



(21)申請案號：100141418

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 14 日

(51)Int. Cl. : A61K9/127 (2006.01)

A61K38/16 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：廖光文 LIAO, KUANG WEN (TW) ; 陳家弘 CHEN, CHIA HUNG (TW)

(74)代理人：吳冠賜；林志鴻；蘇建太

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：6 共 33 頁

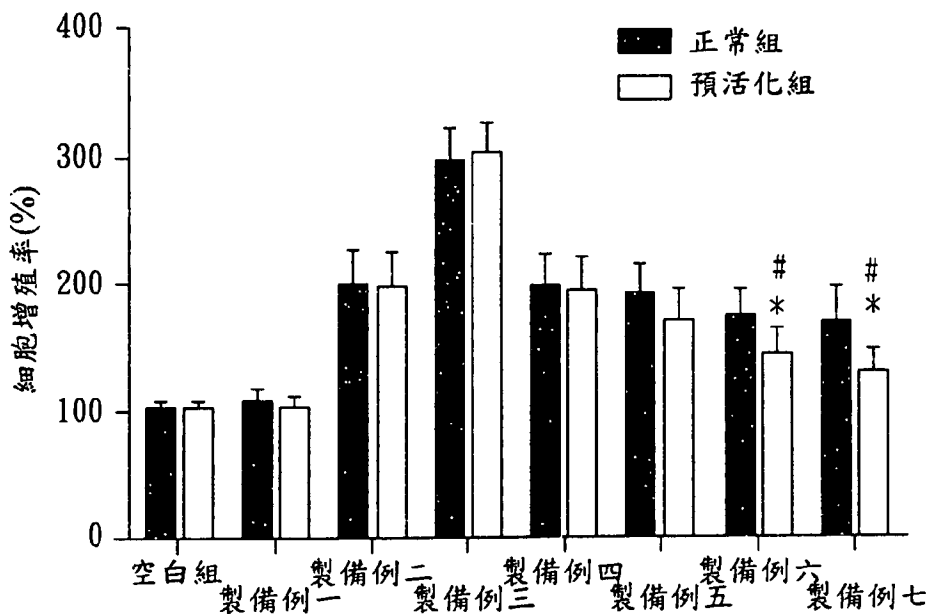
(54)名稱

具有免疫調控能力或增強免疫反應之醫藥組成物

PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF IMMUNOREGULATION OR ENHANCEMENT OF IMMUNE RESPONSE

(57)摘要

本發明係有關於一種具有免疫調控能力或增強免疫反應之醫藥組成物，其係包含一微脂體以及一免疫調控性分子或一抗原性分子，其中無需經過基因性或化學性修飾，只要讓免疫調控性分子或抗原性分子自然吸附於該微脂體，所得的醫藥組成物即可具有免疫調控能力或增強的免疫反應。



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 100141418 AGIK 9/127 (2006.01)

※ 申請日： 100.11.14 ※IPC 分類：

一、發明名稱：(中文/英文)

A 61K 38/16 (2006.01)

具有免疫調控能力或增強免疫反應之醫藥組成物
/PHARMACEUTICAL COMPOSITION OF
IMMUNOREGULATION OR ENHANCEMENT OF
IMMUNE RESPONSE

二、中文發明摘要：

本發明係有關於一種具有免疫調控能力或增強免疫反應之醫藥組成物，其係包含一微脂體以及一免疫調控性分子或一抗原性分子，其中無需經過基因性或化學性修飾，只要讓免疫調控性分子或抗原性分子自然吸附於該微脂體，所得的醫藥組成物即可具有免疫調控能力或增強的免疫反應。

三、英文發明摘要：

A pharmaceutical composition of immunoregulation or enhancement of immune response is disclosed, which includes a liposome and an immunoregulating molecule or an antigenic molecule. The liposome, the immunoregulating molecule or the antigenic molecule needs no genetic or chemical modification. The immunoregulating molecule or the antigenic molecule is spontaneously absorbed by the liposome. Thus, the formed pharmaceutical composition can be used for immunoregulation or enhancement of immune responses.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖(2)。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

「無」

三、英文發明摘要：

A pharmaceutical composition of immunoregulation or enhancement of immune response is disclosed, which includes a liposome and an immunoregulating molecule or an antigenic molecule. The liposome, the immunoregulating molecule or the antigenic molecule needs no genetic or chemical modification. The immunoregulating molecule or the antigenic molecule is spontaneously absorbed by the liposome. Thus, the formed pharmaceutical composition can be used for immunoregulation or enhancement of immune responses.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖(2)。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

「無」

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種含微脂體之醫藥組成物，尤指一種適用於調控免疫能力或增強免疫反應之醫藥組成物。

【先前技術】

微脂體 (liposomes) 一般利用磷脂雙層 (phospholipid bilayer) 所形成的載體，可用於包裹目標藥物分子而達到輸送藥物的功能。由於生物細胞的細胞膜結構基本上也是磷脂雙層，因此微脂體通常具有良好的生物相容性與生物可代謝性。

雖然微脂體作為藥物載體的應用具備了上述優點和特點，但若要大量工業化生產，目前則仍存在一定的難度，例如對於某些水溶性藥物之包封率較低，藥物易從脂質體中滲漏，穩定性不良等。因此，為了增加微脂體的穩定性，有許多技術以化學性修飾法使微脂體的親水端官能基或疏水端官能基，或直接以化學性修飾法鍵結藥物分子與微脂體，但此法可能會造成微脂體的製造時間因需額外進行化學性修飾而拉長、藥物分子活性因化學性修飾而衰退等缺點。

由上述可知，微脂體的用途及特性一般僅限於包覆藥物分子，而達到藥物傳遞的效果，並無其他用途，因此若可以發展出微脂體的其他用途，且該用途無需化學性修飾，則可以避免上述問題，同時更加拓展微脂體的應用性。

【發明內容】

本發明之主要目的係在提供一種具有免疫調控能力之醫藥組成物，其中搭配各種免疫調控性分子與微脂體，只要使免疫調控性分子自然吸附於微脂體表面，而無需額外的化學性修飾法鍵結免疫調控性蛋白與微脂體，亦無需強使微脂體包覆免疫調控性蛋白，所形成的微脂體複合物則如同人工抗原呈現細胞，可達到免疫調控的功效。

為達成上述目的，本發明之一態樣提供一種具有免疫調控能力之醫藥組成物，包括：一微脂體，包含一形成中空球體之中性磷脂膜、一帶正電聚合物、以及一界面性聚合物，其中，該帶正電聚合物與該界面性聚合物兩者皆以非共價性力結合於該中性磷脂膜，且該中性磷脂膜：該帶正電聚合物：該界面性聚合物之比例範圍為10至60：1至3：1至3；以及一免疫調控性分子，其係以非共價性結合於該微脂體表面。

本發明上述具有免疫調控能力之醫藥組成物中，該微脂體：該免疫調控性分子之重量比例範圍較佳可介於1:0.06至1:0.15。此外，該免疫調控性分子沒有特別限制，只要其為具有免疫調控性質之已知抗體或蛋白質，能夠經由自然吸附的方式（此即指非共價性）結合於該微脂體表面即可。於本發明一較佳具體實施例中，採用抗CD3受體之單株抗體、抗CD3受體之單株抗體與抗CD28受體之單株抗體的組合、以及抗CD3受體之單株抗體與抗CTLA4受體之單株抗體的組合做為免疫調控性分子。

本發明之另一目的係在提供一種增強免疫反應之醫藥組成物，其中搭配各種抗原性分子與微脂體，只要使抗原性分子自然吸附於微脂體表面，同樣無需額外的化學性修飾法鍵結抗原性分子與微脂體，亦無需強使微脂體包覆抗原性分子，所形成的微脂體複合物則可又發生物體產生細胞性的免疫反應，且不會有習用使用佐劑進行免疫時因乳化程度難以判斷而造成免疫效果不一致的問題。

