



(10) 授权公告号 CN 108348596 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 23

(21) 申请号 201680050161.9
(22) 申请日 2016.07.01
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108348596 A
(43) 申请公布日 2018.07.31
(30) 优先权数据
62/188,084 2015.07.02 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.02.28
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/040838 2016.07.01
(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/004586 EN 2017.01.05
(73) 专利权人 梅迪根股份有限公司
地址 美国马里兰州
(72) 发明人 彼得·普什科
伊丽娜·特蕾娅科娃
(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003
专利代理师 吴小瑛
(51) Int.Cl.
A61K 39/145 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
(56) 对比文件
CN 101801412 A, 2010.08.11
CN 102676461 A, 2012.09.19

CN 102917731 A, 2013.02.06
Joel R. Haynes等.Influenza-
pseudotyped Gag virus-like particle
vaccines provide broad protection against
highly pathogenic avian influenza
challenge.《Vaccine》.2008,
Huating Wang等.Analysis of Bovine
Leukemia Virus Gag Membrane Targeting and
Late Domain Function.《JOURNAL OF
VIROLOGY》.2002,
Huating Wang等.Analysis of Bovine
Leukemia Virus Gag Membrane Targeting and
Late Domain Function.《JOURNAL OF
VIROLOGY》.2002,
Peter Pushko等.Development of Virus-
Like Particle Technology from Small
Highly Symmetric to Large Complex Virus-
Like Particle Structures.《Intervirology》
.2013, (续)

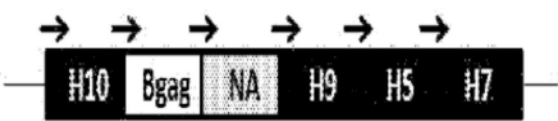
审查员 魏应亮

权利要求书2页 说明书34页
序列表5页 附图34页

(54) 发明名称
用牛免疫缺陷病毒Gag蛋白的重组病毒样颗粒

含新型Bgag VLPs的组成成分以及制造和使用新型Bgag VLPs的方法。

(57) 摘要
在此描述了包含一种或多种不同类型的目标病原体蛋白质的牛免疫缺陷病毒gag蛋白质 (“Bgag”) 重组病毒样颗粒 (“VLPs”)。还描述了包



[接上页]

(56) 对比文件

Jaina M. Patel等.Influenza virus-like particles engineered by protein transfer with tumor-associated antigens induces protective antitumor immunity.《Biotechnol Bioeng》.2015,

LYNN RASMUSSEN等.Characterization of Virus-like Particles Produced by a Recombinant Baculovirus Containing the gag Gene of the Bovine Immunodeficiency-like Virus.《VIROLOGY》.1990,

1. 一种牛免疫缺陷病毒gag蛋白质 (Bgag) 病毒样颗粒 (VLP), 所述Bgag VLP包含Bgag以及源自流感病毒的一种或多种不同目标病原体蛋白质, 其中所述一种或多种不同目标病原体蛋白质选自以下组成的组: H1-H18和NA1-11。

2. 如权利要求1所述的Bgag VLP, 其中所述一种或多种不同目标病原体蛋白质定位于VLP膜上。

3. 如权利要求1所述的Bgag VLP, 其中所述一种或多种目标病原体蛋白质包含选自以下组成的组的四种不同目标病原体蛋白质: H1-H18和NA1-11。

4. 如权利要求3所述的Bgag VLP, 其中所述一种或多种不同目标病原体蛋白质包含H5、H7、H9和H10。

5. 如权利要求1所述的Bgag VLP, 其中所述一种或多种不同目标病原体蛋白质是基因修饰的。

6. 一种牛免疫缺陷病毒gag蛋白质 (Bgag) 病毒样颗粒 (VLP), 所述Bgag VLP包含Bgag以及一种或多种不同目标病原体蛋白质, 其中所述一种或多种不同目标病原体蛋白质是基因修饰的EboMay TMCT。

7. 如权利要求1所述的Bgag VLP, 其中所述Bgag VLP能够保护或诱发受试者内对一种或多种不同病原体的免疫应答。

8. 一种包含如权利要求1-7中任一所述的Bgag VLP的疫苗。

9. 一种用于制备如权利要求1-7中任一所述的Bgag VLP的转移载体质粒, 所述转移载体质粒包含Bgag基因、一种或多种来自所述不同目标病原体蛋白质的基因以及一种或多种启动子。

10. 一种制备如权利要求1-7中任一项所述的Bgag VLP的方法, 包含步骤:

将Bgag基因和来自所述一种或多种不同目标病原体蛋白质的一种或多种基因各自在启动子的控制下串联克隆至转移载体质粒;

使用所述转移载体质粒制备载体病毒;

使用载体病毒感染真核细胞, 以产生Bgag VLP; 和

纯化所述Bgag VLP。

11. 如权利要求10所述的方法, 其中所述转移载体质粒为重组杆状病毒 (rBV) 转移载体质粒。

12. 如权利要求10所述的方法, 其中所述启动子为多角体蛋白启动子。

13. 如权利要求10所述的方法, 其中所述载体病毒为rBV。

14. 如权利要求10-13中任一所述的方法, 其中所述真核细胞为Sf9。

15. 一种如权利要求8所述的疫苗在制备预防或抑制目标病原体在动物体内产生疾病的药物中的应用。

16. 如权利要求15所述的应用, 其中所述动物为哺乳动物。

17. 如权利要求15所述的应用, 其中所述动物为人类。

18. 如权利要求15所述的应用, 其中所述动物为鸟类。

19. 一种制备如权利要求8所述的疫苗的方法, 所述方法包括将如权利要求1-7中任一项所述的Bgag VLP与一种或多种适用于疫苗接种的佐剂混合。

20. 检测受试者内是否存在Bgag基因或Bgag蛋白质的试剂在制备用于确定所述受试者

是否之前接种如权利要求8所述的疫苗的疫苗中的应用。

21. 如权利要求1-7中任一项所述的Bgag VLP, 其包含一种或多种不同核酸, 其中所述核酸诱导或加强受试者对目标病原体的免疫应答。

22. 如权利要求21所述的一种Bgag VLP, 其中所述一种或多种不同核酸是RNA。

用牛免疫缺陷病毒Gag蛋白的重组病毒样颗粒

[0001] 交叉引用在先申请

[0002] 本申请要求2015年7月2日递交的美国临时申请No.62/188,084的优先权,该临时申请在此全部引用作为参考并转让至本申请的受让人。

[0003] 政府利益

[0004] 本发明部分得到了美国政府的支持,国家卫生研究院国家过敏和传染病研究所授予的拨款号为AI111532-02,美国农业部国家食品和农业研究所授予的拨款号为2011-33610-30433。美国政府在本发明上可能具有一定的权利。

技术领域

[0005] 一种病毒样颗粒(“VLP”)的疫苗系统或平台用于诱发对一种或多种不同病原体的免疫应答以及用于制作并使用所述新系统或平台的方法。

背景技术

[0006] 已提出各种各样的免疫系统或平台。由于这些免疫系统或平台不是最理想的,所以在本领域中存有改进系统或平台的需求,包括能够对多种病原体有效的系统或平台。

[0007] 概要

[0008] 在此描述的是一种包含表达或共表达一种或多种不同目标病原体蛋白质的牛免疫缺陷病毒gag蛋白(“Bgag”)的新型VLP。在某些实施例中,目标病原体蛋白质是一种被定位到VLP膜的跨膜蛋白质。在某些实施例中,目标病原体蛋白质是从包括正黏液病毒,线状病毒,冠状病毒和逆转录酶病毒的一种或多种不同病毒病原体中选中。

[0009] 在某些实施例中目标流感病毒是甲型流感病毒,跨膜蛋白质由一种或多种不同的HA亚型1-18(“H1”-“H18”)和/或NA亚型1-11(“N1”-“N11”)组成。例如,在某些实施例中,跨膜蛋白质包含四种不同亚型的HA和一种亚型的NA。在另一个例子中,在某些其他的实施例中,跨膜蛋白质包含三种不同亚型的HA和一种亚型的NA,等等。作为另一例子,在某些实施例中,在新型Bgag VLPs中共表达的四种HAs是H5,H7,H9和H10。

[0010] 在某些实施例中,在新型Bgag VLPs中表达的一种或多种不同的甲型流感跨膜蛋白质仅能够结合到鸟类或人类宿主细胞,然而在某些其他实施例中,一种或多种不同的跨膜蛋白质与鸟类和人类宿主细胞都结合到。

[0011] 在某些实施例中,在新型Bgag VLPs共表达的甲型流感跨膜蛋白质能够形成同源三聚体,然而在某些其他实施例中,跨膜蛋白质形成异源三聚体或同源三聚体和异源三聚体的混合物。

[0012] 任何在此描述的VLPs中,可以基因修饰目标病原体蛋白质。例如,在某些实施例中,目标病原体蛋白质的可变区能够从基因学角度被去除。作为另一例子,在某些实施例中,目标病原体蛋白质的C-末端能够被修饰以增加与Bgag的结合效率。作为另一例子,在某些实施例中,目标病原体蛋白质可以是嵌合体。这种嵌合体的一个例子是通过基因修饰目标埃博拉病毒糖蛋白的C-末端以包含流感HA的跨膜和/或C-末端区而制备的嵌合体。也能

够基因修饰Bgag。例如,在某些实施例中,Bgag被修饰以增加与目标病原体蛋白质的结合效率。

[0013] 在某些实施例中,新型Bgag VLPs能够保护或诱发受试者对一种或多种不同病原体的免疫应答。在某些实施例中,新型Bgag VLPs能够保护或诱发受试者对包括不同流感类型和亚型的一种或多种不同类型和/或亚型的病毒的免疫应答。在某些实施例中,新型Bgag VLPs能够保护或诱发受试者对包含H5,H7,H9和/或H10的流感亚型的免疫应答。

[0014] 在某些实施例中,新型Bgag VLPs具有大于约100nm的直径,且优选地从约150nm至约200nm,例如,约155nm,约160nm,约170nm,约175nm,约180nm,约185nm,约190nm,约195nm,它们的组合等。

[0015] 在某些实施例中,在VLP膜上每一个Bgag VLP包含平均超过375个蛋白突刺,优选地约375个到约800个突刺,且更优选地约800个突刺。在其他实施例中,突刺的数量可以为约400个,约450个,约500个,约550个,约600个,约650个,约700个,约750个,它们的组合等。

[0016] 在某些实施例中,每一个Bgag VLP包含大的表面积,优选地表面积大于目标病原体蛋白质之一源自的病原体。

[0017] 还描述了包含能够保护或诱发受试者对一种或多种不同病原体的疫苗应答的Bgag VLP的新型疫苗。在某些实施例中,包含Bgag VLP的新型疫苗能够保护或诱发受试者对包括不同流感亚型的一种或多种不同类型和/或亚型的病毒的免疫应答。在某些实施例中,包含Bgag VLPs的新型疫苗能够保护或诱发受试者对包含H5,H7,H9和/或H10的流感亚型的免疫应答。

[0018] 还描述了用于制造新型Bgag VLPs的新型DNA载体。在某些实施例中,DNA载体在载体病毒中表达以制备新型Bgag VLPs,并且优选地载体病毒是重组杆状病毒(“rBV”)。在某些实施例中,包含DNA载体的rBV在真核细胞,优选草地贪夜蛾(“Sf9”)细胞中表达。在某些实施例中,每一个目标病原体蛋白质基因受单个启动子控制,并优选单个多角体蛋白启动子。

[0019] 还描述了使用包含一个Bgag基因和来自一种或多种不同目标病原体的至少一个基因的DNA载体制备新型Bgag VLPs或疫苗的方法,所述基因全部组成串联且每一个基因受启动子控制,优选多角体蛋白启动子;一种载体病毒,优选rBV;以及一种真核细胞,优选Sf9。

[0020] 还描述了一种区分Bgag VLP接种疫苗的受试者与未接种疫苗的受试者的方法。

附图说明

[0021] 图1显示了表达流感基因的Bgag VLP构建体和M1-VLP构建体示意图。

[0022] 图2显示了使用火鸡红细胞从图1的构建体产生的Bgag VLP或M1VLP的血凝反应试验。

[0023] 图3显示了由图1的构建体经H1特异性单克隆抗体染色产生的流感VLPs的蛋白质免疫印迹。

[0024] 图4显示了使用考马斯蓝染色的SDS-PAGE凝胶从图1的构建体产生的流感VLPs的蛋白质表达谱。

[0025] 图5显示了以PFU测量的由图1的构建体产生的流感病毒VLPs中NA的酶活性。

- [0026] 图6显示了呈现流感NA和H1蛋白质的Bgag VLP的电子显微照片。
- [0027] 图7显示了呈现流感NA和H1蛋白质的M1VLPs的电子显微照片。
- [0028] 图8显示了表达流感NA和H10基因的Bgag VLP示意图。
- [0029] 图9显示了由图8的构建体产生的流感H10Bgag VLPs的血凝反应试验。
- [0030] 图10显示了由图8的构建体产生的流感H10Bgag VLP的蛋白质免疫印迹以及由图13中的构建体经抗-H10N7, 抗-H5N1, 抗-H7N9, 抗-H9N2抗体染色产生的四亚型H5/7/9/10Bgag VLP的蛋白质免疫印迹。
- [0031] 图11显示了由图8的构建体产生的流感H10Bgag VLP的SDS-PAGE凝胶以及由图13的构建体产生的四亚型H5/7/9/10Bgag VLP的SDS-PAGE凝胶。
- [0032] 图12显示了由图8的构建体产生的H10Bgag VLPs的电子显微照片。
- [0033] 图13显示了表达流感NA, H9, H5, H7和H10基因的Bgag-VLP的示意图。
- [0034] 图14显示了由图13的构建体产生的四亚型H5/7/9/10Bgag VLPs的血凝反应试验。
- [0035] 图15显示了以PFU测量的由图8的构建体产生的H10流感VLPs中的NA酶活性以及由图13中的构建体产生的四亚型H5/7/9/10Bgag VLPs中的NA酶活性。
- [0036] 图16显示了由图13的构建体产生的四亚型H5/7/9/10Bgag VLPs的电子显微照片。
- [0037] 图17显示了源自Mayinga菌株的埃博拉病毒糖蛋白(“EboMay GP”)的原始蛋白质序列。
- [0038] 图18显示了具有流感HA跨膜区和C-末端的嵌合EboMay GP(“EboMay GP-TMCT”)的蛋白质序列。
- [0039] 图19显示了通过超速离心在蔗糖梯度上进一步纯化并经抗埃博拉抗血清染色的EboMay-GP-TMCT IECC Fxn1的蛋白质免疫印迹。
- [0040] 图20显示了经考马斯蓝染色的SDS-PAGE凝胶上的IECC Fxn 1和IECC Fxn 3的峰值蔗糖梯度分数的蛋白质表达谱。
- [0041] 图21显示了EboMay GP-TMCT Bgag VLP的电子显微照片。
- [0042] 图22显示了比较自第1代(“P1”)通过第5代(“P5”)的四亚型Bgag稳定性的血凝反应试验。
- [0043] 图23显示了使用蛋白质免疫印迹和SDS-PAGE在四亚型H5/7/9/10Bgag VLP中的HA亚型的共定位。
- [0044] 图24显示了使用SDS-PAGE密度测定法和半定量蛋白质免疫印迹在四亚型H5/7/9/10Bgag VLP上HA亚型的分布图。
- [0045] 图25显示了使用琼脂糖凝胶电泳的Bgag VLPs中RNA的存在。
- [0046] 图26显示了使用琼脂糖凝胶电泳在更高的分辨率的Bgag VLPs中RNA的存在, 显示了核酸分离。
- [0047] 图27显示在不同测试条件下Bgag VLPs的DNA和RNA概况。
- [0048] 图28显示了图A中的单亚型H10Bgag VLP和图B中的四亚型H5/7/9/10Bgag VLP的制备和表征。
- [0049] 图29显示了经表达H5, H7, H9, H10, NA和Bgag基因的重组杆状病毒(rBV)感染的Sf9细胞的间接免疫荧光测定。
- [0050] 图30显示了用单亚型H10Bgag VLP或四亚型H5/7/9/10Bgag VLP免疫的白鼬的免

疫原性概况。

[0051] 图31总结了免疫后的白鼬受攻击前血清中HA血凝抑制(HI)抗体滴度。

[0052] 图32总结了受攻击2或4天后免疫白鼬中的复制病毒滴度。

[0053] 图33显示了包含来自H5N1高致病性禽流感病毒的三个进化枝的H5HA蛋白质的三进化枝H555Bgag VLPs的制备和表征。

[0054] 图34显示了纯化的三进化枝H555Bgag VLPs的表征。

[0055] 图35显示了用H555Bgag VLP接种疫苗的鸟类针对矛隼H5N8进化枝2.3.4.4(组1), 鸡/埃及H5N1进化枝2.1.3(组2)和鸡/西爪哇进化枝2.2.1(组3)的抗体应答。

[0056] 图36显示了为保护接种疫苗H555VLP的鸡免受高致病性禽流感H5N1或H5N8攻击的Kaplan-Meier存活曲线图。

[0057] 图37显示了待攻击的鸟类在疫苗接种后5周对用于攻击的病毒的个体血凝抑制滴度(记录2)及标准差

[0058] 图38显示了抵抗攻击病毒的鸟群在受攻击后2周的个体血凝抑制滴度(记录2)和标准差。

[0059] 图39显示了用甲型/矛隼/华盛顿/2014H5N8(进化枝2.3.4.4)病毒攻击后第2天和第4天口腔和泄殖腔拭子的病毒滴度。

[0060] 图40显示了用甲型/鸡/埃及/2010H5N1(进化枝2.2.1)病毒攻击后第2天和第4天口腔和泄殖腔拭子的病毒滴度。

[0061] 图41显示了用甲型/鸡/西爪哇苏横/2007H5N1(进化枝2.1.3)病毒攻击后第2天和第4天口腔和泄殖腔拭子的病毒滴度。

[0062] 详细说明

[0063] 解释和定义

[0064] 除非另外说明,本说明书中采用了对本领域技术人员具有普通含义的常规化学,生物化学,分子生物学,免疫学和药理学方法以及术语(除非在此另外定义/描述)。本文所引用的全部出版物,参考文献和专利申请均通过引用整体并入本文。

[0065] 如在本说明书和所附权利要求中使用,适用以下一般规则。单数形式“一”,“一个”和“该”包括复数指代,除非内容明确地另外指出。基因和蛋白质的一般命名规则也适用。也就是说,基因用斜体或下划线表示(例如:B_{gag}或B_{gag}),但蛋白质是标准字体,不用斜体或下划线(例如:B_{gag})。有机体分类的一般命名规则也适用。即顺序,科,类和物种名称都用斜体表示。

[0066] 如在此使用的,以下术语应具有指定的含义。术语“约”具有本领域技术人员将理解的“近似”的表面和普通含义。术语“包含”,“含有”,“包括”,“包括但不限于”,或“以…为特征”是包容性或开放式的,不排除额外的未列举的元素。

[0067] 如在此使用的,以下术语应具有特定的意义。

[0068] “AIDS”指获得性免疫缺陷综合征。

[0069] “Bgag”指牛免疫缺陷病毒gag蛋白。

[0070] “Bgag VLP”指基于VLP的Bgag,即具有内核蛋白质Bgag的病毒样颗粒。

[0071] “BIV”指牛免疫缺陷病毒。

[0072] “CDC”指疾病预防控制中心。

- [0073] “DIVA”指被接种疫苗的动物中受感染的动物的分化
- [0074] “EboMay GP”指属于Mayinga菌株的埃博拉病毒糖蛋白,其实例如图17所示。
- [0075] “EboMay GP-TMCT”指具有流感HA跨膜区和C-末端的嵌合体EboMay GP,其实例如图18所示。
- [0076] 一个“ENV”指一个HIV包膜蛋白质。
- [0077] “Fxns”指分馏法。
- [0078] “H1”-“H18”指1-18型流感HA。
- [0079] 一个“HA”指一个流感跨膜糖蛋白血凝素。
- [0080] 一个“HIV”指人体免疫缺陷病毒。
- [0081] 一个“HK09”病毒指一个H9N2型甲型流感/香港/33982/2009病毒。
- [0082] 一个“HPAI”指高致病性禽流感。
- [0083] 一个“IECC Fxn 1”指从离子交换色谱柱收集的一个峰值分数的EboMay GP-TMCT VLP分数1。
- [0084] 一个“IECC Fxn 3”指从离子交换色谱柱收集的一个峰值分数的EboMay GP-TMCT VLP分数3。
- [0085] “i.n.”指鼻内,如所示的疫苗接种。
- [0086] “i.m.”指肌内,如所示的疫苗接种。
- [0087] 一个“IN/5”病毒指一个H5N1型甲型流感/印度尼西亚/5/2005病毒。
- [0088] 一个“JX/13”病毒指一个H10N8型甲型流感/江西/IPB13a/2013病毒。
- [0089] 一个“M1”指一个流感内核蛋白质基质1。
- [0090] 一个“M1VLP”指一个基于M1的VLP,即具有内核蛋白质M1的病毒样颗粒。
- [0091] “MERS”指中东呼吸综合症。
- [0092] “MOI”指感染复数。
- [0093] “N1”-“N11”指1-11型流感NA。
- [0094] 一个“NA”指一个流感跨膜糖蛋白神经氨酸酶。
- [0095] “p.c.”指受攻击后,如所示的受试者受(多个)目标病原体攻击后的时期。
- [0096] “PBS”指磷酸盐缓冲液。
- [0097] 一个“PEDV”指一个猪流行性腹泻病毒。
- [0098] 一个“PR8”病毒指一个H1N1型甲型流感/波多黎各/8/1934病毒。
- [0099] 一个“rBV”指一个重组杆状病毒。
- [0100] “RFU”指相对荧光单位。
- [0101] “SARS”指严重急性呼吸系统综合症。
- [0102] 一个“Sf9”指一个草地贪夜蛾细胞。
- [0103] 一个“SH/13”指一个H7N9型甲型流感/上海/2/2013病毒。
- [0104] 本发明中的“受试者”优选动物,例如小鼠,白鼬,鸡,猪等,以及优选哺乳动物或鸟,最优选人类。
- [0105] 一个“目标病原体蛋白质”包括来自任何病原体的任何蛋白质或肽。所述病原体可以是病毒,细菌,朊病毒,真核生物,真菌或任何其他微生物。所述病原体也可以是寄生虫,诸如寄生性原虫。所述病原体也可以是多细胞生物,包括人类。人类目标病原体蛋白质的例

子是蛋白质或肽癌症标志物。

[0106] 一个“VN/04”指一个H5N1型甲型流感/越南/1203/2004病毒。

[0107] 一个“VLP”指一个重组病毒样颗粒。

[0108] “WHO”指世界卫生组织；

[0109] 疫苗对抗病原体

[0110] 接种疫苗是预防或减少/治疗病原体引起的流行病最有效的策略。例如，季节性流感流行病严重影响全世界五(5)百万人。最近，西非埃博拉疫情爆发已经使非洲大陆成千上万的人受创。

[0111] 与治疗被病原体感染的病人的药物疗法不同，疫苗通过诱发病人体内强烈的免疫应答以保护病人抵抗未来的感染。传统疫苗的发展一直是狭隘并特定的，集中在诱发抵抗单一病原体的免疫应答。然而，越来越需要研制能够诱发对多种病原体的强烈的免疫应答的多特异性广谱疫苗。在此，发明人首次描述了对一种或多种不同病原体提供免疫保护的一种新型疫苗系统或平台。

[0112] 流感病毒是一种常见的病毒性病原体，对人能够致命并且对公共健康是一种严重的威胁((Morens and Fauci,2012;Palese,2006;Yen and Webster,2009))。流感病毒是一种含有8分段的双股负链RNA基因组的包膜病毒并属于正粘病毒科。甲、乙、丙型流感病毒的存在，其中甲型流感病毒，尤其甲型禽流感病毒，对于其潜在的流行病和大流行病爆发一直被世界卫生组织(“WHO”)和疾病预防控制中心(“CDC”)密切监测。

[0113] 甲型流感病毒包括两种跨膜糖蛋白血凝素(“HA”)和神经氨酸酶(“NA”)以及内核蛋白质基质1蛋白质(“M1”)。甲型流感具有18种已知类型的HA以及11种已知类型的NA，导致总共198种甲型流感亚型的不同的组合。据信，大多数的这些甲型流感亚型可以感染鸟类，而只有一些可以感染人类。由于禽流感亚型能够重配以及基因的频繁改变(Morens and Fauci,2012;Palese,2004)，已知几种甲型禽流感病毒亚型开始跨越人-禽屏障。

[0114] 人-禽屏障的穿越引起了全世界关注，高致病性禽流感(“HPAI”)病毒将会引起大流行病(Kang et al.,2009;Morens and Fauci,2012)，很像1918年在全世界夺取了4千万到1亿人的生命的H1N1大流行病。今天，H5N1流感是高致病性禽流感的一个例子；然而，还存在其他病毒。这些病毒包括，例如，导致2013年爆发并夺取了很多人生命的H7N9流感病毒(Chen et al.,2015;Gao et al.,2013)；具有禽源的H9N2流感病毒，但已知是一种人类病原体(Blanco et al.,2013;Pushko et al.,2005;Yen and Webster,2009)；以及最近才发现H10N8流感病毒，其已经获得了感染人类的能力(Garcia-Sastre and Schmolke,2014;To et al.,2014)。

[0115] 目前，存在针对季节性流感的疫苗。然而，它们包含了分别在鸡胚中生长的H1N1，H3N2和乙型流感病毒，并且后被混合成三价疫苗。使用鸡蛋的疫苗产品具有显著的局限性。包括没有广谱保护；对新兴的高致病性禽流感无效；低产量；以及扩大问题。因为诸如流感的许多病原体经历一年一度的抗原漂移，所以必须连续不断地研制并且改变疫苗以应对循环的季节性病毒的变化。此外，因为流感中的每个三种单价疫苗都必须单独制备，所以三价混合疫苗的生产大大增加了疫苗的生产成本，增加了对流感威胁的响应时间，并且增加了接种后不良反应的可能性。因此，迫切需要研制新型广谱疫苗系统。

[0116] 埃博拉病毒是一种第四级危险群组的病原体，造成极高的死亡率并且在近年来已

经摧毁了许多西非国家。埃博拉病毒是一种含有单股负链RNA的包膜病毒并且属于丝状病毒科。埃博拉病毒具有一个跨膜糖蛋白(“GP”)和内核蛋白质。目前,没有被批准通用于人类的埃博拉疫苗。

