



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111978409 B

(45) 授权公告日 2024. 01. 26

(21) 申请号 202010734323.9
 (22) 申请日 2014.03.17
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 111978409 A
 (43) 申请公布日 2020.11.24
 (30) 优先权数据
 61/791,268 2013.03.15 US
 (62) 分案原申请数据
 201480026671.3 2014.03.17
 (73) 专利权人 因斯瑞拜奥有限公司
 地址 英国百慕大
 专利权人 基思·艾伦·查尔顿
 埃里克·东特
 丹尼尔·T·韦哈马尔
 (72) 发明人 基思·艾伦·查尔顿
 埃里克·东特
 丹尼尔·T·韦哈马尔
 (74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
 专利代理师 郑斌 刘振佳

(51) Int.Cl.
 C07K 19/00 (2006.01)
 A61K 39/00 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 (56) 对比文件
 US 5894018 A,1999.04.13
 CN 1374871 A,2002.10.16
 CN 1905892 A,2007.01.31
 CN 1484532 A,2004.03.24
 WO 2012116453 A1,2012.09.07
 Shenghua Li等.Pentabody-mediated antigen delivery induces antigen-specific mucosal immune response.Molecular Immunology.2009,第1718-1726页.
 2CHB_D.Chain D, Cholera Toxin B-Pentamer Complexed With Gm1 Pentasaccharide.Genbank.2012,1.
 Shenghua Li等.Pentabody-mediated antigen delivery induces antigen-specific mucosal immune response.Molecular Immunology.2009,第1718-1726页.

审查员 吕健

权利要求书3页 说明书15页 附图3页

(54) 发明名称

自组装合成蛋白

(57) 摘要

本公开提供了一种合成免疫原性蛋白,该合成免疫原性蛋白用于用作免疫调节剂以增强哺乳动物对抗原包括但不限于自身抗原的免疫反应,这些抗原含有缀合蛋白质或肽,否则免疫原性差。本公开的嵌合免疫原性蛋白可用于治疗许多疾病,包括但不限于癌症、感染性疾病、自身免疫疾病、过敏、和涉及哺乳动物宿主的免疫应答或受哺乳动物宿主的免疫应答影响的任何临床适应症。

去掉0.025		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	2.681	0	0	0	2.881	0.039	0.908
B	0	0	1.752	0	0	0	0.029	0	0	0	0	0	0.032
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.387	2.345	0.058
E	0	2.566	0	0	2.56	0	2.533	0	0	0	0	0	0
F	0	1.836	0	0	0	0	0	2.418	0.094	0	0.04	0.04	0.063
G	0.039	0	0	0.04	0	0	0	0	0.026	0	0.033	0.122	
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0.027	2.945	2.915	0.088	

WT WT(L7)med ctrl

1. 一种重组合成蛋白,包括:

单体序列,所述单体序列能够组装成稳定的均多聚体,其中每个单体序列包括:

来自霍乱毒素B (CTB) 的细菌全毒素的A1B5组的合成 β 亚基,其中CTB亚基包括突变T1F、P2T、Q3D、N4I、M37I、A38I、I39L、I40V、T41N、T78S、E79N、A80S、A95S、A102V和N103,其中所述突变相对于以下野生型CTB序列进行编号:TPQNI TDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYL TEAKVEKLCVWNNKTPHAI AAI SMAN,其中所述突变促进所述CTB亚基的五聚体形成,

肽间隔区,以及

多肽,其包括选自以下的生长因子:IGF-1、IGF-2、FGF1、FGF2、TGF- α 、TGF- β 、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF、NGF、EGF、HGF、BMP's、PDL1和IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5和IL-6,

其中所述多肽通过所述肽间隔区与所述合成 β 亚基分开。

2. 根据权利要求1所述的重组合成蛋白,其中CTB的 β 亚基还包括选自L8I、A10G、F25L、A32V、N44G和V82I及其组合的突变。

3. 根据权利要求1或2所述的重组合成蛋白,其中CTB的 β 亚基为SEQ ID NO:1。

4. 根据权利要求1或2所述的重组合成蛋白,其中所述生长因子包括表皮生长因子(EGF)。

5. 根据权利要求1所述的重组合成蛋白,其中所述生长因子包括转化生长因子(TGF)。

6. 根据权利要求1所述的重组合成蛋白,其中所述生长因子包括生长因子的中和结构域。

7. 根据权利要求1所述的重组合成蛋白,其中所述生长因子是人自身蛋白生长因子。

8. 根据权利要求1所述的重组合成蛋白,其中所述蛋白包括至少两种不同生长因子,或者所述多肽包括至少两种不同的生长因子或两种不同的人自身蛋白生长因子的中和结构域。

9. 根据权利要求1所述的重组合成蛋白,其中所述多肽包括所述蛋白中的一种或更多种生长因子的作为单个结构域或者作为两个或更多个多重重复序列的全长或中和结构域。

10. 根据权利要求1所述的重组合成蛋白,其中所述多肽间隔区选自SSG、SSGGG、SGG、GGSGG、GGGGs、SSGGGSGGSSG、GGSGGTSGGGSG、SGGTSGGGGSGG、GGSGGTSGGGGSGG、SSGGGSGGSSG、SSGGGSGGGSSG、SSGGGSGGSSGGG和SSGGGSGGGSSGGG。

11. 根据权利要求1所述的重组合成蛋白,其中所述肽间隔区包括生长因子或其中中和结构域。

12. 根据权利要求1所述的重组合成蛋白,其中所述肽间隔区包括一种或更多种宿主T细胞表位。

13. 根据权利要求1所述的重组合成蛋白,其特征在于所述重组合成蛋白包括SEQ ID NO:1

FTDIITDICGEYHNTQIHTLNDKILSYTESLVGKREIILVNFKGGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLSNSKIEKLCVWNNKTPHSIAAISMVR或者SEQ ID NO:2

ALD TNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNP GASAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCSGGSGGTSGGGGSGFTDIITDICGEYHNTQIHTLND

KILSYTESLVGKREIILVNFKGGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLSNSKIEKLCVWNNKTPHSIAAISMVR。

14. 一种制备多价分子的方法,包括:

由权利要求1所述的重组合成蛋白的单体亚基组装多聚体以形成所述多价分子。

15. 一种制备疫苗制剂的方法,包括:

将权利要求1所述的重组合成蛋白的一种或更多种单一一价多聚体混合在一起,以制备所述疫苗制剂。

16. 权利要求1所述的重组合成蛋白在制备用于治疗患者的药物中的用途。

17. 一种重组合成蛋白,包括:

来自霍乱毒素B (CTB) 的细菌全毒素的A1B5组的合成 β 亚基,其中CTB亚基包括突变T1F、P2T、Q3D、N4I、M37I、A38I、I39L、I40V、T41N、T78S、E79N、A80S、A95S、A102V和N103,其中所述突变相对于以下野生型CTB序列进行编号:TPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAI A A I S M A N,其中所述突变促进所述CTB亚基的五聚体形成,肽间隔区,以及

多肽,其包括具有免疫原性序列的肿瘤抗原,其中所述多肽通过所述肽间隔区与合成 β 亚基分开。

18. 根据权利要求17所述的重组合成蛋白,其中CTB的 β 亚基还包括选自L8I、A10G、F25L、A32V、N44G和V82I及其组合的突变,或者其中CTB的 β 亚基为SEQ ID NO:1。

19. 根据权利要求17所述的重组合成蛋白,其中所述多肽包含一种或更多种不同的肿瘤抗原。

20. 根据权利要求17所述的重组合成蛋白,其中所述肿瘤抗原包括一种或更多种不同的肿瘤抗原的全长或一部分。

21. 根据权利要求17所述的重组合成蛋白,其中所述肿瘤抗原包括一种或更多种肿瘤抗原的作为单个表位或多重重复序列形式的全长或一部分。

22. 根据权利要求17所述的重组合成蛋白,还包括第二多肽,所述第二多肽包括表达生长因子的至少一个附加序列。

23. 根据权利要求22所述的重组合成蛋白,其中所述第二多肽包括选自由以下生长因子组成的组的下列生长因子中的一种或更多种:IGF-1、IGF-2、FGF1、FGF2、TGF- α 、TGF- β 、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF、NGF、EGF、HGF、BMP^s、PDL1和IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5和IL-6。

24. 根据权利要求23所述的重组合成蛋白,其中所述第二多肽包括至少两种不同的生长因子的全长或中和部分。

25. 根据权利要求23所述的重组合成蛋白,其中所述第二多肽包括一种或更多种生长因子的作为单个表位或者作为两个或更多个串联重复序列的全长或中和部分。

26. 根据权利要求17所述的重组合成蛋白,还包括SEQ ID NO:1的多肽序列。

27. 根据权利要求26所述的重组合成蛋白,还包含受体的至少一部分,其包括两种至四种不同的受体的一部分或全长受体。

28. 根据权利要求26所述的重组合成蛋白,还包括含有与所述多肽序列一起的生长因子的至少一部分的第二序列,其中所述生长因子包括选自由以下生长因子组成的组的下列

生长因子中的一种或更多种的全长或其部分：IGF-1、IGF-2、FGF1、FGF2、TGF- α 、TGF- β 、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PDGF、NGF、EGF、HGF、BMP's、PDL1和IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5和IL-6。

