



(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 I763065 B

(45) 公告日：中華民國 111 (2022) 年 05 月 01 日

(21) 申請案號：109134040

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 09 月 30 日

(51) Int. Cl. : C07K14/21 (2006.01)

C07K14/435 (2006.01)

C07K14/705 (2006.01)

C12N9/64 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2019/10/04 美國

62/910,474

(71) 申請人：瑞寶基因股份有限公司 (中華民國) REBER GENETICS CO., LTD. (TW)

臺北市內湖區民權東路 6 段 160 號 13 樓 A 室

(72) 發明人：陳韋仁 CHEN, WEI-JEN (TW)；張家榮 CHANG, CHIA-JUNG (TW)；吳佩穎 WU, PEI-YIN (TW)

(74) 代理人：葉璟宗；卓俊傑

(56) 參考文獻：

US 2018/0230193A1

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：2 共 35 頁

(54) 名稱

重組融合蛋白及免疫原組合物

(57) 摘要

重組融合蛋白包括受體相關蛋白 1 (RAP1)、分化簇 28 (CD28)-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (PEt) 融合多胜肽，天冬氨酸內肽酶以及標靶胜肽。RAP1 位於重組融合蛋白的 N 端。分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (CD28-PEt) 融合多胜肽位於 RAP1 的 C 端。天冬氨酸內肽酶位於分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (CD28-PEt) 融合多胜肽的 C 端。標靶胜肽位於天冬氨酸內肽酶蛋白的 C 末端。在本揭露的另一個實施例中，提供了免疫原組合物。包括重組融合蛋白和佐劑的免疫原組合物用於在罹癌的受試者中誘導特異性免疫反應，由此可以成功地降低受試者的癌症轉移和復發的風險。

A recombinant fusion protein includes a receptor associated protein 1 (RAP1), a cluster of differentiation 28 (CD28)-Pseudomonas exotoxin A translocation domain (PEt) fusion polypeptide, a legumain protein and a target peptide. The RAP1 is located at the N-terminus of the recombinant fusion protein. The CD28-PEt fusion polypeptide is located at the C-terminus of the RAP1. The legumain protein is located at the C-terminus of the CD28-PEt fusion polypeptide. The target peptide is located at the C-terminus of the legumain protein. In another embodiment of the present disclosure, an immunogenic composition is provided. The immunogenic composition including the recombinant fusion protein and an adjuvant is used for inducing specific immune responses in a subject with cancer, whereby the risk of cancer metastasis and recurrence for the subject may be successfully reduced.



I763065

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】重組融合蛋白及免疫原組合物

【英文發明名稱】RECOMBINANT FUSION PROTEIN AND

IMMUNOGENIC COMPOSITION

## 【中文】

重組融合蛋白包括受體相關蛋白1 (RAP1)、分化簇28 (CD28) - 假單胞菌外毒素A轉位結構域 (PEt) 融合多胜肽，天冬氨酸內肽酶以及標靶胜肽。RAP1位於重組融合蛋白的N端。分化簇28-假單胞菌外毒素A轉位結構域 (CD28-PEt) 融合多胜肽位於RAP1的C端。天冬氨酸內肽酶位於分化簇28-假單胞菌外毒素A轉位結構域 (CD28-PEt) 融合多胜肽的C端。標靶胜肽位於天冬氨酸內肽酶蛋白的C末端。在本揭露的另一個實施例中，提供了免疫原組合物。包括重組融合蛋白和佐劑的免疫原組合物用於在罹癌的受試者中誘導特異性免疫反應，由此可以成功地降低受試者的癌症轉移和復發的風險。

## 【英文】

A recombinant fusion protein includes a receptor associated protein 1 (RAP1), a cluster of differentiation 28 (CD28)-Pseudomonas exotoxin A translocation domain (PEt) fusion polypeptide, a legumain protein and a target peptide. The RAP1 is located at the

N-terminus of the recombinant fusion protein. The CD28-PEt fusion polypeptide is located at the C-terminus of the RAP1. The legumain protein is located at the C-terminus of the CD28-PEt fusion polypeptide. The target peptide is located at the C-terminus of the legumain protein. In another embodiment of the present disclosure, an immunogenic composition is provided. The immunogenic composition including the recombinant fusion protein and an adjuvant is used for inducing specific immune responses in a subject with cancer, whereby the risk of cancer metastasis and recurrence for the subject may be successfully reduced.

【指定代表圖】無。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】重組融合蛋白及免疫原組合物

【英文發明名稱】RECOMBINANT FUSION PROTEIN AND

IMMUNOGENIC COMPOSITION

【技術領域】

【0001】 [相關申請的交叉引用]

【0002】 此申請要求申請日為 2019 年 10 月 4 日的美國臨時申請第 62/910,474 號的優先權和權益。上述專利申請的全部內容藉由引用併入本文，並成為本說明書的一部分。

【0003】 本發明是有關於一種重組融合蛋白及免疫原組合物，且特別是有關於一種包括重組融合蛋白的免疫原組合物，所述重組融合蛋白可以在罹癌的受試者中有效地誘導特異性免疫反應。

【先前技術】

【0004】 天冬氨酸內肽酶（legumain）在多種腫瘤中會過度表達（overexpression），且在腫瘤晚期和轉移（metastasis）時更為顯著。因此，天冬氨酸內肽酶的過度表達（overexpression）被認為與術後的轉移和復發（recurrence）的風險相關。例如，在患有乳腺腫瘤（breast tumor）的狗中，天冬氨酸內肽酶過度表達，主要治療方法是手術切除。然而在臨床上已經發現，在外科切除乳房腫瘤後的轉移和復發率非常高。

**【發明內容】**

**【0005】** 據此，本揭露提供一種包括重組融合蛋白的免疫原組合物，所述重組融合蛋白可用於在罹癌的受試者中有效地誘導特異性免疫反應，並可降低受試者的癌症轉移和復發的風險。

**【0006】** 根據本揭露的一些實施例，一種重組融合蛋白被提供。該重組融合蛋白包括受體相關蛋白 1 (receptor associated protein 1, RAP1)、分化簇 28 (cluster of differentiation 28, CD28)-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (Pseudomonas exotoxin A translocation domain, PEt) 融合多胜肽、天冬氨酸內肽酶 (legumain) 蛋白以及標靶胜肽 (target peptide)。受體相關蛋白 1 (RAP1) 位在重組融合蛋白的 N-端。分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (CD28-PEt) 融合多胜肽位在受體相關蛋白 1 的 C 端。天冬氨酸內肽酶蛋白位在分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (CD28-PEt) 融合多胜肽的 C 端。標靶胜肽位在天冬氨酸內肽酶蛋白的 C 端。

**【0007】** 在本發明的一實施例中，上述的重組融合蛋白包括 SEQ ID NO：1 的胺基酸序列。

**【0008】** 在本發明的一實施例中，上述的重組融合蛋白包括由 SEQ ID NO：2 的核苷酸序列所編碼的胺基酸序列。

**【0009】** 在本發明的一實施例中，上述的天冬氨酸內肽酶蛋白為人類重組蛋白。

【0010】 在本發明的一實施例中，上述的標靶胜肽為內質網保留序列。

【0011】 本發明的免疫原組合物，用於在罹癌的受試者中誘導特异性免疫反應，免疫原組合物包括上述的重組融合蛋白以及佐劑。

【0012】 在本發明的一實施例中，上述的佐劑包括 CpG 寡聚去氧核苷酸（CpG oligodeoxynucleotides，CpG ODN）或基於皂苷佐劑（saponin-based adjuvant）。