[0117] 中东呼吸综合症(“MERS”)冠状病毒是一种2012年确定的新兴病毒,并且和严重急性呼吸系统综合症(“SARS”)冠状病毒一样,属于冠状病毒科。MERS冠状病毒是一种含有单股正链RNA的包膜病毒。而且,和其他诸如猪流行性腹泻病毒(“PEDV”)一样,MERS冠状病毒具有跨膜糖蛋白。目前,关于MERS冠状病毒的了解很少。

[0118] 人类免疫缺陷病毒(“HIV”)因导致获得性免疫缺陷综合症(“AIDS”)而被熟知。HIV是一种具有单股正链RNA的属于逆转录酶病毒科的包膜病毒。HIV包膜蛋白质(“ENV”)已经成为了疫苗研究的目标。然而,目前没有被批准的用于人体临床的HIV疫苗。

[0119] 对动物和人类有害的病原体名单很长而且越来越多。迫切需要研制一种强大的能够诱发对多种病原体免疫应答的广谱疫苗系统/平台。在此,发明人首次描述了一种使用基于Bgag的新型VLP用于诱发对一种或多种(例如多个)不同病原体的特异或广谱免疫应答的新型疫苗平台。

[0120] 使用VLPs作为候选疫苗

[0121] 重组病毒样颗粒(“VLPs”)是有前景的候选疫苗。它们具有高度免疫原性,形态上和抗原性上与天然病毒颗粒类似,但无法复制。VLPs的免疫保护作用已经在临床前和临床试验中被证实(Pushko et al.,2011)。此外,与活疫苗或灭活疫苗不同,VLPs不涉及目标病原体的产生,但是能够通过由VLPs表达和呈现的目标病原体的抗原来诱发对目标病原体的强烈的免疫应答。因此,对于许多包括流感的病原体,VLPs是安全和有效的候选疫苗(Kushnir et al.,2012;Pushko et al.,2013)。

[0122] 近来,VLPs已被证明对禽流感是有前途的疫苗(Bright et al.,2007;Galarza et al.,2005;Kang et al.,2009;Perrone et al.,2009;Pushko et al.,2005;Quan et al.; Ross et al.,2009)。我们已经表明,例如,包含流感HA,NA和M1蛋白质的VLPs(Pushko et al.,2005)诱发了高效的防护免疫应答,其在某些情况下超过了传统流感疫苗诱发的免疫应答(Bright et al.,2007;Pushko et al.,2007)。观察所得流感VLP疫苗的高免疫原性归因于HA蛋白质组织成与流感病毒结构类似的规律,从而有助于宿主免疫系统的活化(Kang et al.,2009;Pushko et al.,2013)。

[0123] 与鸡胚培养技术不同,VLPs在细胞培养中生成并且通过分子生物学方法设计。然而,即使今天,许多VLPs候选疫苗,与依赖鸡蛋的三价季节性流感疫苗相同,仍被研制为菌株特异性VLPs,这些VLPs单独合成和生产,然后混合或掺合。此外,这些VLPs中的许多通过同源HA,NA和M1蛋白质制备;即源自相同病毒的HA,NA和M1(Perrone et al.,2009;Pushko et al.,2010;Pushko et al.,2005;Pushko et al.,2007)。这种方法是有问题的,因为新兴的病毒序列数据常常不一定是现成的。例如,在新兴流感疫苗的早期疫苗研制期间,新兴流感病毒的M1序列是通常得不到的。这使得使用VLPs同同源的HA,NA和M1蛋白质研制疫苗以应对如新兴的病毒尤其成问题。

[0124] 作为回应,一些人已经使用源自目标流感病毒的HA和NA以及源自不同流感病毒的M1研制了VLPs(Liu et al.,2015)。其他人也已经尝试了使用小鼠白血病病毒gag蛋白代替M1(Haynes,2009;Haynes et al.,2009)或使用猴/人类免疫缺陷病毒gag蛋白代替M1(Guo

et al., 2003)。近来,我们做出了并描述了几种不同的具有各自源自一种不同流感亚型的一种NA和三种不同的HA的M1VLPs (Pushko et al., 2011; Tretyakova et al., 2013)。我们通过电子显微镜进一步表明,三种HA亚型全部共定位相同的M1 VLP (Pushko et al., 2011; Tretyakova et al., 2013)。我们进一步表明,M1VLP诱发了对所有三种流感病毒株的高度保护性免疫应答,并且是有效的三价流感疫苗 (Pushko et al., 2011; Tretyakova et al., 2013)。也就是说,源自单一VLP的M1 VLP疫苗可以预防所有的三种流感病毒。

[0125] 然而,M1VLP不是疫苗的理想候选者,尤其是人类疫苗。例如,一些流感病毒的M1蛋白质在较低水平表达。此外,如上所述,M1或M1的序列通常对新兴流感病毒不是现成的。而且,大多数人都接触到过M1;因此,人体中可能预先存在对表达M1的VLP的宿主免疫力。因此,这将极大地危害一个M1VLP在人类中诱发特异免疫应答的功效。

[0126] 一种新型无M1Bgag VLP

[0127] 发明人在此使用牛免疫缺陷病毒(“BIV”)gag蛋白(“Bgag”)首次制得并描述了无M1VLP,本文称为Bgag VLP,其表达一种或多种不同的目标病原体蛋白质(参见例如实施例1)。在此公开的新型Bgag VLP使用Bgag作为其内核蛋白质。属于病毒逆转录病毒科慢病毒属的BIV以前已被用于疫苗的研制研究,并且之前已经描述了BIV载体的使用(Luo, 2012)。然而,在公开之前,没有人公开使用一种Bgag VLP来表达或共表达一种或多种不同的目标病原体蛋白质,例如各种流感蛋白;使用Bgag VLP作为候选疫苗;或者使用Bgag或用Bgag作为诊断工具。

[0128] 如在此公开的,发明人,除了别的之外,首先制备了表达并呈现一种或多种不同的目标病原体蛋白质的Bgag VLP(参见例如实施例1和实施例5至实施例12);首次显示了Bgag VLP可以表达和呈现一种或多种不同的功能性流感病毒蛋白,包括同时共表达和共存的属于四种不同流感病毒亚型的功能性HA(参见例如实施例5-实施例7和实施例11至实施例12);首次显示Bgag VLP可以表达和呈现非流感病原体蛋白质(参见例如实施例9);并且首次显示Bgag VLP可以表达和呈现基因修饰的嵌合病原体蛋白质(参见例如实施例10)。另外,发明人首次描述了制备一种新型Bgag VLP和Bgag VLP介导的特异性(单目标)或广谱(多目标)疫苗的方法(参见例如实施例1至实施例3和实施例5至实施例12)。此外,发明人已经描述了与使用Bgag VLP有关的益处,包括其作为优良疫苗的益处。甚至进一步,发明人描述了使用Bgag VLP的益处,包括作为广谱候选疫苗。并且,此外发明人描述了将Bgag蛋白质与Bgag VLP系统联合使用的多种诊断方法。

[0129] Bgag VLPs能够用于目标病原体蛋白质的广谱

[0130] Bgag VLP平台能够表达和呈现的目标病原体蛋白的类型非常广。例如,它可以包括来自任何病毒,细菌,朊病毒,真核生物,真菌,寄生虫或任何其他单细胞或多细胞生物体的任何肽或蛋白质。此外,当表达一种或多种这些目标病原体蛋白的Bgag VLP被注射或接种到受试者时,Bgag VLP可以诱发对一种或多种这些病原体的免疫应答。因此,Bgag VLP系统或平台可用作病毒疫苗,细菌疫苗,朊病毒疫苗,真菌疫苗,甚至寄生虫疫苗等,以治疗,抑制和/或预防这些病原体的致病作用。使用本文公开的原理和方法,Bgag VLP系统或平台还可以用作对一种或多种不同病毒,细菌,朊病毒,真核生物,真菌,寄生虫,任何其他微生物或大生物体,以及其组合等的疫苗,并且具有根据受试者的脆弱性或易感性提供定制的疫苗或治疗的优点。例如,对两种特定病毒,一种特定细菌和一种特定真菌敏感的受试者可

以接种定制疫苗以抑制/预防和/或治疗病毒,细菌和真菌的发作。

[0131] 新型Bgag VLP平台也可用于表达一种或多种癌症标志物。例如,一种或多种癌症标志物肽或蛋白质可以用作目标病原体蛋白质。作为疫苗,Bgag VLP可用于增强受试者的免疫系统并增加对发育中的癌细胞的监视,以有效地抑制/预防,治疗或控制癌症。

[0132] 含有目标病原体蛋白质的Bgag VLP可诱发免疫应答并充当疫苗。例如,为诱导对目标病原体蛋白质的免疫应答,含有目标病原体蛋白质的Bgag VLP可被注射或以其他方式接种受试者。然后通过标准测定法确定接种的受试者针对目标病原体的免疫应答。例如,在约2至约4周内,抽取接种疫苗的受试者的血液,通过酶联免疫吸附测定法ELISA,免疫荧光抗体测定法或其它抗体检测测定法测定抗目标病原体抗体,并与未接种疫苗的受试者的抗体谱比较。接种疫苗的受试者中抗目标病原体抗体的存在表明Bgag VLP已经在受试者中诱发了免疫应答,因此在体内是免疫原性的。标准攻击研究还可以证明Bgag VLP在保护受试者抵抗目标病原体方面的功效。

[0133] 有共有目标病原体蛋白质或保守表位的Bgag VLPs

[0134] 在某些实施例中,可以设计Bgag VLP的目标病原体蛋白质以扩大免疫保护。例如,目标病原体蛋白质可以源自于共有HA序列,使用先进的基因分析技术确定(Denis et al., 2008;Ebrahimi et al.;Pica and Palese,2013;Rao et al.,2010;Schotsaert et al., 2009;Wang and Palese,2009;Wei et al.,2010)。作为另一个实例,目标病原体蛋白质源自于保守的流感病毒表位,例如流感病毒M2离子通道蛋白的胞外区(Denis et al.,2008;Ebrahimi et al.;Pica and Palese,2013;Rao et al.,2010;Schotsaert et al.,2009;Wang and Palese,2009;Wei et al.,2010)。由于这些设计,流感Bgag VLP可以为多个或甚至所有的流感病毒亚型提供广谱免疫保护。

[0135] 具有基因修饰的目标病原体蛋白质的Bgag VLPs

[0136] 发明人已经表明基因修饰的目标病原体蛋白质可以由Bgag VLP表达和呈现(参见例如实施例8和实施例10)。例如,在某些实施例中,目标病原体蛋白质的一部分由Bgag VLP表达和呈现。在某些实施例中,一些目标病原体蛋白质可以去除某些可变区。例如,可以通过使用“无头”HA来制备Bgag VLPs,其中引起病毒中和HA的最可变表位被去除。这种方法的一个优点是由Bgag VLPs呈现的无头HA可以诱导对通常隐藏在含有全长的HA的标准VLP中的HA表位的免疫应答。作为另一个例子,Bgag VLPs可以通过使用HA的“茎”区来制备。对无头HA或茎HA的免疫应答可引起能够保护免受流感病毒的多种菌株和亚型的广泛保护性或通用性流感疫苗。在这些实施例中,Bgag VLPs可以主要呈现目标病原体蛋白质的保守区域,以努力诱发广谱免疫应答。

[0137] 来自目标病原体的跨膜蛋白质可以作为优异的目标病原体蛋白质并被Bgag VLP表达和呈现。然而,胞浆蛋白质和肽与源自于目标病原体的分泌性蛋白质和肽一样也可以通过基因工程用作目标病原体蛋白质。例如,可以将病毒,细菌,朊病毒,真核生物,真菌,寄生虫,寄生原生动物或人源(例如癌症标志物)的胞浆和/或分泌蛋白质或肽设计成可由Bgag VLP呈现的跨膜蛋白质。一个这样的实例是使用标准基因工程方法或在此基本描述的方法将流感HA的跨膜区用基因工程设计到这些非跨膜蛋白质和/或肽上以产生嵌合EboMay GP-TMCT。例如,可以将流感HA的跨膜区添加到前列腺特异性抗原的C端,所述前列腺特异性抗原是通常由前列腺细胞分泌的蛋白质癌症标志物。使用在此基本描述的原理和方法,基

因工程PSA蛋白可由Bgag VLP表达和呈现,并用于受试者以抑制,预防,治疗,监测和/或控制癌症进展。

[0138] 在某些实施例中,基因修饰涉及修饰目标病原体蛋白质以增加与Bgag的结合效率(参见例如实施例10)。例如,可以对目标病原体的C-末端进行修饰以优化与Bgag的结合效率。

[0139] 在某些其他实施例中,所述基因修饰涉及产生嵌合的目标病原体蛋白质。一种这样的嵌合体是EboMay GP-TMCT蛋白质(参见图17和18)。如实施例10和本说明书别处所述,嵌合EboMay GP-TMCT蛋白质是通过将目标埃博拉病毒糖蛋白的C-末端替换为流感HA的跨膜和/或C-末端区域而产生的。

[0140] 在某些其他实施例中,可以合理设计和/或重新设计目标病原体蛋白质以通过Bgag VLPs改善其表达和呈现。例如,已经表明,HIV Env蛋白质的合理设计可以使蛋白质表达提高10倍(Wang et al.,2007)。

[0141] 在所有情况下,使用上述基本相同的原理,Bgag蛋白质也可以被基因修饰和改良。例如,Bgag的某些区域可被修饰以增加与目标病原体蛋白质的结合效率

[0142] 像其他Bgag VLPs一样,含有基因工程的目标病原体蛋白质的Bgag VLP可诱发免疫应答,并用作疫苗,例如使用在此所述的原理和方法。

[0143] 新型Bgag VLP能够表达和呈现一种或多种不同类型的目标病原体蛋白质

[0144] 发明人已经制成并描述了一种新型Bgag VLP系统用于一种或多种不同类型的目标病原体蛋白质的表达/共表达和呈现/共呈现(参见例如实施例5到实施例12)。在某些实施例中,目标病原体蛋白定位于VLP的膜上(参见例如图6,7,12,16)。,无论各种病原体蛋白质是否经过基因修饰,可以通过这种新型Bgag VLP系统使用。两个实例包括甲型流感病毒跨膜蛋白质(参见例如实施例5到实施例8和实施例11到实施例12)和埃博拉病毒糖蛋白(参见例如实施例9到实施例10)。

[0145] 发明人还表明Bgag VLPs能够和M1VLPs一样呈现目标病原体蛋白质。例如,发明人表明Bgag VLPs能够和M1VLPs一样呈现流感HA和NA蛋白质(参见例如图2-7)。发明人进一步表明,呈现的目标病原体蛋白质是功能性的。例如,Bgag VLPs上的HA和NA蛋白质显示出具有功能性血凝反应和NA酶活性(参见例如图2,5,9,14和15)。

[0146] 在某些实施例中,新型Bgag VLPs具有大于约100nm且至多200nm的直径,并且优选约120nm至约200nm,更优选约150nm至约200nm,更优选约160nm至约200nm,更优选约170nm至约200nm,更优选约180nm至约200nm,更优选约190nm至约200nm。与一些先天性病原体相比,Bgag VLP实质上更大。例如,流感病毒的平均直径约为100nm;HIV的平均直径约为120nm;而SARS冠状病毒的平均直径约为80-90nm。Bgag VLP实质上大于M1VLP。例如,流感Bgag VLPs的平均直径为约150至约180nm,而流感M1VLPs的平均直径为约120至约150nm。尽管尺寸较大,但Bgag VLPs具有与M1VLPs以及流感病毒类似的一般形态(参见例如图6和7)。较大的Bgag VLP是非常有利的,特别是作为候选疫苗,因为每个VLP可以实质上呈现比先天性病原体或M1VLP更多的目标病原体蛋白质。

[0147] 新型Bgag VLP是一种能够呈现一种或多种不同类型的目标病原体蛋白质的多功能系统(参见例如实施例5至实施例12)。在某些实施例中,Bgag VLP包含选自一种病原体的目标病原体蛋白质(参见例如实施例5至

[0148] 实施例10),而在某些其他实施例中,Bgag VLP包含多种(例如多个)目标病原体蛋白质,其选自多于一种类型或亚型的病原体(参见例如实施例11至实施例12)。在某些实施例中,所选病原体之一是病毒。在某些实施例中,标本病原体选自正粘液病毒,优选流感病毒,并且进一步优选甲型流感病毒;线状病毒,优选埃博拉病毒;冠状病毒,优选MERS病毒;和逆转录酶病毒,优选HIV的组合。

[0149] 在某些实施例中,Bgag VLPs能够保护或诱发受试者中对一种或多种不同病原体的免疫应答。因此,用单目标Bgag VLP制备的疫苗可以提供强大的目标特异性免疫保护,而用多目标Bgag VLPs制备的疫苗可以提供多目标的广谱免疫保护。重要的是,广谱保护是通过单个的多目标Bgag VLP而不是将不同的单目标疫苗掺合在一起来实现的。然而,当然可以进一步混合和/或掺合不同的多目标Bgag VLPs以提供更广泛的免疫覆盖。因此,多目标Bgag VLPs可用于诱发对不同目标病原体的广谱免疫保护,并且是大流行病预防策略的重要补充。

[0150] 新型Bgag VLP可以表达和呈现一种或多种不同的亚型的目标病原体蛋白质

[0151] 发明人已经表明Bgag VLP系统或平台是用于呈现一种或多种不同亚型的目标病原体蛋白质(参见例如实施例5至实施例12)的适应性平台。在某些单亚型Bgag VLP实施例中,发明人已经表明可以制备包含功能性流感跨膜蛋白质NA和HA,包括PR8H1和新兴流感H10的Bgag VLPs(参见例如实施例5和实施例6)。在本公开之前,Bgag先前尚未用于产生流感VLPs,并且Bgag可用于制备单亚型VLPs是未知的。在某些多亚型Bgag VLP实施例中,发明人首次制成并描述了多亚型Bgag VLP,其是一种同时共表达和共存在不同亚型的目标病原体蛋白质的VLP,其使其能够对多种不同亚型的目标病毒提供同时、广谱的免疫保护(参见例如实施例11和实施例12)。在本公开之前,Bgag可用于制备多亚型VLPs是未知的。

[0152] 在某些实施例中,Bgag VLPs能够保护或诱发受试者对一种或多种不同亚型的病毒的免疫应答。因此,用单亚型Bgag VLP制备的疫苗可以提供强大的亚型特异性免疫保护,而用多亚型Bgag VLPs制备的疫苗可以提供多亚型、广谱的免疫保护。与多目标的Bgag VLPs一样,广谱保护是通过单个多亚型Bgag VLP而不是通过把不同的单亚型疫苗掺合在一起来实现的。虽然当然可以混合或掺合不同的多亚型Bgag VLPs,以提供更广泛的免疫覆盖。加之多目标Bgag VLP的设计,可用于诱发对不同类型和亚型的病原体的广谱免疫保护的Bgag VLP系统是大流行病预防策略的重要补充。

[0153] 作为一个例子,新型Bgag VLP能够保护或诱发受试者对一种或多种(例如多个)不同病毒亚型,包括不同流感病毒亚型的免疫应答。在某些实施例中,在新型Bgag VLPs中共表达的甲型流感病毒跨膜蛋白质可仅结合鸟类或人类宿主细胞,而在某些其他实施例中,跨膜蛋白质结合鸟类和人类宿主细胞。在某些实施例中,新型Bgag VLP包含作为其目标病原体蛋白质的一种或多种不同的HA型1-18(“H1”-“H18”)和NA型1-11(“N1”-“N11”),并表达和呈现蛋白质。在某些其他实施例中,新型Bgag VLPs能够保护或诱发受试者对一种或多种不同流感亚型如H5,H7,H9和H10亚型的免疫应答。

[0154] 使用这种新型平台,发明人首次制成并描述了四亚型Bgag VLP(参见例如图10-11,13-16和实施例11)。在某些实施例中,四亚型Bgag VLP共表达来源于流感亚型5,7,9和10的流感HA。这使得四亚型VLP能够在VLP的表面上同时表达和呈现禽流感H5,H7,H9和H10蛋白质以提供对所有四种流感病毒亚型的同时的免疫保护。实施例也可以共同表达和共呈

现(或不表达和不呈现)相同或不同类型的NA。在某些实施例中,来自这些四亚型Bgag VLPs的HAs定位形成同源三聚体,而在某些其他实施例中,HAs形成异源三聚体或同源三聚体和异源三聚体的混合物。在某些实施例中,Bgag VLP共表达和共呈现三种不同类型的HA和一种类型的NA。

[0155] H5,H7,H9和H10亚型的禽流感病毒已被确定为大流行病关注的病原体(Belser et al.,2008;Garcia-Sastre and Schmolke,2014;Palese,2004;Pappas et al.,2007;WHO,2013)。特别地,VN/04(H5N1)和HK/09(H9N2)病毒都在世界卫生组织(WHO)2012年为大流行病预防而推荐的候选疫苗名单上(WHO,2012a)。为了加强大流行病预防,已经批准了灭活的H5N1疫苗(O'Neill and Donis,2009),包括基于细胞培养的流感疫苗。然而,尽管已经报道了有前景的实验疫苗(Chen et al.,2014;Kong et al.,2015;Smith et al.,2013;Tretyakova et al.,2013;Wohlbold et al.,2015),目前还没有被批准的用于H7,H9或H10亚型的人类疫苗(WHO,2012a)。

[0156] 表达一种或多种不同目标病原体蛋白质的新型Bgag VLP是一种优异的疫苗平台,因为它可以诱发对一种或多种不同目标病原体的强烈的免疫应答。例如,将含有来自H10N1病毒的血凝素的H10Bgag VLP注射或以其他方式接种白鼬,在白鼬中诱发了强大的抗H10中和抗体(参见例如图30和31)。类似地,在白鼬中注射或以其他方式接种四亚型H5/H7/H9/10Bgag VLP同时,在白鼬中诱发了强大的抗H5,抗H7,抗H9和H10中和抗体(参见例如图30和31)。进一步发现,所诱发的中和抗体可中和来自相同亚型的不同进化枝的病毒,从而产生交叉保护性中和抗体的潜力。例如,由四亚型H5/H7/H9/10Bgag VLP诱导的抗H5中和抗体可以诱发对H5N1的进化枝1,进化枝0,进化枝1.1.2,进化枝2.2和进化枝2.2.2病毒的中和抗体(参见例如图31)。

[0157] 表达一种或多种不同目标病原体蛋白质的新型Bgag VLP是优异的疫苗平台,因为它还可以为接种疫苗的对象提供对一种或多种不同目标病原体的免疫保护。例如,将含有来自H10N1病毒的血凝素的H10Bgag VLP注射或以其他方式接种白鼬可以在随后活流感H10N1病毒的挑战中保护白鼬,如在例如鼻甲和气管中复制病毒滴度的显著降低所示(参见例如图32)。作为另一个例子,在白鼬中注射或以其他方式接种四亚型H5/H7/H9/10Bgag VLP还在随后具有活流感H10N1病毒的攻毒试验中保护白鼬,如在例如鼻甲和气管中复制病毒滴度的显著降低所示(参见例如图32)。

[0158] 新型Bgag VLP是一种极好的广谱候选疫苗,可以对至少四种病毒亚型或菌株或进化枝提供特异性免疫保护。如本文所述,由该新型流感H5/H7/H9/10四亚型Bgag VLP介导的新型多亚型候选疫苗或四亚型候选疫苗是高度有效的,包括用于人类。与之前讨论的传统掺合疫苗不同,用Bgag VLP平台实现的广谱免疫保护可以在不混合单个疫苗的情况下实现。

[0159] 新型Bgag VLP可以表达和呈现相同亚型不同进化枝的一个或多个目标病原体蛋白质

[0160] 除了表达和呈现属于不同类型和亚型的目标病原体蛋白质之外,Bgag VLP系统还可以用于表达和呈现属于同一亚型不同进化枝的目标病原体蛋白质。例如,Bgag VLP可以表达属于三个不同进化枝的流感H5,如H5进化枝2.3.4.4(甲型/鸡/德国/2014),H5进化枝2.1.3(甲型/鸡/西爪哇/苏横/29/2007)和H5进化枝2.2.1(甲型/鸡/埃及/121/2012)。所得

的流感H555 Bgag VLP表达了功能性HA(参见例如图33)并且具有其他Bgag VLPs的一般形态(参见例如图34)。

[0161] 得到的流感H555 Bag VLP还显示出对流感H5的强免疫原性。例如,随后用H555 Bgag VLP接种鸡,接种疫苗的鸡表现出强烈的免疫原性并经标准血凝抑制试验证实抗H5抗体的存在(参见例如图35,37和38)。进一步地,所得流感H555 Bgag VLP同时保护接种的受试者免受来自所有三个进化枝的挑战。例如,在第1天和第3天用H555 Bgag VLP接种的鸡,其后在第35天受到进化枝2.3.4.4病毒,进化枝2.1.3病毒或进化枝2.2.1病毒的攻击,所有鸡都在攻击中存活下来(参见例如图36)。相反,用假病毒接种的鸡全部在受攻击的6天内死亡。免疫原性研究还表明,当在攻击后2周测量时,接种H555 Bgag VLP的鸡具有对所有三个H5进化枝的高抗体滴度。疫苗的有效性也通过疫苗接种受试者中口腔和泄殖腔病毒脱落的减少来证明。例如,受攻击后两天和四天的接种H555 Bgag VLP的鸡的口腔和泄殖腔拭子中存在的病毒滴度显著低于未接种疫苗的鸡,不管攻击病毒是否属于进化枝2.3.4.4,进化枝2.1.3或进化枝2.2.1(见例如图39-41)。

[0162] 制备表达一种或多种不同目标病原体蛋白质的Bgag VLPs的方法。

[0163] 发明人还研制了有效制备表达并呈现一种或多种不同目标病原体蛋白质的Bgag VLPs的新方法(参见例如实施例1至实施例3和实施例5至

[0164] 实施例12)。在某些实施例中,DNA载体在载体病毒中表达以制备新型Bgag VLP,并且优选载体病毒是重组杆状病毒(“rBV”)。在某些实施例中,含有DNA载体的rBV在真核细胞,优选草地贪夜蛾(“Sf9”)细胞中表达。在某些实施例中,每种目标病原体蛋白质基因受单个启动子控制,优选单个多角体蛋白启动子。在某些实施例中,该方法用于制备表达和呈现多种不同的目标病原体蛋白质的Bgag VLPs。在某些其他实施例中,该方法用于制备表达和呈现多亚型病原体蛋白质的Bgag VLPs。在某些其它实施方案中,所述方法包括使用包含Bgag基因和来自一种或多种不同类型的目标病原体的基因的DNA载体,所述目标载体全部串联组成并且各自在启动子,优选多角体蛋白启动子的控制下;一种载体病毒,优选rBV;和真核细胞,优选Sf9以制备表达一种或多种不同的目标病原体蛋白质的Bgag VLP。

