



(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 I674269 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 10 月 11 日

(21)申請案號：105105741

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 02 月 25 日

(51)Int. Cl. : C07K14/005 (2006.01)

A61K39/12 (2006.01)

(30)優先權：2015/02/26 美國

US 62/121,406

(71)申請人：生控基因疫苗股份有限公司 (中華民國) THE VAX GENETICS VACCINE CO., LTD.
(TW)

臺北市大安區仁愛路 4 段 25-2 號 5 樓

(72)發明人：吳嘉茂 WU, CHIA-MAO (TW)；吳俊明 WU, JUN-MING (TW)；邱怡翠 CHIU, YI-TSUI (TW)；林吟璟 LIN, YIN-CHING (TW)；莊賢凱 CHUANG, HSIEN-KAI (TW)；謝馥檀 HSIEH, FU-TAN (TW)；陳冠銘 CHEN, KUAN-MING (TW)

(74)代理人：王尊民

(56)參考文獻：

TW 201210617A1

TW 201428000A

TW 201428001A

WO 2015/002954A1

審查人員：莊智惠

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：11 共 34 頁

(54)名稱

包含免疫原性蛋白質及組合佐劑並用以誘發抗原特異性 T 細胞反應之疫苗組成物

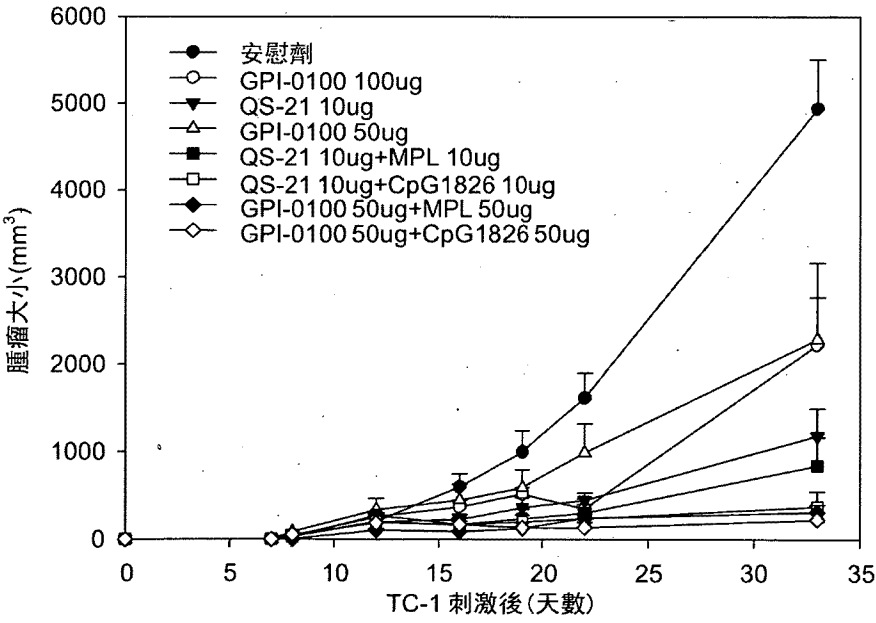
(57)摘要

本發明提供用以在需治療患者身上誘發經強化之抗原特異性 T 細胞介導免疫反應之疫苗組成物。該組成物包含(a)一治療有效量之一免疫原性蛋白質，其係包含至少一病原體之一抗原；(b)一皂素基佐劑(saponin-base adjuvant)，其係選自以下項目所構成群組：GPI-0100、Quil A 及 QS-21；以及(c)一類鐸受體致效佐劑[Toll-like receptor (TLR) agonist adjuvant]，其係選自以下項目所構成群組：單磷醯脂質 A(MPL)及 CpG1826。

Vaccine compositions for use in inducing enhanced antigen-specific T cell-mediated immune responses in a subject in need thereof are disclosed. The composition comprises (a) a therapeutically effective amount of an immunogenic protein comprising at least an antigen of a pathogen; (b) a saponin-base adjuvant selected from the group consisting of GPI-0100, Quil A, QS-21; and (c) a Toll-like receptor (TLR) agonist adjuvant selected from the group consisting of monophosphoryl lipid A (MPL), and CpG1826.

指定代表圖：

圖 11



【發明說明書】

【中文發明名稱】 包含免疫原性蛋白質及組合佐劑並用以誘發抗原特異性T細胞反應之疫苗組成物

【英文發明名稱】 A VACCINE COMPOSITION COMPRISING AN IMMUNOGENIC PROTEIN AND COMBINATION ADJUVANTS FOR USE IN ELICITING ANTIGEN-SPECIFIC T-CELL RESPONSES

【技術領域】

【0001】 本發明整體而言係關於疫苗製劑，更具體而言係關於具有組合佐劑之疫苗製劑。

【先前技術】

【0002】 許多疫苗均以佐劑為其關鍵成分。絕大多數現有疫苗均僅含有單一佐劑。由於其本身限制，任一種佐劑皆無法誘發各種疫苗所需之全部保護免疫反應。因此實需探求在一疫苗製劑中包含多種佐劑之技術。

【發明內容】

【0003】 於一種態樣中，本發明係關於一種疫苗組成物，其係包含：

(a) 一治療有效量的一免疫原性蛋白質，其包含至少一病原體的一抗原；

(b) 一皂素基佐劑(saponin-base adjuvant)，其選自以下項目所構成群組：GPI-0100、Quil A及QS-21；以及

(c) 一類鐸受體致效佐劑[Toll-like receptor (TLR) agonist adjuvant]，其係選自以下項目所構成群組：單磷醯脂質 A (monophosphoryl lipid A, MPL) 及 CpG1826。

【0004】 於本發明另一實施例中，該組成物進一步包含至少一添加劑，該添加劑係選自以下項目所構成群組：甘露醇(mannitol)、蔗糖(sucrose)、海藻糖(trehalose)、組胺酸(histidine)、甘胺酸(glycine)、精胺酸(arginine)、山梨糖醇(sorbitol)、聚山梨醇酯80 (Polysorbate 80)、葡萄糖(glucose)、乳糖(lactose)、麥芽糖(maltose)、麥芽糊精(maltodextrins)、檸檬酸鹽(citrate)、三羥甲基胺基甲烷(Tris) 及磷酸鈉(sodium phosphate)。

【0005】 於本發明另一實施例中，該免疫原性蛋白質係一融合蛋白，其

係包含：

(a) 一抗原呈現細胞(APC)結合區[antigen-presenting cell (APC)-binding domain]或一CD91受體結合區(CD91 receptor-binding domain)，位於該融合蛋白之N端；

(b) 一蛋白質轉導區(protein transduction domain)，位於該APC結合區或該CD91受體結合區之C端，該蛋白質轉導區係選自以下項目所構成群組：

(i) 一融合多肽包含：

(1) 一T細胞增敏訊號轉導勝肽(T cell sensitizing signal-transducing peptide)，在長度上具有28-53個胺基酸殘基，包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列，其中Xaa⁸為I或L；Xaa¹⁰為V、F或A，Xaa¹¹為M或L，Xaa¹⁷為L或I，位於該融合多肽之N端；

(2) 一轉位勝肽(translocation peptide)，在長度上具有34-112個胺基酸殘基，包含一與SEQ ID NO: 3、20、4、或41為至少90%相同之胺基酸序列；以及

(3) 一連結體(linker)，包含SEQ ID NO: 15，連結該T細胞增敏訊號轉導勝肽與該轉位勝肽；

(ii) 一T細胞增敏訊號轉導勝肽，在長度上具有28-53個胺基酸殘基，包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列，其中Xaa⁸為I或L；Xaa¹⁰為V、F或A，Xaa¹¹為M或L，Xaa¹⁷為L或I；以及

(iii) 一轉位勝肽，在長度上具有34-61個胺基酸殘基，包含一與SEQ ID NO: 3、20或41為至少90%相同之胺基酸序列；以及

(c) 一病原體的一抗原，位於該蛋白質轉導區之C端；

其中若該蛋白質轉導區為(biii)之轉位勝肽，則該APC結合區或該CD91受體結合區不含綠膿桿菌外毒素A (Pseudomonas exotoxin A, PE)結合區Ia之胺基酸序列。

【0006】 於本發明另一實施例中，該蛋白質轉導區包含SEQ ID NO: 30之序列。

【0007】 於本發明另一實施例中，該APC結合區或該CD91受體結合區係一多肽，其係包含一與選自以下項目所構成群組者為至少90%相同之胺基酸序列：SEQ ID NO: 5、9、6、7及8。