29. 根据权利要求28所述的重组合成蛋白，其中所述第二序列包括所述合成蛋白中的一种或更多种生长因子的作为单个表位或者作为两个或更多个串联重复序列的全长或中和部分。

自组装合成蛋白

[0001] 本申请是申请号为201480026671.3的中国专利申请的分案申请,原申请是2014年3月17日提交的PCT国际申请PCT/IB2014/001125于2015年11月10日进入中国国家阶段的申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及合成蛋白支架的生成,该合成蛋白支架表现出有利于在使用合成蛋白时向宿主免疫系统递送和呈递抗原的特异性功能和生物物理特性,即使所述抗原在宿主中为免疫原性差的或为非免疫原性的,使得诱导宿主对抗原产生特异性抗体应答。描述一种合成蛋白,该合成蛋白对哺乳动物免疫系统具有免疫原性,并且可组装成稳定的限定多聚体。另外,描述一种方法,该方法用于使用所述蛋白质以向免疫原性差或非免疫原性的肽赋予免疫原性并且诱导对这些肽的特异性抗体应答。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2013年3月15日提交的题为“Synthetic Self-Assembling Immunogenic Proteins”的美国专利申请序列号61/791,268的优先权,该专利以引用的方式全文并入本文。

背景技术

[0005] 将外来(非自身)物质,即抗原,引入脊椎动物的免疫系统通常导致诱导宿主针对该抗原的免疫应答。通常这将涉及B淋巴细胞和/或T淋巴细胞的刺激,以及识别并且结合至该抗原的免疫球蛋白分子(抗体)的产生。存在大量影响物质在宿主中诱导免疫应答的程度的因素。当免疫系统演进并且发展成对“自身”无应答时,外来性的程度是重要的。大小也是一个显著因素,较大分子大体上比较小分子更具免疫原性。低于约1000Da分子量的分子(分类为半抗原)太小,以致于无法以分离的形式被免疫系统发现,并且因此是非免疫原性的,尽管这些分子仍具有抗原性。

[0006] 较大分子将更复杂,并且因此更可能含有多个免疫原性表位,并且还更易于被抗原呈递细胞(APC)吞噬和处理。物质的组成也是重要的,其中蛋白质无疑为最具免疫原性的。多糖的免疫原性小得多(以分离的形式),并且核酸和脂质基本上无免疫原性。类似地,颗粒抗原或变性抗原比可溶分子和天然分子更具免疫原性。外来物质的暴露途径和生物活性也可显著影响宿主的任何免疫应答的性质和程度。例如,与免疫系统的组分或细胞相互作用的物质的肠胃外注射将导致比相对惰性或非活性物质的粘膜暴露(摄取/吸入)更强的应答。

[0007] T细胞和B细胞以不同的方式识别外来抗原并且对外来抗原作出应答。特化的抗原呈递细胞或APC(巨噬细胞、树突状细胞和B细胞)通过从细胞外空间吸收分子(包括大分子和完整微生物)并且处理这些分子的蛋白内容物来连续地询问它们的环境。外源蛋白由核内体的一组蛋白酶消化,并且所得肽显示在细胞表面上MHC II分子的沟槽中。这些肽继而由T细胞表面上的专门受体(TCR)识别。T细胞发展的过程确保显示对含有自身肽的MHC II

作出反应的受体的那些T细胞耗尽,并且仅识别外来序列的那些T细胞成功地成熟。T细胞识别的肽(T细胞表位)不变地是线性的,但是并不总是在肽来源的自然折叠蛋白质上暴露或可触及。

[0008] 相比之下,B细胞表面受体或免疫球蛋白(BCR)识别可溶蛋白(构象表位或变性表位)、半抗原、多糖,和较小程度上的一些脂质和核酸,并且主要与这些相互作用。BCR的特异性与B细胞可分泌的抗体的特异性相同。在结合其同源抗原之后,BCR内在化,并且结合的抗原经处理。只有当抗原是蛋白质,或连接到蛋白质组分时,抗原才会作为MHC II复合物的一部分被呈递在细胞表面上。在这些条件下,B细胞然后可用于被具有识别呈递肽的TCR的T辅助细胞刺激。就大的蛋白或复杂蛋白而言,B细胞可因此被许多不同的T细胞活化,这些T细胞不一定必须识别与BCR相同的抗原表位,但是所有T细胞将识别相同蛋白质的肽组分。脊椎动物免疫系统能够允许它们产生针对自身不具有免疫原性的抗原决定子的抗体。

[0009] 为了开发有效疫苗,必须以这种方式将抗原表位呈递到宿主免疫系统,以刺激强免疫应答,涉及T淋巴细胞和B淋巴细胞两者。不涉及效应子(辅助)T细胞的活化和B细胞受这些效应子(辅助)T细胞的后续刺激的免疫应答通常持续时间短,并且不产生抗原记忆,即当宿主第二次暴露于免疫原时,不引起更强力的且更快速的抗体应答。

[0010] 还常常需要引发能够抑制、阻断或以其他方式中和靶标的功能活性的抗体,并且因此提供对宿主的保护的疫苗。出于许多原因,这会呈现一个大的挑战。很多情况下,需要被抗体应答靶向的那些表位未得到鉴别,因为缺乏与该靶标相关的结构功能数据。即使当存在与靶标和靶标相互作用相关的详细信息时,所鉴别的表位可能不是免疫显性的,并且因此可能不产生在大多数患者中发现的应答。在其他情况下,关键保护性抗原决定子可能不是蛋白质,例如病原体糖蛋白上的多糖,并且因此以分离形式不具免疫原性(T细胞依赖性)。

[0011] 绝大多数疫苗通过胃肠外途径递送;但是粘膜递送存在许多优点,诸如患者的顺从性、自身施用、感染风险的减小、以及诱导粘膜免疫和系统性免疫两者的可能性。还存在许多要克服的障碍,诸如疫苗稀释、微菌群的存在、当口服给予时承受低pH以跨膜的需要、和对有效佐剂的需要(Vajdy等人,2004)。此外,粘膜施用可引起B细胞耐受性而非免疫应答。剂量也可对免疫应答具有主要作用。如果免疫原未被免疫系统有效清除,或如果系统被过高剂量侵没,则可诱导耐受性。相反地,过低剂量也可引起耐受性,或简单地无法刺激足够的免疫细胞。

[0012] 已发展多个方法以帮助克服这些困难。在大多数情况下,将疫苗与一些形式的佐剂一起施用。佐剂基本上是与免疫原一起施用,引起以下情况中的一个或多个的任何制剂:注射位点处免疫原的持续、共刺激信号的增强、淋巴细胞增殖的非特异性刺激或肉芽肿形成。佐剂具有多种形式,例如弗式完全佐剂由失活的分枝杆菌(*Mycobacterium*)组成,而其他佐剂包含水包油(例如角鲨烯)乳液。这些最常用于动物中,因为它们可致使注射位点处的不良反应。一些有机佐剂用于人类疫苗中,诸如Montanide[®](基于植物组分的矿物油),尽管更通常地,佐剂是无机佐剂,诸如铝盐。

[0013] 其中克服低免疫原性的最普及且广泛采用的方法是将鉴别的或期望的抗原或抗原决定子与强免疫原性载体偶联。载体是来源于不同的物质的蛋白质或多肽,例如牛血清

白蛋白 (BSA) 和钥孔血蓝蛋白 (KLH) 常常用作化学缀合的半抗原和小肽的载体以在动物中产生抗体 (Berzofsky和Berzofsky, 1993)。载体在大到足够被宿主免疫系统发现并且处理的分子上呈递半抗原, 并且还通过具有固有免疫原性来刺激宿主免疫应答。

[0014] 一般来讲, 来源于在种系发生方面更远离接收者的来源的载体蛋白是较好的。然后, 载体可能更与宿主蛋白不同, 并且因此更具外来性。选择载体蛋白时的另一个重要的考虑因素是以下可能性, 即如果该载体蛋白是宿主蛋白的同系物, 并且因此分享显著的同源性, 则引发的免疫应答也可与宿主蛋白反应并且引起不良的副作用。非蛋白抗原仅可化学偶联, 这可限制对抗原连接在载体上的位置和抗原呈递方式的控制。小肽可化学上或基因上偶联。在研究的其他区域, 生物信息学的现代发展已引起免疫原, 并且尤其是肽的合理设计的提高。