為達成上述另一目的，本發明之另一態樣提供一種增強免疫反應之醫藥組成物，包括：一微脂體，包含一形成中空球體之中性磷脂膜、一帶正電聚合物、以及一界面性聚合物，其中，該帶正電聚合物與該界面性聚合物兩者皆以非共價性力結合於該中性磷脂膜，且該中性磷脂膜：該帶正電聚合物：該界面性聚合物之比例範圍為10至60：1至3：1至3；以及一抗原性分子，其係以非共價合性結合於該微脂體表面。

本發明上述增強免疫反應之醫藥組成物中，該微脂體：該抗原性分子之重量比例範圍較佳可介於1.5：1至1：1。此外，該抗原性分子沒有特別限制，只要其具有抗原性且能夠經由自然吸附的方式（此即指非共價合性）結合於該微脂體表面即可，舉例如：病毒、蛋白質、胜肽、核酸、寡聚核苷酸、多醣、聚脂質、醣蛋白、脂蛋白等。於本發明一較佳具體實施例中，使用熱休克蛋白做為抗原性分子。

本發明上述之增強免疫反應之醫藥組成物，可選擇性更包含一免疫調節分子（immuno-modulator），該免疫調節

分子可以使用本領域已知免疫調節分子，用於增強相關免疫反應，促使特定抗體產量增加，例如脂聚醣（lipopolysaccharide, LPS）、肽聚醣（peptidoglycan, PG）、脂壁酸（lipoteichoic acid, LTA）、脂肽/蛋白質（lipopeptides/proteins, LP）等細菌細胞產物，CpG寡聚去氧核苷酸（CpG oligodeoxynucleotides, CpG ODN）等核酸分子，顆粒球巨噬細胞聚落刺激因子（granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF）等細胞激素。於本發明一較佳具體實施例中，採用CpG寡聚去氧核苷酸（CpG ODN）做為免疫調節分子，以提升免疫球蛋白IgG2a的產量；於另一較佳具體實施例中，採用脂多醣體（LPS）做為免疫調節分子，以增加免疫球蛋白IgA的產量。

本發明上述之增強免疫反應之醫藥組成物中，該免疫反應係Th1免疫反應，且該免疫反應可為細胞性免疫反應（cell-mediated immune response）。

本文所述之免疫調控能力，係指控制免疫反應，透過抑制或活化涉及免疫反應相關途徑之參與者，包含T細胞、B細胞以及巨噬體（macrophages）之間交互作用的影響因子。另外，上述增強免疫反應，係指相較於使用習用佐劑，可以活化Th1免疫反應（Th1-immunity）並增加免疫球蛋白IgG2a，進而提升細胞性免疫反應，促使免疫球蛋白IgG2a（Immunoglobulin G2a）的產量為免疫球蛋白IgG1產量的一倍以上，而利於防禦病原體、自體免疫疾病、過敏等反應。

此外，上述非共價性結合，係指親水性與疏水性的作用力、靜電力、氫鍵、以及凡得瓦力等促使一分子結合於另一分子。

本發明上述之醫藥組成物中，該微脂體之該中性磷脂膜包含一磷脂質，而可採用的磷脂質沒有特殊限制，只要其可以讓微脂體順利形成鄰脂雙層結構即可，舉例如：二亞麻油酸磷脂醯膽鹼（dilinoleoyl phosphatidyl choline，DLPC）、二油醯基磷脂醯膽鹼（dioleoyl phosphatidyl choline，DOPC）、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼（dimyristoyl phosphatidyl choline，DMPC）、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼（dipalmitoyl phosphatidyl choline，DPPC）、二硬酯醯基磷脂醯膽鹼（distearoyl phosphatidyl choline，DSPC）、二油醯基磷脂醯乙醇胺（dioleoyl phosphatidyl ethanolamine，DOPE）、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺（dimyristoyl phosphatidyl ethanolamine，DMPE）、二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺（dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamine，DPPE）、二油醯基磷脂醯乙醇胺（dioleoyl phosphatidyl ethanolamine，DOPE）、二肉豆蔻醯基磷脂酸（dimyristoyl phosphatidyl phosphatidic acid，DMPA）、二棕櫚醯基磷脂酸（dipalmitoyl phosphatidyl phosphatidic acid，DPPA）、二油醯基磷脂酸（dioleoyl phosphatidyl phosphatidic acid，DOPA）、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油（dimyristoyl phosphatidyl glycerol，DMPG）、二棕櫚醯基磷脂醯甘油（dipalmitoyl phosphatidyl glycerol，DPPG）、二油醯基磷脂醯甘油（dioleoyl phosphatidyl glycerol，

DOPG)、二肉豆蔻醯基磷脂醯絲胺酸 (dimyristoyl phosphatidyl serine, DMPS)、二棕櫚醯基磷脂醯絲胺酸 (dipalmitoyl phosphatidyl serine, DPPS)、以及二油醯基磷脂醯絲胺酸 (dioleoyl phosphatidyl serine, DOPS) 或其組合。於本發明一較佳具體實施例中, 該磷脂質為二亞麻油酸磷脂醯膽鹼 (DLPC)、以及二油醯基磷脂醯膽鹼 (DOPC) 之組合。

本發明上述之醫藥組成物中, 該帶正電聚合物沒有特別限制, 只要為能夠嵌入該微脂體之磷脂雙層結構且帶正電荷的聚合物即可, 舉例如聚胺 (polyamine)、聚乙烯亞胺 (polyethylenimine, PEI)、聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone)、聚乳酸 (polylactic acid)、以及其組合, 且該帶正電聚合物的重量平均分子量較佳係介於2,500至250,000之間, 更佳係介於5,000之125,000之間。於本發明一較佳具體實施例中, 採用重量平均分子量介於12,500至50,000之間的聚乙烯亞胺做為帶正電聚合物。

此外, 本發明上述之醫藥組成物中, 該界面性聚合物沒有特別限制, 只要同時具有親水性結構及疏水性結構、整體結構為不帶電且能夠嵌入該微脂體之磷脂雙層結構的界面性聚合物即可, 舉例如交聯型聚丙烯酸酯 (crosslinked polyacrylate)、皂素 (saponin)、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、以及其組合。該界面性聚合物的重量平均分子量較佳係介於800至80,000之間, 更佳係介於1,600之40,000之間。於本發明一較佳具體實施例中, 採用重量平均

分子量介於4,000至16,000之間的聚乙二醇做為界面性聚合物。

由上述可知，本發明具有免疫調控能力之醫藥組成物無需以化學法修飾共價結合微脂體與免疫調控性分子，所達效用即可如同一般以化學性修飾共價結合、基因工程改造細胞所製得之非細胞組成或人工化抗原呈現細胞（acellular or artificial antigen presenting cell, aAPC），且製作所耗費的時間僅需二十分鐘，未來可以彈性應用於客製化藥物，以調控動物體內的免疫反應。

另一方面，本發明增強免疫反應之醫藥組成物同樣無需以化學法修飾共價結合微脂體與抗原性分子，且製作所耗費的時間僅需二十分鐘，且微脂體吸附的抗原性分子均勻一致，無需乳化步驟，故不會有傳統商用佐劑（完全性佐劑/非完全性佐劑，CFA/IFA）乳化程度難以一致性的問題，且可以活化Th1免疫反應，誘發或增強生物體內正確適當的抗體類型，亦可搭配適當的免疫調節分子增強特定類型之抗體產量。

【實施方式】

於本發明中，中性磷脂膜係構成微脂體的磷脂雙層結構，其中可採用的磷脂質為本領域常用的磷脂質，例如二亞麻油酸磷脂醯膽鹼（DLPC）、二油醯基磷脂醯膽鹼（DOPC）、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼（DMPC）、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼（DPPC）、二硬酯醯基磷脂醯膽鹼

(DSPC)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺(DMPE)、二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺(DPPE)、二油醯基磷脂醯乙醇胺(DOPE)、二肉豆蔻醯基磷脂酸(DMPA)、二棕櫚醯基磷脂酸(DPPA)、二油醯基磷脂酸(DOPA)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油(DMPG)、二棕櫚醯基磷脂醯甘油(DPPG)、二油醯基磷脂醯甘油(DOPG)、二肉豆蔻醯基磷脂醯絲胺酸(DMPS)、二棕櫚醯基磷脂醯絲胺酸(DPPS)、以及二油醯基磷脂醯絲胺酸(DOPS)或其組合，其中以不帶電荷的磷脂質，如磷脂醯膽鹼類(PC)的磷脂質較佳。

