



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117222734 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 12

(21) 申请号 202280030030.X

(22) 申请日 2022.04.22

(30) 优先权数据

63/178755 2021.04.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.10.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/018610 2022.04.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/225057 EN 2022.10.27

(71) 申请人 VLP 治疗有限责任公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 赤畑涉

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 罗文锋 梅黎

(51) Int.Cl.

C12N 7/04 (2006.01)

权利要求书2页 说明书28页
序列表19页 附图17页

(54) 发明名称

靶向半乳凝素的免疫疗法

(57) 摘要

本公开提供包含病毒结构蛋白和半乳凝素表位肽的病毒样颗粒,以及包含其的组合物或疫苗,其在医学中特别是在免疫疗法中的用途。

1. 病毒样颗粒,其包含甲病毒的病毒结构蛋白和至少一种半乳凝素抗原。
2. 根据权利要求1的病毒样颗粒,其中所述病毒结构蛋白衍生自甲病毒。
3. 根据权利要求2的病毒样颗粒,其中所述病毒结构蛋白衍生自基孔肯雅病毒或委内瑞拉马脑炎病毒。
4. 根据权利要求3的病毒样颗粒,其中所述病毒结构蛋白包含衣壳、E1、E2和E3。
5. 根据权利要求3的病毒样颗粒,其中所述病毒结构蛋白衍生自基孔肯雅病毒37997株或OPY-1株或者委内瑞拉马脑炎病毒TC-83株。
6. 根据权利要求1的病毒样颗粒,其中至少一种半乳凝素抗原插入到包膜蛋白E3中。
7. 根据权利要求5的病毒样颗粒,其中所述至少一种半乳凝素抗原插入SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的残基321和326之间,或者对应于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的残基321和326的残基之间,或者SEQ ID NO:3的残基330和335之间,或者对应于SEQ ID NO:3的残基330和335的残基之间。
8. 根据权利要求1的病毒样颗粒,其中所述至少一种半乳凝素抗原为半乳凝素-1的肽片段。
9. 根据权利要求8的病毒样颗粒,其中所述至少一种半乳凝素抗原选自:
#5:SFVLNLGKDSNNLSLHFNPRFNAHGDANTIVSNSKDGA WGTEQREAVFPFQPGS
#7:ANLTVKLPDGYEFKFPNRLNLEA
#12:SFVLNLGKDSNNLSLHFNPRFNAHGDANTIVSNTKEDGT WGTEHREPAFPFQPGS,和
#14:ADLTIKLPDGHEFKFPNRLNMEA。
10. 根据权利要求1的病毒样颗粒,其中所述至少一种半乳凝素抗原为半乳凝素-3的肽片段。
11. 根据权利要求10的病毒样颗粒,其中所述至少一种半乳凝素抗原选自:
#17:ADNFSLDALSGSGNPNPQGWPGAWGNQPA
#21:YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGA
#22:YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYPGA PAPGVYPGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYP
ATGPYGA,和
#23:ADSFSLNDALAGSGNPNPQGYPGAWGNQPA。
12. 分离的核酸分子,其包含编码根据权利要求1-11中任何一项的病毒样颗粒的核苷酸序列。
13. 包含根据权利要求12的核酸分子的载体,其中所述载体任选地包含可操作地连接于所述核酸分子的表达控制序列。
14. 药用组合物或疫苗组合物,其包含:
 - (a) 根据权利要求1-11中任何一项的病毒样颗粒、根据权利要求12的核酸分子和/或根据权利要求13的载体;和
 - (b) 药学上可接受的载体。
15. 靶向半乳凝素的免疫治疗方法,其包括给予需要其的受试者有效量的根据权利要求1-11中任何一项的病毒样颗粒、根据权利要求12的核酸分子和/或根据权利要求13的载体。
16. 根据权利要求1-11中任何一项的病毒样颗粒、根据权利要求12的核酸分子和/或根

据权利要求13的载体用于制造用于免疫疗法、治疗或预防癌症或炎症性疾病；在哺乳动物中产生针对半乳凝素的抗体；调节免疫反应；免疫刺激；抑制半乳凝素之间的相互作用；或抑制半乳凝素活性的药用组合物或试剂盒的用途。

靶向半乳凝素的免疫疗法

技术领域

[0001] 本公开涉及靶向半乳凝素的免疫疗法。

背景技术

[0002] 半乳凝素为凝集素家族的成员,其显示处对 β -半乳糖苷的高亲和力。在哺乳动物体内已发现了约15种半乳凝素,由LGALS基因编码,其以连续方式编号。目前在人类中仅鉴定出半乳凝素-1、-2、-3、-4、-7、-7B、-8、-9、-9B、9C、-10、-12、-13、-14和-16。

[0003] 半乳凝素-1(Gal-1)为与含有N-乙酰基乳糖胺(LacNAc;

[0004] Gal β 1-4GlcNAc)的糖蛋白或糖脂结合的动物凝集素的高度保守的家族的成员(非专利文献1:Barondes SH 1994)。Gal-1在许多肿瘤中显著上调和分泌。高水平的Gal-1与许多癌症的肿瘤侵袭性、转移和存活不佳有关(非专利文献2:Astorgues-Xerri L 2014)。先前研究阐明了,Gal-1已成为新型调节检查点,其通过诱导T细胞耗竭、限制T细胞存活、利于调节性T细胞的扩增、使自然杀伤细胞去活化和使髓样细胞极化为免疫遏制表型来促进免疫逃避程序(非专利文献3:Banh A2011)。半乳凝素-1的表达通过缺氧条件而被上调,以及糖基化依赖性半乳凝素-受体相互作用控制血管生成(非专利文献4:Rabinovich 2014)(非专利文献5:Xu-Yun Zhao 2010)。因此,靶向半乳凝素-聚糖相互作用可通过同时增强抗肿瘤免疫和遏制异常血管生成来干扰肿瘤进展(非专利文献6:Thijssen VL 2006)。

[0005] 由于半乳凝素和/或其结合糖缀合物在癌症发展和预后过程中的至关重要和多功能的作用,已经提出可阻断这些分子之间相互作用的不同候选抑制剂作为潜在抗癌药物(非专利文献7:Lucile Astorgues-Xerri 2014)。迄今为止,大多数已知的半乳凝素拮抗剂为拟糖物,并且为半乳糖苷的衍生物或类似物,靶向半乳凝素的典型碳水化合物结合位点(非专利文献8:Koonce NA 2017)。肽和抗体Gal-1抑制剂还被报道了其拮抗半乳凝素-受体相互作用的能力(非专利文献9:Diego O.Croci 2012,非专利文献10:van der Schaft DW 2002)。

[0006] 半乳凝素-3(Gal-3)为与含有 β -半乳糖苷的糖缀合物(糖蛋白或糖脂)结合的动物凝集素的高度保守的家族的成员(非专利文献11:M.A.Henderson NC 2006,非专利文献12:Mourad-Zeidan AA 2008)。Gal-3在其他半乳凝素家族蛋白中为独特的,在于结构由两个结构域组成:一个含有碳水化合物结合区的羧基末端结构域和一个主要由九个氨基酸的串联重复组成以交联碳水化合物和非碳水化合物配体的氨基末端结构域(图12A)(非专利文献13:Liu 1990,非专利文献1:Barondes SH 1994)。其由各种类型的细胞包括单核细胞、巨噬细胞和上皮细胞分泌,但主要由巨噬细胞分泌(非专利文献14:Reynolds 2005,非专利文献15:MacKinnon AC 2008)。分泌的细胞外Gal-3形成同二聚体或五聚体,并且其对生物功能是很重要的。已证明半乳凝素-3的N-末端结构域对蛋白低聚物的形成是很重要的(图12B)(非专利文献13:Liu1990,非专利文献16:Dumic J 2006,非专利文献17:Kuklinski S1998,非专利文献18:Lepur A 2012)。释放的蛋白可作为细胞外分子起作用以激活细胞,介导细胞-细胞以及细胞-ECM相互作用,诱导各种类型细胞的迁移,并负调控T细胞受体信号传导(非专利

文献19:Yang RY 1996)。Gal-3在各种纤维化疾病模型和患者中增加,包括肺纤维化、肝纤维化、系统性硬化和心脏纤维化(非专利文献20:M.A.Henderson NC 2008,非专利文献21:Barman等人,2019,非专利文献22:Nishi Y 2007,非专利文献23:De Boer 2010)。这表明Gal-3可为组织纤维化的重要介质和有效治疗靶点。迄今为止,研究性半乳凝素-3抑制剂的临床前和临床研究显示出针对纤维化障碍的保护(非专利文献24:Nikhil Hirani 2017,非专利文献25:Yu L 2013)。

[0007] 在过去的100-150年期间,医学上的其中一个主要成功案例为靶向各种感染性疾病的疫苗。疫苗与抗生素一起可能对人类健康比人类任何其他部位更重要。由于疫苗的成功,对使用疫苗技术治疗非感染性疾病比如过敏、自身免疫和癌症的兴趣正在增加。然而,这些疾病的靶点通常为自身抗原,这可造成功效问题。由于耐受机制,与非自身抗原,即细菌、病毒或寄生虫蛋白相比较,诱导对自身抗原的强力抗体反应相当困难(非专利文献26:Hellman 2008,非专利文献27:Falk Saupe 2015)。

[0008] 甲病毒包括一组遗传、结构和血清学相关的披膜病毒(Togaviridae)科蚊媒病毒。甲病毒包括东方马脑炎病毒(Eastern Equine Encephalitis Virus)(EEEV)、委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan Equine Encephalitis Virus)(VEEV)、沼泽地病毒(Everglades Virus)、穆坎布病毒(Mucambo Virus)、皮克孙纳病毒(Pixuna Virus)、西方马脑炎病毒(Western Equine Encephalitis Virus)(WEEV)、辛德比斯病毒(Sindbis Virus)、塞姆利基森林病毒(Semliki Forest Virus)、米德尔堡病毒(Middleburg Virus)、基孔肯雅病毒(Chikungunya Virus)(CHIKV)、奥尼昂-尼昂病毒(O'nyong-nyong)、罗斯河病毒(Ross River Virus)、巴马森林病毒(Barmah Forest Virus)、盖塔病毒(Getah Virus)、鹭山病毒(Sagiyama Virus)、贝巴鲁病毒(Bebaru Virus)、马雅罗病毒(Mayaro Virus)、乌纳病毒(Una Virus)、奥拉病毒(Aura Virus)、怀塔罗瓦病毒(Whataroa Virus)、巴班肯病毒(Babanki Virus)、孜拉加奇病毒(Kyzylagach Virus)、高地J病毒(Highlands J virus)、摩根堡病毒(Fort Morgan Virus)、恩杜姆病毒(Ndumu Virus)和博吉河病毒(Buggy Creek Virus)。含有单个病毒蛋白衣壳的结构亚基与RNA基因组结合在二十面体核衣壳中。在病毒粒子中,衣壳由覆盖着规则排列的跨膜蛋白刺突的脂质包膜包围,所述突刺的每一个由两种糖蛋白E1和E2的异二聚体复合物组成。

[0009] 病毒样颗粒(VLP)为的多蛋白结构,其模仿真实天然病毒的组织构象但缺乏病毒基因组,可能产生更安全和更便宜的候选疫苗。目前,几种预防性的基于VLP的疫苗在全球范围内商业化:GlaxoSmithKline的EngerixR(乙型肝炎病毒)和CervarixR(人类乳头瘤病毒)以及Merck and Co.,Inc.的Recombivax HBR(乙型肝炎病毒)和GardasilR(人类乳头瘤病毒)为一些实例。其他VLP基候选疫苗处于临床试验中或正在经历临床前评估,比如流感病毒、细小病毒、诺沃克(Norwalk)和各种嵌合VLP。许多其他候选疫苗仍限于小规模基础研究,尽管其在临床前测试中取得成功。在过程控制、监控化和优化的背景下讨论了大规模VLP生产的意义。鉴定并相应地讨论了主要的上下游技术挑战。成功的基于VLP的疫苗重磅产品与临床试验的最新结果以及用于治疗或预防性疫苗接种的基于嵌合VLP的技术的最新发展一起进行简要介绍。

[0010] 到目前为止,已为感染人类和其他动物的多于30种不同病毒生产了基于VLP的疫苗。实例包括AAV(腺相关病毒)、H5N3(禽流感)、BFDV(鸚鵡幼雛病病毒(Budgerigar

fledgling disease virus))、BTV(蓝舌病毒(Bluetongue virus))、埃博拉、肠道病毒71(Enterovirus 71)、GHPV(鹅出血性多瘤病毒(Goose hemorrhagic polyoma virus))、HBV(乙型肝炎病毒)、HCV(丙型肝炎病毒)、HDV(δ型肝炎病毒)、HEV(戊型肝炎病毒)、HIV、HPV(人类乳头瘤病毒)、IBDV(感染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus))、甲型流感、甲型流感H1N1、甲型流感H3N2、JC多瘤病毒、马尔堡(Margurg)、MS2、IPCV(印度花生丛簇病毒(Indian peanut clump virus))、NDV(新城疫病毒)、No(诺如病毒)Nv(诺瓦克病毒)、PhMV(酸浆斑驳病毒(Physalis mottle virus))、多瘤病毒、PPV(猪细小病毒)、RHDV(兔出血病病毒)、轮状病毒、SARS、SIV(猿猴免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus))、SV40(猿猴病毒40)、SVDV(猪水疱病病毒(Swine vesicular disease virus))等(非专利文献28:Expert Rev.Vaccines 9(10),1149-1176,2010)。

[0011] 美国专利号9,353,353(专利文献1)公开了包含一种或多种基孔肯雅病毒的病毒结构蛋白的病毒样颗粒(VLP),其可用于配制诱导对感染或其至少一种症状的免疫的用于基孔肯雅的疫苗或抗原组合物。美国专利号9,487,563(专利文献2)公开了修饰的甲病毒或黄病毒的病毒样颗粒(VLP)以及用于增强用于预防或治疗甲病毒和黄病毒介导的疾病的修饰VLP的产生的方法。美国专利号9,249,191(专利文献3)公开了基孔肯雅病毒(CHIKV)或委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)的病毒样颗粒,其中所述病毒样颗粒含有至少一种插入到E2包膜蛋白中以形成融合蛋白的抗原。美国专利号9,969,986公开了甲病毒的病毒样颗粒,其中所述病毒样颗粒包含甲病毒的病毒结构蛋白,后者包含包膜蛋白E3,其中所述包膜蛋白E被3修饰为含有至少一种插入到其弗林蛋白酶(furin)切割位点中的外来抗原。所引用的参考文献通过参考结合至本文中。

[0012] 引用列表

[0013] 专利文献

[0014] [PTL 1]美国专利号9,353,353

[0015] [PTL 2]美国专利号9,487,563

[0016] [PTL 3]美国专利号9,249,191

[0017] 非专利文献

[0018] [NPL 1]Barondes SH,Cooper DN,Gitt MA,Leffler H.1994. "Galectins.Structure and function of a large family of animal lectins."J Biol Chem 269:20807-20810.

[0019] [NPL2]Astorgues-Xerri L,Riveiro ME,Tijeras-Raballand A,Serova M,Neuzillet C,Albert S,Raymond E,Faivre S.2014."Unraveling galectin-1as a novel therapeutic target for cancer"Cancer Treat Rev.40:307-19.

[0020] [NPL 3]Banh A,Zhang J,Cao H,Bouley DM,Kwok S,Kong C等人,2011."Tumor galectin-1mediates tumor growth and metastasis through regulation of T-cell apoptosis"Cancer Res 71:4423-31.

[0021] [NPL 4]Rabinovich,Mariana SalatinoEmail authorDiego O.CrociDiego J.LaderachDaniel CompagnoLucas GentiliniTomas Dalotto-MorenoL.Sebastian Dergan-DylonSantiago P.Mendez-HuergoMarta A.ToscanoJuan P.CerlianiGabriel A.2014."Regulation of Galectins by Hypoxia and Their Relevance in

Angiogenesis:Strategies and Methods”Methods in Molecular Biology Galectins pp 293-304.

[0022] [NPL 5]Xu-Yun Zhao,Ting-Ting Chen,Li Xia,Meng Guo,Ying Xu,Fei Yue,Yi Jiang,Guo-Qiang Chen,Ke-Wen Zhao.2010.“Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1:the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells.”Carcinogenesis 31(8);1367-1375.

[0023] [NPL 6]Thijssen VL,Postel R,Brandwijk RJ,Dings RP,Nesmelova I,Satijn S,Verhofstad N,Nakabeppu Y,Baum LG,Bakkers J,Mayo KH,Poirier F,Griffioen AW.2006.“Galectin-1 is essential in tumorangiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy.”Proc Natl Acad Sci U S A.103(43):15975-80.

[0024] [NPL 7]Lucile Astorgues-Xerri,Maria E.Riveiro,Annemilai Tijeras-Raballand,Maria Serova.2014.“Unraveling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer.”Cancer Treatment Reviews 307-319.

[0025] [NPL 8]Koonce NA,Griffin RJ,Dings RPM.2017.“Galectin-1 Inhibitor OTX008 Induces Tumor Vessel Normalization and Tumor Growth Inhibition in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Models.”Int J Mol Sci.9(18);2671.

[0026] [NPL 9]Diego O.Croci,Mariana Salatino,Natalia Rubinstein,Juan P.Cerliani,Lucas E.Cavallin,Howard J.Leung,Jing Ouyang,Juan M.Illarregui,Marta A.Toscano,Carolina I.Domaica,Maria C.Croci,Margaret A.Shipp,Enrique A.Mesri,Adriana Albini,Gabriel.2012.“Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresseshypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi’s sarcoma.”J.Exp.Med 209:1985-2000.

[0027] [NPL 10]van der Schaft DW,Dings RP,de Lussanet QG,van Eijk LI,Nap AW,Beets-Tan RG,Bouma-Ter Steege JC,Wagstaff J,Mayo KH,Griffioen AW.2002.“The designer anti-angiogenic peptide anginex targets tumor endothelial cells and inhibits tumor growth in animal models.”FASEB J.16(14):1991-3.

[0028] [NPL 11]Henderson NC,Mackinnon AC,Farnworth SL,Poirier F,Russo FP,Iredale JP,Haslett C,Simpson KJ,Sethi T.2006.“Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis.”Proc Natl Acad Sci U S A 103 (13):5060-5.

[0029] [NPL 12]Mourad-Zeidan AA,Melnikova VO,Wang H,Raz A和Bar-Eli M.2008.“Expression profiling of Galectin-3-depleted melanoma cells reveals its major role in melanoma cell plasticity and vasculogenic mimicry.”Am J Pathol 173: 1839-1852.

[0030] [NPL 13]Liu,T F.1990.“Molecular biology of IgE-binding protein,IgE-binding factors,and IgE receptors.”Crit Rev Immunol.10(3):289-306.

[0031] [NPL 14]Reynolds,HY.2005.“Lung inflammation and fibrosis:an alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s.”Am J Respir Crit Care Med 171:98-102.

- [0032] [NPL 15]MacKinnon AC,Farnworth SL,Hodkinson PS,Henderson NC,Atkinson KM,Leffler H,Nilsson UJ,Haslett C,Forbes SJ和Sethi T.2008.“Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3.”J Immunol 180:2650-2658.
- [0033] [NPL 16]Dumic J,Dabelic S,Flougel M.2006.“Galectin-3:An open-ended story.”BBA-Gen Subjects 1760:616-635.
- [0034] [NPL 17]Kuklinski S,Probstmeier R.1998.“Homophilic binding properties of galectin-3:Involvement of the carbohydrate recognition domain.”J Neurochem 70:814-823.
- [0035] [NPL 18]Lepur A,Salomonsson E,Nilsson UJ,Leffler H.2012.“Ligand induced galectin-3 protein self-association.”J Biol Chem 287:21751-21756.
- [0036] [NPL 19]Yang RY,Hsu DK和Liu FT.1996.“Expression of galectin-3modulates T-cell growth and apoptosis.”Proc Natl Acad Sci USA 93:6737-6742.
- [0037] [NPL 20]Henderson NC,Mackinnon AC,Farnworth SL,Kipari T,Haslett C,Iredale JP,Liu FT,Hughes J,Sethi T.2008.“Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis.”Am J Pathol.172(2):288-98.
- [0038] [NPL 21]Barman,Scott A,Xueyi Li,Stephen Haigh,Dmitry Kondrikov,Keyvan Mahboubi,Zsuzsanna Bordan和Stepp W David.2019.“Galectin-3 is Expressed in Vascular Smooth Muscle Cells and Promotes Pulmonary Hypertension through changes in Proliferation,Apoptosis and Fibrosis.”Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.Feb 6,Epub ahead of print.
- [0039] [NPL 22]Nishi Y,Sano H,Kawashima T,Okada T,Kuroda T,Kikkawa K,Kawashima S,Tanabe M,Goto T,Matsuzawa Y,Matsumura R,Tomioka H,Liu FT,Shirai K.2007.“Galectin-3regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis.”Allergol Int.56(1):57-65.
- [0040] [NPL 23]De Boer,R.A.,Yu,L.和van Veldhuisen,D.J.2010.“Galectin-3in cardiac remodeling and heart failure.”Curr.Heart Fail.Rep.7,1-8.
- [0041] [NPL 24]Nikhil Hirani,Alison Mackinnon,Lisa Nicol,Jeremy Walker,Paul Ford,Hans Schambye,Anders Pederson,Ulf Nilsson,Hakon Leffler,Tracy Thomas,Danielle Francombe,John Simpson,Michael Gibbons,Toby M.Maher.2017.“TD139,A Novel Inhaled Galectin-3Inhibitor for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis(IPF).Results from the First in(IPF)Patients Study.”American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 195:A7560.
- [0042] [NPL 25]Yu L,Ruifrok WP,Meissner M,Bos EM,van Goor H,Sanjabi B,van der Harst P,Pitt B,Goldstein IJ,Koerts JA等人,2013.“Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis.”Circ Heart Fail 6:107-117.
- [0043] [NPL 26]Hellman,L.2008.“Therapeutic vaccines against IgE-mediated allergies.”Expert Rev Vaccines 7(2):193-208.

[0044] [NPL 27]Falk Saupe, Elisabeth J.M.Huijbers, Tobias Hein, Julia Femel, Jessica Cedervall, Anna-Karin Olsson和Lars Hellman.2015.“Vaccines targeting self-antigens:mechanisms and efficacy-determining parameters.”FASEB J 29(8): 3253-62.