[0015] 肽疫苗的构思是基于B细胞和T细胞表位的鉴定和化学合成, 这些表位是免疫显性的并且可诱导特异性免疫应答, 例如将靶分子的B细胞表位偶联到广泛识别的T细胞表位以使该表位具有免疫原性 (Naz R.K.和Dabir P., 2007)。当与较大和较复杂蛋白质抗原比较时, 可见肽相对易于产生。肽还可具有有利的化学稳定性, 并且不含致癌或感染可能, 这使它们成为有吸引力的疫苗候选物。但是, 若干障碍限制肽疫苗的普遍可用性, 包括通常它们的固有免疫原性低并且需要较好的佐剂和载体。其他研究提出, 重组嵌合蛋白可制成为更具免疫原性, 若T辅助表位以串联重复序列的形式掺入 (Kjerrulf M等人, 1997)。

[0016] 另一类普及的载体蛋白是细菌类毒素。就针对细菌感染的疫苗而言, 在感染的症状由毒素的作用造成的情况下, 那么这些毒素可用作疫苗本身。当然必须化学上地或通过使用无毒的组分来使毒素无效。在20世纪发展的此类衰减的毒素例如白喉和破伤风疫苗称为类毒素。诸如Wyeth (Pfizer)、Aventis Pasteur、GSK、Merck等公司的在使用或后期发展中的多糖-蛋白质缀合物疫苗使用破伤风、白喉或其他类毒素。

[0017] 许多人已提出霍乱毒素或大肠杆菌 (*E. coli*) 热不稳定肠毒素 (LT) 的B亚基作为各种疫苗应用的可用的载体蛋白 (Nemchinov, L.G等人, 2000; George-Chandy, A.等人2001; 美国专利6,153,203)。它具有高免疫原性, 并且在不存在CT-A亚基的情况下是无毒的。形成广泛使用的霍乱疫苗的基础, 当全身性使用时, 它被证实具有安全性。尽管相对小 (约12kDa), 但是它可组装成稳定的五聚体中, 这为它提供较高的分子量。

[0018] 许多研究人员尤其感兴趣的是利用CTB和肠毒素五聚体对 G_{M1} 神经节苷脂的亲合力, G_{M1} 神经节苷脂是有核细胞的表面上发现的一种支链五糖。在霍乱感染期间, 这种结合促进全毒素跨肠上皮易位。在文献中存在大量报道, 基于CTB融合 (化学或遗传的) 的疫苗在口服或鼻腔内施用时可对刺激粘膜免疫有效 (George-Chandy, A.等人, 2001; Houhui Song等人, 2003; Shenghua Li等人, 2009; Harakuni, A.等人, 2005)。为了保持与 G_{M1} 神经节苷脂 (其在相邻CTB亚基之间形成的口袋处结合) 反应的能力, 必须的是, 靶抗原不阻断 G_{M1} 结合位点的进入并且不阻止CTB多聚体的组装。

[0019] 已证实, 可对CTB进行遗传融合, 此类遗传融合成功地保持 G_{M1} 结合, 但是也存在限制。Liljeqvist, S.等人 (1997) 示出, 链状球菌蛋白G的血清白蛋白结合结构域可基因融合到CTB的N末端或C末端, 或同时融合到两个末端, 并且保持 G_{M1} 结合。然而应指出, N末端融合蛋白和双融合蛋白在形成稳定的五聚体方面效率显著较低, 并且在结合至 G_{M1} 方面不够有效。类似地, 已证实, 除非存在嵌合和野生型CTB两者的异种混合物, 否则大的遗传融合蛋白

不能形成五聚体 (Harakuni, A. 等人, 2005)。

发明内容

[0020] 根据本公开, 由于合成载体的固有免疫刺激和类似佐剂的特性, 合成载体的高免疫原性性质能够提高宿主对所包括的可变序列的免疫应答。还公开根据本公开的合成载体将使得宿主产生对至少部分地由可变序列编码的“自”抗原决定子的抗体应答。

[0021] 在一个例示性实施例中, 重组合成蛋白能够组装成稳定的均五聚体, 其中每个单体包括一个或多个来源于靶蛋白的抗原决定子。

[0022] 在另一个例示性实施例中, 重组合成蛋白能够组装成稳定的杂五聚体, 其中表达不同的抗原决定子的单体组装在一起。

[0023] 在另一个例示性实施例中, 重组合成蛋白基本上类似于以下序列:

FTDIITDICGEYHNTQIHTLNDKILSYTESLVGK EILVNFKGGATFQVEVP

[0024] GSQHIDSQKKAIERMKDTRLRIAYLSNSKIEKLCVW NKTPHSIAAISMVR
(序列 ID:1)

[0025] 在另一个例示性实施例中, 重组合成蛋白包括接头或间隔区序列, 由此定位在合成载体的一个或两个末端处的可变序列以这样的方式与合成载体分开, 其方式为使得若干重组蛋白的合成载体元件缔合。在一个例示性实施例中, 具有连接到生长因子的接头序列的重组合成蛋白基本上类似于以下序列:

ALDT YCFSSSTEK CCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCL

GPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRK

[0026] PKVEQLSNMIVRSCKCSGGSGGTSGGGGSGFTDIITDICGEYHNTQIHTL
NDKILSYTESLVGKREIILVNFKGGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDT
LRIAYLSNSKIEKLCVWNNKTPHSIAAISMVR (序列 ID:2)

[0027] 在另一个例示性实施例中, 重组合成蛋白将缔合成环形式的稳定的五聚体。其他多聚体组件, 例如但不限于二聚体、三聚体、四聚体和更大的多聚体也涵盖在本公开的范围。接头序列可以是变化的, 并且至少应足够长以通过合成载体结构域的缔合阻止可变抗原决定子序列在空间上抑制多聚体的组装。预期在本公开范围内的是, 接头或间隔区可以是柔性的, 从而允许稳定的五聚体的形成。

[0028] 在另一个实施例中, 多聚体的五聚体结构通过至少一个稳定分子的引入得以稳定。稳定分子可在与合成分子相同的细胞中共表达, 或另选地可外源添加。

[0029] 在一个实施例中, 稳定分子包括基本上类似于霍乱毒素的CT-A2结构域的序列。

[0030] 在另一个实施例中, 稳定分子包含与合成蛋白相互作用的序列诸如以稳定多聚体。进一步预期, 使用本领域中已知的公认制造技术, 这种稳定化可产生较大比例的五聚体形式。

[0031] 在另一个例示性实施例中, 稳定分子可用于将抗原结构域锚定到多聚体形式的合成蛋白。

[0032] 在另一个实施例中, 稳定分子的不连续重复可用于缔合两种或更多种多聚体形式的合成蛋白。

[0033] 在一个例示性实施例中,接头或间隔区序列将大体上是亲水的,并且是柔性的,使得这些序列不包括限定的二级结构。

[0034] 在另一个例示性实施例中,接头序列将是这样的,使得接头序列不直接或间接影响合成载体结构域的折叠,或可变抗原决定子结构域的折叠。

[0035] 在另一个例示性实施例中,接头序列将耐受细胞外蛋白酶的蛋白水解。

[0036] 在另一个例示性实施例中,接头或间隔区序列包括但不限于下列:SSG、SSGGG、SGG、GSGG、GGGS、SSGGSGGSSG、GSGGTSGGGSG、SGGTSGGGSGG、GSGGTSGGGSGG、SSGGSGGSSG、SSGGSGGSSG、SSGGSGGSSGG和SSGGSGGSSGG。

[0037] 在一个例示性实施例中,接头序列将包括单独或与可变抗原决定子或合成载体的旁侧序列结合形成T细胞表位的序列。优选地,T细胞表位将是当由MHC(主要组织相容性复合物) II类蛋白结合时如由人类T辅助细胞识别的T细胞表位。优选地,T细胞表位将由HLA(人类白细胞抗原)-DR子类的MHC II分子结合。

[0038] 在另一个例示性实施例中,合成重组蛋白在结构上与细菌全毒素的A1B5组的B-亚基同源。

[0039] 在另一个例示性实施例中,重组合成蛋白的多聚体能够结合至G_{M1}神经节苷脂。

[0040] 在一个例示性实施例中,合成重组蛋白是诱导哺乳动物宿主中免疫应答的免疫原性蛋白。

[0041] 在另一个例示性实施例中,合成重组蛋白是包括一个或多个可变序列的免疫原性蛋白,这些可变序列表现期望患者对其产生免疫应答的抗原决定子。可变序列可位于编码合成载体的序列的N末端和/或C末端,或可掺入合成载体编码序列中,使得可变序列适当地呈递到免疫系统的细胞。在一个优选的实施例中,可变序列以复制构象的方式呈递使得序列在序列来源的天然分子中显示,并且对于B细胞的免疫球蛋白细胞表面受体来说可触及。

[0042] 在另一个例示性实施例中,可变抗原决定子来源于信号分子,包括但不限于生长因子诸如肾上腺髓质素(AM)、促血管生成素(Ang)、骨形态发生蛋白、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子(HGF)、类胰岛素生长因子(IGF)、神经生长因子(NGF)和其他神经营养因子、血小板源性生长因子(PDGF)、转化生长因子 α (TGF- α)、转化生长因子 β (TGF- β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和血管内皮生长因子(VEGF)。