另外，本發明可採用的帶正電聚合物，其重量平均分子量係介於2,500至250,000之間，更佳係介於5,000至125,000之間。可採用的帶正電聚合物舉例如下：聚胺、聚乙烯亞胺、聚乙烯吡咯烷酮、聚乳酸、或其組合。

該界面性聚合物的重量平均分子量較佳係介於800至80,000之間，更佳係介於1,600至40,000之間。可採用的界面性聚合物舉例如下：交聯型聚丙烯酸酯、皂素、聚乙二醇、或其組合。

由上述可知，當採用不帶電荷的磷脂質組成磷脂雙層結構時，該界面性聚合物可以穩定磷脂雙層結構，而帶正電聚合物可賦予正電荷給磷脂雙層結構。

當帶正電聚合物為聚乙烯亞胺，界面性聚合物為聚乙二醇時，微脂體的中性磷脂膜、帶正電聚合物以及界面性

聚合物的比例範圍介於10：3：3至60：1：1之間，較佳為介於10：3：3至30：1：1之間，更佳為3：1：1。

於本發明中，該中性磷脂膜所含成分、成分比例、及其所使用之溶劑不限於本製造例所述之成分及溶劑，本領域具有通常知識者可依需求進行調整。

綜上所述，帶正電聚合物、中性磷脂膜以及界面性聚合物會在特定比例下形成微脂體，且帶正電聚合物以及界面性聚合物是以非共價鍵結合的方式分佈於中性磷脂膜上。換句話說，帶正電聚合物以及界面性聚合物是因其本身的物性而鑲嵌於中性磷脂膜上，而不需要利用化學鍵結的方式來使聚合物與中性磷脂膜結合。故，本實施例之微脂體的製造方法具有簡化製程步驟以及縮短製程時間等特點。

本發明之微脂體可藉由帶正電聚合物吸引一物質的帶負電部分，使得微脂體與該物質因靜電力而吸附。值得一提的是，微脂體對吸附之物質具有高包含力(capacity)，且微脂體與物質之間具有結合反應時間極短以及吸附力穩定的特性。況且，微脂體是以非共價鍵結合的方式吸附物質，故能避免被吸附物質的活性或構型等特性被影響或破壞。

本發明之醫藥組成物，可經由非口服、噴霧吸入、局部、經直腸、經鼻、舌下、陰道、或經由植入型藥盒(implanted reservoir)等方式投藥。於此使用之「非口服」(parenteral)係指皮下注射、皮內注射、靜脈內注射、肌肉內注射、關節腔內注射、動脈內注射、關節液內注射、

胸腔內注射、脊髓內注射、疾病部位內注射、及顱內注射或注入技術。

無菌可注射之組成物，例如無菌可注射水性或油性懸浮液，可根據本領域已知技術，使用適合的分散劑或濕潤劑（如 Tween 80）及懸浮劑來配製。無菌可注射之配製液可為無菌可注射的溶液、或是懸浮於無毒的非口服注射稀釋液或溶劑中，例如 1,3-丁二醇的溶液。可使用之可接受載體及溶劑為甘露醇（mannitol）、水、林格氏溶液（Ringer's solution）或等滲透之氯化鈉溶液。

以下係藉由特定的具體實施例說明本發明之實施方式，熟習此技藝之人士可由本說明書所揭示之內容輕易地了解本發明之其他優點與功效。本發明亦可藉由其他不同的具體實施例加以施行或應用，本說明書中的各項細節亦可基於不同觀點與應用，在不悖離本發明之精神下進行各種修飾與變更。

製備例一 微脂體之製備

首先，二亞麻油酸磷脂醯膽鹼（DLPC）以及二油醯基磷脂醯膽鹼（DOPC）各取 50 mg，溶於 1 ml 乙醇，製出該中性磷脂膜溶液後，將中性脂質溶液加入梨形瓶中，以減壓旋轉方式揮發去除中性脂質溶液中的乙醇，直至乾燥，以於梨形瓶底部形成多層薄膜狀的中性磷脂膜。

接著，取 0.665 克聚乙烯亞胺（PEI）與 0.22 克聚乙二醇（PEG）溶解於 5 mL 二次水中，製成含帶正電聚合物與界面性聚合物之水溶液，將此水溶液緩緩加入形成有中性磷

脂膜之梨形瓶中並輕輕搖晃，再劇烈震盪10分鐘後室溫下放置過夜。其中，震盪容器會使得中性磷脂膜因水合作用而膨脹成(swelling)中空球體結構，使得具有疏水特性與親水特性之帶正電聚合物以及界面性聚合物，以非共價鍵結合的方式分佈於中性磷脂膜上，而形成微脂體。

本實施例為了確保獲得微脂體的尺寸均勻且符合所需，則進一步將所形成的微脂體通過200 nm孔徑膜(mesh)，並重覆通過9次。

製備例二至十 吸附免疫調控性分子之微脂體複合物

取上述製備例一所製得之10 μg 微脂體，分別與抗CD3單株抗體(60 ng αCD3 mAb，實施例二)、抗CD3單株抗體與抗CD28單株抗體(60 ng αCD3 mAb與60 ng αCD28 mAb，實施例三)、以及抗CD3單株抗體與抗CTLA4單株抗體(60 ng αCD3 mAb與20 ng αCTLA4 mAb，實施例四；60 ng αCD3 mAb與40 ng αCTLA4 mAb，實施例五；60 ng αCD3 mAb與60 ng αCTLA4 mAb，實施例六；以及60 ng αCD3 mAb與120 ng αCTLA4 mAb，實施例七)一起培養，另外亦取100 μg 微脂體與HLA-A2胜肽單體(0.6 μg ，實施例八)、HLA-A2胜肽單體與抗CD28單株抗體(0.6 μg HLA-A2與0.6 μg αCD28 mAb，實施例九)、以及HLA-A2胜肽單體與抗CTLA4單株抗體(0.6 μg HLA-A2與0.6 μg αCTLA4 mAb，實施例十)一起培養，待20分鐘後，於5,900 x g轉速下離心5分鐘，取沉澱重新懸濁，即可製得吸附有不同含量之各種免疫調控性分子的微脂體複合物。

製備例十一至十三 吸附抗原性分子之微脂體複合物

取上述製備例一所製得之150 µg微脂體，分別與100 µg之HpHSp 60抗原（實施例十一）、100 µg之HpHSp 60抗原與2 µg之脂聚醣（lipopolysaccharide, LPS, 實施例十二）、以及100 µg之HpHSp 60抗原與1 µg之寡聚去氧核苷酸（CpG oligodeoxynucleotide, CpG ODN, 實施例十三）一起培養，待30分鐘後，於5,900 x g轉速下離心5分鐘，取沉澱重新懸濁後，分別與100 µg之HpHSp 60抗原混合。

數據統計分析

以下相關試驗所得的數據，係以SAS套裝統計軟體（SAS Institute, Inc., Cary, NC）分析，當比較兩獨立試驗時使用T-檢定（T-test），當比較多組變數時使用變異數分析（ANOVA test），其中若 $p < 0.05$ 表示在統計上屬於顯著（significant）差異，所有數據皆以平均值±標準偏差（mean ± SD）代表。

試驗例一 蛋白質吸附量試驗

取上述製備例一所製得之40 µg微脂體，分別與40 µg、80 µg、120 µg、160 µg、200 µg、以及240 µg之牛血清蛋白（bovine serum albumin, BSA）一起培養，待20分鐘後，於5,900 x g轉速下離心5分鐘，取沉澱重新懸濁。而後，利用蛋白質定量的方法評估微脂體對於牛血清蛋白的吸附容量，結果如圖1所示。