[0165] 一种用于疫苗生产的改进方法

[0166] 表达一种或多种不同的目标病原体蛋白质的VLPs,例如在此公开的四亚型Bgag VLPs,优于传统的疫苗生产方法,因为它们不依赖于鸡胚,并且可以在单一生产周期中制备而不需要掺合疫苗也能有效地诱导针对多种目标病原体蛋白质的广谱免疫。在一个实施例中,所述方法涉及将流感HA,NA和Bgag基因克隆到单一的rBV载体中以用于Bgag VLP生产的蛋白质共表达。单个rBV载体的优点在于,这导致在感染的Sf9细胞中多个基因的共表达,其提供了更精简的方法和设计,从而易放大。此外,该方法允许将目标流感病毒蛋白质的菌株特异性抗原克隆到预制的包含标准Bgag和NA基因的rBV转移载体中,进一步精简了季节性流感疫苗的生产过程。例如,在此描述的四亚型Bgag VLP与当前的鸡胚依赖性三价掺合方法相比对季节性流感菌株是一种更优越的候选疫苗。总之,这种优越的设计和方法促进了载体制备并加快了VLP生产和疫苗制备。

[0167] 此外,在此描述的新型Bgag VLP在大流行病或新兴病毒的情况下是一种更可靠的疫苗生产系统。例如,大流行性流感或高毒性的新兴流感病毒会对传统的疫苗研制和生产造成严重的压力。大流行病或新兴流行性感冒病毒可在农业家禽品种中引起家畜流行病。

因此,除了威胁人类健康之外,大流行性流感或新兴流感病毒还会严重威胁健康的鸡和鸡蛋的供应,导致适合于疫苗生产的鸡蛋的短缺。由于除了流感以外的针对病原体,如黄热病,流行性腮腺炎和麻疹的疫苗的生产也很大程度上依赖于鸡蛋,所以家畜流行病会给这些依赖鸡蛋的疫苗的生产和供应带来额外的压力,从而进一步影响公众健康。

[0168] 至少由于这些原因,在此公开的新型单目标或多目标Bgag VLP在这些可怕情况发生期间和之前是一种重要的疫苗平台。而且,Bgag VLP平台可以为人类和/或动物提供一种快速,广谱的和强大的保护,防止危险的大流行病,家畜流行病或新兴的病原体。在涉及H5, H7, H9和/或H10禽流感病毒的爆发中,在此公开的H5/H7/H9/H10四亚型流感疫苗将是有价值的第一道防线,尤其当替代疫苗是还不可用时。

[0169] Bgag VLP作为一种优越的候选疫苗

[0170] 除了说明书其他地方描述的益处外,新型Bgag VLP还是一种优越的候选疫苗,尤其是一种优越的人类候选疫苗。一个原因是因为内核蛋白质Bgag与人类病原体没有相当的同源性。BIV不是人类病原体,因此人类通常不具备对来自BIV诸如Bgag的蛋白质的预存免疫性。用缺省参数使用NCBI BLASTP软件的Bgag的序列分析显示,与猫免疫缺陷病毒的最近似的遗传相似性仅约为29%,与马传染性贫血病毒的遗传相似性约为26%。此外,本发明人已经检测到BIV和包括HIV gag蛋白质的人逆转录病毒gag蛋白质之间没有相似性。因此,Bgag介导的VLPs作为人类疫苗候选具有显著的优势,因为它能够避开宿主的预存免疫性,并且能够诱发比其他诸如M1 VLPs的VLPs更强以及更强健的免疫应答。

[0171] 在某些实施例中,每个Bgag VLP包含大的表面积,优选大于其中目标蛋白质之一源自的病原体的表面积。如本说明书中所公开的,具有较大尺寸的Bgag VLP优于较小的M1 VLPs。大的表面积对于呈现多个目标蛋白质的Bgag VLPs尤其重要,诸如实施例11中所述的H5/7/9/10 Bgag VLPs,其中多个HA亚型共定位于相同的VLP包膜。发明人在此表明与M1 VLPs约120nm至约150nm的平均值相比,新型Bgag VLPs具有约150nm至约180nm的平均直径(参见例如图6-7)。与M1 VLP相比,这种增加的VLP尺寸为更多将由Bgag VLPs呈现的目标病原体蛋白质产生了实质上更大的表面积。例如,与M1 VLPs相比,更多HA三聚体可以定位并由Bgag VLPs呈现。(见图6-7)

[0172] 在某些实施例中,每个Bgag VLP在VLP膜上包含平均超过约375个蛋白突刺,优选约375个突刺到约800个突刺,更优选约475个突刺到约800个突刺,更优选约575个突刺到约800个突刺,更优选约675个突刺到约800个突刺,更优选约775个突刺到约800个突刺,并且进一步优选约800个突刺。据估计,一个平均直径为120nm的球形病毒体估计含有约375个突刺(Harris et al., 2006)。假设三聚体分布均匀,一个直径约为180nm的VLP可容纳约800个突刺,是直径仅为120nm的VLP的突刺数量的两倍以上。因此,Bgag VLP作为候选疫苗优于M1VLP,因为它可以更有效地诱发宿主免疫应答并且可以诱发更强健的宿主免疫应答。

[0173] 使用Bgag基因或Bgag蛋白作为诊断工具

[0174] 在某些实施例中,Bgag基因或Bgag蛋白质被用作一种诊断工具。现有疫苗和诸如M1VLP疫苗的其他VLP疫苗的问题之一是鉴别接种疫苗的受试者与未接种疫苗的受试者的问题。这对Bgag VLP系统可能不是问题。例如,如在此所公开的,与M1不同,人类和某些动物通常不暴露于Bgag基因或Bgag蛋白质。因此,医学专业人员可以使用Bgag基因或Bgag蛋白质来确定受试者先前是否接种了Bgag VLP疫苗。由于M1基因和M1蛋白质在人类和某些动物

种群中无处不在,所以这种诊断能力在例如M1VLP介导的疫苗中是不可能的。这在兽医应用中也可能是特别重要的,例如,当鉴别接种疫苗的动物和受感染的动物(“DIVA”)时是重要的(Rahn et al.,2015;Suarez,2012)。

[0175] 具有目标核酸的Bgag VLPs

[0176] 也可以将核酸掺入Bgag VLPs中以诱导或增强目标的免疫应答。我们最近的数据表明RNA可以被掺入到Bgag VLPs中(参见例如图25-27)。Bgag VLP集合是在没有感染性BIV RNA和BIV env蛋白质的情况下完成的。因此,在VLP中发现的RNA的存在可能源自于Sf9细胞。不受特定理论的束缚,我们相信Bgag VLP结构中存在的RNA可以诱导或增强免疫应答。基于在Bgag VLP产生过程中可以包封RNA的理论,被包封的RNA被认为是免疫调节剂并且可以增强免疫应答,Bgag VLP中RNA的存在可以诱导或增强受试者的免疫应答。再如,Coffman等人(2010)认为RNA可以是TLR7To11样受体的天然激动剂,并且具有免疫刺激特性,可以通过激活包括TLR7在内的先天免疫作为佐剂起作用。就申请人所知,在Bgag VLP的结构中包括这种类型的RNA的Bgag VLP的制备以及这种类型的RNA在Bgag VLP中的事实和这种效果尚未被人们获知和/或描述过。

实施例

[0177] 实施例1

[0178] 用于生产Bgag VLPs和M1VLPs的重组转移载体质粒的产生

[0179] 获得了内核蛋白质和目标病原体蛋白质的蛋白质序列。基于所示的蛋白质序列,为在Sf9细胞中的高水平表达,基因被密码子优化(Life Technologies,卡尔斯巴德,加利福尼亚州),并生化合成(金斯瑞公司,皮斯卡塔韦,新泽西州)。为了产生VLPs,将内核蛋白质Bgag或M1基因以及诸如流感HA和NA的一种或多种不同目标病原体蛋白质的基因串联克隆塑造造成杆状病毒转移载体质粒,使得每个基因都在其自身的转录盒内,其包括每个基因上游的多角体蛋白启动子。图1显示了四个示例性示意图。将构建体克隆到草地贪夜蛾(“Sf9”)细胞中的重组杆状病毒(“rBV”)中。为在昆虫细胞中的高水平表达,内核蛋白的基因,NA和HA被密码子优化,并如所示的那样被串联克隆到rBV中。每个构建体含有一组多角体蛋白启动子,其在第一构建体中代表性地显示为箭头。该过程基本上如(Pushko et al.,2005)中所述,其通过引用并入本文。在所示的例子中,所有的HA基因都是HA1(“H1”)并且源自于相同的甲型流感/波多黎各/8/1934(H1N1)(“PR8”)病毒(显示为黑色盒子)。但是,事实并非如此。与NA基因一样,HA基因可以选自相同的PR8病毒(显示为黑色盒子)或一种不同的病毒,如甲型流感/印度尼西亚/5/2005(H5N1)(“IN/5”)病毒(显示为灰色盒子)。包含内核蛋白质BIV gag(“Bgag”)或M1的构建体被制成。M1 VLP作为控制。在所示的实例中,M1基因(以虚线框显示)选自于IN/5病毒。

[0180] 流感病毒VLP HA和NA蛋白质的表达和功能概况显示于图2-5中。

[0181] 由图1的四种构建体中的每一种构建体产生的流感VLPs呈现了使用火鸡红细胞的血凝反应测定证实的功能性HA蛋白质(参见图2)。包含图1的四种构建体中的每一种构建体的rBV被用于感染Sf9细胞。在受感染的第3天从Sf9细胞中纯化流感VLPs,并进行血凝反应测定。火鸡红细胞从1:56稀释开始以2倍的间隔连续稀释。将纯化的VLPs加入到每个孔中。最右侧的孔含有PBS缓冲溶液,并被用作阴性对照。在该测定中,来自VLPs的功能性HA结合

火鸡红细胞,产生不会沉淀的红细胞晶格,从而在孔中形成扩散的外观。在阴性对照中,不存在功能性HA来形成红细胞晶格。因此,红细胞从溶液中沉淀出来,并在孔的中心呈现点状。该血凝反应试验的结果表明由所有四种构建体制备的VLPs表达了功能性HA,HA定位于VLP的膜上并且HA存在于VLP的表面上。

[0182] 由图1的每个构建体产生的流感VLPs表达了使用H1特异性单克隆抗体的蛋白质免疫印迹中所证实的H1蛋白质(见图3)。以千道尔顿为单位的标记被标记在最右边。H1蛋白质的位置用箭头表示。

[0183] 由图1的1-2构建体产生的流感VLPs含有内核蛋白质Bgag,而由图1的3-4构建体产生的流感VLPs含有内核蛋白质M1(参见图4)。将来自四种构建体的每一种的VLPs加到SDS-PAGE凝胶中并用考马斯染色以评估VLP蛋白质表达谱。以千道尔顿为单位的蛋白质标记被标记在最右边。HA,Bgag和M1蛋白质的位置用箭头表示。

[0184] 由图1的每个构建体产生的流感VLPs包含功能性NA(参见图5)。连续稀释来自图1的每种构建体的VLPs,并使用包含NA-Fluor和甲基伞形酮N-乙酰神经氨酸的荧光测定来评估NA的酶活性。NA的酶活性以相对荧光单位(“RFU”)测量。所示的VLP构建体如下:构建体1是实心方形,构建体2是空的菱形,构建体3是空的圆形,构建体4是实线。PBS阴性对照显示为实心三角形。标准化线显示为虚线。该荧光测定的结果显示所有四种构建体均表达功能性NA。

[0185] 在透射电子显微镜下观察,包含内核蛋白质Bgag的VLPs具有与流感病毒相同的形态(参见图6)。VLPs用1%磷钨酸染色。标尺标记了100nm。

[0186] 在透射电子显微镜下使用与图6相同的条件观察(见图7),包含内核蛋白质M1的VLPs具有与流感病毒相同的形态。

[0187] 蛋白质序列来源的例子如下。

[0188] BIV R-29gag:GenBank,登记号AAA42763.

[0189] 流感IN/05M1:GenBank登记号ABI36004.

[0190] 流感PR8HA:GenBank登记号ABP64731,

[0191] 流感VN/04HA:GenBank登记号AAW80717,

[0192] 流感SH/13HA:GenBank登记号YP_009118475,

[0193] 流感HK/09HA:GenBank登记号AG017847,

[0194] 流感JX/13HA:GenBank登记号AHK10762,

[0195] 流感PR8NA:GenBank登记号ABD77678

[0196] 流感IN/05NA:GenBank登记号ABW06107.

[0197] Ebola EboMay GP:序列列在图17中.

[0198] Ebola EboMay GP-TMCT:序列列在图18中.

[0199] 基因序列来源的例子。

[0200] 流感HA基因序列源自于PR8,VN/04,SH/13,HK/09和JX/13病毒。

[0201] 实施例2

[0202] 用于生产四亚型Bgag VLPs的重组转移载体质粒的产生

[0203] 将Bgag和四种不同的目标病原体蛋白质的蛋白质序列进行密码子优化,并将各个蛋白质的基因如实施例1克隆到单一的杆状病毒转移载体质粒中。例如,基本上如图13所

示,将不同的大流行性流感HA的四个全长基因以及流感IN/05NA基因克隆到转移载体质粒中。

[0204] 实施例3

[0205] 用于生产Bgag VLPs和M1VLPs的rBV的产生

[0206] 使用Bac-to-Bac杆状病毒表达系统 (Life Technologies, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州) 从DH10Bac大肠杆菌中分离含有具有Bgag VLPs重组基因的全长感染性杆状病毒DNA的杆状病毒质粒,并用于转染Sf9细胞以产生rBV。rBV的制备随后进行菌斑纯化。在Sf9细胞中通过标准噬菌斑测定来确定rBV制剂的滴度。

[0207] 在SF900II-SFM昆虫无血清培养基 (Life Technologies, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州) 中,在27℃将Sf9细胞维持为悬浮培养物。为了生产VLPs,使用 2×10^6 cells/ml的Sf9细胞,并以3.0的感染复数(“MOI”)感染72小时,其中rBV表达目标基因。从生长培养基上清液中收集VLPs,通过0.2 μ m膜过滤澄清,然后浓缩并通过在磷酸盐缓冲盐水(“PBS”)中使用20% (w/v) 蔗糖分级梯度来纯化。或者,首先通过如别处所述的离子交换色谱法 (Liu et al., 2015) 将VLPs纯化,并且随后通过超速离心进行纯化。

[0208] 实施例4

[0209] VLPs的评估

[0210] SDS-PAGE在4-12%聚丙烯酰胺凝胶 (Life Technologies, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州) 中完成,然后用GelCode蓝染色 (皮尔斯, 罗克福德, 伊利诺伊州)。

[0211] 蛋白质免疫印迹是通过使用特异性一抗,随后碱性磷酸酶标记山羊抗白鼠IgG (H+L) 完成。使用一抗的实例有:抗HA进化枝1甲型流感H1N1病毒IT-003-001M14小鼠IgG1单克隆抗体 (MAb), 克隆15B7;抗H5 (H5N1) IT-003-005M6小鼠IgG2a MAb, 克隆268D8;抗HA (H7N9) (甲型/上海/1/2013) IT-003-0073M1小鼠IgG1MAb, 克隆9B12;抗H9 (甲型/香港/33982/2009) (H9N2) IT-003-0094M5小鼠IgG1MAb, 克隆17D8;和抗H10 (甲型/蓝翅鸭/路易斯安那州/Sg-00073/07 (H10N7)) IT-003-034兔多克隆抗体 (Immune Technology, 纽约, 纽约州)。

[0212] 通过使用Qubit 2.0荧光测定法测定VLPs的蛋白质浓度 (Life Technologies)。

[0213] 血凝反应功能测定通常如下进行。VLPs在96孔板中以50 μ l体积2倍增量连续稀释。向每个VLP稀释液中加入50 μ l 1%的火鸡红细胞 (RBC) 工作液,温和搅拌VLPs和RBCs的混合物,并且在检查前将板在室温下孵育30-60分钟。阴性血凝反应结果在孔的中心呈现点状。滴度以产生正读值的最高稀释因子计算。血凝反应试验的阳性结果证明,VLPs表达了功能性HA,HA定位于VLP的膜上并且HA存在于VLP的表面。

[0214] 流感NA酶功能试验通常如下进行。根据制造商的说明书,使用甲基伞形酮N-乙酰神经氨酸 (MUNANA; 西格玛, 圣路易斯, 密苏里州) 作为底物,使用基于荧光的NA测定法 (NA-Fluor, Life Technologies) 测定功能性神经氨酸酶活性。使用稀释剂 (盐水或PBS) 作为阴性对照。

[0215] 透射电子显微镜是通过将VLP样品吸收到新鲜排出的400目碳火棉胶片涂覆的铜网 (Poly-Sciences, 沃灵顿, 宾夕法尼亚州) 上来完成的。用含有20mM pH 7.4的三羟甲基氨基甲烷=和120mM KCl的缓冲液冲洗栅格,并用1%磷钨酸负染,然后抽吸干燥。VLPs在80kV下操作的日立H-7600透射电子显微镜 (日立高新技术美国公司, 绍姆堡, 伊利诺斯州) 上是可视化的,并且用1k \times 1k分辨率的CCD照相机 (Advanced Microscopy Techniques Corp.,

丹佛斯,马萨诸塞州)以数字方式捕获。

[0216] rBV的基因稳定性和Bgag VLPs表达的稳定性可以通过标准方法证实,例如在载体细胞中rBV连续传代,并且可以评估含有目标蛋白质的VLPs的表达。例如,通过首先以MOI为0.01在Sf9细胞中五次通过包含四亚型流感Bgag VLP的rBV,其后在血凝反应功能试验中表达VLPs并测量功能性HA的存在能够证明四亚型流感Bgag VLP的表达是稳定的(参见例如图22)。如图22所示,在来自通道P1通过P5的rBV感染的Sf9细胞中制备的四亚型Bgag VLPs的血凝反应试验。从感染rBV的S9细胞上清液收集Bgag VLPs,通过0.22 μ m孔径的膜过滤,通过超速离心浓缩100倍,并重悬于PBS中。从1:128的VLP稀释液开始使用火鸡RBC进行血凝反应试验。作为阴性对照,标记为NC,使用PBS代替VLPs。

[0217] 目标病原体蛋白质在Bgag VLPs中的共定位可以通过例如免疫沉淀或免疫电镜的标准方法来证明。例如,通过首先使用SureBeads磁珠(伯乐,赫克力斯,加利福尼亚州)以及一种抗H5抗体首次免疫沉淀H5/H7/H9/H10流感Bgag VLP,可以表明H9,H10和H7在H5/H7/H9/H10流感Bgag VLP上与H5共定位。SureBeads首先可以在20℃与抗H5抗体结合1小时。任何未结合的抗H5抗体都可以被洗掉。其后将Bgag VLPs孵育至抗H5抗体的SureBeads。任何未绑定到SureBeads的Bgag VLPs都被冲走。所捕获的Bgag VLPs可以用Laemmli缓冲液在70℃下洗脱10分钟,其后使用抗H7,抗H9和/或H10抗体在SDS-PAGE和/或蛋白质免疫印迹上进行分析以确认HA目标蛋白质的共定位(参见例如图23)。作为另一个例子,共定位也可以通过用免疫电镜本质上描述来证明(Pushko et al.,2011)。

[0218] 如图23中的图a所示,通过使用H5-特异性MAb的免疫沉淀反应,接着使用H5-,H7-和H9-特异性MAbs以及H10-特异性兔子抗血清的蛋白质免疫印迹,证明了不同亚型的HA共定位到相同四亚型H5/7/9/10VLPs。样品1-5分别代表rH5,rH7,rH9,rH10和四亚型Bgag VLP抗原。C为PBST缓冲液,代表免疫沉淀反应的阴性对照。

[0219] 存在于Bgag VLP中的每种类型的目标病原体蛋白质的量也可以通过标准方法如半定量蛋白质免疫印迹来确定。例如,H5/H7/H9/H10流感Bgag VLP上存在的H5,H7,H9和H10的量可通过将四亚型Bgag VLP与纯化的H5,H7,H9,H10蛋白质标准品,通过使用Qubit 2.0荧光检测法(Life Technologies)比较来测定。纯化的HA蛋白质标准品的浓度可以通过比较其在染色的SDS-PAGE上的密度测定与已知浓度的BSA标准品来测量。BSA标准品的线性标准曲线可以使用NIH ImageJ软件生成,并且可以确定纯化的HA蛋白质标准品的量。为了确定四亚型Bgag VLP中每种HA蛋白质的浓度,可以进行半定量蛋白质免疫印迹,其中通过密度测定法测量四亚型Bgag VLP的条带强度,并与有已知浓度的HA标准品进行比较(例如参见图23和24)。

[0220] 如图23中的图b所示,可以通过半定量蛋白质免疫印迹来测量Bgag VLP上HA亚型的分布。如图b的上图所示,通过考马斯蓝染色的SDS-PAGE和密度测定法确定rH5,rH7,rH9和rH10单亚型Bgag VLP和H5/7/9/10四亚型Bgag VLP。道5中54kDa的条带代表考马斯蓝染色的Bgag蛋白质。在较下面的图中,用指示的抗体进行蛋白质免疫印迹。通过将VLP道中的条带强度与已知量的相应rHA参照抗原的条带强度进行比较,使用蛋白质免疫印迹来确定VLP内的每个HA亚型的含量。样品1-7分别代表rH5,rH7,rH9和rH10单亚型Bgag VLP和四亚型H5/7/9/10Bgag VLP,0.2mg/ml BSA(5 μ l)和0.1mg/ml BSA(5 μ l)。M代表See Blue Plus2蛋白质分子量梯(Life Technologies)。

[0221] 基于半定量蛋白质免疫印迹,测定了HA在四亚型Bgag VLP中的分布(参见例如图24)。

[0222] 实施例5

[0223] PR8 H1 Bgag VLPs的制备

[0224] 基本上如实施例1-实施例3描述,通过使用在Sf9细胞介导的重组杆状病毒(rBV)表达系统中的Bgag和流感PR8蛋白质制备VLPs。基本上如图1所示,将流感PR8 H1与全长Bgag和NA基因一起克隆到rBV中。NA基因源自流感PR8或IN/05病毒。为了比较目的,发明人还用M1基因代替Bgag基因产生rBV。总之,基本上如图1所示,制备了四种rBV载体。每种rBV含有三个串联的基因,每个基因在其自身的表达盒内的多角体蛋白启动子控制下。MOI为3的条件下用rBV感染Sf9细胞并孵育72小时以允许表达VLPs。从感染细胞的生长培养基中收集VLPs,浓缩并通过超速离心进行部分纯化。使用基本上在实施例4中描述的方法在图2至7中显示了VLPs的评估。

[0225] 如图2所示,所有四种VLPs制剂都显示出与火鸡RBC具有大约相等的滴度的HA活性。如图3所示,通过蛋白质免疫印迹使用H1特异性抗体检测了预期63.44千道尔顿(kDa)(565个氨基酸残基)的PR8 H1的表达。与先前的观察(Perrone et al.,2009;Pushko et al.,2011;Pushko et al.,2005)一致,PR8H1被表达成全长HA₀多肽,其中蛋白质免疫印迹未检测到加工成的HA₁和HA₂。在染色的SDS-PAGE上,如图4所示,分别以约63kDa,54kDa和28kDa的预期分子量检测蛋白质HA,gag和M1的条带。

[0226] 与先前的研究一致,蛋白质免疫印迹或SDS-PAGE未检测到流感NA。然而,如图5所示,VLPs在功能性NA测定中表现出NA酶活性,确认了VLPs中存在功能性NA蛋白质。与含有PR8NA的VLPs相比,含有IN/5NA的VLP制剂中NA酶的活性更高。IN/5NA和PR8NA都属于N1亚型,共有83%相同的氨基酸残基。尽管NA的活性差异,发明人观察到几乎相等的HA表达,如图2-4所示。

[0227] 最后,电子显微镜检查确认了VLP制剂中存在包膜颗粒(图6-7)。Bgag VLPs的直径约为150-200nm,然而M1VLPs的直径约为120-150nm。

[0228] 总之,这些结果确认了表达和呈现HA和NA、蛋白质的Bgag VLPs的形成。

[0229] 实施例6

[0230] JX/13 H10 Bgag VLPs的制备

[0231] 发明人使用基本上如实施例1-实施例3和实施例5中所述的方法和原理已经制备了包含新兴流感病毒株,如JX/13(H10N8)禽源病毒的Bgag VLPs。在2013年,JX/13(H10N8)流感病毒已经引起人类感染,被确定为大流行病关注的病原体(Garcia-Sastre and Schmolke,2014;To et al.,2014)。JX/13(H10N8)流感病毒最初是从中国老年患者中分离出来的,他们因感染而死亡(Garcia-Sastre and Schmolke,2014;To et al.,2014)。

[0232] rBV配置为表达三种基因,即来源于JX/13流感病毒的H10基因,NA基因和Bgag基因。图1显示了在Sf9细胞中表达包含HA 10(“H10”)的流感VLP的rBV构建体的示例性示意图。如图所示,内核蛋白质Bgag,NA和HA的基因在昆虫细胞中为高水平表达进行了密码子优化,并串联克隆到rBV中。每个构建体含有箭头所示的一组多角体蛋白启动子。在所示的例子中,HA基因源自甲型/江西/IPB13a/2013(H10N8) (“JX/13”)病毒(显示为黑色盒子),NA基因源自IN/5病毒(显示为灰色盒子)。所得的rBV用于感染Sf9细胞以制备JX/13H10VLPs。从

2L的Sf9生长培养基中收获由H10, NA和Bgag组成的VLPs, 并通过离子交换色谱法进行纯化。使用基本上在实施例4中描述的方法, 图9-12和15中显示了HA和NA蛋白质的流感病毒VLP形态以及表达和功能概况。