[0043] 在另一个实施例中,可变抗原决定子来源于参与疾病的发展或进展的其他配体分子,诸如但不限于PDL1。

[0044] 在另一个实施例中,可变抗原决定子来源于发现于细胞表面上并且参与调节细胞生长的信号事件的受体,诸如生长因子的天然受体。

[0045] 在另一个实施例中,可变抗原决定子来源于肿瘤抗原。

[0046] 在另一个实施例中,可变抗原决定子来源于细菌、病毒、真菌或其他病原体。

附图说明

[0047] 本公开所述的实施例在附图的图中示出,这些图旨在为示例性而非限制性的,在图中类似的参考标记旨在指代类似或对应的部分,并且其中:

[0048] 图1示出在3轮选择之后,由一组结合至固定的含半乳糖分子(GM1)的可溶突变菌

落产生的ELISA信号；

[0049] 图2示出在SDS凝胶上电泳的突变体文库中的一个的可溶突变蛋白的蛋白质印记，其中一些蛋白保持形成五聚体的能力，而其他蛋白未保持此能力；

[0050] 图3示出在选择和筛选若干突变体文库之后鉴定的突变的选择，图3(a)是突变体选择的序列，每个突变体从7个单独的突变体文库中的一个分离并且示出突变残基的分布，并且图3(b)是来源于编译源自若干不同的突变菌落的突变的合成蛋白的序列；

[0051] 图4示出四种编译突变体的GM1结合ELISA数据，示出两种菌落保持半乳糖结合能力，并且两种菌落未保持此能力；

[0052] 图5示出完全霍乱全毒素分子的结构；并且

[0053] 图6示出根据本公开的合成蛋白的序列(序列ID:1)；和根据本公开的包含编码人类TGF β 1(粗体)、柔性接头(斜体)和合成蛋白载体的序列的合成蛋白的另一序列(序列ID:2)。

具体实施方式

[0054] 本文公开本发明的重组蛋白或疫苗的详细实施例，但是应当理解，本发明所公开的实施例仅为示例性的，它们可以各种形式实施。因此，本文所公开的具体的功能上的细节不应解释为限制性，而是仅仅作为权利要求书的基础和作为用于教导本领域的技术人员以各种方式采用本文所公开的重组蛋白的代表性基础。

[0055] 本公开提供一种合成重组蛋白，该合成重组蛋白用于改善作为免疫原性重组蛋白的元件的最大数目的生长因子表位、肿瘤抗原表位和/或受体结合位点的呈递。

[0056] 在一个例示性实施例中，描述一种如序列ID:2所示的合成重组蛋白，该合成重组蛋白含有至少一种生长因子，包括但不限于人类转化生长因子(TGF)、肿瘤抗原、和/或受体。在另选的例示性实施例中，蛋白可表示基于已知免疫原性蛋白建模的其他免疫原性重组蛋白。此类重组蛋白为对人免疫系统具有高免疫原性的多肽的表达预期在本公开的范围。优选地，重组蛋白向嵌合蛋白质赋予附加的特性，例如高表达产量和制造容易性、口服稳定性和从肠通到血液流的能力，和/或先前的在人类中使用的安全性。

[0057] 如本文提供的某些例示性实施例包括在疫苗组合物和免疫学佐剂组合物(包括药物组合物)中的根据本公开的重组蛋白，免疫学佐剂组合物除重组蛋白之外含有至少一种佐剂，该佐剂是指此类组合物中具有佐剂活性的组分。

[0058] 具有此类佐剂活性的佐剂包括这样的组合物，即当施用给受试者诸如人类(例如人类患者)、非人类灵长类、哺乳动物或具有公认的免疫系统的另一种高级真核生物体时，该组合物能够改变(即，以统计显著的方式提高或降低，并且在某些优选的实施例中，增强或提高)免疫应答的效能和/或持续时间。在本文所公开的某些例示性实施例中，期望的一种或更多种抗原包含在蛋白质载体内，并且任选地一种或更多种佐剂可因此改变，例如引起或增强直接针对期望的一种或更多种抗原的免疫应答，抗原可同时施用或可在施用中在时间和/或空间上(例如，在不同的解剖位点)分开，但是某些例示性实施例并非旨在受如此限制，并且因此还预期以组合物的形式施用重组蛋白，该组合物不包括指定抗原，但可还包括但不限于一种或更多种共佐剂、咪唑并喹啉免疫应答调节剂。

[0059] 因此并且如上文所指出，佐剂包括具有佐剂效应的组合物，诸如皂草苷和皂草苷

拟肽,包括QS21和QS21拟肽(参见例如,美国专利5,057,540;EP 0 362 279 B1;W095/17210)、矾、植物生物碱诸如番茄碱、洗涤剂诸如(但不限于)皂草苷、聚山梨醇酯80、Span 85和硬脂基络氨酸、一种或更多种细胞因子(例如,GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-12、TNF- α 、IFN- γ)、咪唑并喹啉免疫应答调节剂和双茎环免疫调节剂(dSLIM,例如Weeratna等人,2005 Vaccine 23:5263)。

[0060] 包括皂草苷的洗涤剂在例如美国专利6,544,518;Lacaille-Dubois,M和Wagner H.(1996 Phytomedicine 2:363-386);美国专利5,057,540;Kensil,Crit.Rev Ther Drug Carrier Syst,1996,12(1-2):1-55;和EP 0 362 279 B1中提出。颗粒结构,称为免疫刺激复合物(ISCMS),包含Qui1 A(皂草苷)级分,具有溶血性并且已用于疫苗的制造中(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;W0 96/11711)。溶血的皂草苷QS21和QS17(Qui1 A的HPLC纯化级分)已被描述为有效系统佐剂,并且它们的制备方法在美国专利5,057,540和EP 0 362 279 B1中公开。这些参考文献中还描述了QS7(Qui1-A的非溶血级分)的用途,QS7可用作系统疫苗的有效佐剂。QS21的用途还描述在Kensil等人(1991.J.Immunology 146:431-437)中。

[0061] Q S21与聚山梨醇酯或环糊精的组合也是已知的(WO 99/10008)。包含Qui1A的级分诸如QS21和QS7的颗粒佐剂系统描述于W0 96/33739和W0 96/11711中。已用于系统性疫苗接种研究的其他皂草苷包括来源于其他植物物种诸如丝石竹(Gypsophila)和肥皂草(Saponaria)的那些皂草苷(Bomford等人,Vaccine,10(9):572-577,1992)。**[0203]**七叶皂苷是与皂草苷相关的用于本文公开的实施例的佐剂组合物的另一种洗涤剂。七叶皂苷在Merck Index(第12补充版:条目3737)中被描述为马栗树(horsechestnut tree)、七叶树(Aesculus hippocastanum)的种子中存在的皂草苷的混合物。七叶皂苷的分离被描述为是通过色谱法和纯化(Fiedler,Arzneimittel-Forsch.4,213(1953)),以及通过离子交换树脂(Erbring等人,美国专利3,238,190)。七叶皂苷(也称为七叶皂甙)的级分已被纯化并且示出具有生物活性(Yoshikawa M,等人(Chem Pharm Bull(Tokyo)1996年8月;44(8):1454-1464))。毛地黄皂苷是另一种洗涤剂,也在Merck index(第12版,条目3204)中被描述为皂草苷,其来源于毛地黄(Digitalis purpurea)的种子,并且根据Gisvold等人,J.Am.Pharm.Assoc.,1934,23,664;和Rubenstroth-Bauer,Physiol.Chem.,1955,301,621所述的工序纯化。

[0062] 用于根据某些本文公开的实施例使用的其他佐剂或共佐剂包括嵌段共聚物或生物可降解的聚合物,其是指本领域技术人员熟悉的一类聚合物化合物。可包括在疫苗组合物或免疫学佐剂中的嵌段共聚物或生物可降解聚合物的示例包括Pluronic.RTM.L121(BASF公司(Mount Olive,N.J.)),参见例如,Yeh等人,1996 Pharm.Res.13:1693)。

[0063] 某些另外的例示性实施例设想包括但不限于油的免疫学佐剂,这些免疫学佐剂在一些此类实施例中可贡献共佐剂活性,并且在其他此类实施例中可除此之外或另选地提供药学上可接受的载体或赋形剂。任何数量的合适的油是已知的,并且可选择用于包括在基于本公开的疫苗组合物和免疫学佐剂组合物中。此类油的示例,以例证的方式而非限制性地,包括角鲨烯、角鲨烷、矿物油、橄榄油、胆固醇和单油酸二缩甘露醇酯。

[0064] 免疫应答调节剂诸如咪唑并喹啉也在本领域中是已知的,并且在某些目前公开的实施例中也可作为佐剂或共佐剂包括在内。还如上文所指出,用于根据本公开如本文所述