【0013】 在本發明的一實施例中，上述的 CpG 寡聚去氧核苷酸（CpG ODN）的濃度為 0.2 毫克/毫升。

【0014】 在本發明的一實施例中，上述的基於皂苷佐劑的濃度為 0.2 毫克/毫升。

【0015】 在本發明的一實施例中，上述的重組融合蛋白與佐劑的重量比為 1：1 至 12.5：1。

【0016】 在本發明的一實施例中，上述的受試者包括人類和非人類動物。

【0017】 在本發明的一實施例中，上述的癌症包括天冬氨酸內肽酶過度表達癌。

【0018】 在本發明的一實施例中，上述的天冬氨酸內肽酶過度表達癌包括乳腺癌、乳腺腫瘤、前列腺癌、胃癌、大腸直腸癌、卵巢癌或黑色素瘤。

【0019】 基於上述，本發明提供了重組融合蛋白和包括該重組融合蛋白的免疫原組合物。重組融合蛋白包括位於重組融合蛋白的 N

端的受體相關蛋白 1 (RAP1)、位於受體相關蛋白 1 (RAP1) 的 C 端的分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (CD28-Pet) 融合多胜肽、位於分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (CD28-Pet) 融合多胜肽的 C 端的天冬氨酸內肽酶 (legumain) 蛋白，以及位在天冬氨酸內肽酶蛋白的 C 端的標靶胜肽。藉由在用於疫苗接種的免疫原組合物中添加本發明的重組融合蛋白，可以在患有癌症的受試者中成功地有效誘導特異性免疫反應，因此可降低該受試者的癌症轉移和復發的風險。

**【0020】** 為讓本發明的上述特徵和優點能更明顯易懂，下文特舉實施例，並配合所附圖式作詳細說明如下。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0021】** 包括附圖以便進一步理解本發明，且附圖併入本說明書中並構成本說明書的一部分。附圖說明本揭露的實施例，並與描述一起用於解釋本發明的原理。

圖 1A 是以酵素免疫分析法來檢測實施例 2 的不同測試組的小鼠中的天冬氨酸內肽酶的抗體的結果。

圖 1B 至圖 1D 是以體內成像系統來檢測實施例 2 的不同測試組的小鼠中的 4T1/luc 小鼠乳腺腫瘤細胞的結果。

圖 2A 是以酵素免疫分析法來檢測實施例 3 的不同測試組的狗中的天冬氨酸內肽酶的抗體的結果。

圖 2B 是檢測實施例 3 的狗的乳腺腫瘤的體積的結果。

**【實施方式】**

**【0022】** 當前，天冬氨酸內肽酶（Legumain）被發現在多種腫瘤中過度表達(overexpressed)，並且在腫瘤的晚期和轉移( metastasis )時更為顯著。此外，天冬氨酸內肽酶過度表達被認為與術後的轉移和復發( recurrence )的風險相關。例如，在患有乳腺腫瘤( mammary tumor )的狗中，天冬氨酸內肽酶會過度表達，且在臨床上已經發現，外科切除乳腺腫瘤後的轉移和復發率非常高。

**【0023】** 本揭露涉及一種重組融合蛋白（ recombinant fusion protein ）以及免疫原組合物（ immunogenic composition ），重組融合蛋白包括 SEQ ID NO : 1 的胺基酸序列，免疫原組合物包括所述重組融合蛋白與佐劑，以在患有癌症的受試者中有效地誘導特異性免疫反應。在一些示例性實施例中，重組融合蛋白可至少包括受體相關蛋白 1（ receptor associated protein 1，RAP1 ）、分化簇 28（ cluster of differentiation 28，CD28 ）-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域（ Pseudomonas exotoxin A translocation domain，PEt ）融合多胜肽、天冬氨酸內肽酶（ legumain ）蛋白以及標靶胜肽（ target peptide ）。受體相關蛋白 1（ RAP1 ）位在重組融合蛋白的 N-端。分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域（ CD28-PEt ）融合多胜肽位在受體相關蛋白 1( RAP1 )的 C 端。天冬氨酸內肽酶( legumain )蛋白位在分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域（ CD28-PEt ）融合多胜肽的 C 端。標靶胜肽位在天冬氨酸內肽酶（ legumain ）



蛋白的 C 端。

【0024】 在一個示例性的實施例中，重組融合蛋白可包括由 SEQ ID NO：2 的核苷酸序列編碼的胺基酸序列。然而，本揭露不限於此。

【0025】 受體相關蛋白 1 (RAP1) 的分子量為 39 kDa，是內質網保留蛋白 (Endoplasmic Reticulum resident protein, ERFP)。受體相關蛋白 1 (RAP1) 也是與低密度脂蛋白受體 (low-density lipoprotein receptor) 家族成員緊密結合的拮抗劑 (antagonist) 和分子伴護子 (molecular chaperones)，例如，低密度脂蛋白受體相關蛋白 1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1, LRP1)，也被知道為分化簇 91 (cluster of differentiation 91, CD91)。

【0026】 假單胞菌外毒素 A (PE) 蛋白是該細菌最具毒性的致病因子 (virulence factor)。假單胞菌外毒素 A (PE) 蛋白可分為 Ia 結構域 (胺基酸序列 1-252)、II 結構域 (胺基酸序列 253-364)、Ib 結構域 (胺基酸序列 365-404) 和 III 結構域 (胺基酸序列 405-613)。在一些實施例中，具有假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (PEt) 的假單胞菌外毒素 A (PE) 蛋白的胺基酸序列 268-313 可用以作為重組融合蛋白的一部分。然而，本揭露不限於此。在其他實施例中，具有假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (PEt) 的假單胞菌外毒素 A (PE) 蛋白的胺基酸序列也可用以作為重組融合蛋白的一部分。

【0027】 分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (CD28-PEt)

融合多胜肽可以包括分化簇 28 (CD28) 保守區 (conserved region) 和假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (PEt)，並且假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (PEt) 可以位於分化簇 28 (CD28) 保守區的 C 端。分化簇 28 (CD28) 保守區是用以作為誘導 CD28 促控抗體 (agonist antibody) 的抗原表位 (epitope)。以分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (CD28-PEt) 融合多胜肽作為免疫刺激劑 (immunostimulator)，可能會提高 CD28 (CD28 激動劑抗體 (CD28 agonist antibody)) 特異性的 IgG 效價，然後使 CD4+ 和 CD8+ T 細胞敏化 (sensitize)。

**【0028】** 天冬氨酸內肽酶 (Legumain) 蛋白是一種半胱氨酸內肽酶 (cysteine endopeptidase)，屬於肽酶家族 C13 (peptidase family C13)。天冬氨酸內肽酶蛋白是腫瘤中非常重要的臨床指標，並且在多種腫瘤中過度表達，包括人類的乳腺癌 (breast cancer)、乳腺腫瘤 (mammary tumor)、前列腺癌 (prostate cancer)、胃癌 (stomach cancer)、大腸直腸癌 (colorectal cancer)、卵巢癌 (ovarian cancer) 和黑色素瘤 (melanoma)。天冬氨酸內肽酶蛋白也於非人類 (例如狗，但不限於此) 的肛門囊癌 (anal sac carcinoma)、淋巴瘤 (lymphoma)、乳腺腫瘤 (mammary gland tumor)、肥大細胞腫瘤 (mast cell tumor)、口腔惡性黑色素瘤 (oral malignant melanoma)、骨肉瘤 (osteosarcoma)、軟組織肉瘤 (soft tissue sarcoma) (纖維肉瘤 (fibrosarcoma)、周圍神經鞘瘤 (peripheral nerve sheath tumor) 或其他) 和脾血管肉瘤 (splenic

hemangiosarcoma) 中過度表達。此外，天冬氨酸內肽酶蛋白在 III-IV 期癌症中的表達程度 (expression level) 高於 I-II 期癌症，因此，天冬氨酸內肽酶蛋白的過度表達可能與癌症臨床分期有關。具體而言，過度表達的天冬氨酸內肽酶可能嚴重影響抗原呈現 (antigen presentation) 過程，從而影響 MHC II 的活化，但不限於此。過量表達的天冬氨酸內肽酶也可能影響位於細胞表面上的其他蛋白酶的活化 (activation)。例如，腫瘤相關的巨噬細胞 (tumor-associated macrophages, TAMs) (例如，M2 TAM) 可以透過過度表達的天冬氨酸內肽酶蛋白且藉由上述機制，以建立適合腫瘤生長的微環境。

**【0029】** 在一個示例性實施例中，天冬氨酸內肽酶蛋白可以是人類 (智人 (*Homo sapiens*)) 的重組天冬氨酸內肽酶蛋白。然而，本揭露不限於此。在其他示例性實施例中，可以使用具有其他胺基酸序列的其他物種的天冬氨酸內肽酶蛋白。

