

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 39/39

A61K 39/385 A61K 39/21

A61K 39/00

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813170.8

[43] 公开日 2002 年 10 月 16 日

[11] 公开号 CN 1374871A

[22] 申请日 2000.7.21 [21] 申请号 00813170.8

[30] 优先权

[32] 1999.7.21 [33] US [31] 60/144,965

[86] 国际申请 PCT/US00/19816 2000.7.21

[87] 国际公布 WO01/07081 英 2001.2.1

[85] 进入国家阶段日期 2002.3.21

[71] 申请人 利思进药品公司

地址 美国麻萨诸塞州

[72] 发明人 S·D·吉利斯 劳健明

J·S·小维索洛夫斯基

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 刘 玥

权利要求书 4 页 说明书 41 页 附图页数 14 页

[54] 发明名称 增强蛋白和肽抗原免疫原性的 Fc 融合蛋白

[57] 摘要

本发明公开了在哺乳动物中增强预选蛋白或肽抗原免疫原性的组合物和方法。通过将预选抗原与免疫球蛋白重链恒定区相融合制备 Fc - 抗原融合蛋白以增强免疫原性。Fc - 抗原融合蛋白与抗原呈递细胞表面的 Fc 受体结合，由此将该抗原靶向哺乳动物中的抗原呈递细胞。另外，还公开了佐剂家族，例如 Fc - 佐剂融合蛋白，其与 Fc - 抗原融合蛋白结合使用以增强或调节针对预选抗原的特定免疫应答。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

## 权 利 要 求 书

1. 一种在哺乳动物中增强预选抗原免疫原性的方法，该方法包括：

将一种包括通过多肽键连接到预选抗原上的免疫球蛋白重链恒定区的融合蛋白以肌内地，静脉内地，经皮地或皮下地方式施用于哺乳动物，  
5 由此引发针对预选抗原的免疫应答，与单独的预选抗原相比，融合蛋白中的预选抗原在哺乳动物中引起更强的免疫应答。

2. 如权利要求 1 的方法，进一步包括将融合蛋白与佐剂结合使用，相对于不加佐剂时针对所施用的融合蛋白中的预选抗原所引起的免疫应答而言，该佐剂的用量足以增强针对融合蛋白中的预选抗原的免疫应  
10 答。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中，融合蛋白和佐剂同时施用。

4. 如权利要求 2 所述方法，其中，所述佐剂包括一种融合蛋白，该融合蛋白包含通过多肽键与佐剂蛋白相连接的免疫球蛋白重链恒定区。

5. 权利要求 1 或 4 的方法，其中免疫球蛋白重链恒定区包括免疫球  
15 蛋白铰链区。

6. 权利要求 5 的方法，其中的免疫球蛋白重链恒定区包含选自以下的免疫球蛋白重链恒定区结构域：CH2 结构域，CH3 结构域，和 CH4 结构域。

7. 如权利要求 5 的方法，其中的免疫球蛋白重链恒定区包括 CH2  
20 结构域和 CH3 结构域。

8. 权利要求 1 或 4 的方法，其中免疫球蛋白重链恒定区由氨基酸序列定义，该氨基酸序列对应于定义存在于同种哺乳动物中的免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸序列。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其中定义免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸序列对应于人免疫球蛋白重链恒定区。  
25

10. 如权利要求 1 所述的方法，其中的预选抗原选自：前列腺特异的膜抗原，细胞因子受体胞外结构域，病毒蛋白和肿瘤特异性蛋白。

11. 如权利要求 4 的方法，其中的佐剂蛋白是细胞因子。

12. 如权利要求 11 的方法，其中的细胞因子由氨基酸序列定义，该氨基酸序列对应于定义存在于同种哺乳动物中的细胞因子的氨基酸序  
30 列。

13. 如权利要求 12 的方法，其中的细胞因子是人细胞因子。

14. 如权利要求 1 的方法，其中的哺乳动物是人。

15. 一种在哺乳动物中引发针对预选抗原的免疫应答的组合物，该组合物包含选自以下的以肌内地，静脉内地，经皮地或皮下的方式施用的混合物：

5 (a) 一种与佐剂相混合的抗原融合蛋白，该蛋白包含通过多肽键连接到预选抗原上的免疫球蛋白重链恒定区；和

(b) 与佐剂融合蛋白相混合的预选抗原，该佐剂融合蛋白包含通过多肽键连接到佐剂蛋白上的免疫球蛋白重链恒定区。

10 16. 如权利要求 15 所述的组合物，其中 (a) 款中的佐剂包含一种融合蛋白，该融合蛋白包含通过多肽键连接到佐剂蛋白上的免疫球蛋白重链恒定区。

17. 如权利要求 15 所述的组合物，其中 (b) 款中的预选抗原通过多肽键与免疫球蛋白重链恒定区相连接。

15 18. 权利要求 15, 16 或 17 所述的组合物，其中的免疫球蛋白重链恒定区包含免疫球蛋白铰链区。

19. 如权利要求 18 所述的组合物，其中的免疫球蛋白重链恒定区包含选自以下的免疫球蛋白重链恒定区结构域：CH2 结构域，CH3 结构域，和 CH4 结构域。

20 20. 如权利要求 18 的组合物，其中的免疫球蛋白重链恒定区包括 CH2 结构域和 CH3 结构域。

21. 如权利要求 15 的组合物，其中 (a) 款中的佐剂包含 CpG 寡核苷酸序列。

22. 如权利要求 15 的组合物，其中的预选抗原选自：前列腺特异的膜抗原，细胞因子受体的胞外结构域，病毒蛋白和肿瘤特异性蛋白。

25 23. 如权利要求 15 的组合物，其中 (a) 款中的抗原融合蛋白或 (b) 款中的佐剂融合蛋白通过二硫键与第二种免疫球蛋白重链恒定区相连 接。

24. 如权利要求 15 的组合物，其中 (a) 款中的佐剂或 (b) 款中的佐剂蛋白是细胞因子。

30 25. 如权利要求 24 的组合物，其中的细胞因子是人细胞因子。

26. 如权利要求 15, 16 或 17 的组合物，其中的免疫球蛋白重链恒定区由与定义人免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸序列相应的氨基酸序列

来定义。

27. 一种在哺乳动物中增强预选抗原免疫原性的方法，该方法包括：

将一种编码融合蛋白的核酸序列施用于哺乳动物，该融合蛋白包含连接到预选抗原上的免疫球蛋白重链恒定区，上述核酸序列在哺乳动物中表达即产生上述融合蛋白，与编码该预选抗原的核酸序列表达的单独预选抗原相比，该融合蛋白中的预选抗原引发更强免疫应答。

5 28. 如权利要求 27 所述的方法，其中的核酸序列沿 5' 到 3' 的方向编码免疫球蛋白重链恒定区和预选抗原。

10 29. 如权利要求 28 所述的方法，其中的免疫球蛋白重链恒定区包含免疫球蛋白铰链区。

30. 如权利要求 27 或 29 所述的方法，其中的免疫球蛋白重链恒定区包含选自以下的免疫球蛋白重链结构域：CH2 结构域，CH3 结构域，和 CH4 结构域。

15 31. 如权利要求 29 所述的方法，其中的免疫球蛋白重链恒定区包括 CH2 结构域和 CH3 结构域。

32. 如权利要求 27 所述的方法，其中的预选抗原选自：前列腺特异的膜抗原，细胞因子受体的胞外结构域，病毒蛋白和肿瘤特异性蛋白。

33. 如权利要求 27 所述的组合物，进一步包括该核酸序列与一种佐剂结合施用。

20 34. 如权利要求 33 所述的方法，其中的佐剂包括一种编码融合蛋白的核酸序列，上述融合蛋白包含和佐剂蛋白相连接的免疫球蛋白重链恒定区。

35. 一种在哺乳动物中引发针对预选抗原的免疫应答的组合物，该组合物包括：

25 (a) 编码包含免疫球蛋白重链恒定区和预选抗原的融合蛋白的第一核酸序列，该核酸序列在哺乳动物中表达即产生上述融合蛋白，与编码该预选抗原的核酸序列表达的单独预选抗原相比，融合蛋白中的预选抗原引发更强免疫应答，

(b) 一种佐剂。

30 36. 如权利要求 35 所述的组合物，其中的佐剂包括编码一种融合蛋白的第二核酸序列，该融合蛋白包含通过肽键和佐剂蛋白相连接的免疫球蛋白重链恒定区。

37. 如权利要求 35 或 36 所述的组合物，其中的免疫球蛋白重链恒定区包含免疫球蛋白铰链区。
38. 如权利要求 35 或 36 所述的组合物，其中的免疫球蛋白重链恒定区包含选自以下的免疫球蛋白重链结构域：CH2 结构域，CH3 结构域，  
5 和 CH4 结构域。
39. 如权利要求 37 所述的组合物，其中的免疫球蛋白重链恒定区包含选自以下的免疫球蛋白重链结构域：CH2 结构域，CH3 结构域，和 CH4 结构域。
40. 如权利要求 35 所述的组合物，其中的预选抗原选自：前列腺特  
10 异的膜抗原，细胞因子受体的胞外结构域，病毒蛋白和癌特异性蛋白。
41. 如权利要求 36 所述的组合物，其中的佐剂蛋白是细胞因子。
42. 如权利要求 35 所述的组合物，其中的第一核酸序列以可操作的  
方式在可复制的表达载体内处理。
43. 如权利要求 36 所述的组合物，其中的第二核酸序列以可操作的  
15 方式位于可复制的表达载体内。
44. 一种在哺乳动物中增强预选抗原免疫原性的方法，该方法包括：  
对一种哺乳动物同时或依次地施用包含抗原蛋白及定位蛋白的第一融合蛋白，和包含一种佐剂蛋白和上述定位蛋白的第二融合蛋白，所述的定位蛋白可在易受免疫系统影响的区域使第一和第二融合蛋白浓度提高。  
20
45. 一种在哺乳动物中增强预选抗原免疫原性的方法，该方法包括：  
对哺乳动物施用包括一种抗原蛋白，一种佐剂蛋白和一种定位蛋白的融合蛋白，所述的定位蛋白可在易受免疫系统影响的区域使上述抗原和佐剂蛋白浓度提高。

# 说 明 书

## 增强蛋白和肽抗原免疫原性的 Fc 融合蛋白

本申请要求申请日为 1999 年 7 月 21 日，申请号为 60/144, 965 的专利申请的优先权，该申请所公开的内容在此引用作为参考。

### 发明的技术领域

一般来说，本发明涉及在哺乳动物中增强预选蛋白或肽抗原的免疫原性的组合物和方法。更具体地说，本发明涉及编码包括免疫球蛋白重链恒定区和预选抗原的融合蛋白的核酸和氨基酸序列，与单独的预选抗原相比融合蛋白中的预选抗原能够在哺乳动物中诱导更强的免疫应答。

### 发明背景

传统的疫苗研制着重于生产能够中和感染抗原的防御抗体。目前，用作疫苗的抗原典型地包括灭活或减毒的微生物（例如细菌或病毒），它们的产物（例如毒素）或纯化抗原。随着现代分子生物学和基因克隆方法学的到来，使制备更纯，特异性更明显的疫苗成为可能。免疫系统分子水平上的知识使人们能分离和描述由感染抗原刺激的免疫应答。据认为对成功地产生免疫应答至关重要的两个免疫系统组分包括：调节和细胞毒性 T 细胞的关键作用；和通过抗原呈递细胞（APC）向这些细胞呈递抗原的方式。参见实施例，W.E.Paul, 编 (1993) 免疫学基础，Raven 出版有限公司，纽约。

典型地，从 APC 细胞外部接受的蛋白或多肽抗原(外源抗原)在 APC 细胞的胞吞囊或核内体中被降解。于是所得的肽片断与主要组织相容性复合体 (MHC) II 类蛋白形成复合物。所得的复合物移动到细胞表面并呈现于与该 APC 邻近的免疫细胞。肽片断与 MHC 分子形成的沟相匹配，并且该复合物可由表达对该复合物具有结合特异性的 T 细胞受体的 T 细胞所识别。肽结合的 MHC II 类分子与在本领域内称为 CD4 T 细胞的辅助性 T 细胞之间的相互作用可通过另一相互作用，即 MHC II 类分子自身与 T 细胞表面的 CD4<sup>+</sup>受体之间的相互作用予以进一步稳定。这样在 APC 细胞内加工的外源抗原通过 MHC II 类分子呈递到细胞表面。当 MHC II 类复合物呈现于 CD4<sup>+</sup> T 细胞表面时，可导致 CD4<sup>+</sup> 辅助细胞分泌细胞因子，该细胞因子刺激 B 细胞产生针对该肽的抗体。参见 Paul, supra.

用外源抗原接种疫苗典型地导致 CD4 细胞-介导的 T 细胞应答，这种应答一般导致抗体产生。细胞毒性 T 细胞（CTL）典型地不由这种途径所刺激。显然地，CTL 是由下述情况所刺激的，即其中的抗原源于 APC 自身内部（内源抗原），例如在病毒感染细胞中产生的病毒蛋白或在癌细胞中产生的癌症特异性蛋白。事实上在许多病毒性疾病中，认为 CTL 细胞的产生是去除病毒感染细胞的关键，由此使感染得以恢复。

研究表明内源抗原和外源抗原是经过不同加工的。在新生多肽形成过程中，部分多肽由一种称为 proteosome 的细胞内部结构降解。通过这一加工得到的片断与新合成的 MHC I 类分子而非 MHC II 类分子形成复合物，所得的含 MHC I 类分子复合物的抗原转运到细胞表面。再一次，对特异肽片段具有特异性的 T 细胞与 T 细胞结合，但在此种情况下，所需的共同受体相互作用出现在 MHC I 类分子和 CD8 分子之间。由此 APC 细胞表面的内源抗原呈现于 CD8<sup>+</sup> T 细胞。尽管有一部分 CD8<sup>+</sup> T 细胞不是细胞毒性的，但 CD8<sup>+</sup> T 细胞构成 CTL 的主要部分。

据此，显然对能诱导 CTL 应答的疫苗的设计，需要抗原分子（一般为蛋白）或是在细胞内产生或是运送到合适的细胞区室以进入 MHC 加工途径。一种策略是将编码所需蛋白或肽的基因掺入到病毒中，然后用该基因工程病毒作为疫苗（Lorenz 等（1999）人类基因治疗（HUM.GENE.THER.）10: 623-631）。另一种策略是将编码蛋白的 DNA 载体注射到细胞中，再将该细胞施与动物或病人使其从细胞内部表达，再通过 MHC I 类分子呈递到细胞表面。（Donnelly 等（1997）免疫学年评（ANNU.REV.IMMUNOL.）15: 617）。已经公开了一种将 DNA 载体直接注入肌肉或皮肤的简单技术，由此诱导对几种抗原的 CTL 和/或抗体应答（Lai 等（1988）免疫学 CRIT.综述（CRIT.REV.IMMUNOL.）18: 449-84 和美国专利 5,589,466）。研究结果表明抗原由 APC 摄入并加工由此呈现于免疫系统（Lai 等，见上）。

将外源的肽或蛋白运送到 MHC I 类途径已通过使用化学佐剂，例如弗氏佐剂、角鲨烯与去污剂的混合物（Hilgers 等（1999）疫苗 17: 219-228），及最近通过使用可被巨噬细胞吞噬并通过一种供选择的 MHC I 类途径诱导 CTL 应答的抗原包被小珠（De Bruijn 等（1995）欧洲免疫学杂志（EUR.J.IMMUNOL.）25: 1274-1285）获得了部分的成功。而且其它增强对抗原免疫应答的方法可包括将化学佐剂与重组免疫刺激细胞

因子，例如 IL - 2, IL - 12, GM - CSF 等结合使用。例如一种方法是用抗半抗原抗体与 IL - 2 融合作为将这一细胞因子与蛋白抗原相连接的途径，该蛋白抗原已与该半抗原发生过化学反应。（Harvill 等（1996）免疫学杂志 157: 3165）。

5 另一种技术通过将免疫球蛋白可变区的一部分区域用肽抗原替换开发出“抗原化”抗体。一旦重组抗体通过与 APC 细胞表面的 Fc 受体之间的相互作用结合于 APC，杂合分子的肽抗原即呈递于 APC ( Lanza 等 (1993) 美国国家科学院汇编 (PROC.NATL.ACAD.Sci.USA) 90: 11683-11687)。这种方法的一种扩展是将编码“抗原化的”免疫球蛋白重链的质粒 DNA 进行脾脏注射，此后当提供免疫球蛋白轻链部分时，脾 10 脏衍生的 B 细胞可分泌重组抗体。

15 抗体呈递系统的免疫原性是现代疫苗开发中的主要技术障碍之一。接种疫苗的目的是引起强免疫应答。但由于宿主的免疫系统已演化为对抗细菌和病毒，因而当用细菌或病毒作为载体时，信息将与信息载体一起遭到破坏。而且对某一病毒载体，例如牛痘和腺病毒的强免疫应答限制了它们的应用，可以理解在用细菌毒素作为蛋白载体时也会出现类似的问题。同样应用可变区的抗体衍生的“蛋白载体”由其特有的性质不被免疫系统视为“自体”，因而具有潜在地致免疫性。可以预见这些载体分子的多种应用均可以诱导抗独特型应答，因此妨碍了它们的有效应 20 用。据此，本发明的一个目的是提供一种疫苗，其可产生针对预选蛋白或肽抗原强且持久的免疫。

### 发明简述

本发明部分地基于下述发现，即可以通过将预选抗原与免疫球蛋白 25 重链恒定区相融合在哺乳动物中增强预选肽或蛋白抗原的免疫原性。所得的融合蛋白（这里也指“Fc-抗原融合蛋白”或“抗原融合蛋白”）或 编码融合蛋白的核酸序列以疫苗的形式施用于哺乳动物以引起针对预选抗原的免疫应答。而且发现所引起的针对预选抗原的免疫应答的强度和类型可以通过将特定的佐剂和 Fc-融合蛋白或编码 Fc-融合蛋白的核酸序 30 列一起使用得以调节。

据此本发明提供一种在哺乳动物中增强预选抗原的免疫原性的方法。一方面，该方法包括对哺乳动物施用足以引发免疫应答的量的 Fc-

抗原融合蛋白，该融合蛋白包括通过多肽键和预选抗原相连接的免疫球蛋白重链恒定区。另一方面，该方法包括对哺乳动物施用一种核酸序列，例如脱氧核糖核酸（DNA）或核糖核酸（RNA），该核酸序列编码包含融合于上述预选抗原的免疫球蛋白重链恒定区的Fc-抗原融合蛋白。在哺乳动物中与相当的（例如通过重量或分子数）单独预选抗原，即不与免疫球蛋白重链恒定区相融合的预选抗原相比，当该预选抗原作为Fc-抗原融合蛋白的一部分时以能够引发更强的免疫应答为特征。

而且，Fc-抗原融合蛋白所引发的针对预选抗原的免疫应答可以通过将一种佐剂与Fc抗原融合蛋白一起施用来进行增强或调控。尽管多种佐剂，例如化学佐剂如弗氏完全佐剂，或含非甲基化CpG序列的寡核苷酸均可用于实现本发明，目前优选的与Fc融合蛋白一起使用的佐剂包含一种第二Fc融合蛋白（此处指“Fc佐剂融合蛋白”或“佐剂融合蛋白”）或编码这样的Fc融合蛋白的核酸序列。优选的Fc佐剂融合蛋白包含通过多肽键和一种佐剂蛋白，如细胞因子相连接的免疫球蛋白重链恒定区。优选的用于构建Fc-佐剂融合蛋白的细胞因子包括，例如干扰素（IFN-γ）白细胞介素-2（IL-2），白细胞介素-4（IL-4）白细胞介素-12（IL-12）IL-8，肿瘤坏死因子（TNF），粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GMCSF）。另一类Fc-佐剂融合蛋白包括与一种佐剂组成成分相融合的免疫球蛋白重链恒定区，该佐剂组成成分相当于通常部分或专门与膜结合的蛋白的细胞外结构域。例如CD40配基与Fc组分相融合以用作增强的佐剂蛋白。

以共同地或一个接一个地方式共施用的Fc抗原和Fc佐剂融合蛋白（例如Fc-佐剂接着Fc-抗原或Fc-抗原接着Fc-佐剂）可以用于调控所引发的针对预选抗原的免疫应答的类型。称作Th1和Th2的两类免疫应答由不同的刺激物起始且包含不同的细胞因子。Th1介导的免疫应答本质上是典型的细胞免疫，而Th2介导的免疫应答本质上是典型的体液免疫。因此Th1应答可用于攻击变化的细胞，例如癌细胞或病毒感染细胞，而Th2应答可用于攻击细胞外抗原，如寄生虫。通常将细胞因子融合于免疫球蛋白重链恒定区对刺激普通的免疫应答或者起始或调节特异的Th1或Th2应答都是有用的。