的疫苗组合物的一种类型的佐剂或共佐剂可为铝共佐剂,一般称为“矾”。矾共佐剂是基于以下:羟基氧化铝;羟基磷酸铝;或各种专有的盐。矾共佐剂是有利的,因为矾共佐剂具有良好的安全记录、增强抗体应答、稳定化抗原,并且对于大规模生产来说相对简单(Edelman 2002 Mol.Biotechnol.21:129-148;Edelman,R.1980 Rev.Infect.Dis.2:370-383)。

[0065] 药物组合物

[0066] 在某些例示性实施例中,药物组合物是疫苗组合物,疫苗组合物包含根据本公开的重组蛋白,并且可还包含如本文所提供的一种或更多种组分,该一种或更多种组分选自TLR激动剂、共佐剂(包括例如,细胞因子、咪唑并喹啉免疫应答调节剂和/或dSLIM)等等和/或重组表达构建体,连同药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0067] 例示性载体在采用的剂量和浓度下对接收者是无毒的。对于包含重组蛋白的疫苗,通常通过真皮内、皮下、肌肉或静脉内途径,或通过其他途径施用约0.01 μ g/kg至约100mg/kg体重。对于本领域的技术人员显而易见的是,施用的数目和频率将依赖于宿主的应答。用于治疗用途的“药学上可接受的载体”在药物领域中为人们所熟知,并且描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack出版公司(A.R.Gennaro编辑,1985)中。例如,可使用生理pH下的无菌盐水和磷酸盐缓冲盐水。防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂可提供在药物组合物中。例如,可添加苯甲酸钠、抗坏血酸和对羟基苯甲酸的酯作为防腐剂。此外,可使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0068] 药物组合物可为允许将该组合物施用给患者的任何形式。例如,组合物可为固体、液体或气体(气溶胶)的形式。典型的施用途包括但不限于口服、局部、肠胃外(例如,舌下或颊面)、舌下、直肠、阴道和鼻内(例如,作为喷雾)。如本文所用,术语“肠胃外”包括离子电渗、透皮吸收超声波、被动透皮、微针施用,以及皮下注射、静脉内、肌肉内、胸骨内、海绵体内、鞘内、阴茎口内(intrameatal)、尿道内注射或输注技术。在具体实施例中,如本文所述的组合物(包括疫苗组合物和药物组合物)通过选自离子电渗疗法、微气穴、透皮吸收超声波或微针的技术真皮内施用。

[0069] 配置药物组合物,以便允许其中含有的活性成分在将组合物施用给患者之后是生物可利用的。施用给患者的组合物采取一个或更多个剂量单位的形式,其中例如,片剂可为单个计量单位,并且气溶胶形式的一种或更多种本发明化合物的容器可容纳多个剂量单位。

[0070] 对于口服施用,可存在赋形剂和/或粘合剂。示例是蔗糖、高岭土、甘油、淀粉糊精、藻酸钠、羧甲基纤维素和乙基纤维素。可存在着色剂和/或调味剂。可采用涂层外壳。

[0071] 组合物可为液体形式,例如酏剂、糖浆、溶液、乳液或悬浮液。作为两个示例,液体可用于口服施用或用于通过注射递送。当旨在用于口服施用时,优选的组合物含有甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和风味增强剂中的一种或更多种。在旨在通过注射施用的组合物中,可包含表面活性剂、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更多种。

[0072] 如本文所用的液体药物组合物,不管是溶液、悬浮液的形式还是其他类似形式,可包含以下载体或赋形剂中的一种或更多种:无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、优选地生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、不挥发油诸如角鲨烯、角鲨烷、矿物油、单油酸二缩甘露醇酯、胆固醇和/或合成甘油单酯或甘油二酯(可用作溶剂或悬浮介质)、聚乙二醇、甘油、丙

二醇或其他溶剂;抗菌剂诸如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲液诸如乙酸酯、柠檬酸酯或磷酸酯以及用于调节渗透压的试剂诸如氯化钠或右旋糖。胃肠外制剂可包封在安瓿、一次性注射器或由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地是无菌的。

[0073] 在具体实施例中,本发明的药物组合物或疫苗组合物包含小于0.2 μ m的稳定水性悬浮液,并且还包含选自由以下项组成的组的至少一种组分:磷脂、脂肪酸、表面活性剂、洗涤剂、皂草苷、氟化脂质等等。

[0074] 还期望在疫苗组合物或药物组合物中包含其他组分,诸如递送媒介物,包括但不限于铝盐、油包水乳液、生物可降解油媒介物、水包油乳液、生物可降解微胶囊和脂质体。用于此类媒介物的附加免疫刺激物质(共佐剂)的示例也在上文描述,并且可包括N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸(MDP)、葡聚糖、IL-12、GM-CSF、 γ 干扰素和IL-12。

[0075] 尽管在本发明的药物组合物中可采用本领域的普通技术人员熟知的任何合适载体,但是载体的类型将根据施用的方式和是否期望缓释而变化。对于肠胃外施用,诸如皮下注射,载体优选地包括水、盐水、醇、脂肪、蜡或缓冲液。对于口服施用,可采用上述载体中的任一种或固体载体,诸如甘露糖醇、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。生物可降解微球体(例如,聚乳酸半乳交酯(polylactic galactide))也可用作本发明的药物组合物的载体。

[0076] 药物组合物还可包含稀释剂诸如缓冲液、抗氧化剂诸如抗坏血酸、低分子量(小于约10个残基)多肽、蛋白质、氨基酸、碳水化合物(包括葡萄糖、蔗糖或糊精)、螯合剂诸如EDTA、谷胱甘肽以及其他稳定剂和赋形剂。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适当稀释剂。优选地,可使用适当赋形剂溶液(例如,蔗糖)作为稀释剂将产物配制成冻干物。

[0077] 在一个例示性实施例中,重组蛋白的表位或受体支撑结构域,不管来源于天然多肽序列还是合成多肽序列,应具有在适当的化学/环境条件下自组装成低聚多聚体,或在另选的条件下还原成单体的能力。理想的是,多聚化结构域将与离散数目的亚基例如二聚体、三聚体、四聚体、五聚体等组装成稳定的多聚体,使得生成均匀大小的产物。不受任何具体理论的约束,认为如序列ID:1所示的重组合成蛋白将允许与微不足道数量的亚基组装成稳定的多聚体。天然多肽的示例包括但不限于亮氨酸拉锁、1ac阻遏蛋白、链霉抗生物素蛋白/抗生物素蛋白、霍乱毒素B亚基、假单胞菌三聚合结构域和病毒衣壳蛋白。

[0078] 根据本公开,重组蛋白,不管是生长因子还是其部分、细胞受体还是其部分、肿瘤抗原还是其部分,对于生长因子和受体来说与广范围的涉及慢性疾病或癌症的细胞途径相关,并且对于在所述合成蛋白中的肿瘤抗原的使用来说与最广泛可能范围的实体肿瘤相关。蛋白可为重组蛋白的形式,并且可用于治疗慢性疾病,例如胸、肺、膀胱、卵巢、外阴、结肠、肺(pulmonary)、大脑、结肠直肠、肠、头部和颈部、以及食道的癌症。因为在所述疾病中不同的肿瘤抗原可表达并且多种细胞受体和生长因子过表达,所以下文所述的蛋白可含有一种或更多种不同的肿瘤抗原、与疾病相关联的一个或更多个细胞途径的一种或更多种不同的受体或生长因子。这些蛋白称为“多价的”。

[0079] 在本公开的上下文中,“中和结构域”定义为特异性结合对(例如生长因子和其同源受体)中任一成员或两个成员的一个或更多个区域,其中不是特异性结合对的成员的第

三分子结合至前述区域将阻止特异性结合对的两个成员的后续结合。第三分子可为另一个蛋白分子,包括但不限于抗体,或可为小的非蛋白分子,并且可为天然或合成来源的。通常中和结构域包括特异性结合对的成员的在结合期间直接接触的那些区域,并且还包以下区域,在所述区域外的在结合第三分子时引入足够的空间位阻以阻止特异性结合对的成员直接结合的区域。

[0080] 本领域中确定的是,配体被其同源受体特异性识别是由受体的结合位点和配体的具体分子标记(表位)之间的相互作用限定的。因此结合至或以其他方式阻断受体结合位点,或结合至或以其他方式阻断配体的识别表位的抗体将阻止配体受体相互作用。此类抗体描述为“中和的”。在本公开的上下文中,希望在施用重组蛋白之后宿主生成中和抗体,并且因此蛋白序列可表达或包括生长因子或肿瘤抗原中的一者或多者、或所有生长因子或肿瘤抗原、或来源于生长因子或肿瘤抗原的合适序列,使得受体结合所需的表位以功能性(自然)构象呈递。