发明内容

[0045] 本公开涉及靶向半乳凝素的免疫疗法。

[0046] 在第一方面,本公开提供包含病毒结构蛋白和至少一种半乳凝素抗原的病毒样颗粒。

[0047] 在第二方面,本公开提供分离的核酸分子,其包含编码本申请第一方面中提供的病毒样颗粒的核苷酸序列。

[0048] 在第三方面,本公开提供包含第二方面的核酸分子的载体,其中载体任选地包含可操作地连接于核酸分子的表达控制序列。

[0049] 在第四方面,本公开提供药用组合物或疫苗组合物,其包含(a)第一方面的病毒样颗粒、第二方面的核酸分子和/或第三方面的载体;和(b)药学上可接受的载体。

[0050] 在第五方面,本公开提供靶向半乳凝素的免疫疗法,其包括给予需要其的受试者有效量的第一方面的病毒样颗粒、第二方面的核酸分子和/或第三方面的载体。该方法可用于治疗或预防癌症、炎症性疾病和纤维化疾病。还提供了用于在受试者中调节免疫反应、用于免疫刺激受试者、用于在非人哺乳动物中产生针对半乳凝素的抗体;用于在受试者中调节免疫反应;用于在受试者中的免疫刺激;用于在受试者中抑制半乳凝素-聚糖相互作用;或用于抑制半乳凝素活性的方法。

[0051] 在第六方面,本公开提供第一方面的病毒样颗粒、第二方面的核酸分子和/或第三方面的载体用于制备用于免疫疗法、用于在受试者中调节免疫反应、用于免疫刺激受试者、用于在非人哺乳动物中产生针对半乳凝素的抗体;用于在受试者中调节免疫反应;用于在受试者中的免疫刺激;用于在受试者中抑制半乳凝素-聚糖相互作用的药用组合物或试剂盒的用途。

[0052] 在第六方面,本公开提供第一方面的病毒样颗粒、第二方面的核酸分子和/或第三方面的载体用于制备用于免疫疗法、治疗或预防癌症或炎症性疾病;用于在哺乳动物中产生针对半乳凝素的抗体;用于调节免疫反应;用于免疫刺激;用于抑制半乳凝素-聚糖相互作用;或用于抑制半乳凝素活性的第四方面的药用组合物或疫苗组合物的用途。

[0053] 附图简述

[0054] [图1]VEEV Gal-1 VLP的制备。每个泳道从左到右分别为携带Gal-1表位肽#5、#7、#12和#14的VEEV VLP。最右边为没有抗原肽的对照VLP。

[0055] [图2A]携带Gal-1表位肽#5-#10(衍生自人类)的CHIKV-VLP在幼稚BALB/c小鼠中的免疫原性

[0056] [图2B]携带Gal-1表位肽#5(衍生自人类)和#12(衍生自小鼠)的CHIKV-VLP在幼稚BALB/c小鼠中的免疫原性。

[0057] [图3A]携带Gal-1表位肽的VEEV-VLP的表达。

[0058] [图3B]Gal-1蛋白的3D结构。Gal-1表位肽#5和#12编码碳水化合物识别结构域

(CRD)附近的四个 β -片层S3、S4、S5和S6。

[0059] [图3C] Ga1-1蛋白的3D结构。Ga1-1肽#7和#14编码F4和F5 β -片层,其在嗜同种二聚化中可能是重要的。

[0060] [图3D] 用携带Ga1-1表位肽#5、#7、#12和#14的VEEV-VLP免疫的小鼠血清中的抗人类Ga1-1抗体滴度。

[0061] [图3E] 用携带Ga1-1表位肽#5、#7、#12和#14的VEEV-VLP免疫的小鼠血清中的抗小鼠Ga1-1抗体滴度。

[0062] [图3F] 衍生自人类Ga1-1和小鼠Ga1-1的Ga1-1表位肽之间的比较。它们之间不同的氨基酸加下划线。

[0063] [图4A] 用携带Ga1-1表位肽#7和#12的CHIKV-VLP免疫的小鼠血清中的抗小鼠Ga1-1抗体滴度。

[0064] [图4B] 用携带Ga1-1表位肽#7和#12的VEEV-VLP免疫的小鼠血清中针对CHIKV刺突蛋白的抗体滴度。

[0065] [图4C] 用携带Ga1-1表位肽#12和#14的CHIKV-VLP免疫的小鼠血清中抗体的免疫球蛋白亚类。

[0066] [图5A] 携带Ga1-1表位肽#7和#12的CHIKV-VLP对小鼠中Lewis肺癌的影响。(对照)

[0067] [图5B] 携带Ga1-1表位肽#7和#12的CHIKV-VLP对小鼠中Lewis肺癌的影响。(对照VLP)

[0068] [图5C] 携带Ga1-1表位肽#7和#12的CHIKV-VLP对小鼠中Lewis肺癌的影响。(Ga1-1#7VLP)

[0069] [图5D] 携带Ga1-1表位肽#7和#12的CHIKV-VLP对小鼠中Lewis肺癌的影响。(Ga1-1#12VLP)

[0070] [图5E] 每组的终点肿瘤重量。尽管肿瘤体积(图5A-D)和(图5E)在对照和VLP治疗组之间没有统计学上的显著差异,但用Ga1-1#12治疗的小鼠的肿瘤生长慢于其他组。

[0071] [图6A] 携带Ga1-1表位肽#12和#14的CHIKV-VLP对小鼠HPV+头颈部鳞状癌细胞模型的影响。用Ga1-1#14VLP疫苗治疗的小鼠中肿瘤生长慢于对照组,但在任何组之间没有统计学上的显著差异。

[0072] [图6B] 携带Ga1-1表位肽#12和#14的CHIKV-VLP对小鼠HPV+头颈部鳞状癌细胞模型终点重量的影响。

[0073] [图7] 携带Ga1-3表位肽#17、#21、#22和#23的VEEV-VLP和对照VLP的分子大小和纯度。

[0074] [图8] 携带Ga1-3表位肽#17、#21、#22和#23的VEEV-VLP在小鼠体内的免疫原性。

[0075] [图9] 流式细胞分析。分析来自用携带Ga1-3表位肽#17和#22的VLP免疫的小鼠的血清与细胞表面Ga1-3的结合。

[0076] [图10] 通过携带Ga1-3表位肽#17和#22的VLP在小鼠中诱导的抗Ga1-3抗体的中和能力。

[0077] [图11A] 携带Ga1-3表位肽#22和#23的VLP对小鼠STAM非酒精性脂肪性肝炎(NASH)模型的影响。(脂肪变性评分)

[0078] [图11B] 携带Ga1-3表位肽#22和#23的VLP对小鼠STAM非酒精性脂肪性肝炎(NASH)

模型的影响。(炎症评分)

[0079] [图11C]携带Gal-3表位肽#22和#23的VLP对小鼠STAM非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 模型的影响。(气球样评分)

[0080] [图12] (A) 半乳凝素-3蛋白结构由N末端结构域组成,该结构域具有含有丝氨酸6 (6) 磷酸化位点的12个氨基酸的N末端区域和100aa长的胶原样重复序列。碳水化合物识别结构域 (CDR) 130aa包含C-末端并含有NWGR基序; (B) 半乳凝素-3的五聚体结构。

[0081] 发明内容

[0082] 定义

[0083] “药物”意指任何小分子化合物、抗体、核酸分子或多肽或其片段。

[0084] 如本文使用的,术语“佐剂”意指当与制剂中的特定免疫原组合使用时,将增强、改变或修饰所得免疫反应的化合物。在某些实施方案中,佐剂与VLP组合使用。在其他实施方案中,佐剂与DNA疫苗组合使用。免疫反应的修饰包括增强或拓宽抗体和细胞免疫反应任一或两者的特异性。免疫反应的修饰也可意指减少或遏制某些抗原特异性免疫反应。

[0085] 如本文使用的,“改善”意指降低、抑制、减弱、减少、阻止或稳定疾病或其症状的发展或进展。

[0086] 如本文使用的,“改变”意指参照多肽序列或多核苷酸序列的指定位置处的氨基酸或核苷酸的改变。如本文使用的,改变包括在多肽或多核苷酸的指定位置处的氨基酸或核苷酸的取代、缺失或插入。在一些实施方案中,甲病毒衣壳蛋白核定位信号的改变包括用不带电荷氨基酸(例如丙氨酸或天冬酰胺,或除碱性带电荷氨基酸比如赖氨酸或精氨酸之外的任何氨基酸)取代带电荷氨基酸(例如赖氨酸或精氨酸)。

[0087] 如本文使用的,“类似物”意指不相同但具有类似的功能或结构特征的分子。例如,多肽类似物保留相应的天然存在多肽的生物活性,同时具有使类似物的功能相对于天然存在的多肽增强的某些生物化学修饰。此类生物化学修饰可增加类似物的蛋白酶抗性、膜渗透性或半衰期,而不改变例如配体结合。类似物可包括非天然氨基酸。

[0088] 如本文使用的,“包含 (comprises)”、“包含 (comprising)”、“含有”和“具有”等可具有在美国专利法中赋予它们的含义,并且可意指“包括 (includes)”、“包括 (including)”等;“基本上由...组成 (consisting essentially of)”或“基本上由...组成 (consists essentially)”同样具有在美国专利法中赋予的含义,并且该术语为开放式的,允许存在超过所列举的内容,只要所列举的内容的基本或新颖特征不被存在超过所列举的内容改变,但排除现有技术实施方案。

[0089] 如本文使用的,“检测”意指鉴定待检测分析物的存在、不存在或量。

[0090] 如本文使用的,“疾病”意指损害或干扰细胞、组织或器官正常功能的任何病症或障碍。

[0091] 如本文使用的,“有效量”意指相对于未经治疗的患者改善疾病症状所需的药剂的量。用于实践本发明以预防或治疗疾病的活性化合物的有效量取决于给予方式,受试者的年龄、体重和一般健康。最终,主治医师或兽医将决定适当的量和剂量方案。此类量被称为“有效”量。

[0092] 如本文使用的,“片段”意指多肽或核酸分子的一部分。该部分优选地含有参考核酸分子或多肽的整个长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。片

段可含有10、20、30、40、50、60、70、80、90或100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000个核苷酸或氨基酸。

[0093] 如本文使用的,“分离的多核苷酸”意指不含在本公开的核酸分子所衍生自的生物体的天然存在的基因组中侧接该基因的基因的核酸分子(例如DNA)。因此,该术语包括例如这样的重组DNA,其结合到载体中;结合到自主复制的质粒或病毒中;或结合到原核生物或真核生物的基因组DNA中;或者作为独立于其他序列的单独分子(例如通过PCR或限制性核酸内切酶消化而产生的cDNA或者基因组或cDNA片段)存在。另外,该术语包括从DNA分子转录的RNA分子,以及作为编码另外的多肽序列的杂合基因的一部分的重组DNA。

[0094] 如本文使用的,“分离的多肽”意指已从天然伴随其的成分中分离的本公开的多肽。典型地,当多肽为按重量计至少60%不含与其天然缔合的蛋白和天然存在的有机分子时,多肽为分离的。优选地,制剂按重量计至少75%,更优选地至少90%,和最优选地至少99%为本公开的多肽。本公开的分离的多肽可例如通过从天然来源提取、通过表达编码此类多肽的重组核酸;或通过化学合成蛋白来获得。纯度可通过任何适当的方法例如柱色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法或通过HPLC分析进行测量。

[0095] 如本文使用的,“标志物”意指具有与疾病或障碍相关的在表达水平或活性方面的改变的任何蛋白或多核苷酸。

[0096] 如本文使用的,如在“获得药剂”中,“获得”包括合成、购买或以其他方式获取药物。

[0097] 如本文使用的,“减少”意指至少10%、25%、50%、75%或100%的负改变。

[0098] 如本文使用的,“参考”意指标准或对照条件。

[0099] 如本文使用的,“参考序列”为用作序列比较基础的明确序列。参考序列可为指定序列的子集或全部;例如全长cDNA或基因序列的区段,或完整的cDNA或基因序列。对于多肽,参考多肽序列的长度通常将为至少约16个氨基酸,优选地至少约20个氨基酸,更优选地至少约25个氨基酸,和甚至更优选地约35个氨基酸、约50个氨基酸或约100个氨基酸。对于核酸,参考核酸序列的长度通常将为至少约50个核苷酸,优选地至少约60个核苷酸,更优选地至少约75个核苷酸,和甚至更优选地约100个核苷酸或约300个核苷酸或者其附近或其之间的任何整数。

[0100] 如本文使用的,“特异性地结合”意指识别和结合多肽或蛋白,但基本上不识别和结合样品中其他分子的化合物或抗体,所述样品例如生物样品,其天然地包括该多肽或蛋白。

[0101] 如本文使用的,“受试者”意指哺乳动物,包括但不限于人类或非人哺乳动物,比如牛、马、犬、羊或猫。

[0102] 本文提供的范围应被理解为该范围内所有值的简写。例如,1-50的范围应被理解为包括来自以下的任何数字、数字的组合或子范围:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49或50。

[0103] 如本文使用的,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等是指减轻或改善与其相关的障碍和/或症状。将会意识到,尽管没有排除,但是治疗障碍或症状并不需要完全消除与其相关的障碍、病症或症状。

[0104] 除非特别说明或从上下文中显而易见,否则如本文使用的,术语“或”被理解为具有包含性。

[0105] 除非特别说明或从上下文中显而易见,否则如本文使用的,术语“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”被理解为单数或复数的。

[0106] 除非特别说明或从上下文中显而易见,否则如本文使用的,术语“约”被理解为处于本领域正常容许的范围,例如处于平均值的2个标准偏差以内。约可被理解为处于所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%之内。除非从上下文中另外明确表示,否则本文提供的所有数值均由术语约修饰。

具体实施方式

[0107] 在该公开中,提供包含病毒结构蛋白和半乳凝素抗原的病毒样颗粒。

[0108] 如本文使用的,术语“半乳凝素抗原”是指衍生自任何半乳凝素蛋白的任何抗原结构,其可被免疫系统识别和/或刺激细胞介导的免疫反应和/或刺激对抗原有特异性的抗体产生。半乳凝素表位肽可为天然存在的半乳凝素蛋白的片段,或具有一些修饰的天然存在的半乳凝素蛋白的片段。天然存在的半乳凝素蛋白可为半乳凝素-1(Gal-1)或半乳凝素-3(Gal-3)。半乳凝素蛋白可优选地为人类半乳凝素蛋白,并且尤其是人类半乳凝素-1或人类半乳凝素-3蛋白。在一个实施方案中,修饰的片段与天然存在的半乳凝素蛋白的片段具有至少80%、85%、90%、95%或98%的氨基酸序列同一性。在一个实施方案中,修饰的肽片段为其中基于天然存在的半乳凝素蛋白的片段缺失、取代和/或添加至多10%氨基酸的突变体。

[0109] 天然存在的人类半乳凝素-1和人类半乳凝素-3的氨基酸序列如下:半乳凝素-1[智人]

[0110] MACGLVASNLNLKPGECLRVGEVAPDAKSFVLNLGKDSNNLCL
HFNPRFNAHGDANTIVCNSKDGGAWGTEQREAVFPFQPGSVAEV
CITFDQANLTVKLDPGYEFKFPNRLNLEAINYMAADGDFKIKCVA
FD (SEQ ID NO: 7)

[0111] 半乳凝素-3[智人](GenBank登录号:AAB86584.1)

[0112] MADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPGAWGNQPAGAGGYPGAS
YPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYPGAPAGVYPGPPSG
PGAYPSSGQPSATGAYPATGPYGAPAGPLIVPYNLPLPGGVVPRML
ITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENNRRVIVCNTKL
DNNWGREERQSVFPFESGKPFKIQLVEPDHFKVAVNDAHLLQYN
HRVKKLNEISKLGISGDIDLTSASYTMI (SEQ ID NO: 8)

[0113] 半乳凝素抗原,即半乳凝素表位肽的实例可包括以下:

[0114] Gal-1表位肽

[0115] #5: SFVLNLGKDSNNLSLHFNPRFNAHGDANTIVSNKDGGA
WGTEQREAVFPFQPGS (SEQ ID NO: 9)

- [0116] #7: ANLTVKLPDGYEFKFPNRLNLEA (SEQ ID NO: 10)
- [0117] #12: SFVLNLGKDSNNLSLHFNP~~RF~~NAHGDANTIVSNTKEDGT
WGTEHREPAFPFQPGS(SEQ ID NO: 11)
- [0118] #14: ADLTIKLPDGHEFKFPNRLNMEA (SEQ ID NO: 12)
- [0119] Gal-3表位肽
- [0120] #17: ADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPGAWGNQPA (SEQ ID NO: 13)
- [0121] #21: YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGA (SEQ ID NO: 14)
- [0122] #22: YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAYPGAPGAYPGA
PAPGVYPGPPSGPGAYPSSGQPSATGAYPATGPYGA (SEQ ID NO:
15)
- [0123] #23: ADSFSLNDALAGSGNPNPQGYPGAWGNQPA (SEQ ID NO:16)
- [0124] Gal-1表位肽#5为衍生自人类Gal-1的片段和#12为衍生自小鼠Gal-1的相应片段,其中野生型序列中的半胱氨酸用丝氨酸替代(加下划线)。Gal-1表位肽#7为野生型人类Gal-1的片段,和#14为小鼠野生型Gal-1的相应片段。
- [0125] Gal-3表位肽由人类N-末端Gal-3表位肽组成。由人类Gal-3 N-末端重复序列表位肽组成的Gal-3表位肽#21和22,和#22具有比#21更长的重复序列。#23编码小鼠Gal-3 N-末端肽。
- [0126] 在该公开中,甲病毒意指属于病毒的披膜病毒科的含有RNA的病毒。示例性的披膜病毒科病毒包括但不限于东方马脑炎病毒(EEEV)、委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)、沼泽地病毒、穆坎布病毒、皮克孙纳病毒、西方马脑炎病毒(WEEV)、辛德比斯病毒、塞姆利基森林病毒、米德尔堡病毒、基孔肯雅病毒(CHIKV)、奥尼昂-尼昂病毒、罗斯河病毒、巴马森林病毒、盖塔病毒、鹭山病毒、贝巴鲁病毒、马雅罗病毒、乌纳病毒、奥拉病毒、怀塔罗瓦病毒、巴班肯病毒、孜拉加奇病毒、高地J病毒、摩根堡病毒、恩杜姆病毒、博吉河病毒和奥克尔布病毒。
- [0127] 在如由本申请提供的病毒样颗粒中,病毒结构蛋白和抗原可通过存在于病毒结构蛋白中的至少一个第一附着位点和存在于抗原中的至少一个第二附着位点连接。
- [0128] 如本文使用的,“第一附着位点”和“第二附着位点”的每一个是指其中多于一种物质彼此连接的位点。
- [0129] 病毒结构蛋白和抗原可直接或间接地融合。在一个实施方案中,一个或两个接头可插入在抗原的N-末端残基和病毒结构蛋白之间和/或在抗原的C-末端残基和病毒结构蛋白之间。
- [0130] 抗原或病毒结构蛋白可截短和被短接头替代。在一些实施方案中,抗原或病毒结构蛋白包括一个或多个肽接头。一般地,接头由2-25个氨基酸(例如2、3、4、5或6个氨基酸)组成。通常,其长度为2-15个氨基酸,尽管在某些情况下,其可仅为一个,比如单个甘氨酸残基。
- [0131] 在一个实施方案中,其中编码病毒结构蛋白的多核苷酸与编码抗原的多核苷酸基因融合的核酸分子在宿主细胞(例如哺乳动物细胞(例如293F细胞))中表达,使得第一附着

位点和第二附着位点通过肽键连接。在这种情况下,病毒结构蛋白和抗原通过肽键连接。关于该实施方案,第一附着位点和/或第二附着位点可自初始蛋白或抗原进行遗传修饰。例如,自病毒结构蛋白修饰第一附着位点,使得多肽通过包括SG、GS、SGG、GGS和SGSG在内的接头肽与抗原缀合。当病毒结构蛋白与抗原化学缀合时,第一附着位点和第二附着位点可通过化学交联接头连接,所述接头为一种化合物)。交联接头的实例包括但不限于SMPH、磺基-MBS、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-SIAB、磺基-SMPB、磺基-SMCC、SVSB、SIA和可从Pierce Chemical Company获得的其他交联接头。

[0132] 甲病毒的优选实例包括基孔肯雅病毒和委内瑞拉马脑炎病毒。基孔肯雅病毒的实例可包括基孔肯雅病毒37997株和OPY-1株。委内瑞拉马脑炎病毒的实例可包括委内瑞拉马脑炎病毒TC-83株。

[0133] 病毒结构蛋白可包括衣壳蛋白和/或包膜蛋白、其片段或其复合物。因此,用于本申请的病毒结构蛋白可包括衣壳蛋白和/或包膜蛋白和/或其片段或衍生物。在一个实施方案中,由本公开提供的病毒样颗粒包括衣壳、E3、E2和E1蛋白以及半乳凝素抗原。

[0134] 优选地,抗原可作为通过基因工程方式产生的融合蛋白与基孔肯雅病毒的病毒结构蛋白或委内瑞拉马脑炎病毒的结构蛋白连接。

[0135] 在生理条件下,于弗林蛋白酶切割之后,E3可与E2解离。在一个实施方案中,位于E3中的弗林蛋白酶切割位点可突变以防止弗林蛋白酶位点切割。例如,可将抗原插入到弗林蛋白酶切割位点中以在弗林蛋白酶剪切位点中引入突变。在该实施方案中,提供的病毒样颗粒可由衣壳、E3、E2和E1蛋白组成或包含它们,其中E3与E2结合以形成单个蛋白并且抗原插入到E3区域中。例如,由本申请提供的病毒样颗粒可通过组装240个衣壳、240个E1蛋白、240个在其每一个中E2与E3结合并且抗原插入到每个E3区域中的蛋白而形成。

[0136] 用于本申请的基孔肯雅病毒的病毒结构蛋白或委内瑞拉马脑炎病毒的病毒结构蛋白可为天然存在的病毒结构蛋白或其修饰的蛋白。修饰的蛋白可为天然存在的病毒结构蛋白的片段。在一个实施方案中,修饰的蛋白与天然存在的病毒衣壳和/或包膜蛋白具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%的氨基酸序列同一性。在一个实施方案中,修饰的蛋白为其中基于天然存在的病毒衣壳和/或包膜蛋白缺失、取代和/或添加至多10%的氨基酸的突变体。例如,可将K64A或K64N突变引入到用于本发明的委内瑞拉马脑炎病毒的病毒结构蛋白的衣壳中。

[0137] 示例性基孔肯雅病毒的病毒结构蛋白序列以Genbank登录号ABX40006.1 (SEQ ID NO:1) 提供。另一个示例性基孔肯雅病毒的病毒结构蛋白序列以Genbank登录号ABX40011.1 (SEQ ID NO:2) 提供。

[0138] 示例性委内瑞拉马脑炎病毒的病毒结构蛋白如SEQ ID NO:3所示。

[0139] 在一个实施方案中,第一附着位点可包含氨基,并且优选地为赖氨酸残基的氨基。第二附着位点可包含巯基,并且优选地为半胱氨酸的巯基。

[0140] 在一个实施方案中,可提供基孔肯雅病毒样颗粒或委内瑞拉马脑炎病毒样颗粒,其包含基孔肯亚或委内瑞拉马脑炎病毒的病毒结构蛋白和至少一种半乳凝素抗原,其中至少一种半乳凝素抗原插入病毒结构蛋白的E3中,并且基孔肯雅病毒的病毒结构蛋白或委内瑞拉马脑炎病毒的病毒结构蛋白和半乳凝素抗原表达为融合蛋白。半乳凝素抗原可直接或间接地插入病毒结构蛋白的E3中。

[0141] 关于基孔肯雅病毒的病毒结构蛋白,至少一种半乳凝素抗原可代替E3中的弗林蛋白酶切割位点(RKRR)插入SEQ ID NO:1或2的322R至325R或者对应于SEQ ID NO:1或2的322R至325R的弗林蛋白酶位点(RKRR)的位点中。例如,关于基孔肯雅病毒的病毒结构蛋白,至少一种半乳凝素抗原插入SEQ ID NO:1或2的321位残基H和326位S之间;SEQ ID NO:1或2的320位P和326位S之间;或SEQ ID NO:1或2的319位S和326位S之间,或相应的位点。VLP_CHI 0.56载体可被用于制备基孔肯雅病毒样颗粒,其中在SEQ ID No.1或2的残基321和326之间插入半乳凝素抗原。当在SEQ ID No.1或2的残基321和326之间插入半乳凝素抗原时,由本申请提供的病毒样颗粒可为基孔肯雅病毒样颗粒,其包含E2和E3的复合物、衣壳和E1,并且其中至少一种半乳凝素抗原插入在E3区域中。

[0142] 委内瑞拉马脑炎病毒的病毒结构蛋白,至少一种半乳凝素抗原可代替E3中的弗林蛋白酶切割位点(RKRR)插入SEQ ID NO:3的331R至334R,或对应于SEQ ID NO:3的331R-334R的弗林蛋白酶切割位点的位点中。例如,关于委内瑞拉马脑炎病毒的病毒结构蛋白,至少一种半乳凝素抗原插入SEQ ID NO:3的330位G和335位S之间;SEQ ID NO:3的329位P和335位S之间;或SEQ ID NO:3的328位C和335位S之间,或相应的位点。VLP_VEEV 0.66载体可被用于制备委内瑞拉马脑炎病毒样颗粒,其中抗原插入SEQ ID NO:3的残基330和335之间。当抗原插入SEQ ID NO:3的残基330和335之间时,由本申请提供的病毒样颗粒可为委内瑞拉马脑炎病毒样颗粒,其包含E2和E3的复合物、衣壳和E1,并且其中至少一种半乳凝素抗原插入到E3区域中。

[0143] 如本文中关于两种蛋白或氨基酸序列的氨基酸位置使用的,术语“对应于”被用于表明当两种蛋白经受标准序列比对(例如使用BLASTp程序)时,第一序列中指定氨基酸位置处的氨基酸残基对应于第二蛋白中的氨基酸位置或与其对齐。因此,如果位置“A”和“B”处的残基在序列比对中彼此对应,则第一蛋白中的氨基酸位置“A”将对应于第二序列中的氨基酸位置“B”。

[0144] 基孔肯雅病毒以及委内瑞拉马脑炎的病毒结构蛋白包含衣壳、E1、E2、6K和E3。6K在组装过程期间被自然切割并从VLP中去除。在本说明书和权利要求书中,“病毒结构蛋白”不仅指具有6K的那些,而且指去除6K之后的那些。

[0145] 在工作实例中使用的CHIKV和VEEV的6K序列如下:

[0146] CHIKV OPY-1株,6K:SEQ ID NO:1的749-809aa

[0147] atyqeaaiylwneqqplfwlqalipaalivlcnclrlppcccktlaflavmsvgahtvsa (SEQ ID NO:4)

[0148] CHIKV 37997株,6K:SEQ ID NO:2的749-809aa

[0149] atyyeaaaylwneqqplfwlqalipaalivlcnclklppcccktlaflavmsigahtvsa (SEQ ID NO:5)

[0150] VEEV TC-83株,6K:SEQ ID NO:3的758-813aa

[0151] ettwesldhlwnnnqmqfwiqlliplaalivvtrllrcvccvvpflvmagaagaga (SEQ ID NO:6)