【0008】 於本發明另一實施例中，該APC結合區或該CD91受體結合區包

含一與選自以下項目所構成群組者為至少95%相同之胺基酸序列：SEQ ID NO: 5、9、6、7及8。

【0009】 於本發明另一實施例中，該APC結合區或該CD91受體結合區係一多肽，其係包含一選自以下項目所構成群組者之胺基酸序列：SEQ ID NO: 5、9、6、7及8。

【0010】 可擇地，該APC結合區係選自以下項目所構成群組：受體相關蛋白質-1 (receptor-associated protein-1, RAP1)功能區III、 α -2-巨球蛋白受體相關蛋白質(alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein, A2M)、HIV-Tat，及熱休克蛋白 (heat shock proteins, HSPs)，以及綠膿桿菌外毒素A (PE)結合區Ia。

【0011】 於本發明另一實施例中，該融合蛋白不含綠膿桿菌外毒素A (PE)結合區Ia之胺基酸序列。

【0012】 於本發明另一實施例中，該融合蛋白進一步包含一內質網滯留序列，位於該融合蛋白之C端。

【0013】 於本發明另一實施例中，該內質網(ER)滯留序列包含 Lys-Asp-Glu-Leu (SEQ ID NO: 14)之胺基酸序列。ER滯留序列可包含一選自以下項目所構成群組之序列：SEQ ID NO: 14、16-19。可擇地，該ER滯留序列可包含選自以下項目所構成群組之序列：SEQ ID NO: 16-19。

【0014】 於本發明另一實施例中，若該抗原包含10個或更多決定位(epitopes)，則該融合蛋白之C端不具有內質網滯留序列。

【0015】 於本發明另一實施例中，該蛋白質轉導區係為(bi)之融合多肽。

【0016】 於本發明另一實施例中，該蛋白質轉導區係為(bii)之T細胞增敏訊號轉導胜肽。

【0017】 於本發明另一實施例中，該融合蛋白進一步包含一額外連結體，其係位於該蛋白質轉導區與該抗原之間，該額外連結體包含SEQ ID NO: 15。

【0018】 於本發明另一實施例中，該蛋白質轉導區係為(biii)之轉位胜肽。

【0019】 於本發明另一實施例中，該融合蛋白進一步包含一額外連結體位於該APC結合區或該CD91受體結合區與該轉位胜肽之間，該額外連結體包含SEQ ID NO: 15。

【0020】 於本發明另一實施例中，該蛋白質轉導區包含SEQ ID NO: 30之序列。

【0021】 於本發明另一實施例中，該T細胞增敏訊號轉導胜肽包含一與SEQ ID NO: 1或2為至少90%相同之胺基酸序列。

【0022】 於本發明另一實施例中，該T細胞增敏訊號轉導胜肽包含一胺基酸序列，其係選自以下項目所構成群組：SEQ ID NO: 1及2。

【0023】 於本發明另一實施例中，該轉位胜肽包含一胺基酸序列係選自以下項目所構成群組：SEQ ID NO: 3、20、4及41。

【0024】 於本發明另一實施例中，該轉位胜肽在長度上具有34-61個胺基酸殘基。

【0025】 於本發明另一實施例中，上述融合蛋白之蛋白質轉導區具有以下特性：(i)該T細胞增敏訊號轉導胜肽包含SEQ ID NO: 1或2之胺基酸序列；以及(ii)該轉位胜肽包含與SEQ ID NO: 3為至少95%相同之胺基酸序列。

【0026】 該T細胞增敏訊號轉導胜肽展現誘發一抗體之特徵，該抗體可辨識並結合T細胞上CD28受體之胺基酸序列 $K^1X^2E^3X^4X^5Y^6P^7P^8P^9Y^{10}$ (SEQ ID NO: 32)，其中 X^2 為I或L； X^4 為V、F或A，且 X^5 為M或L。

【0027】 抗原呈現細胞(APC)可選自以下項目所構成群組：樹突細胞、巨噬細胞、B細胞及單核血球。

【0028】 在本發明一實施例中，APC之細胞膜包含一CD91受體。

【0029】 於本發明另一實施例中，該病原體係至少一選自以下項目所構成群組：人類乳突病毒(Human Papillomavirus, HPV)、豬生殖與呼吸綜合症病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、人類免疫缺乏病毒(Human Immuno-deficient Virus, HIV-1)、流感病毒(Influenza virus)、登革熱病毒(dengue virus)、C型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)、B型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)及豬環狀病毒2 (Porcine Circovirus 2, PCV2)。

【0030】 在本發明一實施例中，該病原體抗原係選自以下項目所構成群組：人類乳突病毒(HPV) E7蛋白質、B型肝炎病毒(HBV) HBx蛋白質、C型肝炎病毒(HCV)核心抗原、流感病毒M2抗原以及一腫瘤相關抗原。

【0031】 在本發明一實施例中，該HPV E7蛋白質包含一與SEQ ID NO: 21為至少90%相同之胺基酸序列。

【0032】 於本發明另一實施例中，該腫瘤相關抗原係選自以下項目所構成群組：SSX2、MAGE-A3、NY-ESO-1、iLRP、WT12-281、RNF43 (2-116 + 696-783)

及CEA-NE3。

【0033】 於本發明另一實施例中，該抗原係為HPV E7抗原，包含一與選自以下項目所構成群組之序列為至少90%相同之胺基酸序列：SEQ ID NO: 21及22。在本發明一較佳實施例中，該抗原係為HPV E7抗原，其包含SEQ ID NO: 21之胺基酸序列。

【0034】 於本發明另一實施例中，該融合蛋白進一步包含一內質網滯留序列，其係位於該融合蛋白之C端。

【0035】 在本發明一實施例中，該免疫原性蛋白質係一融合蛋白，其係包含SEQ ID NO: 54之序列。例如，該免疫原性蛋白質可為融合蛋白 PE₄₀₇-E7-K3 (SEQ ID NO: 54)。

【0036】 於本發明另一實施例中，該免疫原性蛋白質係一融合蛋白，其係包含SEQ ID NO: 55之序列。例如，該免疫原性蛋白質可為融合蛋白 RAP1-CD28convPE_r-E7-K3 (SEQ ID NO: 55)。

【0037】 於本發明另一實施例中，該免疫原性蛋白質為一融合蛋白，其係包含：

(a) 一抗原呈現細胞(APC)結合區或一CD91受體結合區，位於該融合蛋白之N端；

(b) 一轉位胜肽，在長度上具有34-112個胺基酸殘基，包含一與SEQ ID NO: 3、4、20或41為至少90%相同之胺基酸序列，位於該APC結合區或該CD91受體結合區之C端；以及

(c) 一病原體的一抗原；

(d) 一出核訊號(nuclear export signal, NES)，包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列；以及

(e) 一內質網滯留序列，位於該融合蛋白之C端；

其中該出核訊號係位於該抗原與該內質網滯留序列之間，或該轉位胜肽與該抗原之間。

【0038】 於本發明另一實施例中，該免疫原性蛋白質係一融合蛋白包含：

(a) 一抗原呈現細胞(APC)結合區或一CD91受體結合區，位於該融合蛋白之N端；

(b) 一轉位胜肽，在長度上具有34-61個胺基酸殘基，包含一與SEQ ID NO: 3、20或41為至少90%相同胺基酸序列，位於該APC結合區或該CD91受體結合區之C端；以及

(c) 一病原體的一抗原；

(d) 一出核訊號，包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列；以及

(e) 一內質網滯留序列，位於該融合蛋白之C端；

其中該出核訊號係位於該抗原與該內質網滯留序列之間，或該轉位胜肽與該抗原之間。

【0039】 於本發明另一實施例中，該SEQ ID NO: 44之C端胺基酸係為丙胺酸(alanine)。

【0040】 於本發明另一實施例中，該出核訊號包含SEQ ID NO: 45之胺基酸序列。

【0041】 於本發明另一實施例中，該內質網滯留序列包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列。

