



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108864261 A

(43)申请公布日 2018. 11. 23

(21)申请号 201810569310.3

(51) Int. Cl.

(22)申请日 2012.11.21

C07K 14/28(2006.01)

(30)优先权数据

C07K 14/47(2006.01)

61/563,128 2011.11.23 US

C07K 14/475(2006.01)

61/654,401 2012.06.01 US

C07K 14/48(2006.01)

C07K 14/485(2006.01)

(62)分案原申请数据

C07K 14/495(2006.01)

201280067891.1 2012.11.21

C07K 14/50(2006.01)

(71)申请人 拜奥文斯瑞有限公司

C07K 14/65(2006.01)

地址 百慕大群岛哈密尔顿

C07K 14/71(2006.01)

申请人 基思·艾伦·查尔顿 E·德杭特

C12N 9/12(2006.01)

C12N 9/64(2006.01)

(72)发明人 基思·艾伦·查尔顿 E·德杭特

A61K 39/00(2006.01)

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

A61P 35/00(2006.01)

代理人 王子晔 姚开丽

权利要求书4页 说明书24页 附图30页

(54)发明名称

重组蛋白及其治疗用途

(57)摘要

一种重组蛋白,该重组蛋白在免疫原性表达上或在免疫原性表达内表达一种或多种人类生长因子、肿瘤抗原和/或受体或其表位,从而产生重组蛋白。其中,一个或多个表位存在于在其天然构象的序列的表面上。以合适的内部位置或在末端作为单一表达或作为两个或更多个串联重复,可在编码序列内表达生长因子、肿瘤抗原和/或受体序列。

NSDSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	人类
NSDSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	黑猩猩
NSDSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	猕猴
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	棕鼠
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	黑鼠
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	小鼠
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	野猪
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	猫
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	狗
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	马
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	斑胸草雀
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	鸡
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	青蛙
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	斑马鱼
NSDPSGECFLSHDGYCLNDGCMYIEALDKYACNCVVGVIIGERCQYRDLKWNWELR	文昌鱼

1. 一种重组蛋白,包括:  
多肽序列;和  
顺着所述多肽序列表达生长因子的至少一部分的序列。
2. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其中,所述多肽序列含有免疫原性的多肽序列。
3. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其中,所述多肽序列含有霍乱毒素B蛋白。
4. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其中,所述生长因子含有表皮生长因子。
5. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有表皮生长因子的B-环。
6. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有生长因子的中和结构域。
7. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有下列生长因子中的一种或多种的全长或其部分:含有但并不限于IGF-1、IGF-2、FGF1、FGF2、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF、NGF、EGF、HGF、BMP1-6和IL1-6。
8. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中存在的至少两种不同的生长因子的全长或中和结构域。
9. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有在所述蛋白中作为单一结构域或作为两个或更多个串联重复的一种或多种生长因子的全长或中和结构域。
10. 根据权利要求1所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分或该生长因子的中和结构域通过肽“间隔区”与剩余的合成蛋白隔离开。
11. 根据权利要求10所述的重组蛋白,其中,所述肽“间隔区”部分地包括生长因子或该生长因子的中和结构域。
12. 根据权利要求10所述的重组蛋白,其中,所述肽“间隔区”含有一个或多个宿主T-细胞表位。
13. 一种制备多价分子的方法,包括:  
从单体亚单元组装多聚体以形成合成蛋白,所述合成蛋白含有一种或多种生长因子或其部分。
14. 一种制备疫苗制剂的方法,包括:  
将一种或多种单一的单价多聚体混合在一起制备含有合成蛋白的多价疫苗,所述合成蛋白含有一种或多种生长因子或其部分。
15. 一种治疗患者的方法,包括:  
在疫苗接种期间,在同一日或隔日或间隔一定时间将一种或多种单价体、一种生长因子、合成蛋白独立地给予所述患者。
16. 一种重组蛋白,包括:  
多肽序列;和  
顺着所述多肽序列表达肿瘤抗原的至少一部分的第一序列。
17. 根据权利要求16所述的重组蛋白,其中,所述多肽序列含有免疫原性的多肽序列。
18. 根据权利要求16所述的重组蛋白,其中,所述多肽序列含有霍乱毒素B蛋白。
19. 根据权利要求16所述的重组蛋白,其中,所述肿瘤抗原是前列腺特异性抗原。

20. 根据权利要求16所述的重组蛋白,其中,所述肿瘤抗原的所述至少一部分含有下列肿瘤抗原中的一种或多种的全长或其部分:含有但并不限于PSA及其它的肿瘤抗原。

21. 根据权利要求20所述的重组蛋白,其中,所述肿瘤抗原的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中存在的两种至四种不同的肿瘤抗原的全长或一部分。

22. 根据权利要求20所述的重组蛋白,其中,所述肿瘤抗原的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中作为单一表位或作为两个或更多个串联重复的一种或多种肿瘤抗原的全长或一部分。

23. 根据权利要求16所述的重组蛋白,进一步包括顺着所述多肽序列表达生长因子的至少一部分的第二序列。

24. 根据权利要求23所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有下列生长因子中的一种或多种的全长或其部分:含有但并不限于IGF-1、IGF-2、FGF1、FGF2、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF、NGF、EGF、HGF、BMP1-6和IL1-6。

25. 根据权利要求24所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中存在的两种至四种不同的生长因子的全长或中和部分。

26. 根据权利要求24所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中作为单一表位或作为两个或更多个串联重复的一种或多种生长因子的全长或中和部分。

27. 根据权利要求24所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分或该生长因子的中和部分通过肽“间隔区”与剩余的合成蛋白隔离开。

28. 根据权利要求27所述的重组蛋白,其中,所述肽“间隔区”部分地包括生长因子或该生长因子的中和部分。

29. 根据权利要求27所述的重组蛋白,其中,所述肽“间隔区”含有一个或多个T-细胞表位。

30. 根据权利要求16所述的重组蛋白,进一步包括顺着所述多肽序列表达受体的至少一部分的序列。

31. 根据权利要求30所述的重组蛋白,其中,所述受体的所述至少一部分含有下列受体中的一种或多种的全长或其部分:含有但并不限于人类表皮生长因子受体2、人类表皮生长因子受体3和其它的受体。

32. 根据权利要求31所述的重组蛋白,其中,所述受体的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中存在的两种至四种不同的受体的全长或一部分。

33. 根据权利要求31所述的重组蛋白,其中,所述受体的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中作为单一表位或作为两个或更多个串联重复的一种或多种受体的全长或一部分。

34. 一种重组蛋白,包括:

多肽序列;和

顺着所述多肽序列表达受体的至少一部分的第一序列。

35. 根据权利要求34所述的重组蛋白,其中,所述多肽序列含有免疫原性的多肽序列。

36. 根据权利要求34所述的重组蛋白,其中,所述多肽序列含有霍乱毒素B蛋白。

37. 根据权利要求34所述的重组蛋白,其中,所述受体的所述至少一部分含有下列受体中的一种或多种的全长或其部分:含有但并不限于人类表皮生长因子受体2、人类表皮生长

因子受体3和其它的受体。

38. 根据权利要求37所述的重组蛋白,其中,所述受体的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中存在的两种至四种不同的受体的全长或一部分。

39. 根据权利要求37所述的重组蛋白,其中,所述受体的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中作为单一表位或作为两个或更多个串联重复的一种或多种受体的全长或一部分。

40. 根据权利要求34所述的重组蛋白,进一步包括顺着所述多肽序列表达生长因子的至少一部分的第二序列。

41. 根据权利要求40所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有下列生长因子中的一种或多种的全长或其部分:含有但并不限于IGF-1、IGF-2、FGF1、FGF2、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF、NGF、EGF、HGF、BMP1-6和IL1-6。

42. 根据权利要求41所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中存在的两种至四种不同的生长因子的全长或中和部分。

43. 根据权利要求41所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中作为单一表位或作为两个或更多个串联重复的一种或多种生长因子的全长或中和部分。

44. 根据权利要求41所述的重组蛋白,其中,所述生长因子的所述至少一部分或该生长因子的中和部分通过肽“间隔区”与剩余的合成蛋白隔离开。

45. 根据权利要求44所述的重组蛋白,其中,所述肽“间隔区”部分地包括生长因子或该生长因子的中和部分。

46. 根据权利要求44所述的重组蛋白,其中,所述肽“间隔区”含有一个或多个T-细胞表位。

47. 根据权利要求40所述的重组蛋白,进一步包括顺着所述多肽序列表达肿瘤抗原的至少一部分的第三序列。

48. 根据权利要求47所述的重组蛋白,其中,所述肿瘤抗原是前列腺特异性抗原。

49. 根据权利要求47所述的重组蛋白,其中,所述肿瘤抗原的所述至少一部分含有下列肿瘤抗原中的一种或多种的全长或其部分:含有但并不限于PSA和其它的肿瘤抗原。

50. 根据权利要求49所述的重组蛋白,其中,所述肿瘤抗原的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中存在的两种至四种不同的肿瘤抗原的全长或一部分。

51. 根据权利要求49所述的重组蛋白,其中,所述肿瘤抗原的所述至少一部分含有在所述合成蛋白中作为单一表位或作为两个或更多个串联重复的一种或多种肿瘤抗原的全长或一部分。

52. 一种制备多价分子的方法,包括:

从单体亚单元组装多聚体以形成重组蛋白,所述重组蛋白含有生长因子或其部分、肿瘤抗原或其部分以及受体或其部分中的至少一种。

53. 一种制备疫苗制剂的方法,包括:

将一种或多种单一的单价多聚体混合在一起来制备含有重组蛋白的多价疫苗,所述重组蛋白含有生长因子或其部分、肿瘤抗原或其部分以及受体或其部分中的至少一种。

54. 一种治疗患者的方法,包括:

在疫苗接种期间,在同一日或隔日或间隔一定时间将一种或多种单价重组蛋白独立地

给予所述患者,所述单价重组蛋白含有生长因子或其部分、肿瘤抗原或其部分以及受体或其部分中的至少一种。

## 重组蛋白及其治疗用途

[0001] 本申请是2012年11月21日递交的申请号为201280067891.1,发明名称为“重组蛋白及其治疗用途”的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及重组蛋白用于治疗疾病的领域。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求于2011年11月23日递交的名称为“免疫原性的合成重组蛋白”的美国专利申请序列号61/563,128的优先权,以及于2012年6月1日递交的名称为“免疫原性的合成重组蛋白”的美国专利申请序列号61/654,401的优先权,这两个申请通过引用而整体并入本申请中。

### 背景技术

[0005] 癌症免疫学是对免疫系统和癌细胞(例如,肿瘤或恶性肿瘤)之间的相互作用的研究。免疫应答的启动,诸如癌症特异性抗原的识别是特别重要的,其中,癌症特异性抗原由人类肿瘤表达并且在正常组织中是不表达的。通常,控制恶性细胞分裂和增殖的方法是分离这些抗原并呈递这些抗原,从而使它们作为异己抗原而被免疫系统识别到并引起特异性免疫应答。

[0006] 目前,存在大量经鉴定的生长因子,并且还已经证实了该经鉴定的生长因子的大部分(即使不是全部)除了与其它疾病病症相关之外,还是各种癌症中细胞增殖的重要介质。通常,生长因子是可溶性血清蛋白,其识别并结合位于细胞表面的一组生长因子受体。特定生长因子可能对单一受体具有特异性,或可与多种密切相关的受体结合,且该结合具有不同的亲和力。同样,一些受体仅结合单一生长因子配体,而其它受体可与通常具有不同亲和力的多个相关的生长因子结合。在与其天然受体相结合时,受体的胞浆区被磷酸化,并且该磷酸化将启动细胞内的信号级联,从而导致对一个或多个基因转录的调节以及最终通过细胞周期和细胞增殖进行。

[0007] 生长因子和它们的受体是生物体生长、发育和修复的正常过程中的基本组分,并且它们的组织分布概况和表达水平紧密调控细胞的生长。许多研究表明生长因子能够在体内和体外刺激多种细胞类型的增殖(Cohen S.,Carpenter G.,PNAS USA(美国)72,1317,1975,Witsch E等人:Physiology:25(2):85-101,(2010))。此外,已经表明某些生长因子刺激一些癌细胞株的增殖,例如表皮生长因子(EGF)能够刺激非小细胞肺癌细胞的增殖(Osborne C.K.等人.Can Res.40,2.361(1980))。其它生长因子,诸如血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)和血小板衍生生长因子(PDGF)在若干肿瘤学疾病中是重要的,这些肿瘤学疾病诸如非小细胞肺癌(NSCLC)(Ballas MS,Chachoua A.,Onco Targets and Therapy:4,43-58(2011))、前列腺癌(Cox ME等人;Prostate 69(1):33-40(2009))和乳腺癌(Law J等人,Cancer Res;68,24:10238-10346(2008))。

[0008] 已经报道在恶性组织中的各种生长因子受体的高水平。例如,在表皮源的恶性肿

瘤,诸如肺癌、乳腺癌、膀胱癌、卵巢癌、阴道癌、结肠癌、肺部癌、脑癌和食道癌中检测到异常高水平的表皮生长因子受体(EGFR)。生长因子及其受体在调控肿瘤生长中所起的作用是未知的,但是暗示肿瘤细胞中生长因子受体的表达提供自分泌生长刺激机制,从而导致不受控的增殖(Schlessinger J.,Schreiber A.B.,Levi A.,Lieberman T.,Yarden Y.Crit.Rev.Biochem.1983,14(2)

[0009] 93-111)。此外,Liao Y等人(Hum Pathol 36(11):1186-1196(2005))和Cox ME等人(Prostate:69(1)33-40(2009))描述了增加的胰岛素(Insular)受体和生长因子在转移性前列腺癌中所起的作用。

[0010] 在癌症治疗中,靶向生长因子信号传导的一种治疗方案已经使用了被动免疫治疗法,诸如利用针对相关的特定受体/多种受体的单克隆抗体。这些研究已经证实通过受体抗体的特异性识别能够抑制配体的结合,从而对恶性细胞的促细胞分裂具有抑制效果(SATO J.D.,等人.Methods in Enzymology,第146卷pp63-81,1987)。然而,鼠源性抗体通常将会引起人类抗小鼠抗体的应答(HAMA),因而限制了它们的单一给药。

[0011] 其它治疗方案已经使用了利用疫苗的主动免疫治疗法,其中疫苗包含感兴趣的生长因子,以诱导针对该分子的免疫应答,从而抑制该生长因子对肿瘤的增殖影响。例如,Davila等人的题为Vaccine Composition Comprising Autologous Epidermal Growth Factor or a Fragment or a Derivative Thereof having Anti-tumor Activity and use Thereof in the Therapy of Malignant Diseases(具有抗肿瘤活性的包括自体表皮生长因子或其片段或其衍生物的疫苗组合物及其在治疗恶性疾病中的应用)的美国专利号5,984,018,中公开了一种疫苗的用途,该疫苗包含利用戊二醛化学偶联在一起的生长因子和免疫原性(即,非人类)载体蛋白的混合物。然而,在不受任何特定理论限制的情况下,认为化学偶联阻碍了针对疫苗的免疫应答。

[0012] 因为它需要宿主对“自身抗原”产生免疫反应,而脊椎动物的免疫系统已经进化到了防止这种反应的发生,所以这是在技术上具有挑战的方法。在对自身抗原产生强烈的免疫应答时,通常导致例如辅助型T细胞的激活、自身免疫疾病状态。多年来,已经假设了一些自体免疫疾病,例如,狼疮、多发性硬化(MS)、糖尿病等可能是由于较早地暴露于环境因素所引起的,这些环境因素包括紧密模拟宿主自身-表位的免疫原性表位(T-细胞表位)。这可能导致与宿主表位进行交叉反应的辅助型T细胞的刺激。稍后暴露于环境因素可能导致抗自身免疫应答(Albert,L.J.,和Inman,R.D New England Journal of Medicine,Dec.30<sup>th</sup> pp2068-2074,1999)。已证实了病毒抗原确实能够产生针对神经细胞蛋白的抗自身的免疫应答(Levin,M.C.等人.,Nature Medicine第8卷(5)pp 509-513,2002)。

[0013] Casimiro等人题为Method for Treatment of Malignant and Infectious Chronic Diseases(治疗恶性且传染性慢性疾病的方法)('654公开)的美国专利公布号2006/0251654中公开了一种治疗患恶性或传染性慢性疾病受试者的方法,包括:利用疫苗对受试者进行免疫的方法,该疫苗包含与恶性或传染性慢性疾病相关的自身抗原,该自身抗原与载体蛋白相偶联;利用免疫调节剂对受试者进行治疗;以及利用步骤1的疫苗和选自氢氧化铝和Montanide ISA 51(Seppic(赛比克),巴黎,法国)的合适的佐剂来对受试者再次进行免疫。遗憾地是,认为通过化学偶联制备的疫苗阻碍了免疫应答。

[0014] 上述的大多数疫苗均表现出有一定的限制,这些限制的产生主要来自于制作方法

和潜在缺乏一致性和同源性的蛋白产物。上述疫苗通常包括由利用戊二醛化学偶联的重组载体蛋白和人源多肽的混合物。遗憾地是,该反应性试剂能够在各种化学基团之间不期望地形成共价交联键,并且通常导致形成高度异质的产物。因此,所得到的疫苗可能不仅包括载体蛋白分子,该载体蛋白分子还附接有不同数目(例如,0、1、2、3等)的靶人类多肽;该人类多肽均能经由不同的原子附接至载体,而且能够在不同位置且以不同取向附接至载体。此外,靶多肽和载体蛋白分子可偶联至它们自身,从而产生多种同源多聚体,该多种同源多聚体可能不具有临床效应并且可能不在患者中产生抗癌的免疫应答。

## 发明内容

[0015] 本公开针对多种重组蛋白及其相应的制备方法;重组蛋白的特征及利用重组蛋白治疗慢性疾病,诸如肺癌、乳腺癌、膀胱癌、前列腺癌、卵巢癌、外阴癌、结肠癌、直肠癌、小肠癌、肺部癌症、脑癌、食道癌、其它癌症或其它疾病的治疗方法。

[0016] 在示例性实施方式中,重组蛋白是免疫原性蛋白分子,该免疫原性蛋白分子表达折叠成物理结构的一种或多种序列,例如,表达来自于霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)的霍乱毒素B(CT-B)蛋白或合成等价体的一个或多个序列,以及表达来自于人类生长因子的一个或多个表位的一个或多个序列。生长因子或其部分的表达可以作为单一抗原以串联的方式存在于多个位点处,和/或在每个位点作为较长链的抗原分子存在。

[0017] 在另一示例性实施方式中,重组蛋白是免疫原性蛋白分子,该免疫原性蛋白分子表达折叠成物理结构的一种或多种序列,例如表达来自于霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)的霍乱毒素B蛋白(CT-B)或合成等价体的一个或多个序列,以及表达一种或多种肿瘤抗原或其部分的一个或多个序列。重组蛋白也可含有一种或多种生长因子或其部分的一个或多个序列,和/或一种或多种受体或其部分的一个或多个序列。

[0018] 在另一示例性实施方式中,重组蛋白是免疫原性蛋白分子,该免疫原性蛋白分子表达折叠成物理结构的一种或多种序列,例如表达来自于霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)的霍乱毒素B蛋白(CT-B)或合成等价体的一个或多个序列,以及表达一种或多种受体或其部分的一个或多个序列。重组蛋白也可含有一种或多种生长因子或其部分的一个或多个序列,和/或一种或多种肿瘤抗原或其部分的一个或多个序列。

[0019] 在这些示例性实施方式中,肿瘤抗原或其部分、受体或其部分和/或生长因子或其部分的表达可以作为单一抗原或受体以串联的方式存在于多个位点处,和/或在每个位点以较长链的抗原分子或受体的方式存在。

[0020] 在示例性实施方式中,肿瘤抗原的序列可含有前列腺特异性抗原(PSA)或其部分的序列。在示例性实施方式中,受体的序列可含有人类表皮生长因子受体2(Her2)或其部分的序列,和/或人类表皮生长因子受体3(Her3)或其部分的序列。

[0021] 在示例性实施方式中,生长因子的序列可含有表皮生长因子(EGF)的序列或EGF的合适的编码区域的序列,该编码区域包括在重组蛋白内一个或多个位置的EGF的中和结构域。在其它示例性实施方式中,生长因子的序列可含有下列生长因子和/或替代自身抗原中一种或多种的全长或其部分:例如但并不限于EGF、IGF-1、IGF-2、FGF、TGF- $\beta$ 、TGF- $\alpha$ 、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF、NGF、EGF、HGF、BMP1-6(BMP<sup>1</sup> s1-6)和IL1-6(IL<sup>1</sup> s1-6)。在本公开的范围内可以预期的是生长因子可选自人源或非人源。在本公开的范围内可进一步预