[0233] 如图8的构建体产生的流感VLPs包含如在血凝反应试验中所证明的功能性HA蛋白质。火鸡红细胞以 $1:2^{10}$ 稀释开始以2倍的间隔连续稀释。H10Bgag VLP显示出HA的功能活性, 其滴度为每50ul的3.5mg/ml总的蛋白质 $1:8192$ 或 $1:2^{13}$ 。该血凝反应试验的结果显示, 由图8的构建体制备的VLPs表达了功能性HA, HA定位于VLP的膜上, 并且HA存在于VLP的表面。

[0234] 由图8的H10构建体和图13的四亚型H5/7/9/10产生的流感VLPs表达了通过蛋白质免疫印迹证实的相关的HA蛋白质(参见图10)。用抗H10N7兔子抗体, 抗H5N1单克隆抗体, 抗H7N9单克隆抗体和抗H9N2单克隆抗体对H10VLPs(道1), 四亚型H5/7/9/10VLPs(道2), 对照H5VLPs(道3)染色。标注了千道尔顿标识。HA蛋白质的位置用箭头表示。结果显示H10Bgag VLP在蛋白质免疫印迹中与H10特异性抗体反应(见图10道1), 但不与H5-, H7-或H9-特异性抗体交叉反应(见图10)。HA和Bgag条带均可通过染色SDS-PAGE检测。

[0235] 功能性NA的酶活性也被确认了(参见图15)。H10和Bgag蛋白质的条带也通过染色SDS-PAGE被检测到了(参见图11, 道1)。

[0236] 由图8的构建体产生的H10 VLPs使用图6中所述的条件在透射电子显微镜下观察具有与流感病毒相同的形态(参见图12)。包膜的H10 VLP直径约为150-180nm。

[0237] 实施例7

[0238] 仅具有HA或NA的Bgag VLPs的制备

[0239] 还可以使用实施例1-实施例6中基本描述的方法和原理, 仅使用HA或NA作为目标病原体蛋白质来制备和评估Bgag VLPs。

[0240] 实施例8

[0241] 具有基因修饰的HA和/或NA的Bgag VLPs的制备

[0242] 还可以使用实施例1-实施例7中基本描述的方法和原理, 通过使用基因修饰的HA和/或NA来制备和评估Bgag VLPs。

[0243] 使用类似的原理和方法, Bgag VLPs使用基因修饰的NA。例如, Bgag VLPs可被设计为仅包含NA的部分序列。

[0244] 实施例9

[0245] 具有非流感目标病原体蛋白质的Bgag VLPs的制备

[0246] Bgag VLPs的制备和评估还可以通过使用实施例1-实施例8中基本描述的方法和原理使用其他非流感病原体的目标蛋白质来进行。例如, Bgag VLPs可以通过使用埃博拉病毒糖蛋白(GP)如EboMay GP制备, 其蛋白质序列如图17所示。此类VLPs可诱导对埃博拉病毒糖蛋白的免疫应答, 并可用作疫苗预防埃博拉病毒感染。

[0247] 作为另一个实例, 使用相同的方法和原理, 可以使用来自其他线状病毒的目标蛋白质制备Bgag VLPs。所得的Bgag VLP作为泛线状病毒疫苗非常有用。

[0248] 作为另一个实例, Bgag VLPs也可以通过使用MERS突刺糖蛋白来制备。所得的Bgag VLP作为预防MERS感染的疫苗是非常有用的。作为另一个实例, Bgag VLPs也可以使用来自其他冠状病毒的目标蛋白质来制备。所得的Bgag VLP作为冠状病毒的疫苗非常有用。

[0249] 作为进一步的例子, Bgag VLPs也可以通过使用来自包膜和无包膜病毒的其他抗

原来制备。例如,Bgag VLPs也可以通过使用HIV包膜糖蛋白来制备。所得的Bgag VLP作为抗HIV感染的疫苗是非常有用的。也可以使用来自其他逆转录酶病毒的目标糖蛋白来制备Bgag VLPs以制备针对逆转录酶病毒的疫苗。

[0250] 实施例10

[0251] 具有嵌合目标病原体蛋白质的Bgag VLPs的制备

[0252] 还可以使用基因修饰的目标病原体蛋白来制备和评估Bgag VLPs,以使用实施例1-实施例9中基本描述的方法和原理来优化与Bgag的相互作用。例如,目标包膜病毒的糖蛋白可以被修饰以创造嵌合糖蛋白。如图18所示,本发明人已有通过基因修饰EboMay GP以包含流感HA蛋白质EboMay TMCT的跨膜区和C-末端来制备这样一个嵌合目标病原体蛋白质的实例。流感HA跨膜区和C-末端蛋白质序列带下划线。使用实施例4中基本描述的某些方法,在图19至21中显示了VLPs的纯化和评估。

[0253] EboMay GP-TMCT VLPs表达了如通过蛋白质免疫印迹证实的相关的埃博拉病毒蛋白质(参见图19)。将从离子交换色谱柱(“IECC Fxn 1”)收集的峰级分的EboMay GP-TMCT VLP级分1加载到蔗糖梯度上并通过超速离心进一步纯化。用抗埃博拉病毒抗血清对来自蔗糖梯度的1-28级分的14个汇集的级分(“Fxn s”)染色。

[0254] EboMay GP-TMCT VLPs表达了如通过用考马斯蓝染色的SDS-PAGE凝胶证实的Bgag及相关的埃博拉病毒蛋白质(参见图20)。道1是来自IECC Fxn1的合并峰蔗糖梯度Fxn s 9-10。埃博拉病毒糖蛋白和Bgag在凝胶的最左侧用箭头标记。结果显示,在纯化的VLPs中都存在埃博拉病毒糖蛋白和Bgag,因为它们在同道1中共纯化。道2是来自IECC Fxn3的合并峰蔗糖梯度Fxn 7-8。杆状病毒蛋白质GP64,P39和P10用在凝胶的最左侧的箭头标记。结果表明,IECC Fxn 3主要含有杆状病毒污染物,含有Bgag VLPs的埃博拉病毒糖蛋白可从杆状病毒污染物中纯化出来。

[0255] 在透射电子显微镜下观察,EboMay GP-TMCT VLPs具有大致球型包膜形态(参见图21)。标尺标记了500nm。

[0256] 与表达其它目标病原体蛋白质的Bgag VLPs一样,EboMay GP VLP和EboMay GP-TMCT Bgag VLP均可诱导对埃博拉病毒病毒糖蛋白表位的免疫应答,并可作为疫苗预防埃博拉病毒感染。例如,将EboMay GP Bgag VLP和EboMay GP-TMCT Bgag VLP注射或以其他方式接种受试者以在受试者中诱导免疫应答。然后通过标准测定法来确定接种的受试者对埃博拉病毒的免疫应答。例如,在2至4周内,抽取接种疫苗的受试者的血液,通过ELISA,免疫荧光抗体测定或其他抗体检测测定来测定抗-埃博拉病毒抗体(或更具体地抗EboMay GP抗体),并比较未接种疫苗的受试者的抗体谱。接种疫苗的受试者中抗埃博拉病毒抗体的存在表明Bgag VLP已经在受试者中诱发了免疫应答,因此在体内是免疫原性的。标准攻毒试验也可以证明Bgag VLP的功效。例如,血清阳性的接种疫苗受试者在高防护的实验室中接受致病性埃博拉病毒攻击,以评估Bgag VLP疫苗在预防引起埃博拉病毒性疾病方面的有效性。攻击后接种疫苗的受试者的存活表明Bgag VLP疫苗的保护效力。

[0257] 实施例11

[0258] 四亚型H5/7/9/10Bgag VLPs的制备

[0259] 本发明人已经使用基本上在实施例1-实施例10中描述的方法和原理制备和评估了第一种四亚型Bgag VLPs。发明人已经使用了源自四种禽源流感病毒的HA蛋白质,例如

H5N1, H7N9, H9N2和H10N8亚型。高致病性禽流感H5N1病毒,进化枝1VN/04最初是从致命的人类病例中分离出来的(Maines et al., 2005)。H7N9病毒,SH/13是从患有致命疾病的住院患者中分离出来的(Gao et al., 2013)。H9N2病毒,G1进化枝的HK/09最初是从成年女性患者的鼻咽抽吸物中分离的(Cheng, 2010)。JX/13(H10N8)流感病毒最初是从因感染而死亡的中国老年患者中分离出来的(Garcia-Sastre and Schmolke, 2014; To et al., 2014)。

[0260] 为了制备四亚型VLPs,如实施例2中所述制备rBV转移载体质粒以共同表达来自VN/05, SH/13, HK/09和JX/13流感的HA基因,来自IN/05的NA基因和Bgag基因。H5, H7, H9和H10基因编码长度分别为568个氨基酸, 560个氨基酸, 560个氨基酸和561个氨基酸,且预测的平均分子量分别为64.5kDa, 62.1kDa, 62.9kDa和62.3kDa的多肽。NA和Bgag的长度分别为449个氨基酸和476个氨基酸,预期分子量分别为49.1kDa和53.5kDa。

[0261] 在图13中显示了在Sf9细胞中表达流感准亚型H5/7/9/10Bgag VLPs的rBV构建体的示例性示意图。内核蛋白质Bgag, NA和HA的基因在昆虫细胞中为高水平的表达而密码子优化,并如图所示被串联克隆到rBV中。每个构建体含有一组箭头所示的多角体蛋白启动子。在所示的实例中, H10基因源自于JX/13病毒, HA₉ (“H9”) 基因源自于甲型/香港/33982/2009 (H9N2) (“HK09”) 病毒, HA₅ (“H5”) 基因源自于甲型 (H5N1) 甲型/越南/1203/2004 (H5N1) (“VN/04”) 病毒, HA₇ (“H7”) 基因源自甲型/上海/2/2013 (H7N9) (“SH/13”) 病毒, NA基因源自于IN/5病毒。所有HA基因显示为黑色盒子, NA基因显示为灰色盒子。

[0262] 为了制备VLPs, MOI为3时用rBV感染Sf9细胞以允许H5, H7, H9, H10, NA和gag基因的表达,并且在感染后第3天从培养物上清液中收集VLPs。通过离心以及通过0.2μm膜过滤来澄清来自感染的Sf9细胞的生长培养基。随后通过离子交换色谱法纯化VLPs。

[0263] 用基本上在实施例4中描述的方法于图10-11, 14-16中示出流感VLP形态以及HA和NA蛋白质表达和功能概况。

[0264] 如图13的构建体产生的流感病毒VLPs包含功能性HA蛋白质,如在血凝反应试验中所证明的(参见图14)。H5/H7/H9/H10VLPs凝集火鸡RBCs的机能能力通过血凝反应试验确认。在该测定中,将VLPs稀释液与WHO建议的火鸡RBCs混合,作为动物流感诊断和监测的试剂(WHO, 2012b)。具体地,火鸡红细胞以1:2¹⁰稀释开始以2倍的间隔连续稀释。流感H5/7/9/10Bgag VLP的滴度为每50ul的3.5mg/ml总的蛋白的1:8192或1:2¹³。该血凝反应试验的结果显示由图13的构建体制备的VLPs表达了功能性HA, HA定位于VLP的膜上并且HA存在于VLP的表面上。

[0265] Bgag和HA蛋白质的存在通过使用对每种HA特异的抗体的SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹确认,如图10-11道2所示。蛋白质免疫印迹未检测到NA,表明与蛋白质免疫印迹中使用的抗血清具有低水平的交叉反应性(参见图10)。

[0266] 在图11中,流感VLPs产生了图8的H10构建体,并且显示了图13的四亚型H5/7/9/10表达HA和内核蛋白质Bgag。来自每个两种构建体的VLPs被加载到SDS-PAGE凝胶中并用考马斯染色以评价VLP蛋白质谱。以千道尔顿为单位的蛋白质标记物标记在最右边。HA的位置用箭头表示, Bgag的位置用星号表示。VLPs中的HAs代表约62-64kDa的未分解的HA⁰多肽。如图11道2所示,通过SDS-PAGE检测对应于Bgag蛋白质的大约55kDa的条带。

[0267] 在图15中,由图8的H10构建体和图13的四亚型H5/7/9/10构建体产生的流感VLPs显示了含有功能性NA。连续稀释来自每种构建体的VLPs,并使用基于荧光的流感NA测定来

评估NA的酶活性。所示的VLP构建体如下：H10 VLP是实心正方形，并且四亚型H5/7/9/10VLPs是实心三角形。阴性对照PBS显示为实心圆。该荧光测定的结果显示两种构建体均表达了功能性NA。在图15中确认了四亚型VLPs中功能性NA的存在。

[0268] 总之，这些结果表明所有HA蛋白质，NA和Bgag蛋白质存在于由Sf9细胞产生的四亚型VLPs中，并通过超速离心或层析共纯化。

[0269] 由图13的构建体产生的四亚型H5/7/9/10VLPs使用基本上在实施例4中描述的方法在透射电子显微镜下观察到具有与流感病毒相同的形态（参见图16）。四亚型H5/H7/H9/H10VLPs被确定为直径大约150-200nm的主要是球形的，流感样的，多晶的包膜颗粒，并且包含从VLP包膜突出的典型的流感HA突刺，如图16所示。

[0270] 实施例12

[0271] 其他四亚型和多亚型Bgag VLPs的制备

[0272] 其他四亚型Bgag VLPs或多亚型Bgag VLPs的制备和评估可以使用基本上在实施例1-实施例11中描述的方法和原理完成。例如，可以制备包含H1，H2，H3的多亚型Bgag VLPs和其他亚型。

[0273] 另外，还可以使用基本上在实施例1-实施例11中描述的方法和原理制备和评估包含流感B HA的多亚型Bgag VLPs。

[0274] 另外，可以使用基本上在实施例1-实施例11中描述的方法和原理制备和评估包含相同病毒亚型的目标蛋白质变体的多变体Bgag VLPs。例如，H5N1病毒的不同变体（进化枝）可以被并入到Bgag VLPs中。例如，我们已经制备了多变体Bgag VLPs，其中与人类疫苗相关的三种H5N1 HA变体在VLPs中共表达。例如，我们准备的H5N1HA可以源自于高致病性禽流感H5N1病毒甲型/越南/1203/2004，甲型/埃及/3300-NAMRU3/2008和甲型/湖北/1/2010，所有这些都是WHO为H5N1疫苗研制而建议的。例如，我们还制备了多变体Bgag VLPs，其中在VLP中共表达了与兽用（家禽物种）疫苗相关的三种H5N1HA变体。

[0275] 实施例13

[0276] 一种H10Bgag VLP疫苗的制备

[0277] 基本上按照实施例6所述，使用来自JX/13禽源流感H10N8病毒的一种H10制备用于接种疫苗的H10Bgag VLP。2013年JX/13流感病毒在中国的老年患者中引起致命的人类感染并被鉴定为大流行病关注的病原体。基本上如实施例1至实施例5中所述，rBV载体被配置以共表达H10，NA和Bgag三种基因。所得的rBV用于感染Sf9细胞以制备单一亚型H10 Bgag VLP，例如在图28的图A中所示。

[0278] 从Sf9细胞产生的Bgag VLP随后基本如例如实施例3所述进行纯化。含有Bgag VLPs的滤液通过膜迁移并变成滤液部分，而rBV载体颗粒被膜分离。这是通过阴离子交换色谱法被确认的。例如，阴离子交换色谱法显示Bgag VLP与rBV分离并存在于滤液部分中（参见例如图28图A）。在接种疫苗之前，可以将Bgag VLPs配制在PBS中。

[0279] 与先前的观察一致，H10 Bgag VLP中的HA被表达为HA₀，具有大约60-64kDa，并且没有检测加工的HA₁和HA₂（参见例如图28，图A）。对应于预期大小的NA和Bgag的大约55kDa的明显条带也被检测到。功能性NA酶活性基本上如实施例4中所公开的那样被确认。与其他Bgag VLPs一样，H10 Bgag VLPs在透射电子显微镜下表现为直径约100-180nm的包膜多晶颗粒（参见例如图28，图A）。

[0280] 如表1所示,制备和表征三批H10 Bgag VLPs。所有批次的H10 Bgag VLPs均具有血凝反应活性,每50 μ l的Bgag VLPs的滴度为8,192至65,536,浓度约为总蛋白质的3.5mg/ml。制造或测试条件有助于批次之间的变化。

[0281] 表1.H10 Bgag VLPs的制备。

	产品#	批号 #	总蛋白质 *	HA 含量 **	HA 滴度***
			(mg/ml)	mg/ml	
[0282]	1	020215	3.48	0.4	8 192
	2	081715	3.5	1.0	32 768
	3	082515	3.7	1.5	65 536

[0283] *使用Qubit 2.0荧光计测定(热)。

[0284] **通过SDS-PAGE和密度测定法测定。

[0285] ***通过使用火鸡RBC的HA试验法测定。

[0286] 实施例14

[0287] 一种四亚型H5/7/9/10Bgag VLP疫苗的制备

[0288] 基本上如实施例11中所述,四亚型H5/7/9/10VLP还可以被制备和纯化用于疫苗接种。在疫苗接种之前,可将Bgag VLPs配制在PBS中。

[0289] 通过间接免疫荧光测定评估H5,H7,H9和H10基因的表达。例如,使用H5,H7,H9和H10亚型特异性抗体,间接免疫荧光测定显示存在每种亚型的表达(参见例如图29)。

[0290] 将四亚型H5/7/9/10Bgag VLP纯化并通过阴离子交换色谱法分析(参见例如图28图B)。阴离子交换色谱显示四亚型H5/7/9/10Bgag VLP与rBV分离并存在于滤液部分中。

[0291] 像H10 Bgag VLPs一样,四亚型H5/7/9/10Bgag VLP上的HAs是大约62至64kDa大小的未分解的HA₀,其分别与H5,H7,H9和H10基因预测的64.5kDa,62.1kDa,62.9kDa和62.3kDa一致(参见例如图28图B)。如图28,图B所示,约55kDa的明显条带对应于NA和Bgag的预期分子量。功能性NA酶活性基本上如实施例4中所公开的那样被确认。与其他Bgag VLPs一样,在透射电子显微镜下,四亚型H5/7/9/10Bgag VLP表现为直径约150-200nm的包膜多晶颗粒(参见例如图28,图B)。亚型的共定位以及四亚型H5/H7/H9/H10 VLPs内每种亚型的定量也基本如实施例4所描述的被确认。

[0292] 如表2所示,制备并表征三批四亚型H5/7/9/10 Bgag VLPs。如通过基本上于实施例4描述的血凝反应功能测定测量的,所有批次的四亚型H5/7/9/10 Bgag VLPs均具有血凝活性。

[0293] 表2.H5/7/9/10 Bgag VLPs的制备。

	产品#	批号 #	总蛋白质 *	HA 含量 **	HA 滴度***
			(mg/ml)	mg/ml	
[0294]	1	031815	3.5	0.5	8 192

	2	043015	3.4	0.5	32 768
[0295]	3	072715	2.9	0.4	16 384

[0296] *用Qubit 2.0荧光计测定(热)。

[0297] **通过SDS-PAGE和密度测定法测定。

[0298] ***通过使用火鸡RBC的HA试验法测定。

[0299] 实施例15

[0300] 间接免疫荧光测定法

[0301] 可以进行间接免疫荧光测定。例如,将0.3ml等份的rBV感染的Sf9细胞接种到8孔Nunc LabTek载玻片中。在28℃下培养72小时后,将Sf9细胞用冷丙酮固定,并使用H5,H7,H9和H10特异性抗血清进行间接免疫荧光显微技术。基本上如实施例4中所述,使用的抗血清的实例可以与蛋白质免疫印迹是一样的。表达H5,H7,H9和H10的细胞通过使用FITC-标记山羊抗小鼠IgG(H+L)被可视化(KPL,Gaithersburg,MD)。在IFA中使用包含碘化丙锭核复染剂的封固剂来显现细胞核。

[0302] 如图29所示,Sf9细胞受具有四亚型H5/7/9/10Bgag VLP的重组杆状病毒(rBV)的感染产生了H5,H7,H9,H10,NA和Bgag蛋白质。将感染细胞(上图)和未感染对照(下图)的等份试样接种到腔室玻片中并孵育48小时。将细胞单层用冷丙酮固定,并用指定的对H5,H7,H9或H10抗原特异性的一抗进行探测。孵育后,用合适的物种特异性FITC标记的抗体(绿色)探测单层以显现表达的HA抗原。细胞核用含有碘化丙锭的封固剂染成红色。

[0303] 实施例16

[0304] 血凝抑制试验

[0305] 可以进行血凝抑制试验。例如,用来自霍乱孤菌(Denka Seiken,Tokyo,Japan)的受体破坏酶处理所有的血清,其后使用具有每个指定抗原的4个HA单位的新鲜制备的0.5%火鸡或1%马红细胞(RBCs)进行血凝抑制试验。

[0306] 用于测定HI滴度的同源流感抗原包括全长同源重组抗原,源自甲型/越南/1203/2004(H5N1)的rH5;源自甲型/香港/33982/2009(H9N2)的rH9;源自甲型/安徽/1/2013(H7N9)的rH7,其具有与甲型/上海/2/2013(H7N9)相同的氨基酸序列;以及来自甲型/江西-东湖/346/2013(H10N8)的rH10。这些参考抗原使用BEVS表达,并根据标准方法从Sf9细胞中分离和纯化。

[0307] 异源流感抗原也用于测定血凝抑制滴度。它们包括例如BPL-灭活病毒甲型/水鸭/埃及/12908-NAMRU3/2005(H10N1);甲型/加利福尼亚州/07/2009NYMC X-197A(H1N1);甲型/瑞士/9715293/2013(H3N2);以及BPL-灭活H5N1病毒甲型/香港/156/1997(进化枝0),甲型/柬埔寨/X012331/2013(进化枝1.1.2),甲型/印度尼西亚/05/2005(进化枝2.1.3.2),甲型/斑头雁/青海/1A/2005:PR8,(进化枝2.2)以及甲型/孟加拉国/3233/2011(进化枝2.2.2)。

[0308] 实施例17

[0309] 受试者Bgag VLPs疫苗的接种

[0310] 可以使用标准方法向受试者接种Bgag VLPs,例如成年雄性的费奇白鼬(4-5个月龄,三F农场,赛尔,宾夕法尼亚州)。例如,一组四只动物可以用H10Bgag VLPs(总HA 30μg)

肌内(“i.m.”)接种三次(第0,4和22周)。两组五只白鼬用四亚型Bgag VLPs肌内或鼻内(“i.n.”)(含有每种HA亚型30μg的总HA 120μg)接种疫苗。四只白鼬的一控制组接受PBS作为安慰剂。在最初接种疫苗之前,通过对目前流行的流感病毒的血凝抑制试验确认白鼬血清学阴性。所有白鼬在第4,8,12,16和26周采血以收集血清,通过血凝抑制以评估特异性抗体滴度。在用如甲型/水鸭/埃及/12908-NAMRU3/2005(H10N1)病毒的流感病毒攻击之后,动物也被采血。

[0311] 实施例18

[0312] 表达一种或多种不同目标病原体蛋白质的Bgag VLP疫苗的免疫原性

[0313] 将表达H10的Bgag VLPs和表达H5,H7,H9和H10的Bgag VLP配制在PBS中用于疫苗接种。用H10Bgag VLPs接种的白鼬以30μg HA的剂量接种。用准亚型H5/7/9/10Bgag VLPs接种的白鼬以120μg HA的剂量接种。由于H5,H7,H9和H10以约20-30%存在于准亚型H5/7/9/10Bgag VLPs上,所以120μg剂量对应于每种亚型约30μg。该接种方案与H5N1疫苗的接种方案一致。例如,对于甲型/越南/1203/04(H5N1)疫苗,健康的成年人被接种肌内注射两次45μg和90μg两种剂量导致检测到潜在保护性中和抗体(Treanor JJ et al.2006)。

[0314] 为四亚型Bgag VLP疫苗比较了两条疫苗接种路线,肌内和鼻内路线。疫苗接种方案包括三次接种(第0,4和22周的初次接种和两次加强免疫接种)。测量对同源重组HA参照抗原rH5,rH7,rH9和rH10的血凝抑制滴度。模拟接种的白鼬的血清不具有对任何测试的HA的HA中和抗体(参见例如图30)。相反,H10 Bgag VLPs仅诱发了对rH10的HA中和抗体,而四亚型H5/7/9/10 Bgag VLPs诱发了对H5,H7,H9和H10抗原的HA中和抗体(参见例如图30)。

[0315] 通过肌内初次接种H10 Bgag VLPs后,HA中和抗体在第一次加强后变得可检测并增加。其后,HA中和抗体滴度逐渐下降,直到第二次加强。由于使用的白鼬数量相对较少(4-5/组),因此观察到反应变化很大,特别是在鼻内样本。

[0316] 通过肌内接种H10 Bgag VLP的受试者血清可以具有与接种四亚型Bgag VLPs的受试者相当的HA中和抗体滴度(参见例如图30),而在通过鼻内接种四亚型Bgag VLPs的受试者中中和抗体滴度较低。

[0317] 在四亚型H5/7/9/10 Bgag VLP接种疫苗组中,检测到的最低的中和抗体滴度是针对rH5的,其中可检测的中和抗体滴度至少需要两次疫苗接种。这与H5亚型的相对低的免疫原性一致。相比之下,在肌内组和鼻内组的单次接种疫苗后均可检测到针对rH7,rH9和rH10的中和抗体滴度,在一次加强后增加,然后在第二次加强之前逐渐减少(参见例如图30)。

[0318] 如图30所示,单一亚型H10 VLP和四亚型H5/H7/H9/H10 VLPs均在白鼬中诱发了强烈的免疫应答。白鼬在第0,4和22周(如箭头所示)接种了疫苗。接种组如下:第一组G1是一组是用H10Bgag VLPs(30μg总HA)肌内接种过三次(第0,4和22周)的白鼬组;第四组G4是一接受PBS作为安慰剂的模拟接种疫苗组;第二组G2和第三组G3是分别肌内或鼻内用四亚型VLPs(120μg总HA)接种疫苗的两组白鼬。在第0,4,8,12,16和26周采集血液并通过使用同源参照rH5,rH7,rH9和rH10抗原的血凝抑制试验分析血清。数据点上面的条显示标准偏差。虚线表示检测限。

[0319] 为了研究VLP疫苗接种的交叉保护能力,通过使用几种包括H1,H3,H5和H10亚型的流感分离株的血凝抑制试验来测试受攻击前的血清。在受H10或四亚型VLPs肌内或鼻内疫苗接种的白鼬血清中检测不到对H1和H3病毒的可检测的交叉保护性中和抗体。然而,当用