參考圖1，可以清楚了解40 μg 微脂體，大約最多可吸附約140 μg 之牛血清蛋白。

試驗例二 免疫性活化或抑制反應試驗

以下之細胞培養，係於96孔盤中進行，每孔使用含有10%牛血清蛋白（Fetal calf serum, FCS）以及1%青黴素/鏈黴素/两性黴素（penicillin/streptomycin/amphotericin, PSA）之100 μl RPMI-1640培養基。

欲進行實驗的脾臟細胞，區分為正常組與預活化組等兩組。正常組之脾臟細胞（來自六至八週大的BALB-C小鼠），每孔約含 2.5×10^5 個，其中分別加入1 μg 上述製備例二至七製得之微脂體複合物，持續培養3天。

另一方面，脾臟細胞（來自六至八週大的BALB-C小鼠）先以抗CD3單株抗體（60 ng/ 100 μl ）與抗CD28單株抗體（60 ng/ 100 μl ）活化3天，變成預活化組之脾臟細胞。將此預活化組之脾臟細胞培養於96孔盤中，每孔內培養約 2.5×10^5 個細胞，再加入1 μg 上述製備例二至七製得之微脂體複合物，持續培養3天。

而後，以ELISA法分析培養基中之細胞激素（IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10以及TGF- β ）濃度，並以MTT分析法分析脾臟細胞增殖情況，結果參考以下表一以及圖2。

表一

	IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-10	TGF- β
空白組	0.18 \pm 0.04	1.98 \pm 0.29	0.36 \pm 0.07	3.14 \pm 0.38	0.77 \pm 0.13

製備例一	0.19 ± 0.07	1.90 ± 0.17	0.34 ± 0.06	3.14 ± 0.33	0.70 ± 0.15
製備例二	0.77 ± 0.07	1.96 ± 0.14	0.45 ± 0.04	2.39 ± 0.17	0.25 ± 0.05
製備例三	0.96 ± 0.19	2.92 ± 0.13	0.63 ± 0.06	1.78 ± 0.14	0.17 ± 0.03
製備例六	0.39 ± 0.08	0.65 ± 0.10	0.35 ± 0.07	3.49 ± 0.29	0.86 ± 0.14

表內數字指標 (pg/ml·%) = (細胞激素濃度) / (細胞增殖率)

表一顯示正常組之脾臟細胞經製備例一之微脂體與製備例二、三以及六之微脂體複合物處理後，不同細胞激素之濃度，其中空白組係正常組之脾臟細胞以PBS處理。如表一所示，當吸附不同抗體之微脂體複合物與老鼠正常組脾臟細胞共同培養時，利用ELISA所測得之細胞激素（IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10以及TGF- β ）表現量。如表一所示，可以清楚得知吸附有抗CD3單株抗體、抗CD28單株抗體、以及抗CTLA4單株抗體之微脂體複合物可用於調節脾臟細胞內細胞激素之表現情形。

另外，圖2顯示當吸附不同抗體之微脂體複合物與老鼠正常組以及預活化組脾臟細胞共同培養時，利用MTT分析法所測得之脾臟細胞存活情況，其中空白組係以PBS處理，*代表相較於正常組脾臟細胞，統計上 $p < 0.05$ ；#代表相較於吸附有抗CD3單株抗體之微脂體，統計上 $p < 0.05$ 。如圖2所示，可以清楚得知吸附有抗CD3單株抗體及/或抗CD28單株抗體之微脂體複合物可用於活化脾臟細胞之增殖情況，而吸附有抗CTLA4單株抗體之微脂體複合物便可用於抑制脾臟細胞之增殖情況。

除此之外，當微脂體同時吸附有抗CD3單株抗體以及抗CTLA4單株抗體時，則抑制脾臟細胞增殖之情況，會隨著抗CTLA4單株抗體之增加而趨於顯著；當微脂體同時吸附有抗CD3單株抗體以及抗CD28單株抗體時，活化脾臟細胞增殖之情況則會倍增，同時IL-2、IL-4、以及IFN- γ 等細胞激素的分泌也趨於增加。

由此可知，本發明之醫藥組成物中，微脂體無需利用基因性或/及化學性修飾，只要自然吸附活化型的免疫調控性分子，例如抗CD3單株抗體或/及抗CD28單株抗體，便可刺激非專一性T細胞。

試驗例三 免疫細胞與微脂體複合物之交互作用試驗

基因轉殖C57BL/6-Tg(HLA-A2.1)小鼠，先接種30 μg 16型人類乳突病毒E7蛋白質之抗原決定基 (epitope of human papilloma virus type 16 E7 protein, SEQ ID No. 1: YMLDLQPETT) 搭配佐劑 (Freund's adjuvant)，三星期後取出脾臟細胞培養於96孔盤中，每孔內培養約 2.5×10^5 個細胞，其即變成經免疫細胞組。另一方面，將未接種的小鼠，同樣取出脾臟細胞培養於96孔盤中，每孔內培養約 2.5×10^5 個細胞，其即為未免疫細胞組。經免疫細胞組以及未免疫細胞組，再分別加入PBS、上述製備例一製得之微脂體、以及製備例八至十製得之微脂體複合物，持續培養3天。而後，以MTT分析法分析脾臟細胞增殖情況，並以ELISA法分析培養基中之細胞激素(IL-2、IFN- γ 、TGF- β 以及IL-10)

濃度，結果分別如圖3A至圖3E所示，其中白色柱體表示未免疫細胞組，黑色柱體表示經免疫細胞組。

參考圖3A，則清楚了解製備例八與製備例九之微脂體複合物（製備例八：微脂體+HLA；製備例九：微脂體+HLA+抗CD28單株抗體）可以刺激免疫細胞增殖，而製備例十之微脂體複合物（微脂體+HLA+抗CTLA4單株抗體）可以有效抑制免疫細胞增殖。

參考圖3B與圖3C，其中圖3B為IL-2之表現量，圖3C為IFN- γ 之表現量。由圖3B與圖3C則清楚了解製備例八與製備例九之微脂體複合物可以活化型IL-2、IFN- γ 等細胞激素表現。

參考圖3D與圖3E，其中圖3D為TGF- β 之表現量，圖3E為IL-10之表現量，由圖3D與圖3E則清楚了解製備例十之微脂體複合物可以抑制型TGF- β 、IL-10等細胞激素表現。

試驗例四 細胞毒殺試驗

將PBS（空白組）、上述製備例一製得之微脂體、以及製備例八至十製得之微脂體複合物接種於基因轉殖小鼠，兩星期後提高劑量，再一星期後取出經免疫之小鼠脾臟細胞，此即為未經抗原免疫組。

另一方面，如上述試驗例三，將16型人類乳突病毒E7蛋白質之抗原決定基搭配佐劑接種於基因轉殖小鼠，三星期後該些小鼠再接種PBS、上述製備例一製得之微脂體、以及製備例八至十製得之微脂體複合物，一星期後後取出脾臟細胞，此即為經抗原免疫組。

表現上述抗原之TC1-AAD癌細胞株，係作為目標細胞（target cells），培養於96孔盤中，每孔內培養約 1×10^4 個細胞，分別根據不同E/T比例（12.5/1、25/1、50/1、以及100/1）加入上述未經抗原免疫組與經抗原免疫組之脾臟細胞，待72小時後以MTT分析法分析癌細胞之死亡情況，結果分別如圖4A以及圖4B所示，其中圖4A為添加未經抗原免疫組之脾臟細胞，圖4B為添加經抗原免疫組之脾臟細胞。

如圖4A所示，製備例九之微脂體複合物確實可以活化專一性的免疫細胞，隨著E/T比例增加，細胞毒殺率隨之增加，此亦如同先前文獻所述，活化專一免疫細胞需要同時提供兩個訊號（如製備例九之HLA與抗CD28單株抗體）；另如圖4B所示，顯示含有不同免疫調控性分子之微脂體複合體，可以調控動物體內免疫細胞的活性，隨著E/T比例增加細胞毒殺確實有受到影響。

由上述可知，上述吸附有免疫調控性分子之微脂體複合物，無須經過化學性修飾及/或純化步驟，其性質與功能即可類似人工的抗原呈現細胞（artificial antigen presenting cells, aAPCs）。