期的是所述生长因子的序列可基本相似于人类生长因子或非人类生长因子,或所述序列可包含其功能部分。此外,重组蛋白可含有其它序列的一种或多种表达,该其它序列可在重组免疫原性蛋白序列内功能性模拟生长因子的部分或全部。在一个实施方式中,额外的侧翼残基也可被表达或被添加至最小的序列,从而使分子的整个中和结构域以天然构象的形式存在,并且容易地被呈递至免疫系统的细胞。

[0022] 在本公开的上下文中,“中和结构域”被定义为特异性结合对(例如生长因子及其同源受体)中的任一成员的区域或两个成员的区域,其中不是该特异性结合对的成员的第三分子与上述区域的结合将防止该特异性结合对的两个成员的后续结合。第三分子可为含有但并不限于抗体的其它蛋白分子,或者可为小的非蛋白分子,并且其来源可以是天然的或合成的。中和结构域通常将含有特异性结合对的成员在结合过程中直接接触的那些区域,并且还将含有上述区域外的区域,第三分子在该区域的结合引入了足够的空间位阻以防止特异性结合对的成员的直接结合。

[0023] 在本领域中公认地是,通过受体的结合位点和配体的特定分子标志(表位)之间的相互作用来确定配体被其同源受体特异性识别。因此结合到受体结合位点或者锁定在受体结合位点的抗体,或结合到配体的识别表位或者锁定在配体的识别表位的抗体将防止配体-受体的相互作用。这样的抗体被描述为“中和”。在本公开的上下文中,期望在给予重组蛋白时,通过宿主产生中和抗体,并且因此蛋白序列可表达或含有一种或多种源自生长因子或肿瘤抗原的全部序列或适当序列,从而使受体结合所需的表位存在于功能性(原生)构象中。

[0024] 除了表达单一肿瘤抗原、受体和/或生长因子的多拷贝,在每个物理位点以单一肿瘤抗原、受体和/或生长因子或其部分存在,和/或作为重复肿瘤抗原、受体和/或生长因子序列的链存在(例如, $n=1$ 或大于1)之外;根据本公开,该蛋白也可含有在重组蛋白的序列内的不同位置以单一形式或链的形式存在的两个或更多个不同的肿瘤抗原、受体或生长因子的一个或者多个表位或结合位点的表达。

[0025] 所得到的蛋白质可为表达在重组蛋白序列内的肿瘤抗原、受体和/或生长因子或它们的一个或多个表位或其结合位点的单一多肽。在示例性的实施方式中,重组蛋白的序列表达CT-B序列的一个或多个部分并且在天然构象的重组蛋白的表面上存在肿瘤抗原、受体、和/或生长因子表达或它们的表位或结合位点的一个或者多个的表达。

[0026] 在另一示例性实施方式中,公开了一种制备蛋白制剂的方法。在该示例性实例方式中,该方法包括将一种或多种单一单价单体或者多价单体组装在一起;制备含有重组蛋白的多价疫苗,该重组蛋白含有一种或者多种肿瘤抗原、受体和/或生长因子或它们的部分。

[0027] 在又一示例性实施方式中,公开了一种用于治疗患者的方法。在该示例性实施方式中,该方法包括在疫苗接种期间,以同一日或隔日或间隔一定时间的方式将一种或多种单价体或多价体、一种肿瘤抗原、受体和/或生长因子、合成蛋白单独给予患者。

[0028] 在进一步的示例性实施方式中,公开了一种用于治疗患者的方法。在该示例性实施方式中,该方法包括将在药学可接受的载体中的一种或多种单价疫苗或者多价疫苗、一种肿瘤抗原、受体、和/或生长因子、合成蛋白给予患者,其中药学可接受的载体含有促进免疫应答的佐剂。

## 附图说明

[0029] 本公开所述的实施方式例示在附图中,是示例性而非限制性的,其中相似的附图标记用于表示相似或相应的部分,并且其中:

[0030] 图1示出了一些生物体的EGF分子的序列和结构的表;

[0031] 图2示出了含有EGF中和结构域的人类EGF分子的结构实施方式;

[0032] 图3示出了含有EGF中和结构域的EGF分子的半胱氨酸对的简化线结构的实施方式;

[0033] 图4示出了以正确构象存在EGF中和结构域的EGF分子的最小序列的实施方式;

[0034] 图5示出了表达EGF中和结构域的改性合成分子的结构实施方式;

[0035] 图6示出了与rHuEGF结合的mAb10825和mAb10827的柱状图,且光密度(OD)是在450nm下测量的;

[0036] 图7示出了在与源自中和结构域的游离的可溶性肽竞争下,与rHuEGF结合的mAb 10825和mAb 10827的柱状图;

[0037] 图8示出了抗-EGF中和结构域的mAb 10827与直接吸附在ELISA板上的6种EGF-CT-B合成蛋白结合的线型图;

[0038] 图9示出了抗-EGF中和结构域的mAb 10827与通过兔抗CT-B抗体捕获的6种EGF-CT-B合成蛋白结合的线型图;

[0039] 图10示出了在天然(未经煮沸的)条件,6种单价合成EGF-CT-B蛋白进行SDS-凝胶电泳,并且使用抗-CT-B抗体进行检测的蛋白印迹(Western blot);

[0040] 图11示出了抗-EGF中和结构域的mAb10827与合成EGF-CT-B蛋白结合的线型图,该合成EGF-CT-B蛋白含有两个全长的EGF序列(E2)或两个部分的EGF序列(B2);

[0041] 图12示出了二价合成EGF-CT-B蛋白进行的非变性SDS-PAGE凝胶电泳的Western印迹;

[0042] 图13示出了含有两个全长EGF序列(有下划线)和CT-B序列(斜体)的合成蛋白序列;

[0043] 图14示出了含有两个EGF中和结构域序列(有下划线)和CT-B序列(斜体)的合成蛋白序列;

[0044] 图15示出了含有两个EGF分子的部分序列(有下划线)和CT-B序列(斜体)的合成蛋白序列,该两个EGF分子的部分序列含有Cys6到Cys31的EGF中和结构域;

[0045] 图16示出了显示出PH值变化对天然CT-B蛋白的多聚化影响的Western印迹。在凝胶分析之前,将在凝胶右侧上的样品在所示pH下孵育5分钟。在凝胶分析之前,将在凝胶左侧上的样品在所示的pH下孵育5分钟,随后中和回至pH7.0保持1小时;

[0046] 图17示出了含有表达EGF和CT-B的序列的T1-T6、E2和B2构建体的表;

[0047] 图18示出了E2构建体和B2构建体的Western印迹;

[0048] 图19示出了含有表达EGF和CT-B的序列的构建体E2、E2N和E2C;

[0049] 图20示出了含有EGF和CT-B的序列并且包含延长的氨基酸接头的构建体;

[0050] 图21示出了E2、E2N和E2C构建体的Western印迹;

[0051] 图22示出了含有延长的氨基酸接头的许多N-末端构建体的Western印迹;以及

[0052] 图23示出了含有延长的氨基酸接头的许多C-末端构建体的Western印迹。

[0053] 图24示出了含有IGF1(有下划线)、EGF(有下划线和斜体)和CT-B序列(斜体)的合成蛋白序列;

[0054] 图25示出了捕获ELISA的柱型图,该捕获ELISA证实在单一重组蛋白上同时存在IGF、EGF和CTB序列。柱A和柱B被抗-EGF抗体捕获,而柱C被抗-IGF抗体捕获。对蛋白的检测如下:A为抗-CTB,B为抗-IGF和C为抗-CTB;

[0055] 图26示出了含有Hu-IGF1序列(有下划线)和CT-B序列(斜体)的合成蛋白序列;

[0056] 图27示出了捕获ELISA的柱型图,其中检测IGF-CTB和EGF-CTB的异聚体。所有样品均含有在CTB的C-末端的IGF。样品A和样品B含有在CTB的C-末端的EGF,而样品B和样品D包括在CTB的N-末端EGF。样品A和样品B被抗-EGF抗体捕获并且检测IGF,而样品C和样品D被抗-IGF抗体捕获并且检测EGF;

[0057] 图28(a-e)示出了合成蛋白序列,其a)含有CT-B序列(斜体)和TGF- $\beta$ 1的生长因子序列(有下划线)的合成蛋白序列,b)含有含有CT-B序列(斜体)和FGF2的生长因子序列(有下划线)的合成蛋白序列,c)含有CT-B序列(斜体)和HGF(NK1)的生长因子序列(有下划线)的合成蛋白序列,d)含有CT-B序列(斜体)和IGF1/2的生长因子序列(有下划线)的合成蛋白序列以及e)含有CT-B序列(斜体)和VEGF-A/C的生长因子序列(VEGF-C序列用下划线和斜体标出)的合成蛋白序列;

[0058] 图29示出了多种嵌合重组蛋白的捕获ELISA的柱型图,其中嵌合重组蛋白含有源自一种或多种生长因子的序列和CTB的序列。在每种情况下,重组蛋白被对于该重组蛋白的序列特异性的抗体捕获,然后被对如下不同序列具有特异性的抗体检测:

[0059] HGF和TGF  $\beta$ 1被 $\alpha$ -HGF抗体和 $\alpha$ -TGF  $\beta$ 1抗体捕获,并且检测CTB;

[0060] FGF2被 $\alpha$ -CTB抗体捕获并且检测FGF2;

[0061] VEGF A/C被(i)  $\alpha$ -VEGF-A抗体和(ii)  $\alpha$ -VEGF-C抗体捕获并且在这两种情况下都检测CTB;

[0062] 在两种情况下IGF1/2被 $\alpha$ -IGF1抗体捕获,并且被(i)  $\alpha$ -CTB抗体和(ii)  $\alpha$ -IGF2抗体检测;

[0063] 图30示出了根据图28a的天然重组TGF  $\beta$ 1-CTB蛋白的SDS-PAGE凝胶电泳的Western印迹,证实了初级五聚体重组蛋白的存在;

[0064] 图31示出了合成蛋白序列,其中,a)含有TGF- $\beta$ 1序列(有下划线)和CT-B(斜体)的合成蛋白序列以及b)含有TGF-Beta2受体配体结合结构域序列(下划线)和CT-B序列(斜体)的合成蛋白序列;

[0065] 图32示出了包含TGF-Beta-R2序列和CTB序列的重组蛋白的捕获ELISA的柱型图。该图证实了这两个序列能够在两个方向上同时结合而不产生偏差。

[0066] 图33示出了包含源自TGF- $\beta$ 的序列和CTB的序列的重组蛋白能够与包含源自TGF $\beta$ 受体2和CTB配体结合结构域的序列的重组蛋白相结合;

[0067] 图34示出了免疫接种后,以1/100稀释的第1组小鼠血清对r-IGF的IgG抗体应答;

[0068] 图35示出了免疫接种后,以1/100稀释的第2组小鼠血清对r-EGF的IgG抗体应答;

[0069] 图36示出了免疫接种后,以(a) 1/100稀释和(b) 1/8稀释的第3组小鼠血清对r-EGF的IgG抗体应答;

[0070] 图37示出了免疫接种后,以(a) 1/100稀释和(b) 1/8稀释的第3组小鼠血清对r-IGF的IgG抗体应答;

[0071] 图38示出了免疫接种后,以(a) 1/100稀释和(b) 1/8稀释的第4组小鼠血清对r-EGF的IgG抗体应答;

[0072] 图39示出了免疫接种后,以(a) 1/100稀释和(b) 1/8稀释的第4组鼠血清对r-IGF的IgG抗体应答;

[0073] 图40示出了免疫接种后,以1/8稀释(除了样品178以1/100稀释)的第5组小鼠血清对r-IGF的IgG抗体应答;

[0074] 图41示出了免疫接种后,以1/100稀释的第6组小鼠血清对a) r-IGF和b) rHu-EGF的IgG抗体应答;

[0075] 图42示出了单-神经节苷脂GM1、霍乱毒素亚单元B的天然结合伴侣的结构;

[0076] 图43示出了市售D-半乳糖共轭到固相支撑体(Pierce公司)的结构;以及

[0077] 图44示出了来源于使用CTB表达载体转化的三株大肠杆菌细胞菌株的培养液上清(培养基)的rCTB纯化的SDS-PAGE凝胶电泳,如下:第一泳道显示的是蛋白大小的标记物(size marker),第2、5和8泳道显示的是原培养液上清。泳道3、6、9显示的是原周质馏分。泳道4、7和10显示了被洗脱纯化的CTB。泳道11显示的是通过IMAC纯化的带组氨酸-标签的CTB。

### 具体实施方式

[0078] 在此公开了本重组蛋白或疫苗的详细实施方式,然而,应当要理解的是,所公开的实施方式仅为示例性的,其可能以各种形式来体现。因此,在此所公开的特异功能性细节不应被解释为限制,而是仅仅作为权利要求的基础,并作为用来教导本领域技术人员以各种方式来采用本文所公开的重组蛋白的有代表性的基础。

[0079] 本公开提供了一种同质的重组蛋白,用于改善作为免疫原性重组蛋白的元件存在的生长因子表位、肿瘤抗原表位和/或受体结合位点的最大数目。在一个示例性实施方式中描述了一种重组蛋白,该重组蛋白表达整个或部分的霍乱毒素B(CT-B)、人类表皮生长因子(EGF)、肿瘤抗原和/或受体。在替代的示例性实施方式中,蛋白可表达基于已知的免疫原性蛋白为模型的其它免疫原性重组蛋白。在本公开的范围内考虑地是:这样的重组蛋白将表达对人类免疫系统具有高度免疫原性的多肽。优选地,重组蛋白赋予嵌合蛋白额外的性质,例如,高表达率和易于制造、口服稳定性和跨过肠道进入血流的能力,和/或在人类中在先的安全使用(previous safe use)。

[0080] 在示例性实施方式中,本文所公开的重组蛋白可含有或表达作为总分子量的函数的高比例的蛋白序列,该蛋白序列源自靶点自身抗原。例如,这可通过利用包含多种生长因子表位的大蛋白模型来实现。这些生长因子表位可为单一生长因子的整体或部分的多个拷贝,或为多种不同生长因子的整体或部分的拷贝。

[0081] 根据本公开,生长因子表位的表达应进行折叠,以允许它们的天然构象被基本保留并呈递至宿主免疫系统的组分,从而激发对所述表位的强的宿主免疫应答。模拟重组蛋白的表位支撑结构域的合适的天然蛋白质模型的实例包括但不限于:霍乱毒素B亚单位、大肠杆菌热-不稳定LT和LT-II肠毒素B亚单元、肠毒、百日咳毒素、空肠弯曲菌肠毒素、志贺

毒素、李斯特菌毒素、破伤风类毒素、白喉类毒素、脑膜炎奈瑟菌外膜蛋白、噬菌体外壳蛋白、腺病毒及其它病毒外壳蛋白。或者，蛋白质的非己组分可能是小的。作为最低限度，非己序列在长度上应包括约9、10、11或更多个氨基酸，并含有至少一个人类T-细胞表位的全部或部分。或者，可使用非天然的“合成”多肽，满足为整个蛋白赋予免疫原性的要求，并且允许将生长因子、受体、肿瘤抗原或它们的表位适当地呈递至宿主免疫系统。

[0082] 在示例性实施方式中，表位支持结构域无论是源自天然重组蛋白或源自合成的重组蛋白均应当具有在适当的化学/环境条件下自组装成寡聚多聚体的能力，或在替代的条件下被还原为单体的能力。理想情况下，多聚化结构域将与少量的亚-单元，例如二聚物、三聚物、四聚物、五聚物等组装成稳定的多聚体，以便于产生均一大小的产物。天然多肽的实例包括但并不限于：亮氨酸拉链 (leucine zipper)，乳糖阻遏蛋白 (Lac repressor protein)、链霉亲和素/抗生物素蛋白、霍乱毒素B亚单元、其它AB<sub>5</sub>毒素的B亚单元、假单胞菌三聚化结构域，和病毒衣壳蛋白。

[0083] 根据本公开，重组蛋白无论是生长因子或其部分、细胞受体或其部分、肿瘤抗原或其部分均涉及到参与慢性疾病或癌症的生长因子和受体的广泛的细胞通路，且涉及到利用在所述合成蛋白内的肿瘤抗原的实体瘤的尽可能广泛的范围。该蛋白为重组蛋白的形式，并且可以用于治疗慢性疾病，例如，乳腺癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、外阴癌、结肠癌、肺动脉癌、脑癌、结肠癌、结肠直肠癌、头颈癌和食管癌。由于在所述疾病中可表达不同的肿瘤抗原并且过表达多种细胞受体和生长因子，下文所述的蛋白可包含与疾病相关的一种或多种不同的肿瘤抗原，一或多个细胞通路的一种或多种不同的受体或生长因子。这些蛋白被称为“多价体”。

[0084] 在示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白，所述均质重组蛋白表达一种或多种表皮生长因子 (EGF) 中和结构域。该蛋白为重组蛋白的形式，并且可用于治疗慢性疾病，例如，乳腺癌、肺癌、膀胱癌、卵巢癌、外阴癌、结肠癌、肺动脉癌、脑癌、结肠直肠癌、头颈癌和食道癌。在示例性实施方式中，该蛋白是表达或含有EGF序列和CT-B序列的重组蛋白。

[0085] 在另一示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白，所述均质重组蛋白表达一种成纤维细胞生长因子 (FGF)。在示例性实施方式中，该蛋白是表达或含有FGF序列和CT-B序列的重组蛋白。

[0086] 在进一步的示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白，所述均质重组蛋白表达一种转化生长因子-β1 (TGF-β1)。在示例性实施方式中，该蛋白是表达或含有TGF-β1序列和CT-B序列的重组蛋白。

[0087] 在又一示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白，所述均质重组蛋白表达一种转化生长因子-β1 (TGF-β1)。在示例性实施方式中，该蛋白是表达或含有TGF-β1序列和CT-B序列的重组蛋白。

[0088] 在一个示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白，所述均质重组蛋白表达一种胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)。在示例性实施方式中，该蛋白是表达或含有IGF-1序列和CT-B序列的重组蛋白。

[0089] 在另一示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白，所述均质重组蛋白表达一种肝细胞生长因子 (HGF)。在示例性实施方式中，该蛋白是表达或含有HGF序列和

CT-B序列的重组蛋白。

[0090] 在进一步的示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白,所述均质重组蛋白表达一种胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 和一种胰岛素样生长因子-2。在示例性实施方式中,该蛋白是表达或含有IGF-1序列、IGF-2序列和CT-B序列的重组蛋白。

[0091] 在又一示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白,所述均质重组蛋白表达一种血管内皮生长因子-A (VEGF-A) 和一种血管内皮生长因子-C (VEGF-C)。在示例性实施方式中,该蛋白是表达或含有VEGF-A中和结构域序列、VEGF-C序列和CT-B序列的重组蛋白。

[0092] 为了确定表达和含有HuEGF的合适的编码区,对来自一些生物体的EGF分子的序列和结构进行分析。参考图1,描述了例示来自一些生物体的EGF分子的序列和结构的表。如图1所示,方框100涵盖了来自一些生物体的EGF分子序列的一部分,其代表EGF分子的中和结构域表位。虽然在不同物种的EGF分子的中和结构域表位之间存在显著量的保守性,但是在物种之间仍然存在很大的变异。值得注意的是,在体内研究中,一个中和结构域(被框起来的序列100)在灵长类动物之间是完全保守的,但在啮齿动物和其它物种中是不同的。类似地,EGF分子的不同序列等同于三级结构中的不同。

[0093] 参考图2,描述了根据示例性实施方式的人类EGF分子的结构,该人类EGF分子的结构含有EGF中和结构域。EGF分子包含6个半胱氨酸残基,含有Cys6、Cys14、Cys20、Cys31、Cys33和Cys42。这6个半胱氨酸残基在确定EGF分子的折叠是重要的。EGF中和结构域200(以反平行 $\beta$ -折叠片示出)被两个分离的二硫键连接的半胱氨酸对(Cys6-Cys20和Cys14-Cys31)限制。由于这两个二硫键连接的半胱氨酸对(Cys6-Cys20和Cys14-Cys31)限制了EGF分子的呈现处于正确构象的EGF中和结构域200的最小序列或最小肽,所以它们是重要的。

[0094] 参考图3,描述了根据示例性实施方式的EGF分子半胱氨酸对的简化线结构,其含有EGF的B-环200。如图3所示,Cys6被连接至Cys20,Cys14被连接至Cys31,且Cys33被连接至Cys42。EGF的B-环200定位在Cys20和Cys31之间。因此,如图4所示,EGF分子的呈现处于正确构象的EGF中和结构域200的最小序列或最小肽段400为从Cys6至Cys31的序列。

[0095] 参考图5,描述了根据本公开的表达EGF分子的至少一部分的改性重组蛋白分子的结构,其中EGF分子的至少一部分含有根据示例性实施方式的EGF中和结构域。对EGF分子的Cys33进行单一突变或改变以产生改性的合成分子,其中将Cys33改变为Ala33以移除Cys33,从而防止任何可能的错误折叠问题。

