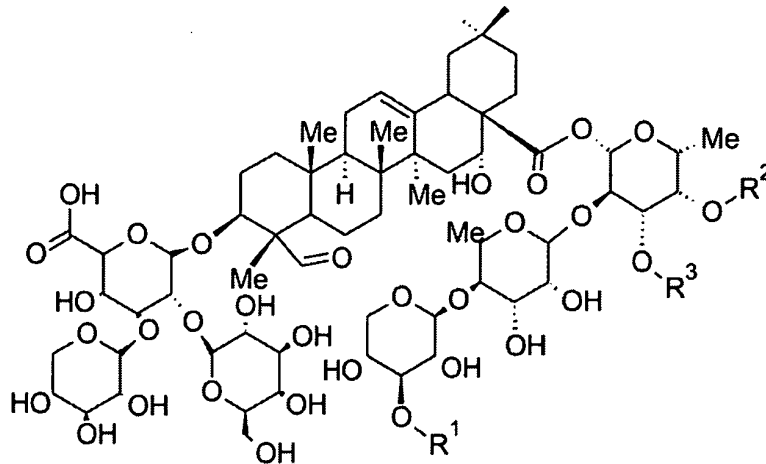
【0038】所有莫耳%均可以 0.1%增量變化（例如約 87%至約 90%、約 90.5%至約 97%、約 3.5%至約 11%、約 10%至約 14%）。

【0039】1989 化合物混合物可包含約 60-70 莫耳%之 1989 化合物 V1A；約 1-5 莫耳%之 1989 化合物 V1B；約 30-40 莫耳%之 1989 化合物 V2A；及約 0.1-3 莫耳%之 1989 化合物 V2B。所有莫耳%均可以 0.1 增量變化（例如 65%、2.5%、35.6%）。

【0040】1857 化合物混合物可包含約 60-70 莫耳%之 1857 化合物 V1A；約 1-5 莫耳%之 1857 化合物 V1B；約 30-40 莫耳%之 1857 化合物 V2A；及約 0.1-3 莫耳%之 1857 化合物 V2B。所有莫耳%均可以 0.1 增量變化（例如 67%、1.5%、33.9%）。

【0041】在另一實施例中，實質上純的 OBI-821 係自奎拉雅屬皂樹粗提取物純化，其中該 OBI-821 之特徵為當在具有 5 μm 粒度、100 Å 孔隙、4.6 mm ID $\times$ 25 cm L 之對稱性 C18 管柱的逆相 HPLC 上使用包含 A:B 為 95%:5%至 75%:25%之移動相的溶離程式分析 11 分鐘時，單個主峰佔層析圖中除溶劑峰外所有峰之總面積的 90%或更多，其中移動相 A 為含有 0.1%三氟乙酸之蒸餾水且移動相 B 為含有 0.1%三氟乙酸之乙腈，流動速率為 1 ml/min。

【0042】在一個實施例中，醫藥組合物包含式 (I) 化合物

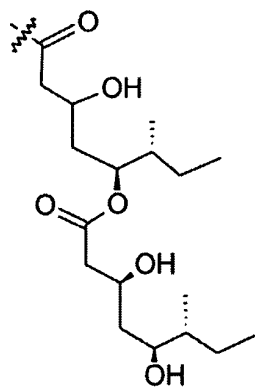


式 (I)

其中，

R^1 為 β -D-芹葉糖或 β -D-木糖；及

R^2 及 R^3 獨立地為 H、烷基、或



(1857 化合物之脂肪醯基部分)，

及醫藥學上可接受之載劑。

【0043】疫苗可包含碳水化合物抗原或其免疫原性片段及 OBI-821 皂素。在另一實施例中，疫苗包含選自 Globo H、SSEA-3、SSEA-4、Gb-4 或其混合物之碳水化合物抗原、DT 及 OBI-821 皂素。在又一實施例中，疫苗包含碳水化合物抗原或其免疫原性片段；載體蛋白及 OBI-821 皂素。載體蛋白之非限制性實例包括類毒素蛋白及非類毒素蛋白（諸如 KLH）。

類毒素蛋白

【0044】與碳水化合物抗原結合之類毒素蛋白可為白喉毒素（DT）或破傷風類毒素（TT）。

【0045】毒素可例如藉由用甲醛、戊二醛、UDP-二醛、過氧化物、氧處理或藉由突變（例如使用重組方法）而失去活性。Relyveld 等人, *Methods in Enzymology*, 93:24, 1983。Woodrow 及 Levine 編, *New Generation Vaccines*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1989。Genth 等人, *Inf. and Immun.*, 68(3):1094-1101, 2000。具有降低之毒性的突變型白喉毒素亦可使用重組方法產生。美國專利第 5,085,862 號；第 5,221,618 號；第 5,244,657 號；第 5,332,583 號；第 5,358,868 號；及第 5,433,945 號。

【0046】DT 為白喉毒素交叉反應性物質（DT-CRM）或白喉類毒素。DT-CRM 係指突變型白喉毒素，例如藉由突變或藉由化學改變，使得其不再具有足夠的 ADP-核糖基。DT-CRM 之非限制性實例包括 DT-CRM 30、DT-CRM 45、DT-CRM 176、DT-CRM 197 及 DT-CRM 228。白喉類毒素為經甲醛失活之白喉毒素。DT 可市售或可藉由此項技術中已知之方法製備，諸如重組 DNA 技術，如美國專利第 5,614,382 號中所描述，其內容以全文引用的方式併入本文中。

【0047】本文所述之疫苗的碳水化合物抗原可藉由美國專利第 8,268,969 號中所描述之合成方法經由對硝基苯基連接子與載體蛋白共價鍵結，該美國專利之內容以全文引用之方式併入本文中。