**【0030】** 在一個示例性的實施例中，靶標胜肽 (target peptide) 可包括內質網 (ER) 保留序列，其幫助抗原從內吞區室 (endocytic compartment) 轉移到內質網 (ER) 中並保留在內腔 (lumen) 中。內質網 (ER) 保留序列可以包括 KDEL 或 RDEL 的胺基酸序列。例如，內質網 (ER) 保留序列可以包括 KDELKDELKDEL 的胺基酸序列。然而，本揭露不限於此。

**【0031】** 在一個示例性實施例中，受試者可以包括人類和非人類動物。例如，受試者可以是小鼠、貓或狗。然而，本揭露不限於

此。

**【0032】** 在一個示例性實施例中，所述癌症可以包括天冬氨酸內肽酶過度表達的癌症。在其他示例性實施例中，天冬氨酸內肽酶過度表達可包括人類的乳腺癌、乳腺腫瘤、前列腺癌、胃癌、大腸直腸癌、卵巢癌和黑色素瘤。然而，本揭露不限於此。在其他示例性實施例中，天冬氨酸內肽酶過度表達的癌症可包括非人類（例如狗，但不限於此）的肛門囊癌、淋巴瘤、乳腺腫瘤、肥大細胞腫瘤、口腔惡性黑色素瘤、骨肉瘤、軟組織肉瘤（纖維肉瘤、周圍神經鞘瘤或其他）和脾血管肉瘤。

**【0033】** 在一個示例性實施例中，佐劑可包括 CpG 寡聚去氧核苷酸（CpG oligodeoxynucleotides，CpG ODN）或基於皂苷的佐劑（saponin-based adjuvant）。例如，基於皂苷的佐劑可以是基於皂苷動物用疫苗佐劑（saponin-based veterinary vaccine adjuvant，VET-SAP）。然而，本揭露不限於此。

**【0034】** 在一個示例性實施例的免疫原組合物中，CpG 寡聚去氧核苷酸（CpG ODN）的濃度為約 0.2 毫克/毫升（mg/mL）。在一些實施例的免疫原組合物中，基於皂苷佐劑的濃度為約 0.2 毫克/毫升（mg/mL）。

**【0035】** 在一個示例性實施例中，重組融合蛋白與佐劑的重量比為 2.5:1。在一些實施例中，重組融合蛋白與佐劑的重量比為 12.5:1。在一些實施方案中，重組融合蛋白與佐劑的比例為 1:1 重量。通過將重組融合蛋白與佐劑的比例調整在該範圍內，可以誘導有

效的特異性免疫反應。

**【0036】** 通過設計重組融合蛋白，使其至少包括受體相關蛋白 1 (RAP1)、分化簇 28(CD28)-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域(PEt) 融合多胜肽、天冬氨酸內肽酶蛋白以及靶標胜肽，並透過包括上述重組融合蛋白的免疫原組合物，可以在罹癌的受試者中成功地誘導有效地特異性免疫反應，因此降低了受試者的癌症轉移和復發的風險。

### **【0037】 實施例**

**【0038】** 進行以下實驗實施例以證明本揭露包括重組融合蛋白的免疫原組合物，可以在罹癌的受試者中成功地誘導特異性免疫反應，從而可以降低受試者的癌症轉移和復發的風險。

**【0039】 實施例 1:** 重組融合蛋白和包括重組融合蛋白的免疫原組合物的製備

**【0040】** 在該實施例中，無菌操作台 (sterile hood) 內，製備 500 毫升的培養基 (125 微升的卡那黴素 (kanamycin) (100 毫克/毫升)，50 毫升的 20% 葡萄糖溶液，450 毫升的 TSB 培養基) 於 2 升的燒瓶 (flask) 中。接著，將細菌原種 (bacterial stock) 接種到含有 500 毫升培養基的 2 升燒瓶中，於 30°C 的培養箱中搖晃 (150 rpm) 培養 14~18 小時。應當注意，上述細菌可以表達包括 SEQ ID NO: 1 的胺基酸序列的重組融合蛋白。在另一個實例中，上述細菌具有 SEQ ID NO: 2 的核苷酸序列，其可以編碼重組融合蛋白的胺基酸序列。

【0041】 在發酵罐（fermenter）中製備培養液：在發酵罐中加入 48 克的胰蛋白（tryptone）、96 克的酵母提取物（yeast extract）、8.8 克的磷酸二氫鉀（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ）、37.6 克的磷酸氫二鉀（ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ）、1 克的氯化鈉（ $\text{NaCl}$ ）及 1 毫升消泡劑（defoamer）後，加水至 4 升並在  $121^\circ\text{C}$  滅菌 20 分鐘。滅菌並降低溫度至  $37^\circ\text{C}$  後，將 100 毫升的碳源溶液（包括 16 克的葡萄糖和 64 克的甘油）和 1 毫升的卡那黴素（100 毫克/毫升）添加到發酵罐中。

【0042】 將在 2L 燒瓶中過夜培養的細菌培養基添加到發酵罐中，並在以下培養條件下培養：溫度為  $37^\circ\text{C}$ ，轉速為 400 至 1000 rpm，pH 為 7.0，溶解氧（DO）值為 20%，通風量為 3 ccm。發酵罐中培養液在 600 nm 波長處的初始光學密度（OD600 波長）在 0.01 ~ 0.04 之間。

【0043】 溫育 6 小時後，將 4 毫升的異丙基-1-硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷（Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG）（1 莫耳濃度（M））加入發酵罐中進行誘導。異丙基-1-硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷（IPTG）誘導 8 小時以上且 pH 值大於 7.5 後，可以收集發酵產物。

【0044】 [重組融合蛋白的收集]

【0045】 將發酵產物在 8,000 rpm 和  $4^\circ\text{C}$  下離心 10 分鐘。移除上清液，並以 TNE 緩衝液（50 mM 的 Tris 緩衝液，50 mM 的氯化鈉（ $\text{NaCl}$ ），1 mM 的 EDTA，pH 8.0）將沉澱物重新均勻懸浮。

【0046】 將冷水系統（cold water system）安裝在高壓細胞破碎機（high-pressure cell crusher）中後，將懸浮液倒入高壓細胞破碎機

中。在 4°C 和 1300 巴的條件下，通過高壓細胞破碎機使懸浮液中的細菌細胞破裂以獲得細胞裂解物，再重複此步驟。

**【0047】** 將沉澱物用 TNE-T 緩衝液洗滌兩次，並以 7,000 rpm 離心 20 分鐘，然後除去上清液。

**【0048】** 將沉澱物用 2 M 的 Urea-T 緩衝液（2 M 的尿素（Urea），50 mM 的 Tris 緩衝液，50 mM 的氯化鈉（NaCl），1mM 的乙二胺四乙酸（EDTA），5 %的 Triton X-100，pH 8.0）洗滌 3 次，並以 7,000 rpm 離心 15 分鐘，然後除去上清液。

**【0049】** 將沉澱物用 TNE 緩衝液洗滌並以 7,000 rpm 離心 30 分鐘，然後去除上清液以獲得包涵體（inclusion body）。將含有重組融合蛋白的包涵體保存在 -20°C 下。

**【0050】** [重組融合蛋白的純化]

**【0051】** 以 150 毫升結合緩衝液（binding buffer）（8 M 尿素（Urea），10 mM 磷酸鉀（K. Phosphate），pH 6.0）將 3 克包涵體均勻懸浮。

**【0052】** 加入 3 毫升的 0.5 M DTT 後，將懸浮的包涵體倒入高壓細胞破碎機中，然後在 1300 巴的壓力下進行高壓均質。應該注意的是，懸浮的包涵體在倒入高壓細胞破碎機之前必須完全均質化。高壓均質後，將裂解物溶液（lysate solution）在 150 rpm 和 37°C 的振盪器上放置 16-24 小時。