例如包括通过肽键和GMCSF相连的免疫球蛋白重链恒定区的融合蛋白是对包括Th1和Th2应答再内的免疫反应的有效通用激活剂。一种

包含 IL-12 或 INF $\gamma$  的 Fc-佐剂融合蛋白可共施用以刺激初级细胞的或 Th1 介导的免疫应答。另外的，一种包括 IL-4 的 Fc-佐剂融合蛋白可以用于刺激初级体液的或 Th2 介导的免疫应答。

而且，对存在于 Fc-佐剂融合蛋白的特定细胞因子的选择可以影响针对 Fc-抗原融合蛋白中的预选抗原所产生的抗体的类型。例如包含 IL-12 的 Fc-佐剂融合蛋白可以刺激辅助 T 细胞，并产生 IgG2a 类抗体。而含 IL-4 的佐剂融合蛋白可以刺激 IgE 类抗体的产生。

正如前面所讨论的，在一个优选实施例中，该方法包括将 Fc-抗原融合蛋白或编码该 Fc-抗原融合蛋白的核酸序列与 Fc-佐剂融合蛋白一起施用。通过应用各自都包含免疫球蛋白重链恒定区的两种融合蛋白可以将预选抗原和佐剂蛋白（例如，细胞因子）共同定位于哺乳动物中的相同或相似细胞类型中。例如，在其表面表达 Fc 受体的巨噬细胞，B 细胞，粒细胞和树状细胞。

据此，通过共同施用 Fc-抗原和能与 Fc 受体结合的 Fc 佐剂融合蛋白可以将抗原融合蛋白中的抗原和佐剂融合蛋白中的佐剂共同定位于相同的细胞类型中。该佐剂能够刺激，增强或调节在预选抗原附近的免疫应答。

在这一优选实施例中，使用了两种不同的定位和浓度形式。首先，本发明使用了一种与抗原和佐剂都能融合的共同组分，它集中于体内特定的区域。在这种方式中，该佐剂附近抗原的有效局部浓度得以提高。

第二，本发明将该抗原靶向抗原加工和呈递系统。第一个浓缩步骤可通过将抗原和佐剂蛋白融合为一个组成成分并使其浓缩于机体中接近免疫系统的某一部分而进行。第二个靶向步骤是通过将抗原蛋白与任意可以增强向该抗原呈递系统递送或由该抗原呈递系统加工的组成成分相融合来进行的。

据此，本发明通过两种可供选择的方法达到这些浓缩效果。一种方法是构建和使用两种不同的融合蛋白，一种抗原定位蛋白融合体和一种佐剂-定位蛋白融合体。第二种方法是构建和施用一种包括所述抗原，佐剂和定位蛋白的融合体。Fc 组成成分是定位蛋白的例子。

上述免疫球蛋白重链恒定区不同于该 Fc 抗原融合蛋白中的预选抗原的一个重要的特征是，其在预期的受体中优选的是无免疫原性或弱免疫原性的。换句话说，在 Fc-抗原融合蛋白中，将预选抗原设计为比该免疫

球蛋白重链恒定区在受体中免疫原性强。

类似地，可以理解 Fc-佐剂融合蛋白在预期的受体中也应当是非或弱免疫原性的。可以通过使用来自或相似于那些预期受体的物种中的免疫球蛋白重链恒定区来降低，在特定的情况下甚至消除免疫球蛋白重链恒定区的免疫原性。例如用优选人源的免疫球蛋白重链恒定区用于生产施用于人的融合蛋白。类似地，当预期受体是人时 Fc-佐剂融合蛋白中的佐剂蛋白也优选人源的。通过选择合适的定义免疫球蛋白重链恒定区和佐剂蛋白的氨基酸序列，可以尽可能完善针对预选抗原的初级免疫应答。

在一个优选实施例中，Fc-抗原融合蛋白的免疫球蛋白重链恒定区包括免疫球蛋白铰链区，和选自以下的一种可选择的免疫球蛋白重链恒定区结构域：CH2 结构域，CH3 结构域和 CH4 结构域，或其组合。所述的免疫球蛋白重链恒定区优选地至少缺少 CH1 结构域。而且本发明的 Fc-融合蛋白，优选地缺少免疫球蛋白重链可变区结构域 ( $V_H$ )。当将该融合蛋白施用于人时，所述免疫球蛋白重链恒定区优选地包含铰链区，和 CH2 结构域或 CH3 结构域，最优选包含铰链区，CH2 结构域和 CH3 结构域。可以理解对本发明有用的免疫球蛋白重链恒定区结构域可以来自在本领域中被称为 IgA(Iga), IgD(Ig5), IgE(Igs), IgG(Igy), 和 IgM(Igp) 的五种免疫球蛋白中的任意一种。但源于 IgG 类的免疫球蛋白重链恒定区是优选的。

可以理解任何所需的预选抗原均可包含在本发明的 Fc-抗原融合蛋白中。在一个优选实施例中，预选抗原选自下面的组，该组包括：前列腺特异性膜抗原，细胞因子受体的胞外结构域，病毒蛋白和癌症或肿瘤特异性抗原。

具有多种构型的 Fc-抗原融合蛋白对实施本发明可能是有用的。例如，预选抗原的 N-末端可以通过多肽键与免疫球蛋白重链恒定区的 C-末端相连。或者预选抗原的 C-末端可以通过多肽键与免疫球蛋白重链恒定区的 N-末端相连。而且可以理解 Fc-抗原融合蛋白可以包括多种一个或多个预选抗原，其中的一个或多个可以直接或通过多肽接头彼此连接或与免疫球蛋白重链恒定区相连接。而且两个或更多的 Fc-抗原融合蛋白可以非共价地或共价地，例如通过一个或多个二硫键连接在一起形成二聚体或多聚体组合物。可以理解在二聚体或多聚体构建体中的 Fc 抗原融合蛋白可以彼此相同或不同。例如，即便两个 Fc 抗原融合蛋白可能包含

相同的免疫球蛋白重链恒定区，其预选抗原可能不同。可以理解 Fc-佐剂融合蛋白也可以应用类似的构型。

而且，编码 Fc 融合蛋白的多种核酸序列对于实现本发明都是有用的。例如，该核酸序列可以沿 5' 到 3' 的方向编码免疫球蛋白重链恒定区和预选抗原或预选抗原和免疫球蛋白重链恒定区。而且该核酸序列还可以任选地包括基于例如与免疫球蛋白重链恒定区的铰链直接相融合的免疫球蛋白轻链序列的“前导”或“信号”序列。在一优选实施例中，当 Fc 区域基于 IgG 序列时，该 Fc 区域沿 5' 到 3' 的方向编码至少包括免疫球蛋白铰链区（即铰链区包含至少一个能与第二种免疫球蛋白铰链区序列形成二硫键的半胱氨酸），免疫球蛋白 CH2 结构域和 CH3 结构域。而其编码 Fc 抗原融合蛋白的氨基酸序列还可以整合到可复制的表达载体中，该表达载体可以在例如细菌宿主，预期受体或以上两者中表达 Fc 融合蛋白。

可以将编码 Fc-抗原融合蛋白的核酸序列单独或与编码 Fc-佐剂融合蛋白的核酸序列一起注射可以引起细胞免疫应答，体液免疫应答或以上两者。与单独应用核酸或蛋白所引起的免疫相比，将基于核酸或基于蛋白的免疫相结合（例如在施用编码 Fc-抗原融合蛋白的核酸之前，之后或过程中施用 Fc-抗原融合蛋白）可以产生彼此的协同作用进而引发针对预选抗原更强的免疫应答。

本发明的上述和其它目的，特征和优点将通过下述的详细描述附图和权利要求显得更为清晰。

#### 附图的简要说明

本发明的上述和其它目的，特征和优点和该发明本身可以通过下述优选实施例的详细描述并结合附图得到更加完全的理解，其中附图 1A-1G 是用于实施本发明的 Fc 融合蛋白示例的图示介绍。图 1A 表示 Fc-抗原融合蛋白或 Fc-佐剂融合蛋白，其中免疫球蛋白重链恒定区 1 连接在抗原或佐剂 2 的 N 末端。图 1B 表示 Fc-抗原融合蛋白或 Fc-佐剂融合蛋白，其中免疫球蛋白重链恒定区 1 连接在抗原或佐剂 2 的 C 末端。图 1C 和图 1D 表示一种二聚体蛋白，其中两条多肽链之一或两者都包含 Fc-抗原融合蛋白或 Fc-佐剂融合蛋白。在图 1C 中在至少一条多肽链中连接到抗原或佐剂 2 的 N 末端，在图 1D 中免疫球蛋白重链恒定区 1 连接到抗原或佐剂 2 的 C-末端。图 1E 表示一种蛋白二聚体，其中的多肽链之一或

两者都包含 Fc-抗原-抗原，Fc-佐剂-佐剂，Fc-抗原-佐剂或 Fc-佐剂-抗原融合蛋白。图 1F 表示一种二聚体蛋白其中的多肽链之一或两者都包含抗原-Fc-佐剂或佐剂-Fc-抗原融合蛋白。图 1G 表示一种二聚体蛋白，其中的多肽链之一或两者都包含抗原-佐剂-Fc 或佐剂-抗原-Fc 融合蛋白。

5 图 2A-2B 以图示的方式表示实施本发明所用到的 DNA 序列。图 2A 表示人 Fc 融合蛋白表达载体。图 2B 表示表达小鼠 IgG 2a Fc 融合蛋白的基因融合体。

10 图 3A-3F 的曲线图表明化学和 Fc-细胞因子佐剂对用 Fc-抗原融合蛋白，小鼠 Fc 人 IL-4 受体胞外结构域 (Fc-IL-4R) 融合蛋白免疫的小鼠所产生的抗体的效果。在图 3A 中，用 Fc-IL-4R 和弗氏完全佐剂 (CFA) 中的 Fc-IL-2 免疫小鼠。在图 3B 中用磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的 Fc-IL-4R 免疫小鼠。在图 3C 中用 FCA 中的 Fc-IL-4R 免疫小鼠。

15 在图 3D 中用 PBS 中的 Fc-IL-4R 和 Fc-IL-2 免疫小鼠。在图 3E 中用 CFA 中的 Fc-IL-4R 和 Fc-GMCSF 免疫小鼠。在图 3F 中用 PBS 中的 Fc-IL-4R 和 Fc-GMCSF 免疫小鼠。在图 3A-3F 中，方块，菱形和三角代表来自三只不同小鼠的数据。用 ELISA 检测针对一种抗原的抗体水平；Y 轴代表由 ELISA 读出的光密度。

20 图 4A-4D 的曲线图表明用人癌抗原，PSMA 以 Fc-抗原融合蛋白的形式以多种用量的 Fc-GMCSF 为佐剂免疫小鼠的效果。在图 4A 中，单独用 50 $\mu$ g 的 Fc-PSMA 融合蛋白免疫小鼠。在图 4B 中，以 0.05 $\mu$ g 的 Fc-GMCSF 作为佐剂用 50 $\mu$ g 的 Fc-PSMA 免疫小鼠。在图 4C 中用 50 $\mu$ g Fc-GMCSF 和 0.5 $\mu$ g 的 Fc-GMCSF 作为佐剂免疫小鼠。在图 4D 中，以 5 $\mu$ g 的 Fc-GMCSF 作为佐剂用 50 $\mu$ g 的 Fc-PSMA 免疫小鼠。在图 4A-4D 中方块，菱形和三角代表来自三只不同小鼠的数据。

25 图 5A-5F 是比较作为天然蛋白 (5A-5C) 或作为小鼠 Fc-PSMA 融合蛋白施用的 PSMA 抗原的特异抗体应答的曲线图。在图 5A 中，用 50 $\mu$ g 的 PSMA 作为抗原免疫小鼠。在图 5B 中，用 50 $\mu$ g 的 PSMA 作为抗原和 0.2 $\mu$ g GMCSF 为佐剂免疫小鼠。在图 5C 中，用 50 $\mu$ g PSMA 作为抗原，0.5 $\mu$ g Fc-GMCSF 作为佐剂免疫小鼠。在图 5D 中，用 50 $\mu$ g Fc-PSMA 作为抗原免疫小鼠。在图 5E 中，用 50 $\mu$ g Fc-PSMA 作为抗原，0.2 $\mu$ g GMCSF 作为佐剂免疫小鼠。在图 5F 中，用 50 $\mu$ g 的 Fc-PSMA 作为抗原，0.5 $\mu$ g 的 Fc-GMCSF 作为佐剂免疫小鼠。在图 5A-5F 中的方块，菱形和三角代

表来自三只不同的小鼠的数据。用 ELISA 测定对每种抗原的抗体水平；Y 轴代表 ELISA 读出的光密度。

图 6 是对针对抗人 PSMA 的抗体产生而言，与 Fc-PSMA 共同施用的 Fc-GMCSF 或 Fc-F3L 佐剂效果比较图表。所有的供试动物均单独或与作为佐剂的 Fc-细胞因子结合施用 50 $\mu$ g 的 Fc-PSMA。每组实验中测试三只小鼠。

图 7A-7B 是表示单独施用或与佐剂 Fc-GMCSF 结合施用的 Fc-EpCAM 融合蛋白在小鼠个体中免疫原性的曲线图。图 7A 和 7B 分别表示加强 7 天和 14 天后所测定的抗体滴度。在初级免疫的 3 周后给予加强。在两幅图中空心菱形代表单独用 10 $\mu$ g Fc-EpCAM 以皮下方式免疫小鼠，实心三角代表以 1 $\mu$ g Fc-GMCSF 为佐剂，用 10 $\mu$ g Fc-EpCAM 以皮下的方式免疫小鼠。用 ELISA 测定针对某种抗原的抗体水平；Y 轴代表 ELISA 读出的光密度。

图 8A-8B 是表示单独施用或与佐剂融合蛋白 Fc-GMCSF 结合施用的 EpCAM-Fc (Fc 区域和抗原的反方向) 融合蛋白在小鼠个体中免疫原性的曲线图。图 8A 和 8B 分别表示免疫 14 天和 21 天 (即加强后 7 天) 后所测定的抗体滴度。在两幅图中空心的菱形代表用 25 $\mu$ g EpCAM-Fc 融合蛋白免疫的三只小鼠的平均滴度，实心的三角代表用 25 $\mu$ g EpCAM-Fc 融合蛋白和 2.5 $\mu$ g Fc-GMCSF 为佐剂免疫的三只小鼠的平均滴度。用 ELISA 测定相对于抗原的抗体水平；Y 轴代表 ELISA 读出的光密度。

图 9 是构建编码 EpCAM-Fc-GMCSF 融合蛋白的质粒载体的图表。这种情况下，抗原 EpCAM 融于免疫球蛋白重链恒定区 (Fc 区域) 的氨基末端，佐剂 GMCSF 融于 Fc 区域的羧基末端。

图 10A-10D 是表明用 PBS 或 25% (w/v) 的蔗糖溶液作为运载工具注射编码 Fc -EpCAM 融合蛋白的质粒载体的小鼠中抗体滴度的曲线图。

图 10A-10D 分别代表开始注射后 14 天，27 天，55 天和 69 天后的抗体滴度。该图中空心的菱形代表用 PBS 中的编码 Fc -EpCAM 融合蛋白的质粒注射的个体小鼠中的抗体滴度，实心的三角代表用蔗糖中的编码 Fc -EpCAM 融合蛋白的质粒注射的个体小鼠中的抗体滴度用 ELISA 测定相对于抗原的抗体水平；Y 轴代表 ELISA 读出的光密度。

图 11A-11B 是  $^{3}H$ -胸腺嘧啶掺入刺激的图表，该刺激反应是对 DNA 接种或由蛋白注射免疫的小鼠中分离的脾细胞的抗原体外刺激的响应。

图 11B 是图 11A 的下部数据的放大图。在该幅图中，实心的菱形代表从用  $100\mu\text{g}$  编码 CMV-Fc-EpCAM 融合蛋白的质粒 DNA 免疫的小鼠中得到的脾细胞，圆圈代表从用  $100\mu\text{g}$  编码 CMV -EpCAM- Fc 融合蛋白的质粒 DNA 免疫的小鼠中得到的脾细胞，十叉代表从用  $10\mu\text{g}$  编码 Fc-EpCAM 蛋白免疫的小鼠中得到的脾细胞。脾是在用质粒 DNA 或蛋白注射 70 天，并在间隔 3 周加强注射两次后的小鼠中去除的。

图 12A-B 是用从质粒 DNA 或 Fc-EpCAM 蛋白免疫的小鼠的脾细胞作的细胞毒 T 淋巴细胞（CTL）的杀伤分析的曲线图。图 12A 是抗表达人 EpCAM 蛋白的抗小鼠 CT26 肿瘤细胞的脾细胞活性。图 12B 是抗亲代小鼠 CT26 肿瘤细胞的脾细胞活性。在以上两幅图中空心的菱形代表用带有（CMV-启动子）-EpCAM 构建体的 DNA 免疫的小鼠的脾细胞。空心方块代表用带有（CMV-启动子）-EpCAM 融合构建体的 DNA 免疫的小鼠的脾细胞。空心的方块代表（CMV-启动子）-Fc -EpCAM 融合构建体的 DNA 免疫的小鼠的脾细胞，空心的三角用带有（CMV-启动子）-EpCAM-Fc 融合构建体的 DNA 免疫的小鼠的脾细胞，十叉代表用 Fc-EpCAM 融合蛋白免疫的小鼠的脾细胞。CTL 分析是用以  $10\text{U/ml}$  的 IL-2 免疫后培养 5 天的小鼠的脾细胞进行的。标记的靶细胞与指示效应物混合并培养 4 小时。用放射性的释放来计算特异裂解物的百分比。

图 13 是通过皮下的方式单独或以  $5\mu\text{g}$  Fc-GMCSF 作为佐剂用 PBS 缓冲液中的的  $50\mu\text{g}$  Fc-MCSP 融合蛋白免疫的小鼠血清中的抗体滴度的曲线图。实心的菱形代表正常血清中的抗体滴度，空心方块代表单独用 Fc-MCSP 融合蛋白免疫的小鼠血清中的抗体滴度，实心三角代表以 Fc-GMCSF 作为佐剂用 Fc-MCSP 融合蛋白免疫的小鼠血清中的抗体滴度。用 ELISA 检测针对一种抗原的抗体水平；Y 轴代表由 ELISA 读出的光密度。

图 14A-B 单独或以 Fc-细胞因子作为佐剂用 Fc-gp41 pep626 融合蛋白免疫的小鼠血清中的抗体滴度的曲线图。图 14A 和 14B 分别代表第二次加强后 7 天和 33 天后所达到的抗体滴度。该图中，空心的菱形代表单独由皮内注射  $25\mu\text{g}$  Fc-gp41pep626 抗原免疫的小鼠中的抗体滴度，空心方块代表以  $25\mu\text{g}$  Fc-GMCSF 作为佐剂由皮内注射  $2.5\mu\text{g}$  Fc -gp41pep626 抗原免疫的小鼠中的抗体滴度，实心三角代表以  $2.5\mu\text{g}$  Fc-IL-2 作为佐剂由皮内注射  $25\mu\text{g}$  Fc-gp41pep626 抗原免疫的小鼠中的抗体滴度。用 ELISA

检测针对一种抗原的抗体水平；Y轴代表由 ELISA 读出的光密度。

#### 发明的详细描述

本发明涉及在哺乳动物体内有效地递送蛋白或肽抗原以诱导体液  
5 (即基于抗体的) 或 Th2 细胞介导的免疫应答，细胞或 Th1 细胞介导的  
免疫应答，以及某些情况下两种免疫应答。已发现可以通过将预选抗原  
与免疫球蛋白重链恒定区相融合形成 Fc-抗原融合蛋白来增强哺乳动物  
中蛋白或肽预选抗原的免疫原性。所得的 Fc-抗原融合蛋白或编码 Fc-抗  
原融合蛋白的核酸序列可以疫苗的形式施用于哺乳动物，例如人中以引  
10 发针对预选抗原的免疫应答。

Fc-抗原融合蛋白选择性地将该抗原靶向抗原呈递细胞 (APCs)。在  
不拘泥于理论的情况下，据信 Fc-抗原融合蛋白与 APCs 的结合是通过表  
达于许多类型的免疫细胞如树状细胞；巨噬细胞；B 细胞；和粒细胞上  
15 的 Fc 受体介导的。当 Fc-抗原融合蛋白施用于哺乳动物后即与 Fc-受体结  
合，然后被 APCs 吞噬。据认为被吞噬的包括预选抗原的融合蛋白降解  
为小肽后呈递于细胞表面。所呈递的肽从而介导体液和/或细胞免疫应  
答。所激发的具体免疫应答类型可以通过将 Fc-抗原融合蛋白和一种佐  
剂，如佐剂融合蛋白共同施用而修饰。