試驗例五 Th1相關抗體之誘發試驗

透過皮下注射的方式，將100 μg HpHsp 60抗原（對照組一）、混合有100 μg 完全性佐劑（complete Freund's adjuvant, CFA）之100 μg HpHsp 60抗原（對照組二）、以及製備例十一製得之微脂體複合物接種於BABL/C小鼠，兩星期後提高劑量再次接種（對照組二改用非完全性佐劑

IFA)，待一星期後以眼窩採血的方式，每三天收集受免疫小鼠血液。

於96孔盤之每孔內，附著100 ng HpHsp 60抗原，在4°C下放置過夜，再用含2%脫脂奶粉之300 μ l磷酸緩衝清洗液（pH 7.4，phosphate-buffered saline with 0.5% Tween-20，PBST）浸泡1小時，使用含0.5%脫脂奶粉之磷酸緩衝清洗液清洗一次，在添加含0.5%脫脂奶粉之磷酸緩衝液（pH 7.4，phosphate-buffered saline，PBS）稀釋所採血液（1：800，100 μ l）培養2小時，清洗三次後加入稀釋一萬倍之100 μ l HRP鍵結的抗小鼠免疫球蛋白（Immunoglobulin，Ig）抗體培養1小時，再清洗三次後加入100 μ l 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺（3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine，TMB）基質，培養20分鐘後以100 μ l 1 N HCl停止反應，再以ELISA測定450 nm的透光密度（optical density，OD），結果如圖5A與圖5B所示。

參考圖5A，其顯示相較於未用佐劑之對照組一，製備例十一之微脂體複合物確實可以誘發小鼠體內對HpHsp 60產生抗體反應，且其反應可比擬同時使用完全性佐劑與非完全性佐劑之對照組二。另一方面，參考圖5B，其顯示相較於同時使用完全性佐劑與非完全性佐劑之對照組二，製備例十一之微脂體複合物比較容易誘發IgG2a，且IgG2a/IgG1比率大於一，此表示動物體內免疫反應屬於Th1免疫，明顯不同於同時使用完全性佐劑與非完全性佐劑之對照組二。

試驗例六 搭配免疫調節性分子之誘發試驗

參考試驗例五所述，透過皮下注射的方式，將混合有100 μg 完全性佐劑（complete Freund's adjuvant, CFA）之100 μg HpHsp 60抗原（對照組二）、以及製備例十二與製備例十三製得之微脂體複合物接種於BABL/C小鼠，兩星期後提高劑量再次接種（對照組二改用非完全性佐劑IFA），待一星期後以眼窩採血的方式，每三天收集受免疫小鼠血液。

後續，同樣參考試驗五所述，於96孔盤之每孔內，附著100 ng HpHsp 60抗原，在4°C下放置過夜，再用含2%脫脂奶粉之300 μl 磷酸緩衝清洗液（pH 7.4, phosphate-buffered saline with 0.5% Tween-20, PBST）浸泡1小時，使用含0.5%脫脂奶粉之磷酸緩衝清洗液清洗一次，在添加含0.5%脫脂奶粉之磷酸緩衝液（pH 7.4, phosphate-buffered saline, PBS）稀釋所採血液（1:800, 100 μl ）培養2小時，清洗三次後加入稀釋一萬倍之100 μl HRP鍵結的抗小鼠免疫球蛋白（Immunoglobulin, Ig）抗體培養1小時，再清洗三次後加入100 μl TMB基質，培養20分鐘後以100 μl 1 N HCl停止反應，再以ELISA測定450 nm的透光密度，結果如圖6A與圖6B所示。

參考圖6A，其顯示相較於不含免疫調節性分子且僅使用佐劑之對照組二，含免疫調節性分子的製備例十二與製備例十三之微脂體複合物皆具有更佳的抗體反應；另一方面，參考圖6B，其顯示相較於不含免疫調節性分子且僅使

用佐劑之對照組二，含脂聚糖（LPS）的製備例十二之微脂體複合物確實可以增加IgA產量，而含寡聚去氧核苷酸（CpG ODN）的製備例十三之微脂體複合物確實可以增加IgG2a產量，證實本發明的醫藥組成物可以搭配各種免疫調節性分子調節抗體產量。

上述實施例僅係為了方便說明而舉例而已，本發明所主張之權利範圍自應以申請專利範圍所述為準，而非僅限於上述實施例。

【圖式簡單說明】

圖1顯示本發明試驗例一中微脂體對於牛血清蛋白的吸附容量。

圖2顯示本發明試驗例二中免疫性活化或抑制反應試驗之結果，其中空白組係以PBS處理，*代表相較於正常組脾臟細胞，統計上 $p < 0.05$ ；#代表相較於吸附有抗CD3單株抗體之微脂體，統計上 $p < 0.05$ 。

圖3顯示本發明試驗例三中免疫細胞與微脂體複合物之交互作用試驗之結果，其中白色柱體表示未免疫細胞組，黑色柱體表示經免疫細胞組，圖3A顯示細胞增殖率，圖3B顯示IL-2之表現量，圖3C顯示IFN- γ 之表現量，圖3D顯示TGF- β 之表現量，以及圖3E顯示IL-10之表現量。

圖4顯示本發明試驗例四中細胞毒殺試驗之結果，其中圖4A為添加未經抗原免疫組之脾臟細胞，圖4B為添加經抗原免疫組之脾臟細胞。

圖5顯示本發明試驗例五中Th1相關抗體之誘發試驗的結果，其中圖5A顯示抗體誘發反應，圖5B顯示不同抗體的比例。

圖6顯示本發明試驗例六中搭配免疫調節性分子之誘發試驗的結果，其中圖6A顯示抗體誘發反應，圖6B顯示不同抗體的比例。

【主要元件符號說明】

無

七、申請專利範圍：

1. 一種具有免疫調控能力之醫藥組成物，包括：

一微脂體，包含一形成中空球體之中性磷脂膜、一帶正電聚合物、以及一界面性聚合物，其中，該帶正電聚合物與該界面性聚合物兩者皆以非共價性力結合於該中性磷脂膜，且該中性磷脂膜：該帶正電聚合物：該界面性聚合物之比例範圍為10至60：1至3：1至3；以及

一免疫調控性分子，其係以非共價性結合於該微脂體表面。

2. 如申請專利範圍第1項所述之具有免疫調控能力之醫藥組成物，其中，該帶正電聚合物係選自由聚胺、聚乙炔亞胺、聚乙炔吡咯烷酮、以及聚乳酸所組群組之至少一者。

3. 如申請專利範圍第2項所述之具有免疫調控能力之醫藥組成物，其中，該界面性聚合物係選自由交聯型聚丙烯酸酯、皂素、以及聚乙二醇所組群組之至少一者。

4. 如申請專利範圍第3項所述之具有免疫調控能力之醫藥組成物，其中，該微脂體之該中性磷脂膜包含一磷脂質，該磷脂質係選自由二亞麻油酸磷脂醯膽鹼（DLPC）、二油醯基磷脂醯膽鹼（DOPC）、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼（DMPC）、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼（DPPC）、二硬酯醯基磷脂醯膽鹼（DSPC）、二油醯基磷脂醯乙醇胺（DOPE）、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺（DMPE）、二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺（DPPE）、二油醯基磷脂醯乙醇胺（DOPE）、二

肉豆蔻醯基磷脂酸 (DMPA)、二棕櫚醯基磷脂酸 (DPPA)、二油醯基磷脂酸 (DOPA)、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油 (DMPG)、二棕櫚醯基磷脂醯甘油 (DPPG)、二油醯基磷脂醯甘油 (DOPG)、二肉豆蔻醯基磷脂醯絲胺酸 (DMPS)、二棕櫚醯基磷脂醯絲胺酸 (DPPS)、以及二油醯基磷脂醯絲胺酸 (DOPS) 所組群組之至少一者。