[0081] 除表达以每身体位点单个肿瘤抗原、受体和/或生长因子或其部分的形式,和/或以重复肿瘤抗原、受体和/或生长因子序列(例如, $n=1$ 或更大)的链的形式呈递的单个肿瘤抗原、受体和/或生长因子的多个拷贝之外;根据本公开的蛋白质还可包含在重组蛋白的序列内不同位置处的以单个或多个链的形式存在的两种或更多种不同的肿瘤抗原、受体和/或生长因子的一个或更多个表位或结合位点的表达。

[0082] 在一个例示性实施例中,公开一种蛋白,该蛋白由表达一个或更多个表皮生长因子(EGF)中和结构域的均质重组蛋白组成。蛋白可为重组蛋白的形式,并且可用于治疗慢性疾病,例如胸、肺、膀胱、卵巢、外阴、结肠、肺、大脑、结肠直肠、头部和颈部、和食道的癌症。在一个例示性实施例中,蛋白是根据本公开的表达或包括EGF序列和合成多肽序列的重组蛋白。在一个例示性实施例中,合成多肽序列基本上类似于序列ID:1。

[0083] 在另一个例示性实施例中,公开一种蛋白,该蛋白由表达一种成纤维细胞生长因子(FGF)的均质重组蛋白组成。

[0084] 在另一个例示性实施例中,蛋白是根据本公开的表达或包括FGF序列和合成多肽序列的重组蛋白。

[0085] 在另一个例示性实施例中,公开一种蛋白,该蛋白由表达一种转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)的均质重组蛋白组成。在一个例示性实施例中,蛋白是根据本公开的表达或包括TGF- $\beta 1$ 序列和合成多肽序列的重组蛋白。

[0086] 在另一个例示性实施例中,公开一种蛋白,该蛋白由表达一种转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)的均质重组蛋白组成。在一个例示性实施例中,蛋白是根据本公开的表达或包括TGF- $\beta 1$ 序列和基本上类似于序列ID:2的合成多肽序列的重组蛋白。

[0087] 在另一个例示性实施例中,公开表达一种胰岛素样生长因子-1(IGF-1)。在一个例示性实施例中,蛋白质是表达或包括IGF-1序列和合成多肽序列的重组蛋白,公开一种蛋白,该蛋白由表达一种肝细胞生长因子(HGF)的均质重组蛋白组成。

[0088] 在另一个例示性实施例中,蛋白是根据本公开的表达或包括HGF序列和合成多肽序列的重组蛋白。

[0089] 在另一个例示性实施例中,公开一种蛋白,该蛋白由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的均质重组蛋白组成。在一个例示性实施例中,蛋白

是根据本公开的表达或包括IGF-1序列、IGF-2序列和合成多肽序列的重组蛋白。

[0090] 在另一个例示性实施例中,公开一种蛋白,该蛋白由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) 的均质重组蛋白组成。在一个例示性实施例中,蛋白是根据本公开的表达或包括VEGF-A中和结构域序列、VEGF-C序列和合成多肽序列的重组蛋白。

[0091] 实例

[0092] 在以下实例中更详细地描述本公开的方面。但是,以下实例不旨在将本公开的范围限制于以下示出的方法或构造的精确细节。以下实例中示出并且描述实际和例示性实施例。但是,应当理解,本领域的技术人员可在本公开的实质和范围内做出修改和改进。

[0093] 实例1:可选碳水化合物结合显示系统的构建

[0094] 需要一种可由此生成突变体的文库并且筛选具有期望特性的突变体的系统,该系统包括在克隆的不同群体的可选表型和编码基因型之间的物理连锁。这种系统使用利用于尤其在抗体工程的领域中产生较大效果的已建立的技术发展。

[0095] 在带有合适的选择性标记 (M13-K07“噬菌体”) 的完整独立地功能性M13“噬菌体”载体,和仅包括病毒的F1包装区域和次要外壳蛋白编码基因的“噬粒”载体中,在M13噬菌体的次要外壳蛋白基因 (基因III) 的上游框内克隆编码选择的碳水化合物结合结构域的基因。当引入到合适的细菌宿主诸如大肠杆菌 (E. coli) 中并且适当繁殖时,前者载体将产生病毒颗粒,这些病毒颗粒显示以次要外壳蛋白P3 (由基因III编码) 的N末端融合蛋白的形式在丝状病毒颗粒的一个末端处的选择的碳水化合物结合结构域的五拷贝。

[0096] 由于当使用噬粒/辅助噬菌体系统时病毒繁殖的性质,并且类似于本领域中操作的那样,后者载体将生成病毒颗粒,其中仅少数群体通常显示相同碳水化合物结合结构域-P3融合蛋白的一个或更少拷贝。

[0097] 将来源于每个载体的克隆在适当条件下繁殖,这是熟悉该技术的技术人员熟知的,并且通过ELISA针对对碳水化合物结合结构域所识别的主要碳水化合物的结合活性筛选含有病毒颗粒的培养上层清液。在此示例中,使用复合分子,该复合分子包括远端半乳糖基团,并且可易于通过吸附到典型96孔免疫测定板上进行固定。为了结合至碳水化合物基团,在碳水化合物结合口袋在相邻结构域之间形成时,两个或更多个碳水化合物结合结构域在复合物中缔合是必要的。

[0098] 在前者“噬菌体”实例中,这可能在单个病毒粒子上的相邻P3融合蛋白之间形成,受到融合蛋白的可接受的取向约束,或在独立的病毒颗粒之间形成。使用噬粒系统,此类缔合最可能在两个或更多个独立的病毒颗粒之间形成,因为预计在单个病毒粒子上包括两个或更多个融合蛋白的病毒的比例非常小。

[0099] 在筛选前述克隆之后,“一价”噬粒来源克隆生成比五价噬菌体克隆显著强的ELISA信号,后者还产生滴度低得多的感染性病毒颗粒。在此实例中噬菌体系统的不良性能不限制该系统在所述过程中的实用性,但据信更可能是这里采用的具体遗传连锁对系统施加的空间/取向约束,和/或融合蛋白 (P3次要衣壳蛋白质是病毒感染的介体) 施加的传染性限制的作用。因此选择基于噬粒的系统,以生成并且选择变体突变体蛋白。

[0100] 实例2:突变体克隆文库的产生

[0101] 编码突变多肽的克隆的文库产生自来源于碳水化合物结合自组装蛋白结构域的

遗传模板。在本实例中,蛋白结构域选自细菌全毒素的A1B5组。得自己公布的数据库诸如蛋白质数据库(Protein Data Base)的结构和功能信息和科学文献用于鉴定区域和/或特异性残基,区域和/或特异性残基被认为有可能或被证明涉及使模板蛋白结构域形成稳定的均五聚体、或与许多哺乳动物细胞类型的表面上发现的特异性含碳水化合物部分相互作用的能力。这些区域/残基从后续诱变和突变体筛选轮次排除。

[0102] 在认为适当时,选择并靶向如上定义的可能易于进行突变并且不涉及期望的特性的区域或残基以用于合理的或随机的诱变。为了最大化生成和选择与模板结构域不同的碳水化合物结合变体的机会,对于每个顺序轮次的文库构建筛选,将突变限于有限数目的紧靠的残基。

[0103] 根据靶向的区域或残基,突变是随机的(即包括可能地所有20种氨基酸),或功能上尽可能合理地限制于显示出与模板结构域中发现的那些类似的生物物理和/或化学特性的那些残基。

[0104] 在此类情况下认为相关的特性包括但不限于侧链大小、电荷、极性、疏水性/亲水性、和参与特异性二级结构诸如 α -螺旋的形成的能力。在可能/可行的情况下,将在任何给定位置中由模板编码的残基从突变体文库中删除以避免非突变体的选择。

[0105] 通过设计寡核苷酸引物生成文库,该寡核苷酸引物包括:序列的与模板基因同源的并使得引物(并且具体地其3'端)在适当条件下与模板DNA退火的区域,和其中包括适当的简并性以在一个或更多个位置中编码多样化的氨基酸的区域。

[0106] 在本实例中,使用本领域中指示的那些熟悉的限定的简并性构建此类寡核苷酸,由此在任何多样化位置中的DNA碱基按需要包含等量的2-4种碱基(G、A、T或C)。另选地,设想更受控的多样性,由此使用从三核苷酸亚磷酸胺的位置混合物生成的寡核苷酸,使得特异性残基(氨基酸)和它们的相对比例在每个多样化位置处受到精确控制。

[0107] 在将突变引入在任一末端处的情况下,使用一种或两种简并引物执行单个PCR反应(并且当必要时重复),以引入所需的遗传多样性。所得产物包括(引物来源的)旁侧限制位点,将该产物克隆到以上实例1中概述的噬粒载体中,使得变体蛋白的文库以框内遗传融合蛋白的形式编码到M13噬菌体的次要P3蛋白质编码基因(基因III)。

[0108] 在期望将多样性引入到在模板基因末端远侧的区域中的情况下,使用两对引物,使得每一对包括一个准确匹配模板序列的末端(5'或3')引物,和一个编码一些、所有所需多样性或不编码所需多样性的简并引物。设计简并引物的3'端,使得i)每个引物准确匹配模板序列,并且ii)每个引物与第二引物对的简并引物准确互补。