在一种施用方式中，将 Fc-抗原融合蛋白施用于受体。在另一种施用  
20 方式中，将编码该 Fc-抗原融合蛋白的核酸序列施用于受体。预选抗原或  
在所施用的 Fc-抗原融合蛋白中，或由所施用的核酸表达均比单独的抗  
原，即不通过多肽键与免疫球蛋白重链恒定区相连接的抗原，免疫原性  
高。而且在某些情况下顺序施用融合蛋白后施用编码相同融合蛋白的核  
酸，或反之，施用编码融合蛋白的核酸后再施用相同的融合蛋白可以用于  
25 使预选抗原的免疫原性最大化。可以理解当融合蛋白的两个组分均有  
活性时可以诱导出理想的免疫应答。换句话说，Fc-抗原融合蛋白中的预  
选抗原能够引起免疫应答，而免疫球蛋白重链恒定区能够与 APCs 表面  
的 Fc 受体相结合。

而且，正如所讨论的，所诱导的免疫应答的类型和强度可以通过将  
30 特异的佐剂，Fc-抗原融合蛋白和/编码 Fc-抗原融合蛋白的核酸共同施用  
予以调节。尽管对于实施本发明而言，化学佐剂，例如明矾或弗氏完全  
或非完全佐剂在一定条件下如于兽医方面应用中是有用的，其副作用如

组织创伤，使得它们不适用于应用于人。据此，优选的佐剂包含一种第二Fc融合蛋白，其中的免疫球蛋白重链恒定区与一种佐剂蛋白相融合形成Fc-佐剂融合蛋白。与Fc-抗原融合蛋白一样，若Fc佐剂融合蛋白的两种组分均有活性则可以诱导理想的免疫应答。换句话说，在Fc佐剂融合蛋白中的佐剂可以调节免疫应答，其免疫球蛋白重链恒定区能与APCs表面的Fc受体相结合。

在本发明的一个优选实施例中，该抗原和佐剂均以Fc融合蛋白或编码这样的融合蛋白的核酸的形式施用。换句话说，所施用的抗原为Fc-抗原融合蛋白，所施用的佐剂为Fc-佐剂融合蛋白。对实施本发明有用的Fc融合蛋白的特定优选实施例如图1A-1G所示。

图1A中介绍了一种Fc融合蛋白示例，其中的免疫球蛋白重链恒定区1的C末端或直接或通过多肽接头的方式与预选抗原或佐剂2的N末端相连接。此处所用到的术语“多肽接头”是指将两个蛋白连接在一起的包含一个或多个氨基酸残基的序列。多肽接头通常是长度约为10-15个残基的一系列氨基酸，包括例如重复的甘氨酸和/或丝氨酸残基。图1B介绍了一种Fc融合蛋白的示例，其中预选抗原或佐剂2的C末端或直接或通过多肽接头的方式与免疫球蛋白重链恒定区1的N末端相连接。

图1C描述了一种包含通过二硫键共价连接在一起的两个Fc融合蛋白的二聚体构建体。该二聚体构建体包括两个Fc融合蛋白，其中每一个免疫球蛋白重链恒定区1的C末端均与预选抗原或佐剂2的N末端相连接。类似地，图1D描述了一种包含通过两个二硫键共价连接在一起的两个Fc融合蛋白的二聚体构建体。该二聚体构建体包括两个Fc融合蛋白，其中每一个预选抗原或佐剂2的C末端均与免疫球蛋白重链恒定区1的N末端相连接。

图1E描述了通过两个二硫键连接在一起的包括两个Fc融合蛋白的二聚体构建体。其中每一个免疫球蛋白重链恒定区1的C末端均直接或通过一种多肽接头与预选抗原或佐剂2的N末端相连接，其C末端还直接或通过一种多肽接头与一种第二抗原或佐剂2'相连接。

图1F也描述了包括通过两个二硫键连接在一起的两个Fc融合蛋白的二聚体构建体。其中每一个预选抗原或佐剂2的C末端均直接或通过一种多肽接头与N免疫球蛋白重链恒定区1的N末端相连接，其C末端还直接或通过一种多肽接头与一种不同的第二抗原或佐剂2'的N末端

相连接。例如，这样的融合蛋白由 N 到 C 末端方向可以包括预选抗原-免疫球蛋白重链恒定区-佐剂。

图 1G 也描述了包括以两个二硫键的方式连接在一起的两个 Fc 融合蛋白的二聚体构建体。该二聚体构建体包括两个 Fc 融合蛋白，其中的抗原或佐剂 2 的 C 末端直接或通过一种多肽接头与一种不同的佐剂或抗原 2' 的 N 末端相连接，该佐剂或抗原 2' 的 C 末端直接或通过一种多肽接头与免疫球蛋白重链恒定区 1 的 N 末端相连接。例如，这样的融合蛋白由 N-到 C-末端的方向可以包括预选抗原-佐剂-免疫球蛋白重链恒定区。

在实施本发明时一般优选将 Fc 组分处在相对于佐剂组分的 N 末端位置。如果佐剂组分位于相对于 Fc 组分的 N 末端位置则佐剂-Fc 融合蛋白可结合于免疫细胞的佐剂受体，且 Fc 组分将处于与抗体结合到细胞表面所采取的方向相同的方向。结果将导致 ADCC 或补体结合。但是，当 Fc 组分处在相对于佐剂组分的 N 末端位置时就不会产生 ADCC 或补体结合。

图 1C-1G 所描述的构建体是通过临近的铰链区上的半胱氨酸之间形成的一对二硫键交联成为二聚体的示例。在该图中描述了二硫桥在这些分子具有天然形式的铰链区将两个免疫球蛋白重链恒定区部分连接起来。尽管在本发明中包括铰链区是优选的，但可以理解如果需要也可以选择在其它部位交联。而且，在某些情况下，两个或更多的单体可以非共价地相连形成对实施本发明有用的二聚体或多聚体。

此处所用到的术语“免疫球蛋白重链恒定区”可与术语“Fc 区域”相互替换使用，可理解为是指能与 Fc 受体相结合的免疫球蛋白重链恒定区的羧基端、其类似物或其中的一部分。已知每一免疫球蛋白重链恒定区包括 4 或 5 个结构域。这些结构域依次命名为：CH1- 铰链- CH2- CH3- (CH4)。CH4 存在于 IgM 中，IgM 中不存在铰链区。对实施本发明有用的免疫球蛋白重链恒定区优选地包括免疫球蛋白铰链区，且优选地还包括 CH3 结构域。该免疫球蛋白重链恒定区最优先地包括免疫球蛋白铰链区，CH2 结构域和 CH3 结构域。此处所用的术语免疫球蛋白“铰链区”可理解为是指完整的免疫球蛋白铰链区或至少足以与第二个免疫球蛋白铰链区形成二硫键的免疫球蛋白铰链区的一部分。

可以理解适合的免疫球蛋白重链恒定区可源于属于 IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM 中的每一种类型的抗体，但源于 IgG 型抗体的免疫球蛋白重

链恒定区是优选的。而且可以理解所述的免疫球蛋白重链恒定区也可以源于任意一种 IgG 抗体亚类即 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4。

在各种免疫球蛋白类型中免疫球蛋白重链恒定区结构域具有交叉同源性。例如，IgG 的 CH2 结构域与 IgA 和 IgD 的 CH2 结构域同源，且与 IgM 和 IgE 的 CH3 结构域同源。优选的免疫球蛋白重链恒定区结构域包括相应于 IgG 的 CH2 区域和 CH3 区域的蛋白结构域，或其功能部分或其衍生物。该免疫球蛋白重链恒定区结构域优选地至少缺少 CH1 结构域。而且，Fc-抗原或 Fc-佐剂融合蛋白可任选地缺少免疫球蛋白可变区。在一个更优选的实施例中，该免疫球蛋白重链恒定区结构域按由 N 末端到 C 末端的方向包括：免疫球蛋白铰链区，CH2 结构域和 CH3 结构域，且以上全部基于来自 IgG 分子的序列。在美国专利 5,541,087 和 5,726,044 中详细讨论了对合适的免疫球蛋白重链恒定区的选择。从特定的免疫球蛋白类型和亚类中选择合适的免疫球蛋白重链恒定区序列属于本领域普通技术人员能力范围内。

在某些情况下通过基因工程或其他方法对免疫球蛋白重链恒定区进行修饰例如突变，缺失或其它的改变可能有用，由此特定的活性，如补体结合，抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 的刺激可被减弱或消除。但是有必要保留免疫球蛋白重链恒定区与 Fc 受体相结合的能力。

对于实施本发明 Fc-抗原融合蛋白和 Fc-佐剂融合蛋白中的免疫球蛋白重链恒定区在预期受体中优选地为无免疫原性或弱免疫原性。如果免疫球蛋白重链恒定区不引起可检测到的直接针对该免疫球蛋白重链恒定区的抗体应答则认为 Fc 区域是无或若免疫原性的。据此该免疫球蛋白重链恒定区域应源于与该融合蛋白的预期受体同种的生物体中的免疫球蛋白或基于与该融合蛋白的预选受体同种的生物体中的免疫球蛋白相应的氨基酸序列。换句话说，当 Fc 融合蛋白构建体 (Fc 抗原和/或 Fc-佐剂融合蛋白) 施用于人时，应当使用人免疫球蛋白重链恒定区序列。人 Fc IgG 的核酸和氨基酸序列已经公布，例如在 Ellison 等 (1982) 核酸研究 10: 4071-4079。同样的当将 Fc 融合蛋白施用于小鼠时则应当使用鼠 Fc 序列。鼠 Fc IgG2a 的核酸和氨基酸序列已经公布，例如在 Bourgois 等 (1974) 欧洲生物化学杂志 43: 423-435。同理，当将 Fc 融合蛋白施用于其它的动物如猫，狗和牲畜如牛，马时也应遵循同样的规律。

此处所用到的术语“预选抗原”是指任何蛋白，或其中的片段或者多肽，其单独或与其它试剂结合能在哺乳动物中诱导免疫应答。可以理解任何所需的预选抗原均可以包括在本发明的Fc-抗原融合蛋白中。在一个优选实施例中，该预选抗原选自下组，该组包括：前列腺特异性的膜抗原（PSMA）；细胞因子受体的胞外结构域，例如人IL-4受体的胞外结构域；肿瘤特异性抗原（例如相对于正常细胞在肿瘤细胞中上调了或水平升高了的抗原）；和病毒蛋白，例如由人免疫缺陷病毒（HIV）基因组编码的蛋白。

此处所用到的术语“佐剂”是指任何可以通过例如增强针对预选抗原免疫应答（体液或细胞）而作为免疫调节剂的物质。此处所用到的术语“体液”免疫是指由体液如血浆或淋巴中的抗体介导的免疫，而“细胞”免疫在本领域中也称为“细胞介导的免疫”是指由T淋巴细胞引发、效应T淋巴细胞和/或巨噬细胞介导的免疫反应。

如上面所讨论的，多种化学佐剂例如弗氏佐剂可用于免疫非人动物。尽管广泛用于动物中以产生高滴度的抗体或显著的细胞毒T淋巴细胞（CTL）应答，但其副作用例如组织创伤，使得它们不适合应用于人。因此，需要在注射部位不产生炎症的条件下诱导强免疫应答。使用本发明的Fc佐剂融合蛋白的一个突出的优点在于其无须使用如弗氏完全佐剂之类的化学佐剂即可诱导强免疫应答。

用于实施本发明的优选的佐剂包括一种Fc佐剂融合蛋白或编码编码该佐剂融合蛋白的核酸。优选的包含在佐剂融合蛋白中的佐剂蛋白包括细胞因子。此处所用到的术语“细胞因子”是指能够修饰哺乳动物中的免疫细胞如T细胞；B细胞；巨噬细胞；中性粒细胞；嗜酸细胞；嗜碱细胞；树状细胞；和它们的前体的活性的任何蛋白，蛋白类似物或其中的功能片段。优选的细胞因子包括，例如IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-12, IL-18, TNF, 和 GMCSF。CD40配体的胞外结构域也是与Fc融合构成Fc-佐剂的优选蛋白。与不加Fc佐剂融合蛋白单独使用Fc抗原融合蛋白相比，与Fc佐剂共同施用的Fc抗原融合蛋白中的抗原可以引发更强的免疫应答。在某些情况下，仅用伴有Fc佐剂的Fc-抗原进行两次免疫所达到的抗体水平即等同或高于利用弗氏佐剂所达到的抗体水平且没有可观察到的皮肤反应。

对具有免疫球蛋白重链恒定区的Fc-抗原融合蛋白或Fc-佐剂融合蛋

白而言，在预期的受体中，该佐剂蛋白优选的为无或弱免疫原性。这可以通过用与从预期受体同种的生物体中分离的细胞因子相应氨基酸序列定义的细胞因子掺入 Fc 佐剂融合蛋白来完成。例如，当将 Fc 佐剂融合蛋白施用于人时，其中的佐剂蛋白（如细胞因子）优选人源的。

5 将 Fc-抗原和 Fc 佐剂融合蛋白同时或先后共同施用可用于调节所刺激的针对预选抗原的免疫应答的类型。称为 Th1 和 Th2 的两类免疫应答由不同的感染所引起并包含不同的细胞因子。Th1 介导的免疫应答本质上是典型的细胞型的，而 Th2 介导的免疫应答本质上是典型的体液型的。据此，Th1 应答可用于攻击可变细胞如肿瘤细胞或或病毒感染的细胞，而 Th2 应答可用于攻击胞外物质如寄生虫。通常将细胞因子与免疫球蛋白重链恒定区相融合用于激活普通的免疫应答或起始、调节特定的 10 Th1 或 Th2 应答。

而且，对存在于 Fc-佐剂融合蛋白中的特定的细胞因子的选择可以影响针对 Fc-抗原融合蛋白中的预选抗原所产生的抗体类型。例如，Fc-IL2 15 通过刺激产生已知的 Th1 细胞因子如 IFN- $\gamma$ , IL-2, 和 TNF 激发辅助 T 细胞应答，上述的 Th1 细胞因子可促进有效的细胞免疫并产生 IgG2a 类抗体。相反，Fc-IL-4 激发可促进体液免疫的 Th2 细胞因子例如 IL-5, IL-6, IL-10 和 IL-4 的产生。

如上所述，在一优选实施例中的方法包括将 Fc-抗原融合蛋白或编码 20 Fc 抗原融合蛋白的核酸与 Fc 佐剂融合蛋白一起施用。通过使用各自均包含免疫球蛋白重链恒定区的两种融合蛋白，可以将预选抗原和佐剂蛋白（例如细胞因子）共定位（co-localize）于哺乳动物的相同或相似的细胞类型中。例如在其表面表达 Fc 受体的巨噬细胞，B 细胞，粒细胞和树状细胞。据此，通过将 Fc-抗原与能与 Fc 受体结合的 Fc-佐剂融合蛋白共同 25 施用，可将抗原-融合蛋白中的抗原和佐剂融合蛋白中的佐剂共定位于相同的 APCs 细胞区室。该佐剂可以增强或调节在该预选抗原附近的免疫应答。

Fc 细胞因子的结合也可以一种协同的方式来刺激普通的免疫应答，并进而影响细胞（Th1）或体液（Th2）应答的出现。例如 Fc-GMCSF 是 30 有效的常规免疫应答刺激物。但是为了调节进一步针对细胞或 Th1 介导的免疫应答，可以将如 Fc-IL12 或 Fc-IFNy 的佐剂蛋白与 Fc-GMCSF 共同施用。为进一步促进体液或 Th2 介导的应答可以将如 Fc-IL4 的佐剂蛋白

与 Fc-GMCSF 共同施用以调节针对产生 Th2 细胞的应答。其它用于与 Fc 融合的 Th1 或 Th2 促进的细胞因子也可以依照所需生理应答的确切性质加以应用。可以理解这种常规的方法也可以通过使该应答针对特定抗原而非有害抗原而调节如自身免疫(一种 Th1 介导的疾病)和变态反应(一种 Th2 介导的疾病)等现存的致病应答，该调节过程是通过免疫一种新的相反 Th 类型的应答进行的。

某些环境下，当用 Fc-抗原融合蛋白免疫动物时用核酸作为佐剂是有益的。核酸例如，包括富含胞嘧啶-磷酸二酯键连接-鸟嘌呤 (CpG) 序列的寡核苷酸偏向于 Th1 应答的免疫应答，也可选择性的与其它佐剂如细胞因子(参见例如, Brazolot 等. (1998)美国国家科学院汇编 ( PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. ) 95: 15553-8; Liu 等 (1998) 血液 92: 3730-6; 和 Klinman 等 (1997) 免疫学 158: 3635-3639)结合使用。据此可以理解将含 CpG 的寡核苷酸与 Fc 抗原融合体共同施用可以增强或适当地调节免疫应答。这样的核酸分子可以是任意的长度，但优选大于 8 15 个核苷酸。该核酸序列优选地包括 CpG 序列，更优选包括嘌呤-嘌呤-C-G-嘧啶-嘧啶，且 CpG 中间的胞嘧啶是非甲基化的。在佐剂 DNA 中该 CpG 二核苷酸的出现频率优选至少约为 5%，更优选约为 10%。例如双链形式的脱氧寡核苷酸 TCCATGACGTTCTGACGTT (SEQ. ID NO. 22) 可以用 20 作佐剂。依照所需的免疫应答的类型可以将该核酸序列与明矾结合使用。

本发明利用传统的重组 DNA 方法学构建 Fc 融合蛋白用于实施本发明。该 Fc 融合构建体优选在 DNA 水平构建，将所得的 DNAs 整合到表达载体中使其表达以产生本发明的 Fc-抗原或 Fc-佐剂融合蛋白。此处所用到的术语“载体”是指任何包含能够掺入到宿主细胞中并通过重组整合到宿主细胞基因组中或作为附加体进行自我复制的核酸序列。这样的载体包括线性核酸，质粒，噬菌粒，粘粒，RNA 载体，病毒载体等。病毒载体的非限定性的实例包括逆转录病毒，腺病毒和腺伴随病毒。此处所用到的术语 Fc 融合蛋白的“基因表达”或“表达”是指 DNA 序列的转录，mRNA 转录体的翻译和 Fc 融合蛋白产物的分泌。分别包含 IL2， 25 CD26, Tat, Rev, OSF-2, bIG-H3, IgE 受体, PSMA, 或 gpl20 的 Fc 融合蛋白已用上述类型的表达载体进行表达。在美国专利 5,541,087 和 5,726,044 30 中讨论了相同或相类似的表达构建体。

作为通过遗传工程技术对蛋白进行融合的替代，也可以将传统的化学交联剂进行化学偶联用于蛋白组分的融合。

用于实施本发明的基本载体包括一种选择标记，例如由源于诸如 SV40 病毒的转录调节序列驱动的编码二氢叶酸还原酶的基因 (DHFR)，和用于选择和维持该质粒在大肠杆菌中存在的细菌质粒序列。融合蛋白序列的表达由启动子和可选择的增强子序列驱动，例如巨细胞病毒 (CMV) 启动子和增强子序列。

若将该 Fc 融合蛋白或编码该融合蛋白的核酸施用于人，该 Fc 融合蛋白编码序列沿 5' -3' 的方向优选地由衍生自例如抗体轻链 (L) 的“前导肽”起始并与优选源于人免疫球蛋白 g1 基因的 Fc $\gamma$ 1 区域的至少部分免疫球蛋白重链恒定区或其实变形式进行框内融合。该人免疫球蛋白 Fc $\gamma$ 1 基因的 Fc $\gamma$ 1 区域优选包括至少部分铰链区和 CH3 结构域，更优选包括至少部分铰链区，CH2 结构域和 CH3 结构域。若将该 Fc 融合蛋白施用于小鼠，优选的编码免疫球蛋白重链恒定区结构域的核酸序列包括沿 5' -3' 的方向编码源于小鼠 IgG2a 抗体铰链区，CH2 结构域和 CH3 结构域的核酸序列。如果需要免疫球蛋白重链恒定区的羧基端可以在核酸水平进行修饰，以将其与编码预选抗原(对于 Fc 抗原融合蛋白的情况)或免疫激活因子(对于 Fc-佐剂细胞因子的情况)进行框内连接。编码分泌盒的 DNA 可以是其基因组构型也可以是其 cDNA 构型。

编码信号序列的部分 DNA 优选编码指导 Fc 融合蛋白分泌并进而从该 Fc 融合蛋白的剩余部分中切除的肽片段。本发明的信号序列是多核苷酸，其编码一种氨基酸序列，该氨基酸序列引发蛋白穿越内质网膜的转运。用于本发明的信号序列包括抗体轻链信号序列，例如抗体 14.18 (Gillies 等(1989)免疫学方法杂志 125: 191)，抗体重链信号序列例如，MOPC141 抗体重链信号序列 (Sakano 等(1980) 自然 286: 5774) 和任何本领域所知的信号序列 (参见例如，Watson (1984) 核酸研究 12: 5145)。

已知在本领域中已被清楚描述的信号序列典型地包括 16 到 30 个氨基酸残基，也可以包括更多或更少的氨基酸残基。典型的信号肽序列包括 3 个区域：碱性的 N 末端区域，中间的疏水区域，和极性较强的 C 末端区域。中间的疏水区域包括 4 到 12 个疏水残基，其在裸肽转运过程中锚定该信号肽穿越脂双层膜。在起始后信号肽通常在内质网腔中由称为