5. 如申請專利範圍第4項所述之具有免疫調控能力之醫藥組成物，其中，該磷脂質係為二亞麻油酸磷脂醯膽鹼 (DLPC)、以及二油醯基磷脂醯膽鹼 (DOPC) 之組合。

6. 如申請專利範圍第1項所述之具有免疫調控能力之醫藥組成物，其中，該免疫調控性分子係一抗體。

7. 如申請專利範圍第6項所述之具有免疫調控能力之醫藥組成物，其中，該抗體係抗CD3受體之抗體、抗CD28受體之抗體、抗CTLA4受體之抗體或其組合。

8. 如申請專利範圍第1項所述之具有免疫調控能力之醫藥組成物，其中，該微脂體：該免疫調控性分子之重量比例範圍係介於1：0.06至1：0.15。

9. 一種增強免疫反應之醫藥組成物，包括：

一微脂體，包含一形成中空球體之中性磷脂膜、一帶正電聚合物、以及一界面性聚合物，其中，該帶正電聚合物與該界面性聚合物兩者皆以非共價性力結合於該中性磷脂膜，且該中性磷脂膜：該帶正電聚合物：該界面性聚合物之比例範圍為10至60：1至3：1至3；以及

一抗原性分子，其係以非共價合性結合於該微脂體表面。

10. 如申請專利範圍第9項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該帶正電聚合物係選自由聚胺、聚乙烯亞胺、聚乙烯吡咯烷酮、以及聚乳酸所組群組之至少一者。

11. 如申請專利範圍第10項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該界面性聚合物係選自由交聯型聚丙烯酸酯、皂素、以及聚乙二醇所組群組之至少一者。

12. 如申請專利範圍第11項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該微脂體之該中性磷脂膜包含一磷脂質，該磷脂質係選自由二亞麻油酸磷脂醯膽鹼（DLPC）、二油醯基磷脂醯膽鹼（DOPC）、二肉豆蔻醯基磷脂醯膽鹼（DMPC）、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼（DPPC）、二硬酯醯基磷脂醯膽鹼（DSPC）、二油醯基磷脂醯乙醇胺（DOPE）、二肉豆蔻醯基磷脂醯乙醇胺（DMPE）、二棕櫚醯基磷脂醯乙醇胺（DPPE）、二油醯基磷脂醯乙醇胺（DOPE）、二肉豆蔻醯基磷脂酸（DMPA）、二棕櫚醯基磷脂酸（DPPA）、二油醯基磷脂酸（DOPA）、二肉豆蔻醯基磷脂醯甘油（DMPG）、二棕櫚醯基磷脂醯甘油（DPPG）、二油醯基磷脂醯甘油（DOPG）、二肉豆蔻醯基磷脂醯絲胺酸（DMPS）、二棕櫚醯基磷脂醯絲胺酸（DPPS）、以及二油醯基磷脂醯絲胺酸（DOPS）所組群組之至少一者。

13. 如申請專利範圍第12項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該磷脂質係為二亞麻油酸磷脂醯膽鹼（DLPC）、以及二油醯基磷脂醯膽鹼（DOPC）之組合。

14. 如申請專利範圍第9項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該抗原性分子係熱休克蛋白。

15. 如申請專利範圍第14項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該微脂體：該抗原性分子之重量比例範圍係介於1.5：1至1：1。

16. 如申請專利範圍第9項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，更包含一免疫調節分子。

17. 如申請專利範圍第16項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該免疫調節分子係為寡聚去氧核苷酸、脂多醣體或其組合。

18. 如申請專利範圍第9項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該免疫反應係Th1免疫反應。

19. 如申請專利範圍第18項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該免疫反應係細胞性免疫反應（cell-mediated immune response）。

八、圖式（請見下頁）：

13. 如申請專利範圍第12項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該磷脂質係為二亞麻油酸磷脂醯膽鹼（DLPC）、以及二油醯基磷脂醯膽鹼（DOPC）之組合。

14. 如申請專利範圍第9項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該抗原性分子係熱休克蛋白。

15. 如申請專利範圍第14項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該微脂體：該抗原性分子之重量比例範圍係介於1.5：1至1：1。

16. 如申請專利範圍第9項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，更包含一免疫調節分子。

17. 如申請專利範圍第16項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該免疫調節分子係為寡聚去氧核苷酸、脂多醣體或其組合。

18. 如申請專利範圍第9項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該免疫反應係Th1免疫反應。