[0096] 使用丙氨酸是因为丙氨酸就功能特性而言是相当“中性的”,并且丙氨酸是除了甘氨酸之外具有最小侧链的氨基酸。因此,丙氨酸被认为是最不可能对改性重组蛋白带来任何非天然特性的残基。在本公开的范围内考虑的是,可使用潜在的任何其它残基,或甚至不对其进行任何改变。

[0097] 在示例性实施方式中,从残基Met21-Ala30限定的区域直至整个EGF序列,可使用EGF分子的任何部分。在实施例中,选择用于在重组EGF-CT-B蛋白中进行表达的序列含有所有的EGF序列以及认为正确呈现中和结构域(被限定为由本发明所使用的中和结构域)所需的独立区域,但并不含有EGF中认为对于实现这一过程来说不是必要的任何其它部分。

[0098] 在另一示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白,所述均质重组蛋白表达血管内皮生长因子-A (VEGF-A) 的中和结构域。在示例性实施方式中,该蛋白是表达

或含有VEGF-A序列和CT-B序列的重组蛋白。在示例性实施方式中,VEGF-A序列将含有中和结构域,该中和结构域包括成熟蛋白中从Cys57到Cys104的序列。在另一示例实施方式中,VEGF-A序列将含有延长直至Val114和Lys108的一个或多个侧翼残基。

[0099] 在另一示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白,所述均质重组蛋白表达TGF- $\beta$ 受体II的配体结合结构域。在示例性实施方式中,该蛋白是表达或含有TGFB-RII序列和CT-B序列的重组蛋白。TGFB-RII序列将含有胞外结构域中Thr23和Gln166之间的任何序列。

[0100] 在另一示例性实施方式中公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白,所述均质重组蛋白表达HGF受体(c-Met)的配体结合结构域。在示例性实施方式中,

[0101] 该蛋白是表达或含有HGF受体序列和CT-B序列的重组蛋白。优选地,HGF受体序列将含有胞外SEMA结构域中Lys27和Leu515之间的任何序列。

[0102] 实施例I:ELISA方案

[0103] 为了确定重组蛋白,例如根据本公开的合成EGF-CT-B蛋白是否能够以正确的构象展示EGF的B-环,获得两种可商购的单克隆抗体(Santa Cruz Antibodies(圣克鲁斯抗体),目录号10825和10827),这两种单克隆抗体已知能阻断EGF与EGF受体的结合。在不受任何特定理论限制的情况下,假设与EGF受体结合的许多来源部分是经由残基Met21-Ala30所限定的区域来实现的。

[0104] 在示例性实施方式中,在ELISA中,1 $\mu$ g/ml和2 $\mu$ g/ml浓度的mAb 10825和mAb 10827用于与重组EGF(rEGF)蛋白相结合,并且在450nm处测量光密度(OD)。参考图6以柱型图例示了该结果。如图6所示,当rEGF被吸附在ELISA板上时,rEGF保留其天然构象,且1 $\mu$ g/ml的mAb 10825或mAb 10827足以获得良好的信号。

[0105] 为了评估残基Met21-Ala30的识别,利用约1 $\mu$ g/ml的蛋白(rEGF)以约100 $\mu$ l/孔来涂覆板,随后将该板在约37 $^{\circ}$ C下孵育约1小时。该板利用约200 $\mu$ l/孔的PBS-0.5%Tween(吐温)(PBST)洗涤两次,然后用约200 $\mu$ l的PBS洗剂两次。该板利用200 $\mu$ l/孔的PBS-2%奶粉(MPBS)对进行封闭,并且在约37 $^{\circ}$ C孵育约1小时。然后,如上所述该板利用PBST洗涤两次并且用PBS洗涤两次。加入约100 $\mu$ l约1 $\mu$ g/ml或约2 $\mu$ g/ml的测试抗体,并在约室温(RT)下孵育约1小时。再次如上所述洗涤该板。再次加入以约1/1000稀释的约100 $\mu$ l/孔的抗体(HRP-标记的抗小鼠Fc特异性抗体,Sigma(西格玛)产品编号A0168),并在约室温下孵育约1小时。再次如上所述洗涤该板,并且利用约100 $\mu$ l/孔的Sureblue TMB底物进行显影直至显色(通常约5-10分钟)。通过加入约50 $\mu$ l/孔的1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>来终止反应,并在约450nm处读取该板。

[0106] 此外,进行竞争性结合ELISA。在第二ELISA中,在对应于感兴趣的表位的游离可溶性肽(肽序列MYIEALDKYA)或对照无关的肽(肽序列SLAGSSGALSK)的存在下,来评估mAb 10825和mAb 10827中的每一种与rEGF的结合。通过以下物质以100 $\mu$ g/孔来进行ELISA:约1 $\mu$ g/ml的mAb 10825加1 $\mu$ g/ml的对应于靶表位的游离可溶性肽,约1 $\mu$ g/ml的mAb 10827加约1 $\mu$ g/ml游离可溶性肽Met21-Ala30,约1 $\mu$ g/ml的mAb 10825加约1 $\mu$ g/ml对照无关的肽,以及约1 $\mu$ g/ml的mAb 10827加约1 $\mu$ g/ml的对照无关的肽。

[0107] 在450nm处测量光学密度(OD)。参考图7以柱型图例示了该结果。如图7所示,对于mAb 10825和mAb 10827两种抗体,清楚地是mAb 10827抗体与Met21-Ala30中和表位结合,而mAb 10825并不与Met21-Ala30中和表位结合。mAb 10825抗体可能是借助于以下过程进

行中和的：通过阻断EGF中在构象上最接近残基Met21-Ala30所限定的区域，空间上 (stearically) 阻碍受体的结合。因此，mAb 10827抗体与在其天然状态下的rEGF中和表位Met21-Ala30结合，并且用在合成EGF-CT-B疫苗前体的后续分析中。

[0108] 实施例II：EGF中和表位的呈现

[0109] 为了确定在CT-B序列末端表达EGF的重组蛋白EGF-CT-B疫苗是否干扰或影响EGF结构域的任何期望的固有特性，尤其是否干扰或影响EGF的Met21-Ala30表位的正确构象的呈现，以及是否干扰或影响CT-B单体在合适的物理-化学条件下组装成多聚体(五聚体环)的能力，而创建了6种重组蛋白，这6种重组蛋白在CT-B序列的N-末端(测试1至测试3)或C-末端(测试4至测试6)表达整个EGF编码区。

[0110] 测试1和测试4含有在CT-B结构域上直接表达全长EGF序列的重组蛋白EGF-CT-B疫苗。测试2和测试5含有合成的EGF-CT-B疫苗，该合成的EGF-CT-B疫苗表达通过短的3氨基酸肽序列而与CT-B结构域隔离的全长EGF序列。在N-末端表达EGF序列的重组蛋白EGF-CT-B疫苗含有SerGlyGly作为3氨基酸肽序列，并且含有KpnI限制性内切位点。在C-末端表达EGF序列的重组蛋白EGF-CT-B疫苗含有SerSerGly作为3氨基酸肽序列，并且含有XhoI限制性内切位点。

[0111] 测试3和测试6含有重组蛋白EGF-CT-B，该重组蛋白EGF-CT-B表达通过短的5氨基酸肽序列而与CT-B结构域隔离的全长EGF序列。在N-末端表达EGF序列的重组蛋白EGF-CT-B含有GlyGlySerGlyGly作为5氨基酸肽序列，并且含有KpnI限制性内切位点。在C-末端表达EGF序列的合成EGF-CT-B含有SerSerGlyGlyGly作为5氨基酸肽序列，并且含有XhoI限制性内切位点。短的3氨基酸肽序列和短的5氨基酸肽序列均用于表示从CT-B序列至生长因子结构域的距离，并且也允许一个结构域相对于另一结构域移动的自由度，从而降低任何潜在的空间位阻。

[0112] 将6种重组蛋白EGF-CT-B中的每一种都克隆到细菌表达载体(pIMS147)中，从而使合成的重组EGF-CT-B蛋白能够在大肠杆菌周质中进行表达，并通过包含的C-末端6xHis标签进行纯化。每种重组EGF-CT-B序列进行表达、纯化，并凭借蛋白凝胶/Bradford(布雷福德)测定法来进行量化。

[0113] 用ELISA法确定了EGF中和表位Met21-Ala30在六种重组EGF-CT-B蛋白的每一种中的呈现。将含有一个末端EGF结构域的重组EGF-CT-B蛋白固定在ELISA板上。用mAb 10827抗体(Santa Cruz)来检测EGF的Met21-Ala30表位。

[0114] 将连续2倍稀释的合成的EGF-CT-B 6-His纯化蛋白涂覆在ELISA板上，并在约37°C孵育约1小时。如上所述，将板进行洗涤并使用约2%的MPBS进行封闭。洗涤涉及利用移液管将约200 $\mu$ l的PBS或PBST吸移到各个孔中，翻转板并轻拍以清空孔，并且重复该操作。然后将1 $\mu$ g/ml的mAb10827抗体加入到所有的孔中，并在约室温下孵育约1小时。再一次洗涤该板，并将抗小鼠的辣根过氧化物酶(HRP)加入到孔中并将板再孵育约1小时。将板再次洗涤，并使用SureBlue TMB进行显色。

[0115] 当加入SureBlue TMB底物时，偶联第二抗体的HRP酶与底物进行酶促反应以产生蓝色产物。观察并监测该反应直到确定该颜色强度已经达到足够的水平。(如果颜色开始出现在不含第一抗体的对照孔中，则使反应终止在这一点上)。通过加入约50 $\mu$ l的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>破坏HRP活性来终止该反应。它也使反应产物颜色从蓝色变为黄色。然后可以用酶标仪(plate



reader) 测量在约450nm处的吸光度。

[0116] 参考图8,以线型图示出了结合ELISA的结果。如图8所示,mAb10827抗体能够结合所有6种重组EGF-CT-B 6-His的纯化蛋白,从而证实在每种制剂中,EGF-Met21-Ala30表位均以其天然构象存在并且可易于被呈递至免疫系统的组分。

[0117] 为了证实合成的重组EGF-CT-B蛋白含有EGF结构域和CT-B序列的表达,而进行第二ELISA。通过第二ELISA,并不使重组蛋白直接吸附在板上,而是使用兔抗CT-B抗体(Antibodies On-Line(在线抗体))来捕获所述重组蛋白(如图9所示)。由于该“捕获”抗体对天然CT-B是特异性的,因此该测定证实了所检测的EGF中和结构域是较大重组蛋白的组成部分,该较大重组蛋白含有正确折叠CT-B结构域。

[0118] 实施例III:EGF-CT-B蛋白的多聚体组装

[0119] 为了检验表达在CT-B衍生重组蛋白的末端包括生长因子的结构域对单体-亚单元组装成多聚体的影响,在天然条件(非还原,未经煮沸)下,使合成蛋白测试1至测试6在SDS-PAGE凝胶上进行电泳。然后通过电印迹将合成的重组EGF-CT-B蛋白转移至硝酸纤维素膜上,并且利用兔抗-CT-B抗体进行探测(如实施例II所述)。经由自显影膜上的ECL底物发射的光来检测HRP标记的第二抗兔抗体的结合。如图10所示,Western印迹证实了高分子量CT-B的存在,这表明合成的EGF-CT-B单体蛋白能够经由CT-B结构域组装成多聚体。

[0120] 在独立的实验中,在pH值为1.0至7.0范围内一系列不同的pH值下,将天然(未经煮沸或非还原的)CT-B蛋白的复制样品孵育5分钟。孵育后,将每种复制样品中和回pH 7.0保持一小时。然后使所有样品在SDS-PAGE凝胶上进行电泳,Western印迹,并利用抗-CTB抗体来检测蛋白(图16)。这证实了i) CTB五聚体在pH 3.0或以下能够在5分钟内被还原成单体,并且ii) 在返回到中性pH值时复原五聚体的形式。先前已经证实了能够制得嵌合蛋白以形成有功能活性的五聚体,该嵌合蛋白包括融合到骆驼抗体结合位点的CT-B蛋白和经由合适的接头(~16kDa的分子量)融合的标签,可将该嵌合蛋白制成形成具有功能活性的五聚体(Li等人.,2009Molecular Immunology 46:1718-1726)。

[0121] 实施例IV:二价的合成EGF-CT-B蛋白

[0122] 在示例性实施方式中创建了两种额外的合成重组EGF-CT-B蛋白,其中i) 在CT-B基因的N-末端和C-末端均表达全长EGF基因,该全长EGF基因通过如上文测试-2和测试-5所述的3氨基酸序列与CT-B基因隔离开,并用“E2”来表示;或者ii) 在如上述的CT-B基因的两个末端均表达含有Met21-Ala30中和表位的截短的EGF,并用“B2”来表示。将两种重组蛋白克隆到上述的大肠杆菌表达载体pIMS147中。如前所述,表达并纯化这两种重组的EGF-CT-B蛋白,并检测正确折叠的CT-B结构域的存在和处于正确构象的EGF中和表位Met21-Ala30的呈现。参考图11,以线型图示出了该结果。如图11所示,E2重组EGF-CT-B蛋白和B2重组EGF-CT-B蛋白均包括CT-B结构域和展示的至少一个功能性正确的EGF Met21-Ala30表位,从而可易于被呈递至抗体。

[0123] 进一步分析涉及在不首先煮沸样品的情况下,使纯化的E2重组EGF-CT-B蛋白和B2重组EGF-CT-B蛋白的样品在pH7.0下在非变性SDS-PAGE凝胶上进行电泳,并通过电转印转移到硝酸纤维素膜上。利用AbOL(Antibodies On-Line)抗CT-B兔多克隆抗体和HRP标记的抗兔抗体来检测所转移的蛋白。如图12所示,Western印迹表明含CT-B结构域重组蛋白既作为单体存在,并且还形成了一系列包括二聚体,三聚体,四聚体和五聚体的低聚多聚体。

[0124] 实施例V:EGF-CT-B蛋白序列

[0125] 图13示出了合成的重组EGF-CT-B蛋白序列的一个实例。如图13所示,样品序列示出了含有2个全长EGF序列(有下划线)以及CT-B序列(斜体)的合成蛋白质序列。

[0126] 实施例VI:EGF-CT-B蛋白序列

[0127] 图14示出了合成的重组EGF-CT-B蛋白序列的另一实例。如图14所示,样品序列示出了含有2个EGF中和结构域序列(有下划线)以及CT-B序列(斜体)的蛋白序列。

[0128] 实施例VII:EGF-CT-B蛋白序列

[0129] 图15示出了重组EGF-CT-B蛋白序列的又一实例。如图15所示,样品序列示出了含有EGF分子的含有EGF中和结构域(Cys6至Cys31)的部分序列(有下划线)和CT-B序列(斜体)的蛋白序列。

[0130] 实施例VIII:含有接头的EGF-CT-B蛋白序列

[0131] 在其它示例性实施方式中,本文公开了含有一个或多个接头或间隔区的额外的重组EGF-CT-B蛋白。上述一个或多个实施方式含有在CT-B的一个或两个末端处与CT-B融合的EGF,从而使得一个基因直接进入下一个基因。这些得到的重组蛋白或嵌合蛋白基本上含有与CT-B直接融合的EGF。在其它示例性实施方式中,嵌合蛋白的EGF组成部分和CT-B组成部分被3个氨基酸或5个氨基酸有效地隔离开,该3个氨基酸或5个氨基酸在两个结构域之间形成了灵活的间隔区或接头。以下氨基酸可用作接头:包括但不限于SSG、SSGG、SGG、GGSG和GGGS。

[0132] 接头的添加可降低例如来自空间位阻的干扰,并有助于通过CT-B结构域形成五聚体。该接头还能够在接头内引入唯一的限制性内切位点,从而允许对基因构建体进行后续操作。在该实施例中,描述了8种构建体(T1~T6、E2和B2),具有在图17示出的表中所列出的序列。在一个示例性实施方式中,限制性内切位点包括但不限于:Xho1、Kpn1、BspE1和Spe1。

[0133] 对构建体T1~T6、E2和B2进行Western印迹分析,并且结合图18进行了如下描述。如图18所示,构建体E2和构建体B2的Western印迹显示存在一些干扰,例如空间位阻和/或其它干扰,这导致了产生的蛋白包括多种低聚体,例如单体、二聚体、三聚体等。或者,所以样品中存在的蛋白浓度可能影响低聚反应,因为它是天然CTB五聚化一个依赖因素。

[0134] 在最低条带对应单体,再往上对应二聚体等。由于B2含有截断的EGF,因此看起来比E2小,这由B2在Western印迹上较低所示。

[0135] 尽管低聚体的数量和比例在构建体与构建体之间有变动,但在构建体T1~T6中也发现了类似的结果。起初,显示在含有氨基酸接头的N-末端具有EGF的蛋白可能产生高比例的五聚体。然而,随后发现五聚体的比例在批次与批次之间也有变动。

[0136] 由于最初假定在一个末端或另一末端处的融合有利于五聚化,因此除E2构建体之外,还构建了2个串联融合并示于图19。第一串联融合(用E2N表示)在CT-B的N-末端含有两个连续的EGF。其中,L-3是SGG,L-4是GSSG。第二融合(用E2C表示)在CT-B的C-末端含有两个连续的EGF,其中L-3是SSG,L-5是GGSGG。

[0137] 在示例性实施方式中,在N-末端和C-末端的氨基酸接头的长度进行延伸以确定在每一末端的氨基酸接头长度是否只产生五聚体,或者可能在一端(N末端或C-末端)产生较高比例的五聚体。参考图20,分别利用构建体T2/3和构建体T4/5延伸N-末端氨基酸接头和

C-末端氨基酸接头。附图(图20)指在C-末端融合的E2C。在该示例性实施方式中,L3是SSG,L5是SSGG,L8是SSGGSGG以及L10是SSGGSGGG。在N-末端的情况中,插入的接头间隔区的长度分别约为7个残基和9个残基。在该实施例中,4种接头将是:L3是SGG、L5是GGSGG、L7是TSGGGSG和L9是TSGGGSGG。每个接头-间隔区可被插入到每个较短的L3接头和L5接头中。因此,将L7插入到L5中或将L9插入到L3中都产生12个残基的接头,但是它们具有不同的序列,以下被称为‘a’和‘b’。如图20所示,N-末端的接头也延伸至10个、12个和14个氨基酸,并且C-末端延伸至11个、13个和15个氨基酸。在该示例性实施例中,L10是SSGGSGGSSG,L12a是GGSGGTSGGGSG,L12b是SGGTSGGGSGG,以及L14是GGSGGTSGGGSGG。类似地,L11是SSGGSGGSSG,L13a是SSGGSGGGSSG,L13b是SSGGSGGSSGGG以及L15是SSGGSGGGSSGGG。

[0138] 参考图21,与具有原始E2的原始二价构建体相比,串联EGF融合体(E2N和E2C)的Western印迹分析证实了E2和E2C均产生许多低聚体。E2N也产生低聚体,但是存在如下的较强的迹象:第一EGF结构域被表达为截短的蛋白,或在表达/纯化期间的某一阶段被裂解。

[0139] 对于具有延伸接头的单价“T”构建体还进行了比较Western印迹分析,并在图22中示出。当上述接头延伸被引入已命名为T2和T3的构建体(N-末端,分别为3个aa接头和5个aa接头)中时,我们得到了T2SL(短延伸的接头,即L10)、T2LL(长接头,L12a)、T3SL(短接头L12b)和T3LL(长接头L14)。类似地,N-末端T5构建体和T6构建体变为T5SL(具有L11)、T5LL(具有L13a)、T6SL(具有L13b)和T6LL(具有L15)。

[0140] 当插入接头间隔区时,实际上可以两个方向克隆该接头间隔区,从而产生完全不同的序列。在可能的情况下,对足够的克隆体进行测序,以找到以期望的方向插入的克隆体。在T3LL-Rev的情况下,最初我们仅仅具有包括期望接头长度(即14个aa)但以“错误”取向插入的克隆体。这有助于说明至少作为物理间隔区来说,这些接头的精确序列不一定是关键的。T3LL-Rev的实际接头序列将为GGSGGTRPSTAATS(下划线=反向部分)。

[0141] 在如图22中示出的Western印迹中,N和R分别指的是天然蛋白和还原/变性蛋白。前两个泳道示出作为五聚体(天然的)和单体(还原的)的野生型CT-B。如其它泳道中所示,可以看出在天然条件下进行电泳时,T3(含有5个氨基酸接头)产生一些不同大小的低聚体,但是所有具有较长接头的N-末端构建体均主要产生五聚体。

[0142] 与此相反,如图23所示,在天然条件下,甚至具有延伸接头的C-末端构建体的Western印迹也产生多个条带。

[0143] 基于该数据,与CT-B的EGF串联N-末端融合似乎是非常有趣的。此外,第一接头(在两个EGF结构域之间)可延伸以试图阻止如上所述的E2N构建体的截短/蛋白水解,并使得当引入替代的生长因子时具有灵活性。通过延伸第一接头与CT-B的N-末端融合的EGF的序列如下:

[0144] H H H H H H I E G R N S D S E C P L S H D G Y C L H D G V C M Y I E A  
L D K Y A C N C V V G Y I G E R C Q Y R D L K W W E L R G G S G G T S G G G G  
S G G T P Q N I T D L C A E Y H N T Q I H T L N D K I F S Y T E S L A G K R E  
M A I I T F K N G A T F Q V E V P G S Q H I D S Q K K A I E R M K D T L R I A  
Y L T E A K V E K L C V W N N K T P H A I A A I S M A N

[0145] 尽管在某些相关实施方式中,已经描述和示出了表达或并入EGF的B-环表位的均质重组蛋白,但是许多变型和修改对本领域技术人员来说应是显而易见,并且这些变型和

修改可在不背离本发明的精神和范围内进行。

[0146] 实施例IX:双特异性IGF1-EGF-CTB蛋白(a)。

[0147] 为了建立通过单一的合成重组蛋白靶定多种生长因子的可行性,合成了编码人胰岛素样生长因子1(IGF1)的基因,其含有短侧翼区以能够克隆到实施例VIII中所述的构建体E2N中。简言之,通过用限制性内切酶Nco1和Xho1消化DNA,将N-末端的EGF基因从载体上切除。然后用本领域技术人员熟悉的方法将其替换为进行相似消化的人类IGF1基因。对所得DNA载体进行测序,以证实它编码所需的重组基因,以允许重组蛋白按照设计的方式进行表达。图24中示出了新型重组蛋白的序列。

[0148] 随后,通过前述载体的表达所产生的蛋白经ELISA分析,以证实这两种生长因子能够同时被展示至哺乳动物免疫系统的组分(即抗体)。简言之,利用抗-CTB抗体的合适稀释液来涂覆ELISA板中的孔,并且随后如先前所述用含2%奶粉的PBS进行封闭。将重组蛋白的样品施加到板上并在室温下孵育1小时。洗涤后,上述制备的不同的孔径1/1000的(或根据供应商的建议)i)小鼠抗EGF抗体AbOL 10827或ii)兔抗-人类IGF1<sub>20</sub>抗体进行孵育。洗涤后,各孔径i)HRP-标记的抗小鼠抗体,或ii)HRP标记的抗兔抗体的合适的稀释液进行孵育,然后如前所述进行显影。如图25所示,产生的信号证实了IGF和EGF均以他们的天然构象展示。由于编码DNA序列在表达载体中的相对位置,抗-IGF抗体产生的信号还证实IGF、EGF和CTB序列存在于同一分子中。

[0149] 实施例X:双特异性IGF1-EGF-CTB蛋白(b)。

[0150] 为了证实利用CTB形成低聚体的天然特性能够产生双特异性重组蛋白,使用本领域技术人员熟悉的技术进行PCR来修改实施例IX中所述的IGF基因,以使其能够被克隆到T5构建体中,以替换EGF基因。所得到的重组蛋白含有融合到CTB序列C-末端的IGF序列,并且CTB序列和IGF序列通过3个氨基酸接头隔离开(图26)。

[0151] 将上述重组蛋白的样品与等(摩尔)量的i)T2蛋白和ii)T5蛋白独立地组合。通过加入所需的10mM的Tris-HCl缓冲液将每种混合物调节至pH为3.0,并在4°C下孵育15分钟以解离任何存在的低聚体。然后中和蛋白混合物,并继续孵育60分钟以促进低聚反应。为了检测异源低聚物的存在,使用小鼠抗-EGF抗体或兔抗-IGF抗体涂覆ELISA板的孔,并进行封闭。洗涤后,IGF-CTB/T2混合物和IGF-CTB/T5混合物被独立地施加到涂覆有抗EGF抗体或抗IGF抗体的孔中,并且在室温下孵育60分钟。

[0152] 洗涤后,加入对生长因子具有特异性但不被涂覆抗体靶定的抗体,并孵育60分钟。因此,兔抗-IGF抗体被施加到涂覆有小鼠抗-EGF抗体的孔中,反之亦然。在洗涤以去除未结合的<sub>20</sub>抗体之后,合适地施加HRP-标记的抗-小鼠抗体或HRP-标记的抗-兔抗体以靶定<sub>20</sub>抗体。结果示出在图27中,并且证实了抗-EGF的涂覆抗体能够捕获并且固定含IGF序列的蛋白。同样地,抗IGF抗体能够捕获并且固定含有EGF序列的蛋白。在这两种情况下,这是通过含IGF和EGF的单体发生低聚反应引起的,从而使得两者都存在。此外,当两种生长因子定位在CTB组分的相对末端(即IGF-CTB和T2)且当两种生长因子都在相同(C)末端(即IGF-CTB和T5)时,能够形成异源低聚物。在两种取向中该测定法均有效。

[0153] 实施例XI:多样生长因子的呈现。

[0154] 根据图28,为了进一步证实本发明的灵活性,使用本领域技术人员熟悉的标准技术生产一组重组蛋白,该组重组蛋白含有源自CTB的序列以及源自一系列生长因子的一种

或多种的额外序列,并且代表大小不同的一系列结构域。通过在大肠杆菌(*E. coli*)中表达基因构建体来制备每种蛋白的样品,并利用IMAC经由每种蛋白N-末端的6-组氨酸标签来纯化。通过ELISA来测定经纯化的重组蛋白以证实每种不同序列的存在,并使用针对每种序列的特异性抗体来确定每种序列的正确展示(图29)。天然蛋白与含有源自mTGF- $\beta$ 1和CTB的序列的重组蛋白的样品一起进行电泳,并且进行Western印迹(图30)。利用 $\alpha$ -CTB抗体来检测蛋白,并且表明在所使用的条件下,重组嵌合蛋白能够形成稳定的五聚体,保留了CTB的这一特性。

[0155] 实施例XII:生长因子受体的呈现

[0156] 为了证实本公开中所述的技术适用于除生长因子之外的蛋白的功能性展示,而生成含有源自生长因子受体和CTB的序列的重组蛋白,并且表明该重组蛋白以天然构象呈现与CTB序列偶联的这些序列。利用本领域技术人员熟悉的标准技术,通过从T3LL克隆体中替代编码EGF的DNA,而将编码人类TGF- $\beta$ 1蛋白序列的DNA克隆到CTB基因的上游。该构建体用于产生含有人类TGF- $\beta$ 1和CTB序列的重组蛋白(图31a)。同样地,产生第二重组蛋白,该第二重组蛋白含有人类TGF $\beta$ 受体2的胞外配体结合结构域和CTB的序列(图31b)。

[0157] TGF- $\beta$ 2和CTB序列在单一重组蛋白上的同时存在通过捕获ELISA来建立。简言之,利用i)小鼠抗-CTB抗体或ii)山羊抗-TGF $\beta$ 2抗体涂覆ELISA板的孔,并利用含奶粉的PBS进行封闭。随后使根据图31b的重组蛋白的样品分别与孔相接触,并孵育约1小时左右。随后进行洗涤,使孔分别与i)山羊抗-TGF $\beta$ 2抗体或ii)小鼠抗-CTB抗体相接触,并孵育1小时。随后进行洗涤,使孔分别与i)HRP-标记的抗-绵羊(山羊)抗体和ii)HRP-标记的抗-小鼠抗体相接触,并孵育约1小时。利用TMB底物使板进行显影并在450nm处测定颜色强度。该测定证实了TGF- $\beta$ 2序列和CTB序列均存在于同一嵌合重组蛋白中(图32)。

[0158] 为了证明TGF- $\beta$ 1和TGF- $\beta$ 2均独立地以天然构象与CTB一起存在,通过ELISA确定TGF- $\beta$ 1及其天然受体之间的相互作用。简言之,将ELISA板的孔涂覆小鼠抗-CTB抗体来进行封闭。然后将孔与如图31a所述的含人类TGF- $\beta$ 1和CTB的序列的重组蛋白相接触,并孵育约1小时。洗涤后,使孔与如图31b中所述的含人类TGF- $\beta$ 2和CTB的序列的重组蛋白相接触,并孵育约1小时。洗剂该孔,并且随后使孔与山羊抗-TGF- $\beta$ 2抗体接触1小时。最后,洗涤该孔,并使其与HRP标记的抗-绵羊(山羊)抗体接触约1小时。利用TMB底物使板进行显影,并在450nm读板。图33示出了两种重组蛋白能够再现天然受体-配体的结合作用,而且这并不被测定中所使用的抗-受体抗体的干扰。

[0159] 实施例XIII:小鼠对重组蛋白制剂的免疫应答

[0160] 在另一个实验中,用根据本公开的含有CTB序列和一种或多种生长因子的序列的重组蛋白对小鼠组进行接种,以评估不同制剂对所述小鼠的免疫应答的影响。六组小鼠按如下所述时间表用不同的重组蛋白质制剂进行免疫,每组包括六只小鼠。

[0161] 除非另有说明,小鼠用25 $\mu$ g重组蛋白进行接种,该重组蛋白在75 $\mu$ l缓冲液中且在75 $\mu$ l Montanide佐剂中经乳化。在第0天和第14天通过肌肉注射给予免疫原。在第0天(免疫前)和第28天采集血清样品,并且分析针对包含在免疫重组蛋白内的生长因子序列的IgG抗体的存在。用下列抗原对小鼠各组进行免疫:

[0162] 第1组:SB1,用75 $\mu$ l Montanide乳化的75 $\mu$ l (25 $\mu$ g)的重组蛋白,该重组蛋白含有根据图26的人类IGF序列和CTB序列;

[0163] 第2组:SB2,用75 $\mu$ l Montanide乳化的75 $\mu$ l (25 $\mu$ g)的重组蛋白,该重组蛋白如在实施例VIII中所述并称为T3LL且含有人类EGF序列和CTB序列;

[0164] 第3组:SB3,用75 $\mu$ l Montanide乳化的75 $\mu$ l (25 $\mu$ g)的重组蛋白,该重组蛋白如实施例IX所述并且含有根据图24的人类IGF序列、人类EGF序列和CTB序列;

[0165] 第4组:SB4,用75 $\mu$ l Montanide乳化的通过如实施例X中所述的方法组合的37.5 $\mu$ l (12.5 $\mu$ g) SB1和37.5 $\mu$ l (12.5 $\mu$ g) SB2,且含有IGF-CTB和EGF-CTB的低聚体;

[0166] 第5组:SB5,除了用20 $\mu$ l Matrix-M佐剂乳化之外,与第一组相同的75 $\mu$ l (25 $\mu$ g) SB1;以及

[0167] 第6组:SB6,给予用37.5 $\mu$ l Montanide乳化的37.5 $\mu$ l (12.5 $\mu$ g) SB1,5分钟之后给药用37.5 $\mu$ l Montanide乳化的37.5 $\mu$ l (12.5 $\mu$ g) SB2,并经由不同的位置给予。

[0168] 在免疫之前及免疫后14天采取血样,并通过ELISA分析血清中IgG抗体的存在和相对滴度,该IgG抗体针对重组蛋白免疫抗原的生长因子组分。用1 $\mu$ g/ml浓度的可商购的重组人类IGF或EGF涂覆ELISA板。封闭和洗涤之后,将来自受试小鼠的血清以各种稀释施加到孔中并在室温下孵育1小时。通过洗涤去除未结合的抗体和其它蛋白,并用HRP标记的抗-小鼠抗体检测结合的小鼠IgG。

[0169] 六组均含有对免疫原性重组嵌合蛋白的生长因子组分具有提高的特异性免疫应答的动物。明显地是,在所有的实验中(包括其中的序列仅含有来自一种生长因子的组)(第1组和第2组,图34和图35),EGF比IGF具有更强的应答。在不受任何特定理论的限制下,这可能是小鼠和人类蛋白之间的同源性程度的反映,据此,EGF的53个残基中有15个残基的不同,而IGF的70个残基仅有4个残基不同。还值得注意地是,在一组内的动物个体应答之间的差异经常是大于不同组间对相同抗原的差异。

[0170] 使用Matrix-M而不使用Montanide作为佐剂(第5组与第1组对比,图40和图34)导致较差的应答,其中一只小鼠完全没有应答,并且其它四个需要进行筛选的样品要具有比Montanide更高的浓度。

[0171] 第3、4和6组接受含有来自EGF和IGF序列的蛋白,区别在于制剂或给予。第3组小鼠,接受在每一蛋白分子上均含有EGF和IGF序列的重组蛋白质,尽管六只小鼠中的2只小鼠没有显示出 $\alpha$ -IGF应答,但是所有小鼠均产生对EGF的应答(图36和图37)。第4组和第6组的小鼠也都产生对EGF的抗体(图38、图39和图41)。在第4组中,一只动物对IGF没有应答,并且另一只仅产生了非常弱的应答。仅在第6组中,其中独立地给予含EGF的蛋白和含IGF的蛋白,所有六只动物均发动了对IGF的应答。

[0172] 实施例XIV:通用的单步纯化

[0173] 期望简单的第一阶段(first-stage)纯化过程,能够应用于在本公开中所详述的任何和全部的免疫原性重组蛋白。理想情况下,纯化将不需要包含亲和标签,诸如六-组氨酸、MBP、FLAG等。本公开的重组蛋白是相关联的,因为它们都含有源自霍乱弧菌CT-B毒素亚单元的至少一些序列,或合成功能性等价物。据设想,可以通过使用单克隆抗体或多克隆抗体实现该纯化,然而单克隆抗体的生产是昂贵。多克隆抗体则较便宜,然而在来自相同动物的不同批次之间和不同个体动物之间可能看到性能上的变化。免疫亲和纯化还需要严格的条件,诸如低pH值以洗脱靶蛋白,而低pH值可能对靶蛋白产生不利的影晌并且将限制亲和基质的重复使用。它也涉及将额外的蛋白引入到生产过程中,这是最好避免的。

[0174] 在天然的CT全毒素中,毒素与在大多数哺乳动物细胞(包括呼吸道和肠道的上皮细胞)表面上发现的单-神经节苷脂Gm1结合(图42)。CT-B亚单元影响结合,并且只有CT-B低聚体与Gm1结合。因此设想,固定在合适支撑体上的CTB可用于本公开的免疫原性重组蛋白的纯化。然而因为一些原因,并不认为使用CTB是优选的方法,尤其是因为CTB是唯一可商购的从牛脑中纯化的材料。动物材料的使用,特别是牛脑组织的使用是不适用于治疗产品的生产中。

[0175] 已知CTB与Gm1的结合涉及与两个相邻的CTB亚单元结合的在支链糖-分子GM1上的末端半乳糖基部分。因此设想,固定到合适固相支撑体上的半乳糖将提供纯化本公开的重组蛋白的通用手段。为了评估该途径的适用性,利用本领域技术人员熟悉的技术将编码CTB的基因克隆到被设计用于回收周质蛋白的细菌蛋白表达载体上,并转化到大肠杆菌的各菌株中。半乳糖-琼脂糖树脂(图43)来自Pierce(皮尔斯)(Pierce目录号20372)。CTB-表达克隆体的50ml培养物在XL1-Blue(蓝)、BL21和TG1大肠杆菌菌株中生长,并经诱导以表达重组CTB,在37°C过夜。通过离心收获细胞并且保留澄清的培养基以用来提取CTB。使用本领域技术人员熟悉的技术通过渗透休克法释放细胞团块的周质内容物,每一培养物产生10ml周质内容物。

[0176] 根据制造商的说明书,用pH为7.5的200mM NaCl、50mM Tris HCl、5mM EDTA(TEN缓冲液)洗剂半乳糖琼脂糖树脂。将NaCl、Tris-HCl pH7.5和EDTA加入到有条件的介质和周质馏分中,并且使终浓度为200mM NaCl、50mM的Tris-HCl和5mM EDTA。将0.5ml经洗涤的半乳糖琼脂糖加入到每一个有条件的培养基和周质馏分中,并在4°C下搅拌孵育2至3小时。将树脂回收BioRad(伯乐)柱中,并用30柱床体积(bed volume)的冰冷TEN缓冲液进行洗剂。结合的蛋白通过使树脂再悬浮在PBS中的0.5ml 1M的半乳糖中,并孵育10分钟而被洗脱。将柱子排空并保留洗脱液以用于分析。该洗脱步骤重复几次,并且分析馏分中CTB的存在。在培养物介质中发现几乎都表达有CTB蛋白。对预纯化的有条件的培养基样品和周质馏分的样品,与含经纯化的CTB(来自培养基)的集中的柱洗脱物一起,通过SDS-PAGE进行分析,并与通过IMAC纯化的His-标记的CTB相比较(图44)。可以看出,从所有三个菌株的培养物上清液中均获得了高度纯化的CTB,且XL1-Blue细胞获得了最高的产率(泳道4、7和10)。纯度与从IMAC纯化(泳道11)看到纯度相比较好,并且含有显著五聚体蛋白。

[0177] 额外的实施方式

[0178] 在另一示例性实施方式中,本文公开了一种疫苗,所述疫苗包括均质重组蛋白用来改善肿瘤抗原表位的呈现以及增加肿瘤抗原表位的数量,该肿瘤抗原表位作为合成免疫原性重组蛋白的元件。在一个示例性实施方式中,本文描述一种由重组蛋白形成的疫苗,该重组蛋白表达多肽序列和肿瘤抗原的全部或部分。

[0179] 在示例性实施方式中,作为总分子量的函数,本文所公开的重组蛋白可含有或表达源自肿瘤抗原和/或其表位的高比例的蛋白序列。这些肿瘤抗原表位可为单一肿瘤抗原的全部或部分的多拷贝,或可望多种不同肿瘤抗原的全部或部分的拷贝。

[0180] 在示例性实施方式中,重组蛋白是免疫原性蛋白分子,所述免疫原性蛋白分子表达折叠成物理结构的一个或多个序列,例如表达来自霍乱弧菌的霍乱毒素B(CT-B)蛋白的一个或多个序列或合成等价物,以及表达的一种或多种肿瘤抗原或其部分的一个或多个序列。

[0181] 在示例性实施方式中,肿瘤抗原的序列可含有前列腺特异性抗原(PSA)或其部分的序列。在其它示例性实施方式中,肿瘤抗原可含有以下肿瘤抗原中一种或多种的全长或其部分:包括但不限于,PSA和其它肿瘤抗原。

[0182] 在另一示例性实施方式中,本文公开了一种包括均质重组蛋白的蛋白,用于改善受体结合位点的呈现以及增加受体结合位点的数目,该受体结合位点作为合成免疫原性重组蛋白的元件。在一示例性实施方式中,本文公开了表达所有或部分多肽序列和受体的重组蛋白。

[0183] 在示例性实施方式中,作为总分子量的函数,本文所公开的重组蛋白可含有或表达源自受体和/或其结合位点的高比例的蛋白序列。这些结合位点可以为单一受体的全部或部分的多个拷贝,或为多个不同受体的全部或部分的拷贝。

[0184] 在示例性实施方式中,重组蛋白是免疫原性蛋白分子,所述免疫原性蛋白分子表达折叠成物理结构的一个或多个序列,例如表达来自霍乱弧菌的霍乱毒素B(CT-B)蛋白的一个或多个序列或合成等价物,以及表达一种或多种受体或其部分的一个或多个序列。

[0185] 在示例性实施方式中,受体的序列可含有人类表皮生长因子受体2(Her2)或其部分的序列,和/或人类表皮生长因子受体3(Her3)或其部分的序列。在其它示例性实施方式中,受体可含有以下受体中一种或多种的全长或其部分:含有但不限于Her2、Her3及其它受体。

[0186] 在其它示例性实施方式中,重组蛋白是免疫原性蛋白分子,所述免疫原性蛋白分子表达折叠成物理结构的一个或多个序列,例如表达CT-B或合成改性的变体的一个或多个序列,并表达一种或多种生长因子或其部分的一个或多个序列、一种或多种肿瘤抗原或其部分的一个或多个序列以及一种或多种受体或其部分的一个或多个序列的各种组合。

[0187] 在示例性实施方式中,重组蛋白含有一种或多种生长因子或其部分的表达或序列,及一种或多种肿瘤抗原或其部分的一个或多个序列的表达或序列。在一个实施方式中,重组蛋白含有CT-B或合成改性的变体,PSA或其部分,以及IGF-1或其部分的一个或多个序列。

[0188] 在另一示例性实施方式中,重组蛋白含有一种或多种生长因子或其部分的表达或序列,及一种或多种受体或其部分的一个或多个序列的表达或序列。在一个实施方式中,重组蛋白含有CT-B或合成改性的变体、Her2或其部分以及IGF-1或其部分的一个或多个序列。在另一实施方式中,重组蛋白含有CT-B或合成改性变型,Her2或其部分,以及PDGF或其部分的一个或多个序列。

[0189] 在另一示例性实施方式中,重组蛋白含有一种或多种肿瘤抗原或其部分的表达或序列,及一种或多种受体或其部分的一个或多个序列。

[0190] 在又一示例性实施方式中,重组蛋白含有一种或多种生长因子或其部分的表达或序列,一种或多种肿瘤抗原或其部分的一个或多个序列,及一种或多种受体或其部分的一个或多个序列。