信号肽酶的细胞酶切除。信号肽中可能的切割位点一般遵循“(-3, -1)”规则。因而典型的信号肽在-1 和-3 位具有小的中性氨基酸残基且在这一区域内缺乏脯氨酸残基。该信号肽酶将切割-1 和+1 氨基酸之间的信号肽，这样在分泌过程中信号序列可从融合蛋白的氨基端切除，从而导致 5 融合蛋白分泌。对实施本发明有用的信号肽序列是本领域所公知的。参见例如 von Heijne (1986) 核酸研究 14: 4683。

需用常规的实验来确定用于分泌盒的信号序列的适合性对本领域的技术人员来说是显而易见的。这样的实验包括确定信号序列指导 Fc 融合蛋白分泌的能力和/或确定为使 Fc 融合蛋白有效分泌所用到的基因组或 10 cDNA 序列的理想构型。另外本领域的技术人员也可以由上述 von Heijne 的文献中的方法构建合成的信号肽序列并通过常规的实验检测这样的合成信号肽序列的效率。术语“信号序列”，“信号肽”，“前导序列”或“前导肽”在此处可以相互替换。

可见有许多不同的方式将 Fc 融合蛋白或编码该融合蛋白的核酸序列 15 用于免疫针对预选抗原的受体。本发明的两种不同的应用可以用于产生 CTL 应答，一种是基于注射编码 Fc-抗原融合蛋白的 DNA，另一种是基于施用能够将该蛋白呈递到 I 类 MHC 途径的 Fc 抗原融合蛋白。

注射蛋白抗原典型地用于在哺乳动物中引发免疫应答。但本发明也提供通过 DNA 注射将抗原呈递到 APCs 的方法。通常使用的技术是将编码抗原蛋白的 DNA 表达载体注射到肌肉中。有报道显示该蛋白抗原由肌肉细胞表达但该抗原不通过这些细胞呈递到免疫系统。而据信特化的 20 APCs，例如巨噬细胞和树状细胞迁移到注射位点，以目前尚不清楚的过程裹挟并呈递该抗原。用 Fc-抗原融合蛋白表达载体可使这一过程更加有效，因为所分泌的融合蛋白能比天然的抗原蛋白更有效地结合到 APCs 上。 25

DNA 注射的方式的一个结果往往导致兼有体液和细胞免疫应答产生。典型地，外源施用的蛋白更难于进入呈递到 MHC I 类分子的途径。然而，施用本发明的 Fc 融合蛋白可能是通过 MHC I 类分子的呈递的外源 30 预选抗原增加了细胞毒性细胞的产生。DNA 免疫与蛋白免疫相结合也可以在免疫系统中对初级免疫起协同作用并进而以抗体产生和细胞毒性细胞应答的形式增加应答水平。将 Fc-佐剂融合蛋白例如 Fc-IL-2, Fc-GMCSF, Fc-IL-12, 和 Fc-Flt3 配体与 Fc-抗原融合蛋白的共同施用确保该

融合蛋白共定位于相同的 APCs 细胞区室，由此刺激针对预选抗原更有效的免疫应答。

本发明的组合物（即，Fc-抗原和/或 Fc-佐剂融合蛋白，或编码以上融合蛋白的核酸序列）可以通过任意合适的方式直接（例如局部地，如 5 通过注射，植入或局部施用到组织位点）或全身的（例如非肠道的或口服）施用于动物。当该组合物以非肠道的方式提供时，例如由皮下的，眼睛的，腹膜内的，肌内的，口腔的，直肠的，阴道的，眼眶内的，经皮的，大脑内的，颅内的，脊柱内的，心室内的，鞘内的，脑池内的，囊内的，鼻内的或通过烟雾剂施用，该组合物优选包括部分含水的或生理上可接受的流体，悬浮液或溶液。这样该载体或赋形剂是生理上可接受的因此除向患者运送所需的组合物外并不对病人的电解质和/或容积平衡产生不良影响。该试剂的流体介质可以包括正常的生理盐水（例如含 10 9.85% NaCl 的水溶液 0.15 M，pH7-7.4）。

每次施用 Fc-抗原融合蛋白的优选剂量在  $50 \text{ ng}/\text{m}^2$  到  $1 \text{ g}/\text{m}^2$  的范围内，更优选  $5 \mu\text{g}/\text{m}^2$  到  $200 \text{ mg}/\text{m}^2$ ，最优选  $0.1 \text{ mg}/\text{m}^2$  到  $50 \text{ mg}/\text{m}^2$ 。每次施用 Fc-佐剂融合蛋白的优选剂量在  $1 \text{ ng}/\text{m}^2$  到  $0.1 \text{ g}/\text{m}^2$  的范围内，更优选  $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^2$  到  $20 \text{ mg}/\text{m}^2$ ，最优选  $10 \mu\text{g}/\text{m}^2$  到  $5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 。每次施用编码 Fc-抗原融合蛋白或 Fc-佐剂融合蛋白的核酸的优选剂量在  $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$  到  $100 \text{ mg}/\text{m}^2$ ，更优选  $20 \mu\text{g}/\text{m}^2$  到  $10 \text{ mg}/\text{m}^2$ ，最优选  $400 \mu\text{g}/\text{m}^2$  到  $4 \text{ mg}/\text{m}^2$ 。  
20

可以理解通过多次独立的免疫可以达到最大限度的免疫，例如相隔约 3 周到 6 个月接种 1 到 3 次。而且，如上所述在特定的情况下通过交替施用 Fc 融合蛋白和编码这样的 Fc 融合蛋白的核酸可以获得最大程度的免疫反应。Fc-抗原融合蛋白或编码该融合蛋白的核酸可以在 Fc 佐剂融合蛋白或编码该佐剂融合蛋白的核酸施用于哺乳动物之前，同时或之后施用于哺乳动物。本领域的技术人员在其能力范围内可以通过常规的实验来确定理想的给药方式、剂量和加强方案。  
25

通过下列非限定性的实施例对本发明作进一步介绍。

#### 实施例

##### 30 实施例 1. Fc-抗原和 Fc-佐剂表达载体的构建

用编码小鼠 IgG2a Fc 区域的核酸构建了表达载体以在小鼠模型中检验 Fc 融合蛋白的免疫原性。这减少了每一 Fc 融合蛋白的 Fc 区域在该哺

乳动物中诱导免疫应答的风险。而且将小鼠细胞因子用作 Fc-佐剂融合构建体的融合组分，因为它们的生物活性具有很高的物种特异性。因而用编码小鼠 IgG2a Fc(美国专利 5,726,044)的 cDNA 序列替换早先报道的载体(Lo 等 (1998) 蛋白质工程 11: 495-500)中的人 IgG1 的 Fc 序列，以对其进行修饰(参见图 2)。

从小鼠脾细胞库中通过聚合酶链式反应 (PCR) 克隆小鼠 IgG2a Fc 序列。该 PCR 引物包含在 5' 端连接前导序列的接头序列和在 3' 端连接编码抗原或佐剂细胞因子序列的唯一的 Sma I/Xma I 酶切位点。使抗原或佐剂 (细胞因子) 序列的 5' 端为 Sma I 位点并保持 Fc 和抗原或佐剂蛋白之间的阅读框，以及紧邻于翻译终止信号后的唯一的 Xho I 位点。所得的 DNA 构建体编码与小鼠 IgG2a H 链直接融合的轻链前导序列以及接下来的小鼠 IgG2a CH2 和 CH3 外显子和融合组分 (抗原或佐剂细胞因子)。

转录由 CMV 启动子/增强子驱动，其对 DNA 体内注射后在培养中的大多数细胞类型中以及肌肉中和其它细胞类型中的表达有用。与维持质粒 DNA 在大肠杆菌中稳定所需的序列一样，每一载体均包括可选择的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 标记基因以便于选出稳定的转染克隆。

下述是通过在所设计的载体中唯一的 Sma I 到 Xho I 位点之间插入合适的接头序列而构建的 Fc-抗原构建体 pdCs-muFc 的示例。其中的"mu" 代表该 Fc 是鼠源的：

所述人 IL4 受体(IL-4R)的胞外结构域 (细胞外部分) 是通过 PCR 扩增从人外周血单核细胞 (PBMC) 中克隆得到的。所用引物分别为 5'GTCCCGGGTATGAAGGTCTTGCAGGAGC(SEQ ID NO: 1) 和 5'CCCTCGAGCTAGTGCTGCTCGAAGGGCTCCCTG (SEQ ID NO: 2)，其分别包括 Sma I 和 Xho I 位点，以便于插入 pdCs-muFc 载体中。PCR 反应的条件和接下来的克隆步骤如下。Advantage KlenTaq 和多聚酶 Mix (Clontech, Palo Alto, 加拿大)，和用于扩增所需基因所用的特定引物。在总共 100 ml 体积的反应混合物中包括 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% 明胶 (w/v), 每种 dNTPs 0.2 mM, 和 1.25 单位的 KlenTaq。进行了 30 个 PCR 循环。每一循环包括在 94 °C 热变性 1 分钟, 42 °C 下退火 45 秒，在 72 °C 下进行扩增 1 分钟。扩增产物亚克隆到 SK 载体上 (Stratagene, San Diego, 加拿大)，并通过标准的测序方法验证。

DNA 序列。

以 5'AAGCTTAAATCCTCCAATGAAGC (SEQ ID NO: 3) 和 5' CTCGAGTTAGGCTACTCACTCAAAG (SEQ ID NO: 4), 分别作为 5 正义链和反义链的引物通过 PCR 由 LnCAP 前列腺癌细胞系 (ATCC CRL1740) 中克隆到人前列腺特异性膜抗原 (PSMA) 的胞外结构域。验证了该 DNA 序列后将所得的 PCR 片段插入到 pdCs-muFc 载体中以构建了 pdCs-muFc-PSMA 融合构建体。

EpCAM (也是已知的 KS 抗原) 的胞外结构域, 在大部分癌细胞中上调的 (upregulated) 的上皮细胞表面蛋白, 是分别以

10 5'CCCCGGGTAAACAGGAAGAATGTGTCTGTG (SEQ ID NO: 5), 和 5'CTCGAGTCATTTAGACCCTGCATTGAG (SEQ ID NO: 6) 作为正义链和反义链的引物, 通过 PCR 由 LnCAP 细胞中克隆到的。通过标准的测序方法验证了该 DNA 序列, 然后将该 PCR 片段插入到载体 pdCs-muFc 中构建了 pdCs-muFc-EpCAM 融合构建体。用 15 EpCAM 胞外结构域作为 N-末端融合组分构建了另一载体, 在这种情况下该 PCR 产物包括 EpCAM cDNA 的天然前导部分和到跨膜结构域边界的成熟胞外结构域。该 PCR 产物的 3'末端包括一个基因工程化的 Afl II 位点以连接到小鼠 Fc 片段的 5'Afl II 位点。所用的 PCR 引物包括 5' TCTAGAGCAGCATGGCGCCCCCGC (SEQ ID NO: 7) 和 5' 20 CCTTAAGCACCCCTGCATTGAGAATTCA (SEQ ID NO: 8). 在该情况下小鼠 Fc 缺少插入到融合蛋白中的 3'插入位点, 但 Fc 编码序列末端包含包含翻译终止信号。

HIV gp41 近膜区中相对保守的区域, 即从 Hind III 位点到临近跨膜区域的赖氨酸, 作为 Fc 融合蛋白表达, 其是短肽抗原抗原序列的一个例证。尽管使用了来自 HIV IIIB 菌株的蛋白序列, 但通过用偏嗜高 GC 含量的密码优化该编码序列以便其在真核细胞中理想地表达。编码第 626 位到 669 位氨基酸残基的 DNA 具有下述序列: C CCG GGA TCC CTG ATC CAC TCC CTG ATC GAG GAA TCC CAG AAC CAG CAA GAG AAG AAC GAG CAG GAG CTG CTG GAG CTC GAC AAG TGG GCC TCC 30 CTG TGG AAC TGG TTC AAC ATC ACC AAT TGG CTG TGG TAC ATC AAG TGA CTC GAG (SEQ ID NO: 9) , 其是通过化学方法合成的并连接到载体 pdCs-muFc 中。融合多肽的氨基酸序列为:

SLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLYIK (SEQ ID NO: 10)。

其它 HIV 蛋白编码序列依照前述 (美国专利 5,541,087 和 5,726,044) 用于构建 Fc-抗原，其用小鼠 IgG2a Fc 而非人源的 IgG1 Fc 的 5 融合蛋白。这些构建体代表本发明进一步的实施例。

用与 Fc 抗原融合蛋白相同的方式构建了一系列包括小鼠 IgG2a Fc 和几个小鼠细胞因子的 Fc-佐剂 (细胞因子) 融合蛋白。特定的细胞因子和克隆引物如下所述。

小鼠 IL-2 通过 PCR 用下列引物由小鼠外周血单核细胞 (PBMCs) 10 克隆得到的。PCR 引物 (有义)

5'GGCCCGGGTAAAGCACCCACTCAAGCTCC (SEQ ID NO: 11), 和 (反义) 5'CCCTCGAGTTATTGAGGGCTTGTG (SEQ ID NO: 12)。

小鼠 GMCSF 是用下列 PCR 引物通过 PCR 自小鼠 PBMCs 中克隆到的。PCR 引物 (有义) 5'CCCAGAAAAGCACCCGCCGCTCACCC 15 (SEQ ID NO: 13), 和(反义) 5'CTCGAGTCATTTGGCTTGGTTTTGC (SEQ ID NO: 14)。

小鼠 Flt3 配体是用下列 PCR 引物通过 PCR 自小鼠胸腺中克隆到的。PCR 引物 (有义) 5'CAAGCTTACACCTGACTGTTACTTCAGC (SEQ ID NO: 15), 和 (反义) 5'CTCGAGTCAAGGCTCTGGGAGCTCCGTGGC 20 (SEQ ID NO: 16)。

小鼠 IL-12p35 是用下列 PCR 引物通过 PCR 自小鼠 PBMCs 中克隆到的。PCR 引物 (有义)

5'CCCCGGGTAGGGTCATTCCAGTCTCTGG (SEQ ID NO: 17), 和(反义) 5'CTCGAGTCAGGCGGAGCTCAGATAGC (SEQ ID NO: 18)。

小鼠 IL12 p40 是用下列 PCR 引物通过 PCR 自小鼠 PBMCs 中克隆到的。PCR 引物 (有义) 5' TCTAGACCATGTGTCCTCAGAAGCTAAC (SEQ ID NO: 19), 和 (反义) 5'CTCGAGCTAGGATCGGACCCTGCAG (SEQ ID NO: 20)。

所有的 PCR 产物，除小鼠 IL-12 p40 外，均克隆了 Sma I 到 Xho I 30 片段，用标准的 DNA 测序方法进行分析后，连接到包含小鼠 IgG2a 的 Fc 作为其 Fc 区域的 pdCs-muFc 载体上。小鼠 IL-12 p40 PCR 在含有相同的 CMV 启动子增强子，直接融合于成熟小鼠 IL-12 的亚单位 p40 上的

轻链前导序列, 和替代在 pdCs-muFc 载体中的 DHFR 选择标记基因的新霉素抗性基因的载体中单独表达 (不作为 Fc 融合蛋白)。所得的载体称为 pNC-mp40, 其中的 "N" 代表新霉素选择基因。

所有的质粒构建体通过在人肾 293 细胞中的瞬间表达诱导特定融合蛋白的合成和分泌。简要地说, 质粒与磷酸盐的共沉淀引入人肾单层膜细胞 293 中 (Sambrook 等 (1989) 分子克隆实验操作手册, 冷泉港, 纽约)。上述细胞放置过夜(16 hr), 用 PBS 清洗, 再加入新鲜细胞培养基 (DMEM 含 10% 胎牛血清(FBS))。2-3 天后, 用对小鼠 IgG-Fc 蛋白具有抗体特异性的 Fc 特异的 ELISA (Gillies 等 (1989) 免疫学方法杂志 125: 191) 检测培养培养基中所分泌的 Fc 融合蛋白。对于小鼠 Fc-IL12, 将 Fc-p35 和 p40 表达质粒 DNAs 在相同的细胞培养物中瞬间表达, 以便异源二聚体细胞因子融合蛋白在分泌出细胞前进行组装。(Gillies 等 (1998) 免疫学杂志 160: 6195)。

因此, 稳定转染的表达多种 Fc 融合蛋白的细胞是通过标准的电穿孔技术将线性 DNA 引入小鼠 NS/0 骨髓瘤细胞所产生的。简要地说, 以  $10^7$  细胞/ml 的浓度将细胞悬浮于 Gene Pulser Cuvette (BioRad) 中, 0.5 ml 的悬浮与 10 $\mu$ g DNA 相混合, 将混合物在冰上冷却 10 分钟。用设定为 0.25 V 和 500 pF 的 Gene Pulser (BioRad) 进行电穿孔。将细胞在冰上复苏 10 分钟, 随后悬浮于生长培养基中并转入 96-孔板。从电穿孔后两天开始, 每 2-3 天用含 0.1 uM 氨甲喋呤的生长培养基喂细胞。通过 Fc ELISA 方法检测在 96-孔板上生长的抗性克隆表达。

为表达小鼠 Fc-IL12 融合蛋白, 如上所述用小鼠 Fc-p35 亚单位表达载体转染已表达小鼠 IL-12 p40 亚单位的 NS/0 转染细胞系。p40 表达系是用 pNC-mp40 载体对 NS/0 进行电穿孔而获得的, 如上所述, 在含新霉素类似物 G418 (生命科学技术) 的培养基中筛选。第二次转染后用 Fc ELISA 和小鼠 IL-12 ELISA (Genzyme, Cambridge, MA) 筛选存活的细胞克隆。

所得融合蛋白的结构完整性由 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 验证。开始, 融合蛋白结合于小体积 (每 ml 培养基 10-20  $\mu$ l) 的蛋白 A Sepharose (Repligen, Needham, MA) 上。用含 Tween-20 (0.01%) 的 PBS 洗涤结合物, 然后在含 SDS 的凝胶缓冲液中洗脱, 再在 5% 2-巯基乙醇存在下煮沸 2 分钟。将还原蛋白在预先灌制的 SDS-PAGE 凝胶中电

泳后用考马斯兰染色。依照生产商的说明用蛋白 A Sepharose 柱(Repligen, Needham, MA)从所得稳定克隆中进行大量的纯化。

实施例 2. Fc-抗原的免疫原性和化学或 Fc- 细胞因子佐剂对抗体产生的效果

5 将在实施例 1 中制备的小鼠 Fc-huIL-4R  $\alpha$  亚单位构建体用作抗原以检测这些蛋白在动物模型中潜在的 APC-靶向效果。IL-4R  $\alpha$  亚单位的胞外结构域代表物种间相当保守的分子，在人和小鼠间有高于 50% 的序列同一性。

10 用在 PBS 中或用弗氏完全佐剂 (CFA) 乳化的 50  $\mu\text{g}$  Fc-抗原融合蛋白 (Fc-IL-4R) 以皮下的方式注射成组小鼠。其中一些组的小鼠还受到 5  $\mu\text{g}$  剂量(与 Fc-IL-4R 混合)的 Fc-IL2 或 Fc-GMCSF Fc-佐剂蛋白。两周后，在小鼠的腹膜腔中注射同样的混合物。该 CFA 形成产生微团，该微团形成缓释-抗原源，对免疫系统形成连续地刺激。CFA 中的分枝杆菌蛋白也通过细胞因子的刺激诱导强炎症性的应答，由此进一步加强免疫应答。但 CFA，引起包括皮肤损伤的严重的副作用因此不适宜施用于人。  
15 但掺有含于 PBS 中的 Fc-佐剂融合蛋白的混合物在任何动物中均不引起任何可见的皮肤反应也没有任何明显的毒性迹象。

20 加强两周后 (即第一次注射后 28 天)，采集动物血液并将全部的血液在微离心管中凝集制备血清，研磨细胞将块状物以 12000 RPM 高速离心 5 分钟，收集上清液。将所得血清用分析缓冲液(含 0.01% Tween-20 的 PBS)稀释并用人 IL-4R 检测抗体反应。用人 Fc-huIL-4R 包被的 96-孔培养板进行抗原特异的 ELISA，该培养板每孔加入 100  $\mu\text{l}$  含于 PBS 的 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  人 Fc-huIL-4R，在 4°C 下培养 (过夜)。使用前用封闭缓冲液(1% BSA, 0.01% Tween-20 PBS)清洗并封闭该培养板。室温下使孔中的供试抗原稀释物温育 2 小时，然后用分析缓冲液对孔清洗 8 次。加入第二抗-小鼠 Fc-特异性的辣根过氧化物酶连接的抗体(1: 2000 稀释, Jackson 免疫研究)，将培养板再温育 1 小时。在用分析缓冲液清洗 8 次后，加入含 25 mM 柠檬酸, 50 mM Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>, pH5 的邻苯二胺二氢氯化物(OPD)溶液并加入 0.03% 的新鲜 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。反应 30 分钟后加入 100  $\mu\text{L}$  of 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。所得平皿在读数仪上 490 nm 读数，该读数仪可自动去除在 650 nm 下读出的背景值。将所得结果绘制成光密度和抗血清稀释度之间的关系图。通过在光密度降到一个设定值例如 1 O.D. 单位前所需稀释的抗体  
25