【0048】本發明之疫苗可誘發以下一或多個活性：相比於 IgM 效價更高的 IgG 效價、更高的補體依賴性細胞毒性（CDC）活性

及/或更高的抗體依賴性細胞介導的細胞毒性 (ADCC) 活性。在另一實施例中, 疫苗誘發以下一或多個細胞: 自然殺手細胞、CD4+ T 淋巴細胞或 CD8+ T 淋巴細胞。其他可量測之免疫參數, 包括 (但不限於) T 輔助細胞活化。

【0049】本發明亦提供包含本文所述之疫苗及醫藥學上可接受之媒劑、賦形劑或載劑之醫藥組合物。合適之媒劑為例如水、生理食鹽水、右旋糖、甘油、乙醇或其類似物及其組合。另外, 媒劑可含有其他賦形劑, 諸如濕潤劑或乳化劑、pH 緩衝劑或佐劑。醫藥學上可接受之載劑可含有用於例如穩定化或提高或降低本發明之醫藥組合物之吸收或清除速率的生理學上可接受之化合物。生理學上可接受之化合物可包括例如碳水化合物 (諸如葡萄糖、蔗糖或聚葡萄糖)、抗氧化劑 (諸如抗壞血酸或麩胱甘肽)、螯合劑、低分子量蛋白質、清潔劑、脂質體載劑或其他穩定劑及/或緩衝劑。賦形劑可為非離子界面活性劑、聚乙烯吡咯啉酮、人類血清白蛋白、氫氧化鋁、具有麻醉作用之藥劑及各種未經修飾及衍生之環糊精。更佳地, 非離子界面活性劑可包括聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 60 及聚山梨醇酯 80。較佳之聚乙烯吡咯啉酮可為 Plasdane C15 (醫藥級之聚乙烯吡咯啉酮)。具有麻醉作用之藥劑較佳為苺醇。其他生理學上可接受之化合物包括濕潤劑、乳化劑、分散劑或防腐劑。參見例如 Remington's Pharmaceutical Science 第 21 版, Mack 出版公司, Easton, Pa. (「Remington's」)。本發明之醫藥組合物亦可包括輔助物質, 諸如藥理學藥劑、細胞激素或其他生物反應調節劑。包含該賦形劑或載劑之醫藥組合物藉由熟知之習知方法調配。

【0050】疫苗可調配用於以下投與途徑：肌肉內、皮內、口服、經皮、經鼻、經頰、經直腸、經陰道、藉由吸入或藉由皮下投與。其他投與模式可為適用的，只要可誘發令人滿意的免疫原性即可。

【0051】本發明之醫藥組合物可經製備成可注射劑，呈液體溶液或懸浮液形式，或呈適合於在注射之前溶解或懸浮於液體媒劑中之固體形式。醫藥組合物亦可以固體形式製備，乳化或將活性成分囊封於用於持續遞送之脂質體媒劑或其他微粒載劑中。舉例而言，醫藥組合物可呈以下形式：油乳液、油包水乳液、水包油包水乳液、位點特異性乳液、長期滯留乳液、乳化膠、微乳液、奈米乳液、脂質體、微粒、微球體、奈米球、奈米粒子及各種天然或合成聚合物，諸如不可再吸收之不透性聚合物（諸如乙烯乙酸乙烯酯共聚物及 Hytrel® 共聚物）、可膨脹聚合物（諸如水凝膠）或可再吸收性聚合物（諸如膠原蛋白）及某些聚合酸或聚酯（諸如用於製造可再吸收性縫合線者），其允許疫苗持續釋放。

【0052】本發明化合物之醫藥學上可接受之鹽及其生理學功能衍生物包括源自適當鹼（諸如鹼金屬（例如鈉、鉀）、鹼土金屬（例如鈣、鎂）、銨及 NX_4^+ （其中 X 為 C_1 - C_4 烷基））之鹽。胺基之醫藥學上可接受之鹽包括以下各酸之鹽：有機羧酸，諸如酒石酸、脂族、環脂族、芳族、雜環、羧酸及磺酸類別之有機酸，諸如甲酸、葡糖醛酸、蘋果酸、順丁烯二酸、反丁烯二酸、丙酮酸、天冬胺酸、麩胺酸、苯甲酸、鄰胺基苯甲酸、甲磺酸、水楊酸、羥基苯甲酸、苯乙酸、杏仁酸、恩波酸（雙羥萘酸）、甲烷磺酸、乙烷磺酸、苯磺酸、泛酸、甲苯磺酸、2-羥基乙烷磺酸、對胺基

苯磺酸、硬脂酸、褐藻酸、羥基丁酸、環己基胺基磺酸、半乳糖二酸及半乳糖醛酸及其類似物、乳糖酸、反丁烯二酸及丁二酸；有機磺酸，諸如甲烷磺酸、乙烷磺酸、羥乙磺酸、次苄基磺酸及對甲苯磺酸；及無機酸，諸如鹽酸、氫溴酸、氫碘酸、硝酸、碳酸、硫酸、胺磺酸及磷酸及其類似物。具有羥基之化合物的醫藥學上可接受之鹽由該化合物之陰離子組合合適之陽離子（諸如 Na^+ 、 NH_4^+ 或 NX_4^+ （其中 X 為例如 C_1 - C_4 烷基）、 Ca^{++} 、 Li^+ 、 Mg^{++} 或 K^+ 及鋅）或由一級、二級及三級胺、環胺、N,N'-二苯甲基乙二胺、氯普魯卡因（chloroprocaine）、膽鹼、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺（N-甲基還原葡萄糖胺）及普魯卡因（procaine）及其類似物製成之有機鹽組成。所有此等鹽均可藉由習知方法自對應的化合物製備，例如藉由使適當酸或鹼與呈游離形式之化合物反應。

誘發免疫反應/抑制癌細胞之方法

【0053】本發明之另一態樣係關於誘發免疫反應之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之本文所述之疫苗。免疫反應包括（但不限於）NK 細胞反應、ADCC 及 CDC 活性及 IgM 及 IgG 產生。