多种不同的H5N1病毒分离株/进化枝,以及H10N1病毒(参见例如图30)进行测试时,检测到交叉反应中和抗体。

[0320] 如图31所示,比较攻毒试验前的HA中和抗体概况。G1-4如图所示并基本上对应于图30。Y轴上显示了HA中和抗体,而X轴上显示了所使用的HA抗原。HA抗原包括:来源于甲型/越南/1203/2004(进化枝1H5N1)的rH5;甲型/香港/33982/2009(H9N2)的rH9;甲型/安徽/1/2013(H7N9)的rH7以及来自甲型/江西-东湖/346/2013(H10N8)的rH10。对包括H10*甲型/水鸭/埃及/12908-NAMRU3/2005(H10N1)的BPL-灭活病毒,H1甲型/加利福尼亚/07/2009 NYMC X-197A(H1N1),H3甲型/瑞士/9715293/2013(H3N2)也进行了分析。对几种包括甲型/香港/156/1997(进化枝0),甲型/柬埔寨/X012331/2013(进化枝1.1.2),甲型/印度尼西亚/05/2005(进化枝2.1.3.2),甲型/斑头雁/青海/1A/2005:PR8,(进化枝2.2)以及甲型/孟加拉国/3233/2011(进化枝2.2.2)的H5N1病毒也进行了分析。数据点上面的条显示标准偏差。虚线表示检测限。

[0321] 实施例19

[0322] 接种疫苗受试者在攻毒试验中的保护

[0323] 白鼬用肌肉注射氯胺酮-甲苯噻嗪-阿托品混合物麻醉并在第27周用具有 10^6 EID₅₀的甲型流感/水鸭/埃及/12908-NAMRU3/2005(H10N1)在PBS稀释总体积为1ml(每个鼻孔500 μ l)的病毒鼻内攻击。病毒攻击可以在最后一次疫苗接种五周后的第27周进行。在H10N1攻击后,白鼬被每天监测持续四天以观察其体重和体温的变化以及疾病临床症状。攻击后(“p.c.”)的第2天和第4天收集鼻洗液样品。在攻击后的第4天,使动物安乐死并采集鼻甲,气管和肺。在鸡胚中测定来自下呼吸道和上呼吸道的样品中的病毒滴度。接种疫苗和PBS对照受试者之间病毒滴度差异的统计显著性由双因素方差统计分析决定。

[0324] 用H10Bgag VLPs或四亚型Bgag VLPs疫苗接种后,用例如H10N1流感病毒的活目标病原体攻击白鼬。由于病毒在地理上和进化上不同于存在于接种到白鼬的Bgag VLP疫苗中的甲型/江西/IPB13a/2013(H10N8)病毒的H10抗原,因此可以使用例如甲型/水鸭/埃及/12908-NAMRU3/2005(H10N1)病毒进行异源性攻击。交叉反应滴度通过用于H10N1病毒的血凝抑制试验来确认(参见例如图31)。直到受攻击后的第4天,H10N1病毒攻击没有在白鼬中引起致命或严重的疾病,但是通过如攻击后的鼻洗液中以及上呼吸道(鼻甲和气管)和下呼吸道(肺)较低的病毒滴度证实了疫苗保护接种疫苗组免于H10N1病毒(参见例如图32)。例如,攻击后第2天或第4天的鼻洗液中,在模拟接种的白鼬中检测到最高滴度,而在鼻内接种四亚型Bgag VLPs的白鼬中观察到最低滴度(参见例如图32图A)。与模拟组相比,用四亚型Bgag VLPs肌肉接种的白鼬也引起了病毒滴度的显著降低(参见例如图32图A)。这提示了局部粘膜免疫在四亚型Bgag VLP疫苗保护中的潜在作用。

[0325] 在鼻甲以及气管组织和肺组织中,复制病毒滴度的降低更为显著(参见例如图32,图B)。在所有无论使用哪种路径接种过H10 Bgag VLPs或四亚型H5/7/9/10 Bgag VLPs的接种的白鼬中,气管和肺组织中病毒滴度降至可检测水平以下。在所有接种疫苗的动物中鼻甲组织中的病毒滴度也显著降低,证明了这些VLP疫苗对异源H10N1攻击的保护效力。

[0326] 如图32,图A所示,在受攻击后的第2天和第4天的鼻洗液复制病毒滴度表明准亚型Bgag VLP疫苗显著保护受试者免受连续攻击。如图32,图B所示,在受攻击后的第2天和第4天,在鼻甲组织中,气管和肺部中的复制病毒滴度表明Bgag VLP疫苗保护了受试者免受随

后的攻击。统计学显著性差异用星号表示。

[0327] 实施例20

[0328] 三进化枝H555Bgag VLPs的制备

[0329] 将Sf9细胞作为悬浮培养物在 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ 的SF900II-SFM昆虫无血清培养基 (Life Technologies) 中维持。为了生产H555Bgag VLPs, 用表达三种指定的H5基因, NA和BIIV gag基因的rBV以3.0的感染复数 (MOI) 感染浓度为 2×10^6 细胞/毫升的2L Sf9细胞。Bgag VLPs在感染后72小时从生长培养基上清液中被收集, 使用 $0.2\mu\text{m}$ 过滤器无菌过滤并且在纯化之前使用正切流动过滤 (TFF, 500,000MWC0) 进行浓缩。通过使用离子交换色谱法然后超速离心来纯化Bgag VLPs。阴离子交换色谱法被用于使用标准方法去除如杆状病毒和宿主细胞DNA的主要杂质。然后, 使用超速离心法用于使用标准方法纯化和浓缩Bgag VLPs。将Bgag VLP制剂表征并在 $2-8^\circ\text{C}$ 下储存于PBS缓冲液中直至接种疫苗。Bgag VLPs的表征, 包括通过SDS-PAGE和蛋白质免疫印迹, 基本上于此进行。

[0330] 实施例21

[0331] 三进化枝H555Bgag VLPs在鸡中的免疫原性及保护效力

[0332] 疫苗接种和病毒攻击Bgag VLP H555疫苗与市售佐剂 (法国赛比克公司, Montanide 70/30, 费尔菲尔德, 新泽西州) 一起配制, 使得每剂量的H555VLPs含有1536个HA单位。因为所有三个H5基因都是从Sf9细胞中相同的表达盒中表达的, 所以预计H5进化枝在H555VLPs中以相似的水平存在。在第1天龄时用0.2ml H555Bgag VLP皮下接种无特定病原体 (SPF) 鸡 ($n=30$), 在第21天龄时皮下接种0.5ml。对照鸟类可以接受PBS。将鸟任意地放入10只的组中并在第35天用以下高致病性禽流感分离株之一进行鼻内攻击 (每只鸟 10^6EID_{50}): 矛隼H5N8 (进化枝2.3.4.4); 鸡/西瓜哇H5N1 (进化枝2.1.3) 或鸡/埃及H5N1 (进化枝2.2.1)。受攻击之后, 每天监测鸟类的临床症状, 在受攻击后第0天和第14天采集血清, 并采集口腔拭子以测量病毒脱落。

[0333] 为了确定病毒脱落, 将口咽和泄殖腔拭子收集在无菌脑心浸液培养基中并在 -70°C 保持冷冻。使用Trizol LS试剂 (Invitrogen, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州) 和MagMAX AI/ND病毒RNA分离试剂盒 (Ambion, 奥斯汀, 德克萨斯州) 提取病毒RNA。使用标准方法进行实时定量RT-PCR (qRRT-PCR)。简而言之, 针对流感病毒M基因的qRRT-PCR通过使用AgPath-ID一步RT-PCR试剂盒 (Ambion) 和ABI 7500快速实时荧光定量PCR系统 (美国应用生物系统公司, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州) 进行。对于病毒定量, 用从用滴定法测量的攻击病毒, 矛隼H5N8, 鸡/西瓜哇H5N1或鸡/埃及H5N1中提取的病毒RNA建立标准曲线。结果报告为 $\text{EID}_{50}/\text{ml}$ 当量, 并且鸡样本的检测下限为 $100.9\text{EID}_{50}/\text{ml}$ 。

[0334] 用Prism 5 (GraphPad Co., 圣地亚哥, 加利福尼亚州) 产生统计分析Kaplan-Meier存活曲线。Mantel-Coxlog-rank检验被用于比较实验组之间的存活曲线 (Prism 5)。使用方差分析 (Prism 5) 分析血凝素抑制滴度之间的均值和标准差的统计学差异。小写字母表示比较组之间的统计学显著性。T检验用于成对比较口腔和泄殖腔拭子的病毒滴度 (Prism 5)。所有统计检验均使用 $p<0.05$ 进行。

[0335] 在用Bgag VLPs接种疫苗, 攻击之前, 通过血凝抑制试验测定对疫苗抗原的抗体水平。如图35所示, 当在测定中使用同源疫苗抗原时, 在第二次应用Bgag VLP疫苗两周后, 所有接种鸟类组均显示出高的HA中和抗体滴度 ($>9\log 2$)。

[0336] 假接种和接种疫苗的鸟类在接种后两周接受三种高致病性禽流感病毒之一的攻击。图36和38分别显示了受攻击前和受攻击后对攻击病毒的HA中和抗体滴度。受攻击前检测出高的HA中和抗体滴度。每种病毒株相当的HA中和抗体滴度表明Bgag VLPs中存在三个H5进化枝。受攻击后,HA中和抗体滴度提高了(例如参见图38)。

[0337] 用三种H5病毒的病毒攻击后,通过鸡的存活和病毒脱落的减少来测量疫苗保护(参见例如图36和39-41)。分别对应于矛隼(H5N8),鸡/埃及(H5N1)和鸡/西瓜哇(H5N1)攻击的疫苗组1,2或3中的所有鸟类均在攻击中存活(参见例如图36)。在任何接种疫苗-攻击的鸟类中没有观察到疾病的临床症状。相反,所有假接种疫苗的鸟类在矛隼,鸡/埃及和鸡/西瓜哇攻击组分别在4天,3天和3天的平均死亡时间死亡。因此,Bgag VLPs对三种包括H5N8病毒的所测攻击流感分离株的每一种均提供了完整保护。所有假接种疫苗的鸟在受攻击后5天内死亡,表明在接种Bgag VLP的鸟类中显著的保护水平。

[0338] 相对于所测试的三种H5分离株,病毒脱落显著降低(参见例如图39-41)。在每个攻击实验中,在 10^6 EID₅₀或PFU的病毒攻击之后,所有三种H5N1病毒在未免疫的对照鸡的上呼吸道中高效地复制。相比之下,经免疫的鸟类在受攻击后的每天显示出H5N1病毒载量的显著减少。在泄殖腔拭子中观察到类似的数据(参见例如图39-41)。

[0339] 因此,三进化枝H555Bgag VLP免疫对H5N1病毒和H5N8高致病性禽流感病毒两种不同的分离株攻击后的致命流感提供显著保护。

[0340] 参考文献

[0341] 以下出版物,参考文献,专利和专利申请在此通过引用整体并入。

[0342] Belser, J.A., Blixt, O., Chen, L.M., Pappas, C., Maines, T.R., Van Hoeven, N., Donis, R., Busch, J., McBride, R., Paulson, J.C., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2008. Contemporary North American Influenza H7viruses possess human receptor specificity: Implications for virus transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7558-7563.

[0343] Blanco, J.C., Pletneva, L.M., Wan, H., Araya, Y., Angel, M., Oue, R.O., Sutton, T.C., Perez, D.R., 2013. Receptor characterization and susceptibility of cotton rats to avian and 2009 pandemic Influenza virus strains. *Journal of virology* 87, 2036-2045.

[0344] Boulay, F., Doms, R.W., Webster, R.G., Helenius, A., 1988. Posttranslational oligomerization and cooperative acid activation of mixed Influenza hemagglutinin trimers. *The Journal of cell biology* 106, 629-639.

[0345] Bright, R.A., Carter, D.M., Daniluk, S., Toapanta, F.R., Ahmad, A., Gavrilov, V., Massare, M., Pushko, P., Mytle, N., Rowe, T., Smith, G., Ross, T.M., 2007. Influenza virus like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated Influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine* 25, 3871-3878.

[0346] Chao, C.C., 1992. A single amino acid deletion at the amino terminus of Influenza virus hemagglutinin causes misfolding and blocks exocytosis of the molecule in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 267, 2142-

2148.

[0347] Chen,F.,Li,J.,Sun,B.,Zhang,H.,Zhang,R.,Yuan,J.,Ou,X.,Ye,W.,Chen,J.,Liu,Y.,Huang,Y.,2015.Isolation and characteristic analysis of a novel strain H7N9 of avian Influenza virus A from a patient with Influenza-like symptoms in China.Int J Infect Dis.

[0348] Chen,Z.,Baz,M.,Lu,J.,Paskel,M.,Santos,C.,Subbarao,K.,Jin,H.,Matsuoka,Y.,2014.Development of a high-yield live attenuated H7N9 Influenza virus vaccine that provides protection against homologous and heterologous H7 wild-type viruses in ferrets.J.Virol.88,7016-7023.

[0349] Cheng,P.K.C.a.L.,W.L.,2010.Molecular characterization of H9N2 isolated in Hong Kong from 2008 to 2009,Unpublished,Hong Kong,GenBank Acc.No.CY055137.

[0350] Denis,J.,Acosta-Ramirez,E.,Zhao,Y.,Hamelin,M.E.,Koukavica,I.,Baz,M.,Abed,Y.,Savard,C.,Pare,C.,Lopez Macias,C.,Boivin,G.,Leclerc,D.,2008.Development of a universal Influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform.Vaccine 26,3395-3403.

[0351] Ebrahimi,S.M.,Tebianian,M.,Aghaiypour,K.,Nili,H.,Mirjalili,A.,Prokaryotic expression and characterization of avian Influenza A virus M2 gene as a candidate for universal recombinant vaccine against Influenza A subtypes;specially H5N1 and H9N2.Molecular biology reports 37,2909-2914.

[0352] Galarza,J.M.,Latham,T.,Cupo,A.,2005.Virus like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal Influenza virus challenge.Viral Immunol.18,244-251.

[0353] Gao,R.,Cao,B.,Hu,Y.,Feng,Z.,Wang,D.,Hu,W.,Chen,J.,Jie,Z.,Qiu,H.,Xu,K.,Xu,X.,Lu,H.,Zhu,W.,Gao,Z.,Xiang,N.,Shen,Y.,He,Z.,Gu,Y.,Zhang,Z.,Yang,Y.,Zhao,X.,Zhou,L.,Li,X.,Zou,S.,Zhang,Y.,Li,X.,Yang,L.,Guo,J.,Dong,J.,Li,Q.,Dong,L.,Zhu,Y.,Bai,T.,Wang,S.,Hao,P.,Yang,W.,Zhang,Y.,Han,J.,Yu,H.,Li,D.,Gao,G.F.,Wu,G.,Wang,Y.,Yuan,Z.,Shu,Y.,2013.Human infection with a novel avian-origin Influenza A(H7N9) virus.N Engl J Med 368,1888-1897.

[0354] Garcia-Sastre,A.,Schmolke,M.,2014.Avian Influenza A H10N8--a virus on the verge?Lancet 383,676-677.

[0355] Guo,L.,Lu,X.,Kang,S.M.,Chen,C.,Compans,R.W.,Yao,Q.,2003.Enhancement of mucosal immune responses by chimeric Influenza HA/SHIV virus like particles.Virology 313,502-513.

[0356] Harris,A.,Cardone,G.,Winkler,D.C.,Heymann,J.B.,Brecher,M.,White,J.M.,Steven,A.C.,2006.Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography.Proc Natl Acad Sci U S A 103,19123-19127.

[0357] Haynes,J.R.,2009.Influenza virus like particle vaccines.Expert Rev Vaccines 8,435-445.

- [0358] Haynes, J.R., Dokken, L., Wiley, J.A., Cawthon, A.G., Bigger, J., Harmsen, A.G., Richardson, C., 2009. Influenza-pseudotyped Gag virus like particle vaccines provide broad protection against highly pathogenic avian Influenza challenge. *Vaccine* 27, 530-541.
- [0359] Kang, S.M., Pushko, P., Bright, R.A., Smith, G., Compans, R.W., 2009. Influenza virus like particles as pandemic vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 333, 269-289.
- [0360] Coffman, R.L., Sher, A., Seder, R.A., 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33, 492-503.
- [0361] Kong, H., Zhang, Q., Gu, C., Shi, J., Deng, G., Ma, S., Liu, J., Chen, P., Guan, Y., Jiang, Y., Chen, H., 2015. A live attenuated vaccine prevents replication and transmission of H7N9 virus in mammals. *Sci Rep* 5, 11233.
- [0362] Kushnir, N., Streatfield, S.J., Yusibov, V., 2012. Virus like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* 31, 58-83.
- [0363] Liu, Y.V., Massare, M.J., Pearce, M.B., Sun, X., Belser, J.A., Maines, T.R., Creager, H.M., Glenn, G.M., Pushko, P., Smith, G.E., Tumpey, T.M., 2015. Recombinant virus like particles elicit protective immunity against avian Influenza A (H7N9) virus infection in ferrets. *Vaccine*.
- [0364] Luo, T., Berkowitz, R., Kaleko, M., 2012. Bovine immunodeficiency virus (BIV) based vectors in: Office, U.P.a.T. (Ed.). Novartis AG, USA.
- [0365] Maines, T.R., Lu, X.H., Erb, S.M., Edwards, L., Guarner, J., Greer, P.W., Nguyen, D.C., Szretter, K.J., Chen, L.M., Thawatsupha, P., Chittaganpitch, M., Waicharoen, S., Nguyen, D.T., Nguyen, T., Nguyen, H.H., Kim, J.H., Hoang, L.T., Kang, C., Phuong, L.S., Lim, W., Zaki, S., Donis, R.O., Cox, N.J., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2005. Avian Influenza (H5N1) viruses isolated from humans in Asia in 2004 exhibit increased virulence in mammals. *J. Virol.* 79, 11788-11800.
- [0366] Morens, D.M., Fauci, A.S., 2012. Emerging infectious diseases in 2012: 20 years after the institute of medicine report. *mBio* 3.
- [0367] O'Neill, E., Donis, R.O., 2009. Generation and characterization of candidate vaccine viruses for pre-pandemic Influenza vaccines. *Current topics in microbiology and immunology* 333, 83-108.
- [0368] Palese, P., 2004. Influenza: old and new threats. *Nat. Med.* 10, S82-87.
- [0369] Palese, P., 2006. Making better Influenza virus vaccines? *Emerg Infect Dis* 12, 61-65.
- [0370] Pappas, C., Matsuoka, Y., Swayne, D.E., Donis, R.O., 2007. Development and evaluation of an Influenza virus subtype H7N2 vaccine candidate for pandemic preparedness. *Clin Vaccine Immunol* 14, 1425-1432.
- [0371] Perrone, L.A., Ahmad, A., Veguilla, V., Lu, X., Smith, G., Katz, J.M., Pushko, P.,

Tumpey, T.M., 2009. Intranasal vaccination with 1918 Influenza virus like particles protects mice and ferrets from lethal 1918 and H5N1 Influenza virus challenge. *J. Virol.* 83, 5726-5734.

[0372] Pica, N., Palese, P., 2013. Toward a universal Influenza virus vaccine: prospects and challenges. *Annual review of medicine* 64, 189-202.

[0373] Pushko, P., Kort, T., Nathan, M., Pearce, M.B., Smith, G., Tumpey, T.M., 2010. Recombinant H1N1 virus like particle vaccine elicits protective immunity in ferrets against the 2009 pandemic H1N1 Influenza virus. *Vaccine* 28, 4771-4776.

[0374] Pushko, P., Pearce, M.B., Ahmad, A., Tretyakova, I., Smith, G., Belser, J.A., Tumpey, T.M., 2011. Influenza virus like particle can accommodate multiple subtypes of hemagglutinin and protect from multiple Influenza types and subtypes. *Vaccine* 29, 5911-5918.

[0375] Pushko, P., Pumpens, P., Grens, E., 2013. Development of virus like particle technology from small highly symmetric to large complex virus like particle structures. *Intervirology* 56, 141-165.

[0376] Pushko, P., Tumpey, T.M., Bu, F., Knell, J., Robinson, R., Smith, G., 2005. Influenza virus like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 Influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine* 23, 5751-5759.

[0377] Pushko, P., Tumpey, T.M., Van Hoeven, N., Belser, J.A., Robinson, R., Nathan, M., Smith, G., Wright, D.C., Bright, R.A., 2007. Evaluation of Influenza virus like particles and Novasome adjuvant as candidate vaccine for avian Influenza. *Vaccine* 25, 4283-4290.

[0378] Quan, F.S., Vunnavala, A., Compans, R.W., Kang, S.M., Virus like particle vaccine protects against 2009 H1N1 pandemic Influenza virus in mice. *PloS one* 5, e9161.

[0379] Rahn, J., Hoffmann, D., Harder, T.C., Beer, M., 2015. Vaccines against Influenza A viruses in poultry and swine: Status and future developments. *Vaccine* 33, 2414-2424.

[0380] Rasmussen, L., Battles, J.K., Ennis, W.H., Nagashima, K., Gonda, M.A., 1990. Characterization of virus-like particles produced by a recombinant baculovirus containing the gag gene of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology* 178, 435-451.

[0381] Rao, S.S., Kong, W.P., Wei, C.J., Van Hoeven, N., Gorres, J.P., Nason, M., Andersen, H., Tumpey, T.M., Nabel, G.J., 2010. Comparative efficacy of hemagglutinin, nucleoprotein, and matrix 2 protein gene-based vaccination against H5N1 Influenza in mouse and ferret. *PloS one* 5, e9812.

[0382] Ross, T.M., Mahmood, K., Crevar, C.J., Schneider-Ohrum, K., Heaton, P.M.,

Bright,R.A.,2009.A trivalent virus like particle vaccine elicits protective immune responses against seasonal Influenza strains in mice and ferrets.PloS one 4,e6032.

[0383] Schotsaert,M.,De Filette,M.,Fiers,W.,Saelens,X.,2009.Universal M2 ectodomain-based Influenza A vaccines:preclinical and clinical developments.Expert review of vaccines 8,499-508.

[0384] Smith,G.E.,Flyer,D.C.,Raghunandan,R.,Liu,Y.,Wei,Z.,Wu,Y.,Kpamegan,E.,Courbron,D.,Fries,L.F.,3rd,Glenn,G.M.,2013.Development of Influenza H7N9 virus like particle (VLP) vaccine:homologous A/Anhui/1/2013 (H7N9) protection and heterologous A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 (H7N3) cross-protection in vaccinated mice challenged with H7N9 virus.Vaccine 31,4305-4313.

[0385] Suarez,D.L.,2012.DIVA vaccination strategies for avian Influenza virus.Avian Dis.56,836-844.

[0386] To,K.K.,Tsang,A.K.,Chan,J.F.,Cheng,V.C.,Chen,H.,Yuen,K.Y.,2014.Emergence in China of human disease due to avian Influenza A(H10N8) -- cause for concern?J.Infect.68,205-215.

[0387] Treanor JJ,Campbell JD,Zangwill KM,Rowe T,Wolff M.Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza A(H5N1)vaccine.N Engl J Med.2006 Mar 30;354(13):1343-51.

[0388] Tretyakova,I.,Pearce,M.B.,Florese,R.,Tumpey,T.M.,Pushko,P.,2013.Intranasal vaccination with H5,H7 and H9 hemagglutinins co-localized in a virus like particle protects ferrets from multiple avian Influenza viruses.Virology 442,67-73.

[0389] Wang,B.Z.,Liu,W.,Kang,S.M.,Alam,M.,Huang,C.,Ye,L.,Sun,Y.,Li,Y.,Kothe,D.L.,Pushko,P.,Dokland,T.,Haynes,B.F.,Smith,G.,Hahn,B.H.,Compans,R.W.,2007.Incorporation of high levels of chimeric human immunodeficiency virus envelope glycoproteins into virus like particles.J.Virol.81,10869-10878.

[0390] Wang,B.Z.,Xu,R.,Quan,F.S.,Kang,S.M.,Wang,L.,Compans,R.W.,2010.Intranasal immunization with Influenza VLPs incorporating membrane-anchored flagellin induces strong heterosubtypic protection.PLoS One 5,e13972.

[0391] Wang,T.T.,Palese,P.,2009.Universal epitopes of Influenza virus hemagglutinins?Nature structural&molecular biology 16,233-234.

[0392] Wei,C.J.,Boyington,J.C.,McTamney,P.M.,Kong,W.P.,Pearce,M.B.,Xu,L.,Andersen,H.,Rao,S.,Tumpey,T.M.,Yang,Z.Y.,Nabel,G.J.,2010.Induction of broadly neutralizing H1N1 Influenza antibodies by vaccination.Science(New York,N.Y 329,1060-1064.

[0393] WHO,2012a.Antigenic and genetic characteristics of Influenza A(H5N1) and Influenza A(H9N2) viruses and candidate vaccine viruses developed for

potential use in human vaccines.

[0394] WHO,2012b.WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev.1.

[0395] WHO,2013.Antigenic and genetic characteristics of A(H5N1),A(H7N3),A(H9N2)and variant Influenza viruses and candidate vaccine viruses developed for potential use in human vaccines.

[0396] Wohlbold,T.J.,Hirsh,A.,Krammer,F.,2015.An H10N8 Influenza virus vaccine strain and mouse challenge model based on the human isolate A/Jiangxi-Donghu/346/13.Vaccine 33,1102-1106.

[0397] Yen,H.L.,Webster,R.G.,2009.Pandemic Influenza as a current threat.Current topics in microbiology and immunology 333,3-24.