量来确定相对抗体滴度。

免疫方法的结果如图 3 所示。通过这种方法单独注射含于 PBS 中的 Fc-IL-4R 融合蛋白仅在一只小鼠中引起抗体应答(图 3B)。但添加了 CFA 可引起较多的小鼠产生应答而滴度与单独用含于 PBS 中的 Fc-IL-4R 融合蛋白注射时基本相同 (图 3C)。将小鼠 Fc-IL2 佐剂与含于 PBS 的 Fc-IL4R 共同施用可以在所有的动物中诱导应答，但所产生的抗体的量有所不同(图 3D)。与单独使用任意一种试剂相比，将 CFA 与小鼠 Fc-IL2 佐剂共同施用 (图 3A) 可诱导出较高的抗体滴度(图 3C 和 3D)。将含于 PBS 中的小鼠 Fc-GMCSF 佐剂共同施用可诱导出在所有组中最强的免疫应答 (图 3E)，包括用 Fc-GMCSF 佐剂和 CFA 共同施用所免疫的组 (图 3F)。换句话说，含于 PBS 中的小鼠 Fc-GMCSF 佐剂当与小鼠 Fc-IL4R 抗原共同施用时无需使用 CFA。因而这样的方法更适合应用于人。

实施例 3. 对在 Fc-PSMA 融合蛋白中的癌症抗原，PSMA 所产生的抗体的 Fc-GMCSF 佐剂剂量的效果

此处 PSMA 基于其有限的正常组织分布代表一种有吸引力的人类肿瘤相关靶抗原。目前 PMSA 作为肿瘤疫苗候选物正在进行临床实验。在这一实施例中对 Fc-PMSA 融合蛋白中的 PMSA 抗原进行了评估。

按照实施例 1 中所讨论的方法制备小鼠 Fc-PSMA 融合蛋白。对成组的小鼠以皮下方式注射 50 $\mu$ g 含于 PBS 中的小鼠 Fc-PSMA，并辅以各种浓度的 Fc-佐剂融合蛋白 Fc-GMCSF，并在 14 天后以腹膜内注射的方式加强免疫。如实施例 2 中对 Fc-IL4R 融合蛋白的描述通过 Fc-PSMA 抗原俘获 ELISA 测定抗体滴度。结果绘制成图 4 中的抗体滴度 (在 OD 值还原为 1 时的稀释度) 和第一次免疫后的时间的关系图。

缺乏 Fc-GMCSF 时，小鼠针对 PSMA 的抗体滴度范围在 1000 到约 20,000 (图 4A)。在与少到 0.05 $\mu$ g Fc-GMCSF 共同施用时所得的抗体滴度范围在 30,000 to 140,000 (图 4B)。Fc-GMCSF 10 倍的增加进一步刺激针对这一癌症抗原的抗体滴度(图 4C 和 4D)。所给出的最高剂量(每只小鼠 5  $\mu$ g Fc-GMCSF 融合蛋白) 仍仅代表每注射剂量约 2  $\mu$ g GMCSF — 对小鼠的皮肤或所免疫动物的任何系统标记没有明显的影响(参见图 4D)。而且与 CFA 不同的是也没有明显的脾增大。

实施例 4. 免疫抗体应答相关的 Fc-介导的 PSMA 呈递效果

通过比较在注射了该融合蛋白，非融合抗原或佐剂蛋白或前述混合物的小鼠中所诱导的免疫应答来检测 Fc-抗原 和 Fc-佐剂融合蛋白中 Fc 组分的特异影响。人 PSMA 系统用于这一目的。

依照制造商的介绍用纤溶酶通过蛋白水解消化 Fc-PSMA 融合蛋白  
5 (Lo 等 (1998) 蛋白质工程 11: 495-500) 制备非融合的 PSMA。通过蛋白 A Sepharose (Repligen, Needham, MA) 的吸收去除所释放的 Fc 和未消化的 Fc-PSMA。

成组的小鼠(n=3)以皮下方式单独(图 5A)或与注射 50 μg 剂量 PSMA, 或与 0.2 μg 游离的 GMCSF (图 5B) 或 0.5 μg Fc-GMCSF (图 5C)  
10 (0.5 μg 含约 0.2 μg GMCSF 的 Fc-GMCSF)结合施用。另一组小鼠中, 每只小鼠以皮下的方式单独注射了 50μg 剂量的 Fc-PSMA 融合蛋白 (图 5D), 或与 0.2 μg 游离的 GMCSF (图 5E) 或 0.5 μg Fc-GMCSF (图 5F) 结合使用。所有的注射均在不含化学佐剂的 PBS 中进行。免疫后 14 天测定抗体与小鼠 Fc-PSMA 的反应性。

15 当用无化学佐剂的 PBS 配制注射动物时 Fc-PSMA 中 Fc-抗原的对 PSMA 的免疫原性的重要性是明显的。其本质上没有针对于 PBS 中施用的 PSMA 的初级免疫应答 (图 5A)。添加 GMCSF 或 Fc-GMCSF 除在一只动物中有微弱的应答外 (图 5B) 对免疫只有非常微小的影响 (图 5B 和 5C)。相反单独用 Fc-PSMA 注射动物在所有的情况下均产生强的免疫应答 (图 5D)。向加强的 Fc-GMCSF 中添加游离的 GMCSF 只有微弱的影响 (图 5E)，但将抗原和作为 Fc 融合蛋白的细胞因子共同施用给出最高水平的应答 (图 5F)。

20 这些结果表明将 Fc-抗原和 Fc-佐剂相结合对产生免疫应答非常有用，并且对该抗原和在体内的刺激细胞的共定位，假定是对 APCs，有明显的益处。

#### 实施例 5 比较融合蛋白 Fc-GMCSF 或 Fc-Flt3L 的佐剂效果

Flt3 的配体在本领域中也指 Flt3 配体 (Flt3)，已表明其在树状细胞 (Soligo 等 BR.J.HAEMATOL.101: 352-63) 的产生和成熟过程中起关键的作用。据认为，树状细胞和组织巨噬细胞是最重要的 APC。在小鼠中的研究表明连续 10 天每天注射可以增强从淋巴组织和脾中收集的树状细胞的数量和 APC 活性，而且这些细胞对向 CD4+ 和 CD8+ T 细胞呈递抗原极为有效。据信皮肤的朗氏细胞 (Langerhans cells) 代表一种能在

摄入后呈递抗原并转移到局部淋巴结的树状细胞。因为认为大多数树状细胞不表达在巨噬细胞(例如 Fc<sub>y</sub>RI)上典型的 Fc 受体阵列，因此不能预知 Fc 融合蛋白的共定位效果是否包含这一 APC 系。

为验证 Flt-3L 能否用作佐剂，将小鼠 Fc-PSMA 和小鼠 Fc-Flt31 而  
5 非小鼠 Fc-GMCSF 融合蛋白(巨噬细胞和粒细胞的有效刺激剂)注射成组的小鼠。在这种情况下，可以预期通过树状细胞的激活和摄入所介导任何佐剂效果，其最终导致针对 PMSA 的抗体应答。结果概括于图 6 中。

这一研究表明小鼠 Fc-Flt3L 是能够刺激抗-PSMA 抗体的强有力的佐  
10 剂，即便不优于也至少等同于等量的 Fc-GMCSF。这一结果支持了所观察到的 Fc-抗原 和 Fc-佐剂 的结合可以特别有效地诱导免疫应答。这一结果还表明树状的 APC 显然与巨噬 APC 一样能被 Fc-抗原和 Fc-细胞因子靶定，这表明至少一种形式的 Fc 受体存在于这些细胞表面。

#### 实施例 6. 对 Fc-EpCAM 和 EpCAM-Fc 融合蛋白的免疫应答

用实施例 1 中的方法和质粒将另一种潜在的重要人癌抗原 EpCAM  
15 (也称为 KSA 和 17-1 A 抗原) 与小鼠 IgG2a Fc 区域构建融合蛋白，单独施用或与作为佐剂的 Fc-GMCSF 共同施用。小鼠通过皮下注射，并在 3 周后用含于 PBS 的 10 μg Fc-EpCAM 1 μg Fc-GMCSF 加强。对照小鼠不接受 Fc-GMCSF。在加强后 7 天(图 7A)和 14 天(图 7B)后测定直接针对 EpCAM 的抗体滴度。该结果显示当单独使用 Fc-EpCAM 时，其是有效的  
20 免疫原(空心菱形)，而 Fc-GMCSF 可进一步增加对这一抗原的应答(闭合三角)。

此外，EpCAM 抗原可以作为 EpCAM-muFc (参见实施例 1，图 1B)，即相对于 Fc 片段的反方向表达。将这一分子通过皮下注射免疫 T  
25 Balb/c 小鼠。使用了更高剂量的 EpCAM-Fc 融合蛋白用于(25 μg 每剂)，佐剂的量也得以增加(2.5 μg Fc-GMCSF)。在免疫 14 天(图 8A)和 21 天(图 8B)后检测针对的抗体滴度。不存在 Fc-GMCSF(图 8A 和 8B, (空心菱形))下单独的 EpCAM-Fc 蛋白是完全致免疫的。添加了 The addition of  
the Fc-细胞因子后抗体滴度增加了 3 倍 (图 8A 和 8B, (实心三角))。

30 为检测对 EpCAM 的免疫应答能否防止哺乳动物中表达这一抗原的肿瘤细胞，对非免疫小鼠或那些由 EpCAM-Fc 融合蛋白(某些情况下是 Fc-细胞因子)免疫的小鼠由尾静脉注射 10<sup>5</sup> CT26 由人 EpCAM (Gillies

等(1998)J. 免疫学 160: 6195)转染的小鼠癌细胞克隆。 21 天后, 将动物处死并通过通过下述方法估计肺转移瘤的范围(1) 根据肺表面有效区进行肿瘤分类; (2) 通过称重和与正常动物肺的比较确定由于肿块所导致的不同重量增加。结果概述于表 1, 其表明与对照小鼠相比所有的经免疫  
5 小鼠均表现出在统计学上显著的肿瘤还原酶减小, 包括单独用 EpCAM-Fc 免疫的动物。用 Fc-EpCAM 作为抗原也出现类似的结果。

表 1

处理组	肿瘤还原酶值	肺平均重量 (mg)
对照	4, 4, 4, 1, 1	412+/-130
EpCAM-Fc	0, 0, 0, 0, 0	210+/-21
EpCAM-Fc+Fc-GM	0, 0, 0, 0, 0	240+/-19
EpCAM-Fc+Fc-IL2	0, 0, 0, 0, 0	230+/-19

用下列等级表示基于肺表面的肺有效区域的肿瘤还原酶值: 1 = 1-25% 有效区域; 2 = 26-50% 有效区域; 3 = 51-75% 有效区域; and 4 = 76-10 100% 有效区域。

#### 实施例 7. 在单一的融合蛋白中抗原-Fc 和 细胞因子佐剂相结合

实施例 6 中所描述的蛋白, EpCAM-Fc, 是与作为羧基蛋白结构域的免疫球蛋白 Fc 区域相连接的 N-末端抗原的示例。这一蛋白或与其它与之相似的蛋白与 Fc-佐剂融合蛋白例如 Fc-细胞因子共同施用以增加针对该抗原所产生免疫应答。另外, 该抗原免疫球蛋白重链恒定区域和佐剂蛋白 (例如细胞因子) 可以作为单一的融合蛋白生产, 例如 EpCAM-Fc-GMCSF 融合蛋白。  
15

用小鼠 IgG2a Fc 和 GM-CSF 序列构建该蛋白的表达质粒以使该构建体能在小鼠模型中进行评价。将从原始的 EpCAM-Fc 表达载体(实施例 1)获得的包含前导-EpCAM-Fc 编码序列的 Xba I 到 Sma I 小片段连接到 Fc-GMCSF 表达载体 (图 9)中的 Sma I 到 Xba I 大片段上。  
20

用氯化钙沉淀法将所得载体, pdCs-EpCAM-Fc-GMCSF, 引入 293 细胞以瞬时表达, 通过电穿孔法引入 NS/0 细胞以稳定表达。在含氨基甲酸乙酯 (0.1 μM) 的培养基中培养上述细胞以筛选稳定的转染子。Fc 通过 ELISA (参见实施例 1)验证表达克隆并将高水平表达的产生菌在培养基上涂开。由条件培养基通过结合并洗脱自蛋白 A Sepharose (Repligen,  
25

Needham, MA)对蛋白 EpCAM-Fc-GMCSF 进行纯化, 由 SDS-PAGE 分析其结构完整性, 其后由 2-巯基乙醇还原。结果显示该蛋白分子量约为 90kD, 作为预期的 EpCAM, Fc 和 GMCSF 单链融合蛋白。

为比较所结合的融合蛋白的相对免疫原性, 将等剂量的 EpCAM-Fc-GMCSF 和在组合 EpCAM-Fc 和 Fc-GMCSF 中单独的融合蛋白以皮下的方式注射于小鼠。14 天后进行同样的注射, 并在加强 7 天后检测血清样本中相对于人 EpCAM 的特异抗体的活性。相同的方法也可以用于其它蛋白或多肽抗原以及其它刺激细胞因子, 例如 IL-2,IL-12 和 Flt3L 。

#### 实施例 8.用 Fc-抗原通过 DNA 注射免疫

10 用于在哺乳动物细胞中转染和生产小鼠 FcEpCAM 和 EpCAM-Fc 的相同表达载体(参见实施例 1)作为“裸”质粒 DNA 注射到 Balb/c 组小鼠的后腿肌肉中。所注射的 DNA 含于 PBS 或 25% (w/v)的蔗糖溶液中, 浓度为 0.5 mg/ml 总量 100  $\mu$ g。注射每 3 周重复一次共 3 次。在不同的时间检测抗体应答并用 ELISA 定量, 在该定量过程中用人 Fc-EpCAM 15 包被的 96-孔板进行俘获, 用 HRP-连接的抗小鼠 Fc 特异多克隆抗体进行检测(Jackson 免疫研究)。图 10 中所列的数据代表注射后 14 天(图 10A), 27 天 (图 10B), 55 天 (图 10C)和 69 天 (图 10D) 所记录的抗体滴度。

20 图 10 所列的结果表明两种方案在第一个月中所诱导出低滴度的抗-EpCAM 抗体 (图 10A 和 10B)。在第 55 天获得很高的抗体滴度 (图 10C), 而到第 69 天获得更高的抗体滴度 (图 10D)。用表达 EpCAM-Fc 的载体进行 DNA 注射也获得相似的结果, 但滴度略低。这些数据表明表达为含蛋白抗原和免疫球蛋白 Fc 区域的融合分子的抗原能诱导免疫应答, 当通过注射裸 DNA 引入时, 持续的抗原暴露导致在大多数动物中的 25 应答延迟。

通过培养来自 DNA 疫苗注射或蛋白免疫(注射 70 天后)并由不同浓度的 Fc-EpCAM 蛋白体外刺激的小鼠的脾细胞以检测细胞免疫应答。如图 11 所示的数据(顶栏)表明对用 Fc-EpCAM(十叉)蛋白免疫的或用 CMV 启动子-EpCAM-Fc (空心圆圈)或 CMV 启动子-Fc-EpCAM (闭合菱形) 表达载体进行 DNA 疫苗注射所免疫的动物中的抗原的增殖应答 30 (通过掺入  $^{3}H$ -胸腺嘧啶检测)。即便在很低的剂量下, 该蛋白免疫的动物表现出对该抗原更强的免疫应答。DNA 接种免疫的动物的免疫应答 (也

在图 11 的底栏中不同部分示出)是剂量依赖的但在数量上低于蛋白注射的小鼠。这些应答以 MHC II 类限定的 CD4<sup>+</sup> T 细胞应答为特征。

为检测细胞毒性活性(一般表示 MHC I 类限定的 T 细胞应答), 将 DNA 或蛋白免疫的小鼠脾细胞培养物在约 10 U/ml IL-2 存在下培养 5 天。效应细胞是所培养的脾细胞, 靶细胞是标记的人 EpCAM-表达 CT26 克隆癌细胞(Balb/c 同系小鼠)或标记的亲代的(非转染的 CT26 细胞)。效应细胞和靶细胞以不同的比例混合, 测定裂解的程度。在去污剂存在下培养标记靶细胞可达到 100% 的裂解值, 所释放的标记物的量... 检测。

结果如图 12 所示, 其中图 12A 表示抗表达人 EpCAM 的 CT26 细胞的脾细胞活性, 图 12B 表示抗亲代 CT26 细胞的脾细胞活性。在两幅图中, 空心的菱形代表从用带有 Fc-EpCAM 构建体的 DNA 免疫的小鼠分离的脾细胞, 空心的三角代表从用带有 EpCAM-Fc 构建体的 DNA 免疫的小鼠分离的脾细胞, 十叉代表从用 Fc-EpCAM 融合蛋白免疫的小鼠分离的脾细胞。

图 12 说明尽管 DNA 疫苗注射产生针对两种靶细胞弱的细胞毒性应答, 在蛋白免疫的小鼠中可见显著提高的细胞毒性。亲代 CT26 肿瘤细胞和表达 EpCAM 的 CT26 肿瘤细胞在分析中均被杀死。所观察到的针对亲代 CT26 细胞的细胞毒性可能是因为这些细胞表达高水平的小鼠 EpCAM 同系物, 该同系物与相应人源蛋白在氨基酸水平上具有 81% 的同一性。

然而, Fc-EpCAM 蛋白免疫的确产生针对表达人 EpCAM 的 CT26 肿瘤细胞显著的细胞毒性活性, 由此解释了实施例 6 中描述的肿瘤防御活性。

#### 实施例 9. 用包含蛋白癌抗原亚区域的 Fc-融合蛋白的免疫.

尽管一些完全蛋白不用作免疫治疗的抗原, 其中一些小的蛋白亚区域却可能十分有效。例如蛋白可以包括经翻译后修饰的结构域使其免疫原性降低, 由此减少实际的多肽组分的免疫活性。大蛋白可以诱导仅与抗原的非肽部分起反应的抗体, 不介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC), 即抗肿瘤免疫应答的潜在重要组分。人黑素瘤-特异的软骨素硫酸酯蛋白多糖(MCSP)抗原是这种情况的一个很好的示例, 其可在

所有的黑素瘤和几种类型的脑癌中表达。该蛋白高度糖基化并通过附加及条糖胺聚糖链得以进一步修饰。已知的抗体 9.2.27 (Bumol 等(1982)美国国家科学院汇编 79: 1245-1249), 以高度亲和性与这一蛋白相结合, 但不介导任何效应子功能, ADCC 或补体介导的细胞毒性(CDC)。甚至这种抗体的部分人源化(嵌合的)的形式也不能介导这一活性。

为了在这一大分子更理想的靶区域引起更集中的应答, 验证了该蛋白序列中的推定的聚糖附加位点。 (Pluske 等 (1996) 美国国家科学院汇编 93: 9710-9715)。筛选出了距细胞表面的跨膜序列不远的亚区域和一些距聚糖结合位点很远的序列。

肽序列如下:

QGATLRLDPTVLDAGELANRTGSVPRFRLLEGGRHGRVVRVPRART  
EPGGSQLVEQFTQQDLEDGRLGLEVGRPEGRAPGPAGD (SEQ ID NO:

21) 是反向翻译的, 所得的 DNA 序列以化学方式合成, 用与上述实施例中相同的酶切位点连接到 pdCs-Fc-X 表达载体中。将翻译终止位点加到  
15 3' 端编码最后一个氨基酸的序列后, 其后紧接着一个唯一的 Xho I 位点。最终的表达质粒以电穿孔的方式转化到 NS/0 骨髓瘤细胞中, 表达所需蛋白稳定的转染子按实施例 1 中描述的方法获得。

用蛋白 A Sepharose 层析 (Repligen, Needham, MA)从培养物的上清液中纯化 Fc-MCSP 蛋白。在以皮下方式将含于 PBS 中的 50 µg Fc-MCSP 融合蛋白单独或与 5 µg Fc-GMCSF 佐剂相结合注射所免疫的 Balb/c 小鼠中以检测抗体滴度。结果如图 13 所示。实心的菱形代表正常血清中的抗体滴度, 空心的方块代表用 Fc-MCSP 免疫的小鼠血清中的抗体滴度, 实心的三角代表用 Fc-MCSP 和佐剂 Fc-GMCSF 免疫的小鼠血清中的抗体滴度。