**【0053】** 之後，將裂解物溶液在 7,000 rpm 和 4°C 下離心 10 分鐘。

**【0054】** 收集上清液並用 0.45 微米/0.22 微米的過濾器（filter）過

濾，並收集含有重組融合蛋白的過濾半產物。

【0055】 在以 5 倍色譜柱體積的結合緩衝液 (binding buffer) (8 M 的尿素，10 mM 的磷酸鉀 (K.) 磷酸鹽，pH 6.0) 平衡 10 毫升 Q Sepharose 色譜柱 (5 毫升/分鐘的流速) 後，將 50 毫升的過濾半產物添加到 Q Sepharose 色譜柱中。

【0056】 加入 3 倍色譜柱體積的 15 % 洗脫緩衝液 (Elution buffer) 以 5 毫升/分鐘的流速洗滌色譜柱，然後收集洗滌的樣品。洗脫緩衝液包括 pH 值為 6.0 的 8 M 尿素、10 mM 磷酸鉀 (K. Phosphate) 和 500 mM 氯化鈉 (NaCl)。

【0057】 加入 3 倍色譜柱體積的 20 % 洗脫緩衝液，以 5 毫升/分鐘的流速洗滌色譜柱，然後收集洗滌的樣品。

【0058】 加入 3 倍色譜柱體積的 100 % 洗脫緩衝液以 5 毫升/分鐘的流速洗滌色譜柱，然後收集含有重組融合蛋白的純化半產物。

【0059】 [重組融合蛋白的重新折疊 (refolding)]

【0060】 將 10 毫克的純化半成品添加到透析袋 (30kD cut-off) 後，向透析袋中添加 8 M 尿素緩衝液 (8 M 尿素，10 mM 磷酸鉀，pH 6.0) 至 10 毫升。

【0061】 將透析袋放置在裝有 5 升的 6 M 尿素緩衝液 (6 M 尿素，10 mM 磷酸鉀，pH 6.0) 的容器中進行透析 16 小時。

【0062】 取出透析袋，將其置於裝有 5 升的 4 M 尿素緩衝液 (4 M 尿素，10 mM 磷酸鉀，pH 6.0) 的容器中透析 4 小時。

【0063】 取出透析袋，並將其置於裝有 5 升的 2 M 尿素緩衝液 (2



M 尿素，10 mM 磷酸鉀，pH 6.0) 的容器中透析 4 小時。

【0064】 取出透析袋並將其置於裝有 5 升的 1M 尿素緩衝液 (1M 尿素，10mM 磷酸鉀，pH 6.0) 的容器中進行透析 16 小時。

【0065】 取出透析袋，並將其置於裝有 5 升的 1X PBS 緩衝液 (pH 7.4) 的容器中進行透析 4 小時。

【0066】 取出透析袋，並將其置於裝有 5 升的 1X PBS 緩衝液 (pH 7.4) 的容器中進行透析 4 小時。

【0067】 取出重新折疊的半產物，並用 0.22 微米的過濾器 (filter) 過濾後，獲得重組融合蛋白。

【0068】 [免疫原組合物的製備]

【0069】 將 10 微升的新黴素 (Neomycin) 和 100 微升的 CpG 寡聚去氧核苷酸 (CpG) / 基於皂苷動物用疫苗佐劑 (VET-SAP) (20 毫克/毫升) 加入 10 毫升的重組融合蛋白中以形成混合物後，將混合物以無菌過濾至具有 0.2 微米過濾器的混合罐中，並以 150 rpm 攪拌 5 分鐘，以得到免疫原組合物。在該實驗實施例中，將重組融合蛋白與 CpG / VET-SAP 均勻混合，例如比例為 2.5 : 1。然而，本揭露不限於此。在其他實驗實施例中，重組融合蛋白與 CpG / VET-SAP 也可以以 1 : 1 或 12.5 : 1 的比例均勻混合。在一些實驗實施例中，CpG ODN 的濃度為約 0.2 毫克/毫升。在其他實驗實施例中，基於皂苷佐劑的濃度為約 0.2 毫克/毫升。

【0070】 **實施例 2**：免疫原組合物對乳腺腫瘤動物模型的影響

【0071】 在該實驗例中，將雌性 BALB/c 小鼠 (7 週齡) 用作試驗

動物，並通過皮下注射向其注射安慰劑或免疫原組合物。如表 1 所示，將 Balb/c 小鼠分為 3 組，每組 3-10 隻小鼠。首先，通過尾靜脈注射 (tail vein injection) 向 A 至 C 組注射小鼠乳腺腫瘤細胞 (例如  $1.4 \times 10^4$  4T1-luc 細胞)。在注射小鼠乳腺腫瘤細胞後第 3、10 和 17 天，向 A 組注射緩衝液 (作為安慰劑)，向 B 組注射包括重組融合蛋白和 CpG 寡聚去氧核苷酸 (CpG) 的免疫原組合物，以及向 C 組注射包括重組融合蛋白和基於皂苷動物用疫苗佐劑 (VET-SAP) 的免疫原組合物。應注意的是，4T1 小鼠乳腺腫瘤細胞具有高度致瘤性 (tumorigenic) 和侵襲性 (invasive)，可以自發地從原發腫瘤轉移到多個遠處，包括淋巴結、血液、肝、肺、腦及骨。

**【0072】** 在注射安慰劑/免疫原組合物之前與在第一次、第二次和第三次安慰劑/免疫原組合物注射之後，通過頷下血液 (submandibular blood) 收集來收集血液樣品。血液樣品中的血清用於天冬氨酸內肽酶 (legumain) 之 IgG 抗體的酵素免疫分析法 (ELISA) 分析。小鼠中的小鼠乳腺腫瘤細胞是透過體內成像系統 (IVIS) 來檢測。

**【0073】** 表 1

組	免疫原組合物	注射體積(微升)	小鼠的數量
A	安慰劑	100	8
B	重組融合蛋白 + CpG	100	10

C	重組融合蛋白+ VET-SAP	100	3
---	-----------------	-----	---

**【0074】** [天冬氨酸內肽酶之 IgG 抗體的 ELISA 分析]

**【0075】** 天冬氨酸內肽酶之 IgG 抗體的 ELISA 分析的實驗步驟：  
將 3-10 隻小鼠的血清（每隻小鼠 10  $\mu$ L）混合到同一管中。將每組血清稀釋 1000 倍後，將 100 微升血清稀釋液添加到 Biocheck legumain ELISA 試劑盒的抗原盤的一個孔洞中（塗覆 1 微克/孔洞的天冬氨酸內肽酶），並在 37°C 反應 30 分鐘。用 1X 的 PBST 洗滌 4 次後，加入 100 微升的 anti-mouse-IgG-HRP（1：10000），並在 37°C 反應 30 分鐘。用 1X 的 PBST 洗滌 4 次後，加入 100 微升的 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺（tetramethylbenzidine，TMB），並在室溫反應 15 分鐘。在加入 100 微升 1N 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 之後，用酵素免疫分析儀（ELISA reader）測量於 450 nm 波長下的訊號。

**【0076】** 圖 1A 是以酵素免疫分析法來檢測實施例 2 的不同測試組的小鼠中的天冬氨酸內肽酶的抗體的結果。橫軸表示注射安慰劑/免疫原組合物前（B0）、在第一次安慰劑/免疫原組合物注射之後（A1）、在第二次安慰劑/免疫原組合物注射之後（A2）以及第三次安慰劑/免疫原組合物注射之後（A3）的每組小鼠的血清。縱軸表示在 450 nm 波長下的光學密度(optical density，OD)的讀值，其可以代表血清中天冬氨酸內肽酶的抗體的相對量。根據圖 1A 的結果，相較於 A 組與 B 組在 B0 時的天冬氨酸內肽酶的抗體量，A 組和 B 組在 A1、A2、A3 時的天冬氨酸內肽酶的抗體量沒有顯著

變化。然而，在 A2 及 A3 時，來自 C 組（注射了包括重組融合蛋白和 VET-SAP 的免疫原組合物）的天冬氨酸內肽酶的抗體量顯著高於 A 組（僅注射了安慰劑）的天冬氨酸內肽酶的抗體量。

【0077】 因此可以看出，包括重組融合蛋白和 VET-SAP 的免疫原組合物，可以在具有小鼠乳腺腫瘤細胞的小鼠中成功地誘導特異性免疫反應，例如抗體免疫反應。

【0078】 [通過體內成像系統（IVIS）檢測腫瘤細胞]