【0042】 於本發明另一實施例中，該出核訊號及該ER滯留序列形成一融合胜肽，其係包含一與SEQ ID NO: 43為至少90%相同之胺基酸序列。

【0043】 於本發明另一實施例中，該轉位胜肽在長度上具有34-61個胺基酸殘基。

【0044】 於本發明另一實施例中，該轉位胜肽在長度上具有34-46個胺基酸殘基。

【0045】 於本發明另一實施例中，該APC結合區或該CD91受體結合區係不含綠膿桿菌外毒素A (PE)結合區Ia之胺基酸序列。

【0046】 於本發明另一實施例中，該APC結合區或該CD91受體結合區包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列。

【0047】 於本發明另一實施例中，該APC結合區或該CD91受體結合區之胺基酸序列為SEQ ID NO: 9。

【0048】 於本發明另一實施例中，該抗原係來自一病原體的二或多個抗原胜肽之融合抗原。

【0049】 於本發明另一實施例中，該ER滯留序列之長度超過4個胺基酸殘基。

【0050】 於本發明另一實施例中，該轉位胜肽包含一與SEQ ID NO: 3、4、20或41為至少95%相同之胺基酸序列。

【0051】 於本發明另一實施例中，該APC結合區或該CD91受體結合區展現能夠辨識並結合一抗原呈現細胞(APC)上受體之特性，該抗原呈現細胞(APC)係選自以下項目所構成群組：樹突細胞、單核血球、B細胞及淋巴細胞。

【0052】 於本發明另一實施例中，該病原體係選自以下項目所構成群組：豬生殖與呼吸綜合症病毒(PRRSV)、豬環狀病毒2 (PCV2)、口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)、豬瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)、新城雞瘟病毒(Newcastle disease virus, NDV)、傳染性胃腸炎病毒(Transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、豬流行性下痢病毒(Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)、流行性感冒病毒、假性狂犬病病毒(Pseudorabies virus)、微小病毒(Parvovirus)、豬水疱病病毒(Swine vesicular disease virus, SVDV)、痘病毒(Poxvirus)、輪狀病毒(Rotavirus)、肺炎黴漿菌(Mycoplasma pneumonia)、疱疹病毒(Herpes virus)、傳染性支氣管炎病毒(Infectious bronchitis virus)及傳染性華氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus)。

【0053】 該疫苗組成物可採腸胃外藥劑型態，例如皮下或肌內注射。

【0054】 於另一態樣中，本發明係關於上述組成物於製造一種藥劑之使用，所述藥劑係用以在需治療患者身上誘發一病原體抗原特異性T細胞介導免疫反應。

【0055】 可擇地，於另一態樣中，本發明係關於上述組成物於在需治療患者身上誘發一病原體抗原特異性T細胞介導免疫反應之用途。

【0056】 進一步可擇地，本發明係關於一種在需治療患者身上誘發經強化之抗原特異性T細胞介導免疫反應之方法，其係包含對需治療患者施以一治療有效量之上述組成物，並藉以在需治療患者身上誘發經強化之抗原特異性T細胞介導免疫反應。

【0057】 上述及其他態樣將藉由以下較佳實施例之描述參照以下附圖陳明，然據其所為之變化及修改亦應屬於本發明新穎概念之精神及範疇。

【0058】 附圖闡明本發明之一或多種實施例，並配合書面敘述共同說明本發明之原理。各圖面中係以相同之示數指稱實施例中相同或相似之元件。

【圖式簡單說明】**【0059】**

圖1為建構物示意圖。

圖2之表格顯示各種疫苗組成物誘發之細胞介導免疫原性。

圖3之表格顯示各種疫苗組成物誘發之體液免疫原性。

圖4顯示免疫接種時程。

圖5A之圖表顯示皂素基佐劑GPI-0100與TLR致效佐劑於刺激免疫原性蛋白質PE₄₀₇-E7-K3所誘發T細胞介導免疫反應上之相互作用。

圖5B係將圖5A之資料以GPI-0100（50微克／劑）為基準進行標準化後之圖表。

圖6之圖表顯示圖5A動物組之抗體力價。

圖7A之圖表顯示皂素基佐劑QS-21與TLR致效佐劑於刺激免疫原性蛋白質PE₄₀₇-E7-K3所誘發T細胞介導免疫反應上之相互作用。

圖7B係將圖7A之資料以QS-21（10微克／劑）為基準進行標準化後之圖表。

圖7C係將圖7A之資料以GPI-0100（100微克／劑）為基準進行標準化後之圖表。

圖8之圖表顯示圖7A動物組之抗體力價。

圖9之圖表顯示各種疫苗製劑誘發之T細胞介導免疫反應。

圖10A之表格列示多種包含一免疫原性蛋白質及一或兩種佐劑之疫苗製劑。

圖10B為腫瘤小鼠模型之免疫接種時程。

圖11之圖表顯示經PE₄₀₇-E7-K3結合各種佐劑(n=4)接種之動物組腫瘤大小曲線。安慰劑組施以PBS（亦即無佐劑及PE₄₀₇-E7-K3）。

【實施方式】

【0060】 本發明將於以下實例詳細描述，此處所舉實例僅為說明之用，熟悉此技術人士應可由此思及多種修改與變化。在此詳述本發明之各種實施例。於附圖中，類似之元件係標以類似之編號。於此說明書及所附申請專利範圍中，除非前後文另有指明，否則「一」、「一種」及「該」之意義包括複數。同樣，此說明書及所附申請專利範圍中，除非前後文另有指明，否則「在...內」之意義包括「在...內」及「在...上」。此外，說明書中所用之標題或副標僅為方便讀者參照，不應影響本發明之範圍。此說明書中所用之其他語彙將於下文明確

體定義。

定義

【0061】本說明書中所用語彙普遍具有其在此技術中針對本發明相關用途及各語彙所用上下文所應理解之常設意義。以下就數項用於描述本發明之語彙進行說明，以利讀者瞭解本發明之描述。為求便利，某些語彙可能帶有強調性標示，例如使用斜體字及／或引號。強調性標示之使用並不影響語彙之範圍及意義；語彙之範圍及意義於相同之文章脈絡中不論有無強調性標示均為相同。應知相同之事物可透過多種方式表述。因此，在此所討論之一或多個語彙可能使用替代性用語及同義詞，一語彙在此闡述或討論與否並非表示該語彙有無特殊重要性。在此提供特定語彙之同義詞。對於一或多種同義詞之使用並非排除其他同義詞之使用。本說明書中各處使用之實例，包括在此所述之語彙範例，均僅屬說明用途，不應對本發明或任何例示語彙之範圍及含意構成限制。同理，本發明並不受限於本說明書中所提出之各種實施例。

【0062】除非另有定義，否則在此使用之所有技術及科學語彙均具有本發明所屬技術領域人士通常理解之含意。若有牴觸，應以本文件及其所提供之定義為準。

【0063】美國專利申請公開案第20140154285 A1號及第20140154280 A1號中述及將例如融合蛋白等免疫原性蛋白質使用作為免疫原性增強劑，用以誘發抗原特異性T細胞反應，上開各案之整體於此合併參照。

【0064】類鐸受體(TLR) 4配體，特別是增效劑(agonist)，例如脂質A衍生物，具體而言是單磷醯脂質A (monophosphoryl lipid A)，或更具體而言是3脫醯單磷醯脂質A (3 Deacylated monophosphoryl lipid A, 3 D-MPL)。GlaxoSmithKline Biologicals N.A.所販售之3D-MPL以MPL為名，而在本說明書中將之稱為MPL或3D-MPL。

【0065】美國專利第5,057,540號、Kensil, C. R.發表之「皂素作為疫苗佐劑 (Saponins as vaccine adjuvants)」(Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2):1-55)以及EP 0362279 B1，均對Quil A [取自南美皂樹(*Quillaja Saponaria* Molina)之樹皮]及其分離部份有所描述。

【0066】QS-21為取自南美皂樹樹皮之天然皂素。QS-21係Quil A之HPLC純化無毒分離部份，在美國專利第5,057,540號中有所描述。

第9頁，共22頁(發明說明書)

【0067】「抗原呈現細胞(APC)或輔助細胞(accessory cell)」一語意指細胞能夠展現與其表面上主要組織相容性複合體(MHC)複合之外來抗原。T細胞可利用其T細胞受體(TCR)辨識此等複合體。此等細胞處理抗原並將之呈現給T細胞。專職抗原呈現細胞之主要種類包括：樹突細胞(DC)、巨噬細胞、單核血球及特定B細胞。