25 在第 14 天检测到对这一 MCSP 的亚区域的特定免疫反应, 以及在加强免疫后明显升高。这一结果表明与单独用 Fc-MCSP (空心三角)免疫小鼠相比用 Fc-GMCSF 和 Fc-MCSP 免疫的小鼠刺激产生针对 MCSP (实心三角) 较高的抗体滴度。

30 实施例 10. 用含病毒抗原的 Fc-融合蛋白进行免疫

开发针对引起 AIDS 的人免疫缺陷病毒 (HIV)的有效疫苗是疫苗研究的一个重要目标。最近, 有几篇报道显示该病毒包膜的特定性质是在

无关的表位引起免疫应答，由此屏蔽病毒颗粒重要的和潜在的中和区域。这些包括存在作为捕获器的高度优势免疫原性区域和广泛的糖基化从而完全屏蔽和还原重要的表位的免疫原性(Wyatt 等 (1998) 自然 393: 705-11)。

一种可能的包围该捕获器的机制是表达病毒包膜基因的小区域以避免不予保护的优势免疫应答并诱导中和应答。小亚单位疫苗的一个问题是还原的免疫原性或者作为合成肽或者是一小蛋白。一个方法已将该蛋白或肽结合到致免疫的载体蛋白例如匙孔碱血蓝蛋白 (KLH)上。也由于该蛋白和多肽诱导对 KLH 的强免疫应答。另一方法是将 Fc 与如实施例 1 中所描述的例如 gp41 (病毒包膜锚定结构域 gp 160) 的外结构域的亚区域构成融合蛋白。与其它载体不同，该免疫球蛋白区域被视为“自身”由此将优势免疫效果降到最低。

The Fc-gp41pep626 融合构建体包括一融合于小鼠免疫球蛋白 Fc 区域的含 44 个 氨基酸的多肽。HIV 菌株 IIIB 在这一区域的序列包括 N-连接糖基化信号，因此由 293 细胞通过瞬间表达或由 NS/0 骨髓瘤细胞通过稳定转染所产生的 Fcgp41pep626 融合蛋白表现出在 SDS-PAGE 分析时迁移率的高度变化，由此说明糖基化程度的不均一性。

尽管这一病毒抗原很小(44 氨基酸残基) 且是异源糖基化但可能在 Balb/c 小鼠(参见图 14)中引发免疫应答。此种情况下,以 5 只小鼠为一组第一天以牙内地方式注射 25 $\mu$ g Fc-gp41pep626，并在两周期间再注射两次，或单独(空心菱形) 或与 2.5  $\mu$ g Fc-佐剂融合蛋白 Fc-GMCSF (空心方块) 或 Fc-IL2 (实心三角)共同施用。图 14A 和 14B 分别代表在第二次加强后 7 天和 33 天的抗体滴度。

该免疫应答更依赖于与 Fc-细胞因子共同施用，花费较长时间以获得高抗体滴度。可以理解用修饰这一不含糖基化信号的序列(事实上，许多菌株并不编码这一位点)或通过酶学方法在体外去除糖链可以引发强免疫应答。

#### 实施例 11: Fc-融合体的佐剂活性

##### 包含细胞表面分子胞外结构域的蛋白

为构建 Fc-佐剂融合蛋白，有时可以将 Fc 与膜结合蛋白胞外结构域相融合。例如 CD40 配体(CD40L)在 N 末端与 Fc 的 C 末端相融合。可选择使用接头。

CD40L 是有用的因为其受体 CD40, 在 B 表面表达, 而且起包括在由 T 细胞对 B 细胞的刺激过程中。类似于肿瘤坏死因子, CD40L 是三聚体其可引起在细胞表面其受体的二聚体化或三聚体化。结果细胞间的受体结构域产生接触和信号转导。与 TNF 一样, CD40L 可能是膜结合的  
5 但也可能从细胞表面切除, 类似于细胞因子的功能。

Fc-CD40L 融合蛋白与 Fc-抗原融合蛋白共同施用于动物。在对照实验中, 该 Fc-CD40L 蛋白和该 Fc-抗原蛋白施用于不同组的动物。可以理解注射了两种融合蛋白的动物比单独施用一种融合蛋白的动物产生高的抗体滴度。

10 另外, 单一的包含抗原和 CD40L 组分的 Fc 融合蛋白组分与可选择的与位于 Fc, CD40L, 和抗原组分之间的接头共同使用。该融合蛋白可能是 N-末端到 C-末端方向的 Fc- (L)-抗原 - (L)-CD40L, FC- (L)-CD40L- (L)-抗原, 抗原) L)-CD40L- (L)-Fc, CD40L- (L)-抗原 - (L)-Fc, 抗原 - (L)-Fc- (L)-CD40L, 或 CD40L-Fc- (L)-抗原 - (L)。该包括 Fc, 抗原, 和 CD40L 的融合蛋白注射到动物中并测定抗体滴度。将融合蛋白与 CD40L 和抗原共同注射小鼠所产生的抗体滴度比单独注射仅包括 Fc 和抗原、或 Fc 和  
15 CD40L 的融合蛋白所产生的抗体滴度高。

根据上述施用融合蛋白, 可以通过静脉, 皮下或其它合适的方式注射动物。首次和加强施用抗体和/或佐剂免疫之间的时间以及测定抗体滴度的方法如前面的实施例所述。  
20

可选择的可以使用标准的剂量和分析策略。

#### 等同声明

在不背离本发明的本质或基本特征的前提下, 本发明还包括其他特定的形式。上述的实施例可从各方面解释本发明但并不作为对本发明的限定。本发明的范围由附加的权利要求来界定, 并非根据上述描述限定, 但在与权利要求等同的含义和范围内的所有变化均应视为包括在本发明的范围内。  
25

#### 30 参考文献

上述的所有专利文献和科学出版物的教导均包含于此作为参考。

## 序列表

<110> S. D. 吉利斯(Gillies, Stephen D.)  
劳健明(Lo, Kin-Ming)  
J. S. 小维索洛夫斯基(Wesolowski, John)  
利思进药品公司(Lexigen Pharmaceuticals Corp.)

<120> 增强蛋白和肽抗原免疫原性的 Fc 融合蛋白

<130> LEX-007PC

<140>

<141>

<150> US 60/144, 965

<151> 1999-07-21

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: IL-4R 引物

<400> 1

gtcccggtta tgaaggctt gcaggagc

28

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: IL-4R 引物

<400> 2

ccccctcgagc tagtgctgct cgaagggctc cctg

34

<210> 3  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:PSMA 引物

<400> 3  
aagcttaaat cctccaaatga agc 23

<210> 4  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:PSMA 引物

<400> 4  
ctcgagtttag gctacttcaac tcaaag 26

<210> 5  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:EpCAM 引物

<400> 5  
ccccgggtaa acaggaagaa tgtgtctgtg 30

<210> 6  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:EpCAM 引物

<400> 6  
ctcgagtcat tttagaccct gcattgag 28

<210> 7  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:EpCAM 引物

<400> 7  
tctagagcag catggcgccc ccgc 24

<210> 8  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:EpCAM 引物

<400> 8  
ccttaagcac cctgcattga gaattcag 28

<210> 9  
<211> 148  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:编码 HIV IIIB gp41 的氨基酸残基 626-669 的 DNA

<400> 9  
cccgggatcc ctgateccact ccctgatega ggaatccccag aaccagcaag agaagaacga 60  
gcaggagctg ctggagctcg acaagtgggc ctccctgtgg aactggttca acatcaccaa 120  
ttggetgtgg tacatcaagt gactcgag 148

<210> 10  
<211> 44  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:来自 pdC-muFC 载体的融合多肽

<400> 10  
Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys  
1 5 10 15  
  
Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn  
20 25 30  
  
Trp Phe Asn Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys  
35 40

<210> 11  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:小鼠 IL2 引物

<400> 11  
ggcccggtta aagcacccac ttcaagctcc 30

<210> 12  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:小鼠 IL2 引物

<400> 12  
ccctcgagtt attgagggtt tgggtt 25

<210> 13  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:小鼠 GMCSF 引物

<400> 13  
ccccggaaaaa gcacccgcgg gctcaccc 28

<210> 14  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:小鼠 GMCSF 引物

<400> 14  
ctcgagtcat tttggcttg gtttttgc 29

<210> 15  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:小鼠 Flt3 配基引物

<400> 15  
caagcttaca cctgactgtt acttcago 28

<210> 16  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:小鼠 Flt3 配基引物

<400> 16  
ctcgagtc aa ggctctgg ga gctccgtggc 30

<210> 17  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:小鼠 IL-12p35 引物

<400> 17  
ccccgggt ag ggtcat tcca gt ct ct gg 28

<210> 18  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:小鼠 IL-12p35 引物

<400> 18  
ctcgagtcag gcggagctca gatagc 26

<210> 19  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:小鼠 IL12 p40 引物

<400> 19  
tctagaccat gtgtcctcag aagctaac 28

<210> 20  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:小鼠 IL12 p40 引物

<400> 20  
ctcgagctag gateggaccc tgcag 25

<210> 21  
<211> 83  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明:MSCP 肽

<400> 21  
Gln Gly Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu  
1 5 10 15

Leu Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly  
20 25 30

Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Pro Gly  
35 40 45

Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu Glu Asp Gly  
50 55 60

Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg Ala Pro Gly Pro  
65 70 75 80

Ala Gly Asp

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明:可用作佐剂的寡聚脱氧核苷酸

<400> 22

tccatgacgt tcctgacgtt 20

# 说 明 书 附 图

图 1A

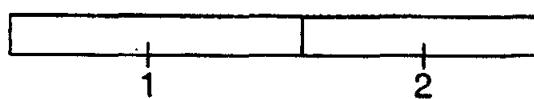


图 1B

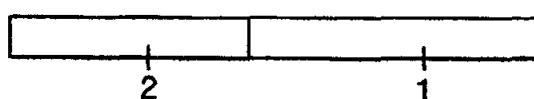


图 1C

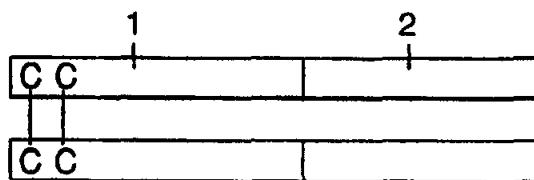


图 1D

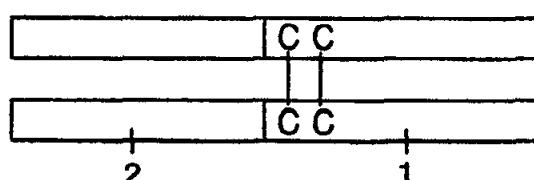


图 1E

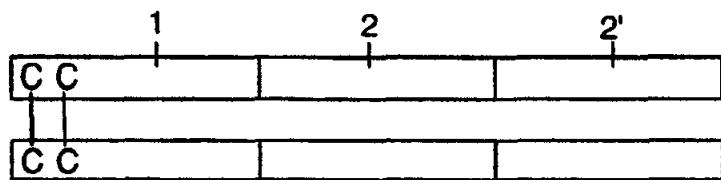


图 1F

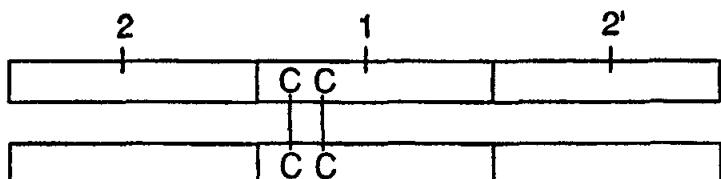
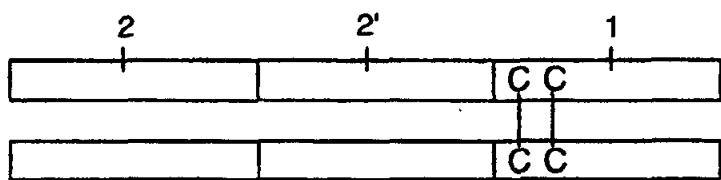
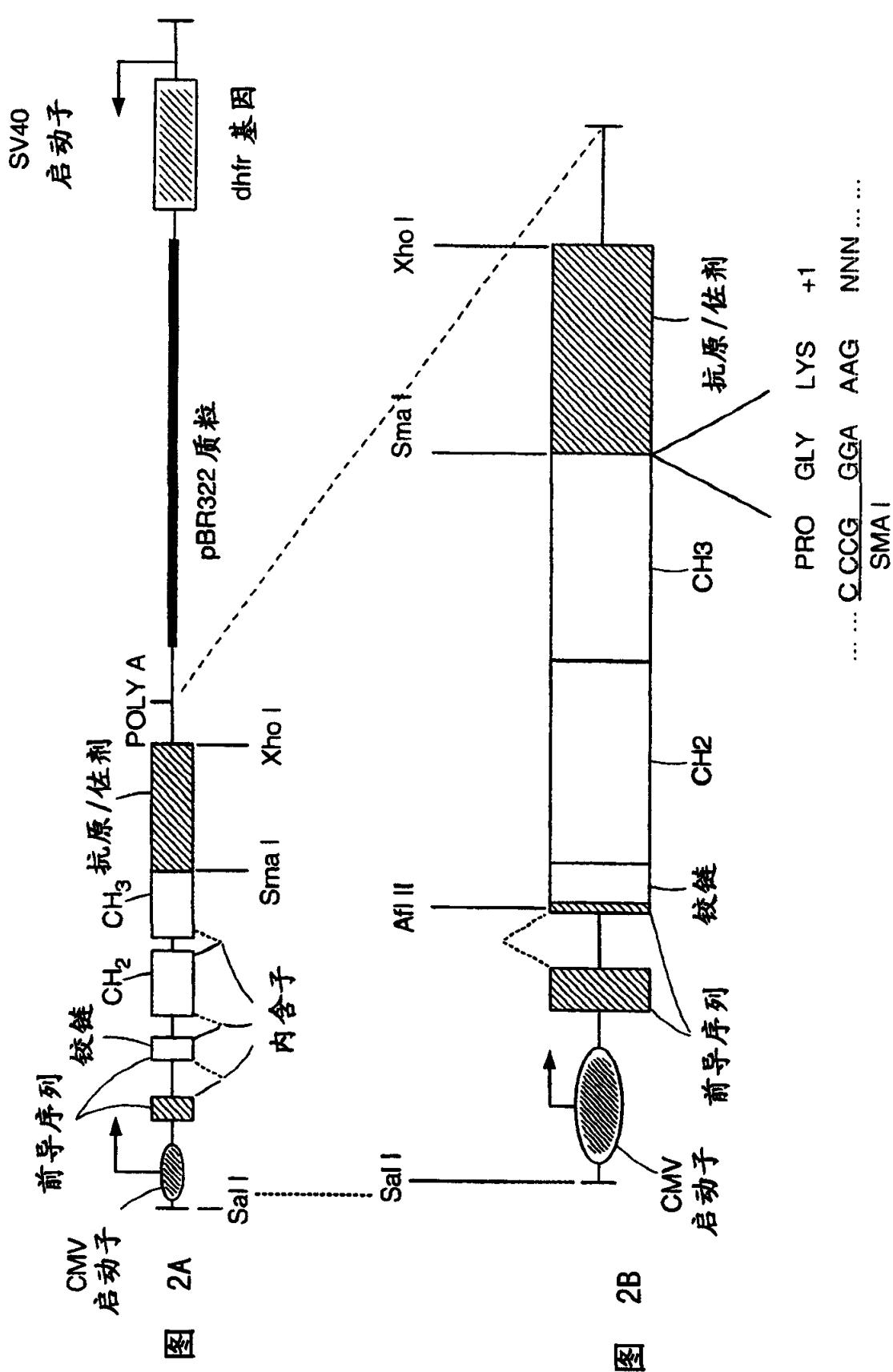