19. 如申請專利範圍第18項所述之增強免疫反應之醫藥組成物，其中，該免疫反應係細胞性免疫反應（cell-mediated immune response）。

八、圖式（請見下頁）：

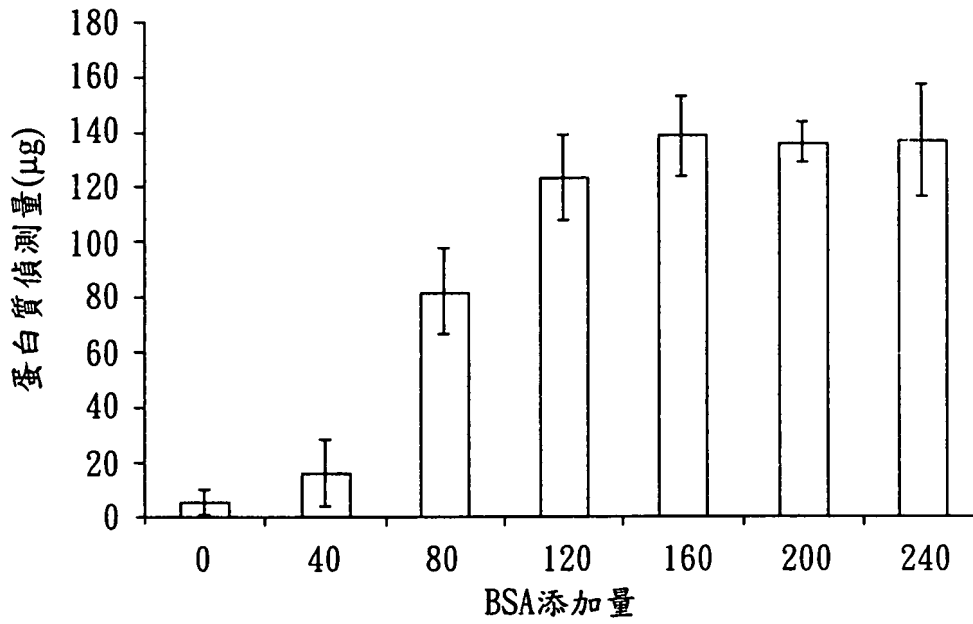


圖1

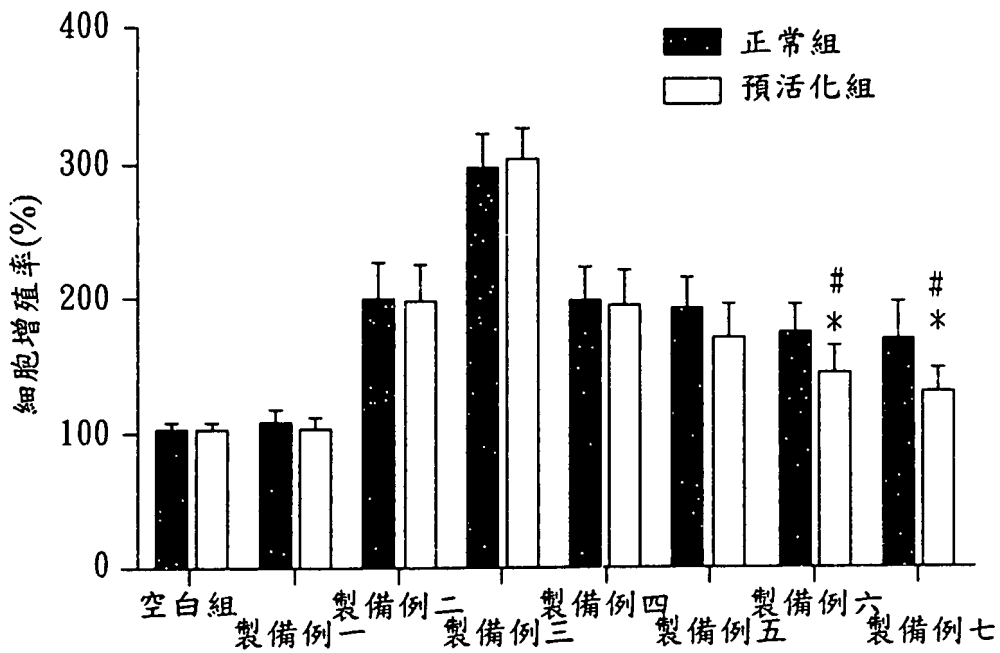
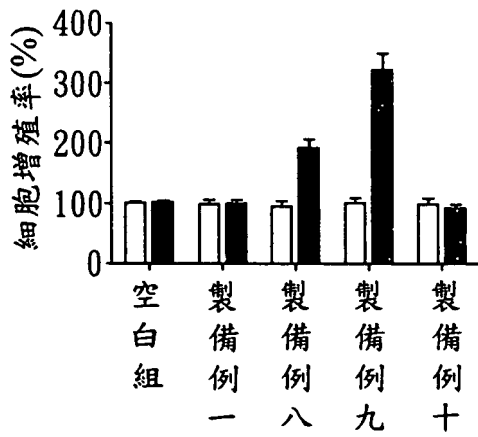
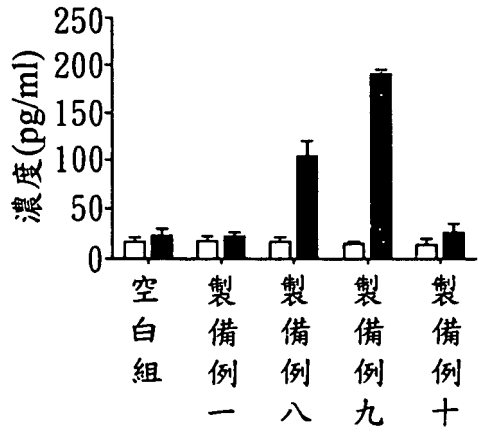


圖2

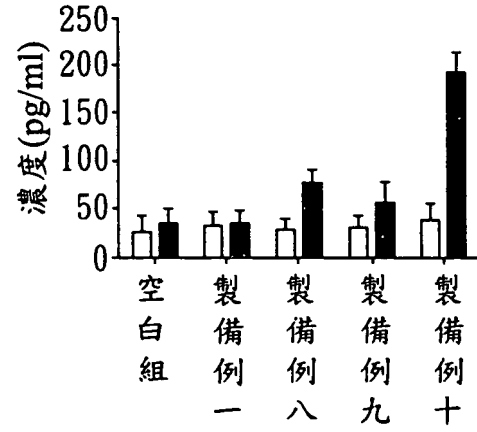
A.



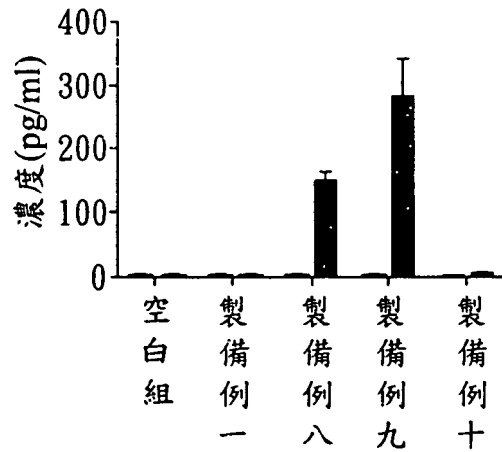
B.



D.



C.



E.