[0152] 本文提供的核酸分子包括编码本公开的多肽或其片段的任何核酸分子。此类核酸分子不需要与内源性核酸序列100%相同,但典型地将表现出基本同一性。与内源性序列具有“基本同一性”的多核苷酸典型地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。可用于本公开的方法的核酸分子包括编码本公开的多肽或其片段的任何核酸分子。此类核酸分子不需要

与内源性核酸序列100%相同,但典型地将表现出基本同一性。与内源性序列具有“基本同一性”的多核苷酸典型地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”意指在各种严格条件下,在互补多核苷酸序列(例如本文所述的基因)或其部分之间配对以形成双链分子。(参见例如Wahl,G.M.和S.L.Berger(1987)Methods Enzymol.152:399;Kimmel,A.R.(1987)Methods Enzymol.152:507)。

[0153] 例如,严格的盐浓度一般将为小于约750mM NaCl和75mM柠檬酸三钠,优选地为小于约500mM NaCl和50mM柠檬酸三钠,并且更优选地为小于约250mM NaCl和25mM柠檬酸三钠。低严格性杂交可在不存在有机溶剂(例如甲酰胺)的情况下获得,而高严格性杂交可在存在至少约35%的甲酰胺,并且更优选地至少约50%甲酰胺的情况下获得。严格的温度条件一般将包括至少约30℃,更优选地至少约37℃,和最优选地至少约42℃的温度。不同的另外参数,比如杂交时间、去污剂(例如十二烷基硫酸钠(SDS))的浓度以及载体DNA的包含或排除,为本领域技术人员众所周知的。通过根据需要组合这些不同条件来实现不同的严格水平。在优选实施方案中,杂交将在30℃下于750mM NaCl、75mM柠檬酸三钠和1% SDS中发生。在更优选的实施方案中,杂交将在37℃下于500mM NaCl、50mM柠檬酸三钠、1% SDS、35%甲酰胺和100μg/ml变性鲑鱼精子DNA(ssDNA)中发生。在最优选的实施方案中,杂交将在42℃下于250mM NaCl、25mM柠檬酸三钠、1% SDS、50%甲酰胺和200μg/ml ssDNA中发生。这些条件的有用变化对于本领域技术人员将为易于显而易见的。

[0154] 对于大多数应用,杂交后洗涤步骤的严格性也会不同。洗涤严格条件可通过盐浓度和通过温度来定义。如上,可通过降低盐浓度或通过提高温度来提高洗涤严格性。例如,用于洗涤步骤的严格盐浓度优选地为小于约30mM NaCl和3mM柠檬酸三钠,和最优选地为小于约15mM NaCl和1.5mM柠檬酸三钠。用于洗涤步骤的严格温度条件一般将包括至少约25℃,更优选地至少约42℃,和甚至更优选地至少约68℃的温度。在优选的实施方案中,洗涤步骤将在25℃下于30mM NaCl、3mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中发生。在更优选的实施方案中,洗涤步骤将在42℃下于15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中发生。在更优选的实施方案中,洗涤步骤将在68℃下于15mM NaCl、1.5mM柠檬酸三钠和0.1% SDS中发生。

[0155] 这些条件的另外变化对于本领域技术人员将为易于显而易见的。杂交技术对于本领域技术人员为众所周知的,并且描述于例如Benton和Davis(Science 196:180,1977);Grunstein和Hogness(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 72:3961,1975);Ausubeld等人(Current Protocols in Molecular Biology,Wiley Interscience,New York,2001);Berger和Kimmel(Guide to Molecular Cloning Techniques,1987,Academic Press,New York);和Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York。“基本上相同”意指表现出与参考氨基酸序列(例如本文所述的任何一种氨基酸序列)或核酸序列(例如本文所述的任何一种核酸序列)具有至少50%同一性的多肽或核酸分子。优选地,此类序列在氨基酸水平或核酸上与被用于比较的序列具有至少60%,更优选地80%或85%,和更优选地90%、95%或者甚至99%同一性。

[0156] 序列同一性一般使用序列分析软件(例如威斯康辛大学生物技术中心(University of Wisconsin Biotechnology Center),1710University Avenue,Madison,Wis.53705的遗传学计算机组的序列分析软件包、BLAST、BESTFIT、GAP或PILEUP/PRETTYBOX程序)来测量。此类软件通过对各种取代、缺失和/或其他修饰指定同源性程度来匹配相同

或相似的序列。保守性取代一般包括以下组内的取代：甘氨酸、丙氨酸；缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺；丝氨酸、苏氨酸；赖氨酸、精氨酸；以及苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中，可使用BLAST程序，其中概率评分在 $e<10^{-3}$ 和 $e<100$ 之间表明密切相关的序列。

[0157] 在本文变量的任何定义中对化学基团列表的叙述包括作为任何单个基团或列举基团的组合的该变量定义。本文中对于变量或方面实施方案的叙述包括作为任何单个实施方案或者与任何其他实施方案或其部分组合的该实施方案。

[0158] 本文提供的任何组合物或方法可与本文提供的任何其他组合物和方法中的一种或多种组合。

[0159] 在该公开的一些实施方案中，蛋白可包含突变，其含有产生沉默的取代、添加或缺失但不改变编码蛋白的特性或活性或者蛋白的制备方式的改变。可出于多种原因，例如为特定宿主优化密码子表达，而产生核苷酸变体，参见美国专利公开2005/0118191，其出于所有目的通过参考以其全部结合至本文中。

[0160] 另外，可对核苷酸测序以确保克隆正确的编码区且不含任何不需要的突变。核苷酸可被亚克隆到表达载体（例如杆状病毒）中用于在任何细胞中表达。本领域的技术人员理解各种亚克隆方法为可获得的并且为可能的。

[0161] 分离的核酸可为基本上纯化的，但不是必须的。例如，在克隆或表达载体内分离的核酸不是纯的，在于其可能仅占其所在细胞中材料的微小百分比。当在本文中使用该术语时，此类核酸是分离的，因为其可由本领域普通技术人员已知的标准技术容易地进行操纵。

[0162] 多肽表达

[0163] 通常，可通过用在合适的表达媒介物中的编码多肽的核酸分子或其片段的全部或部分转化合适的宿主细胞来产生包含甲病毒的病毒结构蛋白和至少一种半乳凝素（gelactin）抗原的VLP。

[0164] 分子生物学领域的技术人员将理解，可使用多种多样表达系统中的任何一种来提供重组蛋白。使用的精确宿主细胞对本公开并不极其重要。本公开的多肽可在原核宿主（例如大肠杆菌）或在真核宿主（例如酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*），昆虫细胞例如Sf21细胞，或哺乳动物细胞例如NIH 3T3、HeLa、COS细胞）中产生。此类细胞可从广泛范围的来源获得（例如美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection），Rockland, Md.；也参见例如Ausubel等人，同上）。昆虫细胞的非限制性实例为草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*, Sf）细胞例如Sf9、Sf21，粉纹夜蛾（*Trichoplusia ni*）细胞例如High Five细胞和果蝇S2细胞。真菌（包括酵母）宿主细胞的实例为酿酒酵母，乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*, K.lactis），假丝酵母属（*Candida*）物种包括白色假丝酵母（*C.albicans*）和光滑假丝酵母（*C.glabrata*），构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*），粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*, S.pombe），巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）和解脂亚罗酵母（*Yarrowia lipolytica*）。哺乳动物细胞的实例为COS细胞、幼仓鼠肾细胞、小鼠L细胞、LNCaP细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、人类胚胎肾（HEK）细胞、非洲绿猴细胞、CV1细胞、HeLa细胞、MDCK细胞、Vero和Hep-2细胞。也可以使用非洲爪蟾（*Xenopus laevis*）卵母细胞或两栖动物来源的其他细胞。原核宿主细胞包括细菌细胞，例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌（*B.subtilis*）和分枝杆菌。

[0165] 克隆所述蛋白的方法为本领域已知的。例如,可通过RT-PCR从自己感染所述病毒的细胞中提取的多聚腺苷酸化mRNA中分离编码特定甲病毒的病毒结构蛋白例如CHIKV或VEEV病毒结构蛋白的基因。所得产物基因可作为DNA插入物被克隆到载体中。术语“载体”是指核酸可通过其而在生物体、细胞或细胞成分之间传播和/或转移的方式。载体包括质粒、病毒、细菌噬菌体、原病毒、噬菌粒、转座子、人工染色体等,它们自主复制或者可整合到宿主细胞的染色体中。载体也可作为裸RNA多核苷酸、裸DNA多核苷酸、在同一链内由DNA和RNA两者组成的多核苷酸、聚赖氨酸缀合的DNA或RNA、肽缀合的DNA或RNA、脂质体缀合的DNA等,其不能自主复制。在许多但非全部的常见实施方案中,本发明的载体为质粒或杆粒。

[0166] 该公开进一步提供编码蛋白包括嵌合分子的核苷酸,其克隆到可在提供VLP形成的细胞中表达的表达载体中。“表达载体”为能够促进表达以及复制掺入其中的核酸的载体,比如质粒。

[0167] 一般地,待表达的核酸分子“可操作地连接”于启动子和/或增强子,并且进行通过启动子和/或增强子的转录调节控制。

[0168] 存在用于产生该公开多肽的多种表达系统。可用于产生此类多肽的表达载体非限制性地包括染色体、附加体和病毒衍生的载体,例如衍生自细菌质粒,细菌噬菌体,转座子,酵母附加体,插入元件,酵母染色体元件,病毒比如杆状病毒、乳多泡病毒比如SV40、痘苗病毒、腺病毒、鸡痘病毒(fowl pox virus)、假狂犬病病毒和逆转录病毒的载体以及衍生自其组合的载体。

[0169] 本文提供的构建体和/或载体包含编码结构蛋白的甲病毒多核苷酸,所述结构蛋白包括如本文所述的包膜蛋白或衣壳蛋白或其部分。载体可为例如噬菌体、质粒、病毒或逆转录病毒载体。包含核苷酸的构建体和/或载体应当操作性连接于适当的启动子,比如CMV启动子、噬菌体 λ PL启动子、大肠杆菌lac、phoA和tac启动子、SV40早期和晚期启动子,并且逆转录病毒LTR的启动子为非限制性实例。取决于所期望的宿主细胞和/或表达速率,其他合适的启动子对于技术人员将为已知的。表达构建体将进一步含有转录起始、终止的位点,并在转录区含有用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的转录本的编码部分将优选包括待翻译多肽开头处的翻译起始密码子和适当位于待翻译多肽末端的终止密码子。

[0170] 表达载体将优选地包括至少一种选择标记。此类标记包括用于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶、G418或新霉素抗性以及用于在大肠杆菌和其他细菌中培养的四环素、卡那霉素或氨苄青霉素抗性基因。在载体中优选的是病毒载体,比如杆状病毒、痘病毒(例如痘苗病毒、禽痘病毒(avipox virus)、金丝雀痘病毒、鸡痘病毒、浣熊痘病毒、猪痘病毒等)、腺病毒(例如犬腺病毒)、疱疹病毒和逆转录病毒。可与本公开一起使用的其他载体包含用于细菌的载体,其包含pQE70、pQE60和pQE-9、pBluescript载体、Phagescript载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5。优选的真核载体为pFastBac1 pWINE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG、pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL。其他合适的载体对于熟练技术人员将为易于显而易见的。

[0171] 重组构建体可被制备并用于转染、感染或转化,且可将病毒蛋白(包括本文描述的那些)表达至真核细胞和/或原核细胞中。因此,该公开提供包含一种载体(或多种载体)的宿主细胞,所述载体含有编码以上描述的甲病毒的病毒结构基因包括衣壳、E3、E2、6K和E1或其部分和/或任何嵌合分子的核酸,并且允许在允许形成VLP的条件下于所述宿主细胞中

表达以上描述的甲病毒的病毒结构基因包括衣壳E3、E2、6K和E1或其部分,和/或任何嵌合分子。

[0172] 在一个实施方案中,所述载体为重组杆状病毒。在另一个实施方案中,将所述重组杆状病毒被转染到昆虫细胞中。在优选实施方案中,所述细胞为昆虫细胞。在另一个实施方案中,所述昆虫细胞为Sf9细胞。

[0173] 在另一个实施方案中,所述载体和/或宿主细胞包含编码如所描述的甲病毒基因的核苷酸包括衣壳、E3、E2、6K和E1或其部分。

[0174] 在另一个实施方案中,所述载体和/或宿主细胞基本上由如本文所述的甲病毒衣壳、E3、E2、6K和E1或其部分组成。在进一步的实施方案中,所述载体和/或宿主细胞由包含衣壳、E3、E2、6K和E1或其部分的甲病毒蛋白组成,如本文所述。这些载体和/或宿主细胞含有甲病毒核心、E3、E2、6K和E1或其部分,如本文所述,并且可含有另外的细胞成分,比如细胞VL蛋白 (celluVLProtein)、杆状病毒蛋白、脂质、碳水化合物等。

[0175] 用于多肽生产的特定细菌表达系统为大肠杆菌pET表达系统 (Novagen, Inc., Madison, Wis)。根据该表达系统,将编码多肽的DNA以被设计为允许表达的取向插入到pET载体中。由于编码这种多肽的基因处于T7调节信号的控制下,因此多肽的表达通过在宿主细胞中诱导T7 RNA聚合酶的表达来实现。这一般使用响应于IPTG诱导而表达T7 RNA聚合酶的宿主菌株来实现。一旦产生,然后便根据本领域已知的标准方法分离重组多肽,所述方法例如本文描述的那些。

[0176] 另一种用于多肽生产的细菌表达系统为pGEX表达系统 (Pharmacia)。该系统采用GST基因融合系统,其被设计用于高水平表达作为融合蛋白的基因或基因片段以及快速纯化和回收功能性基因产物。将感兴趣的蛋白与来自日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*) 的谷胱甘肽S-转移酶蛋白的羧基末端融合,并通过使用Glutathione Sepharose 4B的亲色谱法容易地从细菌裂解物中纯化。融合蛋白可在温和条件下通过用谷胱甘肽洗脱来回收。谷胱甘肽S-转移酶结构域从融合蛋白中的切割通过在该结构域上游存在用于位点特异性蛋白酶的识别位点来促进。例如,pGEX-2T质粒中表达的蛋白可用凝血酶切割;在pGEX-3X中表达的那些可用因子Xa切割。

[0177] 药用组合物和给予

[0178] 本公开的特征为包含如本文所述的VLP的药用组合物。本文中有用的药用组合物含有药学上可接受的载体以及该公开的VLP,所述药学上可接受的载体包括任何合适的稀释剂或赋形剂,其包括本身不会诱导产生对接受组合物的脊椎动物有害的免疫反应的任何药用物质,并且其可在没有过度毒性的情况下给予。如本文使用的,术语“药学上可接受”意指由联邦或州政府监管机构批准,或在药典、欧洲药典或其他普遍公认的药典中列出,用于哺乳动物,并且更特别地用于人类。这些组合物可用于在脊椎动物中诱导保护性免疫反应的疫苗和/或抗原组合物。

[0179] 药学上可接受的载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、无菌等渗水性缓冲液及其组合。Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub.Co.N.J.当前版本) 中呈现了对药学上可接受的载体、稀释剂和其他赋形剂的彻底讨论。制剂应适于给予模式。在优选实施方案中,制剂适合于给予人类,优选地为无菌、非颗粒和/或无热原的。

[0180] 如果需要,组合物还可含有少量的润湿或乳化剂,或pH缓冲剂。组合物可为固体形

式,比如适合于重构的冻干粉剂、液体溶液剂、悬浮剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放制剂或粉剂。口服制剂可包括标准载体,比如药用级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0181] 在某些实施方案中,VLP组合物以液体形式,例如在指示VLP组合物的数量和浓度的密封容器中提供。

[0182] 优选地,VLP组合物的液体形式在气密密封容器中以至少约50 μ g/ml,更优选至少约100 μ g/ml、至少约200 μ g/ml、至少500 μ g/ml或至少1mg/ml提供。

[0183] 或者,疫苗制剂通过滴剂、大颗粒气溶胶(大于约10微米)或者喷入到上呼吸道或小颗粒气溶胶(小于10微米)或喷入到下呼吸道而鼻内给予。尽管任何以上递送途径均会产生免疫反应,但鼻内给予赋予在许多病毒(包括甲病毒,例如CHIKV或VEEV)进入位点处引发粘膜免疫的另外益处。

[0184] 因此,该公开还包括配制诱导哺乳动物对感染或其至少一种症状的免疫的疫苗或抗原组合物的方法,包括向所述制剂中添加有效剂量的VLP,例如甲病毒(例如CHIKV或VEEV)。

[0185] 在某些情况下,优选的是用单个剂量刺激免疫,然而也可通过相同或不同途径给予另外的剂量,以达到期望的效果。例如,在新生儿和婴儿中,可能需要多次给予来引发足够的免疫水平。必要时,可在整个儿童期每隔一段时间继续给予,以保持足够的水平或保护。

[0186] 类似地,特别易受反复或严重感染影响的成年人,比如卫生保健工作者、日托工作者、幼儿的家庭成员、老年人和心肺功能或免疫系统受损的个体,可能需要多次免疫以建立和/或保持保护性免疫反应。诱导的免疫水平可例如通过测量中和性分泌性和血清抗体的量来监测,并在必要时调整剂量或重复接种疫苗以引发和保持期望的保护水平。

[0187] 技术人员可容易地确定药用制剂的剂量,例如通过首先鉴定有效引发预防性或治疗性免疫反应的剂量,例如通过测量病毒特异性免疫球蛋白的血清滴度或者通过测量血清样品或尿液样品或粘膜分泌物中抗体的抑制比率。所述剂量可由动物研究确定。用于研究疫苗功效的动物的非限制性列表包括豚鼠、仓鼠、雪貂、毛丝鼠、小鼠和棉鼠以及非人灵长类动物。大多数动物不是感染物的天然宿主,但仍可用于疾病各方面的研究。例如,可对任何以上动物给予候选疫苗,例如本公开的VLP,以部分地表征诱导的免疫反应,和/或确定是否已产生了任何中和性抗体。例如,已在小鼠模型中进行了许多研究,因为小鼠体型小,而且其成本低允许研究者可以更大规模进行研究。

[0188] 另外,可由技术人员进行人类临床研究以确定用于人类的优选有效剂量。此类临床研究为常规的,并且为本领域众所周知的。待采用的精确剂量也将取决于给予途径。有效剂量可从衍生自体外或动物测试系统的剂量-反应曲线推断。

[0189] 还如本领域众所周知的,可通过使用免疫反应的非特异性刺激剂(被称为佐剂)来增强特定组合物的免疫原性。实验上已经使用佐剂来促进针对未知抗原的免疫的普遍增加。免疫方案使用佐剂来刺激反应已有多年,并且因此,佐剂为本领域普通技术人员众所周知的。一些佐剂影响抗原呈递的方式。例如,当蛋白抗原被铝佐剂(alum)沉淀时,免疫反应增加。抗原的乳化也可延长抗原呈递的持续时间。意图包含Vogel等人,“A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients(第2版)”中描述的任何佐剂在该发明的范围内,所述

文献出于所有目的通过参考以其全部结合至本文中。

[0190] 示例性的佐剂包括完全弗氏佐剂(含有杀死的结核分枝杆菌的免疫反应的非特异性刺激剂)、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。其他佐剂包括GMCSP、BCG、氢氧化铝、MDP化合物比如thur-MDP和nor-MDP、CGP (MTP-PE)、脂质A和单磷酸脂质A (MPL)。还考虑在2%角鲨烯/Tween-80乳液中的RIBI,其含有从细菌中提取的三种成分,即MPL、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)。也可使用MF-59、Novasomes.RTM.、MHC抗原。

[0191] 本公开的VLP也可与“免疫刺激剂”一起配制。这些“免疫刺激剂”为增加免疫系统反应的身体自身化学信使(细胞因子)。免疫刺激剂包括但不限于具有免疫刺激、免疫增强和促炎活性的各种细胞因子、淋巴因子和趋化因子,比如白细胞介素(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13);生长因子(例如粒细胞-巨噬细胞(GM)集落刺激因子(CSF));和其他免疫刺激分子,比如巨噬细胞炎性因子,F1t3配体、B7.1、B7.2等。免疫刺激分子可与VLP在同一制剂中给予,或者可分开给予。可给予蛋白或编码蛋白的表达载体以产生免疫刺激作用。因此在一个实施方案中,该公开包含含有佐剂和/或免疫刺激剂的抗原和疫苗制剂。

[0192] 根据本公开,该组合物可用于免疫疗法、治疗或预防癌症或炎症性疾病,包括肝纤维化疾病;在哺乳动物中产生针对半乳凝素的抗体;在受试者中调节免疫反应;受试者的免疫刺激;抑制半乳凝素和半乳凝素受体之间的相互作用;或抑制半乳凝素活性。

[0193] 可由组合物治疗的癌症的实例包括但不限于头颈部癌症、肺癌、非小细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、黑色素瘤、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、结肠癌、十二指肠癌、肛门癌、胃癌、肝癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜和子宫颈癌。阴道癌、外阴癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌。阴茎癌、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、前列腺癌、肾盂癌。中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症(包括石棉引起的那些)及其组合。

[0194] 尤其是,当至少一种半乳凝素抗原为半乳凝素-1表位肽,比如以下的Gal-1表位多肽#5、#7、#12或#14,尤其是Gal-1表位肽#5或#7时,由本公开提供的VLP可被用于治疗或预防癌症,比如肺癌,以及由HPV感染引起的疾病或病症。

[0195] 当至少一种半乳凝素抗原为半乳凝素-3表位肽,比如以下的Gal-3表位肽#17、#21、#22或#23,尤其是Gal-3表位肽#17、#21或#22时,由本公开提供的VLP可被用于治疗或预防与纤维化相关的疾病和病症,包括但不限于肺纤维化、肝纤维化包括非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、系统性硬化和心脏纤维化。

[0196] 本申请将参考以下实施例详细描述,然而实施例并不预期限制本申请的范围。

[0197] 实施例1

[0198] Gal-1 VLP的制备

[0199] 材料和方法

[0200] 通过使用人类和小鼠Gal-1蛋白的氨基酸序列和3D结构设计了半乳凝素-1 (Gal-1) 疫苗表位(表1)。在表1中,表位肽#5-#10为人类gal-1片段,并且表位肽#12和#14为小鼠gal-1蛋白的片段。为在蛋白颗粒表面呈递Gal-1表位肽,用Gal-1表位肽修饰了基孔肯雅病

毒(CHIKV)或委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)的病毒结构蛋白的E3区。表位肽通过接头SGG(N-末端)和GGG(C-末端)融合在CHIKV的SEQ ID NO:2的321位H和326位S之间,VEEV的SEQ ID NO:3的330位G和335位S之间。

[0201] 为产生哺乳动物表达载体pCHIKV-Gal-1或pVEEV-Gal-1质粒DNA载体,将合成的Gal-1表位肽序列的dsDNA片段(gBlocks, IDT)插入到pCHIKV或pVEEV载体中CHIKV E3包膜蛋白DNA的特定位置中。使用不插入任何Gal-1表位肽的pCHIKV或pVEEV载体作为对照VLP表达载体。

[0202] [表1]

表位肽#	表位肽	长度 (A.A.)	SEQ ID No:
对照	无	-	-
Gal-1 #5	SFVLNLGKDSNNLSLHFNPRFNAHGDANT IVSNSKDGGAWGTEQREAVFPFQPGS	55	9
Gal-1 #6	NNLSLHFNPRFNAHGDANTIVSNSKDG	27	17
Gal-1 #7	ANLTVKLDPDGYEFKFPNRLNLEA	23	10
Gal-1 #8	ANLTVKLDPDGYEFKFPN	17	18
Gal-1 #9	QPGSVAEVSITFDQANLTVKLDPDG	24	19
Gal-1 #10	ANTIVSNSKDGGAWGTEQREAVF	23	20
Gal-1 #12	SFVLNLGKDSNNLSLHFNPRFNAHGDANT IVSNTKEDGTWGTGTEHREPAFPFQPGS	55	11
Gal-1 #14	ADLTIKLPDGHFEKFPNRLNMEA	23	12

[0203] [0204] 在37℃下,于存在8% CO₂的情况下,使用振荡温育箱(INFORS HT),用FreeStyle 293表达培养基(Thermo Fisher Scientific, #12338-018)悬浮培养FreeStyle 293F细胞(Thermo Fisher Scientific, #R790-07)。在0.8μg DNA/10⁶细胞、DNA:PEI=1:3和1.25x10⁶个细胞/mL培养基的条件下,通过PEI(聚乙烯亚胺,Polysciences, #23966),用pCHIKV Gal-1#7、#12或对照质粒DNA表达载体转染293F细胞。培养上清液在转染后4天收获,并通过离心(3,000rpm, 10min)澄清,然后用0.45μm PES膜过滤系统(VWR#10040-470)过滤。通过经使用兔抗CHIKV抗血清(VLP Therapeutics)或小鼠抗VEEV血清(ATCC)和HRP标记的物种特异性二抗,在没有任何纯化或浓缩的情况下对过滤的培养上清液进行蛋白印迹分析来确认Gal-1 VLP的产生。