[0191] 在以上描述的任一实施方式中,除了表达单一肿瘤抗原、受体和/或生长因子的一个或多个拷贝之外,还在每一物理位点处均呈现为单一的肿瘤抗原、受体和/或生长因子或其部分,和/或为重复的肿瘤抗原、受体和/或生长因子序列的链(例如, $n=1$ 至10)。根据本公开的重组蛋白还可含有来自两种或更多不同的肿瘤抗原、受体和/或生长因子的一种或



多种中和结构域或结合位点的表达,呈现为在重组蛋白序列中的不同位置处的单链或多链。例如,所述重组蛋白可含有作为单一表位或结合位点或作为两个或更多个串联重复的2至4种不同的肿瘤抗原、受体和/或生长因子的全长或部分的表达或序列,和/或一种或多种肿瘤抗原、受体和/或生长因子。

[0192] 所得到的蛋白是单一多肽,所述单一多肽表达在重组蛋白的序列内的肿瘤抗原、受体和/或生长因子,或者其一种或多种表位或其结合位点。在示例性实施方式中,重组蛋白的序列表达CT-B序列的一个或多个部分,且将含有表位或其结合位点的至少一种或多种表达的肿瘤抗原、受体和/或生长因子表达呈现在处于天然构象的免疫原性重组蛋白表面上。

[0193] 根据本公开,肿瘤抗原表位、受体结合位点和/或生长因子表位的表达应进行折叠,以允许基本保留它们的天然构象并呈递至宿主免疫系统的组分,从而激发强的宿主免疫应答。合适的天然蛋白模型的实例含有但并不限于,霍乱毒素B亚单元、李斯特菌、破伤风类毒素、白喉类毒素、噬菌体外壳蛋白,腺病毒及其它病毒外壳蛋白。或者,可使用非天然的“合成”多肽,该非天然的“合成”多肽满足赋予完整蛋白免疫原性,并允许将肿瘤抗原表位、受体结合位点和/或生长因子表位适当呈递至宿主免疫系统的要求。

[0194] 佐剂

[0195] 本文所提供的某些示例性实施方式含有在疫苗组合物和免疫佐剂组合物内的根据本公开的重组蛋白,该疫苗组合物和免疫佐剂组合物含有药物组合物。该药物组合物除了重组蛋白之外还包含至少一种佐剂,佐剂是指这种组合物中具有佐剂活性的组分。具有所述佐剂活性的佐剂含有如下的组合物:当该组合物被给予至受试者,诸如人(例如,人类患者)、非人类的灵长类动物、哺乳动物或具有识别的免疫系统的另一高级真核生物时,能够改变(例如,以统计学显著的方式增加或减小,并且在某些优选实施例中,增强或增加)免疫应答的效力和/或寿命。在本文公开的某些示例性实施方式中,被包含在蛋白载剂以及任选地一种或多种佐剂内的期望的抗原和或多种抗原可以改变(例如激发或增强)免疫应答,该免疫应答针对所述期望的抗原和或多种抗原,该多种抗原可在同一时间给予或在其给予中间隔一定时间和/或空间(例如,在不同解剖位点)独立地给予。但某些示例性实施方式并不被如此地限定,因而还考虑在组合物中的重组蛋白的给予,该组合物并不含有特定抗原,但还含有但并不限于一种或多种共-佐剂、咪唑并喹啉免疫应答调节剂。

[0196] 因此且如上所述,佐剂含有具有佐剂效果的成分,诸如皂苷和皂苷类似物,含有QS21和QS21类似物(参见,例如,美国专利号5057540、EP 0 362 279 B1、WO 95/17210)、明矾、植物生物碱诸如番茄素、去垢剂(诸如但并不限于皂苷、聚山梨醇酯80, Span85和硬脂酰酪氨酸)、一种或多种细胞因子(例如GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )、咪唑并喹啉免疫应答调节剂以及双茎环免疫调节剂(dSLIM,例如,Weeratna等人.,2005Vaccine 23:5263)。

[0197] 例如,美国专利号6,544,518,Lacaille-Dubois,M和Wagner H.(1996 Phytomedicine 2:363-386),美国专利号5,057,540,Kensil,Crit.Rev Ther Drug Carrier Syst,1996,12(1-2):1-55和EP 0 362 279 B1中教导了含有皂苷的去垢剂。被称为免疫刺激复合物(ISCOMS)包括奎尔(Quil)A(皂甙)的馏分的颗粒结构具有溶血活性,并已经用于制备疫苗中(Morein,B.,EP 0 109 942 B1)。已报道这些结构具有佐剂活性(EP 0

109 942 B1、WO 96/11711)。具有溶血活性的皂苷QS21和QS17(Quil A经HPLC纯化的馏分)被描述为有效的系统性佐剂,其生产方法公开在美国专利号5,057,540和EP 0 362 279 B1中。在这些参考文献中还描述了QS7(Quil-A的非溶血性馏分)的用途,其作为用于系统性疫苗的有效佐剂。Kensil等人(1991.J.Immunology 146:431-437)进一步描述了QS21的用途。QS21与聚山梨醇酯或环糊精的组合也是已知的(WO 99/10008)。在WO 96/33739和WO 96/11711中描述了包括QuilA馏分,如QS21和QS7的颗粒佐剂体系。在系统性接种疫苗的研究中,已经使用的其它皂苷含有源自其它植物物种诸如丝石竹(Gypsophila)和肥皂草(Saponaria)的那些皂苷(Bomford等人,Vaccine,10(9):572-577,1992)。

[0198] 七叶素是与皂苷相关的另一去垢剂,用于本文所公开的的实施方案的佐剂组合物中。在默克(Merk)索引(12.sup.th Ed.:条目3737)中,七叶素被描述为存在于七叶树(horse chestnut tree)、欧洲七叶树(Aesculus hippocastanum)种子中的皂甙混合物。通过色谱分离和纯化(Fiedler,Arzneimittel-Forsch.4,213(1953))以及通过离子交换树脂法(Erbring等人,美国专利No.3,238,190)描述了它的分离。七叶素(又称七叶皂甙钠)的馏分已经被纯化,并表面具有生物活性(Yoshikawa M等人,Chem Pharm Bull(Tokyo(东京))1996 8月;44(8):1454-1464)。毛地黄皂苷是另一种去垢剂,在默克索引(12.sup.th Ed.,条目3204)中也被称为皂苷,其源自洋地黄的种子,并根据Gisvold等人,J.Am.Pharm.Assoc.,1934,23,664以及Rubenstroth-Bauer,Physiol.Chem.,1955,301,621中描述的步骤进行纯化。

[0199] 用于根据本文中公开的某些实施方案的其它佐剂或共-佐剂含有嵌段共聚物或可生物降解的聚合物,指在相关领域中常见的一类聚合化合物。可在疫苗组合物或免疫佐剂中含有的嵌段共聚物或可生物降解的聚合物的实例包括聚丙二醇与环氧乙烷的加聚物(Pluronic).RTM.L121(BASF Corp(巴斯夫公司),Mount Olive(芒特奥利夫),新泽西州;例如参见Yeh等人.,1996 Pharm.Res.13:1693)。

[0200] 某些进一步的示例性实施方式涉及免疫佐剂,该免疫佐剂含有但并不限于油状物,在一些这样的实施方式中该油状物可有助于共-佐剂的活性,而在其它这样的实施方式中可以附加地或替代地提供药学上可接受的载剂或赋形剂。任何数量的合适的油状物是已知的,并可基于本公开选择用于疫苗组合物和免疫佐剂组合物中的内含物。这种油状物的实例(以示例而非限制地方式)含有角鲨烯、角鲨烷、矿物油、橄榄油、胆固醇和二缩甘露醇单油酸酯。

[0201] 免疫反应调节剂诸如咪唑并喹啉免疫应答调节剂也是本领域已知的,并且也现在公开的实施方案中含有该免疫反应调节剂作为佐剂或共-佐剂。

[0202] 如上所述,用于根据如本文所公开的疫苗组合物的佐剂或共-佐剂的一种类型可以是铝共-佐剂,其通常称为“明矾”。明矾共-佐剂是基于以下物质:铝氧-氢氧化物、铝-羟基磷酸或各种专用盐。明矾共-佐剂是有益的,因为它们具有良好的安全记录、提高抗体应答、稳定抗原,并且大规模生产相对简单(Edelman 2002Mol.Biotechnol.21:129-148;Edelman,R.1980Rev.Infect.Dis.2:370-383)。

[0203] 药物组合物

[0204] 在某些示例性实施方式中,药物组合物是疫苗组合物,该疫苗组合物包括根据本公开的重组蛋白,且与药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂结合;该疫苗组合物可进一步

包括如本文所提供的一种或多种组分,该一种或多种组分如本文所述选自TLR激动剂、共-佐剂(例如,含有细胞因子、咪唑并喹啉免疫应答调节剂和/或dSLIM)等和/或重组的表达构建体。

[0205] 示例性的载剂所采用的剂量和浓度将对受试者是无毒的。对于包括重组蛋白的疫苗,通常通过皮内、皮下、肌肉或静脉内途径,或通过其它途径以约0.01.mu.g/kg至约100mg/kg体重的剂量给予疫苗。

[0206] 对于本领域技术人员明显地是,根据宿主的应答,确定给予的次数和频率。在制药领域中,用于治疗用途的“药学上可接受的载剂”是众所周知的,并且例如描述在Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明登氏药学全书),Mack Publishing Co.(迈克出版公司)(A.R.Gennaro编辑1985)中。例如,也可使用生理pH下的无菌盐水和磷酸盐缓冲盐水。在药物组合物中,可提供防腐剂、稳定剂、染料以及甚至调味剂。例如,也可加入苯甲酸钠、抗坏血酸和对羟基苯甲酸酯作为防腐剂。此外,可以使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0207] 药物组合物可为允许要被给予患者的组合物的任何形式。例如,该组合物可以是固体、液体或气体(气溶胶)的形式。给药的典型途径含有但并不限于,口服、局部、胃肠外(如舌下或颊)、舌下、直肠、阴道和鼻内(例如,作为喷雾)。本文中所使用的术语肠胃外含有离子电渗疗法、超声促渗法、被动经皮,微针给药,也包括皮下注射、静脉内、肌肉、胸骨内、海绵体内、鞘内、道内、尿道内注射或输注技术。在具体实施方式中,本文所述的组合物(含有疫苗和药物组合物)是通过选自离子电渗疗法、微小气泡形成(microcavitation)、超声促渗或微针的技术经皮内给予的。

[0208] 药物组合物被配置为允许在将组合物给予患者时,被包含在其中的活性成分是生物相容的。将给予患者的组合物采取一种或多种剂量单位的形式,其中例如,片剂可以是单一剂量单位,并且本发明以气溶胶形式的一种或多种化合物的容器(container)可以保持多个剂量单位。

[0209] 对于口服给药,可存在赋形剂和/或粘合剂。实例是蔗糖、高岭土、甘油、淀粉糊精、藻酸钠、羧甲基纤维素和乙基纤维素。也可存在着色剂和/或调味剂。也可采用涂层外壳。

[0210] 组合物可为液体的形式,例如,酏剂、糖浆、溶液、乳液或悬浮液。作为两个实例,该液体可用于口服给药或通过注射递送。当用于口服给药时,优选的组合物包含增甜剂、防腐剂、染料/着色剂和增味剂中的一种或多种。在用于通过注射给药的组合物中,可含有表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲液、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0211] 如本文所使用的液体药物组合物,无论是以溶液、悬浮液或其它相似的形式,可以含有以下载剂或赋形剂中的一种或多种:无菌稀释剂如注射用水,盐水溶液,优选生理盐水,林格氏溶液,等渗氯化钠,固定油如角鲨烯,角鲨烷,矿物油,二缩甘露醇单油酸酯,胆固醇和/或可作为溶剂或悬浮介质的合成的单或双甘油酯,聚乙二醇,甘油,丙二醇或其它溶剂;抗菌剂如苯醇或羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如乙酸盐,柠檬酸盐或磷酸盐和用来调节渗透压的试剂如氯化钠或葡萄糖。肠胃外制剂可被封装在安瓿内,一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0212] 在具体实施方式中,本发明的药物或疫苗组合物包括小于0.2微米的稳定水性悬浮液,并进一步包括选自由磷脂、脂肪酸、表面活性剂、去垢剂、皂甙、加氟脂质等组成的组

中的至少一种组分。

[0213] 还可期望在疫苗或药物组合物中含有其它组分,诸如递送载剂,含有但并不限于铝盐、油包水乳剂、可生物降解的油载剂、水包油乳剂、可生物降解的微胶囊和脂质体。在这样的载剂中使用的额外的免疫刺激物质(共-佐剂)的实例如上所述,并且可含有N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(MDP)、葡聚糖、IL-12、GM-CSF、 $\gamma$ 干扰素和IL-12。

[0214] 虽然在本发明的药物组合物中可采用本领域普通技术人员已知的任何合适的载剂,但载剂的类型将根据给药方式和是否期望持续释放而变动。对于肠胃外给药,诸如皮下注射,载剂优选包括水、盐水、醇、脂肪、蜡或缓冲液。对于口服给药,可采用任何上述载剂或固体载剂,如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖和碳酸镁。也可采用可生物降解的微球体(例如,聚乳酸)作为用于本发明药物组合物的载剂。

[0215] 药物组合物也可包含:稀释剂如缓冲液,抗氧化剂如抗坏血酸,低分子量(少于约10个残基)的多肽,蛋白,氨基酸,碳水化合物含有葡萄糖、蔗糖或糊精,螯合剂如EDTA,谷胱甘肽和其它稳定剂和赋形剂。中性缓冲盐水或与非特异性血清白蛋白混合的盐水是示例性的合适的稀释剂。优选地,产品可利用适当的赋形剂溶液(例如,蔗糖)作为稀释剂被配制为冷冻干产物。

[0216] 在示例性实施方式中,不论源自天然或合成的多肽序列,重组蛋白的表位或受体支持结构域都应当具有在适当的化学/环境条件下的自组装成低聚的多聚体(oligomeric multimer)或者在替代条件下还原为单体的能力。理想情况下,多聚化结构域组装成具有精细(discreet)量的亚单元的的稳定多聚体(例如二聚物、三聚物、四聚物、五聚物等),以便产生均一大小的产物。天然多肽的实例含有但并不限于,亮氨酸拉链、乳糖阻抑蛋白(lac repressor protein)、链霉亲和/亲和素、霍乱毒素B亚单元、假单胞菌三聚化结构域和病毒衣壳蛋白。

[0217] 在示例性实施方式中公开了一种制备多价分子的方法。在该示例性实施方式中,该方法包括从单体亚单元组装成多聚体,以形成含有一种或多种肿瘤抗原、受体和/或生长因子或其部分的合成蛋白。

[0218] 在另一示例性实施例中公开了一种制备疫苗制剂的方法。在该示例性实施方式中,该方法包括:将一种或多种单一的单价多聚体混合在一起制备含有重组蛋白的多价疫苗,该重组蛋白含有至少一种或多种肿瘤抗原、受体和/或生长因子或其部分。

[0219] 在又一示例性实施方式中公开了一种治疗患者的方法。在该示例性实施方式中,该方法含有:在疫苗接种期间,以同一日或隔日(at alternate days)或间隔一定时间(times)的方式将一种或多种单价体、一种肿瘤抗原、受体和/或生长因子、重组蛋白独立地给予患者。

[0220] 当重组蛋白被描述为含有或表达肿瘤抗原、生长因子和/或受体至少一种序列的全部或部分的一种或多种以及CT-B序列时,但重组蛋白质可含有天然CT-B序列或与天然的CT-B序列基本相似的序列和/或合成序列。

[0221] 当重组蛋白被描述为含有或表达CT-B序列时,重组蛋白可含有或表达CT-B序列的衍生物或与CT-B序列基本相似的序列。

[0222] 当已经结合某些实施方式描述并说明均质重组蛋白表达或并入一种或多种肿瘤抗原、生长因子和/或受体时,对本领域技术人员来说,许多变型和修改将是明显的,并且可

以在不脱离本发明的精神和范围内进行。因此,本公开不被限定于如上所述的方法或构造的精确细节,这样的变型和修改也被涵盖在本公开的范围之内。

	100		
NSDSECPLSHDGYCLHDGVC	CMYIEALDKYACNCVVG	YIGERCQYRDLKWWELR	人类
NSDSECPLSHDGYCLHDGVC	CMYIEALDKYACNCVVG	YIGERCQYRDLKWWELR	黑猩猩
NSDSGCPLSHDGYCLHDGVC	CMYIEALDKYACNCVVG	YIGERCQYRDLKWWELR	猕猴
NSNTGCPESYDGYCLNGGVC	MYVESVDRYVCNCVIG	YIGERCQHRDLRWWKLR	棕鼠
	MYVESVDRYVCNCVIG	YIGERCQHRDLRWWNR	黑鼠
NSYPGCPSSYDGYCLNGGVC	MHIESLDSYFCNCVIG	YSGDRCQTRDLRWWELR	小鼠
NSYSECPESHGVC	CMYIEAVDSYACNCVFG	YVGERCQHRDLKWWELR	野猪
NSYQECPPSYDGYCLYNGVC	CMYIEAVDRYACNCVFG	YVGERCQHRDLK-WELR	猫
NGYRECPSSYDGYCLYNGVC	CMYIEAVDRYACNCVFG	YVGERCQHRDLK-WELR	狗
NSYQECSSQSYDGYCLHGGVC	VYLVQVDTHACNCVVG	YVGERCQHQDLRWWELR	马
CPPEYSESYCLHGGVCNYV	SDLODYACNCVTGYV	GERCQFSDLEWWEQR	斑胸草雀
CPPAYDSYCLHGGVCNYV	SDLODYACNCVTGYV	GERCQFSDLEWWE	鸡
ECPLAYDGYCLNGGVC	IHFPELKDYGCRVAGY	VGERCQFDDLKSWE	青蛙
NGVQSCPSTHDSYCLYDGV	CFYFPEMESYACNCVLG	YMGERCQFSDLEWWELO	斑马鱼
CPPRYEGFCLHGGICFYV	DRLG-VGCSCPVMYEG	ERCQY	文昌鱼