【0054】在又一態樣中，本發明提供抑制癌細胞之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之本文所述之疫苗。在一個實施例中，癌症係選自乳癌、肺癌、食道癌、直腸癌、膽管癌、肝癌、頰癌、胃癌、結腸癌、鼻咽癌、腎臟/腎癌、腦腫瘤、前列腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、胰臟癌、睪丸癌、膀胱癌、頭頸癌、口腔癌、神經內分泌癌、腎上腺癌、甲狀腺癌、骨癌、皮膚癌（例如基底細胞癌、鱗狀細胞癌或黑素瘤）。在另一實施例中，

癌症為表現 Globo H 之癌症。表現 Globo H 之癌症的非限制性實例包括乳癌、肺癌、胃癌、結腸癌、胰臟癌、前列腺癌、卵巢癌及子宮內膜癌。由疫苗所產生之抗體（諸如抗 Globo H 抗體）固在地抑制表現 Globo H 之癌症。

【0055】在某些實施例中，有效量之疫苗用於誘發所需的免疫效應，諸如在個體中針對特異性碳水化合物抗原（例如 Globo H）刺激 IgG 產生。疫苗或醫藥組合物之有效量或劑量可視碳水化合物抗原之量、所用佐劑之類型、投與模式及待治療個體之年齡、體格及病狀而變化。誘發免疫原性所需要的疫苗或醫藥組合物之確切量將由醫師確定。

【0056】疫苗可以具有或不具有一或多個按特定時間間隔投與加強劑量之單獨劑量(stat dose)，以達成在數月至數年間長期免疫保護性效應。投與頻率可視多種因素中之任一者而變化，例如症狀嚴重程度、所需之免疫保護程度、醫藥組合物是否用於預防或治癒目的等。舉例而言，在一個實施例中，根據本發明之醫藥組合物每月一次、每月兩次、每月三次、每隔一週（qow）、每週一次（qw）、每週兩次（biw）、每週三次（tiw）、每週四次、每週五次、每週六次、每隔一天（qod）、每天（qd）、一天兩次（qid）或一天三次（tid）投與。疫苗亦可與其他習知療法同時或依序投與，諸如化學療法、靶標療法或用於癌症治療之靶標腫瘤相關的碳水化合物抗原之抗體。

【0057】本發明進一步藉由以下實例說明，該等實例出於論證而非限制之目的提供。根據本發明，熟習此項技術者應瞭解，在不背離本發明之精神及範疇的情況下可對所揭示之特定實施例

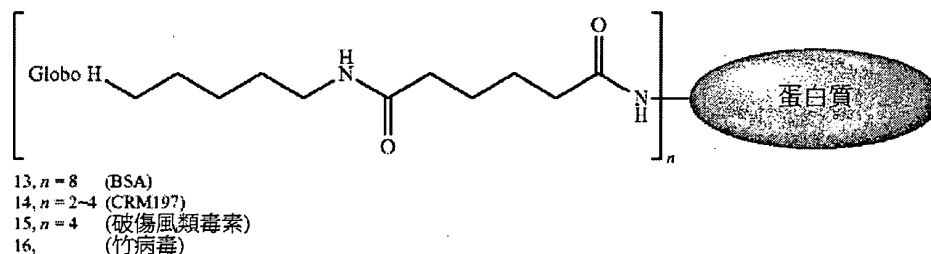
作出許多改變且仍獲得相同或類似結果。

實例 1：製備具有較高碳水化合物/毒素蛋白比率之疫苗及提取 OBI-821

【0058】Globo H 與 KLH 或 DT 結合，此結合根據此項技術中已知之方法，例如如美國專利第 6,544,952 號或第 8,268,969 號中所描述，該等專利之內容以全文引用的方式併入本文中。所得疫苗包含 Globo H:DT (Globo H 與 DT 之分子比率 = 2-4:1)。

產生糖結合物之一般程序

【0059】糖結合物如下製造：



【0060】將 BSA、DT-CRM197 及破傷風類毒素 (Adimmune, 台灣) 溶解於 100 mM 磷酸鹽緩衝液 pH 7.2 中 (約 5 mg/ml)，且向溶液中添加 30 至 40 當量之 Globo H 半酯 35。在室溫下輕輕攪拌混合物 24 h。隨後用去離子水稀釋該混合物且針對去離子水之 5 次改變進行透析。隨後將溶液凍乾成白色粉末。所獲得之 Globo H-蛋白質結合物可藉由 MALDI-TOF 分析表徵以測定碳水化合物結合率。41(GH-BSA) 之 MALDI-TOF 實驗值為 76029，42(GH-DT-CRM197) 實驗值為 62138，43(GH-TT) 實驗值為 162902，44(GH-BaMV) 未測定。MALDI-TOF MS 分析糖結合物。糖結合物及主要載體蛋白可用 ddH₂O 復原 (約 1 μg/μl)。基質 (芥子酸) 用 1:1 乙腈及去離子水新鮮製備，使最終基質濃度為 10 mg/ml，包括 0.1% TFA。輕輕裝載及混合基質溶液與糖結合物，隨後空氣

第 23 頁，共 32 頁(發明申請專利範圍)

乾燥板。在量測之前使用牛血清白蛋白進行必不可少的校準。各糖結合物及主要蛋白質樣品在線性正模式下偵測。平均分子量允許計算結合在載體蛋白上之碳水化合物分子之平均數目。

【0061】碳水化合物抗原分子:毒素蛋白分子之比率超過 5:1 之疫苗根據以下步驟製造：

(a) 將 10 ml-25 ml Globo H (可購自 OBI Pharma,台灣) 及對硝基苯酯連接子 (可購自 OBI Pharma, 台灣) 溶解於 25 μ l DMF (可購自 Sigma-Aldrich, 美國) 中。