[0001]	序列表
[0002]	<110> 梅迪根股份有限公司 (MEDIGEN, INC.)
[0003]	<120> 用牛免疫缺陷病毒Gag蛋白的重组病毒样颗粒
[0004]	<130> DCSH1880031
[0005]	<150> US62/188,084
[0006]	<151> 2015-07-02
[0007]	<160> 2
[0008]	<170> SIP0SequenceListing 1.0
[0009]	<210> 1
[0010]	<211> 676
[0011]	<212> PRT
[0012]	<213> 扎伊尔埃博拉病毒 (Zaire ebolavirus)
[0013]	<400> 1
[0014]	Met Gly Val Thr Gly Ile Leu Gln Leu Pro Arg Asp Arg Phe Lys Arg
[0015]	1 5 10 15
[0016]	Thr Ser Phe Phe Leu Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Arg Thr Phe Ser
[0017]	20 25 30
[0018]	Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn Ser Thr Leu Gln Val Ser Asp Val
[0019]	35 40 45
[0020]	Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg
[0021]	50 55 60
[0022]	Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro
[0023]	65 70 75 80
[0024]	Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val
[0025]	85 90 95
[0026]	Val Asn Tyr Glu Ala Gly Glu Trp Ala Glu Asn Cys Tyr Asn Leu Glu
[0027]	100 105 110
[0028]	Ile Lys Lys Pro Asp Gly Ser Glu Cys Leu Pro Ala Ala Pro Asp Gly
[0029]	115 120 125
[0030]	Ile Arg Gly Phe Pro Arg Cys Arg Tyr Val His Lys Val Ser Gly Thr
[0031]	130 135 140
[0032]	Gly Pro Cys Ala Gly Asp Phe Ala Phe His Lys Glu Gly Ala Phe Phe
[0033]	145 150 155 160
[0034]	Leu Tyr Asp Arg Leu Ala Ser Thr Val Ile Tyr Arg Gly Thr Thr Phe
[0035]	165 170 175
[0036]	Ala Glu Gly Val Val Ala Phe Leu Ile Leu Pro Gln Ala Lys Lys Asp
[0037]	180 185 190
[0038]	Phe Phe Ser Ser His Pro Leu Arg Glu Pro Val Asn Ala Thr Glu Asp

[0039]	195	200	205
[0040]	Pro Ser Ser Gly Tyr Tyr Ser Thr Thr Ile Arg Tyr Gln Ala Thr Gly		
[0041]	210	215	220
[0042]	Phe Gly Thr Asn Glu Thr Glu Tyr Leu Phe Glu Val Asp Asn Leu Thr		
[0043]	225	230	235
[0044]	Tyr Val Gln Leu Glu Ser Arg Phe Thr Pro Gln Phe Leu Leu Gln Leu		
[0045]	245	250	255
[0046]	Asn Glu Thr Ile Tyr Thr Ser Gly Lys Arg Ser Asn Thr Thr Gly Lys		
[0047]	260	265	270
[0048]	Leu Ile Trp Lys Val Asn Pro Glu Ile Asp Thr Thr Ile Gly Glu Trp		
[0049]	275	280	285
[0050]	Ala Phe Trp Glu Thr Lys Lys Asn Leu Thr Arg Lys Ile Arg Ser Glu		
[0051]	290	295	300
[0052]	Glu Leu Ser Phe Thr Val Val Ser Asn Gly Ala Lys Asn Ile Ser Gly		
[0053]	305	310	315
[0054]	Gln Ser Pro Ala Arg Thr Ser Ser Asp Pro Gly Thr Asn Thr Thr Thr		
[0055]	325	330	335
[0056]	Glu Asp His Lys Ile Met Ala Ser Glu Asn Ser Ser Ala Met Val Gln		
[0057]	340	345	350
[0058]	Val His Ser Gln Gly Arg Glu Ala Ala Val Ser His Leu Thr Thr Leu		
[0059]	355	360	365
[0060]	Ala Thr Ile Ser Thr Ser Pro Gln Ser Leu Thr Thr Lys Pro Gly Pro		
[0061]	370	375	380
[0062]	Asp Asn Ser Thr His Asn Thr Pro Val Tyr Lys Leu Asp Ile Ser Glu		
[0063]	385	390	395
[0064]	Ala Thr Gln Val Glu Gln His His Arg Arg Thr Asp Asn Asp Ser Thr		
[0065]	405	410	415
[0066]	Ala Ser Asp Thr Pro Ser Ala Thr Thr Ala Ala Gly Pro Pro Lys Ala		
[0067]	420	425	430
[0068]	Glu Asn Thr Asn Thr Ser Lys Ser Thr Asp Phe Leu Asp Pro Ala Thr		
[0069]	435	440	445
[0070]	Thr Thr Ser Pro Gln Asn His Ser Glu Thr Ala Gly Asn Asn Asn Thr		
[0071]	450	455	460
[0072]	His His Gln Asp Thr Gly Glu Glu Ser Ala Ser Ser Gly Lys Leu Gly		
[0073]	465	470	475
[0074]	Leu Ile Thr Asn Thr Ile Ala Gly Val Ala Gly Leu Ile Thr Gly Gly		
[0075]	485	490	495
[0076]	Arg Arg Thr Arg Arg Glu Ala Ile Val Asn Ala Gln Pro Lys Cys Asn		
[0077]	500	505	510

[0078]	Pro Asn Leu His Tyr Trp Thr Thr Gln Asp Glu Gly Ala Ala Ile Gly
[0079]	515 520 525
[0080]	Leu Ala Trp Ile Pro Tyr Phe Gly Pro Ala Ala Glu Gly Ile Tyr Thr
[0081]	530 535 540
[0082]	Glu Gly Leu Met His Asn Gln Asp Gly Leu Ile Cys Gly Leu Arg Gln
[0083]	545 550 555 560
[0084]	Leu Ala Asn Glu Thr Thr Gln Ala Leu Gln Leu Phe Leu Arg Ala Thr
[0085]	565 570 575
[0086]	Thr Glu Leu Arg Thr Phe Ser Ile Leu Asn Arg Lys Ala Ile Asp Phe
[0087]	580 585 590
[0088]	Leu Leu Gln Arg Trp Gly Gly Thr Cys His Ile Leu Gly Pro Asp Cys
[0089]	595 600 605
[0090]	Cys Ile Glu Pro His Asp Trp Thr Lys Asn Ile Thr Asp Lys Ile Asp
[0091]	610 615 620
[0092]	Gln Ile Ile His Asp Phe Val Asp Lys Thr Leu Pro Asp Gln Gly Asp
[0093]	625 630 635 640
[0094]	Asn Asp Asn Trp Trp Thr Gly Trp Arg Gln Trp Ile Pro Ala Gly Ile
[0095]	645 650 655
[0096]	Gly Val Thr Gly Val Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu Phe Cys Ile Cys
[0097]	660 665 670
[0098]	Lys Phe Val Phe
[0099]	675
[0100]	<210> 2
[0101]	<211> 690
[0102]	<212> PRT
[0103]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0104]	<400> 2
[0105]	Met Gly Val Thr Gly Ile Leu Gln Leu Pro Arg Asp Arg Phe Lys Arg
[0106]	1 5 10 15
[0107]	Thr Ser Phe Phe Leu Trp Val Ile Ile Leu Phe Gln Arg Thr Phe Ser
[0108]	20 25 30
[0109]	Ile Pro Leu Gly Val Ile His Asn Ser Thr Leu Gln Val Ser Asp Val
[0110]	35 40 45
[0111]	Asp Lys Leu Val Cys Arg Asp Lys Leu Ser Ser Thr Asn Gln Leu Arg
[0112]	50 55 60
[0113]	Ser Val Gly Leu Asn Leu Glu Gly Asn Gly Val Ala Thr Asp Val Pro
[0114]	65 70 75 80
[0115]	Ser Ala Thr Lys Arg Trp Gly Phe Arg Ser Gly Val Pro Pro Lys Val
[0116]	85 90 95

[0117]	Val	Asn	Tyr	Glu	Ala	Gly	Glu	Trp	Ala	Glu	Asn	Cys	Tyr	Asn	Leu	Glu
[0118]				100				105					110			
[0119]	Ile	Lys	Lys	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Cys	Leu	Pro	Ala	Ala	Pro	Asp	Gly
[0120]				115				120					125			
[0121]	Ile	Arg	Gly	Phe	Pro	Arg	Cys	Arg	Tyr	Val	His	Lys	Val	Ser	Gly	Thr
[0122]				130				135					140			
[0123]	Gly	Pro	Cys	Ala	Gly	Asp	Phe	Ala	Phe	His	Lys	Glu	Gly	Ala	Phe	Phe
[0124]	145						150					155				160
[0125]	Leu	Tyr	Asp	Arg	Leu	Ala	Ser	Thr	Val	Ile	Tyr	Arg	Gly	Thr	Thr	Phe
[0126]					165					170					175	
[0127]	Ala	Glu	Gly	Val	Val	Ala	Phe	Leu	Ile	Leu	Pro	Gln	Ala	Lys	Lys	Asp
[0128]					180					185				190		
[0129]	Phe	Phe	Ser	Ser	His	Pro	Leu	Arg	Glu	Pro	Val	Asn	Ala	Thr	Glu	Asp
[0130]				195				200					205			
[0131]	Pro	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Thr	Ile	Arg	Tyr	Gln	Ala	Thr	Gly
[0132]				210				215					220			
[0133]	Phe	Gly	Thr	Asn	Glu	Thr	Glu	Tyr	Leu	Phe	Glu	Val	Asp	Asn	Leu	Thr
[0134]	225					230					235					240
[0135]	Tyr	Val	Gln	Leu	Glu	Ser	Arg	Phe	Thr	Pro	Gln	Phe	Leu	Leu	Gln	Leu
[0136]					245					250					255	
[0137]	Asn	Glu	Thr	Ile	Tyr	Thr	Ser	Gly	Lys	Arg	Ser	Asn	Thr	Thr	Gly	Lys
[0138]				260					265						270	
[0139]	Leu	Ile	Trp	Lys	Val	Asn	Pro	Glu	Ile	Asp	Thr	Thr	Ile	Gly	Glu	Trp
[0140]				275					280					285		
[0141]	Ala	Phe	Trp	Glu	Thr	Lys	Lys	Asn	Leu	Thr	Arg	Lys	Ile	Arg	Ser	Glu
[0142]				290				295					300			
[0143]	Glu	Leu	Ser	Phe	Thr	Val	Val	Ser	Asn	Gly	Ala	Lys	Asn	Ile	Ser	Gly
[0144]	305						310				315					320
[0145]	Gln	Ser	Pro	Ala	Arg	Thr	Ser	Ser	Asp	Pro	Gly	Thr	Asn	Thr	Thr	Thr
[0146]					325					330					335	
[0147]	Glu	Asp	His	Lys	Ile	Met	Ala	Ser	Glu	Asn	Ser	Ser	Ala	Met	Val	Gln
[0148]				340					345					350		
[0149]	Val	His	Ser	Gln	Gly	Arg	Glu	Ala	Ala	Val	Ser	His	Leu	Thr	Thr	Leu
[0150]				355				360					365			
[0151]	Ala	Thr	Ile	Ser	Thr	Ser	Pro	Gln	Ser	Leu	Thr	Thr	Lys	Pro	Gly	Pro
[0152]				370				375					380			
[0153]	Asp	Asn	Ser	Thr	His	Asn	Thr	Pro	Val	Tyr	Lys	Leu	Asp	Ile	Ser	Glu
[0154]	385					390					395					400
[0155]	Ala	Thr	Gln	Val	Glu	Gln	His	His	Arg	Arg	Thr	Asp	Asn	Asp	Ser	Thr

[0156]	405								410				415					
[0157]	Ala	Ser	Asp	Thr	Pro	Ser	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Pro	Pro	Lys	Ala		
[0158]	420								425				430					
[0159]	Glu	Asn	Thr	Asn	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Asp	Phe	Leu	Asp	Pro	Ala	Thr		
[0160]	435								440				445					
[0161]	Thr	Thr	Ser	Pro	Gln	Asn	His	Ser	Glu	Thr	Ala	Gly	Asn	Asn	Asn	Thr		
[0162]	450								455				460					
[0163]	His	His	Gln	Asp	Thr	Gly	Glu	Glu	Ser	Ala	Ser	Ser	Gly	Lys	Leu	Gly		
[0164]	465								470				475				480	
[0165]	Leu	Ile	Thr	Asn	Thr	Ile	Ala	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Ile	Thr	Gly	Gly		
[0166]	485								490				495					
[0167]	Arg	Arg	Thr	Arg	Arg	Glu	Ala	Ile	Val	Asn	Ala	Gln	Pro	Lys	Cys	Asn		
[0168]	500								505				510					
[0169]	Pro	Asn	Leu	His	Tyr	Trp	Thr	Thr	Gln	Asp	Glu	Gly	Ala	Ala	Ile	Gly		
[0170]	515								520				525					
[0171]	Leu	Ala	Trp	Ile	Pro	Tyr	Phe	Gly	Pro	Ala	Ala	Glu	Gly	Ile	Tyr	Thr		
[0172]	530								535				540					
[0173]	Glu	Gly	Leu	Met	His	Asn	Gln	Asp	Gly	Leu	Ile	Cys	Gly	Leu	Arg	Gln		
[0174]	545								550				555				560	
[0175]	Leu	Ala	Asn	Glu	Thr	Thr	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Phe	Leu	Arg	Ala	Thr		
[0176]	565								570				575					
[0177]	Thr	Glu	Leu	Arg	Thr	Phe	Ser	Ile	Leu	Asn	Arg	Lys	Ala	Ile	Asp	Phe		
[0178]	580								585				590					
[0179]	Leu	Leu	Gln	Arg	Trp	Gly	Gly	Thr	Cys	His	Ile	Leu	Gly	Pro	Asp	Cys		
[0180]	595								600				605					
[0181]	Cys	Ile	Glu	Pro	His	Asp	Trp	Thr	Lys	Asn	Ile	Thr	Asp	Lys	Ile	Asp		
[0182]	610								615				620					
[0183]	Gln	Ile	Ile	His	Asp	Phe	Val	Asp	Lys	Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Gly	Asp		
[0184]	625								630				635				640	
[0185]	Asn	Asp	Asn	Trp	Trp	Thr	Gly	Trp	Arg	Gly	Gly	Tyr	Gln	Ile	Leu	Ser		
[0186]	645								650				655					
[0187]	Ile	Tyr	Ser	Thr	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	Ile	Met	Met	Ala		
[0188]	660								665				670					
[0189]	Gly	Leu	Ser	Leu	Trp	Met	Cys	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu	Gln	Cys	Arg	Ile		
[0190]	675								680				685					
[0191]	Cys	Ile																
[0192]	690																	

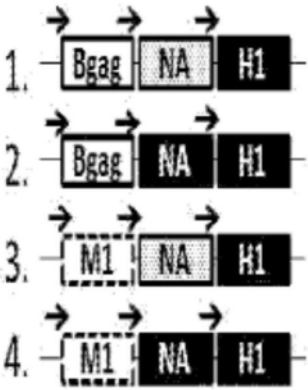


图1

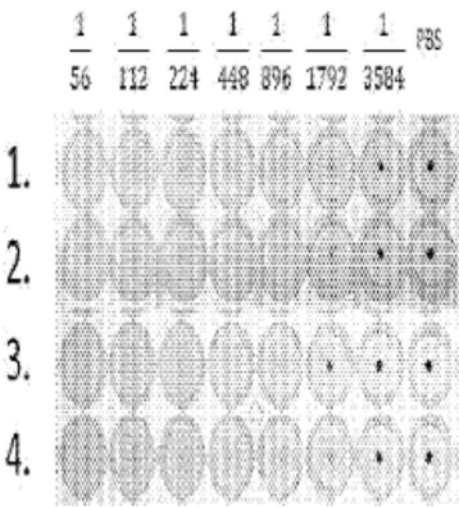


图2

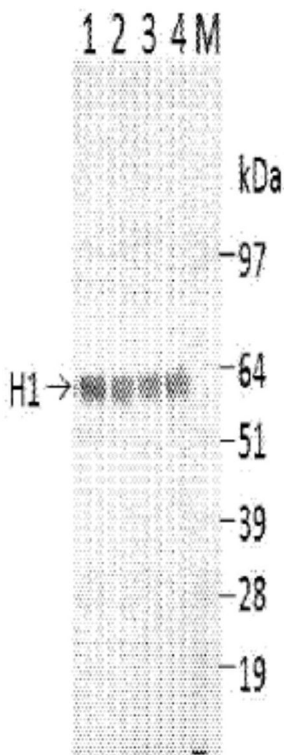


图3

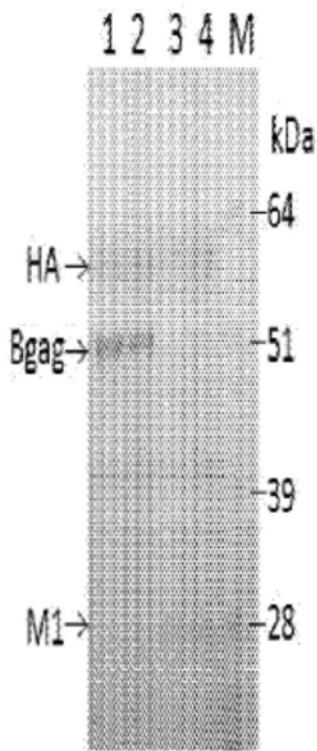


图4

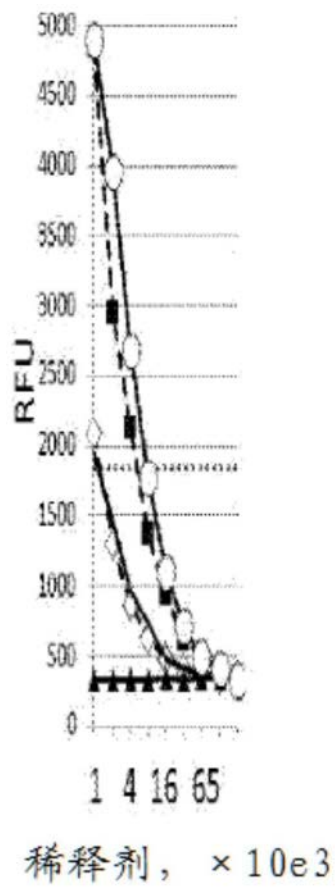


图5



图6



图7

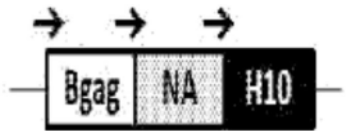


图8

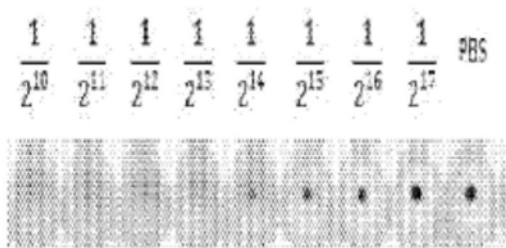


图9

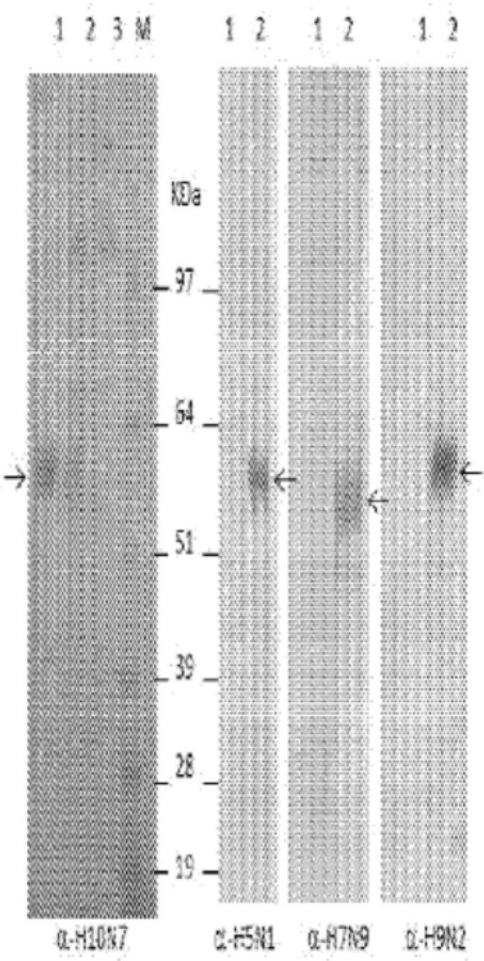


图10

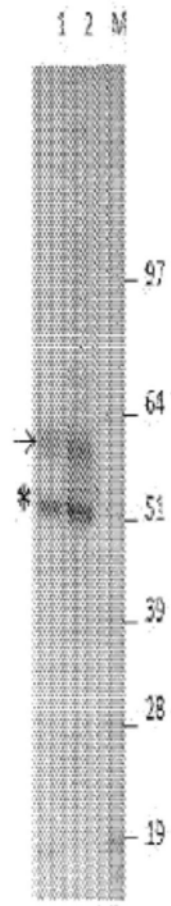


图11

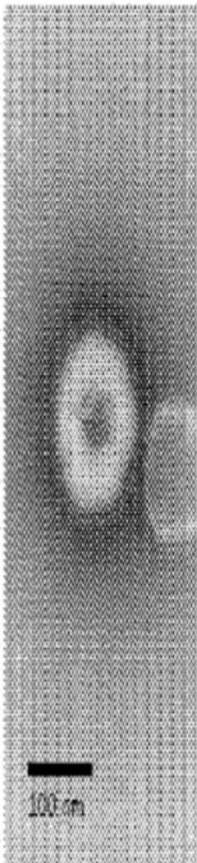


图12

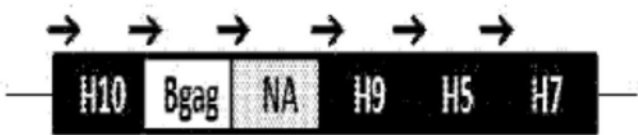


图13

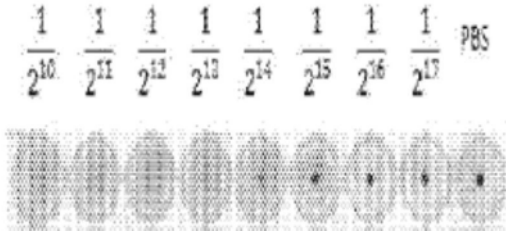


图14

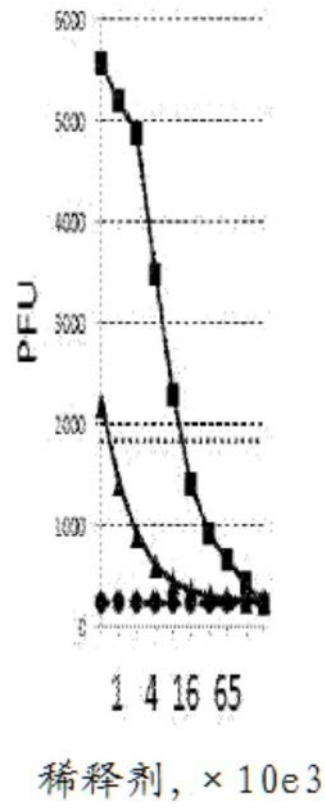


图15



图16

源自 Mayinga 菌株的埃博拉病毒糖蛋白的原始蛋白质序列(“EboMay GP”)

MGVTGILQLPRDRFKRTSFFLWVILFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLV
CRDKLSSTNQLRSVGLNLEGNGVATDVPSATKRWGFRSGVPPKVVNYEAGEW
AENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGEPRCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKE
GAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNATED
PSSGYSTTIRYQATGFGTNETEYLFEVDNLTIVQLESRFTTPQFLLQLNETI
YTSGKRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVS
NGAKNISGQSPARTSSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSH
LTTLATISTSPQSLTTKPGPDNSTHNTPVYKLDISEATQVEQHHRRTDNDST
ASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTTSPQNHSETAGNNNTHHQD
TGEESASSGKLGITNTIAGVAGLITGGRRTRREAIVNAQPKCNPNLHYWTT
QDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGIYTEGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLF
LRATTELRTESILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKID
QIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGWRQWIPAGIGVTGVIIAVIALEFCICKEVF

图17

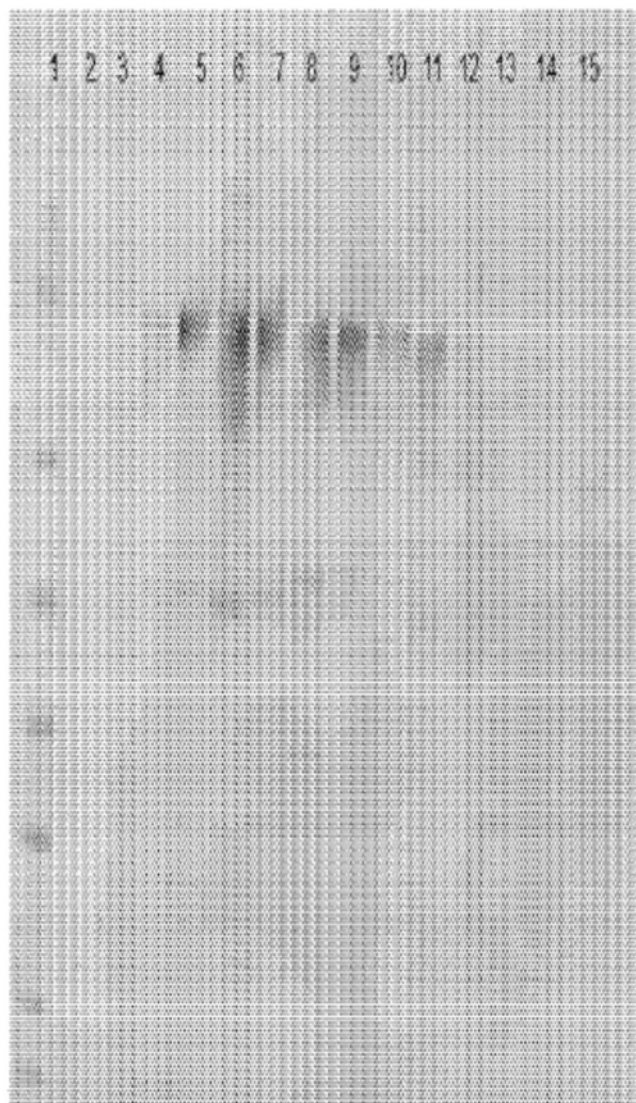
具有流感 HA 跨膜区和 C-末端的嵌合 EboMay GP (“EboMay GP-TMCT”)

MGVGTGILQLPRDRFKRTSEFLWVIILFQRTFSIPLGVIHNSTLQVSDVDKLV
 CRDKLSSTNQLRVGLNLEGNGVATDVPSATKRWGFSGVPPKVVNYEAGEW
 AENCYNLEIKKPDGSECLPAAPDGIRGFPCRYVHKVSGTGPCAGDFAFHKE
 GAFFLYDRLASTVIYRGTTFAEGVVAFLILPQAKKDFSSHPLREPVNATED
 PSSGYYSTTIRYQATGFGTNETEYLF EVDNLTYYVQLESRTTPQFLLQLNETI
 YTSGKRSNTTGKLIWKVNPEIDTTIGEWAFWETKKNLTRKIRSEELSFTVVS
 NGAKNISGQSPARTSSDPGTNTTTEDHKIMASENSSAMVQVHSQGREAAVSH
 LTTLATISTSPQSLTTKPGPDNSTHNTVPYKLDISEATQVEQHHRRTDNDST
 ASDTPSATTAAGPPKAENTNTSKSTDFLDPATTTSPQNHSETAGNNNTHHQD
 TGEESASSGKLGLITNTIAGVAGLITGGRRTREAIVNAQPKCNPNLHYWTT
 QDEGAAIGLAWIPYFGPAAEGITYTEGLMHNQDGLICGLRQLANETTQALQLF
 LRATTELRTFSILNRKAIDFLLQRWGGTCHILGPDCCIEPHDWTKNITDKID
 QIIHDFVDKTLPDQGDNDNWWTGWRGGYQILSIYSTVASSLALAIMMAGLSL
WMCSNGSLQCRICI