[0205] 为纯化和浓缩Gal-1 VLP,将含有VLP的培养上清液分层到1.5mL OptiPrep(60% w/v碘克沙醇,Accurate chemical, #AN1114542)上,并在SW-28转子(Beckman)中以52,000xg离心1.5小时。在去除上清液以在界面上方留下1.5mL之后,将两层混合并在NVT100转子(Beckman)中以360,000xg离心2.5小时以形成密度梯度。

[0206] 收集粗品VLP并用HiPrep 16/60Sephacryl S-500 HR柱(GE,

[0207] #28-9356-06)和磷酸盐缓冲盐水(PBS)使用Biologic Duo-Flow FPLC系统(Bio-Rad)通过尺寸排阻色谱将其纯化。通过Amicon Ultra-15离心过滤装置(EMD Millipore, #UFC910024)浓缩含有VLP的级分并通过0.20μm PES膜将其过滤。

[0208] 按照制造商的说明,通过BCA蛋白测定(Pierce, #23225)测量总蛋白浓度。通过

SDS-PAGE分析(Any kD Mini-PROTEAN TGX预制蛋白凝胶,Bio-Rad,#456-9035),然后为使用QC胶体考马斯染料(Bio-Rad,#1610803)的基于考马斯染料的染色,确认VLP样品的纯度。将蔗糖和EDTA分别添加到VLP溶液中至最终浓度为250mM和5mM。将Gal-1 VLP样品的蛋白浓度调整为0.4mg/mL并储存于-80℃下。

[0209] 293F细胞(10ml)用编码所示Gal-1表位到VEEV VLP中的10ug质粒进行转染。收获上清液并对其进行蛋白印迹检测抗VEEV小鼠血清(1:1000稀释)。上清液中携带Gal-1表位肽#5、#7、#12和#14的VLP的表达得到确认(图1)。

[0210] 实施例2

[0211] 小鼠免疫原性研究

[0212] 材料和方法

[0213] 为制备免疫样品,将VLP溶液解冻并与2% Alhydrogel佐剂(10mg/ml铝,Brenntag,#250-843261,批号#5014)以1:1(v/v)混合。在第1、4和8天用0.05mL中的10ug(蛋白)肌肉内注射到小鼠(8周龄雌性,BALB/c,Envigo)大腿中。为评估肽-VLP融合蛋白对针对自身抗原的抗体滴度的影响,将10ug全长重组人类或小鼠Gal-1蛋白(Sino Bioscience)与Alhydrogel佐剂一起注射到两组中的小鼠中作为对照。第0和15天经由下颌下静脉并且第29天通过心脏穿刺采集血液样品。在Smithers Avanza Toxicology Service(Gaithersburg,MD)按照机构动物护理和使用委员会的指南(Guideline of Institutional Animal Care and Use Committee)进行动物处理、免疫、出血和血清制备。将全血样品收集在血清分离管(Greiner,#450472)中并以1,200xg离心5min以分离血清。将收集的血清储存于-20℃下直至分析。

[0214] ELISA测定

[0215] 通过间接ELISA确定Gal-1特异性血清抗体滴度。将免疫测定板(Thermo Fisher Scientific,Maxisorp,#442404)用PBS中的100μL(500ng/mL)重组人类或小鼠半乳凝素-1蛋白(Sino Bioscience,#10290-HNAE和#50100-MNAE)于4℃下包被过夜。用TBS-T冲洗之后,将孔用350μL封闭缓冲液(TBS-T中5%脱脂乳)在室温下封闭1小时。用TBS-T将孔洗涤3次。将小鼠血清1:50稀释,并在封闭缓冲液中以1:5进一步连续稀释至最终稀释度为1:781,250。将稀释的血清在包被的孔中于室温下温育1小时。将孔用400μL的TBS-T洗涤5次,并与HRP标记的抗小鼠IgG+M+A抗体(Thermo Fisher,#PA1-84388)一起在室温下进一步温育30min。将板孔用TBS-T洗涤5次,并与100μL HRP底物(SureBlue TMB单组分微孔过氧化物酶底物,Sera Care,#5120-0076)一起温育。用100μL停止溶液(1M H₂SO₄)终止反应,并通过微孔板读取器(Synergy/HTX,BioTek)测量450nm的吸光度。使用Microsoft Excel(Microsoft)和GraphPad Prism 8.0(GraphPad Software)分析数据。终点滴度被定义为产生高于空白加上三个标准偏差的吸光度测量值的较高血清稀释度。

[0216] 通过间接ELISA和亚类特异性二抗实验组合确定免疫的血清中抗Gal-1抗体的免疫球蛋白类别和亚类。将免疫测定板用PBS中的100μL(500ng/mL)重组小鼠半乳凝素-1蛋白(Sino Bioscience,#50100-MNAE)在4℃下包被过夜。用TBS-T冲洗之后,将孔用350μL封闭缓冲液(TBS-T中5%脱脂乳)在室温下封闭1小时。用TBS-T将孔洗涤3次。将小鼠血清在封闭缓冲液中1:1000稀释。将每个稀释的血清转移到8个不同的Gal-1包被的孔中,并在室温下温育1小时。将孔用400μL的TBS-T洗涤5次,并与HRP标记的抗小鼠Ig亚类特异性抗体Mouse

Typer Sub Isotyping Panel (Bio-Rad, #172-2055) 一起在室温下进一步温育30min。将板孔用TBS-T洗涤5次,并与100 μ L的HRP底物(SureBlue™ TMB单组分微孔过氧化物酶底物, Sera Care, #5120-0076)一起温育。用100 μ L停止溶液终止反应,并通过微孔板读取器测量450nm的吸光度。

[0217] 结果

[0218] 通过筛选Gal-1肽片段(如表1所示),我们已经鉴定了与CHIKV病毒样颗粒平台组合诱导抗人类Gal-1抗体的两种有前景的Gal-1候选疫苗#5和#7(图2A)。通过ELISA分别对小鼠和人类Gal-1确定了Gal-1 VLP在幼稚BALB/c小鼠中的免疫原性。第一次注射之后四周,在用Gal-1 VLP免疫的小鼠中诱导了抗人类和小鼠半乳凝素-1抗体。对于小鼠模型中的概念验证研究,用小鼠Gal-1序列修饰衍生自人类Gal-1的Gal-1 VLP#5的肽序列,并获得Gal-1 VLP#12。相对于结合rmGal-1,通过用Gal-1#5VLP免疫的血清优先结合rhGal-1(图2B)。另一方面,相对于结合rhGal-1,通过用Gal-1#12VLP免疫的血清优先结合rmGal-1。

[0219] 为有效生产Gal-1 VLP,将VLP的来源从基孔肯雅病毒(CHIKV)变为委内瑞拉马脑炎病毒(VEEV)。制备总共5种不同颗粒,包括四种Gal-1 VEEV VLP(表1, #5、#7、#12和#14)和对照VEEV VLP。在变性条件下,通过SDS-PAGE分析了Gal-1 VLP和对照VLP的分子大小和纯度(图3A)。所有VLP样品均与理论分子量相匹配,并且纯度超过90%。50-75kDa之间的蛋白条带为Gal-1肽和病毒结构蛋白的融合蛋白。分子量取决于插入的Gal-1肽的长度而变化。小鼠一周三次肌肉内注射10 μ g Gal-1 VLP蛋白与氢氧化铝佐剂。免疫之后四周,通过ELISA分别确定对人类或小鼠Gal-1有特异性的抗Gal-1抗体滴度。四种Gal-1肽缀合的VLP分子#5、7、12和14在小鼠中诱导了抗小鼠Gal-1抗体,但重组小鼠Gal-1蛋白没有(图3D、E)。Gal-1#5和#7为不同的人类Gal-1表位序列肽,并且携带那些肽的VLP诱导抗人类Gal-1抗体。Gal-1 VLP#12和#14为不同的小鼠Gal-1表位肽,并且携带那些肽的VLP有效地诱导抗小鼠Gal-1抗体(图3E)。Gal-1肽#5和#12编码碳水化合物识别结构域(CRD)附近的四个 β -片层S3、S4、S5和S6(图3B)。Gal-1肽#7和#14编码F4和F5 β -片层,其在嗜同种二聚化中可能是重要的(图3C)。VLP蛋白纳米颗粒上显示的自身蛋白与病毒衍生蛋白的嵌合抗原破坏针对自身蛋白的免疫耐受,并有效地刺激抗体产生。尽管Gal-1蛋白在物种之间高度保守(图3F),但用来自不同物种的Gal-1表位肽免疫的血清诱导了人类或小鼠选择性抗Gal-1抗体(图3E)。Gal-1 VLP疫苗可有效地刺激针对自身蛋白的体液免疫反应。

[0220] 实施例3

[0221] 体内肿瘤模型

[0222] 材料和方法

[0223] 在加利福尼亚大学圣迭戈分校(La Jolla, CA)穆尔斯癌症中心(Moores Cancer Center)病理学和医学教授Judith Varner博士的指导下,按照机构动物护理和使用委员会的指南进行动物处理、免疫、出血、肿瘤接种、肿瘤测量和血清制备。肿瘤大小一周测量两次。肿瘤体积计算为 $D \times d^2/2$,其中D=最长直径和d=最短直径。在第41天处死小鼠,并收集血液和肿瘤组织。测量终点肿瘤重量。研究中收集的所有数据均通过Microsoft Excel和GraphPad Prism进行分析。

[0224] LLC模型

[0225] 在第1、4和8天通过肌肉内注射用以1:1(v/v)含有2%alhydrogel佐剂的10 μ g

CHIKV Gal-1病毒样颗粒疫苗免疫C57BL6 (雌性,8周龄)小鼠三次(n=8)。对照小鼠注射含有2%alhydrogel的PBS。第15天,在肿瘤接种之前从每只动物采集200 μ l血液。将血液处理成血浆并储存于-20 $^{\circ}$ C下。用无血清PBS中的Lewis肺癌细胞(1×10^6 个细胞/100 μ L)在侧腹皮下(s.c.)攻击小鼠。

[0226] MEER HPV模型

[0227] 在第1、4和8天用以1:1(v/v)含有2%alhydrogel佐剂的10 μ gVEEV Gal-1病毒样颗粒疫苗免疫C57BL6 (雌性,8周龄)小鼠三次,并在第15天之后每周通过肌肉注射免疫。对照小鼠注射含有2%alhydrogel的对照VEEV VLP疫苗。第15天,在肿瘤接种之前从每只动物采集200 μ l血液。将血液处理成血浆并储存于-20 $^{\circ}$ C下。用无血清PBS中的MEER HPV+细胞(1×10^6 个细胞/100 μ L)在侧腹皮下(s.c.)攻击小鼠。

[0228] 结果

[0229] 在肺癌小鼠模型中检查Gal-1 VLP疫苗对癌症疗法的影响。C57BL6小鼠在肿瘤接种之前两周用对照VLP或Gal-1 VLP预免疫。通过ELISA确定抗小鼠Gal-1抗体滴度(图4A)。还检查了针对病毒蛋白的抗体滴度以供免疫参考(图4B)。接受Gal-1 VLP的小鼠产生了抗小鼠Gal-1抗体,如先前在不同小鼠品系中观察到的。用两种不同的Gal-1 VLP免疫的小鼠优先地表达IgG2a抗小鼠Gal-1抗体(图4C)。

[0230] 在第15天皮下接种Lewis肺癌细胞并监测肿瘤生长。尽管肿瘤体积(图5A-D)和终点肿瘤重量(图5E)在对照组和VLP治疗组之间没有统计学上的显著差异,但用Gal-1#12治疗的小鼠肿瘤生长慢于其他组。

[0231] 检查Gal-1疫苗对小鼠HPV+头颈部鳞状癌(Square Carcinoma)细胞模型的影响。用Gal-1#14VLP疫苗治疗的小鼠肿瘤生长慢于对照组,但在任何组之间没有统计学上的显著差异(图6A和6B)。

[0232] 实施例4

[0233] 具有Gal-3抗原的VLP的制备

[0234] 材料和方法

[0235] 通过使用人类和小鼠Gal-3蛋白的蛋白氨基酸序列和3D结构设计了半乳凝素-3(Gal-3)表位肽(表2)。为产生哺乳动物表达载体pVEEV Gal-3质粒DNA载体,将合成的Gal-3表位肽序列的dsDNA片段(gBlocks, IDT)插入到pVEEV载体中编码VEEV E3包膜蛋白的DNA的特定位置中(在330位的G和335位的S之间)。使用不插入任何Gal-1表位肽的pVEEV载体作为对照VLP表达载体。

[0236] 在37 $^{\circ}$ C下,使用含有8% CO₂的振荡温育箱,用FreeStyle 293表达培养基(Thermo Fisher Scientific, #12338-018)悬浮培养FreeStyle293F细胞(Thermo Fisher Scientific, #R790-07)。在0.8 μ g DNA/10⁶细胞、DNA:PEI=1:3(w/w)和1.25 $\times 10^6$ 个细胞/mL培养基的条件下,通过PEI(聚乙烯亚胺,Polysciences, #23966),用到细胞中的pVEEV Gal-3 VLP或对照质粒DNA表达载体转染293F细胞。培养上清液转染后4天收获,并通过离心(3,000rpm, 10min)澄清,然后用0.45 μ m PES膜过滤系统(VWR#10040-470)过滤。

[0237] 将含有VLP的培养上清液分层到1.5mL OptiPrep (60% w/v碘克沙醇, Accurate chemical, #AN1114542)上,并在SW-28转子(Beckmann)中以52,000 $\times$ g离心1.5hr。在去除上清液以在界面上方留下1.5mL之后,将两层混合以制备50% OptiPrep溶液,并在NVT100转

子(Beckman)中以360,000xg离心2.5hrs以形成密度梯度。

[0238] 收集粗品VLP并用HiPrep 16/60Sephacryl S-500HR柱(GE,#28-9356-06)和磷酸盐缓冲盐水(PBS)使用Biologic Duo-Flow FPLC系统(Bio-Rad)通过尺寸排阻色谱将其纯化。通过Amicon Ultra-15离心过滤装置(EMD Millipore,#UFC910024)浓缩含有VLP的级分并通过0.20μm PES膜将其过滤。

[0239] 按照制造商的说明,通过BCA蛋白测定(Pierce,#23225)测量总蛋白浓度。通过SDS-PAGE分析(Any kD Mini-PROTEAN TGX预制蛋白凝胶,Bio-Rad,#456-9035),然后为使用QC胶体考马斯染料(Bio-Rad,#1610803)的基于考马斯染料的染色,确认VLP的纯度。将蔗糖和EDTA以最终浓度分别为250mM和5mM添加到VLP溶液中。将VLP样品的蛋白浓度调整为0.4mg/mL并储存于-80℃下。

[0240] [表2]

表位肽#	表位肽	长度 (A.A.)	SEQ ID No:
对照	无	-	-
Gal-3 #17	ADNFSLHDALSGSGNPNPQGWPAGWGNQ PA	30	13
[0241] Gal-3 #21	YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAY PGAPGA	34	14
Gal-3 #22	YPGASYPGAYPGQAPPGAYPGQAPPGAY PGAPGAYPGAPAPGVYPGPPSGPGAYPS SGQPSATGAYPATGPYGA	74	15
Gal-3 #23	ADSFSLNDALAGSGNPNPQGYPGAWGNQ PA	30	16

[0242] 在变性条件下,通过SDS-PAGE分析了包含Gal-3表位肽的VEEV VLP和对照VEEV VLP的分子大小和纯度(图7)。所有VLP样品均与理论分子量相匹配,并且纯度超过90%。50-75kDa之间的蛋白条带为Gal-3肽与VEEV病毒结构蛋白的融合蛋白,并且大小变化取决于肽的长度。

[0243] 实施例5

[0244] 小鼠免疫原性研究

[0245] 材料和方法

[0246] 为制备免疫样品,将VLP溶液解冻并与Alhydrogel佐剂(10mg/ml铝,Brenntag,#250-843261,批号#5014)以1:1(v/v)混合。在第1、4和8天用0.05mL中的10ug(蛋白)肌肉内注射到小鼠(8周龄雌性,BALB/c,Envigo)大腿中。第0和15天经由下颌下静脉并且第29天通过心脏穿刺采集血样。在Smithers Avanza Toxicology Service(Gaithersburg,MD)按照机构动物护理和使用委员会的指南进行动物处理、免疫、出血和血清制备。将全血样品收集在血清分离管(Greiner,#450472)中并以1,200xg离心5min以分离血清。收集的血清储存于-20℃下直至分析。

[0247] ELISA测定

[0248] 通过间接ELISA确定Gal-3特异性血清抗体滴度。将免疫测定板(Thermo Fisher Scientific,Maxisorp,#442404)用PBS中的100uL(500ng/mL)重组人类或小鼠半乳凝素-3蛋白(GA3-H5129,AcroBioscience和#599806,Biolegend)于4℃下包被过夜。用TBS-T冲洗之后,将孔用350uL封闭缓冲液(TBS-T中5%脱脂乳)在室温下封闭1小时。用TBS-T将孔洗涤3次。将小鼠血清1:50稀释,并在封闭缓冲液中以1:5进一步连续稀释至最终稀释度为1:781,250。将稀释的血清在包被的孔中于室温下温育1小时。将孔用400uL的TBS-T洗涤5次,并与HRP标记的抗小鼠IgG+M+A抗体(Thermo Fisher,#PA1-84388)一起在室温下进一步温育30min。将板孔用TBS-T洗涤5次,并与100uL HRP底物(SureBlue™ TMB单组分微孔过氧化物酶底物,Sera Care,#5120-0076)一起温育。用100uL停止溶液终止反应,并通过微孔板读取器(Synergy/HTX,BioTek)测量450nm的吸光度。使用Microsoft Excel(Microsoft)和GraphPad Prism 8.0(GraphPad Software)分析数据。通过其OD高于测定对照+3x对照的SD的最高稀释度确定小鼠血清的终点滴度。

[0249] 结果

[0250] 通过ELISA确定了Gal-3 VLP在幼稚BALB/c小鼠中的免疫原性。第一次注射之后四周,使用重组小鼠或人类Gal-3蛋白分析用Gal-3VLP免疫的小鼠血清中的抗人类和小鼠半乳凝素-3抗体。结果如图8所示。Gal-3 VLP#17由人类N-末端Gal-3表位肽组成并诱导比抗小鼠Gal-3更多的抗人类Gal-3抗体。相比之下,Gal-3 VLP#23编码小鼠Gal-3 N-末端肽并诱导比抗人类Gal-3抗体更多的抗小鼠Gal-3抗体。由人类Gal-3 N-末端重复序列表位肽组成的Gal-3 VLP#21和22,和#22具有比#21更长的重复序列。

[0251] 实施例6

[0252] 与细胞表面Gal-3结合的血清抗体的流式细胞术分析

[0253] 材料和方法

[0254] 将293F细胞(在FreeStyle 293培养基中 2×10^6 个细胞/mL)与重组人类半乳凝素-3(30μg/mL)一起在室温下温育30min。将细胞离心降下并用细胞培养基洗涤两次。将沉淀的细胞重悬于FC染色缓冲液(PBS中5% FBS)中,并转移100μL到96孔V形底的板中。将板以800xg离心以沉淀细胞并丢弃上清液。将5只小鼠的血清汇集并用FC染色缓冲液以1:250稀释。将稀释的血清加入到含有用和不用Gal-3处理的沉淀细胞的孔中。将细胞通过移液重悬并在室温下温育1小时。温育之后,将细胞下降并重悬于FC染色缓冲液中以洗涤细胞。把洗涤步骤重复两次并将细胞重悬于Alexa 488标记的山羊抗小鼠IgG+M抗体(Invitrogen,1:500稀释)中,且在室温下避光温育30min。将细胞用FC染色缓冲液洗涤两次。将细胞重悬于200μL的FC染色缓冲液中并通过流式细胞仪(Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer,ThermoFisher)进行分析。

[0255] 结果

[0256] 通过流式细胞术分析检查抗Gal-3抗体对细胞表面Gal-3蛋白的识别和结合。通过蛋白印迹分析,293F细胞中Gal-3蛋白的内源性表达为不可检测到的。将293F细胞的单细胞悬液与重组人类Gal-3蛋白一起温育,并然后洗涤三次以去除未结合的蛋白。用封闭缓冲液然后为荧光标记的抗小鼠IgG+M稀释Gal-3 VLP免疫的血清。使用以对照VLP免疫的小鼠血清作为对照。来自用Gal-3#17和#22免疫的小鼠的两种血清均与Gal-3处理的细胞结合(图9)。

[0257] 实施例7

[0258] 拉下测定

[0259] 材料和方法

[0260] 将20 μ L免疫的小鼠血清、20 μ g小鼠抗Gal-3单克隆抗体(c1.B2C10,Santa Cruz)或20 μ g小鼠对照IgG(Biolegend)用PBS稀释至1mL,并与40 μ L蛋白G磁珠(GenScript)一起在室温下于旋转器上温育1小时。将磁珠用PBS在磁性支架上洗涤三次。将包被的磁珠在存在或不存在50mM乳糖的情况下重悬于1mL重组人类Gal-3溶液(2 μ g/mL)中,并在室温下于旋转器上温育1小时。然后,将磁珠用PBS洗涤三次,并用50 μ L含有2-巯基乙醇的1x Laemmli SDS-PAGE样品缓冲液煮沸。将样品通过SDS-PAGE分离并转移到PVDF膜上。用抗Gal-3单克隆抗体(c1.Gal397,BioLegend)和HRP标记的抗小鼠IgG探测Gal-3蛋白。将膜与Clarity Western ECL底物(Bio-Rad)一起温育并通过ChemiDoc XRS+成像系统(Bio-Rad)捕获图像。

[0261] 结果

[0262] 通过拉下测定检查由Gal-3 VLP疫苗诱导的抗Gal-3抗体的中和能力。通过连接于蛋白G磁珠的抗Gal-3抗体捕获溶液中自由移动的重组Gal-3蛋白。用单克隆Gal-3抗体B2C10和来自Gal-3 VLP疫苗接种小鼠的抗血清拉下了Gal-3蛋白,但在对照VLP中没有。Gal-3VLP有效地诱导了识别膜结合和自由移动形式的Gal-3蛋白的高滴度抗Gal-3抗体(图10)。

[0263] 实施例8

[0264] 小鼠NASH模型

[0265] 材料和方法

[0266] 从Japan SLC, Inc. (日本) 获得C57BL/6小鼠(14天孕期雌性)。研究中使用的所有动物均按照日本药理学学会动物使用指南进行饲养和护理。将动物保持在SPF设施中,处于温度(23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C)、湿度(45 $\pm$ 10%)、光照(12小时人工光暗周期;光照在8:00-20:00)和空气交换的受控条件下。

[0267] 在25只雄性小鼠中,通过在出生之后2天单次皮下注射200 μ g链脲佐菌素(STZ, Sigma-Aldrich, USA)溶液并在4周龄之后饲喂高脂肪饮食(HFD, 57kcal % 脂肪, Cat#HFD32, CLEA Japan, Inc., Japan) 诱导NASH。Gal-3 VLP、对照VLP和媒介物以50 μ L/身体的体积肌肉内(大腿)给予。每次均变换注射腿以避免局部炎症。每天监测活力、临床体征和行为。治疗之前记录体重。每次给予之后约60分钟,对小鼠观察毒性、垂死和死亡的显著临床体征。将动物在9周龄时于异氟烷(Pfizer Inc.)麻醉下通过经直接心脏穿刺的放血来处死。

[0268] 对于血清样品,在第15天(6周龄)时,从面部静脉采集非禁食血液于不含抗凝剂的血清分离管中。将采集的血液在4 $^{\circ}$ C下以3,500 $\times$ g离心5分钟。收集20 μ L上清液并将其储存于-80 $^{\circ}$ C下用于生物化学。通过FUJIDRI-CHEM 7000(Fujifilm Corporation, 日本)测量血清ALT水平。对于HE染色,从在Bouin溶液中预固定的肝组织石蜡块切下切片,并将其用Lillie Mayer的苏木精(Muto Pure Chemicals Co., Ltd., 日本)和伊红溶液(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)染色。在GraphPad Prism 6(GraphPad Software Inc., USA)上使用Bonferroni多重比较检验进行统计分析。P值<0.05被认为统计上显著性。当单尾t检验返回P值<0.1时,假定有趋向或趋势。结果表示为平均值 $\pm$ SD。

[0269] 结果

[0270] 在小鼠STAM非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 模型中检查Gal-3 VLP疫苗对Gal-3抑制的影响。用STZ治疗并饲喂高脂肪饮食的小鼠在6-8周龄时发展为非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 和NASH。用对照或Gal-3VLP治疗的小鼠在4周龄时开始,并在第一周三次且然后每周一次直到8周龄,总共六次注射。

[0271] 在任何两组之间在体重变化、终点肝脏和肾脏重量方面均未观察显著差异。第5组中的一只小鼠在研究日期23被发现死亡,其似乎为意外死亡,并且与治疗的毒性无关。在研究终点,测量血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平作为肝损伤的一般标志物。研究大鼠的ALT水平高于正常水平 (17.5-30.2U/L) (Johnson-Delaney 1996)。ALT在任何组之间无显著差异。为评估Gal-3疫苗对NASH疾病进展的影响,根据Kleiner的标准 (Kleiner等人,2005) 计算NAFLD活性评分 (NAS)。在脂肪变性、小叶炎症和肝细胞气球样方面为NAS评估的有三种不同的成分 (表3,图11A-C)。对来自在NASH模型中的研究的H&E染色肝脏切片进行评分和分析 (表4)。来自媒介物组的肝脏切片表现出微和大泡性脂肪沉积、肝细胞气球样和炎性细胞浸润。对照VLP和Gal-3#23VLP组中的NAS与媒介物组相比较趋于降低 (图11,表4)。尤其是对于VLP疫苗在肝细胞气球样方面评分降低。尽管进入的任何组之间的总NAS评分没有统计学上的显著差异,但在用对照VLP或Gal-3疫苗治疗的组中存在观察到气球样评分较低的一些趋向。

[0272] [表3]

[0273] NAS成分的定义

条目	评分	程度
脂肪变性	0	<5%
	1	5-33%
	2	>33-66%
	3	>66%
小叶炎症	0	无病灶
	1	<2 个病灶/200x
	2	2-4 个病灶/200x
	3	>4 个病灶/200x
肝细胞气球样	0	无
	1	少量气球样细胞
	2	许多细胞/显著气球样

[0275] [表4]

[0276]

组		评分											NAS 平均值±SD
		脂肪变性				小叶炎症				肝细胞 气球样			
n	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2		
媒介物	5	2	3	-	-	-	-	2	3	1	2	2	4.4±0.5
对照 VLP	5	1	4	-	-	-	-	1	4	4	1	-	3.8±0.4
Gal-3 VLP#22	5	4	-	1	-	-	-	-	5	4	-	1	3.8±1.1
Gal-3 VLP#23	5	2	3	-	-	-	-	1	4	4	1	-	3.6±0.5
Gal-3 VLP#22+#23	4	3	-	1	-	-	-	-	4	3	-	1	4.0±1.2

序列表

<110> VLP 治疗有限责任公司(VLP THERAPEUTICS, INC.)