(b) 用 2.5 ml 磷酸鹽緩衝液 (亦即 pH > 8 之鹼性緩衝液) 溶解 25 mg DT。

(c) 在室溫下將步驟 (a) 中之混合物添加至步驟 (g) 中之混合物中隔夜。所得混合物具有 8 至 9.2 之間的 pH。

【0062】結果：如藉由 MALDI-TOF MS 測定，10 ml Globo H 產生包含 Globo H:DT(8:1)之疫苗且 25 Globo H 產生包含 Globo H:DT(24:1)之疫苗。

製備 OBI-821 皂素

【0063】OBI-821 皂素根據以下步驟自奎拉雅屬皂樹提取物提取：

(a) 藉由大粒子 C18 逆相層析法預先過濾奎拉雅屬皂樹提取物，隨後藉由基於二氧化矽之製備型正相層析法來純化。此舉產生粗 OBI-821。

(b) 再次藉由大粒子 C18 逆相層析法預先過濾步驟 (a) 中之粗 OBI-821，隨後進行逆相製備型 HPLC。OBI-821 物質依序藉由去鹽及凍乾製程製成。

【0064】自奎拉雅屬皂樹之樹皮提取之經純化的 OBI-821 皂素藉由質譜分析。圖 5A 中 1989.01 處之質量峰、圖 5B 中 1989.12 處之質量峰及 1989.13 處之質量峰說明存在分子量為約 1989 之化合物。分子量為約 1989 之化合物的莫耳比為：圖 5A 中為 89.8%，圖 5B 中為 96.8%，及圖 5C 中為 87.0%。類似地，圖 5A 中 1856.97 處之質量峰、圖 5B 中 1856.02 峰處之質量峰及 1857.09 處之質量峰說明存在分子量為約 1857 之化合物。分子量為約 1857 之化合物的莫耳比為：圖 5A 中為 10.2%，圖 5B 中為 3.2%，及圖 5C 中為 13%。

【0065】經純化之 OBI-821 皂素進一步藉由層析法分析。圖 6 為層析圖 LC-UV 影像(管柱：PolyLCPolyHYDROXYETHYL A 200 * 4.6 mm 5 μ m, 300 A)。第一峰說明存在 1989 V1 (A 及 B) 化合物及 1857 化合物 V1 (A 及 B) 化合物 (約 65.94%)，且第二峰說明存在 1989 V2 (A 及 B) 化合物及 1857 V2 (A 及 B) 化合物 (約 34.06%)。圖 7 為層析圖 LC-MS 影像(管柱：Waters Symmetry ODS 150*2.1 mm)。上部圖中之峰 1 說明存在 1989 化合物 V1B 及 V2B (約 2.2%)，而峰 4 說明存在 1989 化合物 V1A 及 V2A (約 97.8%)。下部圖中之峰 2 說明存在 1857 化合物 V1 B 及 1857 化合物 V2 B (約 1.9%) 且峰 3 說明存在 1857 化合物 V1A 及 1857 化合物 V2A。

實例 2：具有較高碳水化合物/毒素蛋白質比率的疫苗之免疫原性及 OBI-821 皂素之佐劑功效

【0066】使用 CL57B/6 小鼠進行實例 1 中之 Globo H/DT (8:1) 疫苗的活體內免疫原性及 OBI-821 皂素之佐劑功效的評估。

【0067】約八週大的 CL57B/6 小鼠隨機分成以下四個研究組：

組	投與治療	N (小鼠數目)	投與途徑	投與治療日
Globo H-DT/S	Globo H/KLH/OBI-821 皂素	6	皮下	第 0 天、 第 7 天、 第 14 天及 第 21 天
Globo H-KLH/C34	Globo H/KLH/C34	6		
Globo H-DT/S	Globo H/DT(Globo H 與 DT 之分子比率=8:1)/OBI-821 皂素	6		
Globo H-DT/C34	Globo H/DT(Globo H 與 DT 之分子比率=8:1)/C34	6		

【0068】在第一次注射之前或第 0 天及在各注射之後三天(亦即在第 10 天、第 17 天及第 24 天)，經眶後或面靜脈不用抗凝血劑收集血液樣品。血液樣品經離心以分離血清與血細胞。收集血清且儲存在 -20°C 下，其稍後藉由 ELISA 分析。將來自各小鼠之血清連續稀釋以用於抗 Globo H IgG 分析。將 Globo H-神經醯胺塗佈在分析板上隔夜，隨後用 1×阻斷緩衝液 (Sigma) 阻斷 30 分鐘且用 PBST 洗滌。經稀釋之血清樣品添加至分析板，在室溫 (RT) 下培育 1 小時且洗滌。將山羊抗小鼠 IgG-AP 二次抗體 (Southern Biotech) 添加至樣品中且在 RT 下培育 45 分鐘。再次洗滌板，隨後添加色素原受質且在 37°C 下培育 20 分鐘。藉由添加停止溶液終止反應。藉由板讀取器 (Molecular Device) 在 405 nm 波長下定量光學密度。Mann-Whitney t 測試用於統計學分析。圖 1A 及圖 1B 顯示所測試之疫苗的定量抗 Globo H IgG 效價。

【0069】結果：來自 Globo H/DT (比率為 8:1) 免疫之小鼠的 IgG 效價顯著高於具有 C34 佐劑之 Globo H/KLH 的 IgG 效價 ($P < 0.01$)。來自 Globo H/DT (比率為 8:1) 免疫之小鼠的 IgG 效價高於具有 OBI-821 皂素佐劑之 Globo H/KLH 的 IgG 效價。(參見圖 1(A))。不管所使用之載體蛋白的類型，OBI-821 皂素相比於 C34