【0079】 圖 1B 至圖 1D 是以體內成像系統來檢測實施例 2 的不同測試組的小鼠中的 4T1/luc 小鼠乳腺腫瘤細胞的結果。注射小鼠乳腺腫瘤細胞後 32 天，使用體內成像系統檢測 A 至 C 組小鼠中的 4T1/luc 小鼠乳腺腫瘤細胞的信號。根據圖 1B 的結果，A 組中有 4/8 隻（約 50 %）小鼠在體內（不含尾巴）具有腫瘤細胞。在圖 1C 中，B 組中有 2/10（約 20 %）隻小鼠（不包括尾巴）在體內具有腫瘤細胞。在圖 1D 中，C 組有有 1/3 隻（約 33 %）小鼠在體內（不包括尾巴）具有腫瘤細胞。

【0080】 因此可以看出，包括重組融合蛋白和 CpG/VET-SAP 的免疫原組合物，可以成功地降低具有小鼠乳腺腫瘤細胞的小鼠發生癌症轉移的風險。此外，在 C 組中，包括重組融合蛋白和 VET-SAP 的免疫原組合物可以至少通過產生天冬氨酸內肽酶的抗體來降低癌症轉移的風險。在 B 組中，儘管未檢測到天冬氨酸內肽酶的抗體，但它被相信，包括重組融合蛋白和 CpG 的免疫原組合物可能觸發對天冬氨酸內肽酶的細胞免疫反應，從而降低了癌症轉移的

風險。

**【0081】 實施例 3：** 免疫原組合物對患有乳腺腫瘤的狗的影響

**【0082】** 在該實驗例中，將具有乳腺腫瘤的狗分為兩組，每組有 1 隻狗，如表 2 所示。在手術切除腫瘤之前，通過皮下注射向  $\alpha$  組和  $\beta$  組注射包括重組融合蛋白和 VET-SAP 的免疫原組合物。免疫原組合物注射 3 次。在測量腫瘤體積之後，在第 0 天分別在  $\alpha$  組和  $\beta$  組中注射第一劑免疫原組合物。接下來，在第 10 天和第 16 天分別將第二劑和第三劑的免疫原組合物注射到  $\alpha$  組中。在第 10 天和第 16 天分別將第二劑和第三劑的免疫原組合物注射到  $\beta$  組中。在第 32 天，以手術切除了  $\alpha$  組的乳腺腫瘤。

**【0083】** 在第 0、10、16、24 和 32 天收集來自  $\alpha$  組和  $\beta$  組的血液樣品。血液樣品中的血清用於天冬氨酸內肽酶之 IgG 抗體的 ELISA 分析。在第 0、10、16、24 和 32 天測量  $\beta$  組的乳腺腫瘤的體積。

**【0084】** 表 2

組	免疫原組合物	注射體積(微升)	狗的數量
$\alpha$	重組融合蛋白 + VET-SAP	1000	1
$\beta$	重組融合蛋白 + VET-SAP	1000	1

**【0085】** [天冬氨酸內肽酶之 IgG 抗體的 ELISA 分析]

**【0086】** 天冬氨酸內肽酶之 IgG 抗體的 ELISA 分析的實驗步驟：在每組血清稀釋 1000 倍後，將 100 微升血清稀釋液添加到 Biocheck legumain ELISA 試劑盒的抗原盤的一個孔洞中（塗覆 1 微克/孔洞的天冬氨酸內肽酶），並在 37°C 反應 30 分鐘。用 1X 的

PBST 洗滌 4 次後，加入 100 微升的 anti-mouse-IgG-HRP (1 : 10000)，並在 37°C 反應 30 分鐘。用 1X 的 PBST 洗滌 4 次後，加入 100 微升的 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB)，並在室溫反應 15 分鐘。在加入 100 微升 1N 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 之後，用酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 測量於 450 nm 波長下的光學密度。

**【0087】** 圖 2A 是以酵素免疫分析法來檢測實施例 3 的不同測試組的狗中的天冬氨酸內肽酶的抗體的結果。橫軸表示在第 0、10、16 和 24 天時每組的狗的血清。縱軸表示在 450 nm 波長下的光學密度(optical density, OD)的讀值，其可以代表血清中天冬氨酸內肽酶的抗體的相對量。根據圖 2A 的結果，α 組和 β 組在第 10、16 和 24 天的天冬氨酸內肽酶的抗體量顯著高於 α 組和 β 組在第 0 天的天冬氨酸內肽酶的抗體量。因此，可以看出，包括重組融合蛋白和 VET-SAP 的免疫原組合物，可以在患有乳腺腫瘤的狗中成功地誘導特異性免疫反應，例如抗體免疫反應。

**【0088】** [α 組中的乳腺腫瘤的體積的測量]

**【0089】** 圖 2B 是檢測實施例 3 的狗的乳腺腫瘤的體積的結果。在注射第一劑免疫原組合物之前，在第 0 天測量 α 組中的乳腺腫瘤的大小。測量後，如圖 2B 所示，α 組中的乳腺腫瘤的尺寸為約 85 × 95 × 100 mm，α 組中的乳腺腫瘤的體積為約 403,750 mm<sup>3</sup> (85 × 95 × 100 × 1/2)。接下來，還在第 10、16、24 和 32 天測量 α 組的乳腺腫瘤體積。根據圖 2B 的結果，在第二劑注射 (第 10 天) 後，腫瘤

體積明顯變小。此外，獸醫還觀察到腫瘤開始軟化。接下來，在第 32 天以手術切除腫瘤，且在手術切除腫瘤後，未觀察到復發。因此可以看出，包含重組融合蛋白和 VET-SAP 的免疫原組合物可以成功地降低患有乳腺腫瘤的狗發生癌症轉移的風險。

**【0090】** 根據以上的實施例，重組融合蛋白包括位於重組融合蛋白的 N 端的受體相關蛋白 1(RAP1)、位於受體相關蛋白 1(RAP1) 的 C 端的分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (CD28-Pet) 融合多胜肽、位於分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域 (CD28-Pet) 融合多胜肽的 C 端的天冬氨酸內肽酶 (legumain) 蛋白，以及位於天冬氨酸內肽酶 (legumain) 蛋白的 C 端的標靶胜肽 (target peptide)。此外，本揭露的包括重組融合蛋白的免疫原組合物用於在罹癌的受試者中有效地誘導特異性免疫反應，因此降低了該受試者的癌症轉移和復發的風險。

**【0091】** 雖然本發明已以實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何所屬技術領域中具有通常知識者，在不脫離本發明的精神和範圍內，當可作些許的更動與潤飾，故本發明的保護範圍當視後附的申請專利範圍所界定者為準。

#### **【符號說明】**

無

## 序列表

&lt;110&gt; 瑞寶基因

&lt;120&gt; 重組融合蛋白及免疫原組合物

&lt;130&gt; 086374-TW-PA

&lt;140&gt; 109134040

&lt;141&gt; 2020/09/30

&lt;150&gt; US 62/910,474

&lt;151&gt; 2019-10-04

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 492

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 1

Met Ala Glu Phe Glu Glu Pro Arg Val Ile Asp Leu Trp Asp Leu Ala  
 1                    5                    10                    15

Gln Ser Ala Asn Leu Thr Asp Lys Glu Leu Glu Ala Phe Arg Glu Glu  
                   20                    25                    30

Leu Lys His Phe Glu Ala Lys Ile Glu Lys His Asn His Tyr Gln Lys  
                   35                    40                    45

Gln Leu Glu Ile Ala His Glu Lys Leu Arg His Ala Glu Ser Val Gly  
                   50                    55                    60

Asp Gly Glu Arg Val Ser Arg Ser Arg Glu Lys His Ala Leu Leu Glu  
                   65                    70                    75                    80

Gly Arg Thr Lys Glu Leu Gly Tyr Thr Val Lys Lys His Leu Gln Asp  
                   85                    90                    95



# I763065

Leu Ser Gly Arg Ile Ser Arg Ala Arg Glu Phe Thr Asp Ile Tyr Phe  
100 105 110

Cys Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys  
115 120 125

Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Arg Ala Arg Tyr Lys Arg Gly Trp Glu  
130 135 140

Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr  
145 150 155 160

Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Gly  
165 170 175

Ser Glu Phe Asp Gly Gly Lys His Trp Val Val Ile Val Ala Gly Ser  
180 185 190

Asn Gly Trp Tyr Asn Tyr Arg His Gln Ala Asp Ala Cys His Ala Tyr  
195 200 205

Gln Ile Ile His Arg Asn Gly Ile Pro Asp Glu Gln Ile Val Val Met  
210 215 220

Met Tyr Asp Asp Ile Ala Tyr Ser Glu Asp Asn Pro Thr Pro Gly Ile  
225 230 235 240

Val Ile Asn Arg Pro Asn Gly Thr Asp Val Tyr Gln Gly Val Pro Lys  
245 250 255

Asp Tyr Thr Gly Glu Asp Val Thr Pro Gln Asn Phe Leu Ala Val Leu  
260 265 270

Arg Gly Asp Ala Glu Ala Val Lys Gly Ile Gly Ser Gly Lys Val Leu  
275 280 285

Lys Ser Gly Pro Gln Asp His Val Phe Ile Tyr Phe Thr Asp His Gly  
290 295 300

Ser Thr Gly Ile Leu Val Phe Pro Asn Glu Asp Leu His Val Lys Asp  
305 310 315 320

Leu Asn Glu Thr Ile His Tyr Met Tyr Lys His Lys Met Tyr Arg Lys  
325 330 335

Met Val Phe Tyr Ile Glu Ala Cys Glu Ser Gly Ser Met Met Asn His  
340 345 350

Leu Pro Asp Asn Ile Asn Val Tyr Ala Thr Thr Ala Ala Asn Pro Arg  
355 360 365

Glu Ser Ser Tyr Ala Cys Tyr Tyr Asp Glu Lys Arg Ser Thr Tyr Leu  
370 375 380

Gly Asp Trp Tyr Ser Val Asn Trp Met Glu Asp Ser Asp Val Glu Asp  
385 390 395 400

Leu Thr Lys Glu Thr Leu His Lys Gln Tyr His Leu Val Lys Ser His  
405 410 415

Thr Asn Thr Ser His Val Met Gln Tyr Gly Asn Lys Thr Ile Ser Thr  
420 425 430

Met Lys Val Met Gln Phe Gln Gly Met Lys Arg Lys Ala Ser Ser Pro  
435 440 445

Val Pro Leu Pro Pro Val Thr His Leu Asp Leu Thr Pro Ser Pro Asp  
450 455 460

Val Pro Leu Thr Ile Met Lys Arg Lys Leu Met Asn Thr Asn Leu Glu  
465 470 475 480

Lys Asp Glu Leu Lys Asp Glu Leu Lys Asp Glu Leu  
485 490

# I763065

<210> 2  
<211> 1473  
<212> DNA  
<213> 智人

<400> 2  
gctgagttcg aggagccgcg tgtgattgac ctgtgggacc tggcgcagtc cgccaacctc 60  
acggacaagg agctggaggc gttccgtgag gagctcaagc acttcgaagc caaaatcgag 120  
aagcacaacc actaccagaa gcagctggag attgcgcacg agaagctgcg tcacgcagag 180  
agcgtgggcg acggcgagcg tgtgagccgc agccgcgaga agcacgccct gctggagggc 240  
cgtaccaagg agctgggcta cacgggtgag aagcatctgc aggacctgac cggccgtatc 300  
tcccgtgctc gtgaattcac cgacatctac ttctgcaaaa tcgaagtta gtaccgccg 360  
ccgtacctgg acaacgaaaa atctaacggt accatcatcc accgtgcgcg ttacaaactg 420  
ggttgggaac agctggaaca gtgcggttac ccggttcagc gtctggttgc gctgtacctg 480  
gcggcgcgctc tgtcttggaa ccaggttgac caggttatcc gtggttctga attcgacggt 540  
ggtaaacctt gggttgttat cgttgcgggt tctaaccggt ggtacaacta ccgtcaccag 600  
gcggacgcgt gccacgcgta ccagatcatc caccgtaacg gtatcccgga cgaacagatc 660  
gttgttatga tgtacgacga catcgcgtac tctgaagaca acccgacccc gggatatcgtt 720  
atcaaccgtc cgaacggtac cgacgtttac caggggtgtc cgaagacta caccggtgaa 780  
gacgttacc cgcagaactt cctggcggtt ctgcgtggtg acgcggaagc ggttaaagg 840  
atcggttctg gtaaagtctt gaaatctggt ccgcaggacc acgttttcat ctacttcacc 900  
gaccacggtt ctaccggtat cctggttttc ccgaacgaag acctgcacgt taaagacctg 960  
aacgaaacca tccaactacat gtacaaacac aaaatgtacc gtaaaatggt tttctacatc 1020  
gaagcgtgcg aatctggttc tatgatgaac cacctgccgg acaacatcaa cgtttacgcg 1080  
accaccgcg cgaaccgcg tgaatcttct tacgcgtgct actacgacga aaaacgttct 1140  
acctacctgg gtgactggta ctctgttaac tggatggaag actctgacgt tgaagacctg 1200  
accaaagaaa ccctgcacaa acagtaccac ctggttaaat ctcacaccaa cacctctcac 1260  
gttatgcagt acgtaacaa aacctctct accatgaaag ttatgcagtt ccagggtatg 1320