图1

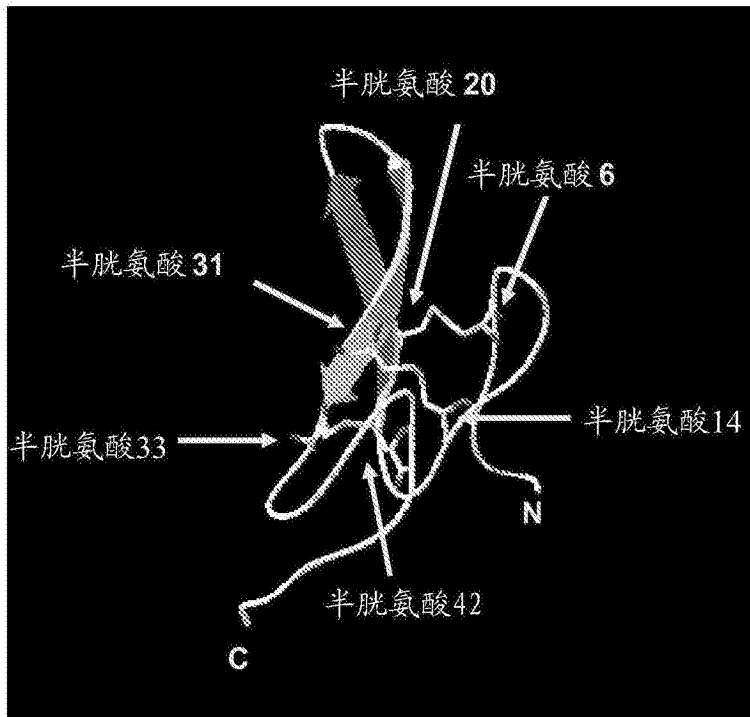


图2

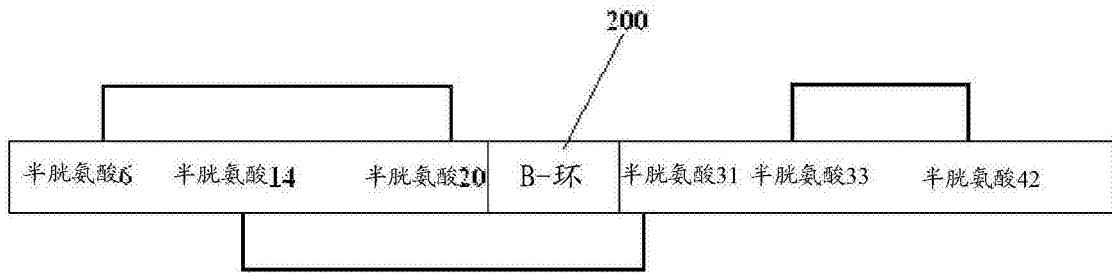


图3

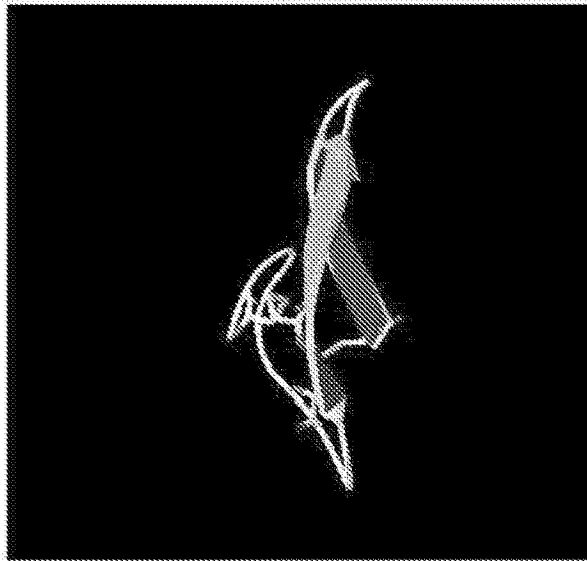


图4

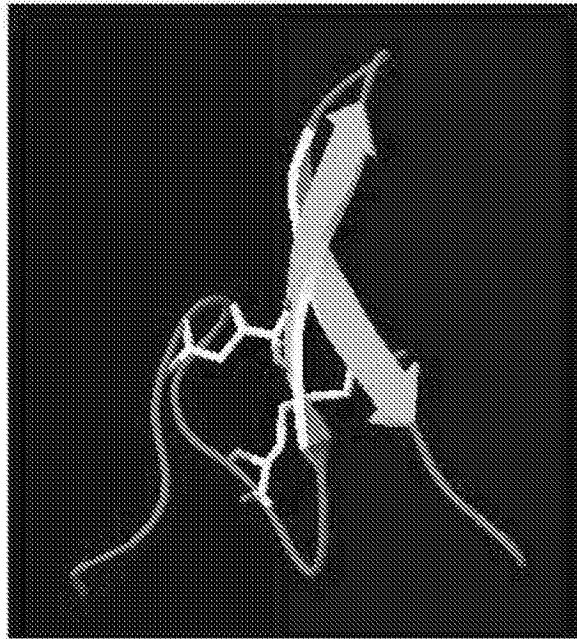


图5

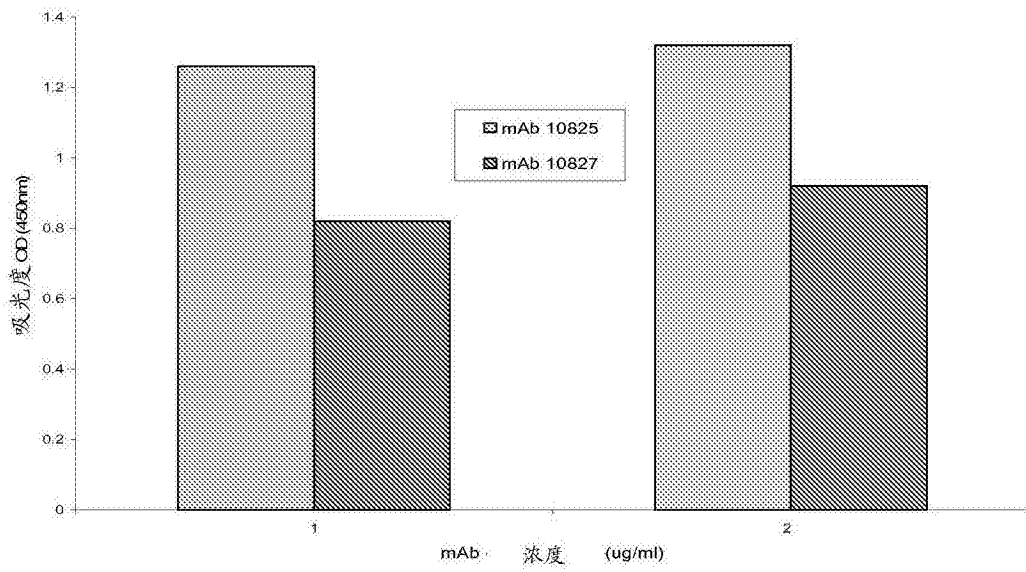


图6



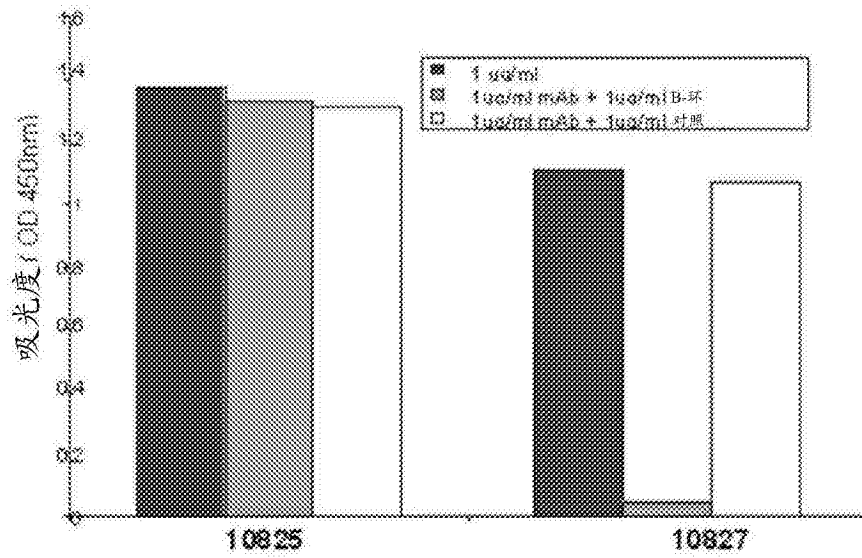


图7

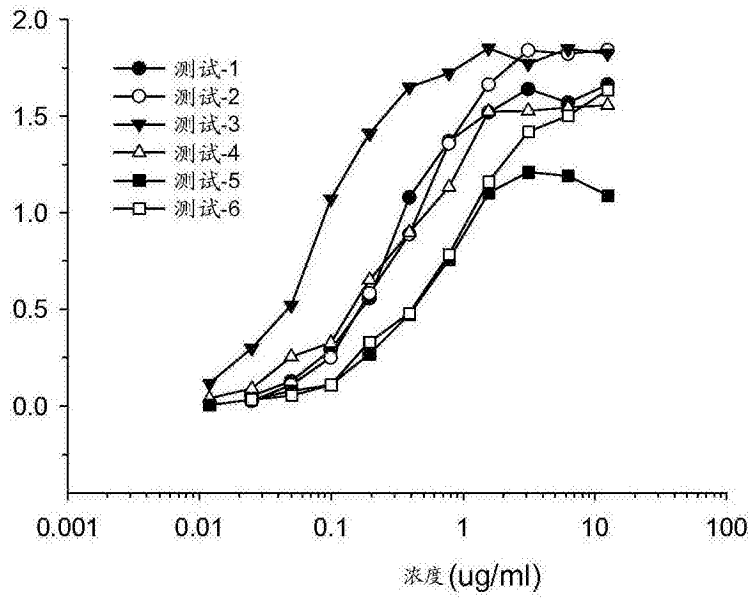


图8

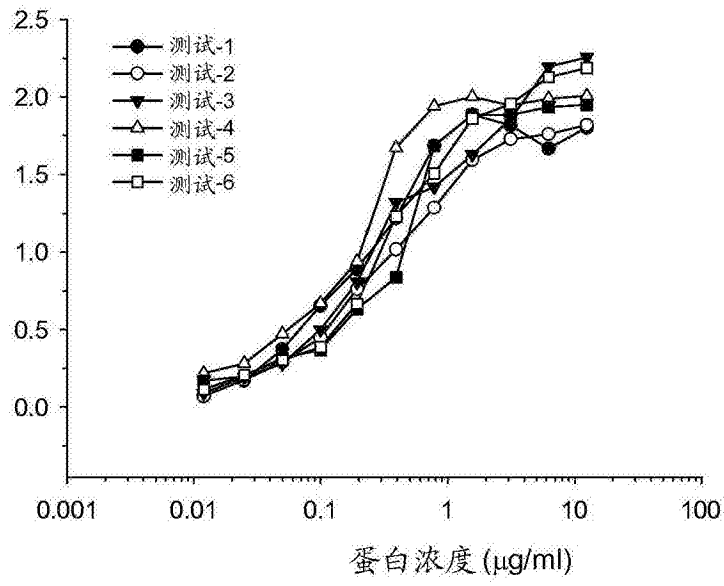


图9

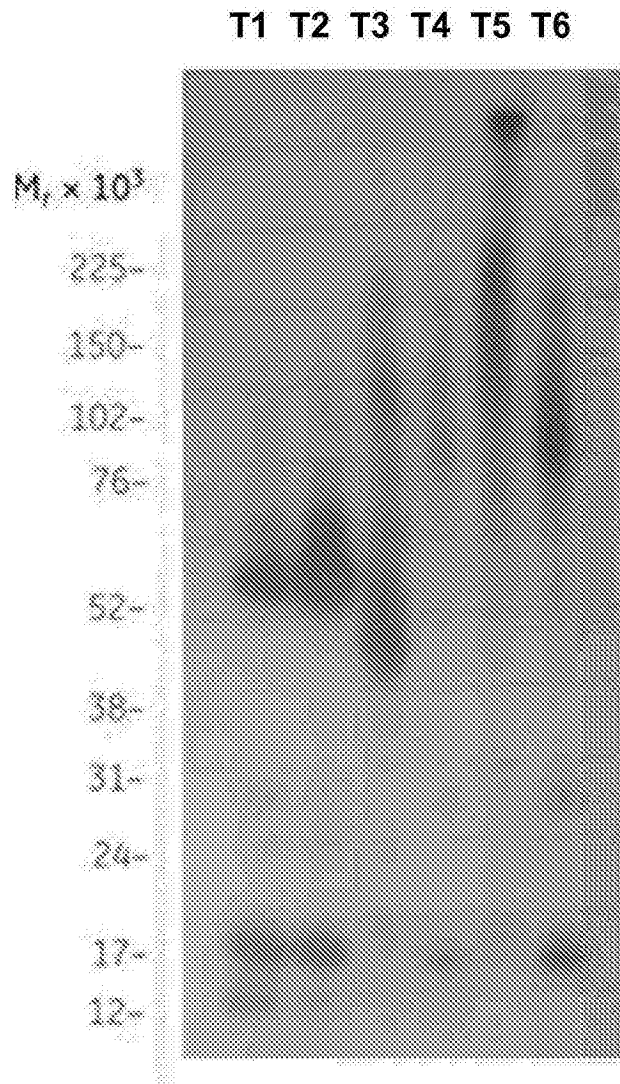


图10

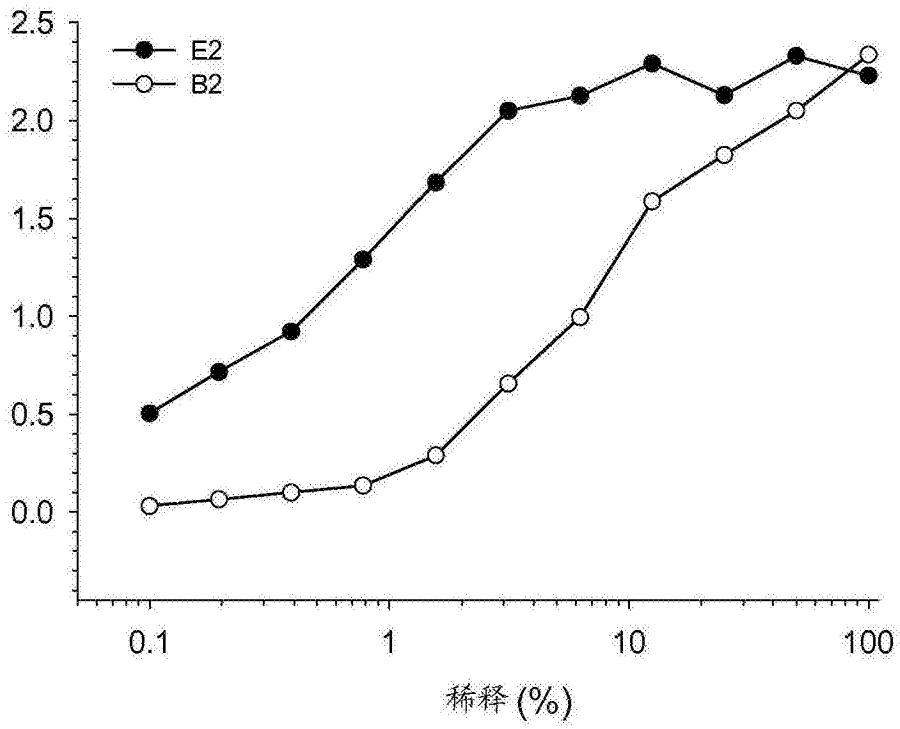


图11

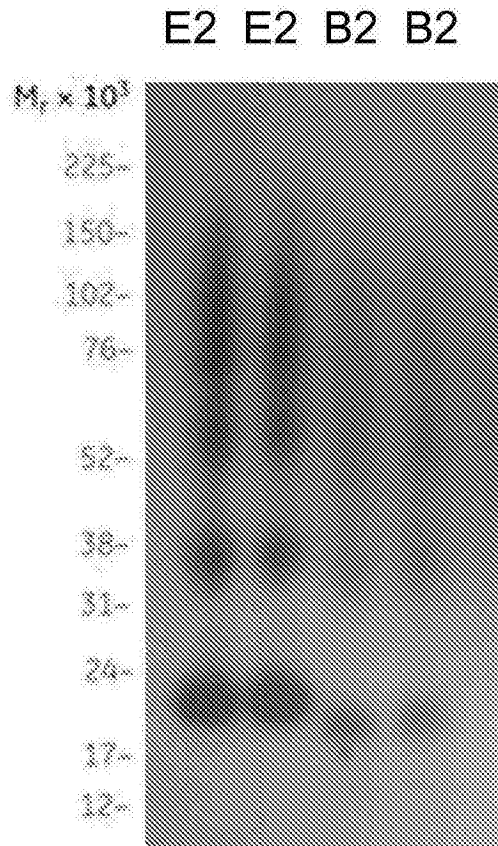


图12

HHHHHHIEGRNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIE  
ALDKYACNCVVVGYIGERCQYRDLKWWELRSGGTPQN  
 ITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSUTESLAGKREMAIITFKN  
 GATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVE  
 KLCVWNNKTPHAIAAISMANSSSGNSDSECPLSHDGYCL  
HDGVCMYIEALDKYACNCVVVGYIGERCQYRDLKWW  
ELR

图13

HHHHHHIEGRCMYIEALDKYSGGTPQNITDLCAE  
 YHNTQIHTLNDKIFSUTESLAGKREMAIITFKNGATFQV  
 EVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVW  
 NNKTPHAIAAISMANSSSGCMYIEALDKY

图14

HHHHHHIEGRCPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDK  
YACSGGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSUTESLAG  
 KREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDT  
 LRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANSSSGCPLS  
HDGYCLHDGVCMYIEALDKYAC

图15

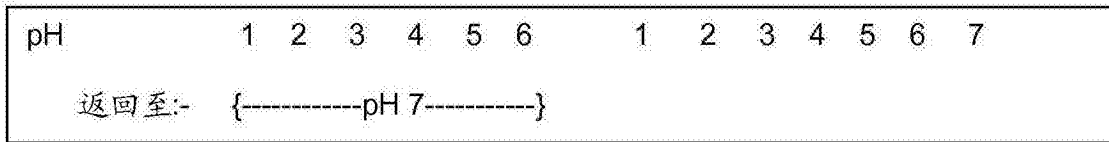
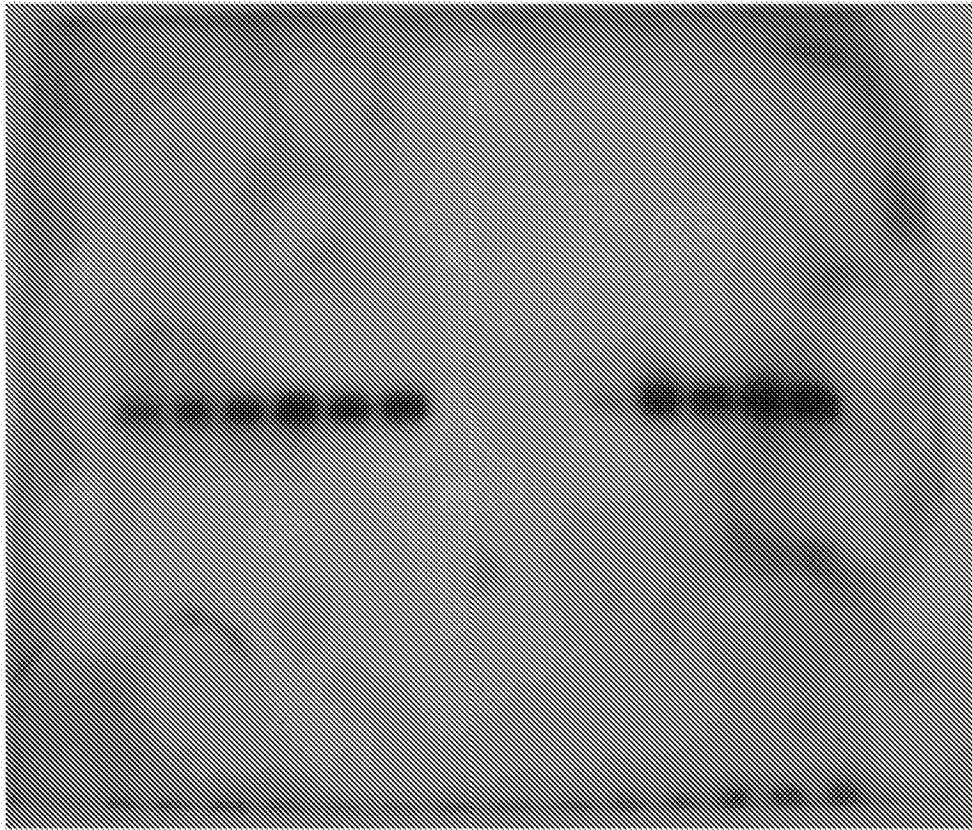


图16

构建体	序列
T1	EGF与CT-B的N-末端直接融合。
T2	EGF与CT-B的N-末端融合且通过3个氨基酸接头与CT-B隔离开。
T3	EGF与CT-B的N-末端融合且通过5个氨基酸接头与CT-B隔离开。
T4	EGF与CT-B的C-末端直接融合。
T5	EGF与CT-B的C-末端融合且通过3个氨基酸接头与CT-B隔离开。
T6	EGF与CT-B的C-末端融合且通过5个氨基酸接头与CT-B隔离开。
E2	在CT-B的两个末端均融合有全长的EGF，每一全长的EGF均通过3个氨基酸接头与CT-B隔离开。
B2	在CT-B的两个末端均融合有截短的EGF（例如从半胱氨酸6至半胱氨酸31的EGF序列），每一截短的EGF均通过3个氨基酸接头与CT-B隔离开。