佐劑引起統計學上顯著更高的 IgG 效價 ($P < 0.05$ ，參見圖 1A 及圖 1B)。

實例 3：使用 ADCC 及 CDC 分析進行具有較高碳水化合物/毒素蛋白比率的疫苗之免疫原性及 OBI-821 皂素之佐劑功效的評估

【0070】用表 3 中之疫苗免疫四組路易斯大鼠。

表 3：疫苗組合物

組	疫苗組合物
G1	磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS)
G2	7.5 μ g GH-DT (Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1)
G3	7.5 μ g GH-DT (Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1) + 25 μ g OBI-821 皂素
G4	7.5 μ g GH-DT (Globo H 與 DT 之分子比率為 24:1) + 25 μ g OBI-821 皂素

【0071】用列於表 3 中之疫苗在第 0 天、第 7 天、第 14 天及第 21 天經皮下免疫大鼠。在第一次注射之前 (亦即第 0 天) 及在第 10 天、第 17 天及第 24 天收集周邊血液單核細胞 (PBMC) 及血漿。

【0072】使用此項技術中已知之鈣黃綠素 AM 釋放法進行 ADCC 及 CDC 分析。程序描述如下：

用鈣黃綠素 AM 標記標靶細胞

MCF-7 乳癌細胞 (標靶細胞) 在補充有 2 mM L-麩醯胺酸、1 mM 丙酮酸鈉及 0.01 mg/mL 胰島素、10%胎牛血清之最低必需培養基中培養。將標靶細胞添加至 96 孔板 (5×10^3 個細胞/孔)，且在潮濕的 5% CO₂ 氛圍中在 37°C 下培育隔夜。丟棄培養基且各孔用 PBS 洗滌一次。將 100 μ L 20 M 鈣黃綠素-AM 溶液添加至各孔中 (每孔 2 nmol) 且在潮濕的 5% CO₂ 氛圍中在 37°C 下培育 2 小

時。乾燥上清液且各孔用 PBS 洗滌三次。

用樣品血漿培育標靶細胞

樣品血漿經熱失活且將 50 L 1/5X 熱失活之樣品血漿添加至各孔中，除了「完全釋放」及「背景」對照組。在添加 50 L PBMC 或血清之後最終稀釋倍數將為 1/10X。板在 37°C 下（避光）培育 30 分鐘。

用 PBMC 或補體培育標靶細胞

在培育之後，在 ADCC 分析中將 50 微升 PBMC (2×10^6 個細胞/mL) (針對 E:T 比率為 20:1) 添加至各孔中，且在 CDC 分析中將 50 微升 1/10X 稀釋之血清添加至各孔中，除了「完全釋放」及「背景」對照組。反應混合物在潮濕之 5% CO₂ 氛圍中在 37°C 下培育 4 小時。在培育時間之最後 15 分鐘，將含有 2% Triton 溶液之不含酚紅的 MEM (50 微升) 添加至「完全釋放」對照組中，且將不含酚紅的 MEM (50 微升) 添加至「背景」對照組中。板在 100 g 下離心 5 分鐘，且隨後將 80 微升上清液轉移至 96 孔黑色板。在 485 nm 激發及 538 nm 發射波長下量測螢光。

【0073】圖 2A 至圖 2D 顯示 G2、G3 及 G4 疫苗之活體內 ADCC 及 CDC 活性。

【0074】結果：如圖 2B 及圖 2D 中所說明，在第 24 天 G3 疫苗(具有 OBI-821 皂素佐劑)之 ADCC 及 CDC 活性比 G2 疫苗(不具有皂素佐劑)之 ADCC 及 CDC 活性高。如圖 2B 及圖 2D 中所說明，在第 24 天 G4 疫苗 (Globo H/DT 比率為 24:1) 之 ADCC 及 CDC 活性比 G3 疫苗 (Globo H/DT 比率為 8:1) 之 ADCC 及 CDC 活性高。此等結果顯示 OBI-821 皂素佐劑及碳水化合物抗原

/毒素蛋白比率超過 5:1 之疫苗增強且誘發更長久的 ADCC 及 CDC 反應。

實例 4：具有較高碳水化合物/毒素蛋白比率的疫苗之免疫反應及 OBI-821 皂素之佐劑功效

【0075】使用 CL57B/6 小鼠或 Balb/c 小鼠進行實例 1 中之 Globo H/DT (8:1)及 Globo H/DT (16:1)疫苗及 OBI-821 皂素佐劑的活體內評估。

【0076】約八週大的 CL57B/6 小鼠隨機分成以下 8 個研究組：

組	投與治療	N (小鼠數目)	免疫劑量及時程
G1	Globo H/KLH/OBI-821 皂素	6	在第 0 天、第 7 天、第 14 天及第 21 天經皮下注射 2 次。 各注射為 100 μ L
G2	Globo H/DT(Globo H 與 DT 之分子比率為 3:1)/OBI-821 皂素	6	
G3	H/DT(8:1)/OBI-821 皂素	6	
G4	Globo H/DT(Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1)/OBI-821 皂素	6	
G5	Globo H/DT(Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1)/C34	6	
G6	Globo H/KLH/C34	6	
G7	GloboH/DT(Globo H 與 DT 之分子比率為 16:1)/OBI-821 皂素	6	
G8	PBS (磷酸鹽緩衝生理食鹽水)	3	

【0077】在第一次注射之前或第 0 天，在第 10 天、第 17 天及第 24 天經後眶或面靜脈不用抗凝血劑收集血液樣品。血液樣品經離心以分離血清與血細胞。收集血清且儲存在 -20℃ 下，其稍後藉由 ELISA 分析。將來自各小鼠之血清連續稀釋以用於抗 Globo H IgG 及 IgM 分析。圖 3A、圖 3B 及圖 4 顯示所測試之疫苗的定量抗 Globo H IgM 及抗 Globo H IgG 效價。