# I763065

aaacgtaaag cgtcttctcc ggttccgctg ccgccggta cccacctgga cctgaccccg 1380

tctccggacg ttccgctgac catcatgaaa cgtaaacctga tgaacaccaa cctcgagaaa 1440

gacgaactga aggatgagct caaagacgaa ctg 1473

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種重組融合蛋白，包括：

受體相關蛋白 1，位在所述重組融合蛋白的 N-端；

分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域融合多胜肽，位在所述受體相關蛋白 1 的 C 端；

天冬氨酸內肽酶蛋白，位在所述分化簇 28-假單胞菌外毒素 A 轉位結構域融合多胜肽的 C 端；以及

標靶胜肽，位在所述天冬氨酸內肽酶蛋白的 C 端。

【請求項2】如請求項1所述的重組融合蛋白，其中所述重組融合蛋白包括SEQ ID NO：1的胺基酸序列。

【請求項3】如請求項1所述的重組融合蛋白，其中所述重組融合蛋白包括由SEQ ID NO：2的核苷酸序列所編碼的胺基酸序列。

【請求項4】如請求項1所述的重組融合蛋白，其中所述天冬氨酸內肽酶蛋白為人類重組蛋白。

【請求項5】如請求項1所述的重組融合蛋白，其中所述標靶胜肽為內質網保留序列。

【請求項6】一種免疫原組合物，用於在罹癌的受試者中誘導特異性免疫反應，所述免疫原組合物包括：

如請求項 1 所述的重組融合蛋白；以及

佐劑，

其中所述癌為天冬氨酸內肽酶過度表達癌，所述受試者包括人類和非人類的哺乳類動物。

【請求項7】如請求項6所述的免疫原組合物，其中所述佐劑包括CpG寡聚去氧核苷酸或基於皂苷佐劑。

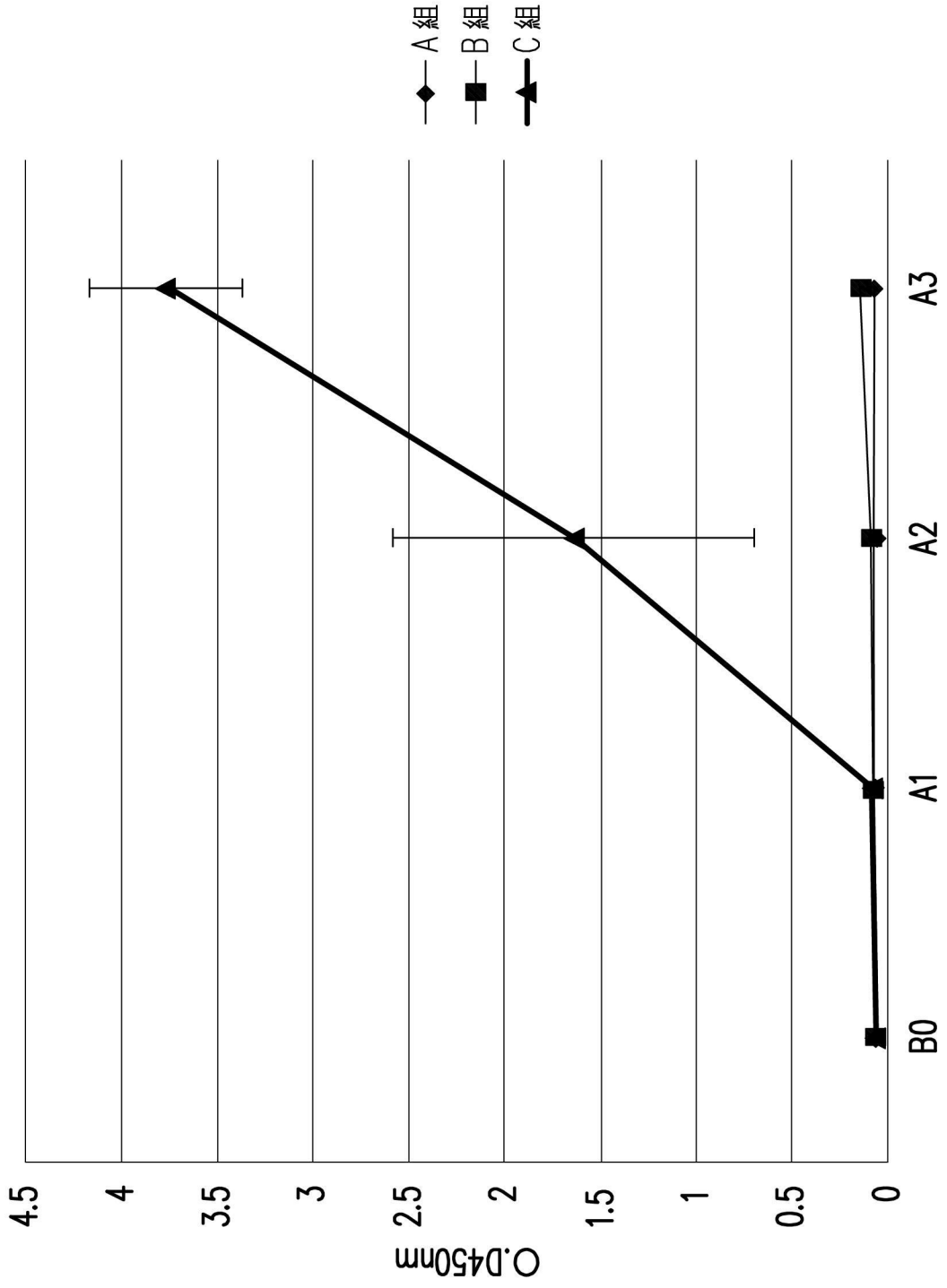
【請求項8】如請求項7所述的免疫原組合物，其中所述CpG寡聚去氧核苷酸的濃度為0.2毫克/毫升。

【請求項9】如請求項7所述的免疫原組合物，其中所述基於皂苷佐劑的濃度為0.2毫克/毫升。

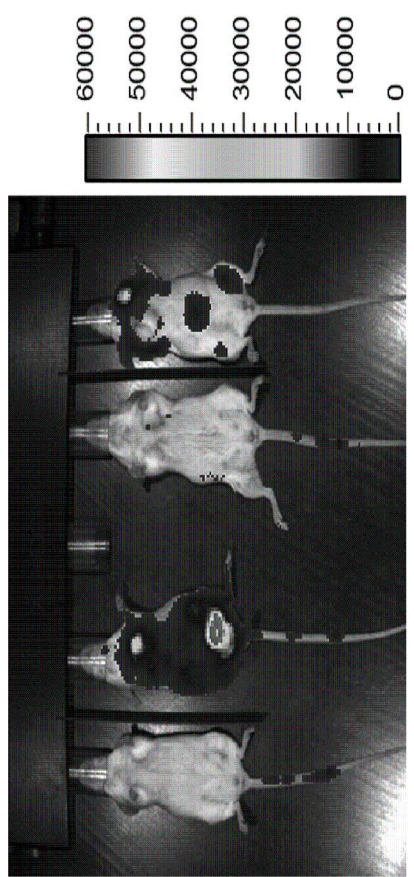
【請求項10】如請求項6所述的免疫原組合物，其中所述重組融合蛋白與所述佐劑的重量比為1：1至12.5：1。

【請求項11】如請求項6所述的免疫原組合物，其中所述天冬氨酸內肽酶過度表達癌包括乳腺癌、乳腺腫瘤、前列腺癌、胃癌、大腸直腸癌、卵巢癌或黑色素瘤。

【發明圖式】

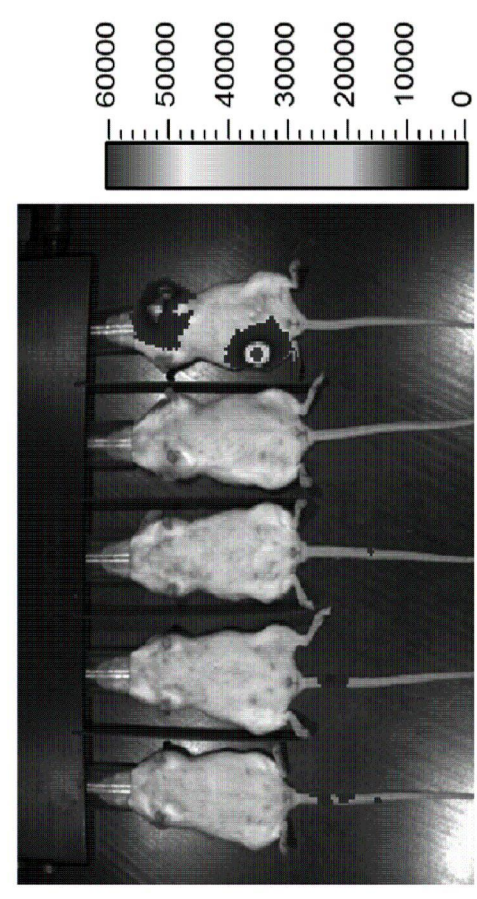
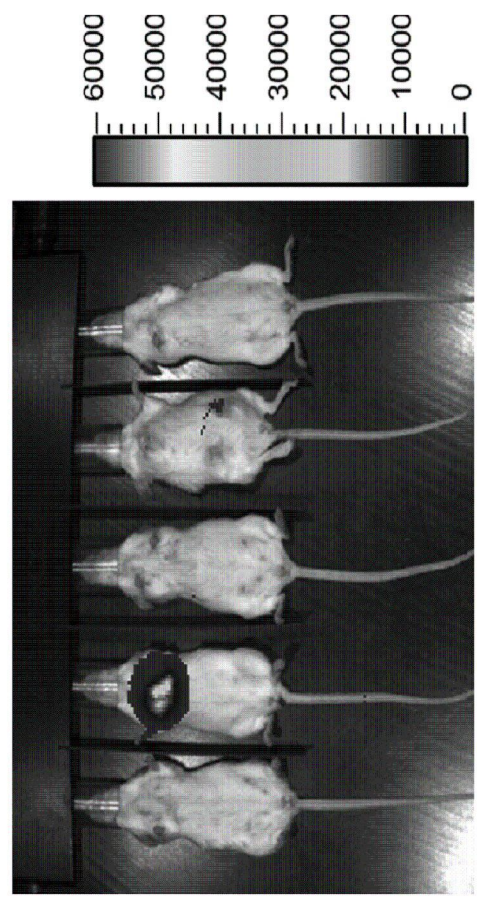