【0068】「抗原呈現細胞(APC)結合區」一語意指可結合至一抗原呈現細胞(APC)之功能區。APC結合區可為一種多肽，其包含與選自以下項目所構成群組之序列為至少90%相同之胺基酸序列：SEQ ID NO: 5、6、7、8及9。APC結合區係一能夠辨識並結合APC上受體之配體。

【0069】分化簇91 (Cluster of differentiation 91, CD91)係一蛋白質，可形成細胞膜中之受體，並參與受體介導胞吞作用(receptor-mediated endocytosis)。

【0070】「蛋白質轉導區」一語意指一多肽或一融合多肽，其可增敏T細胞，並從而強化抗原特異性T細胞反應，及／或將一抗原導引或指向（亦即標定向）抗原呈現之第一型主要組織相容性複合體(MHC-I)路徑（亦即胞毒性T細胞路徑）。

【0071】「增敏T細胞」一語普遍是指CD8+及CD4+T細胞受到增敏作用影響，且因此CD8+(CTL)及CD4+T細胞對於抗原挑戰之反應受到強化。抗原特異性細胞介導免疫反應之測量方式係將對抗原反應時所產生之抗原特異性誘導的 γ -干擾素(γ -interferon)量化。例如，若無增敏訊號（亦即無蛋白質轉導區），抗原獨自作用可能僅產生微弱或甚至完全無法產生細胞介導免疫反應，亦即，CD8+及CD4+T細胞僅產生少量或甚至完全不產生抗原特異性的 γ -干擾素，而若配合增敏訊號（蛋白質轉導區），抗原便可產生經強化之細胞介導免疫反應。因此，增敏訊號（蛋白質轉導區）之功能在於提升CD4+及CD8+T細胞於宿主體內之敏感度，俾使宿主於其後受一抗原刺激時，因CD4+及CD8+T細胞事先已經致敏化，故而該抗原可引致經強化之抗原特異性T細胞介導免疫反應。

【0072】蛋白質轉導區可為「融合多肽」，其中融合多肽包含一T細胞增敏訊號轉導胜肽、一連結體以及一轉位胜肽。例如，該融合多肽可為「CD28convPE_t」多肽。

【0073】「CD28conv」一語意指CD28保留區域，係一「T細胞增敏訊號轉導胜肽」。此為誘發CD28增效劑抗體(CD28 agonist antibody)之決定位。

【0074】「PE_t」或「PE_tCore」一語意指長度上包含34個胺基酸殘基之PE轉位區核心。

【0075】「CD28conv」與「PE_t」之間有一連結體。融合多肽「CD28convPE_t」之方向或排列十分重要，因為「CD28conv」（或T細胞增敏訊號轉導胜肽）必須位於PE_t（或轉位胜肽）之上游，亦即，PE_t必須位於「CD28conv」之C端方能強化T細胞反應。特別地，「CD28convPE_t」對CD28conv產生之IgG力價（稱為CD28特定增效劑抗體）遠高於反向融合胜肽PE_tCD28conv。CD28特定增效劑抗體對CD4+及CD8+T細胞均能產生增敏作用。正確定向之融合多肽CD28convPE_t係在CD28conv與PE_t區域之間有一連結體(R¹X²R³X⁴K⁵R⁶)。此連結體包含一抗原呈現細胞(APC)特定蛋白酶（細胞自溶酵素L）切位點Lys-Arg (KR)。因此，融合蛋白RAP1-CD28convPE_t-抗原-K3可被消化為兩個片段：RAP1-CD28conv及PE_t-抗原-K3。RAP1-CD28conv片段可進一步在溶解體中消化，且CD28conv之決定位經由MHC II路徑呈現於APC細胞表面，進而誘發產生CD28增效劑抗體之體液免疫反應。因此，CD28增效劑抗體是由B細胞產生。此CD28增效劑抗體可結合至T細胞表面之CD28，並預先活化T細胞 (CD4+及CD8+T細胞)。

【0076】「T細胞增敏訊號轉導胜肽」在長度上具有28-53個胺基酸殘基且包含一與SEQ ID NO: 31至少90%相同之胺基酸序列，其中X⁸為I或L；X¹⁰為V、F或A，X¹¹為M或L，X¹⁷為L或I。

【0077】T細胞增敏訊號轉導胜肽包含主要區K¹X²E³X⁴X⁵Y⁶P⁷P⁸Y¹⁰ (SEQ ID NO: 32) 其中X²為I或L；X⁴為V、F或A，X⁵為M或L。

【0078】美國專利第20140154285 A1號提及特定用於小鼠之T細胞增敏訊號轉導胜肽(TDIYFCKIEFMYPYLDNEKSNGTIIH；SEQ ID NO: 31，其中X⁸為I，X¹⁰為F，X¹¹為M，X¹⁷為L)。

【0079】PE轉位胜肽可包含一與SEQ ID NO: 3、4、20或41為至少90%相同之胺基酸序列。例如，PE轉位胜肽之胺基酸序列可為全長PE (SEQ ID NO: 10) 之a.a. 280 - a.a. 313 (SEQ ID NO: 3)、a.a. 268 - a.a. 313 (SEQ ID NO: 20)、a.a. 253 - a.a. 313 (SEQ ID NO: 41)或a.a. 253 - a.a. 364 (SEQ ID NO: 4)。亦即，PE轉位胜肽之胺基酸序列可包含PE功能區II (a.a. 253至a.a. 364；SEQ ID NO: 4)之任何部位，只要其包含a.a. 280-a.a. 313 (SEQ ID NO: 3)必要片段即可。

【0080】抗原可為致病蛋白、多肽或胜肽，其可引起因病原體造成之疾

病，或能夠在受病原體或腫瘤相關抗原(tumor-associated antigen, TAA)感染之宿主體內誘發免疫反應，所述腫瘤相關抗原(TAA)係一明確表達於腫瘤細胞中之多肽。抗原可選自病原體或癌細胞，包括但不限於，人類乳突病毒(HPV)、豬生殖與呼吸綜合症病毒(PRRSV)、人類免疫缺陷病毒-1 (HIV-1)、流感病毒、登革熱病毒、C型肝炎病毒(HCV)、B型肝炎病毒(HBV)、豬環狀病毒2 (PCV2)、豬瘟病毒(CSFV)、口蹄疫病毒(FMDV)、新城雞瘟病毒(NDV)、傳染性胃腸炎病毒(TGEV)、豬流行性下痢病毒(PEDV)、流行性感冒病毒、假性狂犬病病毒、微小病毒、豬水疱病病毒(SVDV)、痘病毒、輪狀病毒、肺炎黴漿菌、疱疹病毒、傳染性支氣管炎病毒、傳染性華氏囊病病毒、非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer)、乳腺癌(breast carcinoma)、黑色素瘤(melanoma)、淋巴瘤(lymphomas)、大腸癌(colon carcinoma)、肝細胞癌(hepatocellular carcinoma)及其任何組合。例如，HPV E7蛋白質(E7)、HCV核心蛋白(HCV核心)、HBV X蛋白質(HBx)為疫苗開發所選用之抗原。抗原可為二或多種選自一或多種致病蛋白之抗原所融合而成之融合抗原。例如，PRRSV ORF6與ORF5片段之融合抗原，或PRRSV與PCV2病原體之抗原蛋白融合。

【0081】 內質網滯留序列之作用在於協助抗原自胞吞區室(endocytotic compartment)轉位進入ER，並使其保留在內腔中。其包含序列Lys Asp Glu Leu (KDEL)或RDEL。ER滯留序列可包含KKDLRDELKDEL (SEQ ID NO: 16)、KKDELRLDELKDEL (SEQ ID NO: 17)、KKDELRLVELKDEL (SEQ ID NO: 18)或KDELKDELKDEL (SEQ ID NO: 19)之序列，或是主要由上述序列所構成，或是由上述序列所構成。

【0082】 分子量39 kDa之受體相關蛋白質(RAP1)為ER常駐蛋白(ER resident protein)及LDL受體相關蛋白質之分子伴侶蛋白(molecular chaperone)。其對於CD91 (Kd~ 3 nM)之結合親和力極高，且由三個具有類似功能之區域組成。