【0078】結果：具有 OBI-821 皂素佐劑之疫苗相比於具有 C34 佐劑之疫苗誘發統計學上顯著更多的抗 Globo H IgM 及抗 Globo

H IgG (參見圖 3A、圖 3B 及圖 4)。以下為統計學顯著差異：

- 在第 17 天 G3 疫苗 (OBI-821 皂素) 之 IgM 效價顯著高於 G5 疫苗 (C34) 之 IgM 效價 ($p = 0.02$)；
- 在第 17 天 G1 疫苗 (OBI-821 皂素) 之 IgM 效價顯著高於 G6 疫苗 (C34) 之 IgM 效價 ($p = 0.03$)，
- 在第 24 天 G3 疫苗 (OBI-821 皂素) 之 IgM 效價顯著高於 G5 疫苗 (C34) 之 IgM 效價 ($p = 0.03$)，
- 在第 17 天 G3 疫苗 (OBI-821 皂素) 之 IgG 效價顯著高於 G5 疫苗 (C34) 之 IgG 效價 ($p = 0.001$)，
- 在第 17 天 G1 疫苗 (OBI-821 皂素) 之 IgG 效價顯著高於 G6 疫苗 (C34) 之 IgG 效價 ($p = 0.003$)，
- 在第 24 天 G3 疫苗 (OBI-821 皂素) 之 IgG 效價顯著高於 G5 疫苗 (C34) 之 IgG 效價 ($p = 0.003$)，及
- 在第 24 天 G1 疫苗 (OBI-821 皂素) 之 IgG 效價顯著高於 G6 疫苗 (C34) 之 IgG 效價 ($p = 0.004$)。

● 【0079】此等結果說明 OBI-821 皂素佐劑相比於 C34 佐劑顯著增強 IgM 及 IgG 反應。

● 【0080】在第 17 天及第 24 天 Globo H/KLH/OBI-821 皂素 (G1) 相比於 Globo H/DT (3:1)/OBI-821 皂素 (G2) 誘發顯著更高的 IgM 及 IgG 效價。不受特定理論約束，G1 因具有較高的碳水化合物密度 (每個 KLH 載體蛋白約 700 個 Glob H 單元)，會引起較強的免疫反應，而 G2 具有較低的碳水化合物密度 (每個 DT 載體蛋白 3 個 Globo H 單元)，會引起較弱的免疫反應。以下統計學顯著差異：

- 在第 17 天 G1 疫苗 (KLH) 之 IgM 效價顯著高於 G2 疫苗 (DT) 之 IgM 效價 ($p = 0.003$),
- 在第 24 天 G1 疫苗 (KLH) 之 IgM 效價顯著高於 G2 疫苗 (DT) 之 IgM 效價 ($p = 0.03$),
- 在第 24 天 G1 疫苗 (KLH) 之 IgG 效價顯著高於 G2 疫苗 (DT) 之 IgG 效價 ($p = 0.004$)。

【0081】在第 17 天及第 24 天 Globo H/DT (Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1)/OBI-821 皂素 (G3 及 G4) 及 Globo H/DT (Globo H 與 DT 之分子比率為 16:1)/OBI-821 皂素 (G7) 之 IgM 及 IgG 效價與 Globo H/KLH/OBI-821 皂素 (G1) 之 IgM 及 IgG 效價可相當 (參見圖 4)。儘管相比 GH-KLH (Globo H 與 DT 之分子比率為 700:1) 具有較低的碳水化合物密度, 但 GH-DT (Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1) 展現與 GH-KLH 可相當的免疫原性。

【0082】具有較高 Globo H/DT 比率 (Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1 或 16:1) 的疫苗相比於具有較低 Globo H/DT 比率 (3:1) 的疫苗誘發更高且持續時間更長的 IgM 及 IgG 效價。注意以下統計學顯著差異：

- 在第 17 天 G3 疫苗 (Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1 比率) 之 IgM 效價顯著高於 G2 疫苗 (3:1 比率) 之 IgM 效價 ($p = 0.02$),
- 在第 17 天 G7 疫苗 (Globo H 與 DT 之分子比率為 16:1 比率) 之 IgM 效價顯著高於 G2 疫苗 (3:1 比率) 之 IgM 效價 ($p = 0.006$),
- 在第 17 天 G3 疫苗 (Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1 比率) 之 IgG 效價顯著高於 G2 疫苗 (3:1 比率) 之 IgG 效價 ($p = 0.01$),

- 在第 17 天 G7 疫苗 (Globo H 與 DT 之分子比率為 16:1 比率) 之 IgG 效價顯著高於 G2 疫苗 (Globo H 與 DT 之分子比率為 3:1 比率) 之 IgG 效價 ($p = 0.03$),

- 在第 24 天 G3 疫苗 (Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1 比率) 之 IgG 效價顯著高於 G2 疫苗 (3:1 比率) 之 IgG 效價 ($p = 0.01$),

- 在第 24 天 G7 疫苗 (Globo H 與 DT 之分子比率為 16:1 比率) 之 IgG 效價顯著高於 G2 疫苗 (Globo H 與 DT 之分子比率為 3:1 比率) 之 IgG 效價 ($p = 0.01$),

● 在第 17 天及第 25 天 Globo H/DT (Globo H 與 DT 之分子比率為 8:1)/OBI-821 皂素 (G3) 及 Globo H/DT (16:1)/OBI-821 皂素 (G7) 之 IgG 效價顯著高於 Globo H/DT (Globo H 與 DT 之分子比率為 3:1)/OBI-821 皂素 (G2) 之 IgG 效價 ($P < 0.05$)。

【0083】本說明書中所引用之所有公開案、專利及專利申請案均以引用的方式併入本文中，就如同各個別公開案或專利申請案特定地且個別地指示以引用的方式併入一般。

● 【0084】本發明不限於本文所揭示之實施例的範疇，該等實施例預期作為本發明之個別態樣的單個說明，而非限制本發明之範疇。根據前述描述及教示，對於熟習此項技術者而言除本文所述外，本發明之模型及方法的各種修改亦將變得顯而易見，且同樣地意欲屬於本發明之範疇。在不背離本發明之真實範疇及精神的情況下，可實踐該等修改或其他實施例。