<120> 靶向半乳凝素的免疫疗法

<130> 676783

<150> US63/178755

<151> 2021-04-23

<160> 20

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 1248

<212> PRT

<213> 基孔肯雅病毒

<400> 1

```

Met Glu Phe Ile Pro Thr Gln Thr Phe Tyr Asn Arg Arg Tyr Gln Pro
1           5           10           15
Arg Pro Trp Thr Pro Arg Pro Thr Ile Gln Val Ile Arg Pro Arg Pro
          20           25           30
Arg Pro Gln Arg Gln Ala Gly Gln Leu Ala Gln Leu Ile Ser Ala Val
          35           40           45
Asn Lys Leu Thr Met Arg Ala Val Pro Gln Gln Lys Pro Arg Arg Asn
          50           55           60
Arg Lys Asn Lys Lys Gln Lys Gln Lys Gln Gln Ala Pro Gln Asn Asn
65           70           75           80
Thr Asn Gln Lys Lys Gln Pro Pro Lys Lys Lys Pro Ala Gln Lys Lys
          85           90           95
Lys Lys Pro Gly Arg Arg Glu Arg Met Cys Met Lys Ile Glu Asn Asp
          100          105          110
Cys Ile Phe Glu Val Lys His Glu Gly Lys Val Thr Gly Tyr Ala Cys
          115          120          125
Leu Val Gly Asp Lys Val Met Lys Pro Ala His Val Lys Gly Thr Ile
          130          135          140
Asp Asn Ala Asp Leu Ala Lys Leu Ala Phe Lys Arg Ser Ser Lys Tyr
145          150          155          160
Asp Leu Glu Cys Ala Gln Ile Pro Val His Met Lys Ser Asp Ala Ser
          165          170          175
Lys Phe Thr His Glu Lys Pro Glu Gly Tyr Tyr Asn Trp His His Gly
          180          185          190
Ala Val Gln Tyr Ser Gly Gly Arg Phe Thr Ile Pro Thr Gly Ala Gly

```

195	200	205
Lys Pro Gly Asp Ser Gly Arg	Pro Ile Phe Asp Asn Lys Gly Arg Val	
210	215	220
Val Ala Ile Val Leu Gly Gly Ala Asn Glu Gly Ala Arg Thr Ala Leu		
225	230	235
Ser Val Val Thr Trp Asn Lys Asp Ile Val Thr Lys Ile Thr Pro Glu		
245	250	255
Gly Ala Glu Glu Trp Ser Leu Ala Ile Pro Val Met Cys Leu Leu Ala		
260	265	270
Asn Thr Thr Phe Pro Cys Ser Gln Pro Pro Cys Thr Pro Cys Cys Tyr		
275	280	285
Glu Lys Glu Pro Glu Glu Thr Leu Arg Met Leu Glu Asp Asn Val Met		
290	295	300
Arg Pro Gly Tyr Tyr Gln Leu Leu Gln Ala Ser Leu Thr Cys Ser Pro		
305	310	315
His Arg Gln Arg Arg Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala		
325	330	335
Thr Arg Pro Tyr Leu Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser		
340	345	350
Cys His Ser Pro Val Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp		
355	360	365
Gly Thr Leu Lys Ile Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp		
370	375	380
Asp Ser His Asp Trp Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro		
385	390	395
Ala Asp Ala Glu Arg Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys		
405	410	415
Thr Ile Thr Gly Thr Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys		
420	425	430
Gly Glu Thr Leu Thr Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His		
435	440	445
Ser Cys Thr His Pro Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu		
450	455	460
Lys Phe His Ser Arg Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr		
465	470	475
Tyr Val Gln Ser Thr Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met		
485	490	495
Pro Pro Asp Thr Pro Asp Arg Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn		
500	505	510

Val	Lys	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Gln	Thr	Val	Arg	Tyr	Lys	Cys	Asn	Cys
515				520				525							
Gly	Gly	Ser	Asn	Glu	Gly	Leu	Thr	Thr	Thr	Asp	Lys	Val	Ile	Asn	Asn
530				535				540							
Cys	Lys	Val	Asp	Gln	Cys	His	Ala	Ala	Val	Thr	Asn	His	Lys	Lys	Trp
545				550				555				560			
Gln	Tyr	Asn	Ser	Pro	Leu	Val	Pro	Arg	Asn	Ala	Glu	Leu	Gly	Asp	Arg
565				570				575							
Lys	Gly	Lys	Ile	His	Ile	Pro	Phe	Pro	Leu	Ala	Asn	Val	Thr	Cys	Arg
580				585				590							
Val	Pro	Lys	Ala	Arg	Asn	Pro	Thr	Val	Thr	Tyr	Gly	Lys	Asn	Gln	Val
595				600				605							
Ile	Met	Leu	Leu	Tyr	Pro	Asp	His	Pro	Thr	Leu	Leu	Ser	Tyr	Arg	Asn
610				615				620							
Met	Gly	Glu	Glu	Pro	Asn	Tyr	Gln	Glu	Glu	Trp	Val	Met	His	Lys	Lys
625				630				635				640			
Glu	Val	Val	Leu	Thr	Val	Pro	Thr	Glu	Gly	Leu	Glu	Val	Thr	Trp	Gly
645				650				655							
Asn	Asn	Glu	Pro	Tyr	Lys	Tyr	Trp	Pro	Gln	Leu	Ser	Thr	Asn	Gly	Thr
660				665				670							
Ala	His	Gly	His	Pro	His	Glu	Ile	Ile	Leu	Tyr	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Tyr
675				680				685							
Pro	Thr	Met	Thr	Val	Val	Val	Val	Ser	Val	Ala	Thr	Phe	Ile	Leu	Leu
690				695				700							
Ser	Met	Val	Gly	Met	Ala	Ala	Gly	Met	Cys	Met	Cys	Ala	Arg	Arg	Arg
705				710				715				720			
Cys	Ile	Thr	Pro	Tyr	Glu	Leu	Thr	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Pro	Phe	Leu
725				730				735							
Leu	Ser	Leu	Ile	Cys	Cys	Ile	Arg	Thr	Ala	Lys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Gln
740				745				750							
Glu	Ala	Ala	Ile	Tyr	Leu	Trp	Asn	Glu	Gln	Gln	Pro	Leu	Phe	Trp	Leu
755				760				765							
Gln	Ala	Leu	Ile	Pro	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Val	Leu	Cys	Asn	Cys	Leu
770				775				780							
Arg	Leu	Leu	Pro	Cys	Cys	Cys	Lys	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Ala	Val	Met
785				790				795				800			
Ser	Val	Gly	Ala	His	Thr	Val	Ser	Ala	Tyr	Glu	His	Val	Thr	Val	Ile
805				810				815							
Pro	Asn	Thr	Val	Gly	Val	Pro	Tyr	Lys	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Pro	Gly

820	825	830
Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu Leu Leu Ser Val Thr Leu Glu		
835	840	845
Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr Cys Glu Tyr Lys Thr Val Ile		
850	855	860
Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly Thr Ala Glu Cys Lys Asp Lys		
865	870	875
Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val Phe Thr Gly Val Tyr Pro Phe		880
885	890	895
Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp Ala Glu Asn Thr Gln Leu		
900	905	910
Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu Ser Cys Lys Thr Glu Phe Ala		
915	920	925
Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val		
930	935	940
Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val Thr Ala Tyr Ala Asn Gly Asp		
945	950	955
His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys Phe Ile Val Gly Pro Met Ser		
965	970	975
Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp		
980	985	990
Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln		
995	1000	1005
Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro Glu Ser Lys Asp Val Tyr		
1010	1015	1020
Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro Ala Val Gly Thr Val		
1025	1030	1035
His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe Lys Tyr Trp Leu		
1040	1045	1050
Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro Phe Gly Cys		
1055	1060	1065
Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala Val Gly		
1070	1075	1080
Asn Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala Phe Thr Arg		
1085	1090	1095
Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro		
1100	1105	1110
Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys		
1115	1120	1125

Tyr Ala	Ala Ser Lys Lys Gly	Lys Cys Ala Val His	Ser Met Thr
1130		1135	1140
Asn Ala	Val Thr Ile Arg Glu	Ala Glu Ile Glu Val	Glu Gly Asn
1145		1150	1155
Ser Gln	Leu Gln Ile Ser Phe	Ser Thr Ala Leu Ala	Ser Ala Glu
1160		1165	1170
Phe Arg	Val Gln Val Cys Ser	Thr Gln Val His Cys	Ala Ala Glu
1175		1180	1185
Cys His	Pro Pro Lys Asp His	Ile Val Asn Tyr Pro	Ala Ser His
1190		1195	1200
Thr Thr	Leu Gly Val Gln Asp	Ile Ser Ala Thr Ala	Met Ser Trp
1205		1210	1215
Val Gln	Lys Ile Thr Gly Gly	Val Gly Leu Val Val	Ala Val Ala
1220		1225	1230
Ala Leu	Ile Leu Ile Val Val	Leu Cys Val Ser Phe	Ser Arg His
1235		1240	1245
<210> 2			
<211> 1248			
<212> PRT			
<213> 基孔肯雅病毒			
<400> 2			
Met Glu Phe Ile Pro Thr Gln Thr Phe Tyr Asn Arg Arg Tyr Gln Pro			
1	5	10	15
Arg Pro Trp Ala Pro Arg Pro Thr Ile Gln Val Ile Arg Pro Arg Pro			
	20	25	30
Arg Pro Gln Arg Gln Ala Gly Gln Leu Ala Gln Leu Ile Ser Ala Val			
	35	40	45
Asn Lys Leu Thr Met Arg Ala Val Pro Gln Gln Lys Pro Arg Arg Asn			
50	55	60	
Arg Lys Asn Lys Lys Gln Arg Gln Lys Lys Gln Ala Pro Gln Asn Asp			
65	70	75	80
Pro Lys Gln Lys Lys Gln Pro Pro Gln Lys Lys Pro Ala Gln Lys Lys			
	85	90	95
Lys Lys Pro Gly Arg Arg Glu Arg Met Cys Met Lys Ile Glu Asn Asp			
	100	105	110
Cys Ile Phe Glu Val Lys His Glu Gly Lys Val Met Gly Tyr Ala Cys			
	115	120	125
Leu Val Gly Asp Lys Val Met Lys Pro Ala His Val Lys Gly Thr Ile			
130	135	140	

Asp	Asn	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Leu	Ala	Phe	Lys	Arg	Ser	Ser	Lys	Tyr
145					150					155					160
Asp	Leu	Glu	Cys	Ala	Gln	Ile	Pro	Val	His	Met	Lys	Ser	Asp	Ala	Ser
			165						170					175	
Lys	Phe	Thr	His	Glu	Lys	Pro	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Trp	His	His	Gly
			180					185					190		
Ala	Val	Gln	Tyr	Ser	Gly	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Pro	Thr	Gly	Ala	Gly
		195					200					205			
Lys	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Arg	Pro	Ile	Phe	Asp	Asn	Lys	Gly	Arg	Val
	210					215					220				
Val	Ala	Ile	Val	Leu	Gly	Gly	Ala	Asn	Glu	Gly	Ala	Arg	Thr	Ala	Leu
225					230					235					240
Ser	Val	Val	Thr	Trp	Asn	Lys	Asp	Ile	Val	Thr	Lys	Ile	Thr	Pro	Glu
				245					250					255	
Gly	Ala	Glu	Glu	Trp	Ser	Leu	Ala	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Ala
			260					265					270		
Asn	Thr	Thr	Phe	Pro	Cys	Ser	Gln	Pro	Pro	Cys	Thr	Pro	Cys	Cys	Tyr
		275					280					285			
Glu	Lys	Glu	Pro	Glu	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Leu	Glu	Asp	Asn	Val	Met
	290					295					300				
Arg	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Gln	Leu	Leu	Lys	Ala	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Pro
305					310					315					320
His	Arg	Gln	Arg	Arg	Ser	Thr	Lys	Asp	Asn	Phe	Asn	Val	Tyr	Lys	Ala
			325						330					335	
Thr	Arg	Pro	Tyr	Leu	Ala	His	Cys	Pro	Asp	Cys	Gly	Glu	Gly	His	Ser
			340					345					350		
Cys	His	Ser	Pro	Ile	Ala	Leu	Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Glu	Ala	Thr	Asp
		355					360					365			
Gly	Thr	Leu	Lys	Ile	Gln	Val	Ser	Leu	Gln	Ile	Gly	Ile	Lys	Thr	Asp
	370					375					380				
Asp	Ser	His	Asp	Trp	Thr	Lys	Leu	Arg	Tyr	Met	Asp	Ser	His	Thr	Pro
385					390					395					400
Ala	Asp	Ala	Glu	Arg	Ala	Gly	Leu	Leu	Val	Arg	Thr	Ser	Ala	Pro	Cys
			405						410					415	
Thr	Ile	Thr	Gly	Thr	Met	Gly	His	Phe	Ile	Leu	Ala	Arg	Cys	Pro	Lys
			420					425					430		
Gly	Glu	Thr	Leu	Thr	Val	Gly	Phe	Thr	Asp	Ser	Arg	Lys	Ile	Ser	His
	435						440					445			
Thr	Cys	Thr	His	Pro	Phe	His	His	Glu	Pro	Pro	Val	Ile	Gly	Arg	Glu

450	455	460
Arg Phe His Ser Arg Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr		
465	470	475
Tyr Val Gln Ser Thr Ala Ala Thr Ala Glu Glu Ile Glu Val His Met		480
	485	490
Pro Pro Asp Thr Pro Asp Arg Thr Leu Met Thr Gln Gln Ser Gly Asn		495
	500	505
Val Lys Ile Thr Val Asn Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys		510
	515	520
Gly Gly Ser Asn Glu Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn		525
	530	535
Cys Lys Ile Asp Gln Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Asn Trp		540
545	550	555
Gln Tyr Asn Ser Pro Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg		560
	565	570
Lys Gly Lys Ile His Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg		575
	580	585
Val Pro Lys Ala Arg Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val		590
	595	600
Thr Met Leu Leu Tyr Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn		605
	610	615
Met Gly Gln Glu Pro Asn Tyr His Glu Glu Trp Val Thr His Lys Lys		620
625	630	635
Glu Val Thr Leu Thr Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly		640
	645	650
Asn Asn Glu Pro Tyr Lys Tyr Trp Pro Gln Met Ser Thr Asn Gly Thr		655
	660	665
Ala His Gly His Pro His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr		670
	675	680
Pro Thr Met Thr Val Val Ile Val Ser Val Ala Ser Phe Val Leu Leu		685
	690	695
Ser Met Val Gly Thr Ala Val Gly Met Cys Val Cys Ala Arg Arg Arg		700
705	710	715
Cys Ile Thr Pro Tyr Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu		720
	725	730
Leu Ser Leu Leu Cys Cys Val Arg Thr Thr Lys Ala Ala Thr Tyr Tyr		735
	740	745
Glu Ala Ala Ala Tyr Leu Trp Asn Glu Gln Gln Pro Leu Phe Trp Leu		750
	755	760
		765

Gln Ala Leu Ile Pro Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Cys Asn Cys Leu			
770	775	780	
Lys Leu Leu Pro Cys Cys Cys Lys Thr Leu Ala Phe Leu Ala Val Met			
785	790	795	800
Ser Ile Gly Ala His Thr Val Ser Ala Tyr Glu His Val Thr Val Ile			
	805	810	815
Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys Thr Leu Val Asn Arg Pro Gly			
	820	825	830
Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu Leu Gln Ser Val Thr Leu Glu			
	835	840	845
Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr Cys Glu Tyr Lys Thr Val Ile			
	850	855	860
Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly Thr Ala Glu Cys Lys Asp Lys			
865	870	875	880
Ser Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val Phe Thr Gly Val Tyr Pro Phe			
	885	890	895
Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp Ala Glu Asn Thr Gln Leu			
	900	905	910
Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu Ser Cys Lys Thr Glu Phe Ala			
	915	920	925
Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val			
	930	935	940
Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val Ala Ala Tyr Ala Asn Gly Asp			
945	950	955	960
His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys Phe Val Val Gly Pro Met Ser			
	965	970	975
Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp			
	980	985	990
Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln			
	995	1000	1005
Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro Glu Ser Lys Asp Val Tyr			
	1010	1015	1020
Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro Ala Ala Gly Thr Val			
	1025	1030	1035
His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe Lys Tyr Trp Leu			
	1040	1045	1050
Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro Phe Gly Cys			
	1055	1060	1065
Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala Val Gly			

1070	1075	1080
Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp	Ile Pro Asp Ala Ala	Phe Thr Arg
1085	1090	1095
Val Val Asp Ala Pro Ser Val	Thr Asp Met Ser Cys	Glu Val Pro
1100	1105	1110
Ala Cys Thr His Ser Ser Asp	Phe Gly Gly Val Ala	Ile Ile Lys
1115	1120	1125
Tyr Thr Ala Ser Lys Lys Gly	Lys Cys Ala Val His	Ser Met Thr
1130	1135	1140
Asn Ala Val Thr Ile Arg Glu	Ala Asp Val Glu Val	Glu Gly Asn
1145	1150	1155
Ser Gln Leu Gln Ile Ser Phe	Ser Thr Ala Leu Ala	Ser Ala Glu
1160	1165	1170
Phe Arg Val Gln Val Cys Ser	Thr Gln Val His Cys	Ala Ala Ala
1175	1180	1185
Cys His Pro Pro Lys Asp His	Ile Val Asn Tyr Pro	Ala Ser His
1190	1195	1200
Thr Thr Leu Gly Val Gln Asp	Ile Ser Thr Thr Ala	Met Ser Trp
1205	1210	1215
Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly	Val Gly Leu Ile Val	Ala Val Ala
1220	1225	1230
Ala Leu Ile Leu Ile Val Val	Leu Cys Val Ser Phe	Ser Arg His
1235	1240	1245
<210>	3	
<211>	1255	
<212>	PRT	
<213>	委内瑞拉马脑炎病毒	
<400>	3	
Met Phe Pro Phe Gln Pro Met Tyr Pro Met Gln Pro Met Pro Tyr Arg		
1	5	10
Asn Pro Phe Ala Ala Pro Arg Arg Pro Trp Phe Pro Arg Thr Asp Pro		
20	25	30
Phe Leu Ala Met Gln Val Gln Glu Leu Thr Arg Ser Met Ala Asn Leu		
35	40	45
Thr Phe Lys Gln Arg Arg Asp Ala Pro Pro Glu Gly Pro Ser Ala Ala		
50	55	60
Lys Pro Lys Lys Glu Ala Ser Gln Lys Gln Lys Gly Gly Gly Gln Gly		
65	70	75
Lys Lys Lys Lys Asn Gln Gly Lys Lys Lys Ala Lys Thr Gly Pro Pro		

85							90					95				
Asn	Pro	Lys	Ala	Gln	Asn	Gly	Asn	Lys	Lys	Lys	Thr	Asn	Lys	Lys	Pro	
100							105					110				
Gly	Lys	Arg	Gln	Arg	Met	Val	Met	Lys	Leu	Glu	Ser	Asp	Lys	Thr	Phe	
115							120					125				
Pro	Ile	Met	Leu	Glu	Gly	Lys	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ala	Cys	Val	Val	Gly	
130							135					140				
Gly	Lys	Leu	Phe	Arg	Pro	Met	His	Val	Glu	Gly	Lys	Ile	Asp	Asn	Asp	
145							150					155				160
Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Lys	Thr	Lys	Lys	Ala	Ser	Lys	Tyr	Asp	Leu	Glu	
165							170					175				
Tyr	Ala	Asp	Val	Pro	Gln	Asn	Met	Arg	Ala	Asp	Thr	Phe	Lys	Tyr	Thr	
180							185					190				
His	Glu	Lys	Pro	Gln	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Trp	His	His	Gly	Ala	Val	Gln	
195							200					205				
Tyr	Glu	Asn	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Pro	Lys	Gly	Val	Gly	Ala	Lys	Gly	
210							215					220				
Asp	Ser	Gly	Arg	Pro	Ile	Leu	Asp	Asn	Gln	Gly	Arg	Val	Val	Ala	Ile	
225							230					235				240
Val	Leu	Gly	Gly	Val	Asn	Glu	Gly	Ser	Arg	Thr	Ala	Leu	Ser	Val	Val	
245							250					255				
Met	Trp	Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Thr	Val	Lys	Tyr	Thr	Pro	Glu	Asn	Cys	
260							265					270				
Glu	Gln	Trp	Ser	Leu	Val	Thr	Thr	Met	Cys	Leu	Leu	Ala	Asn	Val	Thr	
275							280					285				
Phe	Pro	Cys	Ala	Gln	Pro	Pro	Ile	Cys	Tyr	Asp	Arg	Lys	Pro	Ala	Glu	
290							295					300				
Thr	Leu	Ala	Met	Leu	Ser	Val	Asn	Val	Asp	Asn	Pro	Gly	Tyr	Asp	Glu	
305							310					315				320
Leu	Leu	Glu	Ala	Ala	Val	Lys	Cys	Pro	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser	Thr	
325							330					335				
Glu	Glu	Leu	Phe	Asn	Glu	Tyr	Lys	Leu	Thr	Arg	Pro	Tyr	Met	Ala	Arg	
340							345					350				
Cys	Ile	Arg	Cys	Ala	Val	Gly	Ser	Cys	His	Ser	Pro	Ile	Ala	Ile	Glu	
355							360					365				
Ala	Val	Lys	Ser	Asp	Gly	His	Asp	Gly	Tyr	Val	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	
370							375					380				
Ser	Gln	Tyr	Gly	Leu	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	Leu	Lys	Gly	Arg	Thr	Met	
385							390					395				400