【0083】 PE₄₀₇ (SEQ ID NO. 40)在前案專利(US 7,335,361 B2)中稱為PE(ΔIII)。

【0084】 出核訊號(NES)意指蛋白質中4個疏水性殘基之短胺基酸序列，將其標定以利用核運輸從細胞核經核孔複合體輸出至細胞質。輸出蛋白(exproins)辨識並結合NES。最常見之疏水性殘基間隔為L¹X²X³K⁴L⁵X⁶X⁷L⁸X⁹L¹⁰X¹¹ (SEQ ID NO. 44)，其中「L」為白胺酸，「K」為離胺酸，且「X^{2,3,6,7,9,11}」為任何自然

產生之胺基酸。例如，人造NES可包含序列 Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Ala (LQKKLEEELELA；SEQ ID NO: 45)。

【0085】「NESK」一語意指NES與ER滯留訊號之融合胜肽（亦即，NES融合至ER滯留訊號）。其係一人造胜肽，負責處理出核訊號(NES)和ER滯留序列功能。因此，其可從細胞核將抗原經核孔複合體輸出至細胞質，並協助抗原從細胞質轉位至ER並將抗原保留於ER之內腔內。例如，NESK之胺基酸序列可為LQKKLEEELELAKDEL (SEQ ID NO: 43)。

【0086】「患者」一語意指人類或非人類動物。

【0087】「治療」一語意指對於具有癌症或感染之患者，或有罹此疾病症狀或傾向之人，施予有效量之融合蛋白，以期治癒、緩和、解除、醫治、改善或預防該疾病、其症狀或其傾向。此一病患可由醫療專業人士依據任何適當診斷方法之結果而判定。

【0088】「有效量」一語意指在受治療對象身上產生療效所需活性化化合物之用量。如熟悉此技術者所知，有效劑量係依據給藥路徑、賦形劑使用及是否與其他治療方式同時使用而異。

【0089】縮寫：CD 28，分化簇28。

實施例

【0090】以下依據本發明實施例提供示範性儀器、裝置、方法及其相關結果，但不構成對於本發明範圍之限制。應知實例中為便於閱讀，可能加註標題或副標，唯其不應限制本發明之範圍。此外，下文提出特定並揭露特定理論，然其不論對錯，只要本發明之實施不受影響，不論任何特定理論或行動方案均不應限制本發明之範圍。

免疫原性蛋白質製備：

【0091】免疫原性蛋白質表達於大腸桿菌表達系統中。其可能僅為抗原，或為抗原及ER滯留訊號(K3)融合於綠膿桿菌外毒素A功能區I及II（亦即PE₄₀₇）之C端，以產生PE₄₀₇-(抗原)-K3融合蛋白，或為抗原及ER滯留訊號融合於RAP1-CD28convPE_t融合蛋白之C端，以產生RAP1-CD28convPE_t-(抗原)-K3融合蛋白（圖1）。在此所用抗原為E7抗原，且以下實驗係使用產生之兩種融合蛋白PE₄₀₇-E7-K3 (SEQ ID NO: 54)及RAP1-CD28convPE_t-E7-K3 (SEQ ID NO: 55)。

不同免疫原性組成物之免疫原性分析：

【0092】 E7 免疫原性蛋白質(包括E7 抗原、PE₄₀₇-E7-K3 融合蛋白或 RAP1-CD28convPE_t-E7-K3 融合蛋白)被搭配以不同的佐劑，如鋁鹽(alum)、GPI-0100或QS-21，並於小鼠身上測試其免疫原性。所有免疫原性蛋白質與鋁鹽、GPI-0100或QS-21結合時皆可能誘發中度至強度E7 抗原特定體液免疫反應。E7 抗原或PE₄₀₇-E7-K3 融合蛋白結合GPI-0100或QS-21時，可誘發輕度至重度之E7 抗原特定細胞介導免疫反應。另一方面，RAP1-CD28convPE_t-E7-K3 融合蛋白若結合鋁鹽、GPI-0100及QS-21時，可誘發中度至強度細胞介導免疫反應。上述結果顯示GPI-0100及QS-21為較能刺激體液免疫反應及細胞介導免疫反應兩者之佐劑。此外，PE₄₀₇-E7-K3或RAP1-CD28convPE_t-E7-K3 融合蛋白僅有在與皂素基佐劑(如GPI-0100或QS-21)結合時，方能誘發較E7 抗原更強之反應。

T細胞介導免疫反應之動物研究

【0093】 向樂斯科生物科技股份有限公司購入5週齡雌性小鼠C57BL/6。每籠5隻給予12小時晝/12小時夜照明週期。供其自由取用食物飲水，餵養一週並於實驗前維持標準條件。用於實驗之免疫原性蛋白質為生控基因疫苗股份有限公司所生產，經低壓乾凍之PE₄₀₇-E7-K3 (SEQ ID NO: 54)，每瓶含0.6毫克蛋白質。佐劑如下：GPI-0100 (Hawaii Biotech)；MPL (Cat. No. 699800P, Avanti)；Poly I : C (Cat. No. tlrl-pic-5, InvivoGen)；R837 (Cat. No. tlrl-imqs, InvivoGen)；R848 (Cat. No. tlrl-r848, InvivoGen)；CpG1826 (Cat. No. tlrl-1826, InvivoGen)；以及實驗室級QS-21 (TheVax)。

【0094】 免疫接種時程示於圖4。小鼠於3週期間每週一次以表1及圖5A-B、7A-C所示之疫苗製劑接種。所有小鼠於最後一次免疫接種完的7天後犧牲，收取脾臟。將脾細胞分離出來。

佐劑製劑

【0095】 評估表1所列佐劑製劑以調查免疫原性組成物之最佳免疫反應。

表1

製劑編號	第一組		第二組				
	(皂素基佐劑)		(TLR 致效佐劑)				
	QS-21	GPI-0100			咪唑喹啉		
Poly I : C (TLR3 增效劑)			MPL (TLR4 增效劑)	R837 (TLR7 增效劑)	R848 (TLR7/8 增效劑)	CpG1826 (TLR9 增效劑)	
A	安慰劑						
B		100 微克					
C		50 微克					
D			50 微克				
E				50 微克			
F					50 微克		
G						50 微克	
H							50 微克
I		50 微克	50 微克				
J		50 微克		50 微克			
K		50 微克			50 微克		
L		50 微克				50 微克	
M		50 微克					50 微克
N	10 微克						
O			10 微克				
P				10 微克			
Q					10 微克		
R						10 微克	
S							10 微克
T	10 微克		10 微克				
U	10 微克			10 微克			
V	10 微克				10 微克		
W	10 微克					10 微克	
X	10 微克						10 微克

CD8⁺細胞之胞內細胞激素染色。

【0096】 於6孔平底組織培養盤裝入脾細胞(2*10⁷)並於37°C培養兩小時，加入或不加入1微克／毫升HPV₁₆-E7胜肽（其為全長PE之第49-57個胺基酸）及布雷非德菌素A (Brefeldin A)以及孟寧素(Monensin)，以增加細胞中細胞激素的

累積，提升對於細胞激素產生細胞(cytokine-producing cell)之可偵測性。經培養後，以300xg離心5分鐘將細胞移入試管。棄置表層物，大致震盪混合孔盤內容物，然後以每一樣本0.2毫克之螢光素異硫氰酸酯共軛(fluorescein isothiocyanate-conjugated)抗小鼠CD8（複製體53-6.7，eBioscience）及抗小鼠CD3（複製體17A2，BioLegend）進行表面標記物染色30分鐘。在黑暗中於冰上以1毫升螢光流式細胞分選儀(FACS)緩衝液（1% FBS於PBS中）及IC固定溶液(eBioscience)清洗細胞30分鐘，之後再次懸浮於1毫升細胞透化清洗緩衝液(BioLegend)。將細胞以Permwash (BD Pharmingen)清洗兩次，而後以0.2毫克／樣本之比例，在黑暗中於冰上以稀釋於細胞透化清洗緩衝液之異藻藍蛋白共軛(allophycocyanin-conjugated)抗小鼠IFN- γ （複製體XMG1.2，eBioscience）染色胞內IFN- γ 30分鐘。將細胞再次懸浮於1毫升FACS緩衝液中，然後使用FACS Calibur流式細胞儀加以分析。

【0097】在免疫原性檢驗中，透過測量脾細胞中之CD3+/CD8+/IFN+ T細胞數量評估各種疫苗製劑所誘發之抗原特異性T細胞介導免疫反應。圖5A顯示以各種疫苗製劑治療之動物組每 2×10^7 脾細胞中之E7特定CD8+/IFN+雙陽性CD3+ T細胞百分比。將各組資料對照於以PE₄₀₇-E7-K3與50微克／劑的GPI-0100組合治療之動物組（圖5B）。資料顯示GPI-0100結合MPL或CpG1826可將免疫原性蛋白質誘發之T細胞介導免疫反應強化2至3倍。