【符號說明】

【0085】無



201718004

【發明摘要】

申請日: 103.1.6

IPC分類: A61K39/60 (2006.01)
A61K39/65 (2006.01)
A61K39/91 (2006.01)

【中文發明名稱】具有較高碳水化合物抗原密度之疫苗及其醫藥組成物
【英文發明名稱】VACCINES WITH HIGHER CARBOHYDRATE ANTIGEN DENSITY AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS THEREOF

C07H 15/56 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【中文】

本發明提供包含與作為載體蛋白之白喉毒素 (DT) 結合之碳水化合物抗原的疫苗，其中碳水化合物抗原分子與載體蛋白分子之數目比高於 5:1。本文亦揭示一種新穎皂素佐劑及藉由投與有效量之本文所揭示之疫苗抑制癌細胞之方法。

【英文】

The present invention provides vaccines comprising carbohydrate antigen conjugated to a diphtheria toxin (DT) as a carrier protein, wherein the ratio of the number of carbohydrate antigen molecule to the carrier protein molecule is higher than 5:1. Also disclosed herein is a novel saponin adjuvant and methods to inhibit cancer cells, by administering an effective amount of the vaccine disclose herein.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種疫苗，其包含：

(a) 碳水化合物抗原或其免疫原性片段；及

(b) 白喉毒素 (DT)，

其中碳水化合物抗原與白喉毒素 (DT) 之比率在 5:1 至 39:1 範圍內。

【第2項】 如申請專利範圍第 1 之疫苗，其中該碳水化合物抗原係選自 Globo H、SSEA-3、SSEA-4 或 Gb-4。

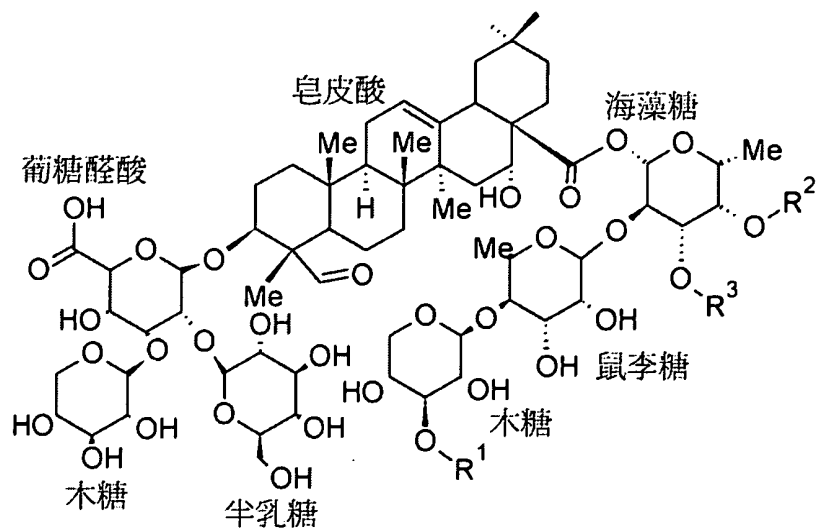
【第3項】 如申請專利範圍第 2 項所述之疫苗，其中該碳水化合物抗原為 Globo H。

【第4項】 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗，其中該 DT 為白喉毒素交叉反應性物質或白喉類毒素。

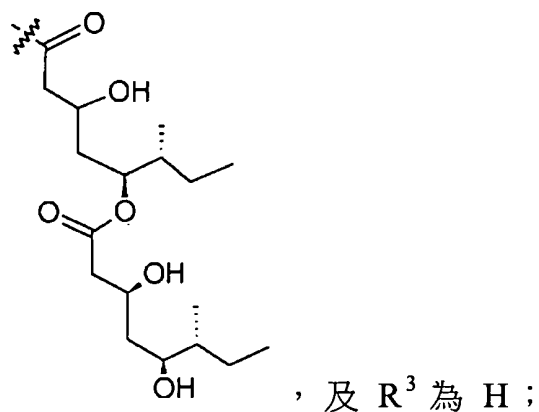
【第5項】 如申請專利範圍第 4 項所述之疫苗，其中該白喉毒素交叉反應性物質係選自 CRM30、CRM45、CRM 176、CRM 197 或 CRM 228。

【第6項】 如申請專利範圍第 1 項所述之疫苗，其進一步包含皂素佐劑。

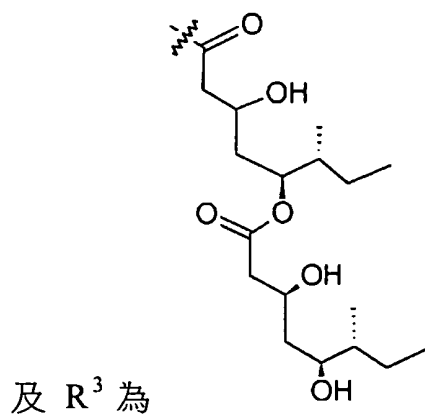
【第7項】 如申請專利範圍第 6 項所述之疫苗，其中該皂素佐劑為 OBI-821 皂素，其中該 OBI-821 皂素為至少一種選自以下經分離之式(I)化合物之第一化合物混合物：