【圖1A】

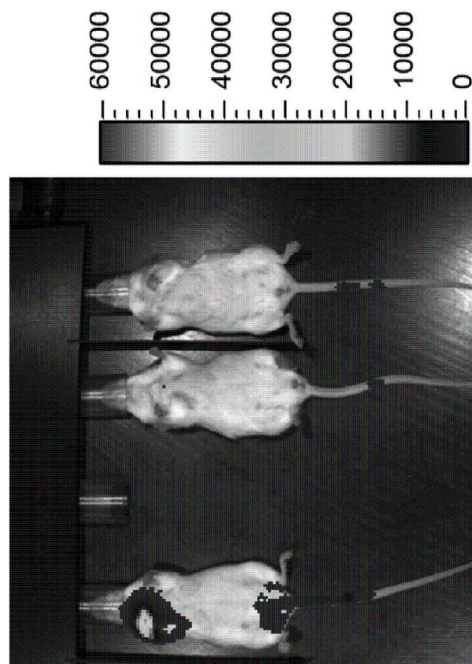


【圖1B】

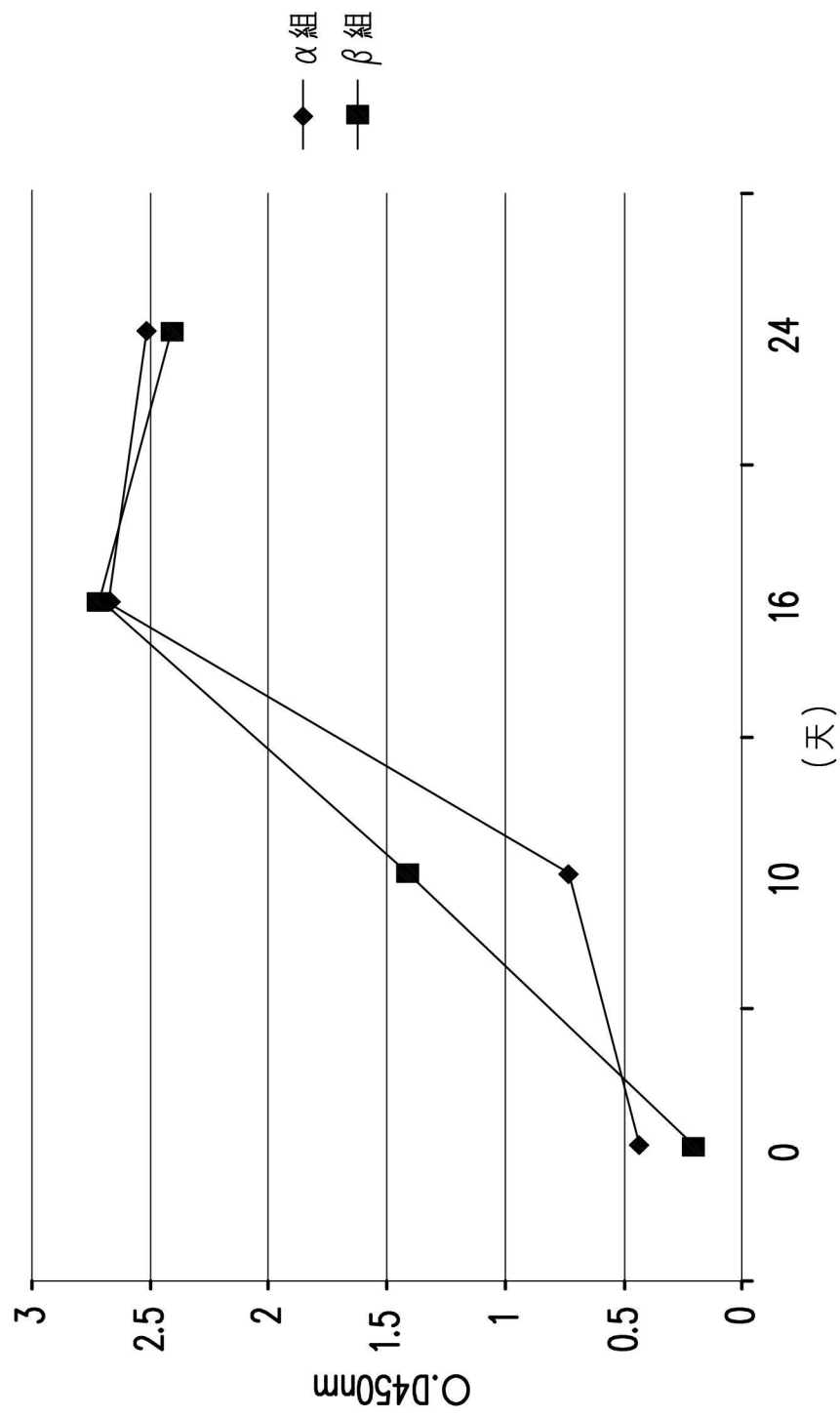




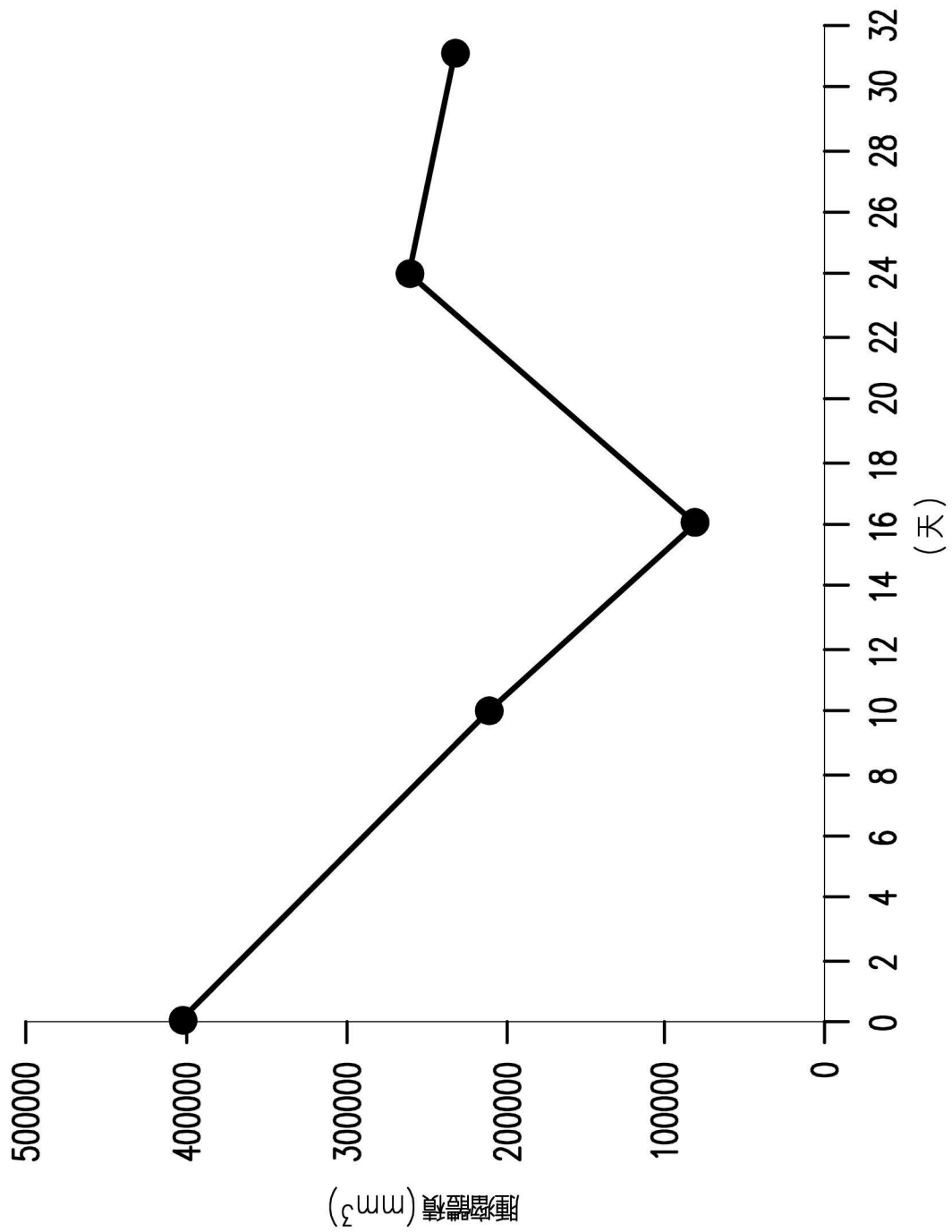
【圖1C】



【圖1D】



【圖2A】



【圖2B】