流感 HA 序列被加下划线

图18

**埃博拉病毒糖蛋白 (EboMay-GP-TMCT)的表达: 通过超速离心在蔗糖
梯度上进一步纯化并经抗埃博拉抗血清染色的 EboMay-GP-TMCT IECC
Fxn1 的蛋白质免疫印迹**



1. 标记 SeeBlue Plus2
2. 蔗糖梯度 Fxns 1+2
3. 蔗糖梯度 Fxns 3+4
4. 蔗糖梯度 Fxns 5+6
5. 蔗糖梯度 Fxns 7+8
6. 蔗糖梯度 Fxns 9+10
7. 蔗糖梯度 Fxns 11+12
8. 蔗糖梯度 Fxns 13+14
9. 蔗糖梯度 Fxns 15+16
10. 蔗糖梯度 Fxns 17+18
11. 蔗糖梯度 Fxns 19+20
12. 蔗糖梯度 Fxns 21+22
13. 蔗糖梯度 Fxns 23+24
14. 蔗糖梯度 Fxns 25+26
15. 蔗糖梯度 Fxns 27+28

图19

经考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶上的 IECC Fxn 1 和 IECC Fxn 3 的峰值
蔗糖梯度分数的蛋白质表达谱

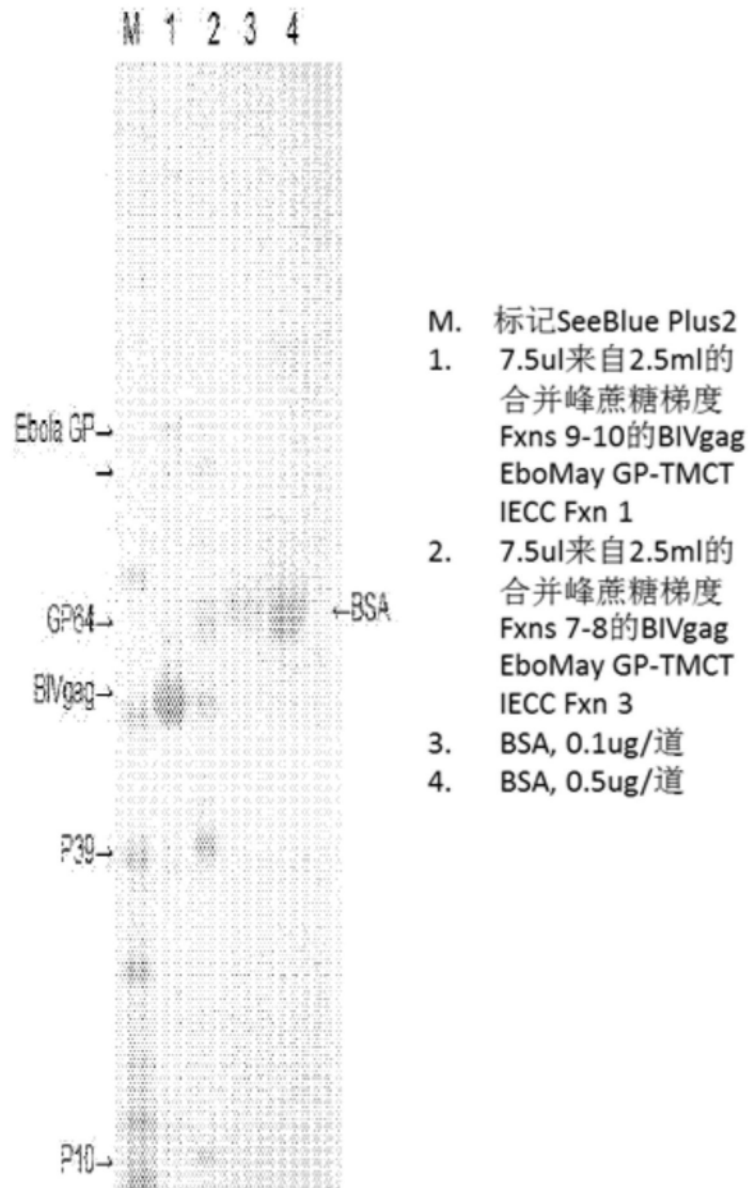
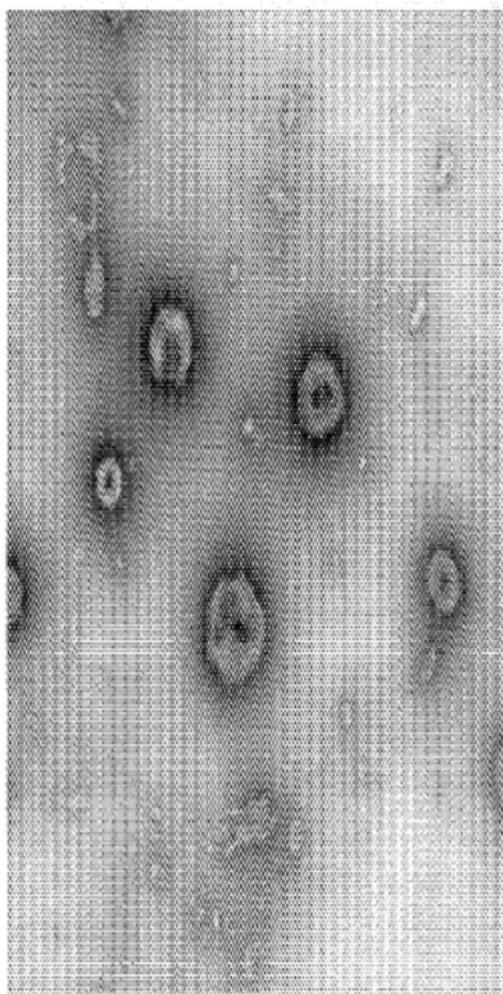


图20

EboMay GP-TMCT Bgag VLP 电子显微照片

S2 BIV-Ebo 1-2 CARB PTA 90985 N2_010

口径: 0.001036微米/像素

12:34:31 PM 11/14/2014

500 nm

高压=80.0千伏

直接放大: 70000倍

图21

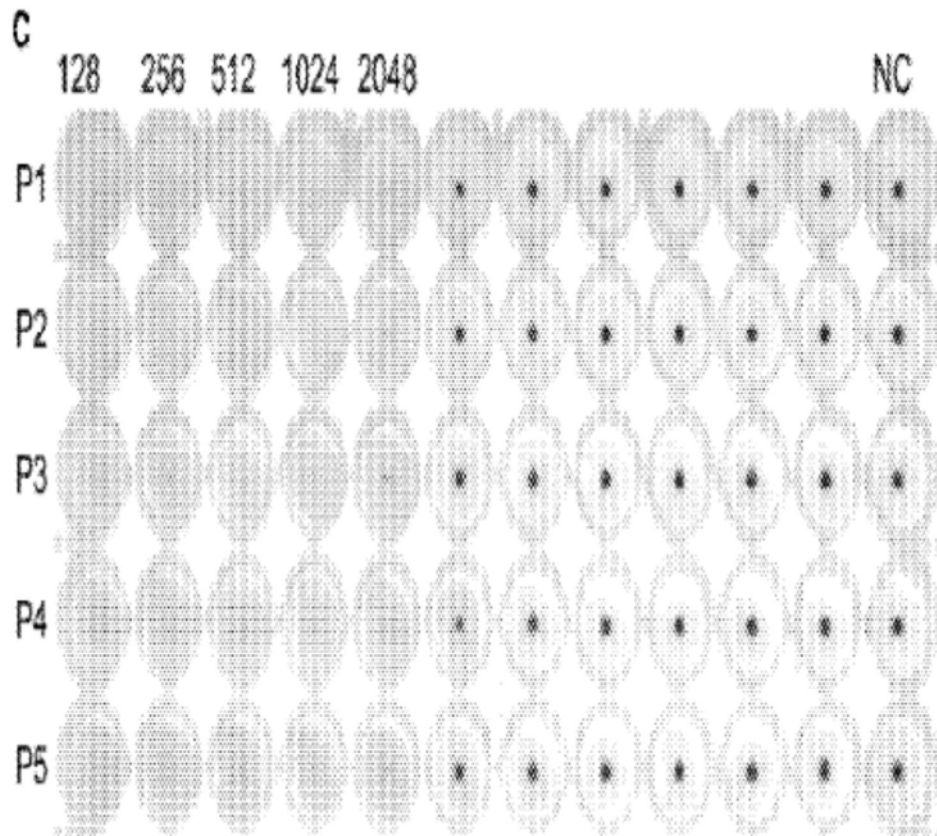


图22

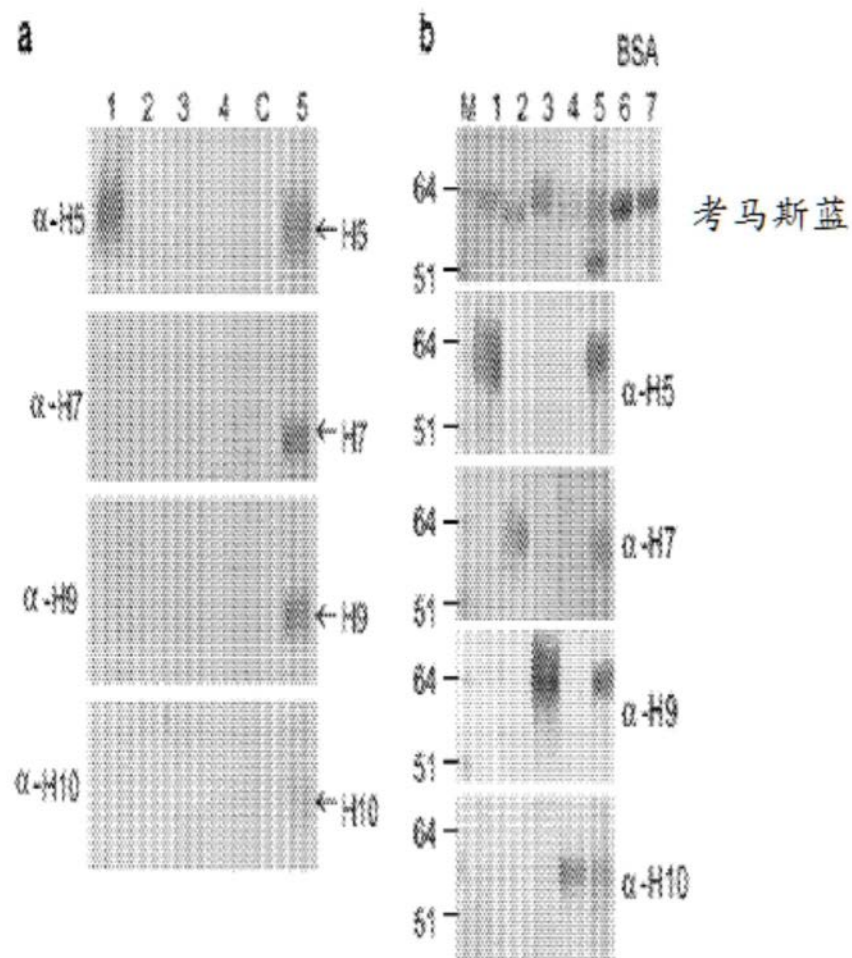


图23

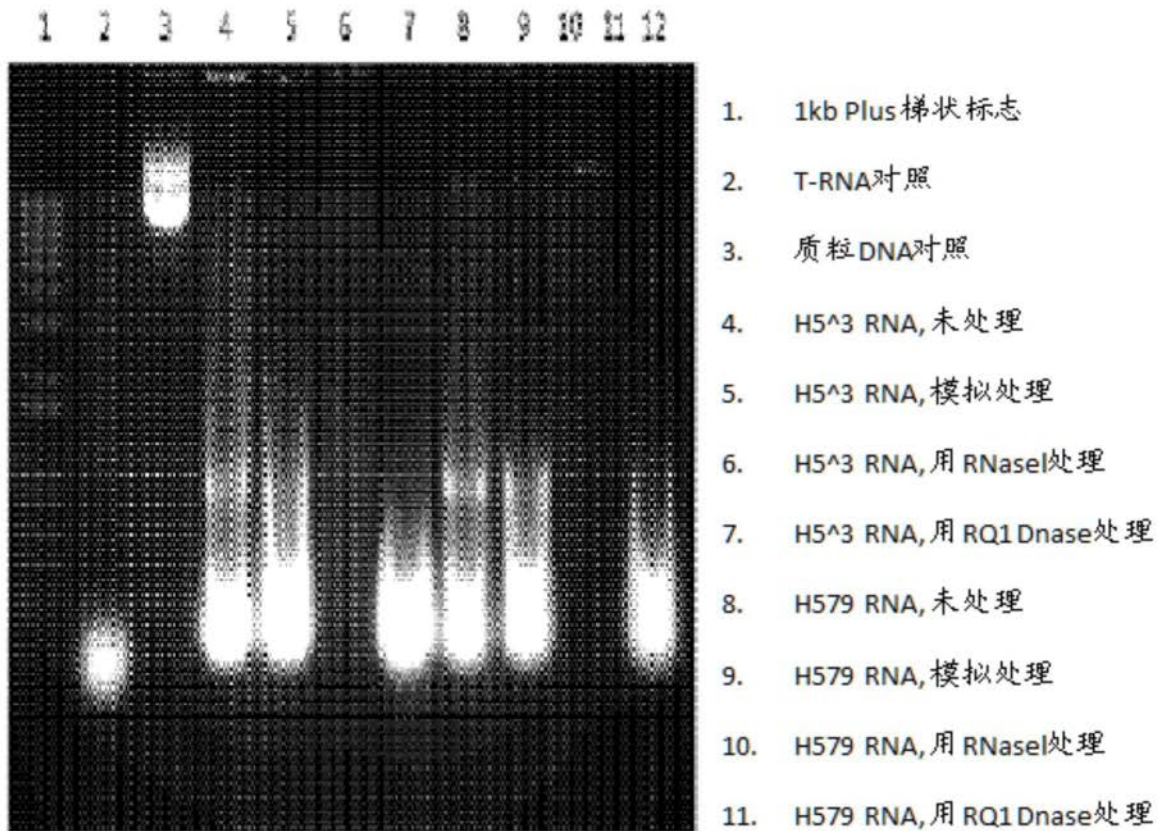
四亚型 VLPs^a 中 HA 的含量

HA 抗原	HA 含量, $\mu\text{g}/\text{ml} + \text{SD}^b$	HA 含量, %
H5	298.54 ± 7.4	23.8
H7	286.6 ± 43.8	22.8
H9	428.8 ± 9.6	34.2
H10	241.1 ± 5.4	19.2

^a 通过 SDS-PAGE 密度测定法和半定量蛋白质免疫印迹。^b SD, 标准偏差。

图24

琼脂糖凝胶



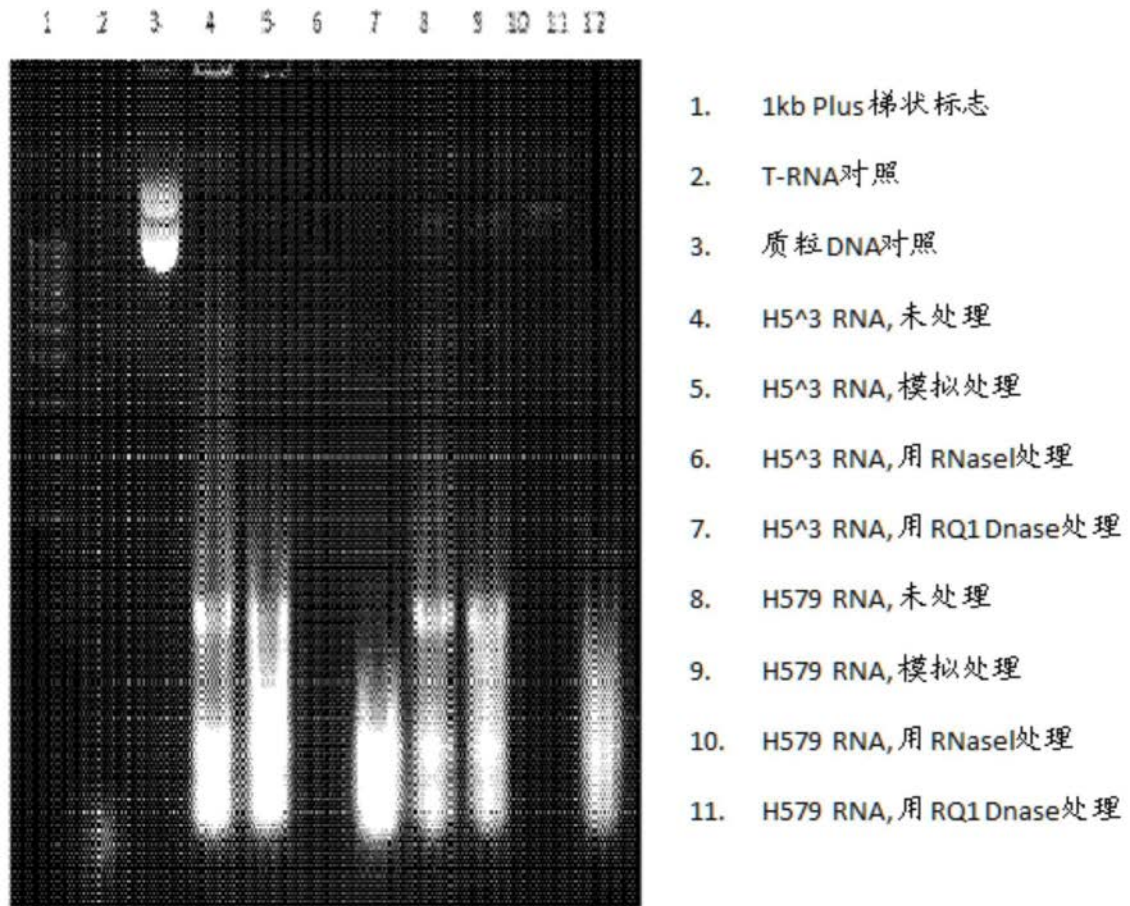
未处理= Trizol提取核酸, 无缓冲液, 保存在冰上

模拟处理= Trizol提取核酸, 和其他样品相同的方式处理

(+缓冲液, 37°C 30分钟, +EDTA, 65°C 10分钟) 但没有酶

图25

琼脂糖凝胶（长时间运行）



未处理= Trizol提取核酸，无缓冲液，保存在冰上
模拟处理= Trizol提取核酸，和其他样品相同的方式处理
(+缓冲液，37°C 30分钟，+EDTA，65°C 10分钟) 但没有酶

图26

荧光剂（Qubit）

样品	RNA (μg/mL)	DNA (μg/mL)
H5^3, 未处理	400	14.00
H5^3, 模拟处理	312	7.90
H5^3+RNaseI	<0.050	8.48
H5^3+RQ1 DNase	398	6.46
H579, 未处理	370	8.24
H579, 模拟处理	350	7.08
H579+RNaseI	<0.050	3.68
H579+RQ1 DNase	222	4.74