Arg Tyr Asp Met His Gly Thr Ile Lys Glu Ile Pro Leu His Gln Val		
	405	410 415
Ser Leu Tyr Thr Ser Arg Pro Cys His Ile Val Asp Gly His Gly Tyr		
	420	425 430
Phe Leu Leu Ala Arg Cys Pro Ala Gly Asp Ser Ile Thr Met Glu Phe		
	435	440 445
Lys Lys Asp Ser Val Arg His Ser Cys Ser Val Pro Tyr Glu Val Lys		
	450	455 460
Phe Asn Pro Val Gly Arg Glu Leu Tyr Thr His Pro Pro Glu His Gly		
465	470	475 480
Val Glu Gln Ala Cys Gln Val Tyr Ala His Asp Ala Gln Asn Arg Gly		
	485	490 495
Ala Tyr Val Glu Met His Leu Pro Gly Ser Glu Val Asp Ser Ser Leu		
	500	505 510
Val Ser Leu Ser Gly Ser Ser Val Thr Val Thr Pro Pro Asp Gly Thr		
	515	520 525
Ser Ala Leu Val Glu Cys Glu Cys Gly Gly Thr Lys Ile Ser Glu Thr		
	530	535 540
Ile Asn Lys Thr Lys Gln Phe Ser Gln Cys Thr Lys Lys Glu Gln Cys		
545	550	555 560
Arg Ala Tyr Arg Leu Gln Asn Asp Lys Trp Val Tyr Asn Ser Asp Lys		
	565	570 575
Leu Pro Lys Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Gly Lys Leu His Val Pro		
	580	585 590
Phe Leu Leu Ala Asp Gly Lys Cys Thr Val Pro Leu Ala Pro Glu Pro		
	595	600 605
Met Ile Thr Phe Gly Phe Arg Ser Val Ser Leu Lys Leu His Pro Lys		
	610	615 620
Asn Pro Thr Tyr Leu Ile Thr Arg Gln Leu Ala Asp Glu Pro His Tyr		
625	630	635 640
Thr His Glu Leu Ile Ser Glu Pro Ala Val Arg Asn Phe Thr Val Thr		
	645	650 655
Glu Lys Gly Trp Glu Phe Val Trp Gly Asn His Pro Pro Lys Arg Phe		
	660	665 670
Trp Ala Gln Glu Thr Ala Pro Gly Asn Pro His Gly Leu Pro His Glu		
	675	680 685
Val Ile Thr His Tyr Tyr His Arg Tyr Pro Met Ser Thr Ile Leu Gly		
	690	695 700
Leu Ser Ile Cys Ala Ala Ile Ala Thr Val Ser Val Ala Ala Ser Thr		

705	710	715	720
Trp Leu Phe Cys Arg Ser Arg Val Ala Cys Leu Thr Pro Tyr Arg Leu			
	725	730	735
Thr Pro Asn Ala Arg Ile Pro Phe Cys Leu Ala Val Leu Cys Cys Ala			
	740	745	750
Arg Thr Ala Arg Ala Glu Thr Thr Trp Glu Ser Leu Asp His Leu Trp			
	755	760	765
Asn Asn Asn Gln Gln Met Phe Trp Ile Gln Leu Leu Ile Pro Leu Ala			
	770	775	780
Ala Leu Ile Val Val Thr Arg Leu Leu Arg Cys Val Cys Cys Val Val			
785	790	795	800
Pro Phe Leu Val Met Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Tyr Glu His			
	805	810	815
Ala Thr Thr Met Pro Ser Gln Ala Gly Ile Ser Tyr Asn Thr Ile Val			
	820	825	830
Asn Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Pro Ile Ser Ile Thr Pro Thr Lys			
	835	840	845
Ile Lys Leu Ile Pro Thr Val Asn Leu Glu Tyr Val Thr Cys His Tyr			
	850	855	860
Lys Thr Gly Met Asp Ser Pro Ala Ile Lys Cys Cys Gly Ser Gln Glu			
865	870	875	880
Cys Thr Pro Thr Tyr Arg Pro Asp Glu Gln Cys Lys Val Phe Thr Gly			
	885	890	895
Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp Thr Glu			
	900	905	910
Asn Thr Gln Val Ser Lys Ala Tyr Val Met Lys Ser Asp Asp Cys Leu			
	915	920	925
Ala Asp His Ala Glu Ala Tyr Lys Ala His Thr Ala Ser Val Gln Ala			
	930	935	940
Phe Leu Asn Ile Thr Val Gly Glu His Ser Ile Val Thr Thr Val Tyr			
945	950	955	960
Val Asn Gly Glu Thr Pro Val Asn Phe Asn Gly Val Lys Ile Thr Ala			
	965	970	975
Gly Pro Leu Ser Thr Ala Trp Thr Pro Phe Asp Arg Lys Ile Val Gln			
	980	985	990
Tyr Ala Gly Glu Ile Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala Gly			
	995	1000	1005
Gln Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Val Ser Ser			
1010	1015	1020	

Ser Asp	Leu Tyr Ala Asn Thr	Asn Leu Val Leu Gln	Arg Pro Lys
1025	1030	1035	
Ala Gly	Ala Ile His Val Pro	Tyr Thr Gln Ala Pro	Ser Gly Phe
1040	1045	1050	
Glu Gln	Trp Lys Lys Asp Lys	Ala Pro Ser Leu Lys	Phe Thr Ala
1055	1060	1065	
Pro Phe	Gly Cys Glu Ile Tyr	Thr Asn Pro Ile Arg	Ala Glu Asn
1070	1075	1080	
Cys Ala	Val Gly Ser Ile Pro	Leu Ala Phe Asp Ile	Pro Asp Ala
1085	1090	1095	
Leu Phe	Thr Arg Val Ser Glu	Thr Pro Thr Leu Ser	Ala Ala Glu
1100	1105	1110	
Cys Thr	Leu Asn Glu Cys Val	Tyr Ser Ser Asp Phe	Gly Gly Ile
1115	1120	1125	
Ala Thr	Val Lys Tyr Ser Ala	Ser Lys Ser Gly Lys	Cys Ala Val
1130	1135	1140	
His Val	Pro Ser Gly Thr Ala	Thr Leu Lys Glu Ala	Ala Val Glu
1145	1150	1155	
Leu Thr	Glu Gln Gly Ser Ala	Thr Ile His Phe Ser	Thr Ala Asn
1160	1165	1170	
Ile His	Pro Glu Phe Arg Leu	Gln Ile Cys Thr Ser	Tyr Val Thr
1175	1180	1185	
Cys Lys	Gly Asp Cys His Pro	Pro Lys Asp His Ile	Val Thr His
1190	1195	1200	
Pro Gln	Tyr His Ala Gln Thr	Phe Thr Ala Ala Val	Ser Lys Thr
1205	1210	1215	
Ala Trp	Thr Trp Leu Thr Ser	Leu Leu Gly Gly Ser	Ala Val Ile
1220	1225	1230	
Ile Ile	Ile Gly Leu Val Leu	Ala Thr Ile Val Ala	Met Tyr Val
1235	1240	1245	
Leu Thr	Asn Gln Lys His Asn		
1250	1255		
<210>	4		
<211>	61		
<212>	PRT		
<213>	基孔肯雅病毒		
<400>	4		
Ala Thr Tyr Gln Glu Ala Ala Ile Tyr Leu Trp Asn Glu Gln Gln Pro			
1	5	10	15

Leu Phe Trp Leu Gln Ala Leu Ile Pro Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu
 20 25 30

Cys Asn Cys Leu Arg Leu Leu Pro Cys Cys Cys Lys Thr Leu Ala Phe
 35 40 45

Leu Ala Val Met Ser Val Gly Ala His Thr Val Ser Ala
 50 55 60

<210> 5

<211> 61

<212> PRT

<213> 基孔肯雅病毒

<400> 5

Ala Thr Tyr Tyr Glu Ala Ala Ala Tyr Leu Trp Asn Glu Gln Gln Pro
 1 5 10 15

Leu Phe Trp Leu Gln Ala Leu Ile Pro Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu
 20 25 30

Cys Asn Cys Leu Lys Leu Leu Pro Cys Cys Cys Lys Thr Leu Ala Phe
 35 40 45

Leu Ala Val Met Ser Ile Gly Ala His Thr Val Ser Ala
 50 55 60

<210> 6

<211> 56

<212> PRT

<213> 委内瑞拉马脑炎病毒

<400> 6

Glu Thr Thr Trp Glu Ser Leu Asp His Leu Trp Asn Asn Asn Gln Gln
 1 5 10 15

Met Phe Trp Ile Gln Leu Leu Ile Pro Leu Ala Ala Leu Ile Val Val
 20 25 30

Thr Arg Leu Leu Arg Cys Val Cys Cys Val Val Pro Phe Leu Val Met
 35 40 45

Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala
 50 55

<210> 7

<211> 135

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Met Ala Cys Gly Leu Val Ala Ser Asn Leu Asn Leu Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Cys	Leu	Arg	Val	Arg	Gly	Glu	Val	Ala	Pro	Asp	Ala	Lys	Ser	Phe	Val	
20				25				30								
Leu	Asn	Leu	Gly	Lys	Asp	Ser	Asn	Asn	Leu	Cys	Leu	His	Phe	Asn	Pro	
35				40				45								
Arg	Phe	Asn	Ala	His	Gly	Asp	Ala	Asn	Thr	Ile	Val	Cys	Asn	Ser	Lys	
50				55				60								
Asp	Gly	Gly	Ala	Trp	Gly	Thr	Glu	Gln	Arg	Glu	Ala	Val	Phe	Pro	Phe	
65				70				75				80				
Gln	Pro	Gly	Ser	Val	Ala	Glu	Val	Cys	Ile	Thr	Phe	Asp	Gln	Ala	Asn	
85				90				95								
Leu	Thr	Val	Lys	Leu	Pro	Asp	Gly	Tyr	Glu	Phe	Lys	Phe	Pro	Asn	Arg	
100				105				110								
Leu	Asn	Leu	Glu	Ala	Ile	Asn	Tyr	Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Asp	Phe	Lys	
115				120				125								
Ile	Lys	Cys	Val	Ala	Phe	Asp										
130				135												
<210> 8																
<211> 250																
<212> PRT																
<213> 智人																
<400> 8																
Met	Ala	Asp	Asn	Phe	Ser	Leu	His	Asp	Ala	Leu	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn	
1				5				10				15				
Pro	Asn	Pro	Gln	Gly	Trp	Pro	Gly	Ala	Trp	Gly	Asn	Gln	Pro	Ala	Gly	
20				25				30								
Ala	Gly	Gly	Tyr	Pro	Gly	Ala	Ser	Tyr	Pro	Gly	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gln	
35				40				45								
Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Tyr	Pro	
50				55				60								
Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Tyr	Pro	Gly	Ala	Pro	Ala	Pro	Gly	Val	Tyr	Pro	
65				70				75				80				
Gly	Pro	Pro	Ser	Gly	Pro	Gly	Ala	Tyr	Pro	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Ser	
85				90				95								
Ala	Thr	Gly	Ala	Tyr	Pro	Ala	Thr	Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly	
100				105				110								
Pro	Leu	Ile	Val	Pro	Tyr	Asn	Leu	Pro	Leu	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Pro	
115				120				125								
Arg	Met	Leu	Ile	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	Val	Lys	Pro	Asn	Ala	Asn	Arg	
130				135				140								

Ile Ala Leu Asp Phe Gln Arg Gly Asn Asp Val Ala Phe His Phe Asn
 145 150 155 160
 Pro Arg Phe Asn Glu Asn Asn Arg Arg Val Ile Val Cys Asn Thr Lys
 165 170 175
 Leu Asp Asn Asn Trp Gly Arg Glu Glu Arg Gln Ser Val Phe Pro Phe
 180 185 190
 Glu Ser Gly Lys Pro Phe Lys Ile Gln Val Leu Val Glu Pro Asp His
 195 200 205
 Phe Lys Val Ala Val Asn Asp Ala His Leu Leu Gln Tyr Asn His Arg
 210 215 220
 Val Lys Lys Leu Asn Glu Ile Ser Lys Leu Gly Ile Ser Gly Asp Ile
 225 230 235 240
 Asp Leu Thr Ser Ala Ser Tyr Thr Met Ile
 245 250

<210> 9

<211> 55

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Ser Phe Val Leu Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn Leu Ser Leu His
 1 5 10 15
 Phe Asn Pro Arg Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Ser
 20 25 30
 Asn Ser Lys Asp Gly Gly Ala Trp Gly Thr Glu Gln Arg Glu Ala Val
 35 40 45
 Phe Pro Phe Gln Pro Gly Ser
 50 55

<210> 10

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

Ala Asn Leu Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe Pro
 1 5 10 15
 Asn Arg Leu Asn Leu Glu Ala
 20

<210> 11

<211> 55

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 11

Ser Phe Val Leu Asn Leu Gly Lys Asp Ser Asn Asn Leu Ser Leu His

1 5 10 15

Phe Asn Pro Arg Phe Asn Ala His Gly Asp Ala Asn Thr Ile Val Ser

20 25 30

Asn Thr Lys Glu Asp Gly Thr Trp Gly Thr Glu His Arg Glu Pro Ala

35 40 45

Phe Pro Phe Gln Pro Gly Ser

50 55

<210> 12

<211> 23

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 12

Ala Asp Leu Thr Ile Lys Leu Pro Asp Gly His Glu Phe Lys Phe Pro

1 5 10 15

Asn Arg Leu Asn Met Glu Ala

20

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Ala Asp Asn Phe Ser Leu His Asp Ala Leu Ser Gly Ser Gly Asn Pro

1 5 10 15

Asn Pro Gln Gly Trp Pro Gly Ala Trp Gly Asn Gln Pro Ala

20 25 30

<210> 14

<211> 34

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Tyr Pro Gly Ala Ser Tyr Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Ala Pro

20 25 30

Gly Ala

<210> 15

<211> 74

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Tyr Pro Gly Ala Ser Tyr Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro

1 5 10 15

Gly Ala Tyr Pro Gly Gln Ala Pro Pro Gly Ala Tyr Pro Gly Ala Pro

20 25 30

Gly Ala Tyr Pro Gly Ala Pro Ala Pro Gly Val Tyr Pro Gly Pro Pro

35 40 45

Ser Gly Pro Gly Ala Tyr Pro Ser Ser Gly Gln Pro Ser Ala Thr Gly

50 55 60

Ala Tyr Pro Ala Thr Gly Pro Tyr Gly Ala

65 70

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 16

Ala Asp Ser Phe Ser Leu Asn Asp Ala Leu Ala Gly Ser Gly Asn Pro

1 5 10 15

Asn Pro Gln Gly Tyr Pro Gly Ala Trp Gly Asn Gln Pro Ala

20 25 30

<210> 17

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Asn Asn Leu Ser Leu His Phe Asn Pro Arg Phe Asn Ala His Gly Asp

1 5 10 15

Ala Asn Thr Ile Val Ser Asn Ser Lys Asp Gly

20 25

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

Ala Asn Leu Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe Pro

1 5 10 15

Asn

<210> 19

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Gln Pro Gly Ser Val Ala Glu Val Ser Ile Thr Phe Asp Gln Ala Asn

1 5 10 15

Leu Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly

20

<210> 20

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Ala Asn Thr Ile Val Ser Asn Ser Lys Asp Gly Gly Ala Trp Gly Thr