[0109] 以此方式,生成两种PCR产物,并且然后经由来源于简并引物的互补重叠序列使彼此退火并且连接。随后将所得产物以框内遗传融合蛋白的形式与基因III次要衣壳蛋白基因克隆到噬粒载体中。在从先前文库筛选并且选择一种或更多种克隆的输出之后建立连续文库,或从模板或一种或更多种选择的突变克隆平行地建立并且筛选连续文库。

[0110] 使用标准方法通过电穿孔将所有遗传构建体文库引入到宿主大肠杆菌TG1细胞中,并且将转化体铺到选择性培养基上。在适当的温育之后,将细菌的菌落从板上刮下,并且按需要储存和/或筛选。

[0111] 实例3:突变体文库的筛选

[0112] 为了从文库选择突变体,将(文库的)培养物接种到液体培养基(2×TY,100 μ g/ml

氨苄青霉素,1%葡萄糖)中,使得其中包括的细胞足以包括100-1000倍的预计多样性的表示,并且体积足以确保 OD_{600} 在0.1范围内。然后在约37°C下温育(伴以摇动)培养物,直到 OD_{600} 达到0.4-0.6(即,对数期生长)。然后通过以约20辅助噬菌体每细菌细胞的比率(OD_{600} 为1.0视为约 8.0×10^8 个细胞/毫升)添加M13 K07辅助噬菌体,使培养物感染。在约30min静态温育之后,将细胞再伴以摇动温育约30min。将卡那霉素添加至约50 μ g/ml,并且将培养物在约30°C下伴以摇动温育过夜。

[0113] 第二天上午,将培养物以约8,000g、约25-30min离心成细胞沉淀物,并且去除上层清液并保持。将细胞沉淀物舍弃。将20%体积的200mM NaCl、20%PEG 6,000添加到培养物上层清液,并且在冰上温育约1h以沉淀噬菌体颗粒。将噬菌体以约8,000g沉淀约25-30min,并且重悬浮于20%的初始体积PBS(磷酸盐缓冲盐水)中。同样,添加20%新体积的200mM NaCl、20%PEG 6,000,并且在冰上温育噬菌体约25-30min。再次将噬菌体以约8000g沉淀25-30min,并且将沉淀物重悬浮于约2ml磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。将所得悬浮液转移到一个或多个Eppendorf管中,并且以最大速度沉淀5min,以沉淀任何残余的细菌细胞/碎片。然后噬菌体悬浮液用于选择。

[0114] 为了进行选择,用合适的抗原诸如可固定的半乳糖衍生物或B亚基的天然配体以1-10 μ g/ml(通常5ml)涂布免疫管并且在4-8°C下过夜或在室温下放置1h。在用PBS洗涤3-5次(通过简单地倒入免疫管中并且再倒出)之后,通过在37°C下添加MPBS(含有2%乳粉的PBS)持续1-2h来将管封闭。如上文所述洗去MPBS,并且添加约 1×10^{11} 至 1×10^{12} 或更多个噬菌体颗粒。

[0115] 将体积补足到约5ml,并且例如用石蜡膜将免疫管密封。然后使免疫管“翻滚”(直立)约30min,然后静置温育约90min以允许显示来自突变体文库的能够识别固定配体的蛋白质的那些噬菌体结合至免疫管。通过洗涤去除未结合的,或仅弱结合的噬菌体。选择的严格性需要根据使用的洗涤数目、用以洗涤的PBST(含有0.1%Tween 20的PBS)的使用,或调节配体的涂层浓度来改变。

[0116] 通过添加1ml 100mM三乙胺(TEA)并且翻滚最长10min(更长的温育不利地影响噬菌体生存力),然后立即倒入0.5ml 1M Tris-HCl(pH 7.4)中用于中和来将结合的噬菌体颗粒从免疫管洗脱。将约0.75ml洗脱的噬菌体添加到约10ml合适的大肠杆菌(E.coli)菌株诸如TG1(Agilent)的对数期培养物中。将培养物在约37°C下在不摇动的情况下温育以允许感染。将感染的细胞的样品的系列稀释液铺展到含有100 μ g/ml氨苄青霉素和1%葡萄糖的小TYE板上。将其余细胞铺到带有相同培养基的较大生物测定板上。全部在约30°C下温育过夜。其他0.75ml噬菌体中,将约75 μ l如上感染到约1ml对数期大肠杆菌(E.coli)HB2151细胞中,并且如上将系列稀释液铺板并且温育。将其余噬菌体以甘油储备液(约15%甘油)的形式在约-80°C下储存。

[0117] 第二天,刮下大的生物测定板以去除细胞,然后将这些细胞如先前所述以甘油储备液的形式储存或用M13 K07辅助噬菌体生长并且“救出”以制备富集的噬菌体群体,用于下一轮选择。通常进行二至三个顺序轮次的选择。在选择完成之后,将HB2151细胞的小系列稀释液板的各个菌落拣取到含有约100 μ l/孔 $2 \times$ TY和100 μ g/ml氨苄青霉素的96孔培养板中,并且在37°C下摇动温育过夜。第二天,将来自每个孔的约5 μ l培养物以约150 μ l培养基/孔接种到新鲜板中,并且在约37°C下摇动温育约2小时。添加含有1M IPTG的另外的培养基

以得到1mM IPTG的最终浓度,并且将板在30℃下摇动温育过夜。在HB2151细胞中,用IPTG诱导引起可溶突变蛋白的表达,该可溶突变蛋白包括可检测的c-myc肽标签,而非融合到病毒颗粒的组分的蛋白,大肠杆菌(E. coli) TG1细胞的情况就是这样。将初始96孔培养板在约-80℃下储存。

[0118] 第二天,使用典型的ELISA方案,针对与固定碳水化合物的结合,测定诱导的96孔板的培养上层清液,并且用易得的HRP标记的抗c-Myc抗体检测结合(图1)。对于结合至GM1显示出强阳性的菌落以暗色单元示出。阳性和阴性对照用方框表示。

[0119] 将来自通过结合ELISA显示出强阳性的菌落的培养上层清液通过SDSPAGE和蛋白质印记进一步分析以评定五聚体和其他多聚体状态的存在,如图2所示。在电泳之前样品未被还原或煮沸,并且用HRP标记的抗c-Myc抗体检测蛋白质。在示出的实例中,菌落C1和C3是易于组装成约60kDa的五聚体的阳性对照。菌落C2是阴性对照,该阴性对照以12kDa单体的形式在所用的条件下运行。可见菌落A1和A3主要以五聚体的形式运行,而很大部分的菌落B12形成单体。其余菌落仅形成单体(B1、B7)或形成许多多聚体形式。

[0120] 实例4:突变的编译

[0121] 为了评定最大数目的残基适应突变的能力,构建各自靶向模板的不同的残基或区域的若干个不同的文库并且筛选。因此,识别出表现出结合至固定碳水化合物衍生物以及主要形成五聚体的期望选择标准的大量菌落,但是每个菌落包括多个独特的突变/差异,如图3A所示。为了生成带有可能增强的特性的菌落,有必要将这些变化的序列组合到少量菌落中。

[0122] 因为突变体生成和选择过程识别出可以容纳三种或更多种不同的残基的若干位置,设计总计四种组合突变体(A-D),如图3B所示。表达含有组合的突变的这四种菌落,并且通过ELISA与适当的对照比较来评估合成蛋白的结合,如图4所示。据发现,菌落中的两者(A和C)仅具有微弱的结合,而其他两种菌落(B和D)能够非常强地结合至GM1。这表明,来源于单独菌落的突变可成功地组合,但无法保证选择的结合特性的增强或甚至保持。

[0123] 实例5:均五聚体的稳定化

[0124] 作为其天然全功能形式,以组名“A1B5”描述的细菌全毒素包含五个B亚基和单个A亚基。B亚基组装成带有中心“孔”的五聚体环。单个A亚基位于该环的顶部,并且向下突出到空隙中,如图5所示。A亚基自身包含2个不同的结构域。当全毒素易位到细胞中时释放的A1结构域含有与蛋白质复合物的毒性相关联的酶活性。该酶活性作为全毒素的一部分由A2结构域保持。这样具有 α -螺旋结构,在该结构中A1结构域位于N末端,并且C末端突出到由5个B亚基形成的孔中。A2的C末端的一些残基与B亚基的残基形成相互作用。因为在B亚基与A2结构域的特定残基之间存在确认的相互作用(Zhang R.G.等人,1995),有理由提出A亚基,并且具体地A2结构域的存在有助于使五聚体B亚基环稳定。由于两个A亚基结构域之间的结构和功能差别,在不受任何具体理论束缚的情况下,认为A2结构域单独赋予对B亚基五聚体的该稳定化作用。类似地,众所周知在完全不存在A亚基的情况下,B亚基能够形成五聚体环,那么A2结构域有可能通过与B亚基共表达,或通过外源添加而与B亚基五聚体缔合,并且因此对B亚基五聚体施加稳定化作用。