【0098】圖7A顯示以不同疫苗製劑接種之動物組每 2×10^7 脾細胞中之E7特定CD8+/IFN+雙陽性CD3+ T細胞百分比。將各組資料對照於以PE₄₀₇-E7-K3與QS-21（10微克／劑；圖7B）或GPI-0100（100微克／劑；圖7C）組合治療之動物組。資料顯示，相較於僅含單一佐劑QS-21（10微克／劑）之疫苗組成物，QS-21結合MPL（10微克／劑）或CpG1826（10微克／劑）可將免疫原性蛋白質PE₄₀₇-E7-K3誘發之T細胞介導免疫反應強化3至4倍（圖7B）。此外，由包含組合佐劑QS-21及MPL或QS-21及CpG1826之疫苗製劑於動物組所誘發之T細胞介導免疫反應為僅包含單一佐劑GPI-0100（100微克／劑）（圖7C）之疫苗製劑之8倍。

體液免疫性之研究

【0099】以如上所述之方式對動物進行接種並收集血清樣本。將每一動物於各收集時點之血清樣本於阻斷緩衝液中稀釋一萬倍。使用ELISA法測定HPV16

E7特定IgG程度（披覆E7 pet32a 1微克／孔）。

【0100】圖6顯示疫苗組成物使用單一TLR致效佐劑時，僅誘發少量抗體，但若以TLR致效佐劑配合皂素基佐劑GPI-0100（50微克／劑）使用，則在第三次免疫接種後於小鼠身上誘發大量抗體。

【0101】圖8顯示疫苗組成物使用單一TLR致效佐劑時，僅誘發少量抗體，但若以TLR致效佐劑配合皂素基佐劑QS-21（10微克／劑）使用，包含QS-21+MPL或QS-21+CpG1826兩種佐劑之製劑在對動物組進行第二次免疫接種後，於動物體內產生大量抗體（資料未示）。QS-21結合所有TLR致效佐劑均於第三次免疫接種後產生大量抗體。資料顯示QS-21或GPI-0100與Poly I: C之組合並未強化QS-21或GPI-0100之效果，因此GPI-100或QS-21可能是經由TLR3相關機制運作。咪唑喹啉佐劑(R837、R848)之作用路徑與CpG1826相同，但卻展現全然不同之T細胞介導免疫性。至於咪唑喹啉是否能夠經由K細胞及／或巨噬細胞作用則仍有待調查。

不同平台融合蛋白所誘發之T細胞介導免疫原性反應

【0102】進一步利用上述發現之最佳佐劑組合檢驗不同免疫原性蛋白質PE₄₀₇-E7-K3及RAP1-CD28convPE_t-E7-K3所誘發之T細胞介導免疫原性反應，並執行與圖5A所示相同之免疫原性測定。向樂斯科生物科技股份有限公司購入5週齡小鼠57BL/6。免疫接種時程與圖4所示者相同。表2顯示用於此研究之疫苗製劑。

【0103】圖9顯示融合蛋白RAP1-CD28convPE_t-E7-K3誘發之T細胞介導免疫反應較融合蛋白PE₄₀₇-E7-K3強。然而，不論使用何種佐劑組合，兩種平台所誘發之T細胞介導免疫反應的型式相似。

表2

製劑編號	蛋白質	QS-21	GPI-0100	MPL	CpG1826
A	安慰劑				
B	PE ₄₀₇ -E7-K3	10 微克	50 微克		
C			50 微克		
D			50 微克	50 微克	
E			50 微克		50 微克
F		10 微克			
G		10 微克		10 微克	
H		10 微克			10 微克
I		10 微克	50 微克		
J	RAP1- CD28convPE _r - E7-K3		50 微克		
K			50 微克	50 微克	
L			50 微克		50 微克
M		10 微克			
N		10 微克		10 微克	
O		10 微克			10 微克

TC-1腫瘤動物模型之研究

【0104】 疫苗：100微克的PE₄₀₇-E7-K3與不同佐劑或其組合調製成劑。疫苗製劑如圖10A所示。以TC-1細胞株（5*10⁴細胞／小鼠，皮下注射）刺激7天之後，每7天對小鼠接種疫苗一次，共計三次（圖10B）。結果顯示相較於單一佐劑GPI-0100（100微克／劑），組合佐劑QS-21（10微克／劑）與MPL（10微克／劑）、QS-21（10微克／劑）與CpG1826（10微克／劑）、GPI-0100（50微克／劑）與MPL（50微克／劑），或GPI-0100（50微克／劑）與CpG1826（50微克／劑）更能夠有效抑制TC-1腫瘤細胞之生長（圖11）。

【0105】 表3顯示各種融合蛋白成分之序列識別碼(SEQ ID NO.)。

【0106】 表4顯示在動物體內測試T細胞介導免疫反應效果之融合蛋白及抗原序列。

表 3

成分	序列識別碼 SEQ ID NO:	長度 (殘基)
hCD28 核心 TDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIH	1	28
hCD28 最大 NCDGKLGNESVTFYLNQLYVNQTDIYFCKIEVM YPPPYLDNEKSNGTIIHVKG	2	53
PE _t 核心 (PE 轉位區核心; PE 之 a.a. 280- a.a. 313)	3	34
PE _t 最大 (轉位區最大, PE 之 a.a. 253 - a.a. 364)	4	112
RAP1 最大 (功能區 III of RAP1)	5	104
A2M 最小	6	153
HIV-Tat 最小	7	24
HSPs 最小, 熱休克 70 kDa 蛋白質 (HSP; 人類)	8	641
最小綠膿桿菌外毒素 A (PE)結合區 Ia(一 APC 結合區, PE 之 a.a. 1- a.a. 252)	9	252
連結體 R ¹ X ² R ³ X ⁴ K ⁵ R ⁶ , 其中「X ^{2,4} 」為任何胺基酸殘基。	15	6
全長 PE (外毒素 A 成熟型態, 綠膿桿菌)	10	613
全長 RAP1 (人類低密度脂蛋白受體相關蛋白之相關蛋白質 1, LRPAP1); 功能區 1: a.a. 1- a.a. 112; 功能區 2: a.a. 113 - a.a. 218; 功能區 3: a.a. 219 - a.a. 323.	11	323
全長 A2M (人類 α-2-巨球蛋白受體相關蛋白質前驅物)	12	357
HIV-Tat (人類免疫缺陷病毒 1)	13	101
KDEL (內質網滯留序列)	14	4
KKDLRDELKDEL (K3)	16	12
KKDELRLDELKDEL (K3)	17	13
KKDELRLVELKDEL (K3)	18	13
KDELKDELKDEL (K3)	19	12
PE ₂₆₈₋₃₁₃ (全長 PE 之 a.a. 268- a.a. 313) PLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLA ARLSWNQVDQVIR	20	46