1 5 10 15

Glu Gln Arg Glu Ala Val Phe

20

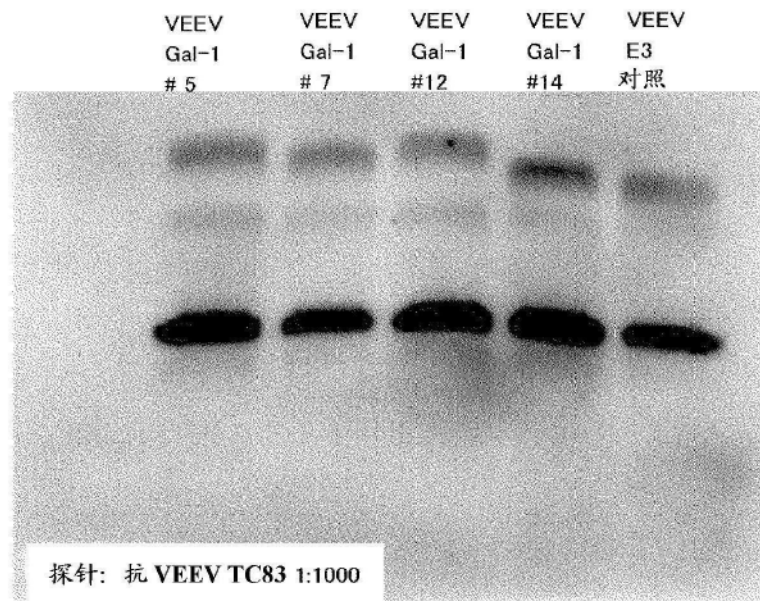


图1

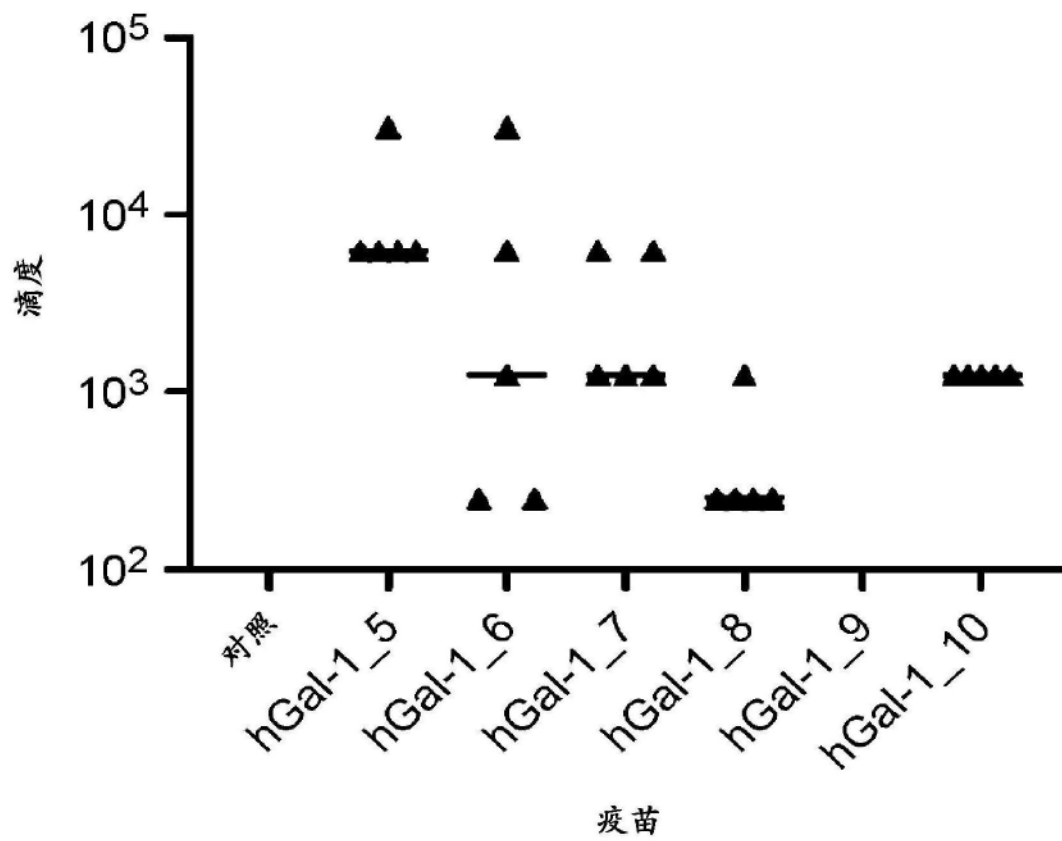


图2A

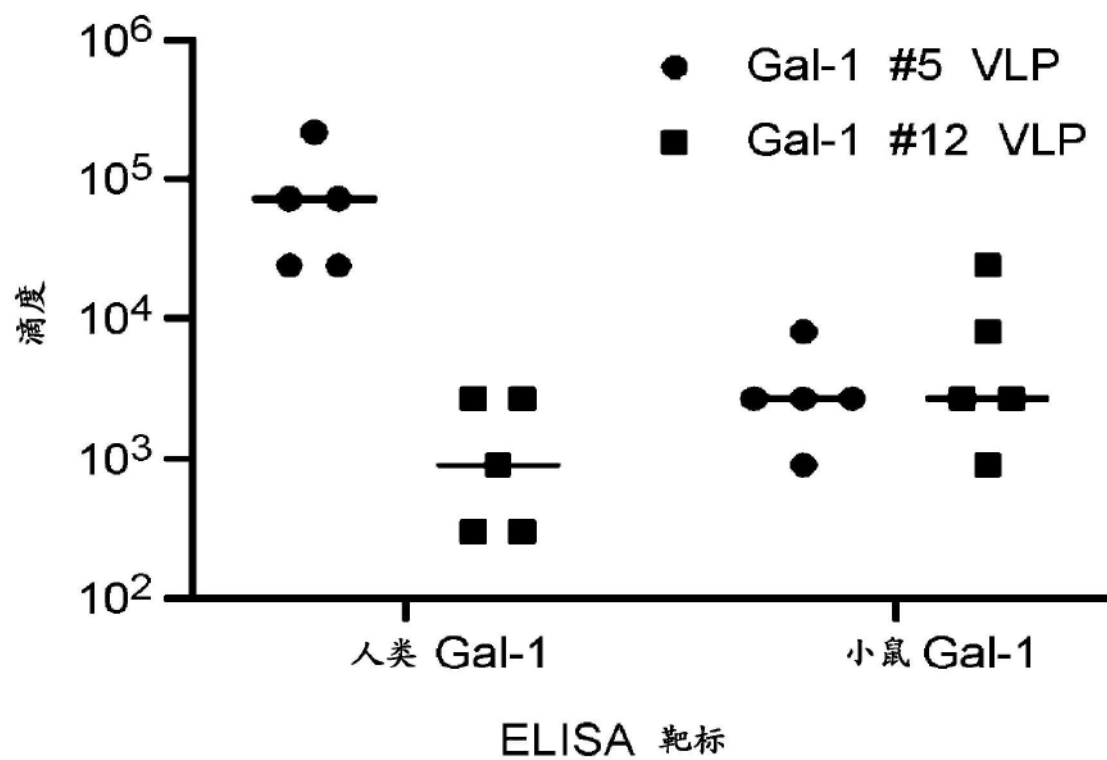


图2B

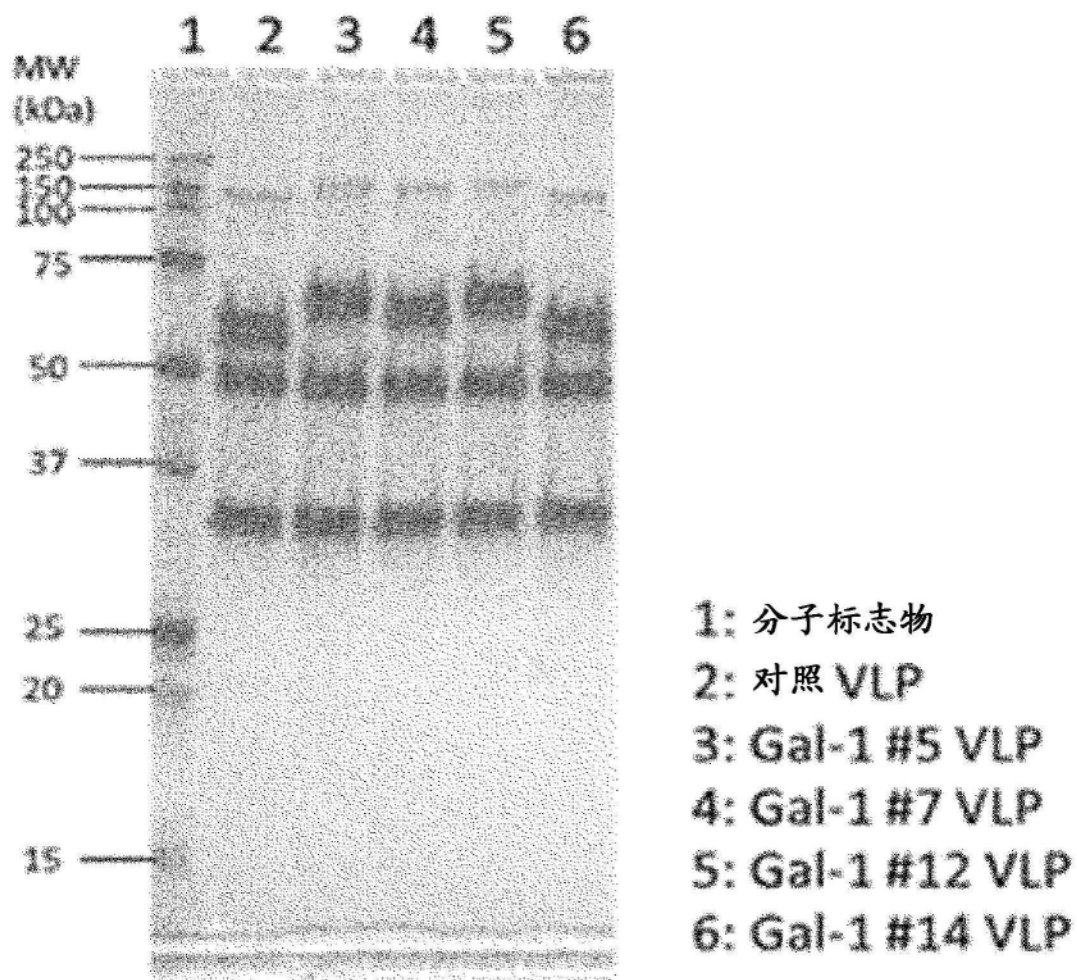


图3A

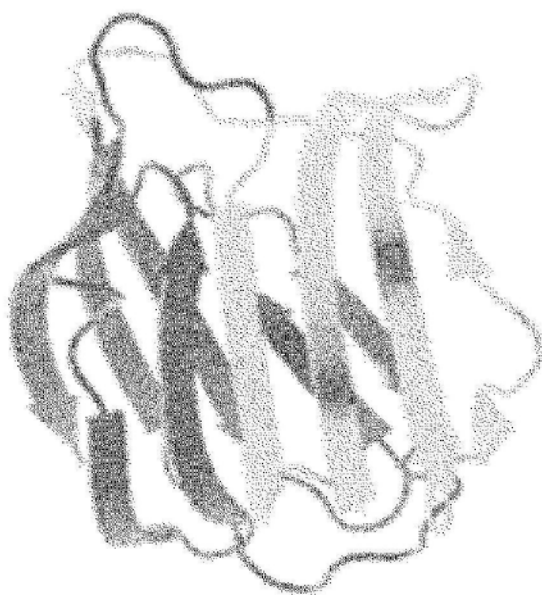


图3B



图3C

针对人类 Gal 1 的抗体

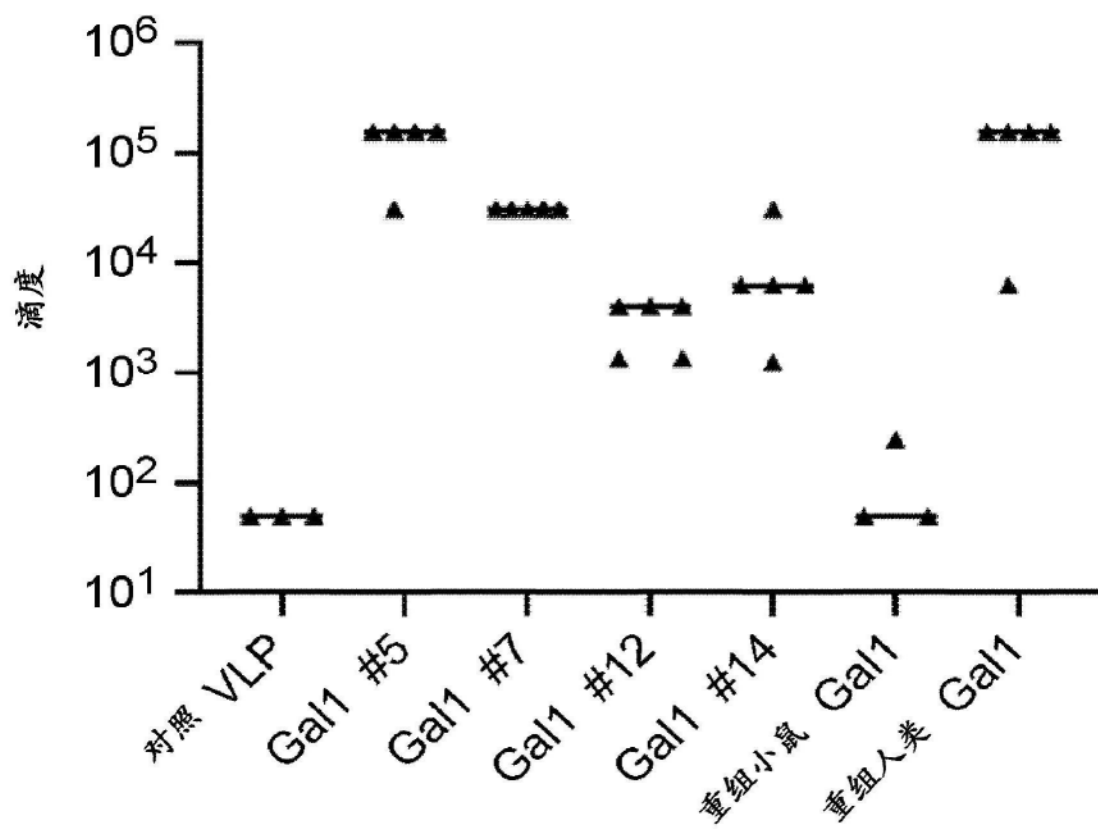


图3D

针对小鼠 Gal 1 的抗体

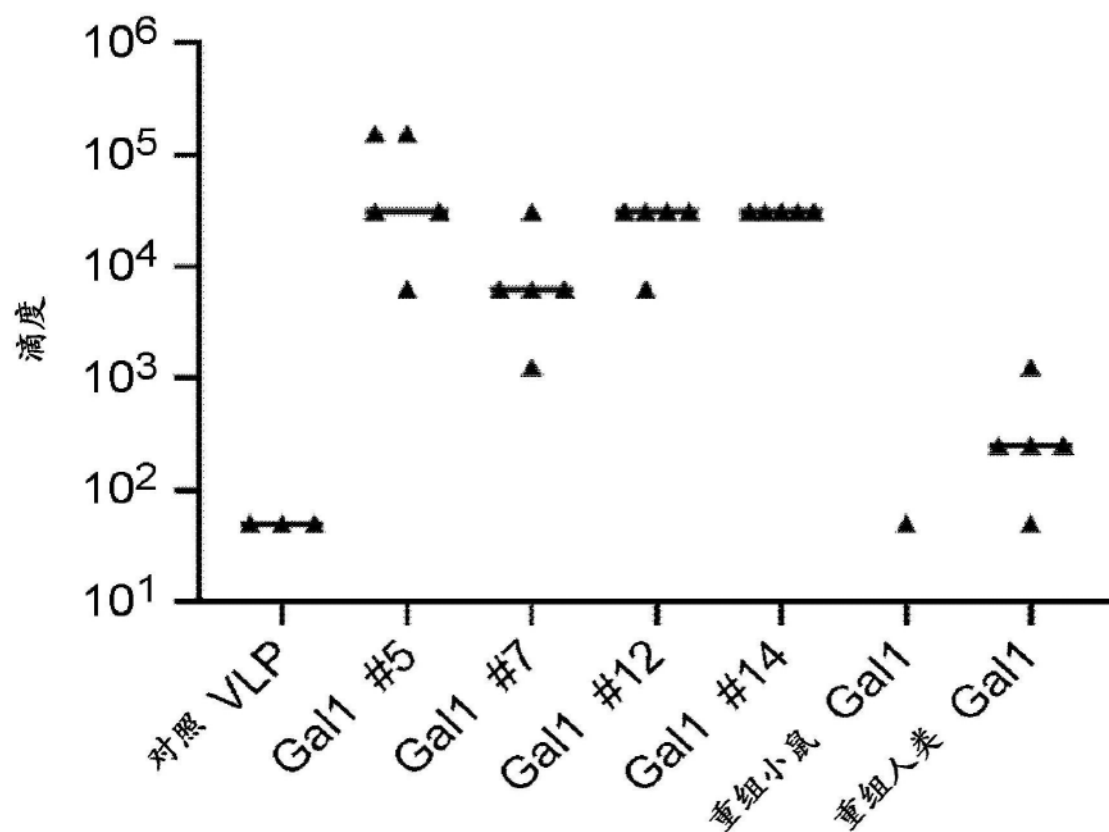


图3E

88.5% 同一性 (54/61)

Gal-1 #5 SGG SFVLNLGKDSNNLSLHFNPRFNAGDANIIVSNSKDGGAWGIEQREAVFPFQPGS GGSGal-1 #12 SGG SFVLNLGKDSNNLSLHFNPRFNAGDANTIVSNTKEDGTWGTIEHREPAPFPFQPGS GGS

86.2% 同一性 (25/29)