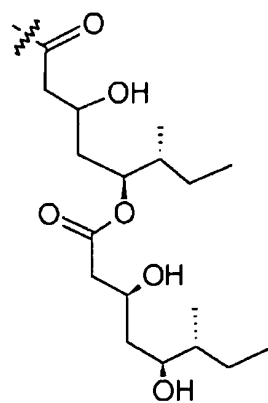
(1) 式 I 之化合物，且其中 R^1 為 β -D-芹菜糖， R^2 為



(2) 式 I 之化合物，且其中 R^1 為 β -D-芹菜糖， R^2 為 H，

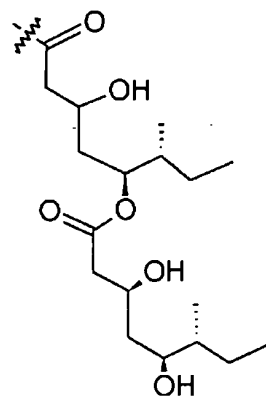


(3) 式 I 之化合物，且其中 R^1 為 β -D-木糖， R^2 為



，及 R^3 為 H；及

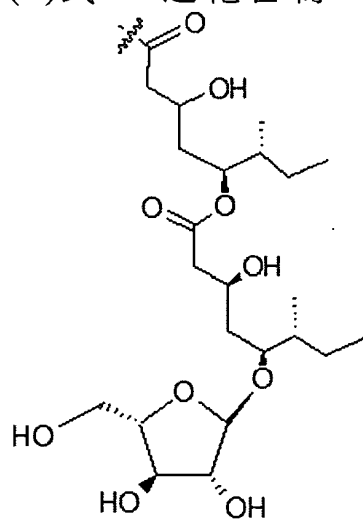
(4) 式 I 之化合物，且其中 R^1 為 β -D-木糖， R^2 為 H，



及 R^3 為

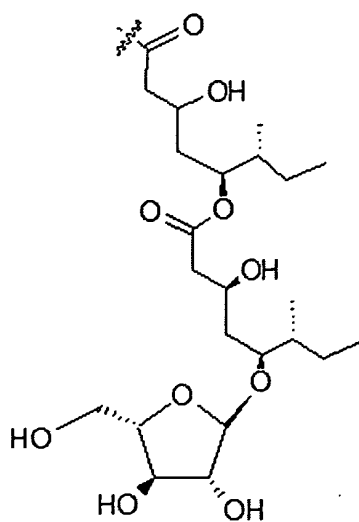
【第 8 項】如申請專利範圍第 7 項所述之疫苗，其中該 OBI-821 皂素進一步包含至少一種選自以下經分離之式(I)化合物之第二化合物混合物：

(1) 式 I 之化合物，且其中 R^1 為 β -D-芹菜糖， R^2 為



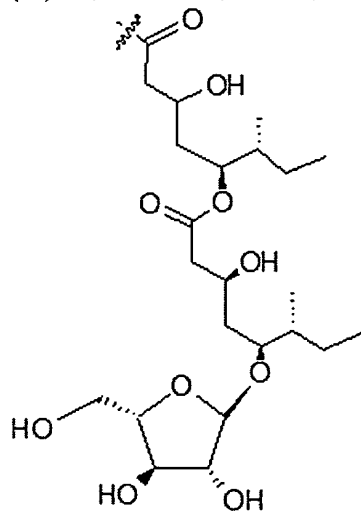
，及 R^3 為 H；

(2) 式 I 之化合物，且其中 R^1 為 β -D-芹菜糖， R^2 為 H，



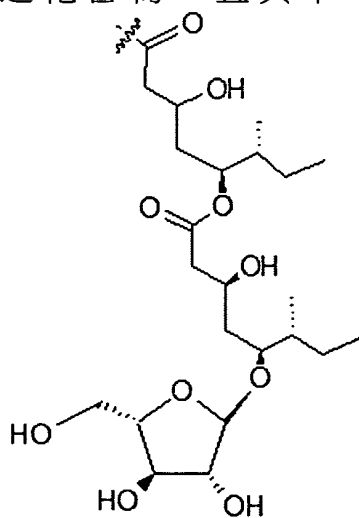
及 R^3 為

(3) 式 I 之化合物，且其中 R^1 為 β -D-木糖， R^2 為



，及 R^3 為 H；及

(4) 式 I 之化合物，且其中 R^1 為 β -D-木糖， R^2 為 H，

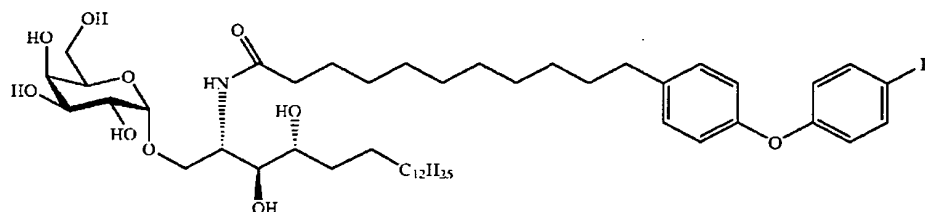


及 R^3 為

【第9項】申請專利範圍第1項所述之疫苗，其進一步包含 α -半

乳糖基-神經醯胺 (α -GalCer) 佐劑。

【第10項】 如申請專利範圍第9項所述之疫苗，其中該 α -GalCer 佐劑具有以下結構：



【第11項】 一種醫藥組合物，其包含：

(a) 如申請專利範圍第1項至第10項之任一項所述之疫苗；及

(b) 醫藥學上可接受之載劑。

【第12項】 一種如申請專利範圍第1項至第10項之任一項所述之醫藥組成物用於製備抑制癌細胞之藥物之用途，其向有需要之個體投與有效量之如申請專利範圍第1項至第10項之任一項所述之疫苗。

【第13項】 如申請專利範圍第12項所述之用途，其中該癌症為表現 Globo H 之癌症。

【第14項】 如申請專利範圍第13項所述之用途，其中該表現 Globo H 之癌症為乳癌、肺癌、胃癌、結腸癌、胰臟癌、前列腺癌、卵巢癌、食道癌、直腸癌、膽管癌、肝癌、頰癌、鼻咽癌、腎癌、腦腫瘤、睪丸癌、膀胱癌、頭頸癌、口腔癌、神經內分泌癌、腎上腺癌、甲狀腺癌、骨癌、皮膚癌、基底細胞癌、鱗狀細胞癌、黑色素瘤、子宮頸癌或子宮內膜癌。