图 1G





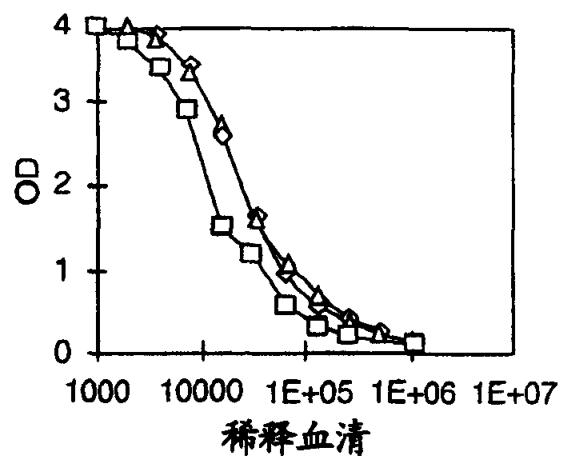


图 3A

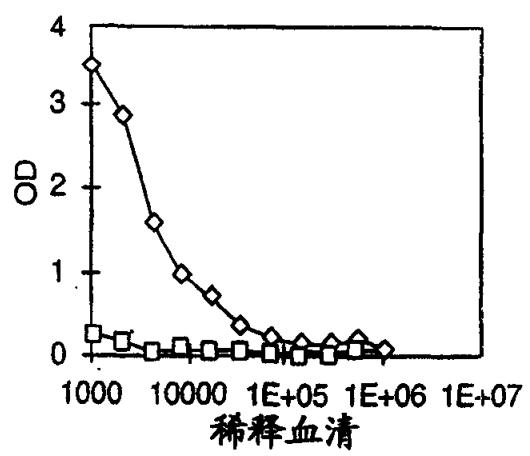


图 3B

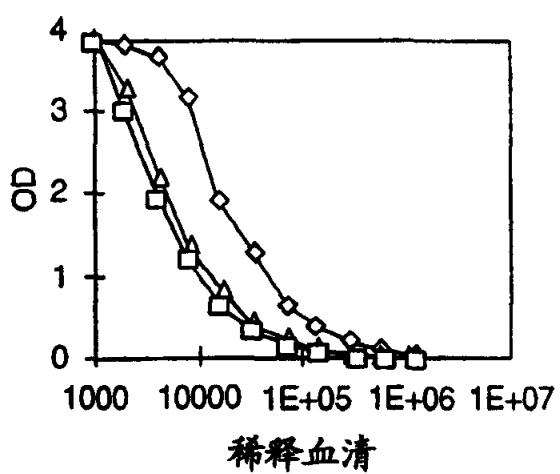


图 3C

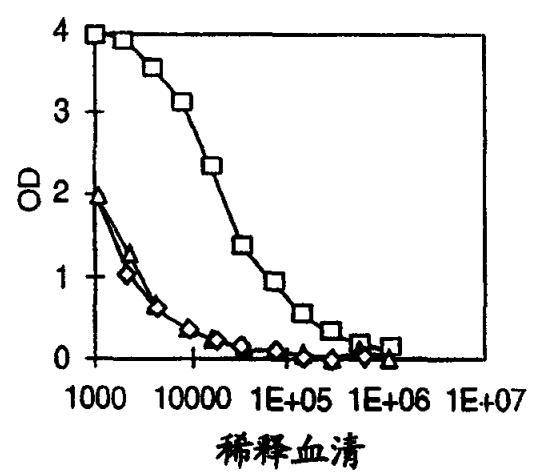


图 3D

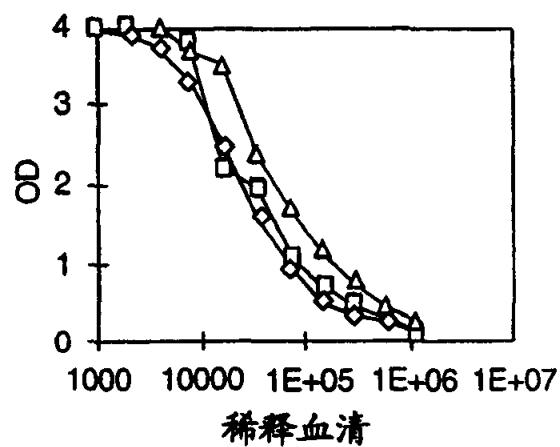


图 3E

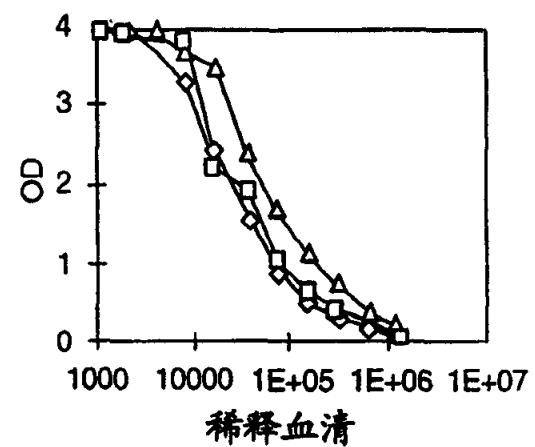


图 3F

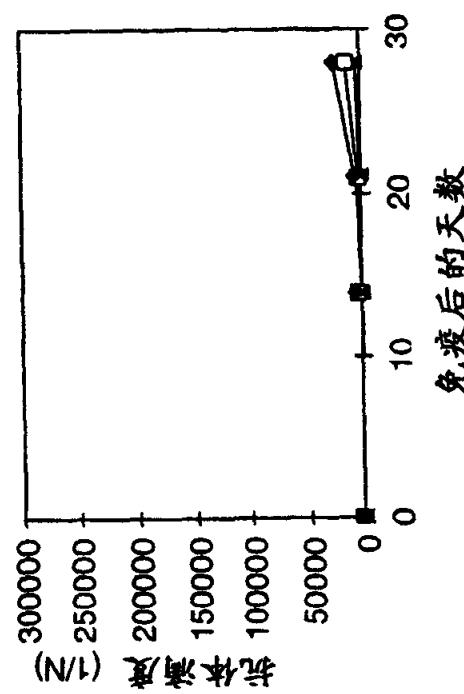


图 4A

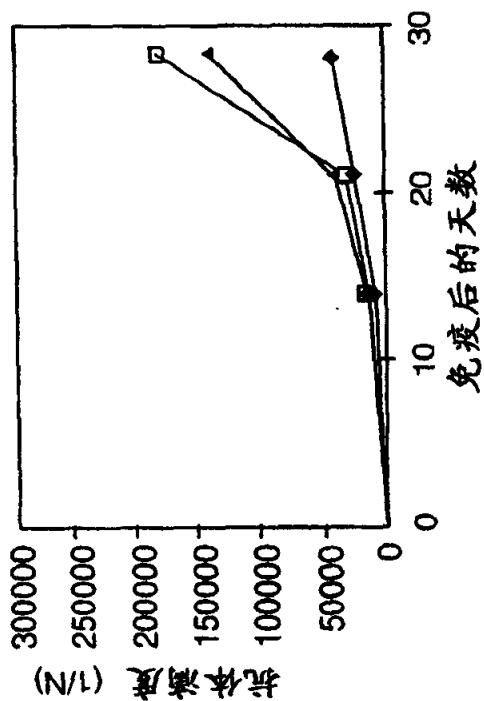


图 4B

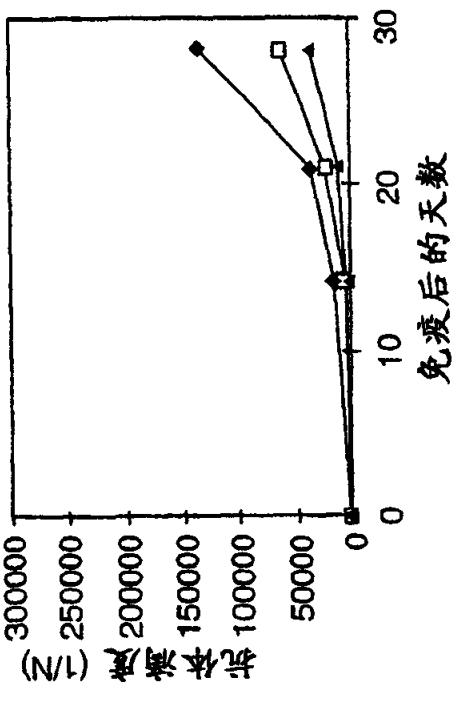


图 4C

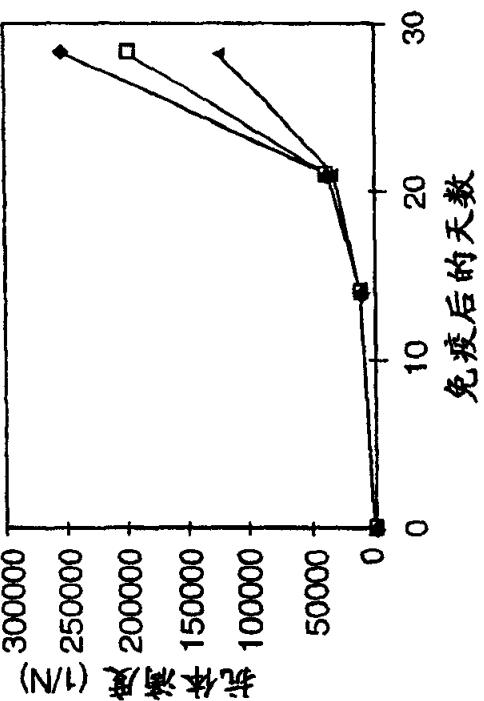
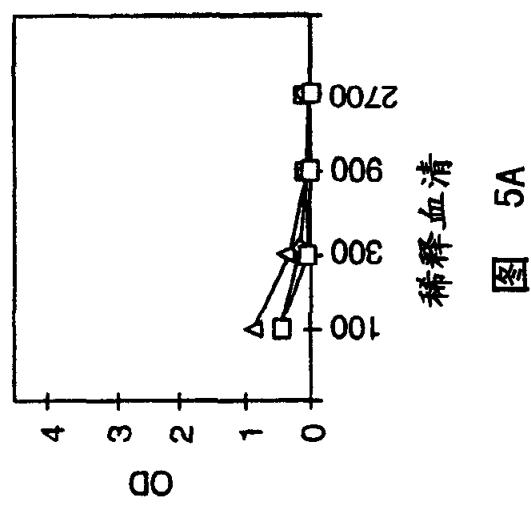
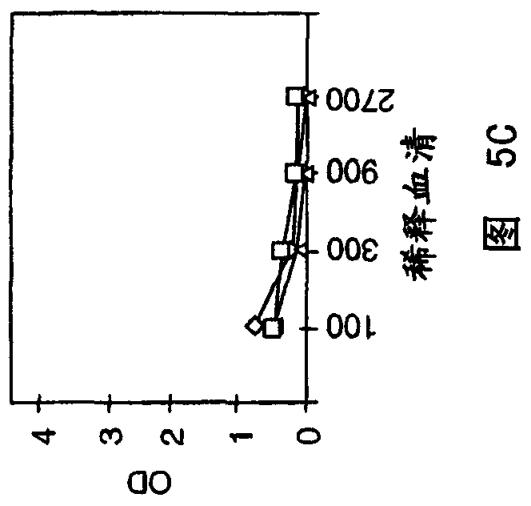
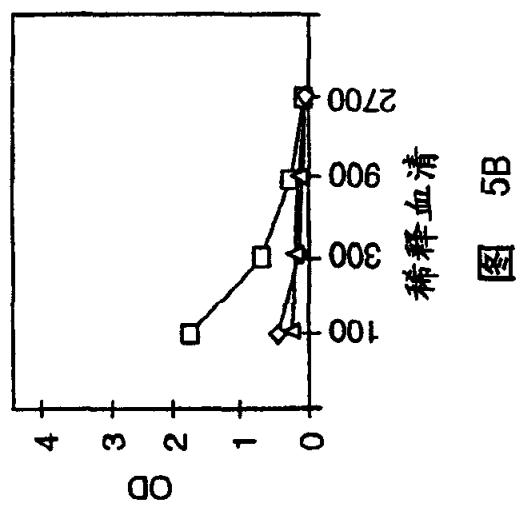
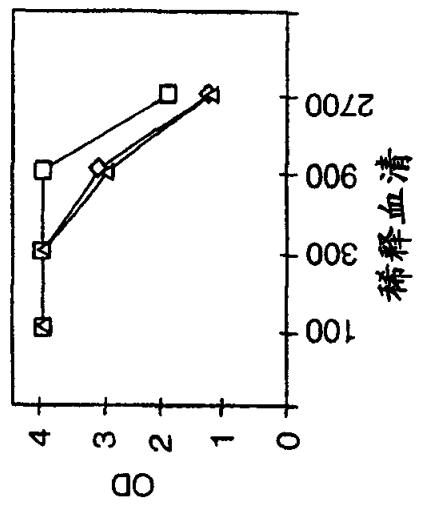
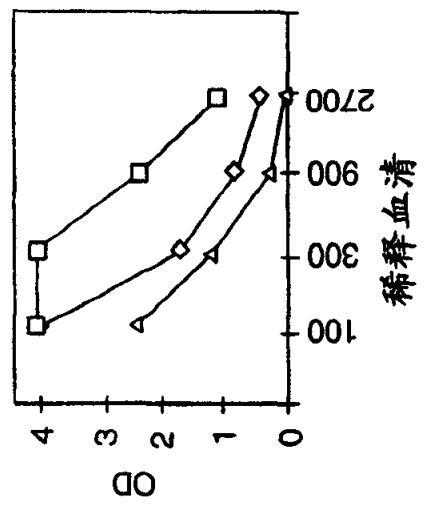