CD28convPE _t T ¹ D ² I ³ Y ⁴ F ⁵ C ⁶ K ⁷ X ⁸ E ⁹ X ¹⁰ X ¹¹ Y ¹² P ¹³ P ¹⁴ P ¹⁵ Y ¹⁶ X ¹⁷ D ¹⁸ N ¹⁹ E ²⁰ K ²¹ S ²² N ²³ G ²⁴ T ²⁵ I ²⁶ I ²⁷ H ²⁸ R ²⁹ X ³⁰ R ³¹ X ³² K ³³ R ³⁴ G ³⁵ W ³⁶ E ³⁷ Q ³⁸ L ³⁹ E ⁴⁰ Q ⁴¹ C ⁴² G ⁴³ Y ⁴⁴ P ⁴⁵ V ⁴⁶ Q ⁴⁷ R ⁴⁸ L ⁴⁹ V ⁵⁰ A ⁵¹ L ⁵² Y ⁵³ L ⁵⁴ A ⁵⁵ A ⁵⁶ R ⁵⁷ L ⁵⁸ S ⁵⁹ W ⁶⁰ N ⁶¹ Q ⁶² V ⁶³ D ⁶⁴ Q ⁶⁵ V ⁶⁶ I ⁶⁷ R ⁶⁸ ，其中 X ⁸ 為 I 或 L；X ¹⁰ 為 V、F 或 A，X ¹¹ 為 M 或 L，X ¹⁷ 為 L 或 I，X ^{30, 32} 為任何胺基酸殘基。	30	68
CD28 共有序列 T ¹ D ² I ³ Y ⁴ F ⁵ C ⁶ K ⁷ X ⁸ E ⁹ X ¹⁰ X ¹¹ Y ¹² P ¹³ P ¹⁴ P ¹⁵ Y ¹⁶ X ¹⁷ D ¹⁸ N ¹⁹ E ²⁰ K ²¹ S ²² N ²³ G ²⁴ T ²⁵ I ²⁶ I ²⁷ H ²⁸ ，其中 X ⁸ 為 I 或 L； X ¹⁰ 為 V、F 或 A，X ¹¹ 為 M 或 L，X ¹⁷ 為 L 或 I。	31	28
CD28 關鍵區 K ¹ X ² E ³ X ⁴ X ⁵ Y ⁶ P ⁷ P ⁸ P ⁹ Y ¹⁰ ，其中 X ² 為 I 或 L；X ⁴ 為 V、 F 或 A，X ⁵ 為 M 或 L。	32	10
SSX2	33	187
MAGE-A3	34	314
NY-ESO-1	35	181
iLRP	36	296
WT12-281	37	279
RNF43 (2-116 + 696-783)	38	406
CEA-NE3	39	284
PE ₄₀₇ （全長 PE 之 a.a. 1- a.a. 407）	40	407
PE ₂₅₃₋₃₁₃ （全長 PE 之 a.a. 253- a.a. 313）	41	61
PE ₃₁₃ （全長 PE 之 a.a. 1- a.a. 313）	42	313
NESK 為 <u>LQKKLEELELAKDEL</u> *	43	15
NES 共有序列為 L ¹ X ² X ³ K ⁴ L ⁵ X ⁶ X ⁷ L ⁸ X ⁹ L ¹⁰ X ¹¹ ，其中 「L」為白胺酸，「K」為離胺酸且「X ^{2,3,6,7,9,11} 」為 任何自然產生之胺基酸。	44	11
NES 為 LQKKLEELELA	45	11
PCV2 ORF2（豬環狀病毒類型 2 開放讀譯區 2）	46	192
CSFV E2（豬瘟病毒膜糖蛋白 E2）	47	328
FMDV VP1 胜肽（VP1 之病毒殼蛋白 a.a. 127- a.a. 176）	48	50
FMDV 3A 胜肽（3A 之 a.a. 21-35）	49	15
FMDV（口蹄疫病毒）VP1-3A 胜肽**	50	65

NDV F 胜肽（融合蛋白之 a.a. 65- a.a. 82）	51	18
NDV HN 胜肽（血球凝集素神經氨酸酶之 a.a. 101-a.a. 111）	52	11
NDV FHN 胜肽***	53	29
PE ₄₀₇ -E7-K3	54	525
RAP1-CD28convPE _t -E7-K3	55	290

*：粗體字代表人工出核訊號之胺基酸序列；加註底線字代表內質網滯留訊號之胺基酸序列。

**：VP1-3A胜肽(SEQ ID NO: 50)是由VP1之a.a. 127 - a.a. 176與3A之a.a. 21-a.a. 35所組成之融合抗原；亦即FMDV VP1胜肽(SEQ ID NO: 48)與FMDV 3A胜肽(SEQ ID NO: 49)之融合蛋白。

***：FHN胜肽(SEQ ID NO: 53)是由融合蛋白之a.a. 65 - a.a. 82與血球凝集素神經氨酸酶之a.a. 101- a.a. 111所組成之融合抗原；亦即，NDV F胜肽(SEQ ID NO: 51)與NDV HN胜肽(SEQ ID NO: 52)之融合蛋白。

表4

融合蛋白名稱	抗原名稱	抗原 SEQ ID NO:
RAP1-CD28convPE _t -E7-K3	HPV16 E7（全長）	21
PE ₄₀₇ -E7-K3		
RAP1-CD28convPE _t -E7 ₁₈ -K3	HPV18 E7（全長）	22
RAP1-CD28convPE _t -HCVc-K3	HCV 核心蛋白（全長）	23
RAP1-CD28convPE _t -HBx-K3	HBV X 蛋白（全長）	24
RAP1-CD28convPE _t -PCV2-K3	PCV2 ORF2（ORF2 之片段）	25
RAP1-CD28convPE _t -DGD-K3	PRRSV 核殼體 （ORF7 a.a. 64 - a.a. 123、連結體與 ORF7 a. a. 64- a.a. 123 之融合抗原）	26
RAP1-CD28convPE _t -M12-K3	PRRSV RNA 依賴 RNA 聚合酶 （ORF1b a.a.1046-a.a. 1210）	27
RAP1-CD28convPE _t -PQAB-K3	PRRSV 美株：ORF6 (a.a. 2-a.a. 26)與 ORF5 (a.a. 31- a.a. 63)之融合抗原	28
RAP1-CD28convPE _t -RSAB-K3	PRRSV 歐株：ORF6 (a.a. 2-a.a. 28)與 ORF5 (a.a. 31-a.a. 64)之融合抗原	29

【0107】 上述實施例及實例之選擇及描述係用以說明本發明之原理及其實務應用，以利熟悉此技術人士運用本發明及各種實施例，並就實際使用需要進行適當之各種修改。熟悉本發明所屬領域技術之人士應可輕易思及不脫離本發明精神及範疇之替代實施例。本說明書中引述及討論之所有參考文獻均以其整體於此合併參照，如同其各自於此提及而併入本說明書之程度。



I674269

【發明摘要】

IPC分類：C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

【中文發明名稱】 包含免疫原性蛋白質及組合佐劑並用以誘發抗原特異性T細胞反應之疫苗組成物

【英文發明名稱】 A VACCINE COMPOSITION COMPRISING AN IMMUNOGENIC PROTEIN AND COMBINATION ADJUVANTS FOR USE IN ELICITING ANTIGEN-SPECIFIC T-CELL RESPONSES

【中文】本發明提供用以在需治療患者身上誘發經強化之抗原特異性T細胞介導免疫反應之疫苗組成物。該組成物包含(a)一治療有效量之一免疫原性蛋白質，其係包含至少一病原體的一抗原；(b)一皂素基佐劑(saponin-base adjuvant)，其係選自以下項目所構成群組：GPI-0100、Quil A及QS-21；以及(c)一類鐸受體致效佐劑[Toll-like receptor (TLR) agonist adjuvant]，其係選自以下項目所構成群組：單磷醯脂質A(MPL)及CpG1826。

【英文】Vaccine compositions for use in inducing enhanced antigen-specific T cell-mediated immune responses in a subject in need thereof are disclosed. The composition comprises (a) a therapeutically effective amount of an immunogenic protein comprising at least an antigen of a pathogen; (b) a saponin-base adjuvant selected from the group consisting of GPI-0100, Quil A, QS-21; and (c) a Toll-like receptor (TLR) agonist adjuvant selected from the group consisting of monophosphoryl lipid A (MPL), and CpG1826.

【指定代表圖】 圖11

申請專利範圍

1. 一種組成物，其係包含：

- (a) 一治療有效量之一免疫原性蛋白質，其係包含至少一病原體之一抗原；
- (b) 一皂素基佐劑GPI-0100；
- (c) 一類鐸受體(TLR)致效佐劑，係選自以下項目所構成群組：單磷醯脂質A (MPL)及CpG寡核苷酸；

其中該免疫原性蛋白質係一融合蛋白，其係包含：

- (a') 一抗原呈現細胞(APC)結合區或一CD91受體結合區，位於該融合蛋白之N端；
- (b') 一蛋白質轉導區，位於該APC結合區或該CD91受體結合區之C端，該蛋白質轉導區係選自以下項目所構成群組：

(i) 一融合多肽，包含：

- (1) 一T細胞增敏訊號轉導胜肽，在長度上具有28-53個胺基酸殘基，包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列，其中Xaa⁸為I或L；Xaa¹⁰為V、F或A，Xaa¹¹為M或L，Xaa¹⁷為L或I，位於該融合多肽之N端；
- (2) 一轉位胜肽，在長度上具有34-112個胺基酸殘基，包含一至少與SEQ ID NO: 3、4、20或41為90%相同之胺基酸序列；以及
- (3) 一連結體，包含SEQ ID NO: 15，連結該T細胞增敏訊號轉導胜肽與該轉位胜肽；