[0125] 因此提出这样的合成或非天然存在的多肽:该合成或非天然存在的多肽与全毒素B亚基共享充分类似的构象,该多肽能够组装成多聚体包括五聚体环,并且在该多肽中对应

于与全毒素B亚基中的A2相互作用的那些残基的残基是相同的或共享相同的生物物理特性,那么此类合成蛋白五聚体可经历类似的稳定化有益效果。此外提出,在不存在天然A2结构域的情况下,使用本领域技术人员熟悉的技术诸如“噬菌体显示”,可将合成多肽从合适的多肽文库中分离,该合成多肽可在组装成五聚体时至少部分地结合至两种或更多种天然或合成单体的暴露表面,并且因此使结构稳定。

[0126] 因为天然存在的A2结构域支撑结构上独立的A1结构域,A1结构域自身不与全毒素的任何其他组分相互作用,那么有可能A2结构域或功能性合成等同物可提供锚固另一多肽结构域的部件。在不受任何具体理论束缚的情况下,认为与序列ID:1所示的多肽共享充分类似的构象的非天然存在的多肽自身有助于形成表现出稳定的五聚体环结构,该五聚体环结构允许如本公开中所述的表位的连接。

[0127] 尽管已结合某些实施例描述并且示出装置、系统和方法,但是许多变型和修改对于本领域技术人员来说是显而易见的,并且可在不脱离本公开的实质和范围的情况下作出。因此本公开不限于上文所述的方法或构造的精确细节,因为此类变型和修改旨在包括在本公开的范围之内。

[0128] 已采用的术语和表达用作说明书的术语且不作为限制,并且不意图在使用此类术语和表达中排除示出和描述的特征的任何等同物或其部分,但是认识到各种修改可能在受权利要求书保护的本发明的范围之内。因此,应理解,尽管已通过优选实施例和任选的特征具体描述了本发明,但是对本文公开的概念的修改和变型可由本领域技术人员实施,并且此类修改和变型视为在如随附权利要求限定的本发明的范围之内。

		去掉0.025											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0	0	0	0	0	2.681	0	0	0	2.881	0.039	0.908	
B	0	0	1.752	0	0	0.029	0	0	0	0	0	0.032	
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.387	2.345	0.058	
E	0	2.566	0	0	2.56	0	2.533	0	0	0	0	0	
F	0	1.836	0	0	0	0	0	2.418	0.094	0	0.04	0.063	
G	0.039	0	0	0.04	0	0	0	0	0.026	0	0.033	0.122	
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0.027	2.945	2.915	0.088	

WT WT(L7) med ctrl

图1

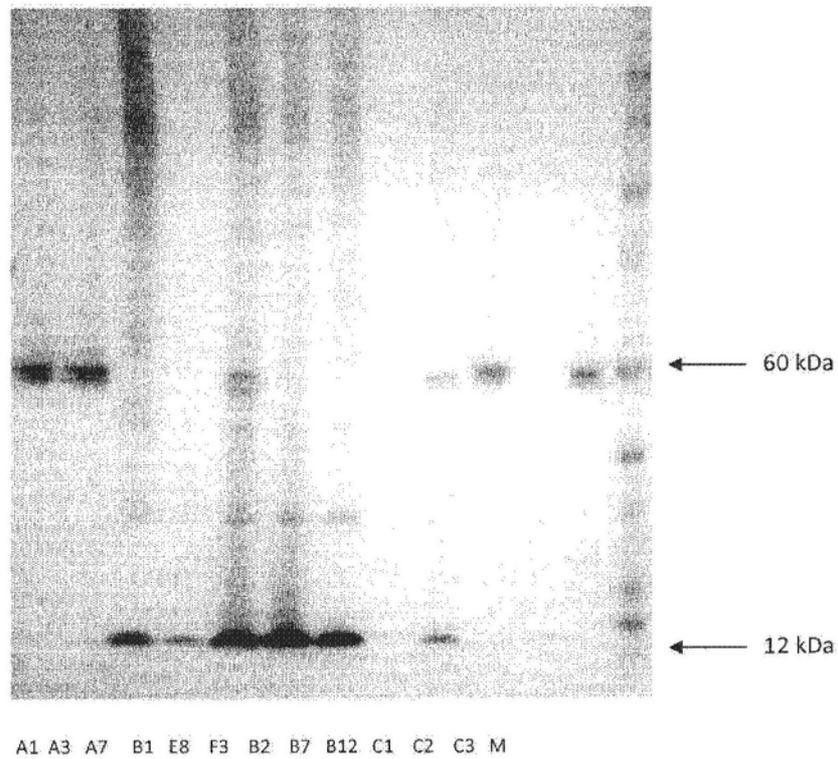


图2

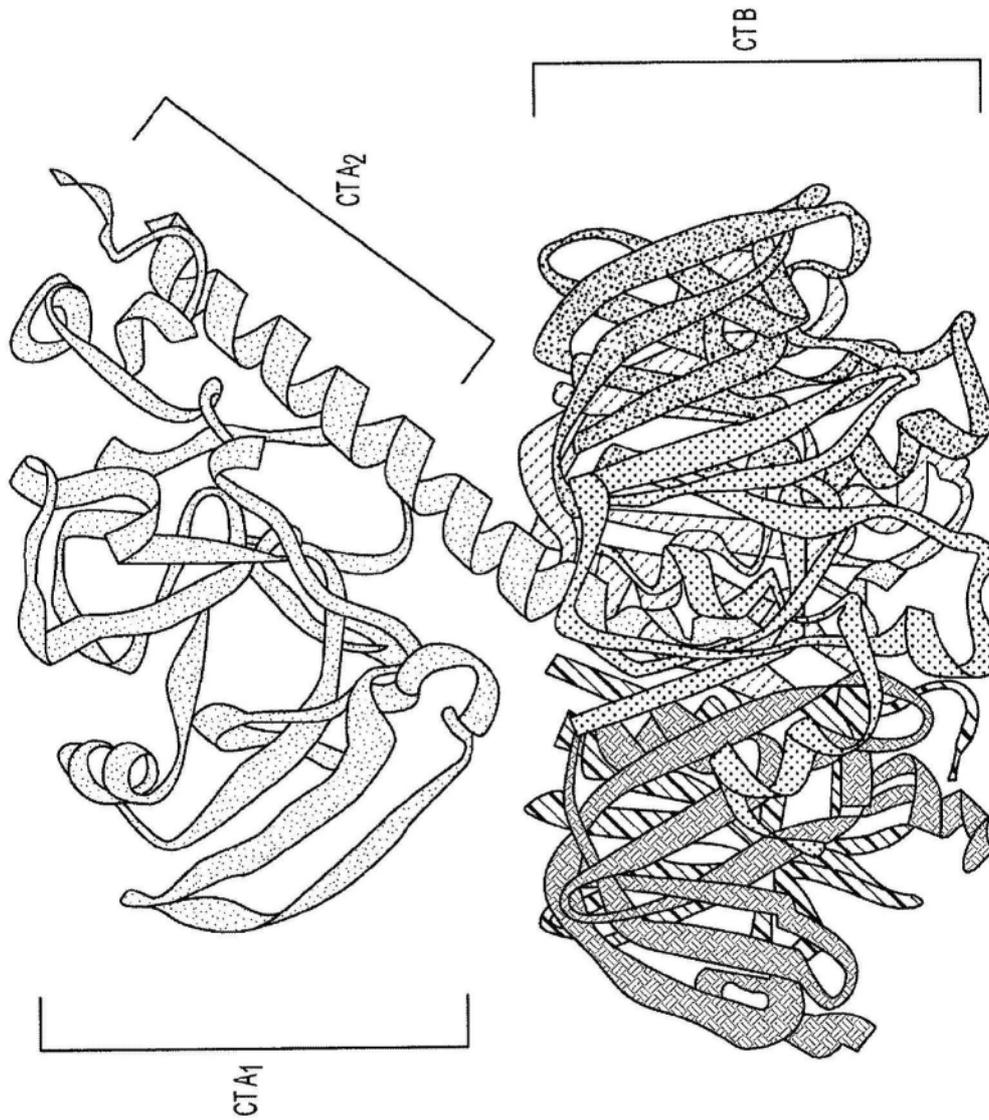


图5

(序列ID: 1)

FTDIITDICGEYHNTQIH TLNDKILSYTESLVGKREIILVNFKGGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIER
MKDTRLIAYLSNSKIEKLCVWNNKTPHSIAAISMVR

(序列ID: 2)

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQH
NPGASAAPCCVPQALEPLPIVYVGRPKVEQLSNMIVRSCKCSGGSGGTSGGGGSGFTDIITDICGEY
HNTQIH TLNDKILSYTESLVGKREIILVNFKGGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLIAYLSNSKIEKLC
VWNNKTPHSIAAISMVR

图6