图 4D



5

图  
5C图  
5E图  
5F

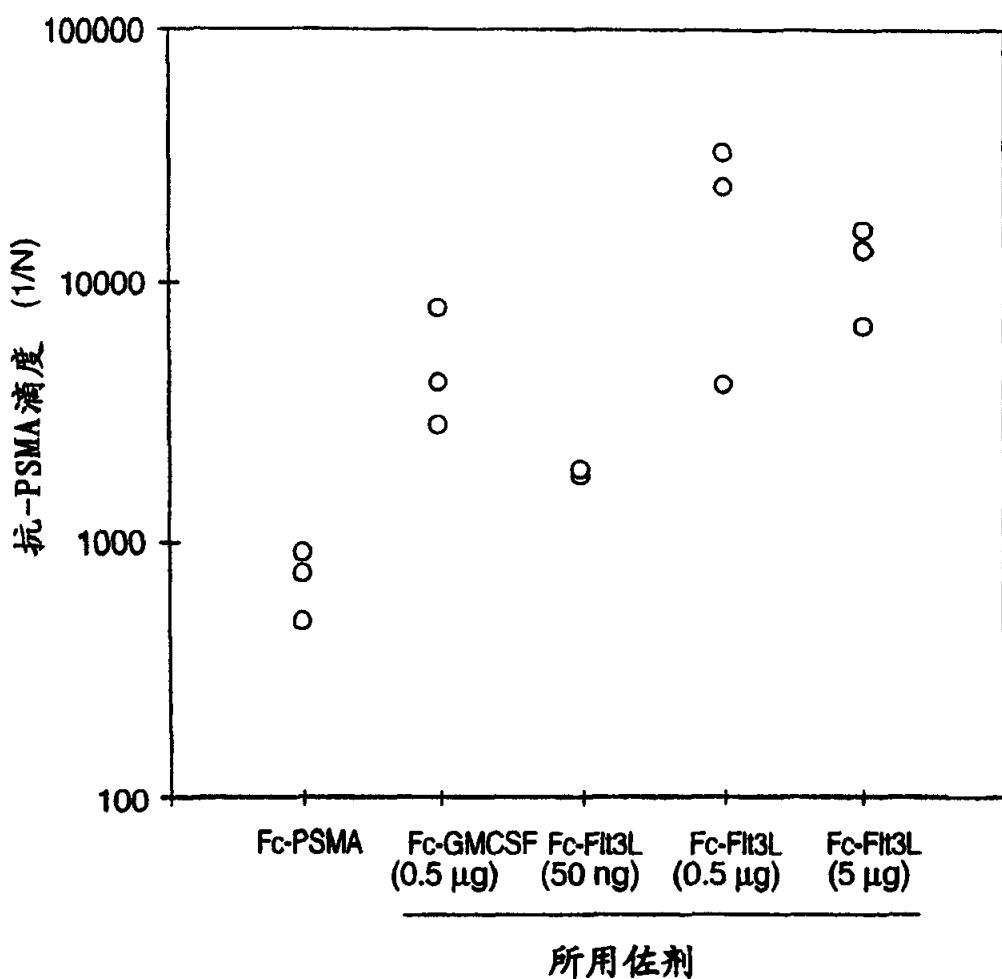


图 6

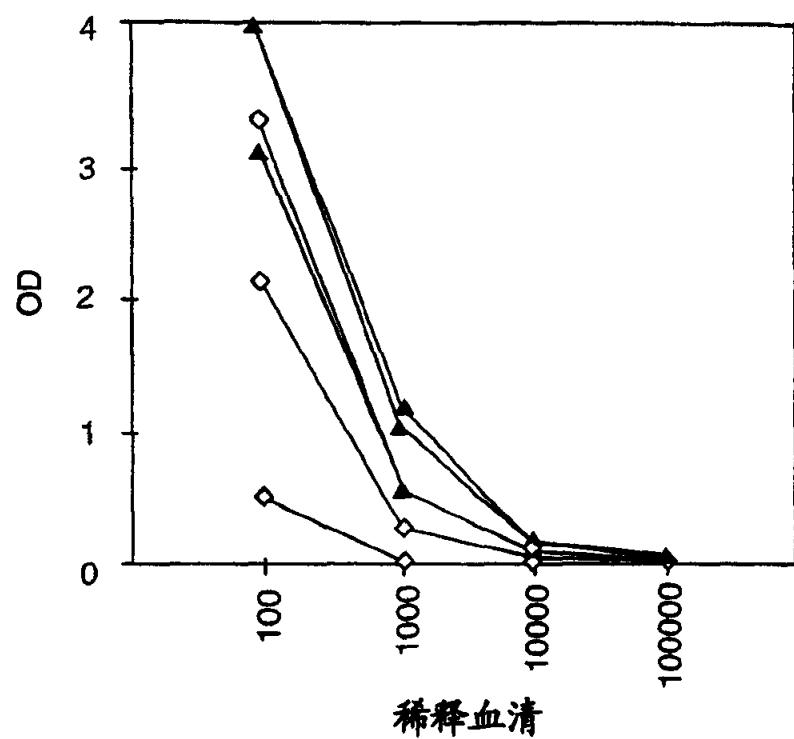


图 7A

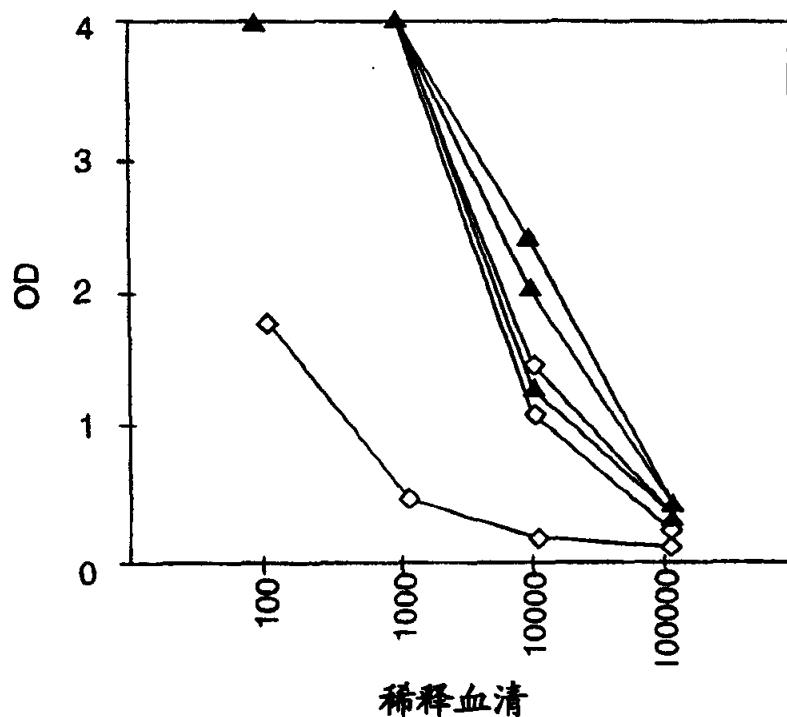


图 7B

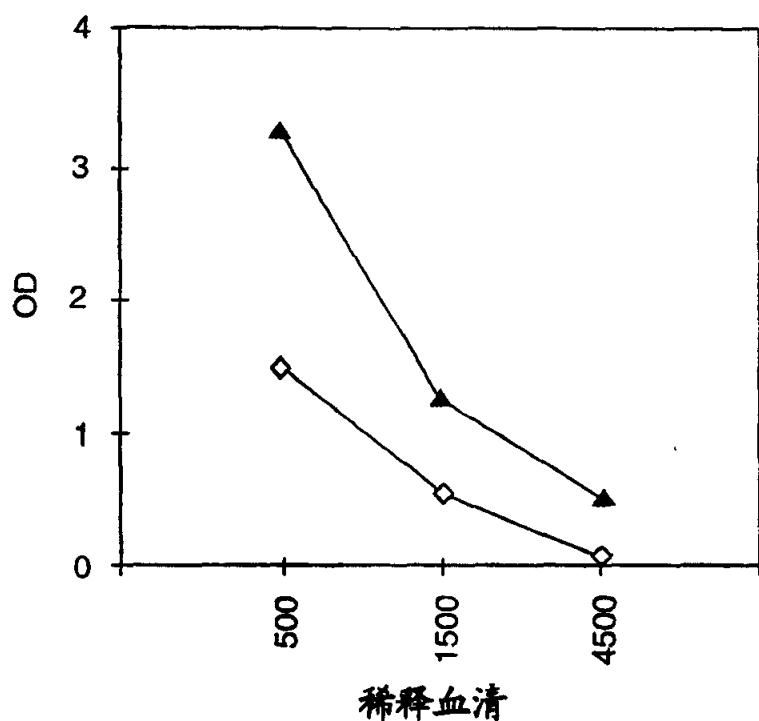


图 8A

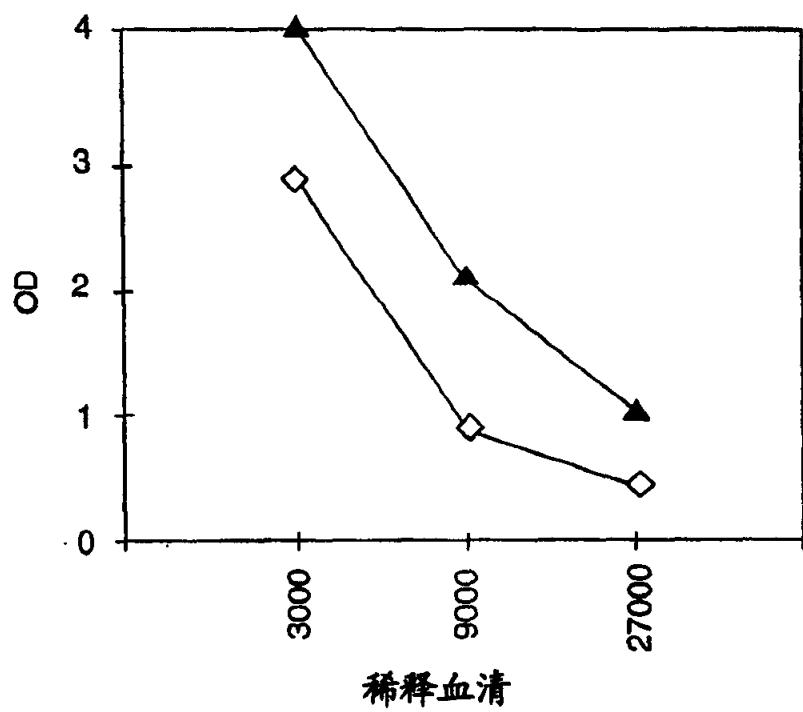


图 8B

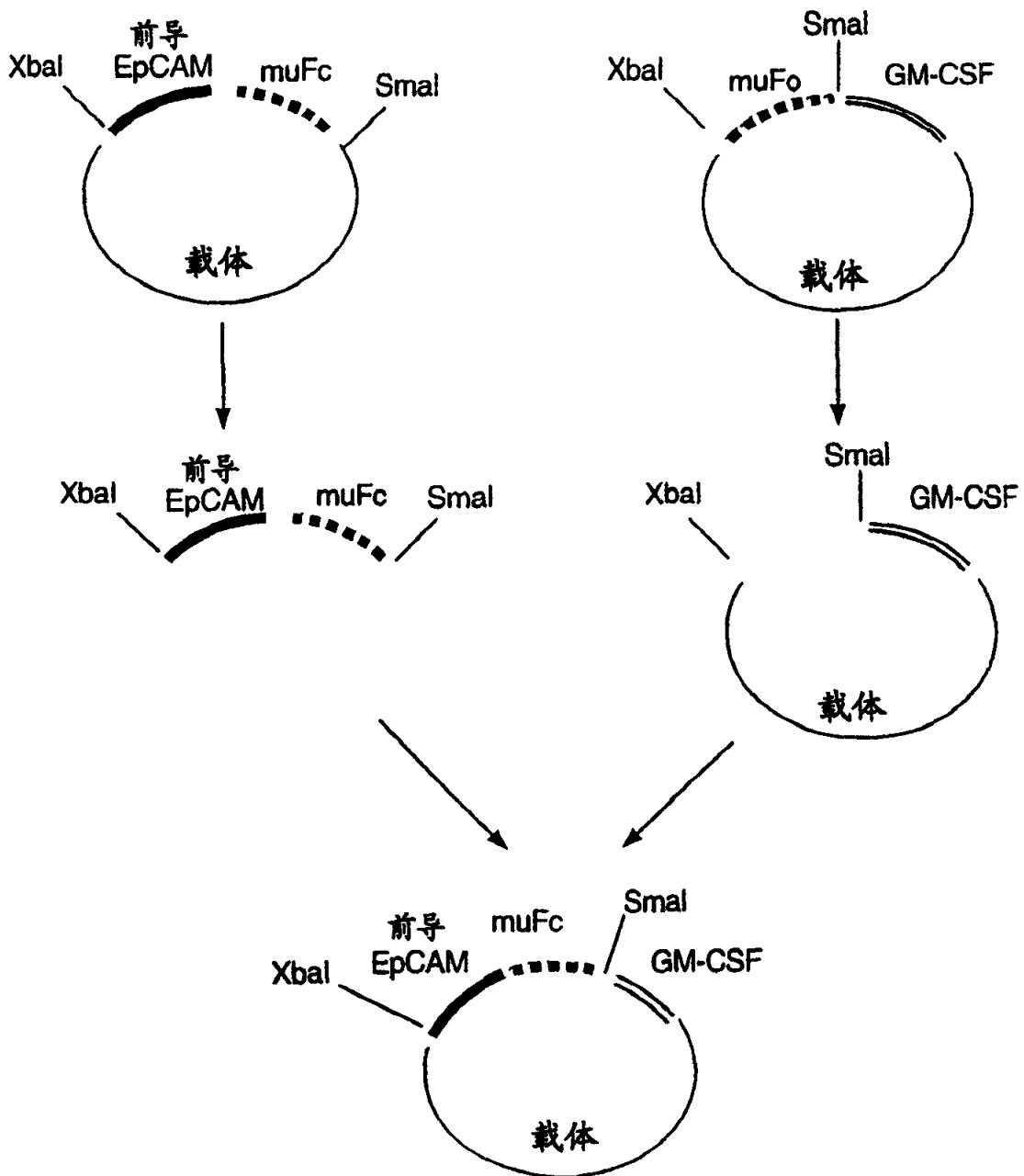
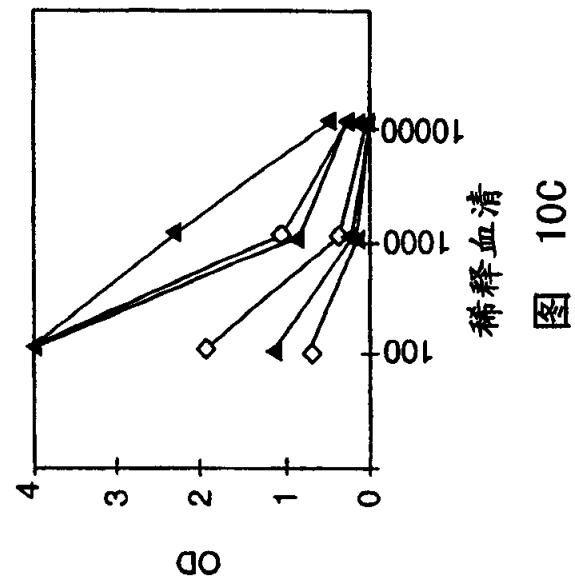
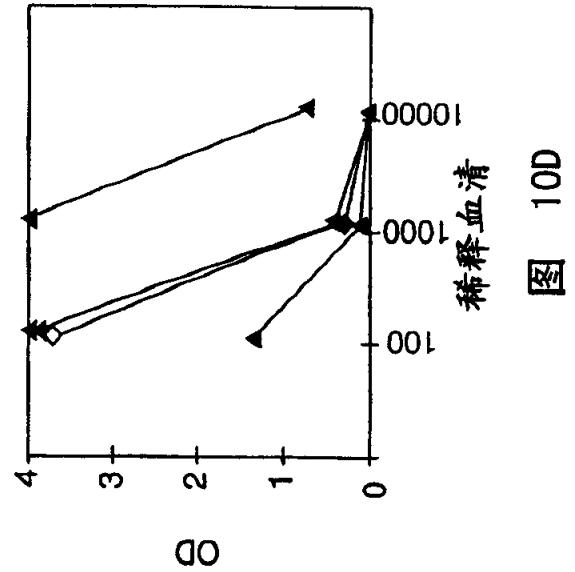
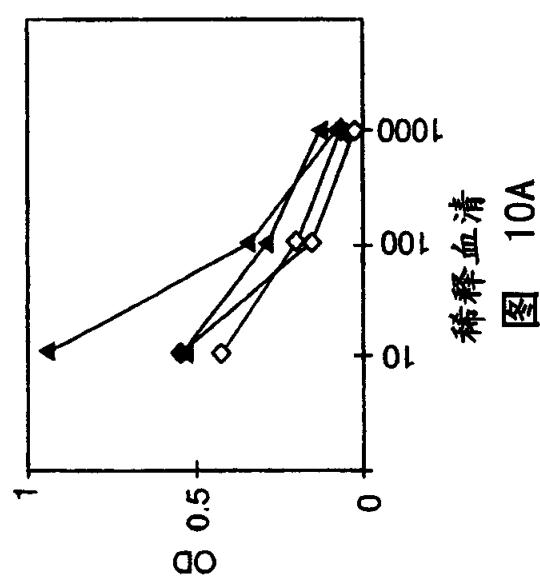
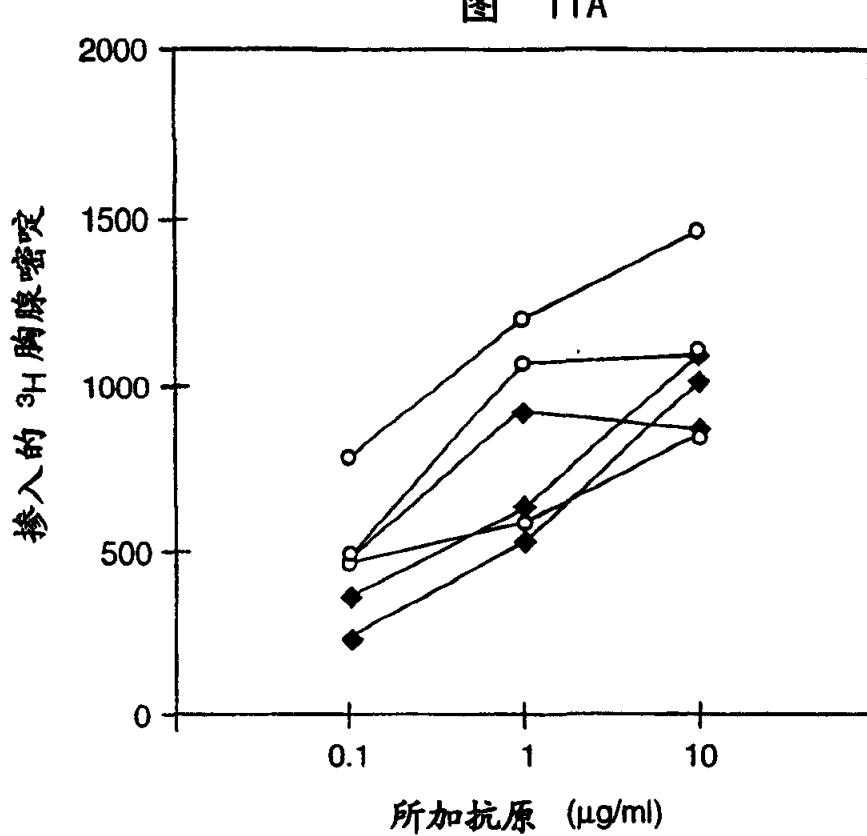
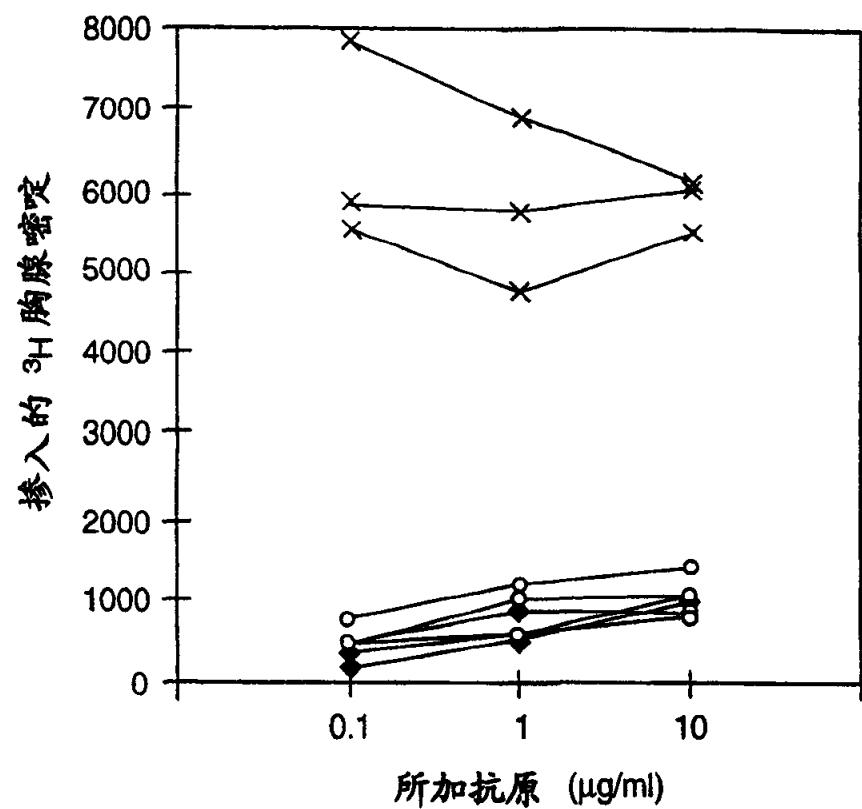


图 9





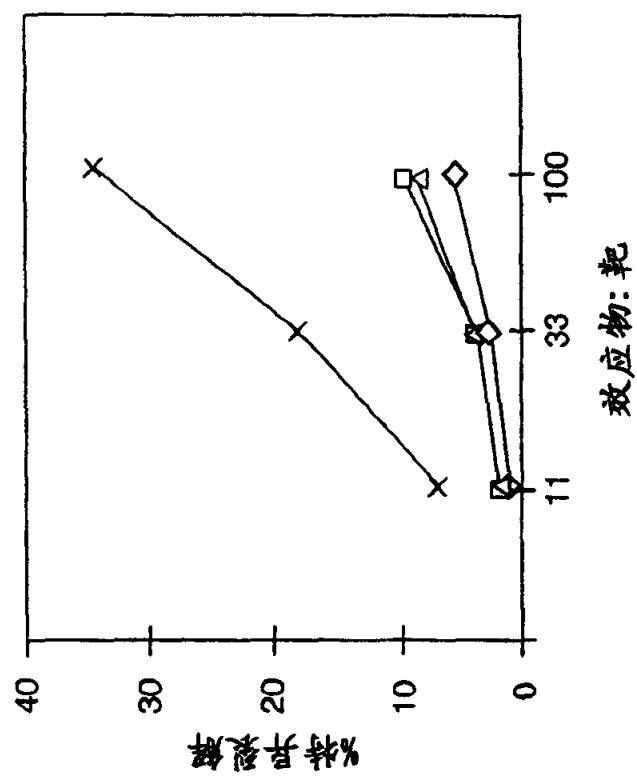


图 12B

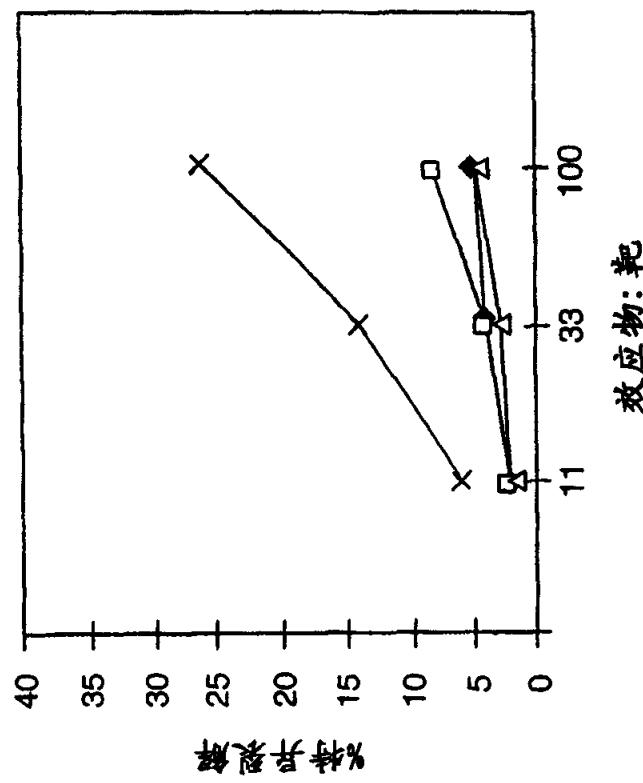


图 12A

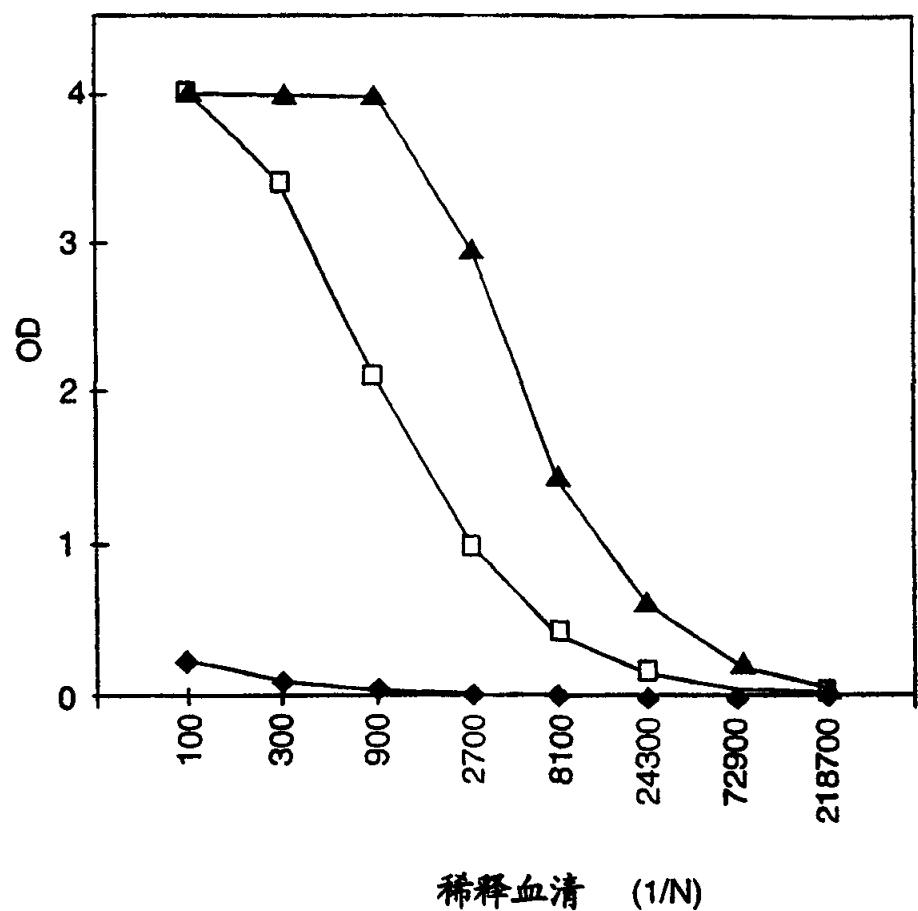


图 13

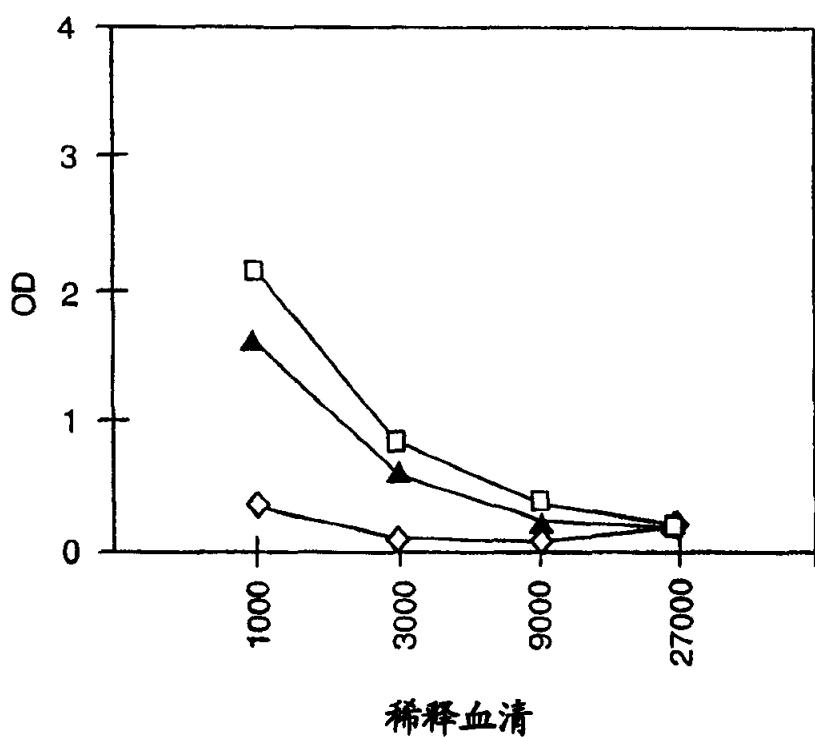


图 14A

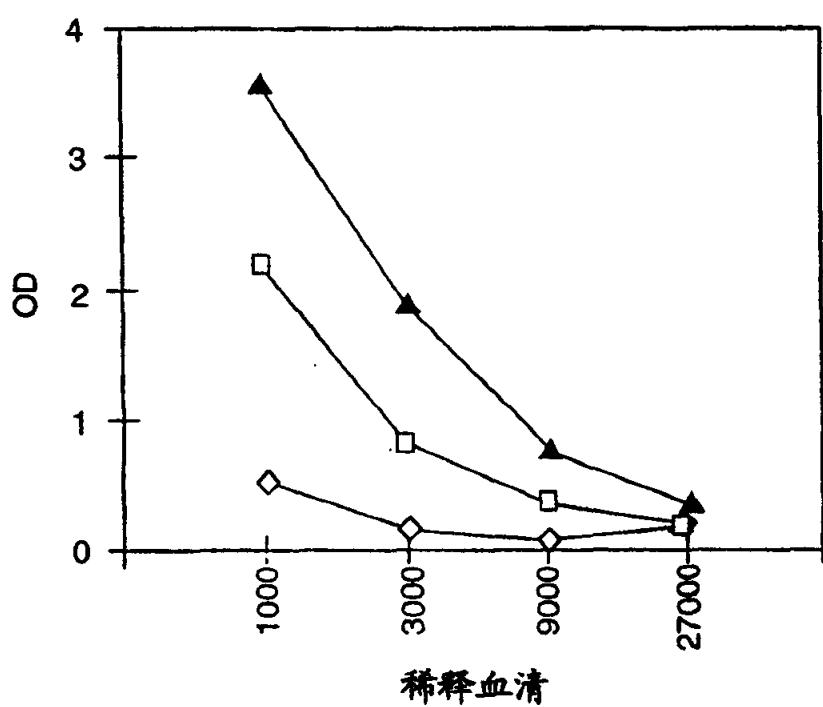


图 14B

专利名称(译)	增强蛋白和肽抗原免疫原性的Fc融合蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">CN1374871A</a>	公开(公告)日	2002-10-16
申请号	CN00813170.8	申请日	2000-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	利思进药品公司		
申请(专利权)人(译)	利思进药品公司		
当前申请(专利权)人(译)	利思进药品公司		
[标]发明人	SD吉利斯 劳健明 JS小维索洛夫斯基		
发明人	S·D·吉利斯 劳健明 J·S·小维索洛夫斯基		
IPC分类号	A61K39/39 A61K38/16 A61K39/00 A61K39/12 A61K39/21 A61K39/385 A61P37/04 C07K14/16 C07K14/475 C07K14/52 C07K14/535 C07K14/705 C07K19/00 C12N15/62 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/12 A61K39/21 A61K39/385 A61K2039/53 A61K2039/54 A61K2039/545 A61K2039/55522 A61K2039/55533 A61K2039/55566 A61K2039/6056 C07K14/005 C07K14/475 C07K14/52 C07K14/535 C07K14/705 C07K19/00 C07K2319/00 C07K2319/02 C07K2319/40 C07K2319/75 C12N15/62 C12N2740/16122 C12N2740/16134 Y10S930/141		
代理人(译)	刘玥		
优先权	60/144965 1999-07-21 US		
其他公开文献	CN1308037C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

**摘要(译)**

本发明公开了在哺乳动物中增强预选蛋白或肽抗原免疫原性的组合物和方法。通过将预选抗原与免疫球蛋白重链恒定区相融合制备Fc - 抗原融合蛋白以增强免疫原性。Fc - 抗原融合蛋白与抗原呈递细胞表面的Fc受体结合,由此将该抗原靶向哺乳动物中的抗原呈递细胞。另外,还公开了佐剂家族,例如Fc - 佐剂融合蛋白,其与Fc - 抗原融合蛋白结合使用以增强或调节针对预选抗原的特定免疫应答。