(ii) 一T細胞增敏訊號轉導胜肽，在長度上具有28-53個胺基酸殘基，包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列，其中Xaa⁸為I或L；Xaa¹⁰為V、F或A，Xaa¹¹為M或L，Xaa¹⁷為L或I；以及

(iii) 一轉位胜肽，在長度上具有34-112個胺基酸殘基，包含一至少與SEQ ID NO: 3、4、20或41為90%相同之胺基酸序列；以及

- (c') 一病原體之一抗原，位於該蛋白質轉導區之C端。

2. 一種組成物，其係由下列成份組成：

- (a) 一治療有效量之一免疫原性蛋白質；
- (b) 一皂素基佐劑QS21；

- (c) 一類鐸受體(TLR)致效佐劑，係選自以下項目所構成群組：單磷醯脂質A (MPL)及CpG寡核苷酸； 以及
- (d) 一添加劑，該添加劑係選自以下項目所構成群組：甘露醇、蔗糖、漏蘆糖、組胺酸、甘胺酸、精胺酸、山梨糖醇、聚山梨醇酯80、葡萄糖、乳糖、麥芽糖、麥芽糊精、檸檬酸鹽、三羥甲基胺基甲烷以及磷酸鈉；其中該免疫原性蛋白質係一融合蛋白，其係包含：
- (a') 一抗原呈現細胞(APC)結合區或一CD91受體結合區，位於該融合蛋白之N端；
- (b') 一蛋白質轉導區，位於該APC結合區或該CD91受體結合區之C端，該蛋白質轉導區係選自以下項目所構成群組：
- (i) 一融合多肽，包含：
- (1) 一T細胞增敏訊號轉導胜肽，在長度上具有28-53個胺基酸殘基，包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列，其中Xaa⁸為I或L；Xaa¹⁰為V、F或A，Xaa¹¹為M或L，Xaa¹⁷為L或I，位於該融合多肽之N端；
- (2) 一轉位胜肽，在長度上具有34-112個胺基酸殘基，包含一至少與SEQ ID NO: 3、4、20或41為90%相同之胺基酸序列；以及
- (3) 一連結體，包含SEQ ID NO: 15，連結該T細胞增敏訊號轉導胜肽與該轉位胜肽；
- (ii) 一T細胞增敏訊號轉導胜肽，在長度上具有28-53個胺基酸殘基，包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列，其中Xaa⁸為I或L；Xaa¹⁰為V、F或A，Xaa¹¹為M或L，Xaa¹⁷為L或I；以及
- (iii) 一轉位胜肽，在長度上具有34-112個胺基酸殘基，包含一至少與SEQ ID NO: 3、4、20或41為90%相同之胺基酸序列；以及
- (c') 一病原體之一抗原，位於該蛋白質轉導區之C端。
3. 如請求項1所述之組成物，其中該蛋白質轉導區包含SEQ ID NO: 30之序列。
4. 如請求項1所述之組成物，其中該APC結合區或該CD91受體結合區為一多肽，其所包含之胺基酸序列係至少與一選自以下項目所構成群組之序列為90%相同：SEQ ID NO: 5、9、6、7及8。

5. 如請求項1所述之組成物，其中該T細胞增敏訊號轉導胜肽包含一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自以下項目所構成群組：SEQ ID NO: 1及2。
6. 如請求項1所述之組成物，其中該轉位胜肽包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列。
7. 如請求項1所述之組成物，其中該病原體係選自以下項目所構成群組中之至少一者：人類乳突病毒(HPV)、豬生殖與呼吸綜合症病毒(PRRSV)、人類免疫缺乏病毒(HIV-1)、流感病毒、登革熱病毒、C型肝炎病毒(HCV)、B型肝炎病毒(HBV)及豬環狀病毒2 (PCV2)。
8. 如請求項1所述之組成物，其中該病原體抗原係選自以下項目所構成群組：人類乳突病毒(HPV) E7蛋白質、B型肝炎病毒(HBV) HBx蛋白質、C型肝炎病毒(HCV)核心抗原、流感病毒M2抗原以及一腫瘤相關抗原。
- 9.如請求項8所述之組成物，其中該腫瘤相關抗原係選自以下項目所構成群組：SSX2、MAGE-A3、NY-ESO-1、iLRP、WT12-281、RNF43 (2-116 + 696-783)及CEA-NE3。
- 10.如請求項8所述之組成物，其中該HPV E7蛋白質包含一與SEQ ID NO: 21為至少90%相同之胺基酸序列。
- 11.如請求項1所述之組成物，其中該融合蛋白進一步包含一位於該融合蛋白之C端的內質網滯留序列。
- 12.如請求項1所述之組成物，其中該蛋白質轉導區是該在長度上具有34-112個胺基酸殘基之轉位胜肽，且包含一與SEQ ID NO: 3、4、20或41為至少90%相同之胺基酸序列；該融合蛋白還包含一出核訊號，其包含SEQ ID NO: 44之胺基酸序列，以及一內質網滯留序列，其位於該融合蛋白之C端；其中該出核訊號係位於該抗原與該內質網滯留序列之間，或該轉位胜肽與該抗原之間。
13. 如請求項12所述之組成物，其中該轉位胜肽在長度上具有34-61個胺基酸殘基，且包含一與SEQ ID NO: 3、20或41為至少90%相同之胺基酸序列。
14. 如請求項1所述之組成物，其中該抗原呈現細胞(APC)結合區或該CD91受體結合區包含一與SEQ ID NO: 9為至少90%相同之胺基酸序列；該蛋白質轉導區包含一與SEQ ID NO: 3、4、20或41為至少90%相同之胺基酸

序列；以及，該病原體抗原包含一與SEQ ID NO: 21為至少90%相同之胺基酸序列。

15. 如請求項14所述之組成物，其中該融合蛋白包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列。
16. 如請求項1所述之組成物，其中該抗原呈現細胞(APC)結合區或該CD91受體結合區包含一與SEQ ID NO: 5為至少90%相同之胺基酸序列；該蛋白質轉導區包含SEQ ID NO: 30之胺基酸序列；以及，該病原體抗原包含一與SEQ ID NO: 21為至少90%相同之胺基酸序列。
17. 如請求項16所述之組成物，其中該融合蛋白包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列。
18. 一種如請求項1至17中任一項所述之組成物供用於製備一醫藥品之用途，所述醫藥品係用以在需治療的患者身上誘發一病原體抗原特異性T細胞介導免疫反應。
19. 一種組成物，其係由下列成份組成：
 - (a) 一治療有效量之一免疫原性蛋白質；
 - (b) 一皂素基佐劑QS21；以及
 - (c) 一類鐸受體(TLR)致效佐劑，係選自以下項目所構成群組：單磷醯脂質A (MPL)及CpG寡核苷酸；其中該免疫原性蛋白質係一融合蛋白，其係包含：
 - (a') 一抗原呈現細胞(APC)結合區或一CD91受體結合區，位於該融合蛋白之N端；
 - (b') 一蛋白質轉導區，位於該APC結合區或該CD91受體結合區之C端，該蛋白質轉導區係選自以下項目所構成群組：
 - (i) 一融合多肽，包含：
 - (1) 一T細胞增敏訊號轉導胜肽，在長度上具有28-53個胺基酸殘基，包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列，其中Xaa⁸為I或L；Xaa¹⁰為V、F或A，Xaa¹¹為M或L，Xaa¹⁷為L或I，位於該融合多肽之N端；
 - (2) 一轉位胜肽，在長度上具有34-112個胺基酸殘基，包含一至少與SEQ ID NO: 3、4、20或41為90%相同之胺基酸序列；以及

- (3) 一連結體，包含SEQ ID NO: 15，連結該T細胞增敏訊號轉導胜肽與該轉位胜肽；
- (ii) 一T細胞增敏訊號轉導胜肽，在長度上具有28-53個胺基酸殘基，包含SEQ ID NO: 31之胺基酸序列，其中Xaa⁸ 為I或L；Xaa¹⁰ 為V、F或A，Xaa¹¹為M或L，Xaa¹⁷為L或I；以及
- (iii) 一轉位胜肽，在長度上具有34-112個胺基酸殘基，包含一至少與SEQ ID NO: 3、4、20或41為90%相同之胺基酸序列；以及
- (c') 一病原體之一抗原，位於該蛋白質轉導區之C端。