Gal-1 #7 SGG ANLIVK LPDGYEFKFP NRLNLEA GGSGal-1 #14 SGG ADLTIK LPDGHEFKFP NRLNMEA GGS

图3F

抗半乳凝素-1

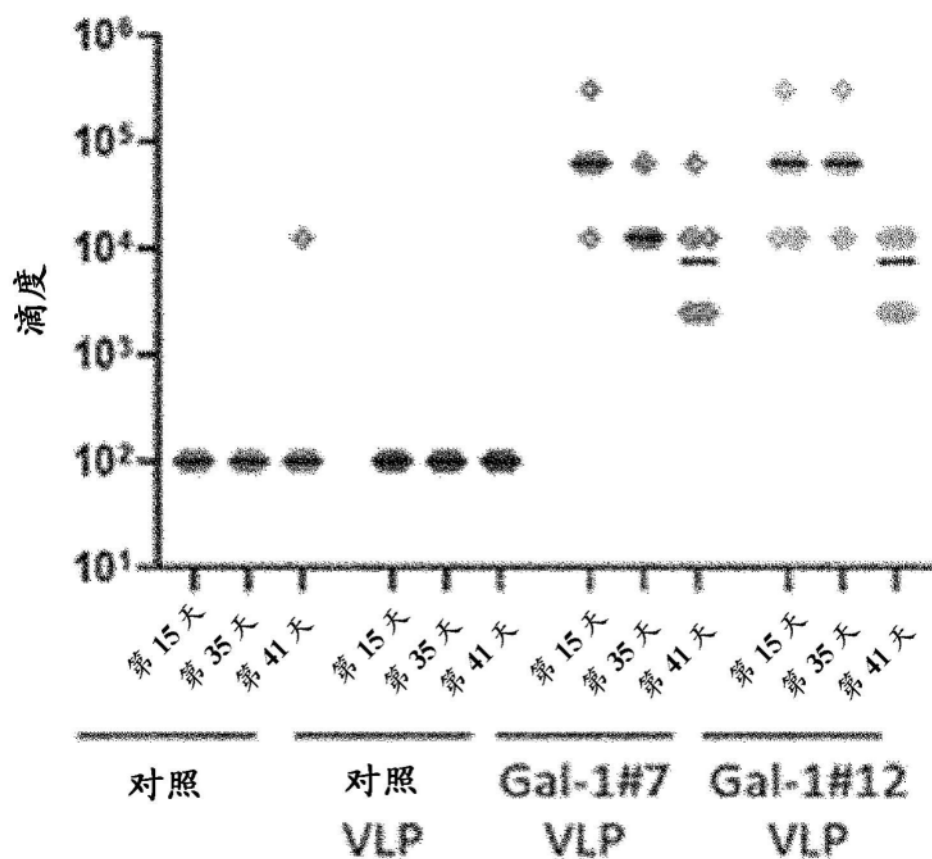


图4A

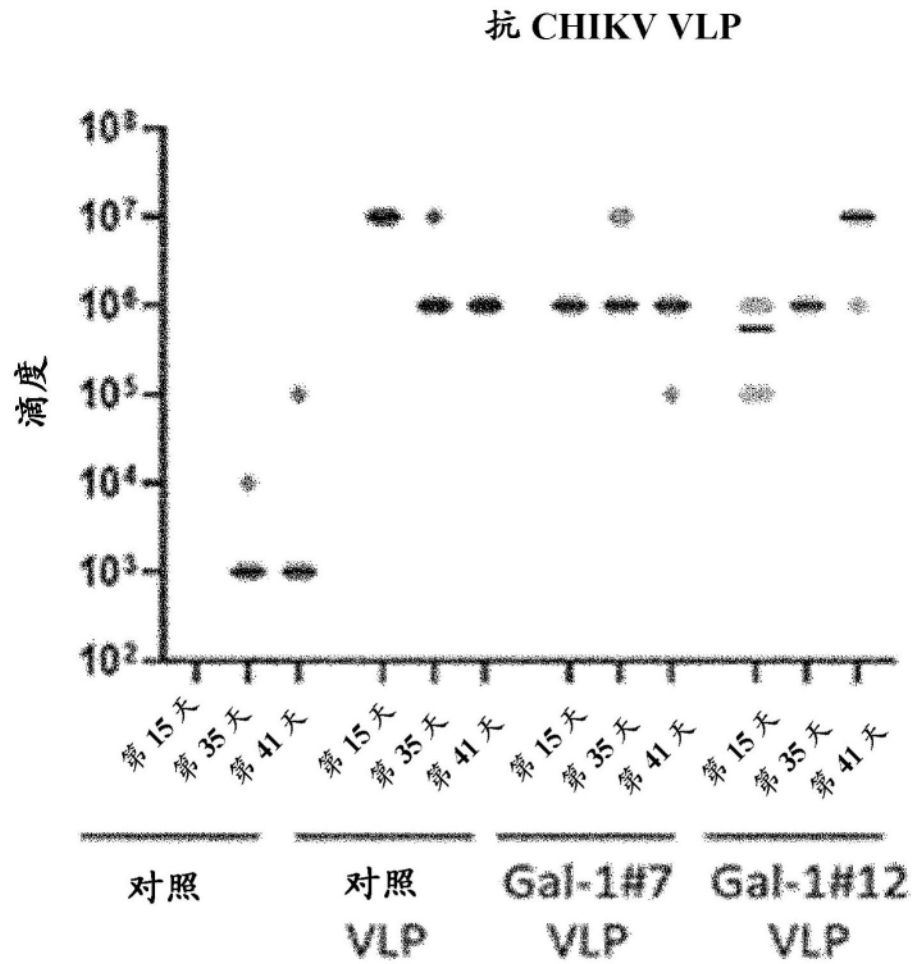


图4B

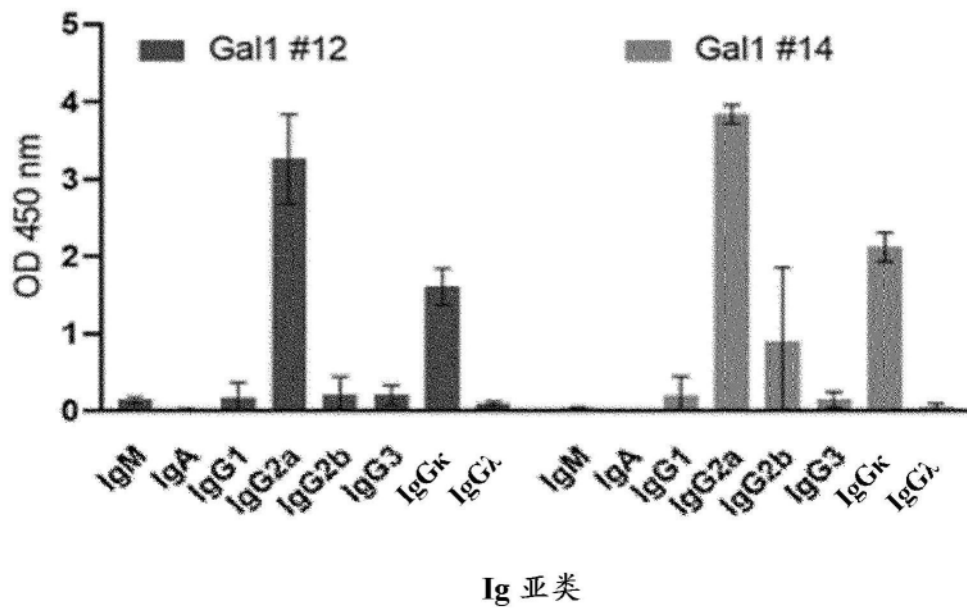


图4C

对照

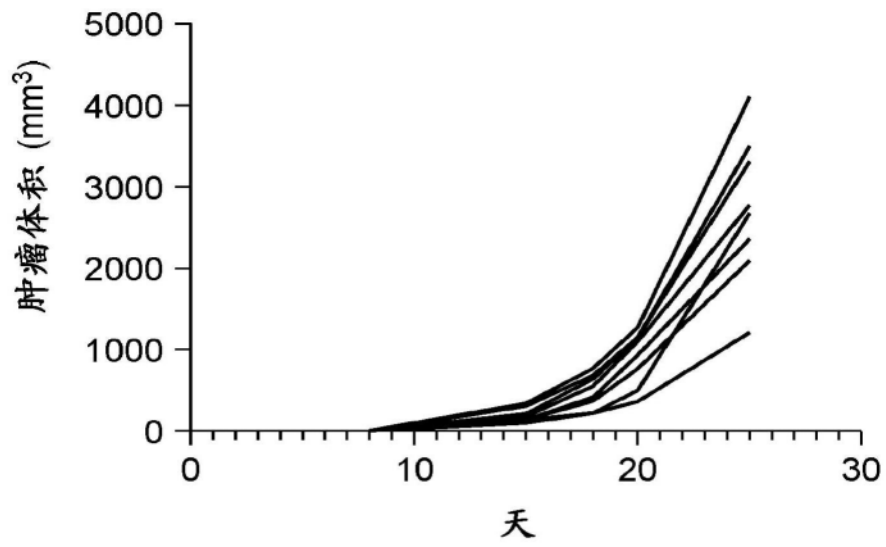


图5A

对照 VLP

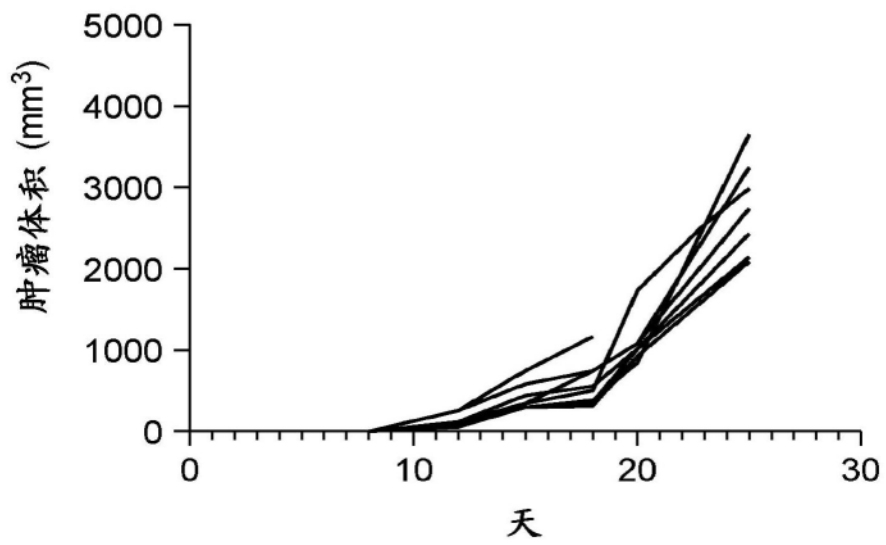


图5B

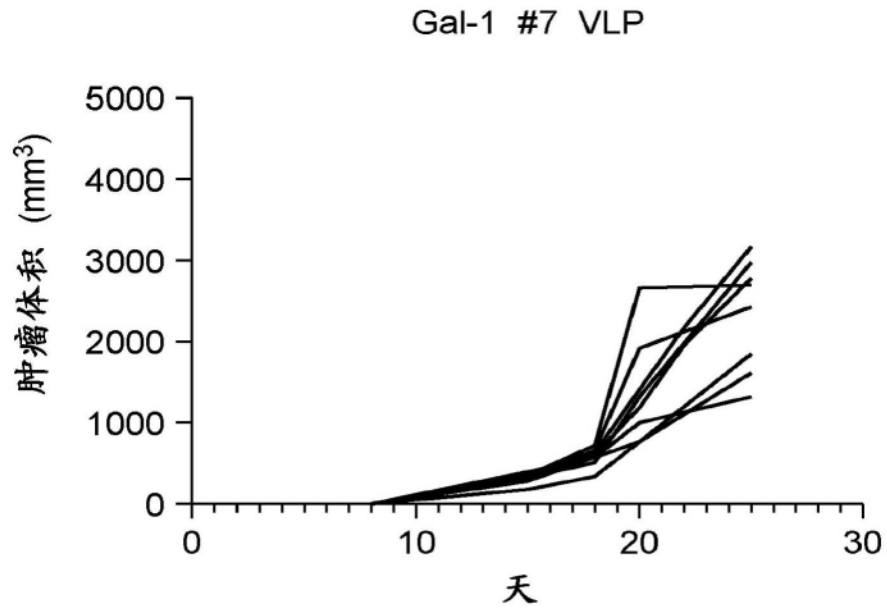


图5C

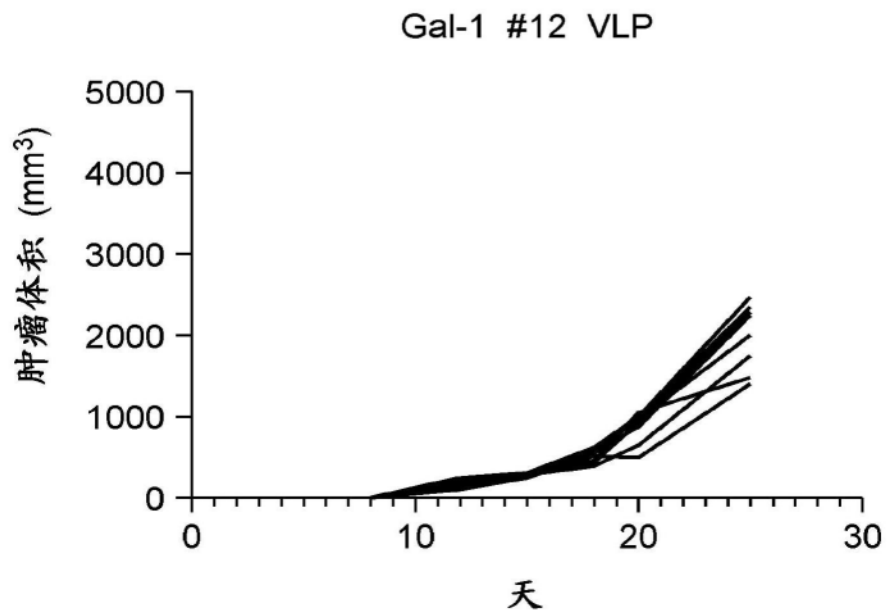


图5D

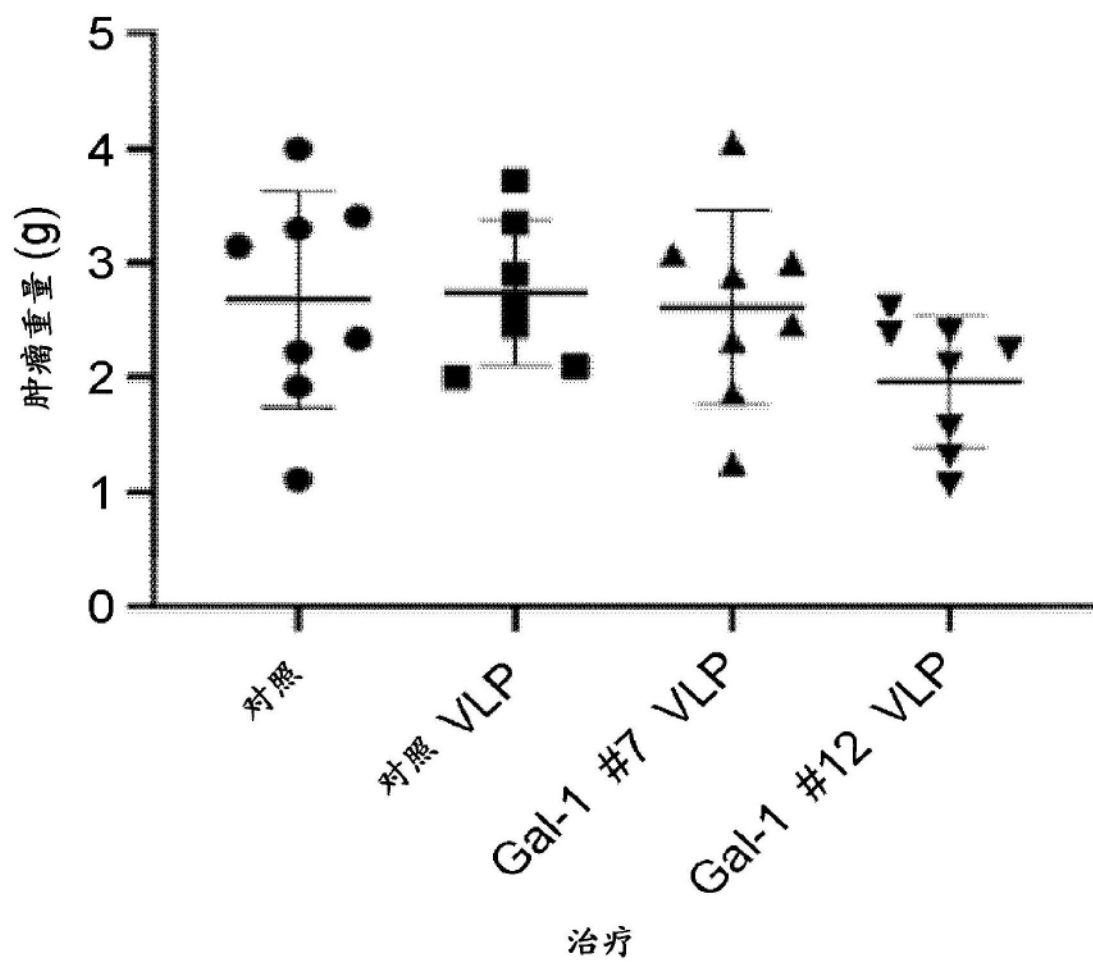


图5E

HPV + Meer 肿瘤生长曲线

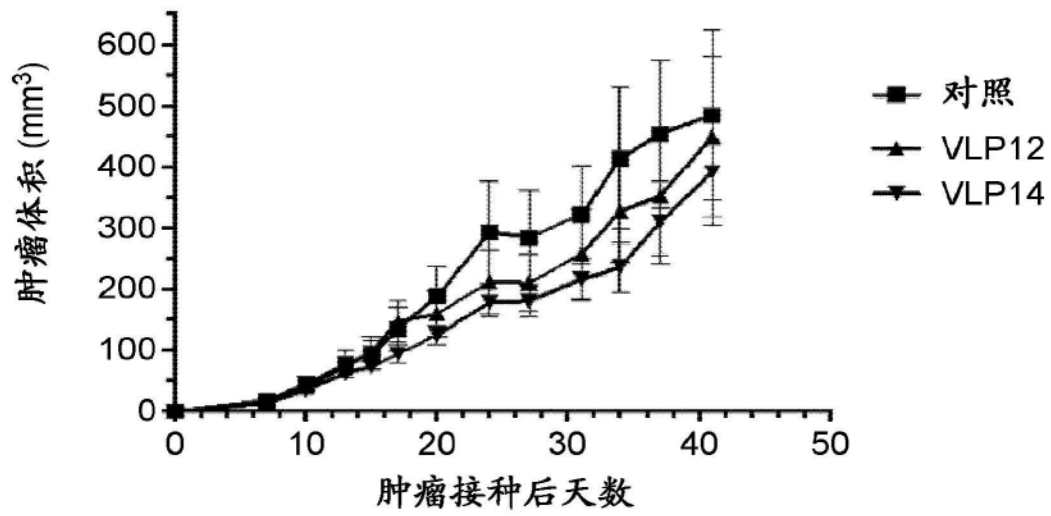


图6A

HPV + Meer 肿瘤终点重量

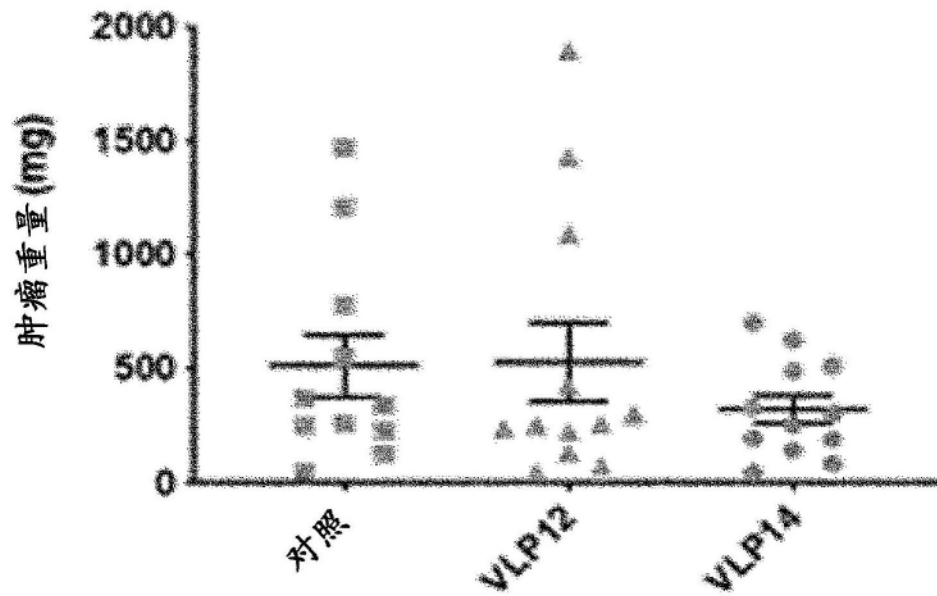


图6B

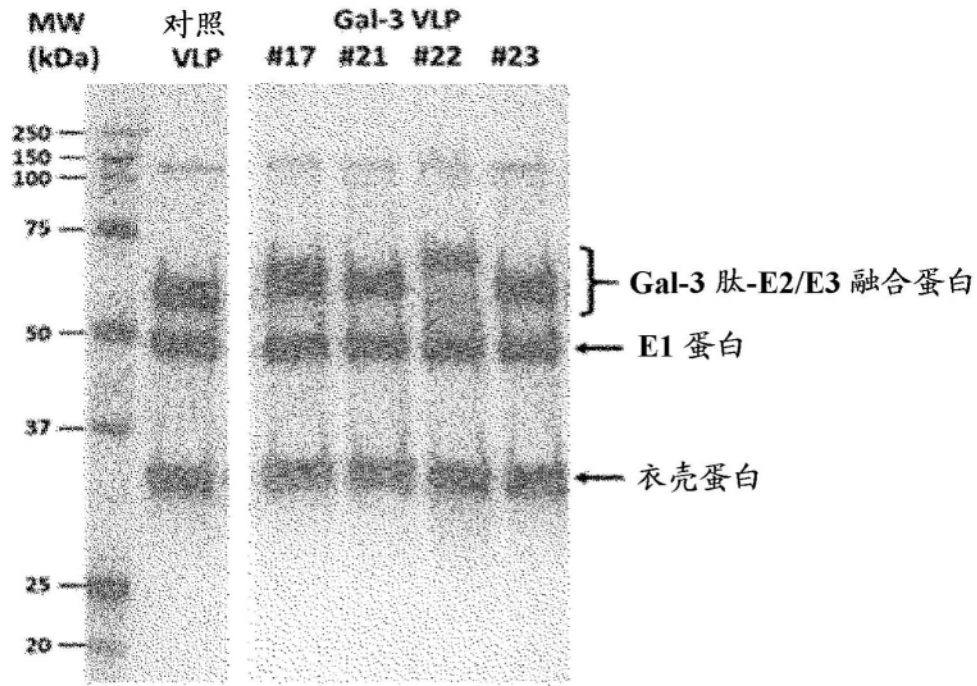


图7

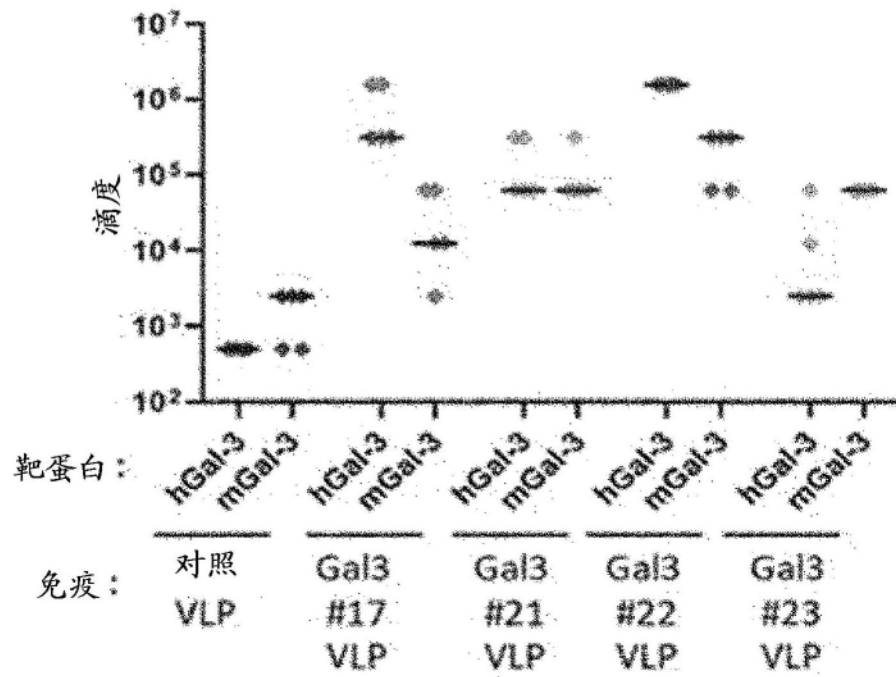


图8

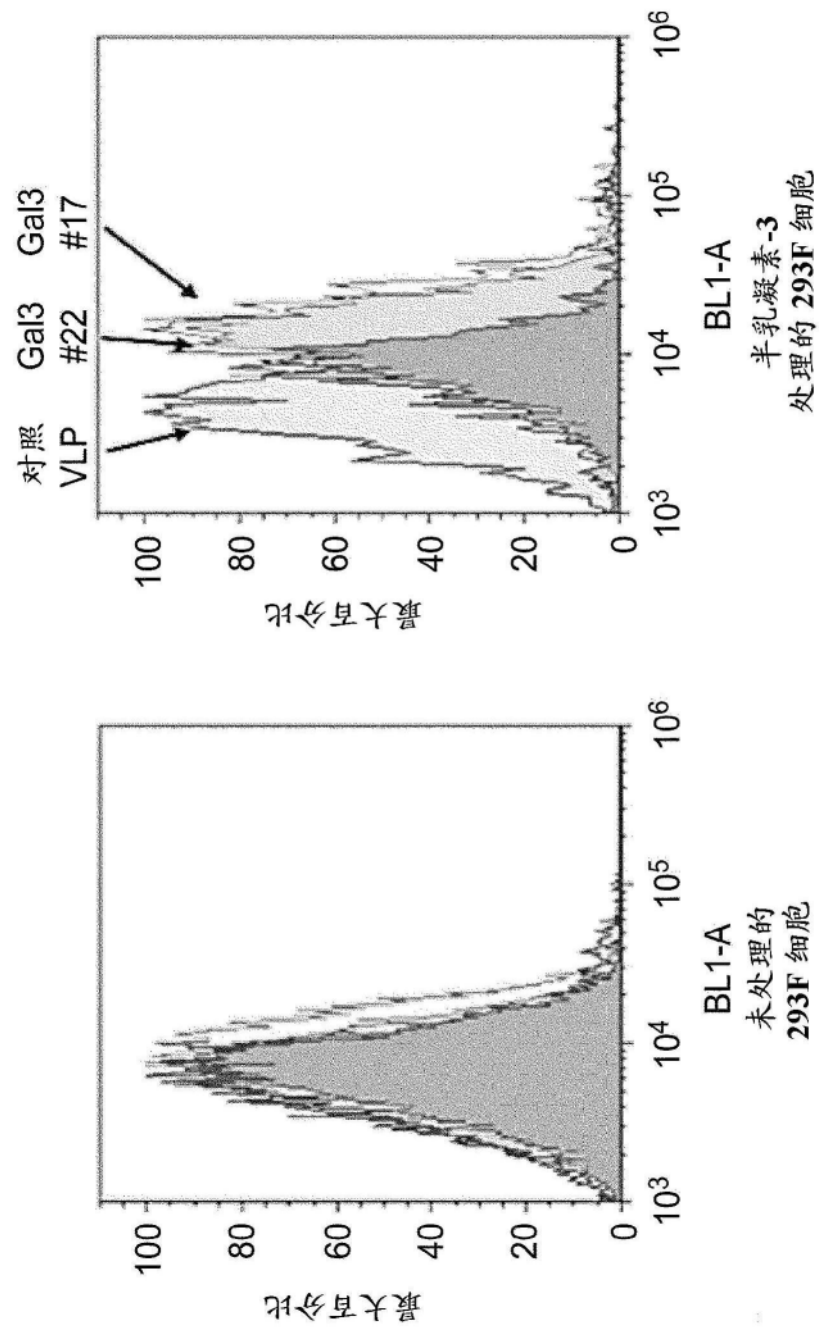


图9

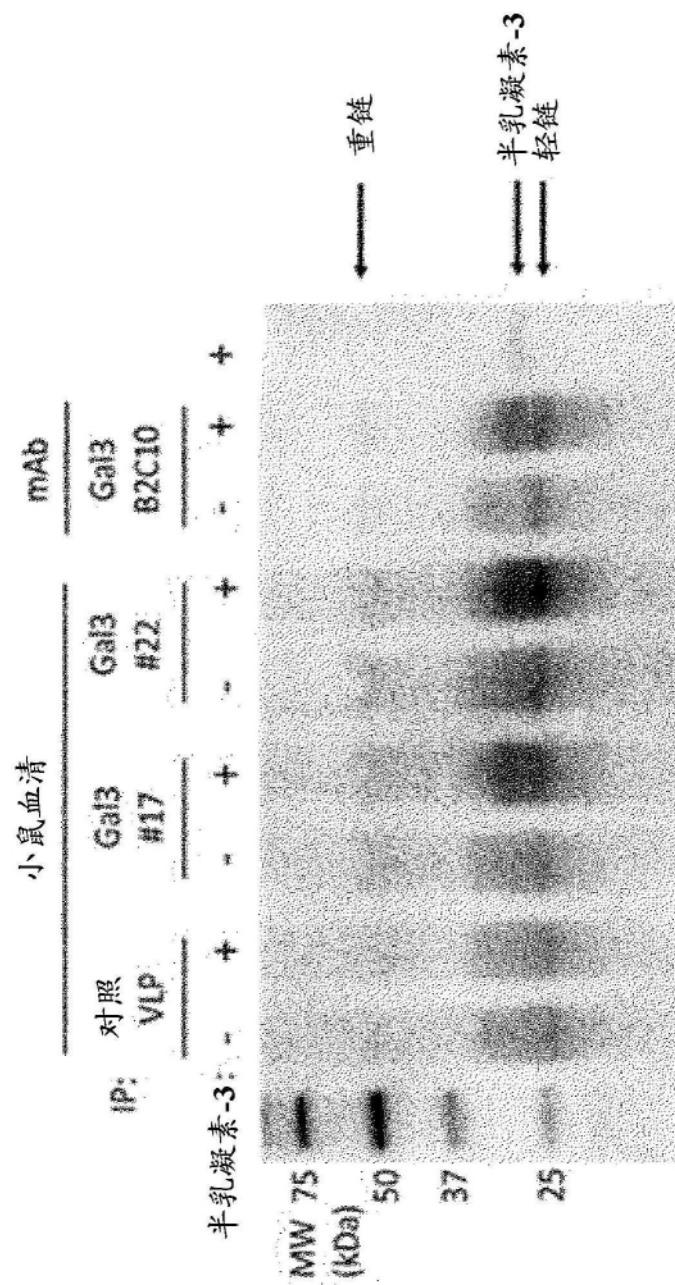


图10

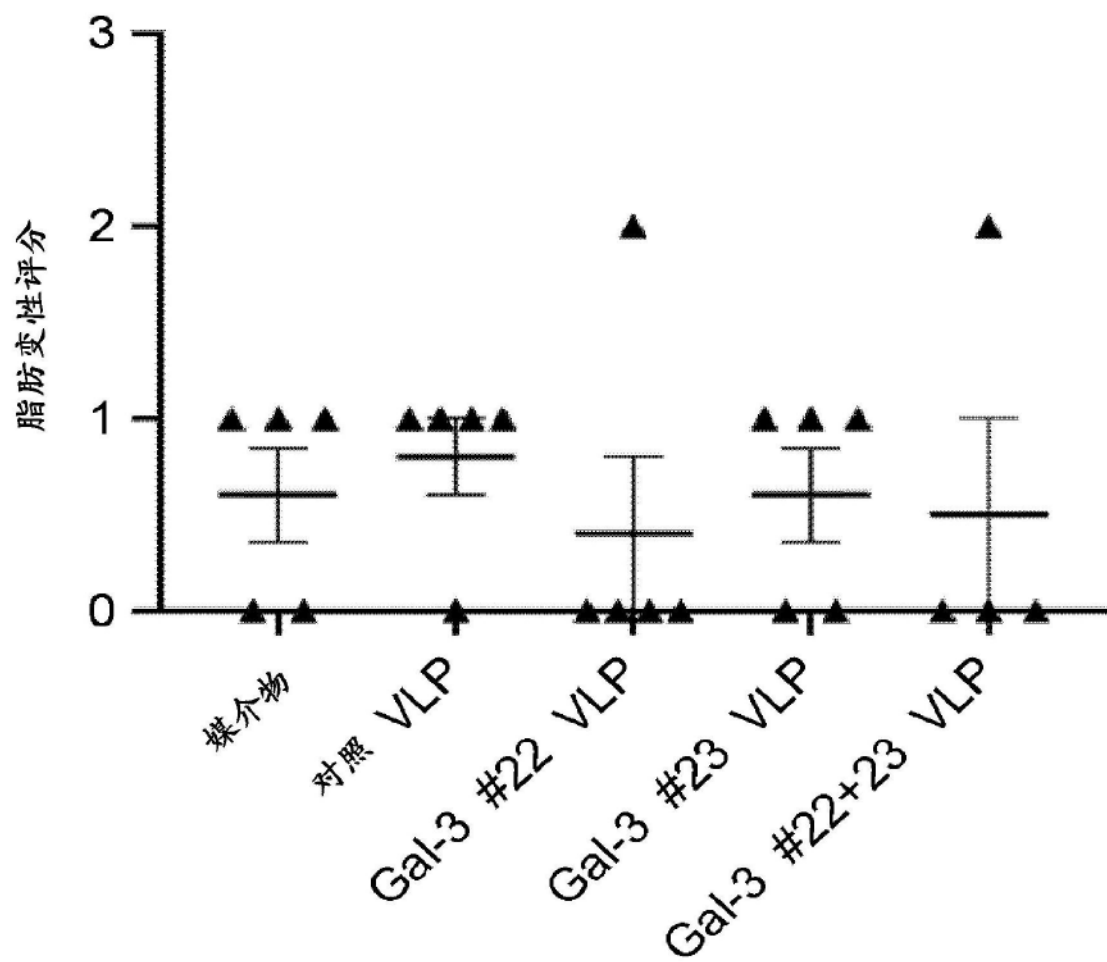


图11A

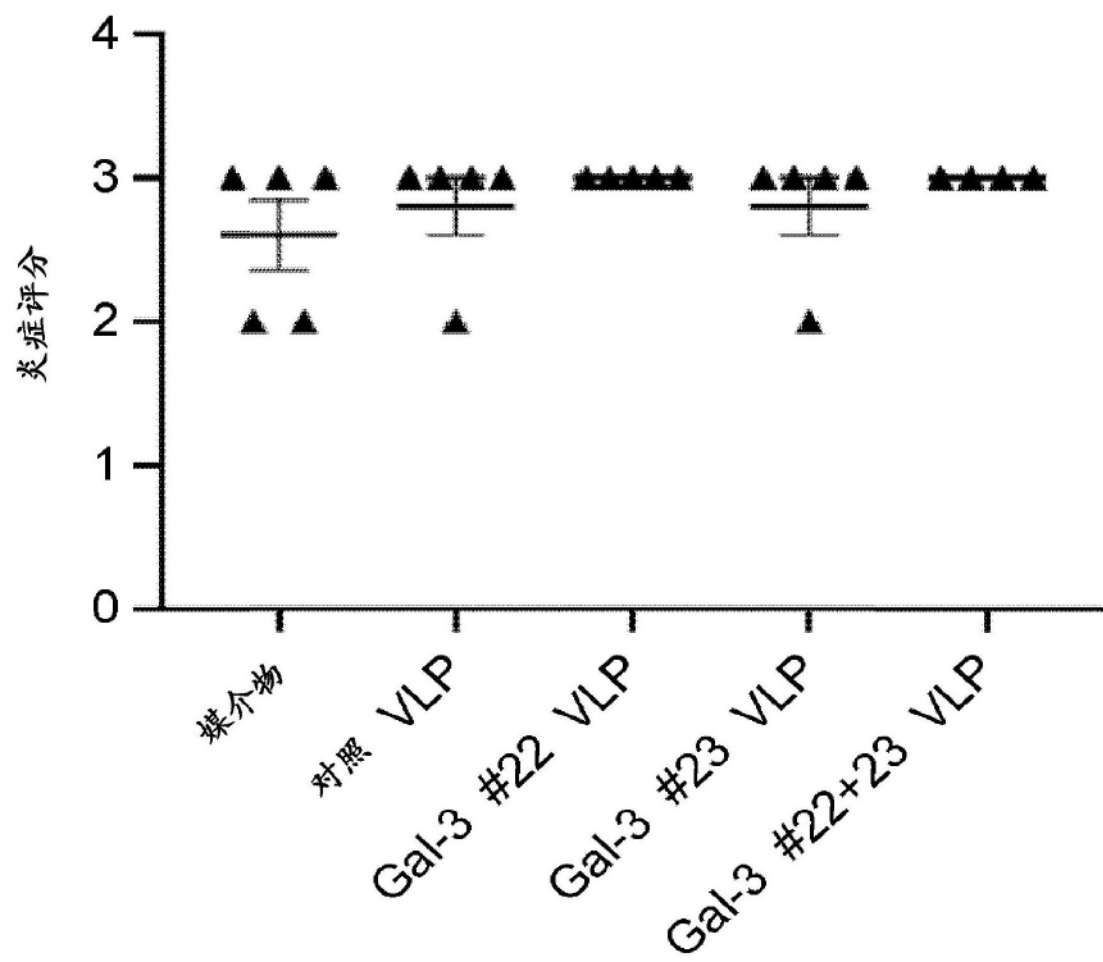


图11B

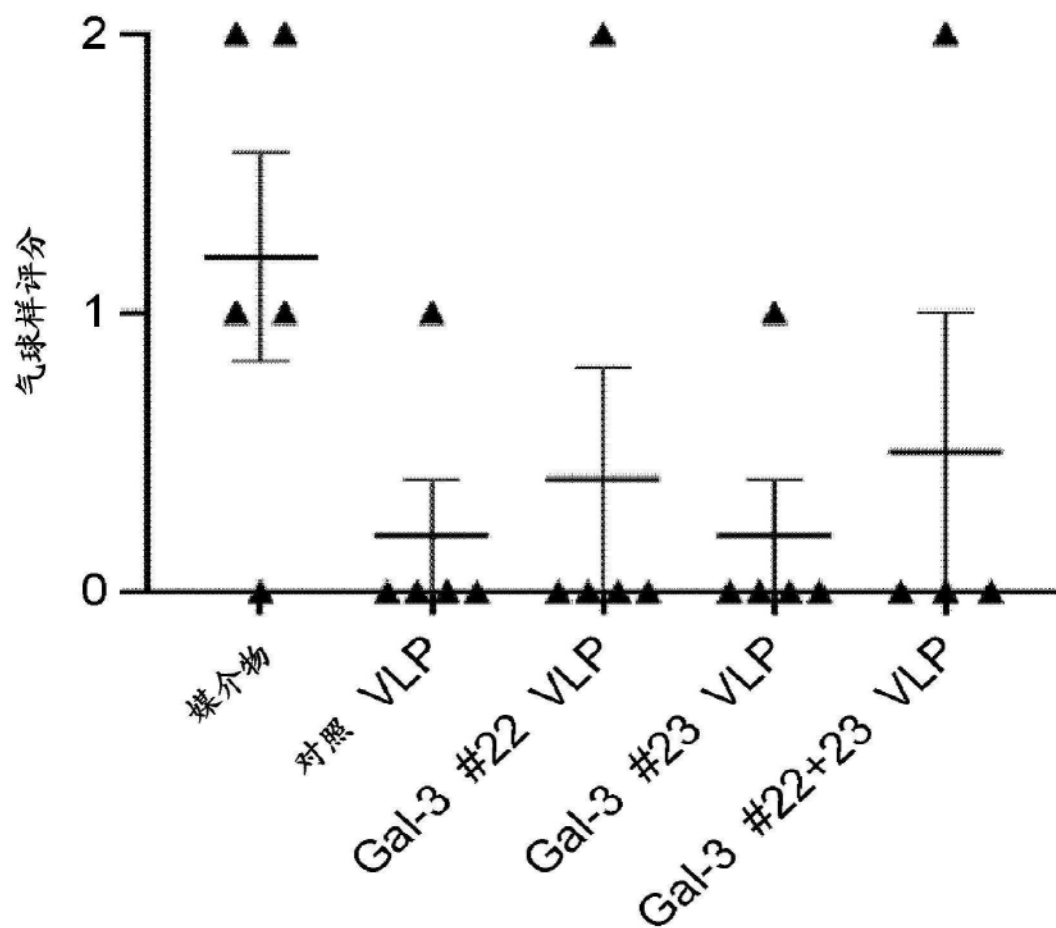


图11C

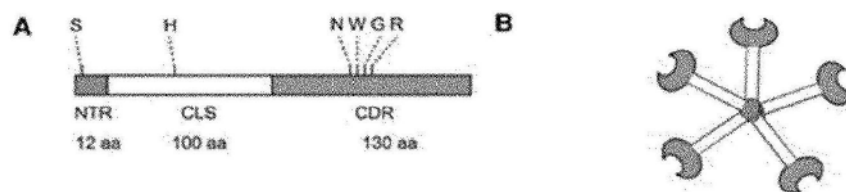


图12