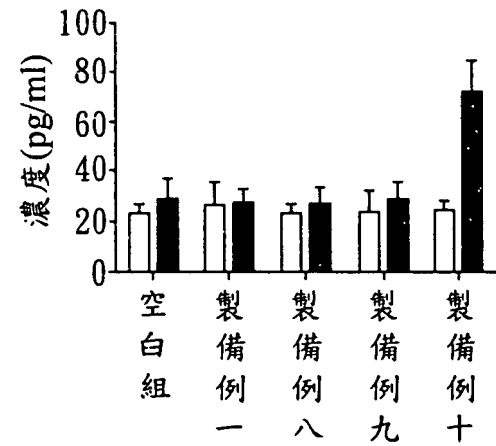


圖3

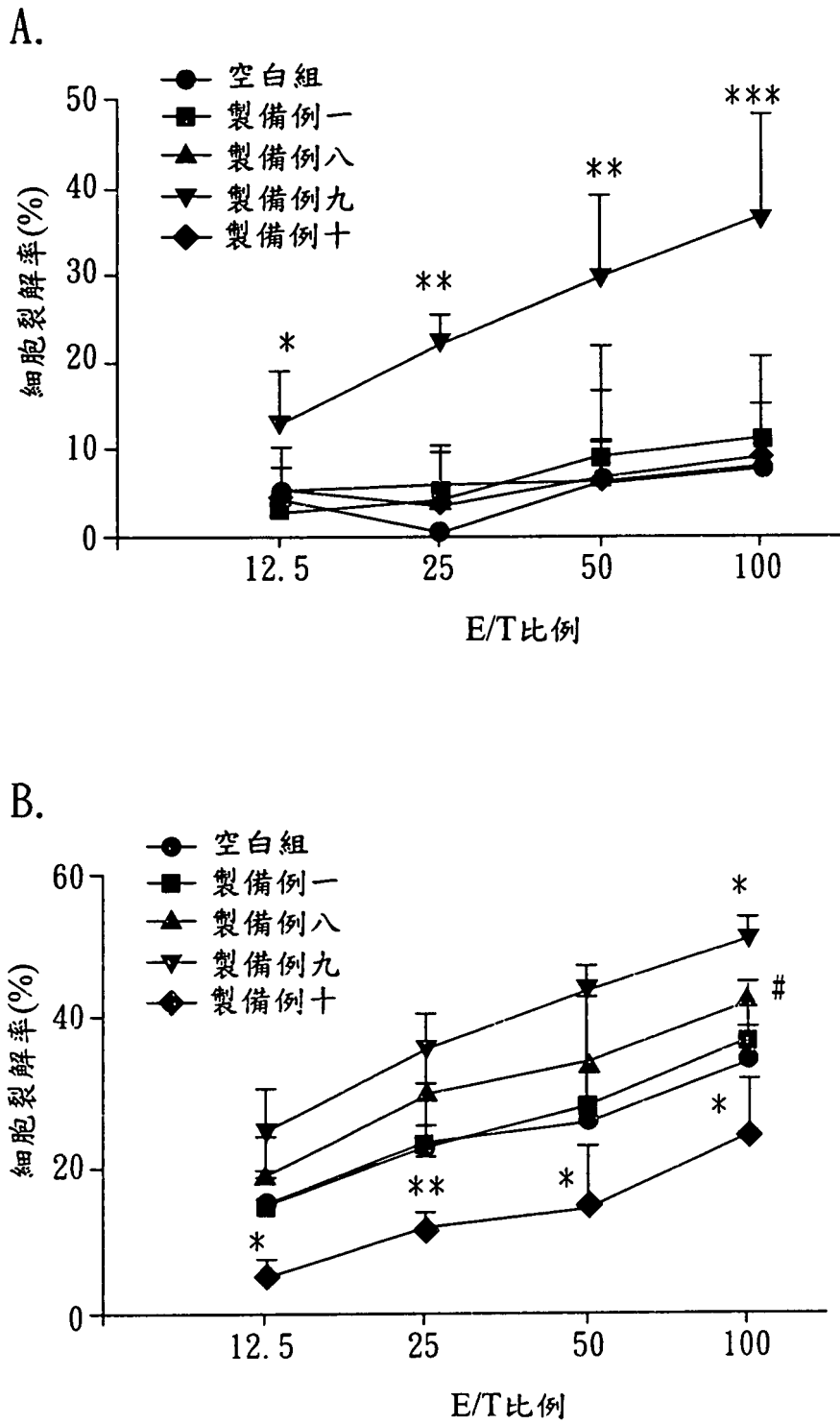


圖 4

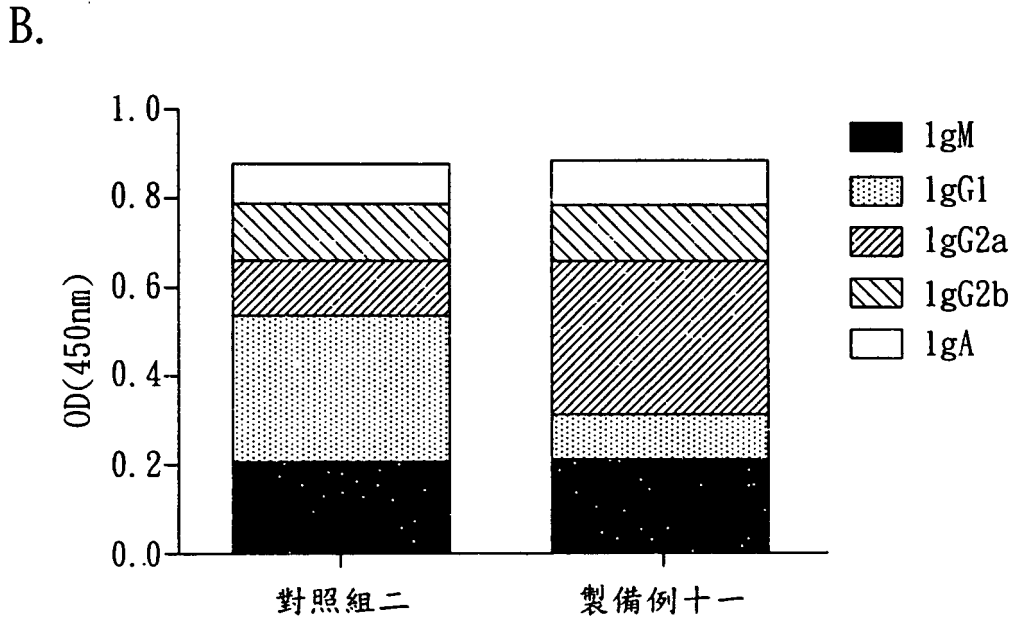
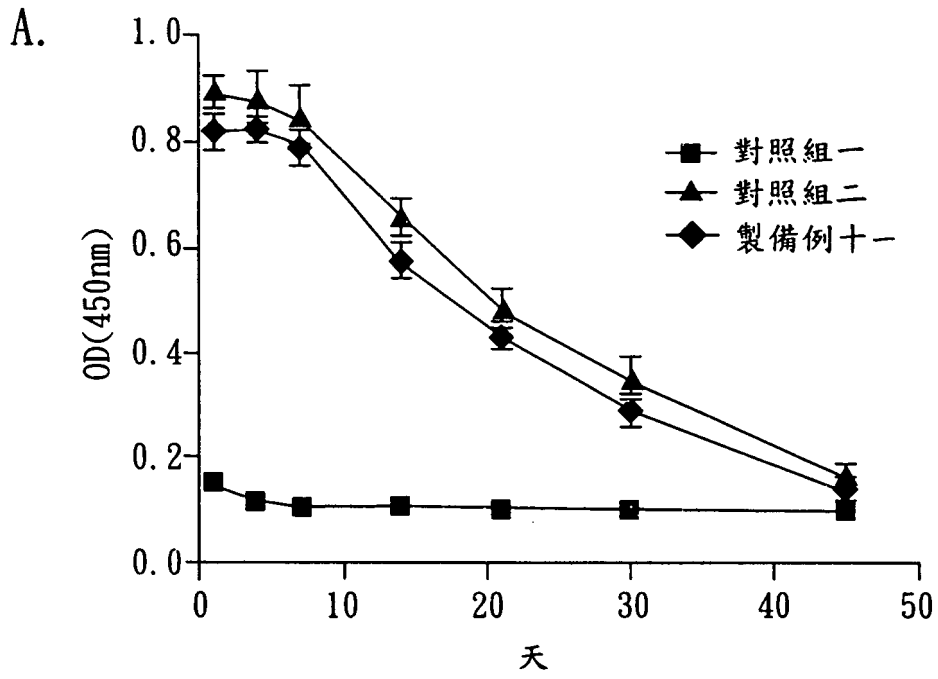
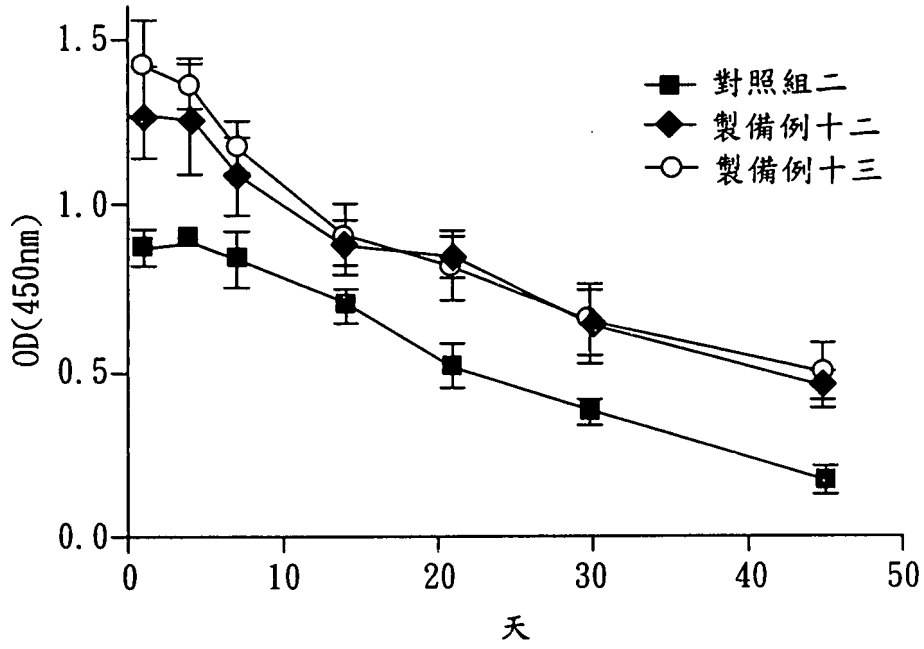


圖5

A.



B.

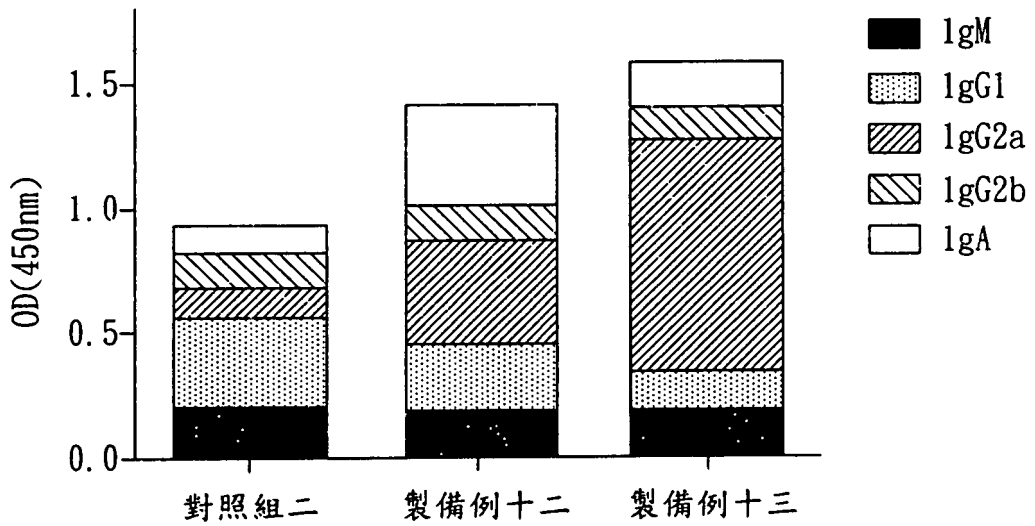


圖6