图17

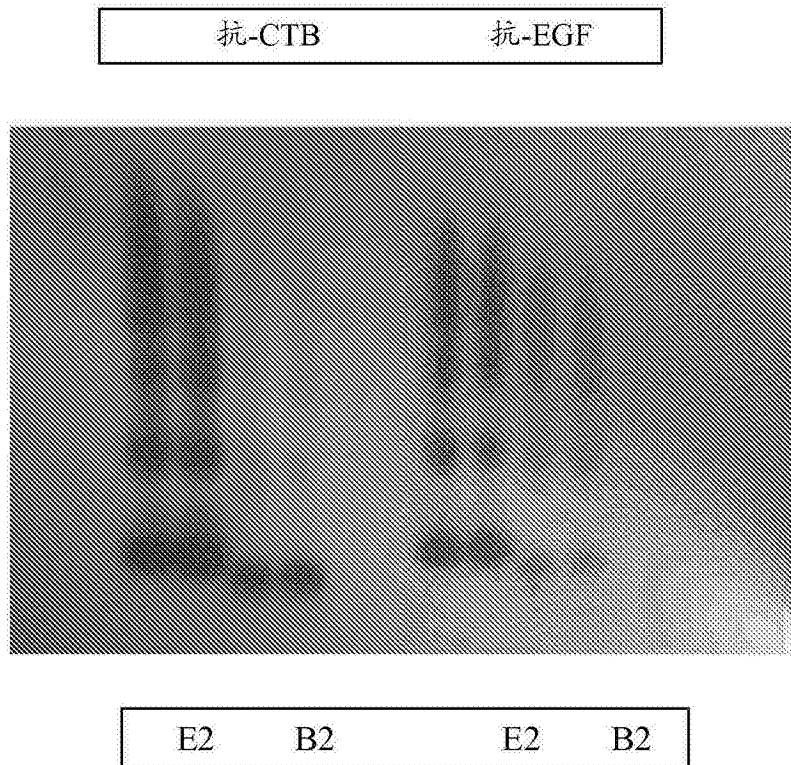


图18

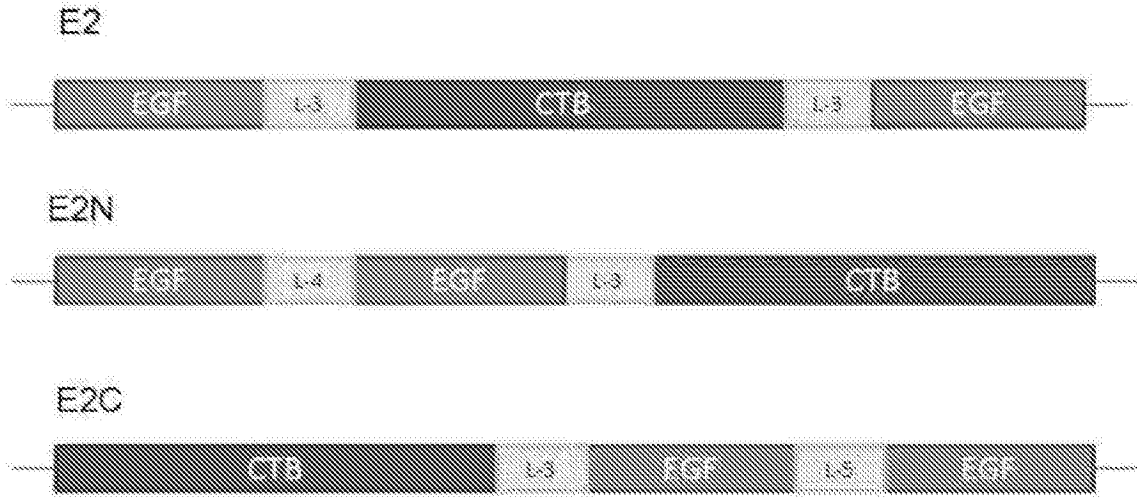


图19

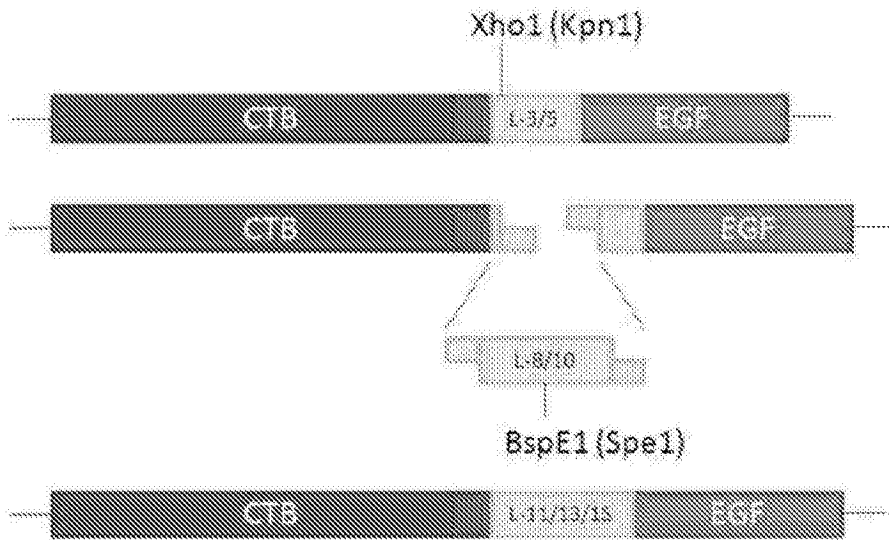


图20



$\alpha$ -EGF 蛋白印迹

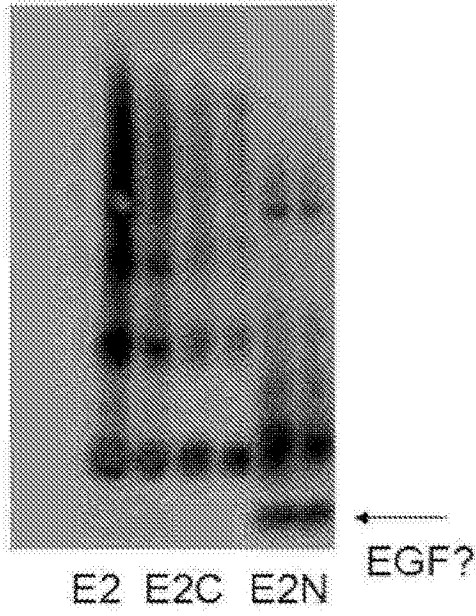


图21

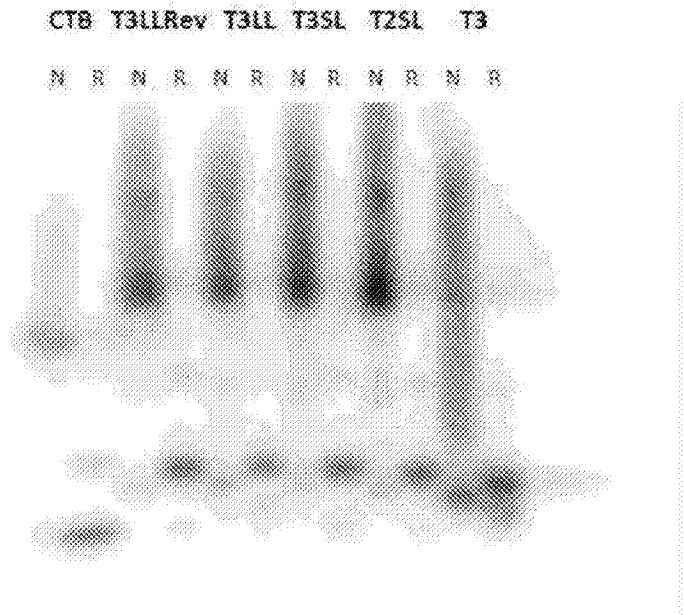


图22

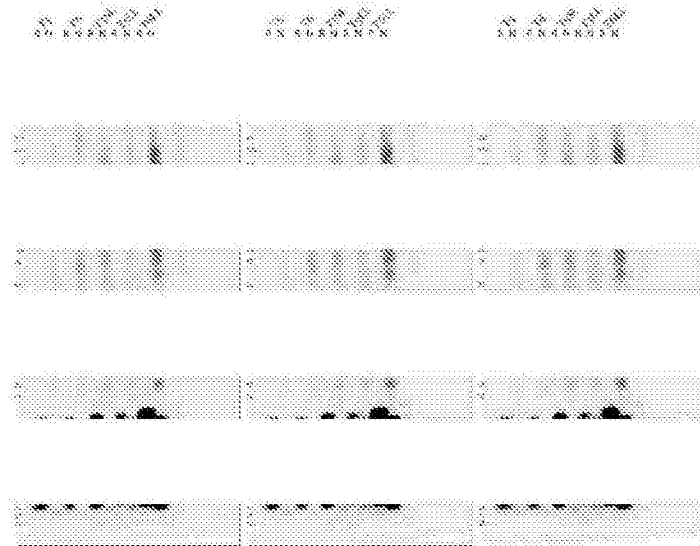


图23

HHHHHHIEGRGPETLCGAELVDALQFVCGDRGF  
YFNKPTGYGSSSRRAPOTGIVDECCFRSCDLRRLEMY  
CAPLKPAKSAGSSGNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIE  
ALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELRGGSGGTSG  
 GGGSGTPQNI<sup>DL</sup>CAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAG  
 KREMAIITFKNGATFQVEVPSQHIDSQKKAIERMKD<sup>TLR</sup>  
 IAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISM<sup>AN</sup>

图24

## 双特异性嵌合蛋白“通过设计”的捕获ELISA

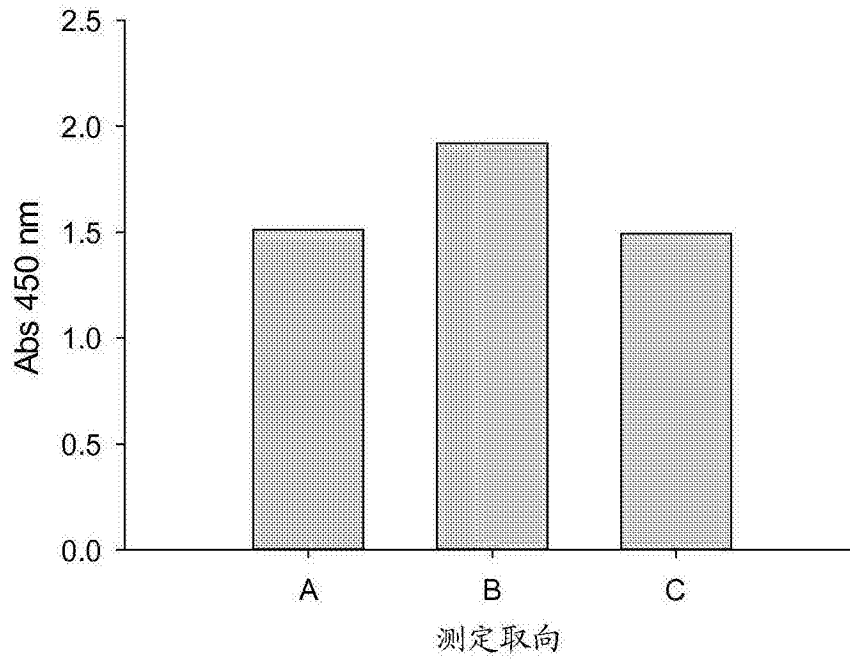


图25

HHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTE  
 SLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPSQHIDSQKKAIERMK  
 DTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANS SSG GP  
ETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAP  
QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA

图26

双特异性嵌合蛋白“通过处理”的捕获ELISA

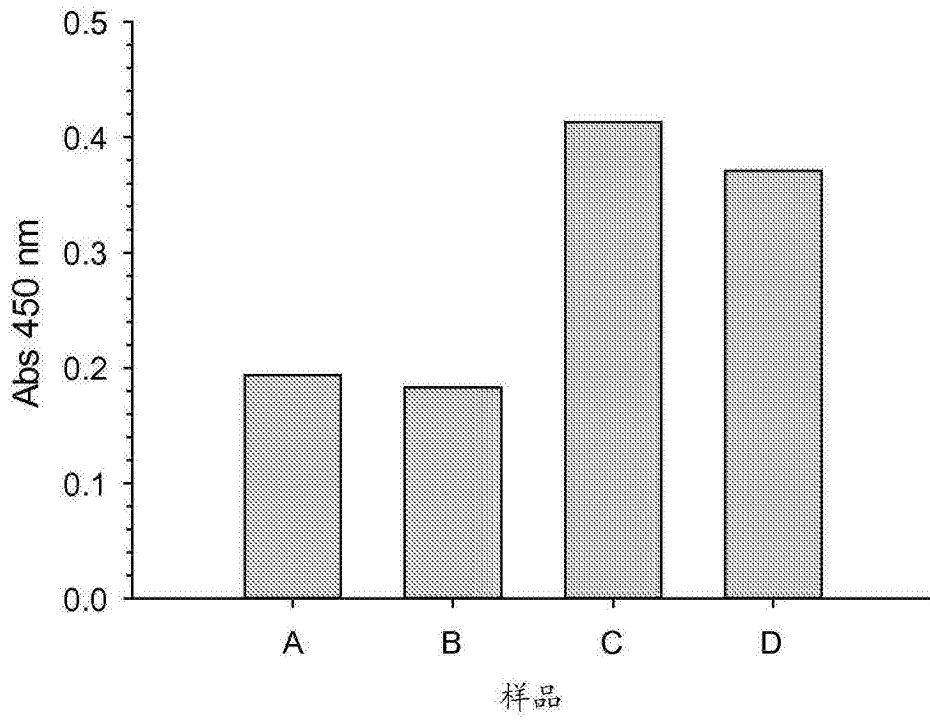


图27

a) mTGF- $\beta$  1  
 HHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF  
 SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA  
 IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN  
 SSGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI  
 HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHN  
 PGASASPCCVPOALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIV  
RSCKCS

b) mFGF2  
 HHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTE  
 SLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERM  
 KDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANS  
 SSGPALPEDGGAAFPFGHFKDPKRLYCKNGGFFLRIHPDGR  
 VDGVREKSDPHVKLQLQAEERGVVSIKGVCANRYLA  
 MKEDGRLLASKCVTEECFFFERLESNNYNTYRSRKYS  
SWYVALKRTGQYKLGSKTGPGQKAILFLPMSAKS

c) mHGF  
 HHHHHHQKKRRNTLHEFKKSAKTTLTKEDPLLKIKT  
 KKVNSADECANRCIRNRGFTFTCKAFVFDKSRKRCY  
 WYPFNSMSSGVKKGFGHEFDLYENKDYIRNCIIGKGG  
 SYKGTVSITKSGIKCQPWNSMIPHEHSFLPSSYRGKDL  
 QENYCRNPRGEEGPPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSGG  
 SGGTSGGGGSGGGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF  
 SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA  
 IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN

d) mIGF-1/2

HHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF  
 SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA  
 IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN  
SSGGPETLCGAELVDALQFVCGPRGFYFNKPTGYGSS  
IRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPTKAA  
GGSA YGPGETLCGGELVDTLQFVCSDRGFYFSRPSSR  
ANRRSRGIVEECCFRSCDLA LLETYCATPAKSE

e) mVEGF-A/C

HHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF  
 SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA  
 IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMA  
NSSGVIKFMDVYQRSYCRPIETLVDIFQEYPDEIEYIFK  
PSCVPLMRCAGCCNDEALECVPTSES NITMQIMRIKP  
HQSQHIGEMSFLQHSRCECRPKKTEILKSIDNEWRKTO  
CMPREVCIDVGKEFGAATNTFFKPPCVSVYRCGGCCNS  
EGLQCMNTSTGYLSKTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHT  
SCRCMS

图28

重组嵌合蛋白的捕获ELISA

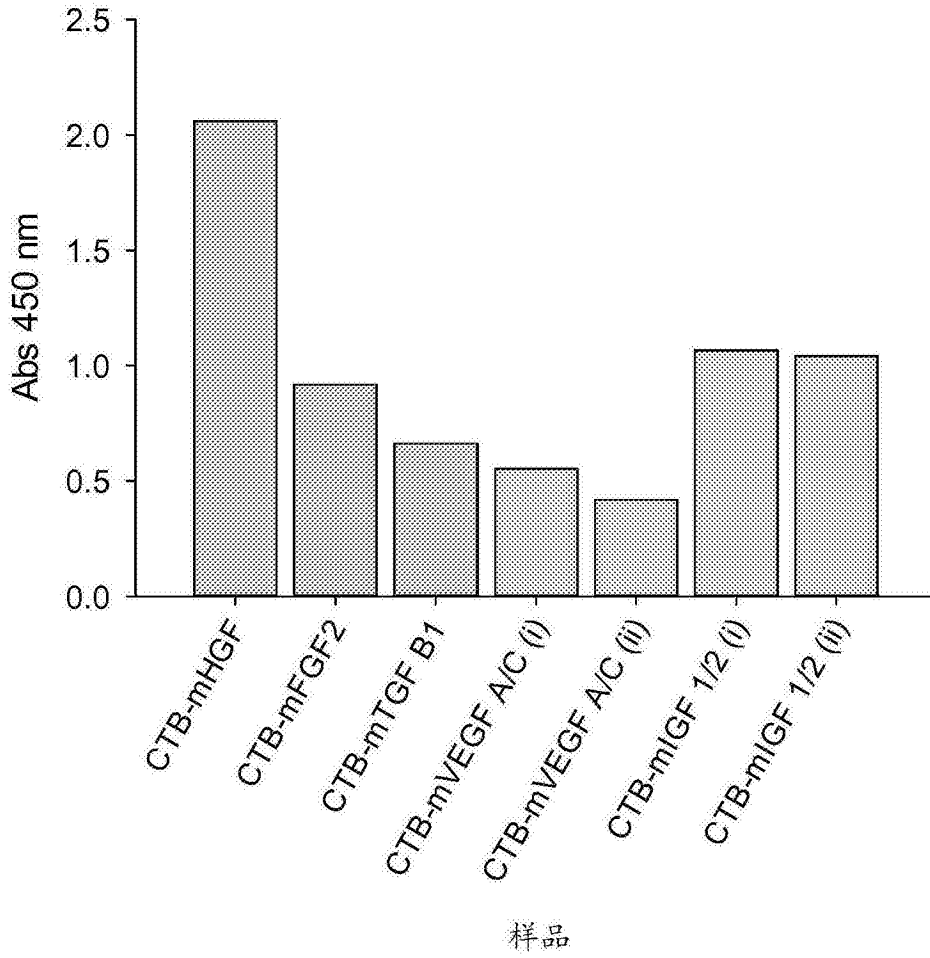


图29

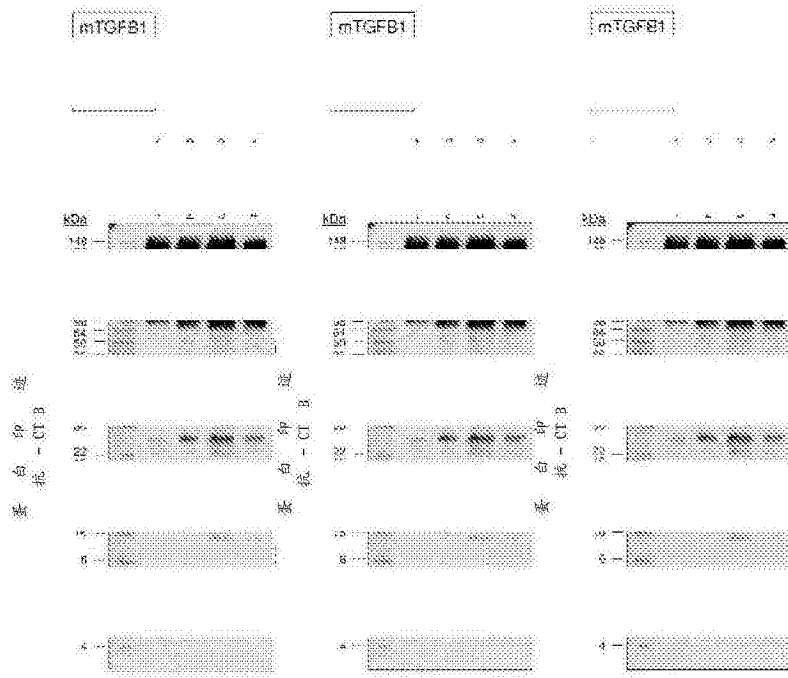


图30



a) HuTGF- $\beta$  1  
HHHHHHALDTNYCFSSTEKNCCVRQ LYIDFRKD  
LGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL  
LYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVE  
QLSNMIVRSCCKCSGGSGGTSGGGGGSGTPQNITDLCA  
*EYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQ*  
*VEVPSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWN*  
*NKTPHAIAAISMAN*

b) Hu-TGF- $\beta$  -R2  
HHHHHHIEGRAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSC  
MSNCSITSICEKPQEVAVVWRKNDENITLETVCHDP  
KLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSSD  
ECNDNIIFSEGGSGGTSGGGGGSGTPQNITDLCAEYHN  
*TQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVP*  
*SQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTP*  
*HAIAAISMAN*

图31

TGF-β受体2的捕获ELISA

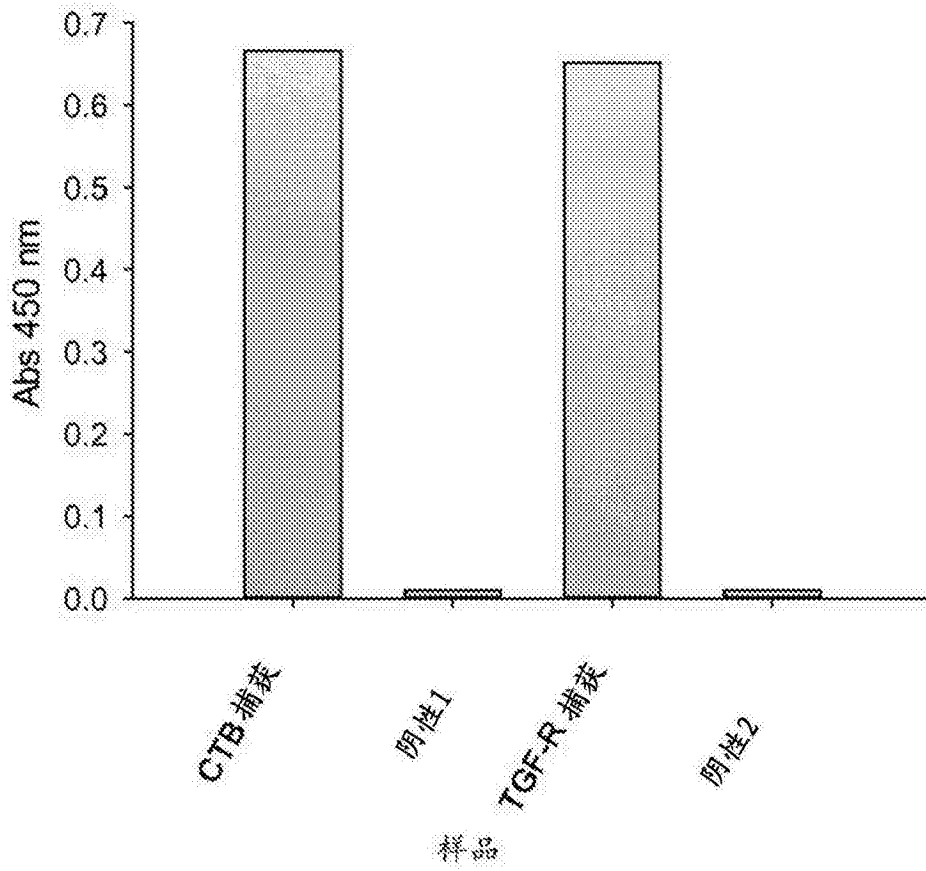


图32

HuTGF-β 序列与TGF-β 受体2序列的结合

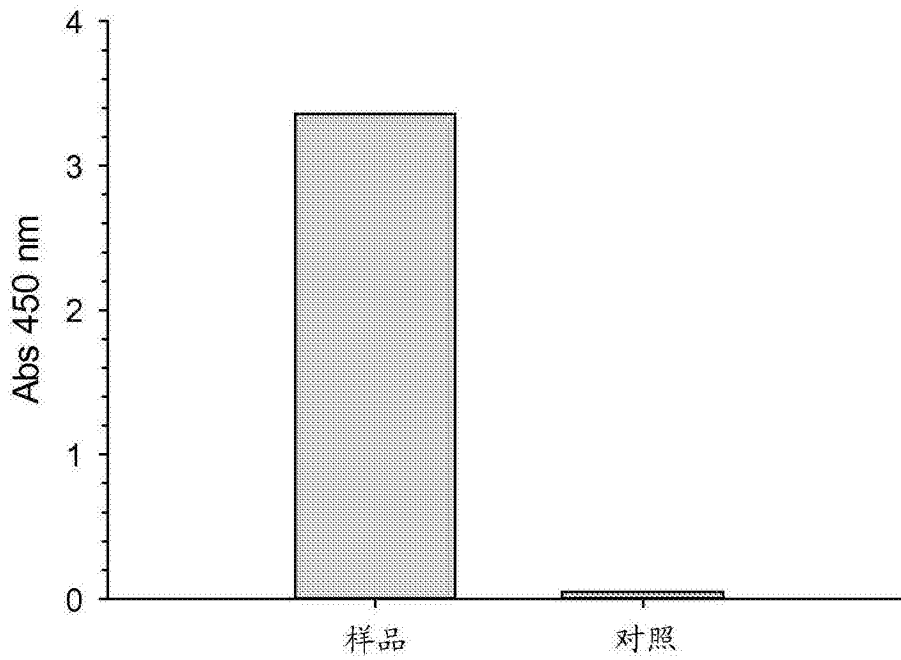


图33

以1/100稀释的第一组血清与rhIGF的结合

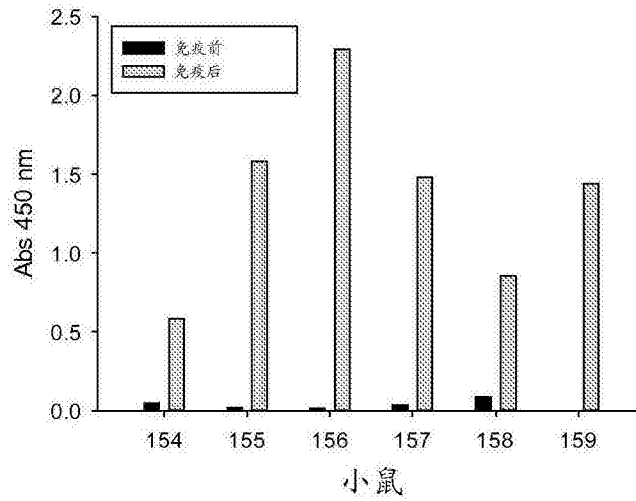


图34

以1/100稀释的第二组血清与rhEGF的结合

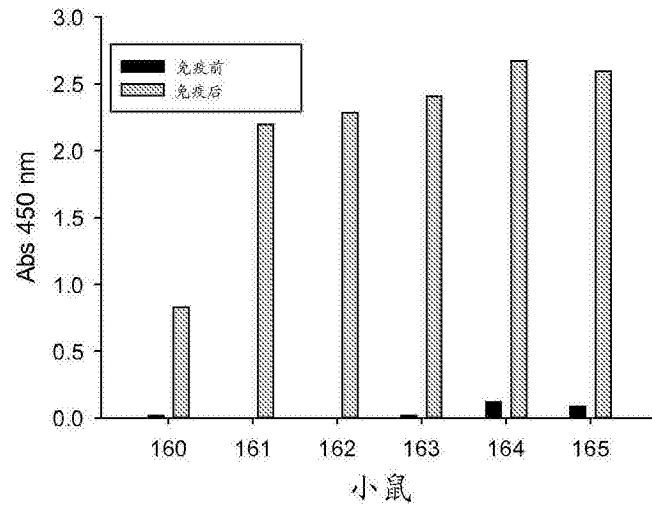
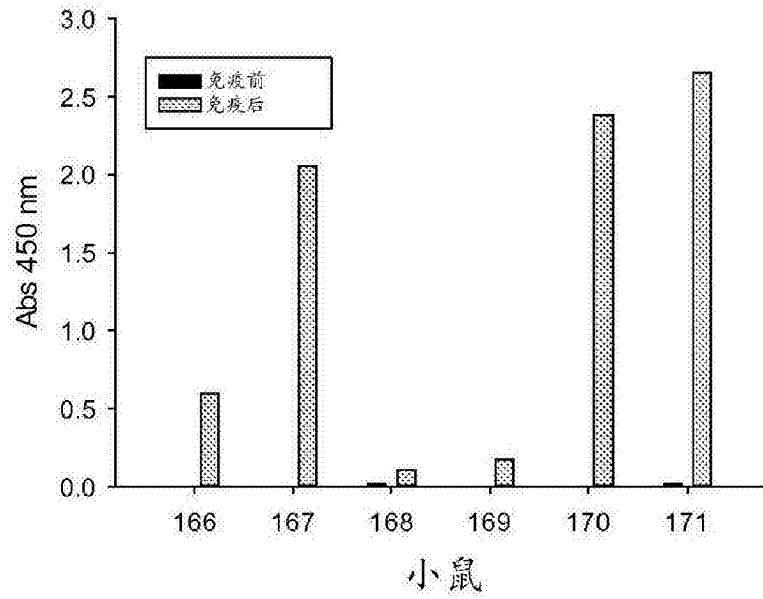


图35

a)

以1/100稀释的第三组血清与rHu-EGF的结合



b)

以1/8稀释的第三组血清与rHu-EGF的结合

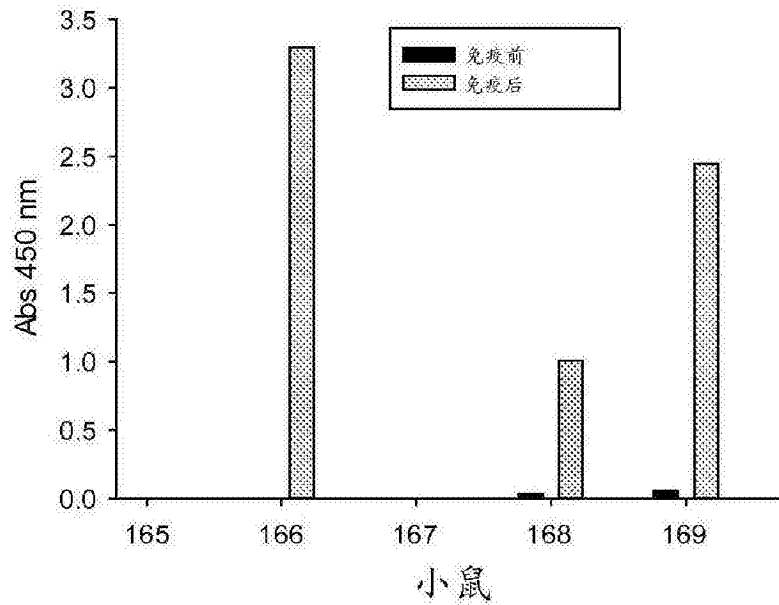
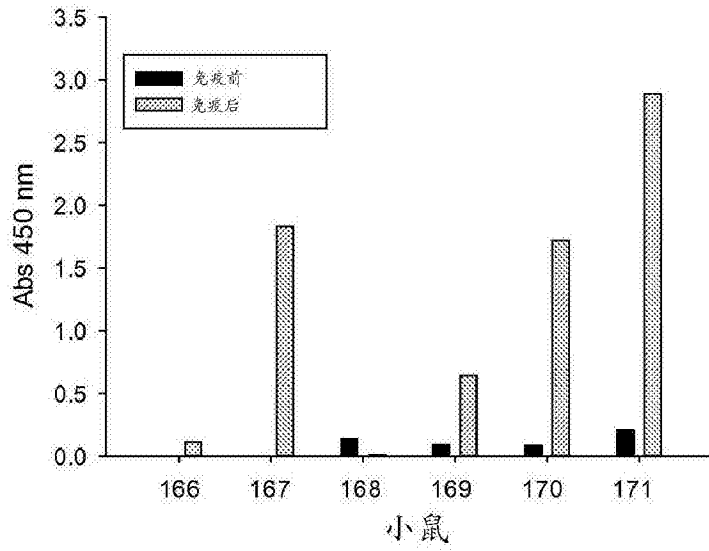


图36

a)

以1/100稀释的第三组血清与rHu-IGF的结合



b)

以1/8稀释的第三组血清与rHu-IGF的结合

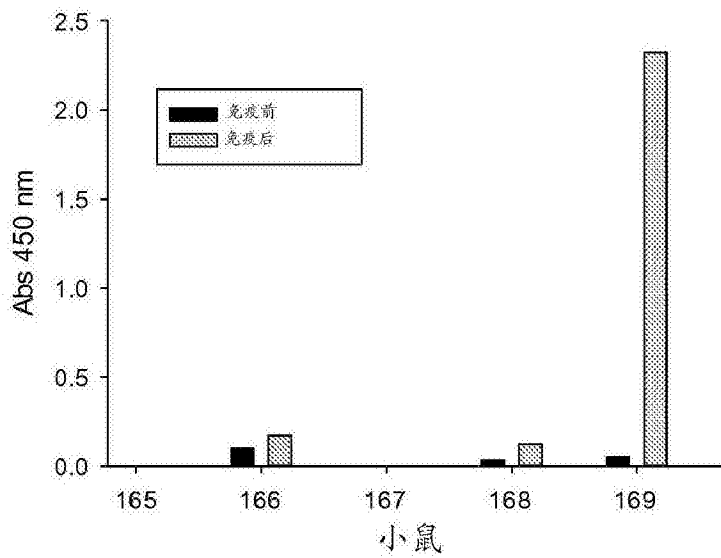
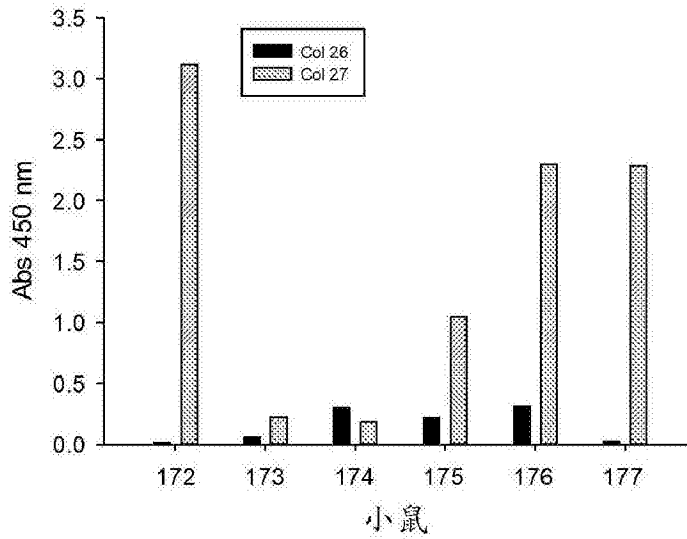


图37

a)

以1/100稀释的第四组血清与rHu-EGF的结合



b)

以1/8稀释的第四组血清与rHu-EGF的结合

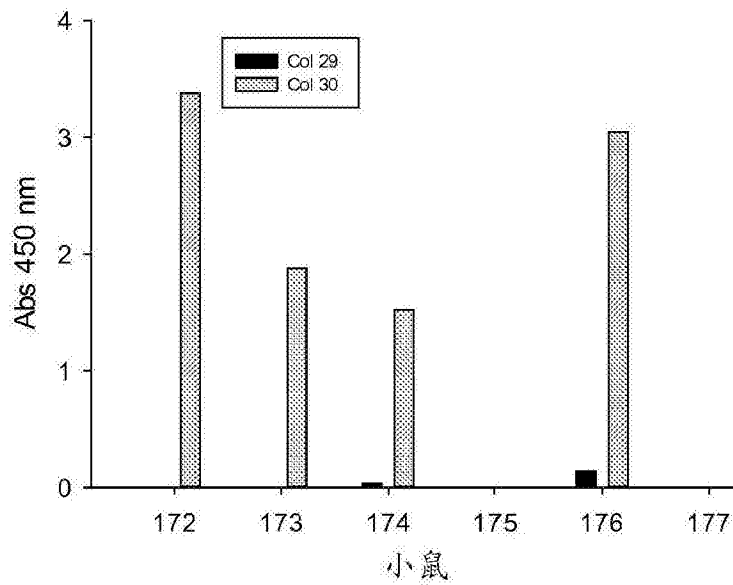
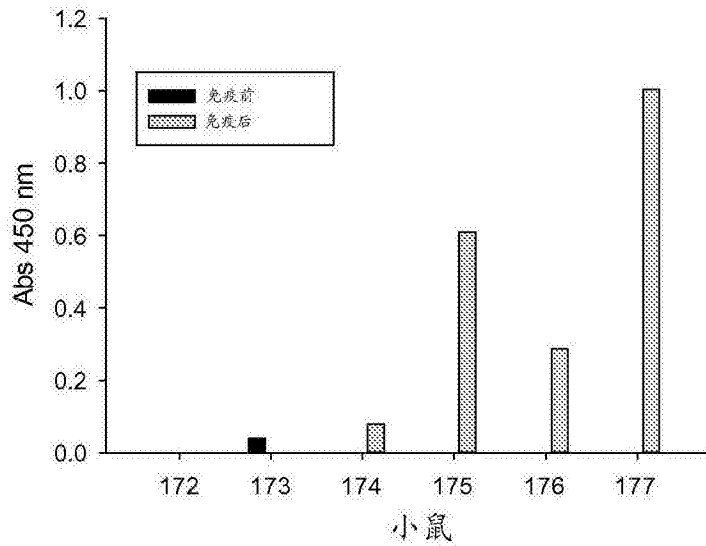


图38

a)

以1/100稀释的第四组血清与rHu-IGF的结合



b)

以1/8稀释的第四组血清与rHu-IGF的结合

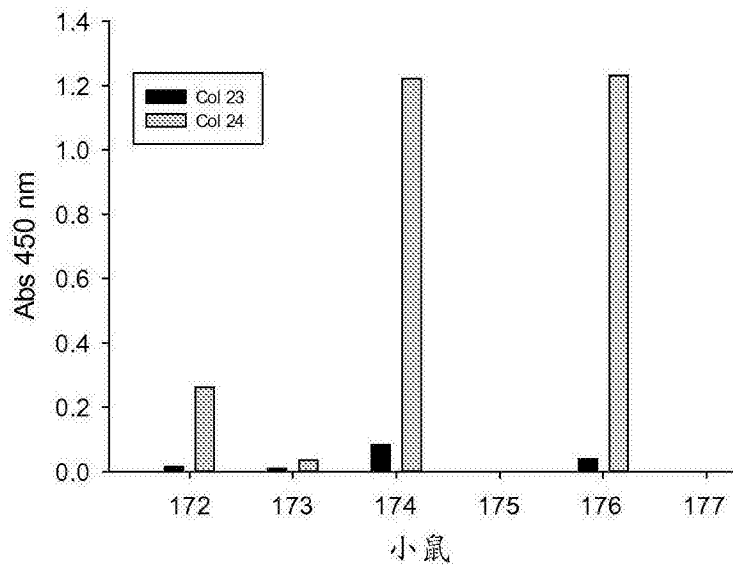


图39



以1/8稀释或1/100稀释的第五组血清与rHuIGF的结合

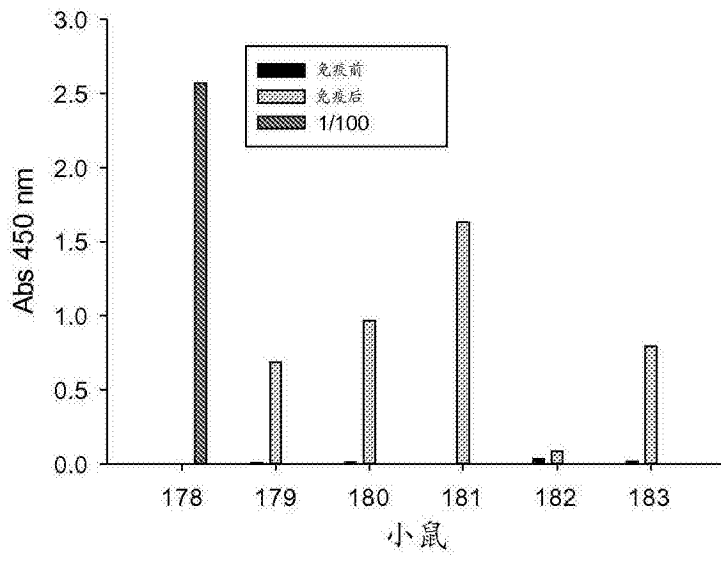
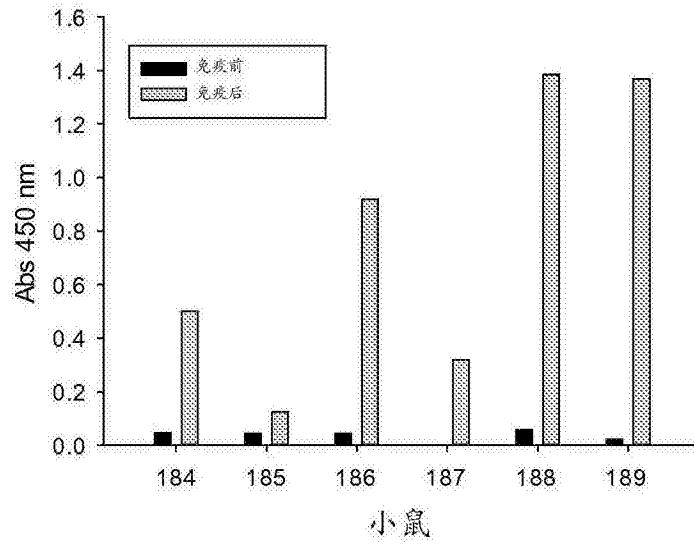


图40

a)

以1/100稀释的第六组血清与rHu-IGF的结合



b)

以1/100稀释的第六组血清与rHu-EGF的结合

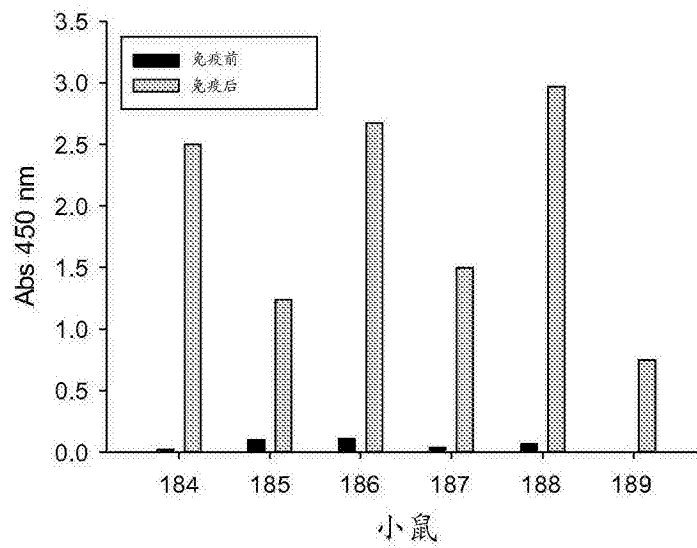


图41