图27

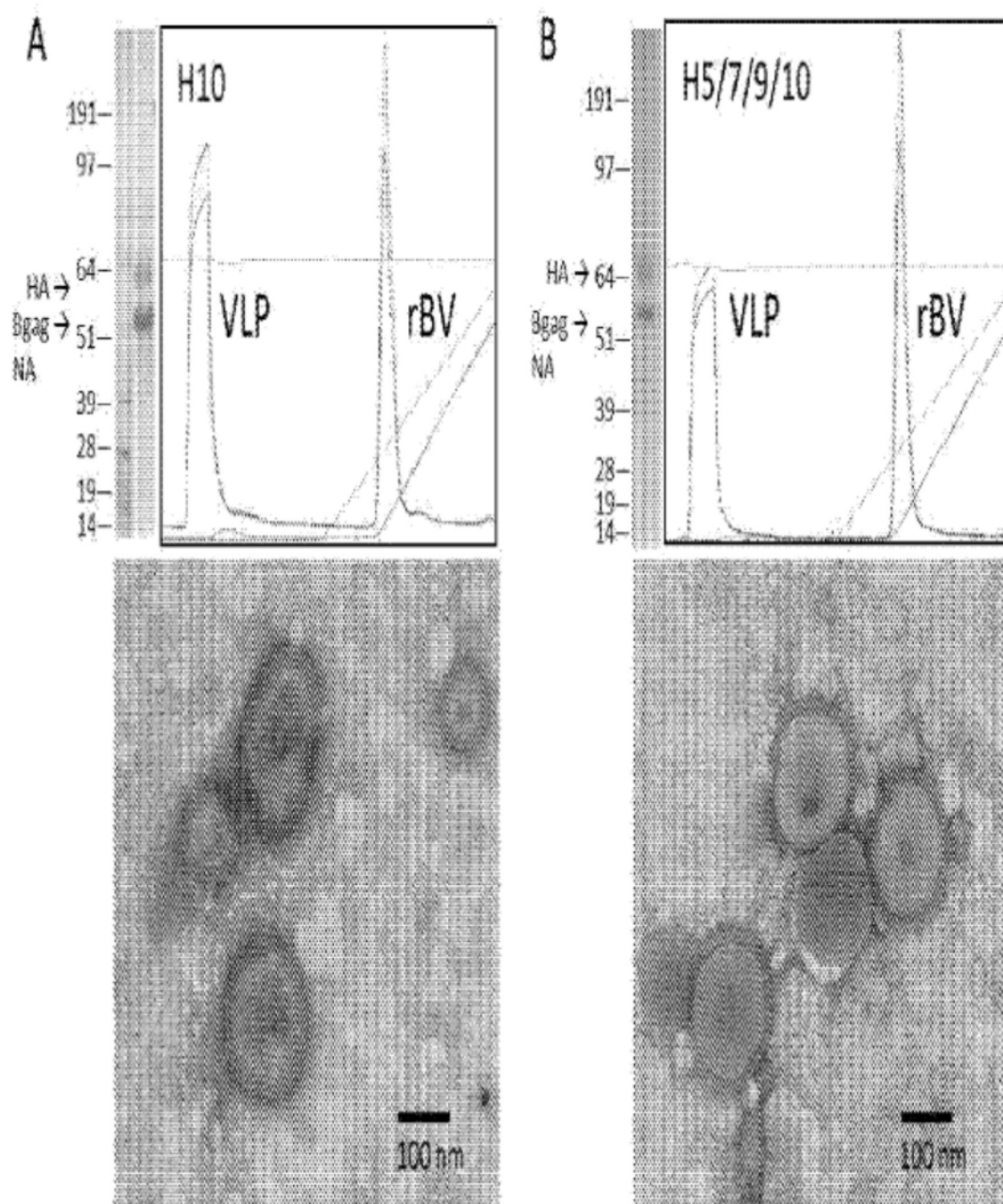


图28

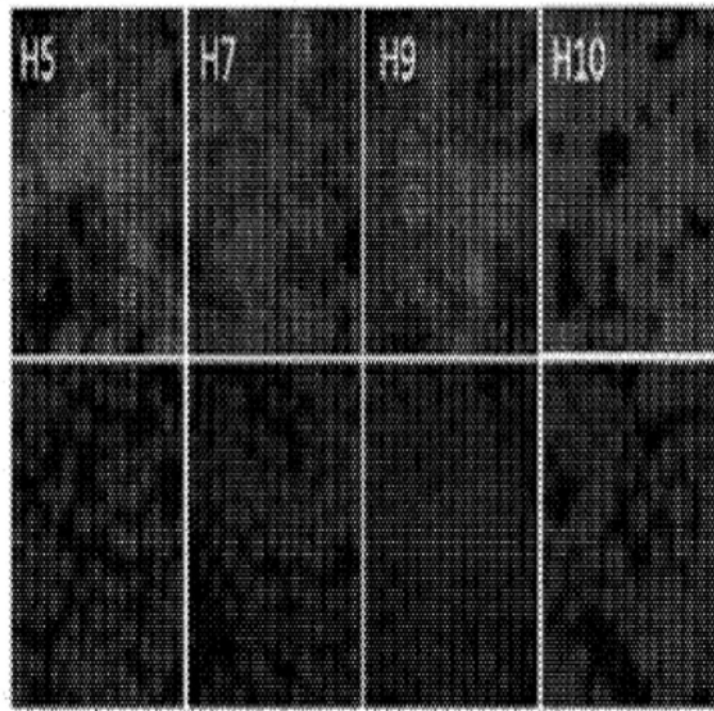


图29

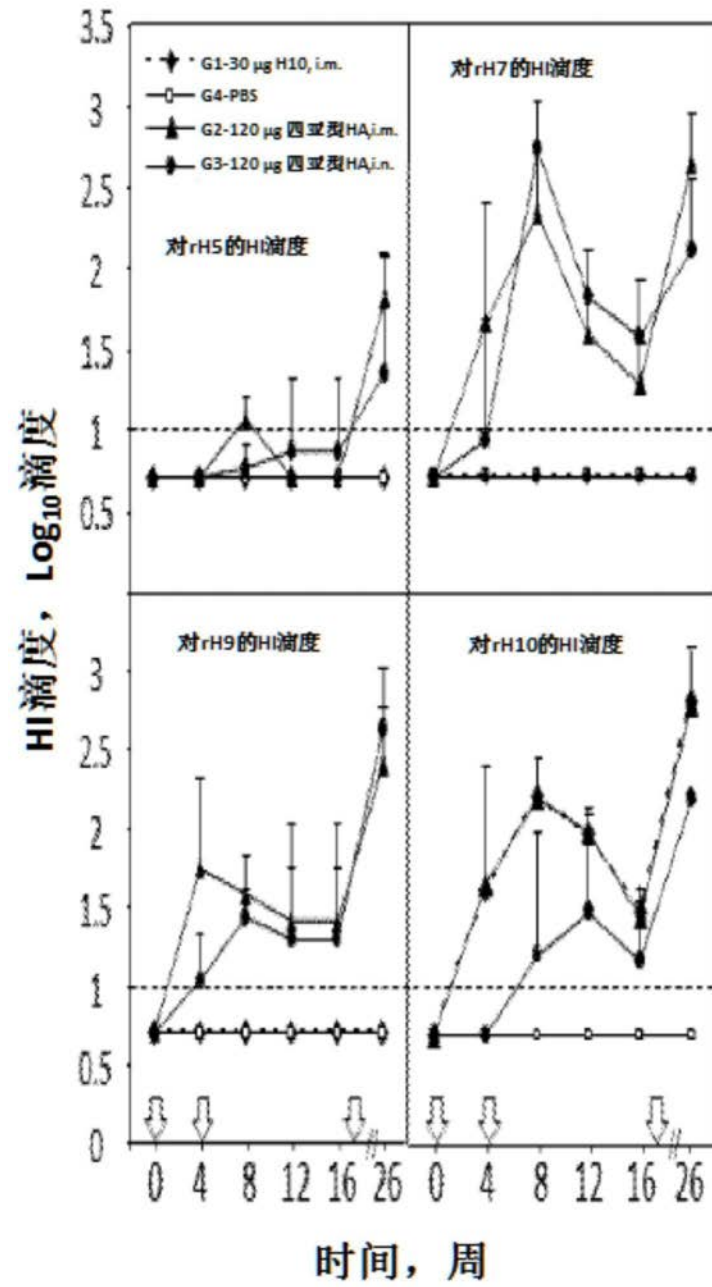


图30

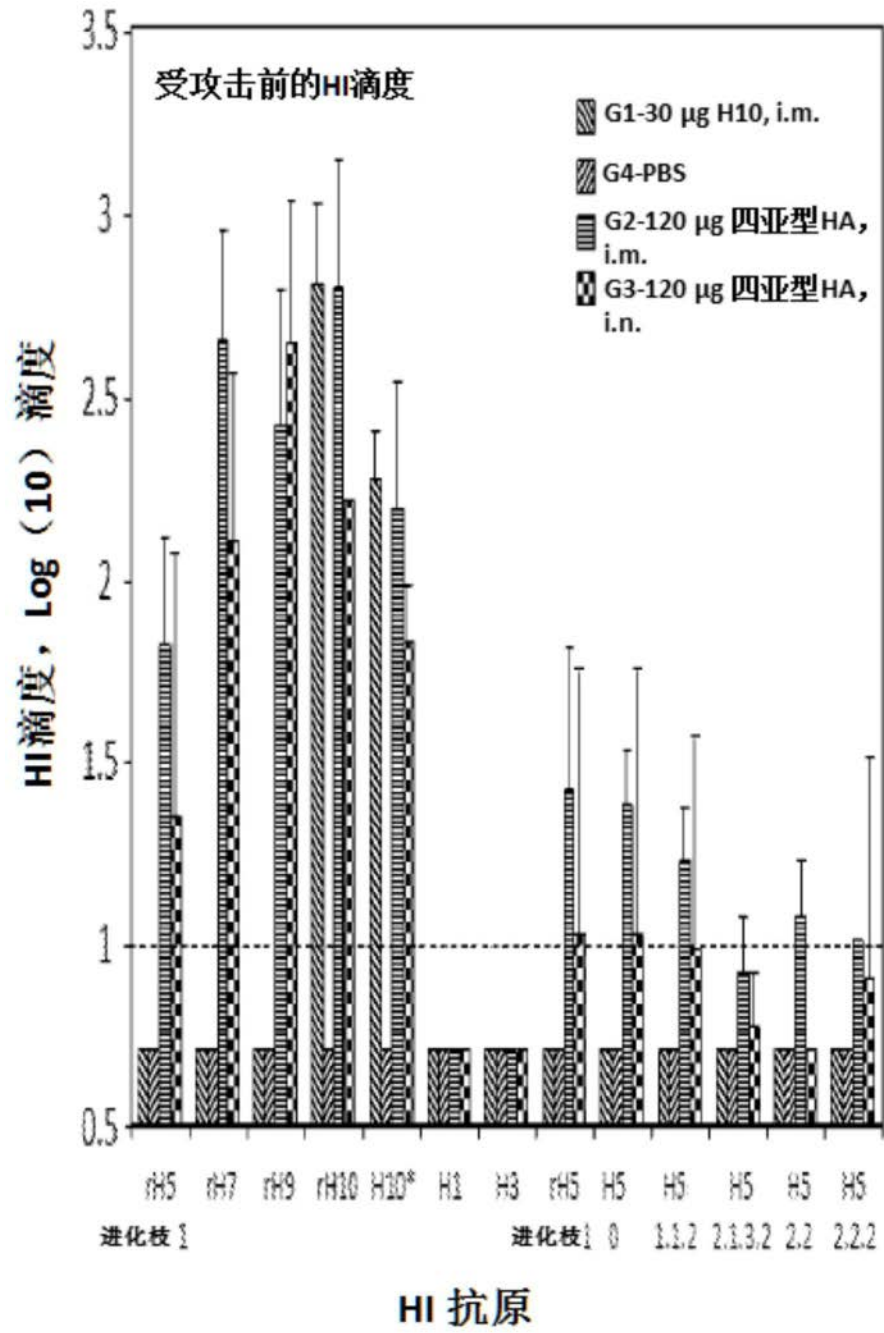


图31

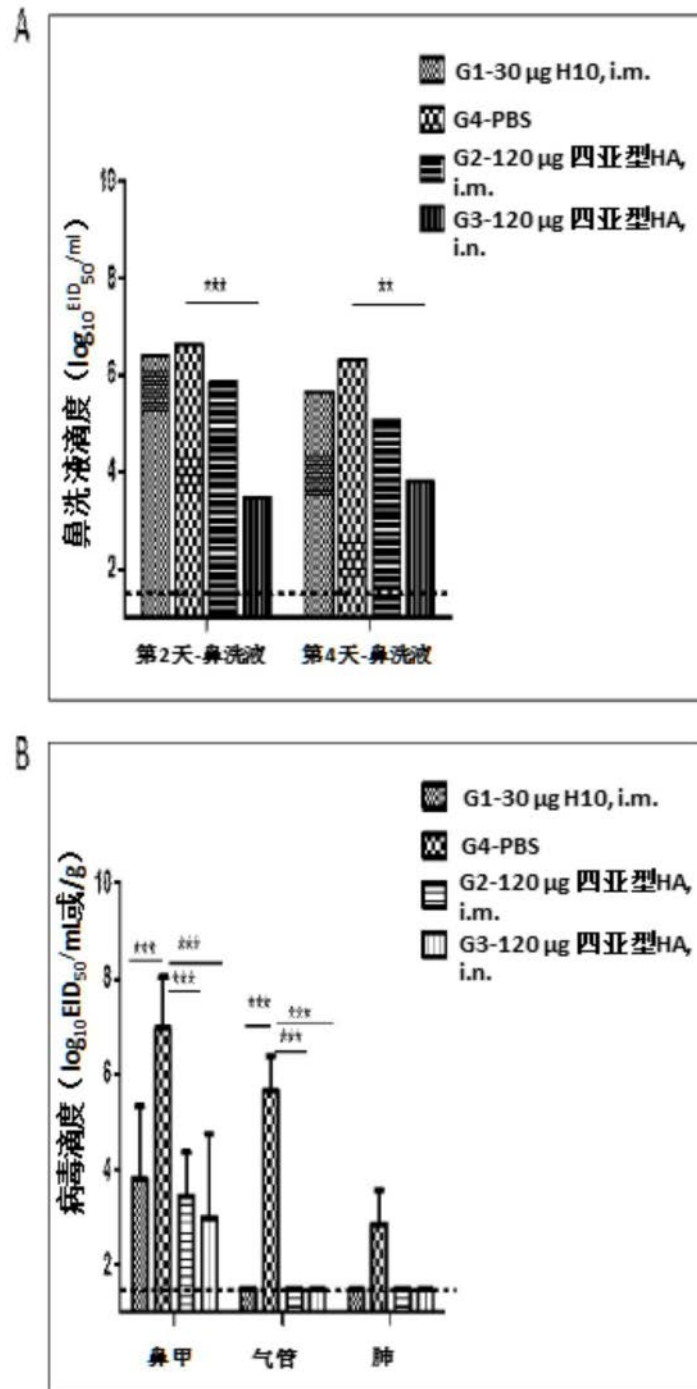


图32

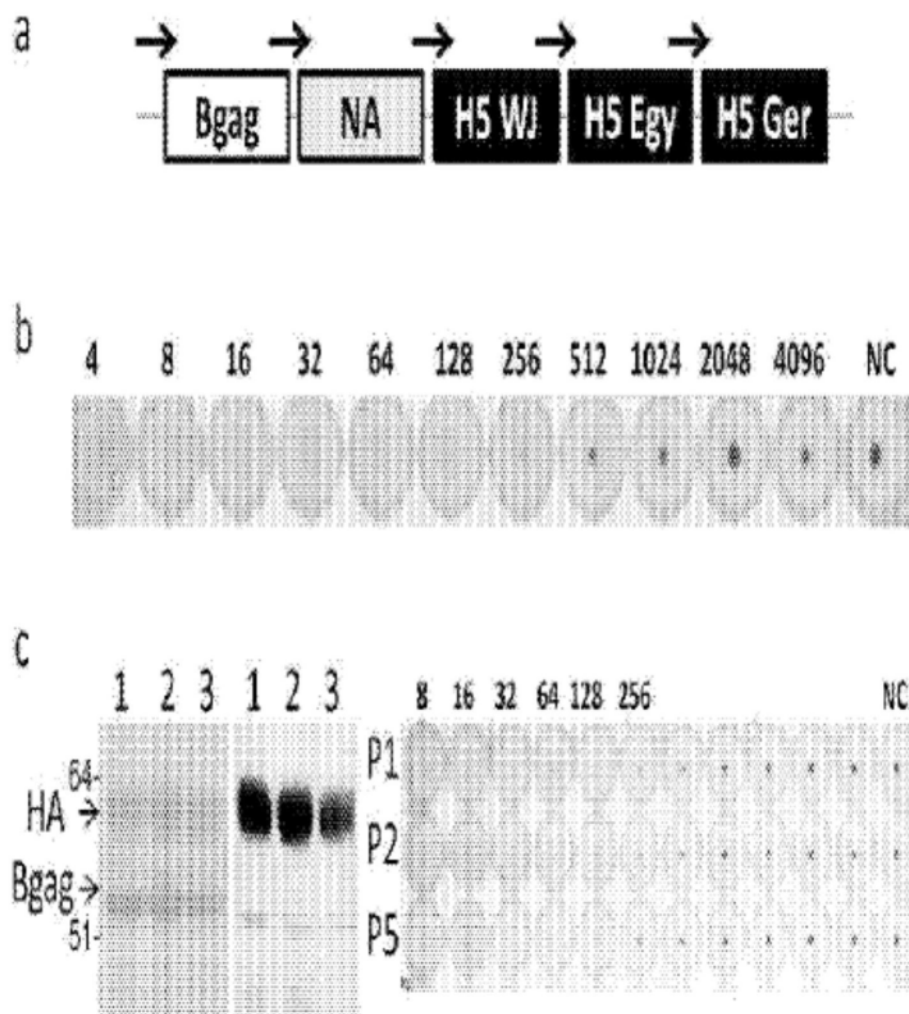


图33

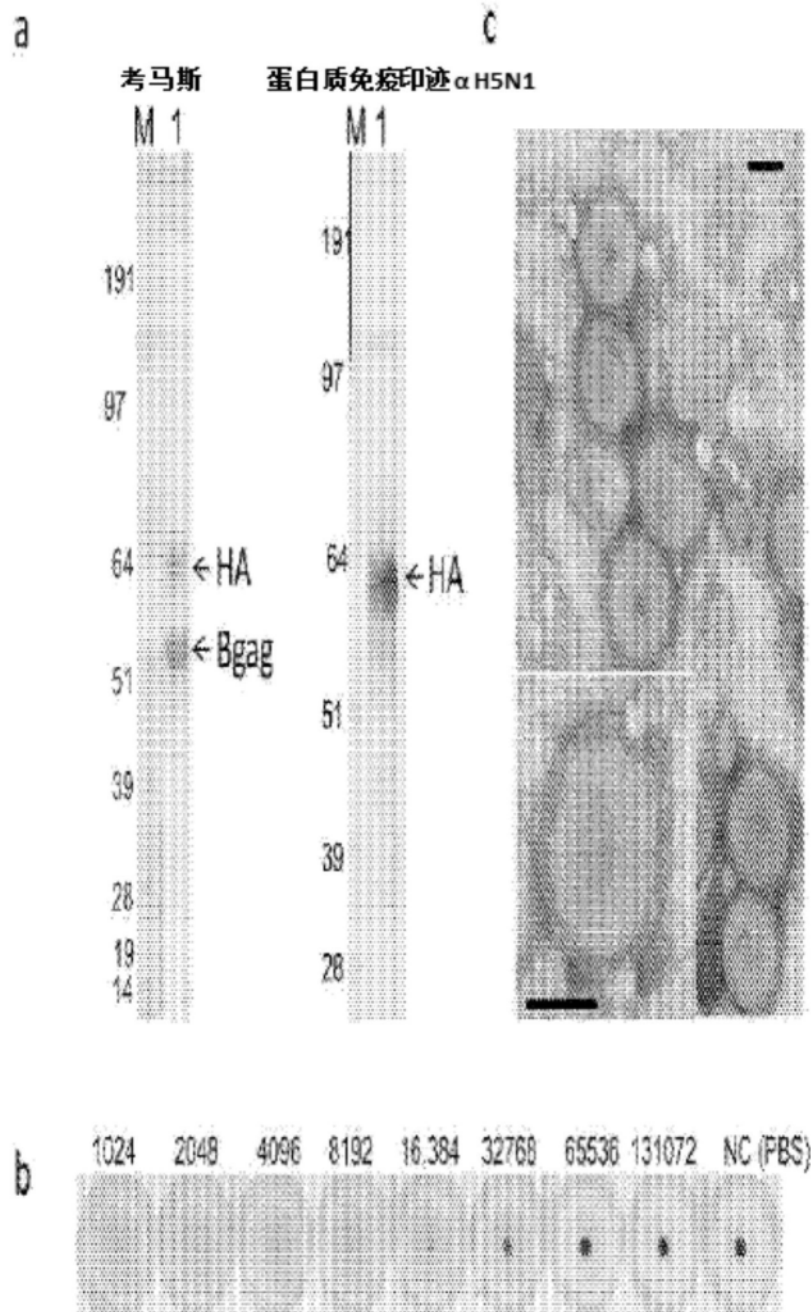


图34

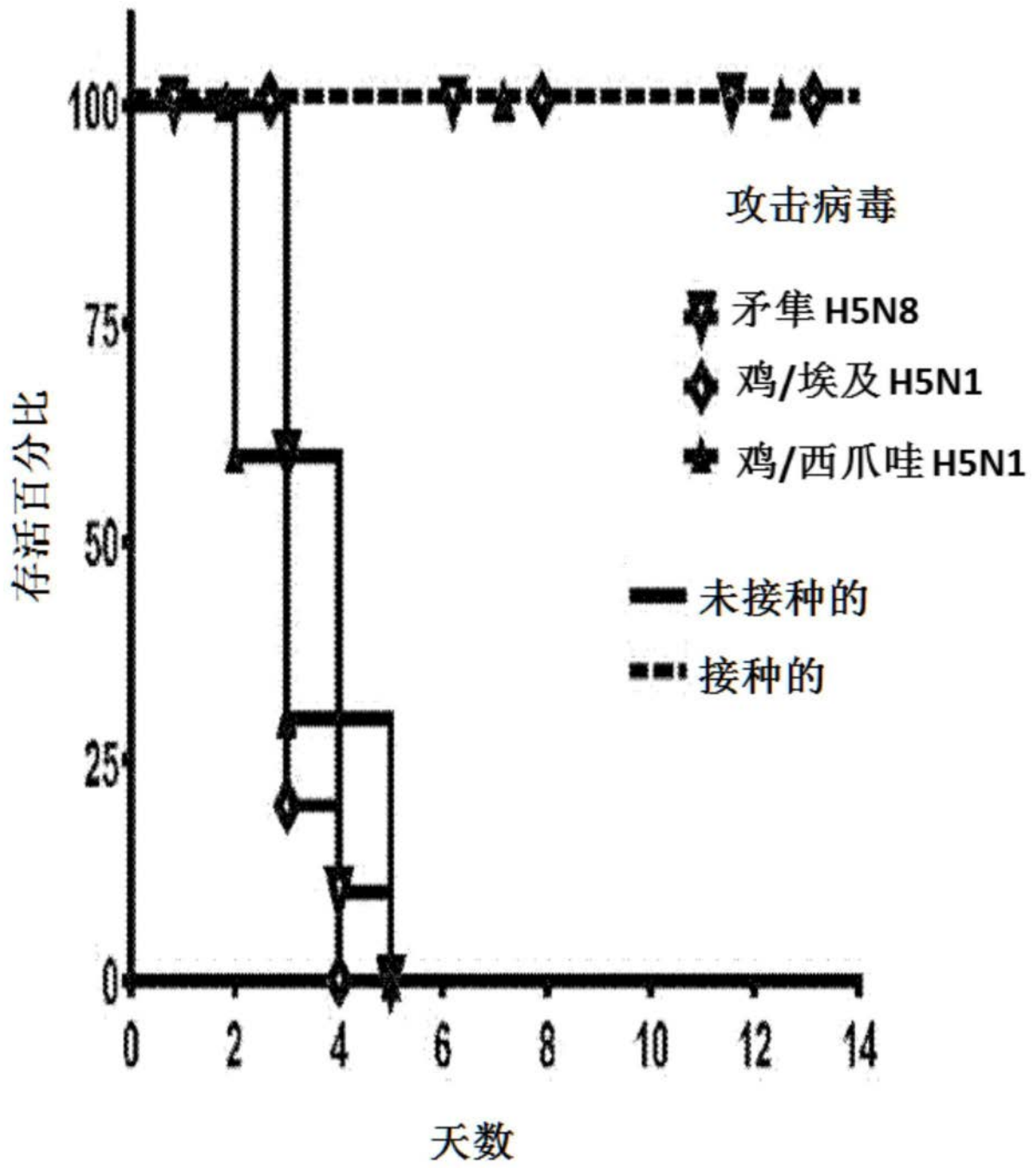


图36

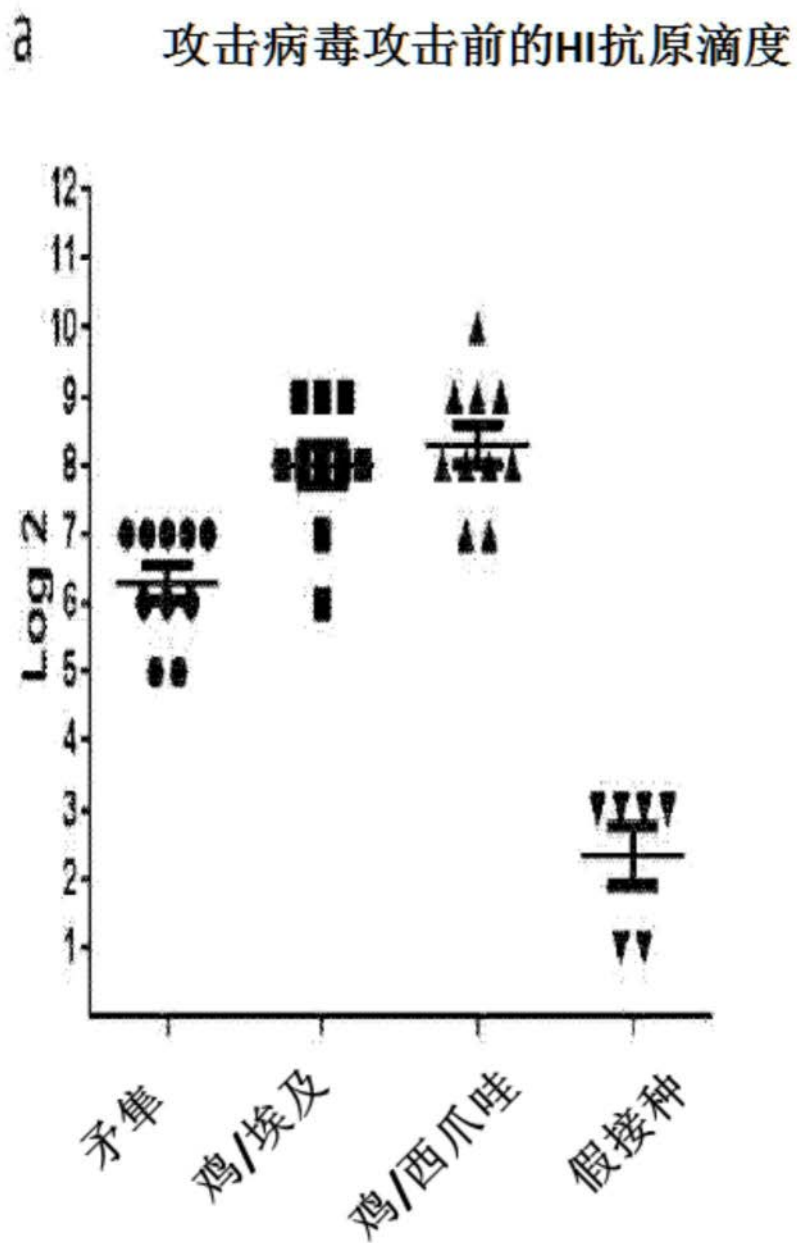


图37

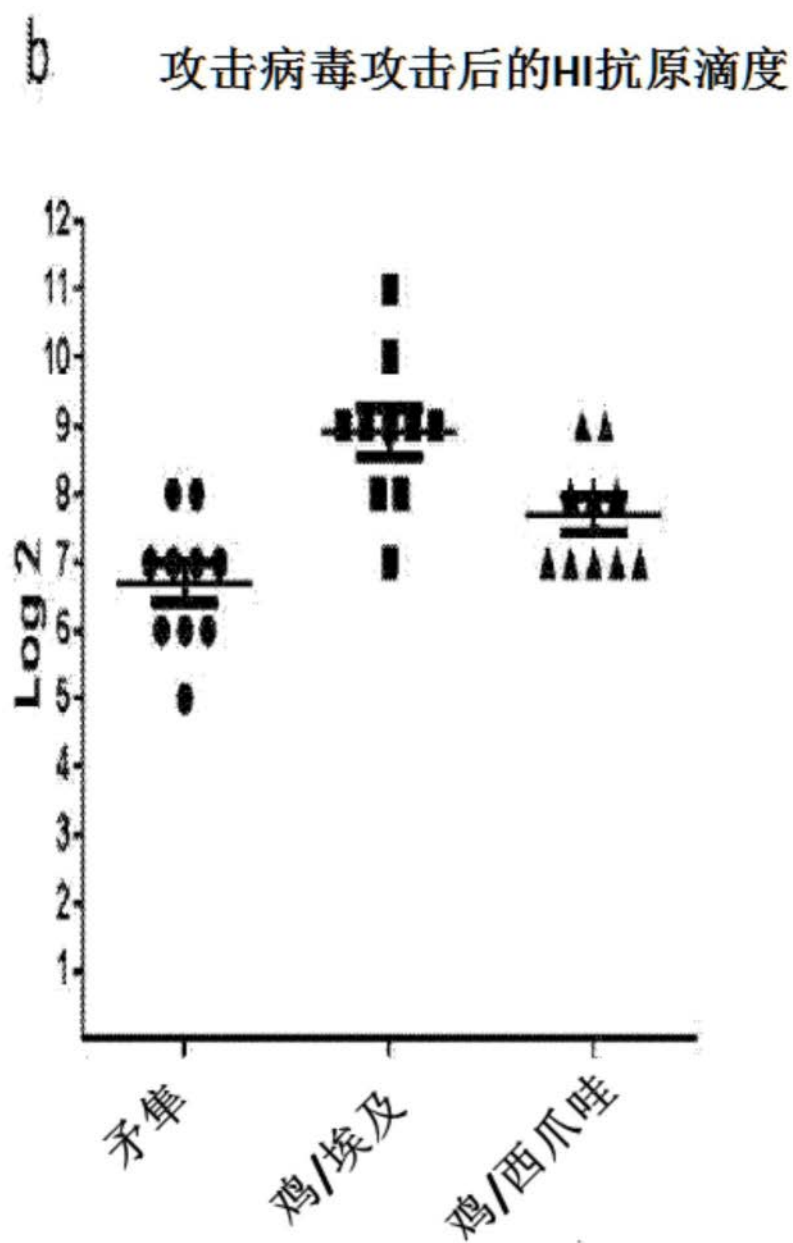
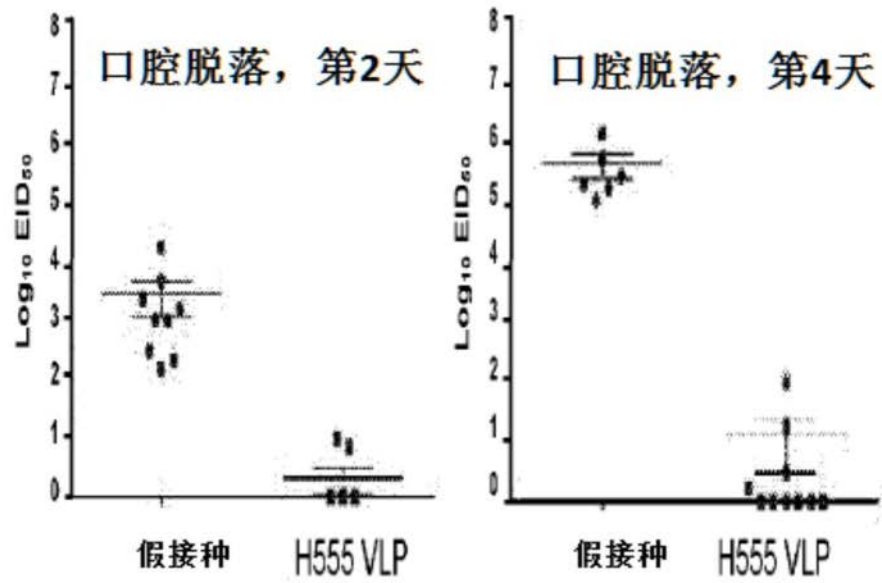


图38



甲型/矛隼/华盛顿/2014 H5N8 (进化枝2.3.4.4)

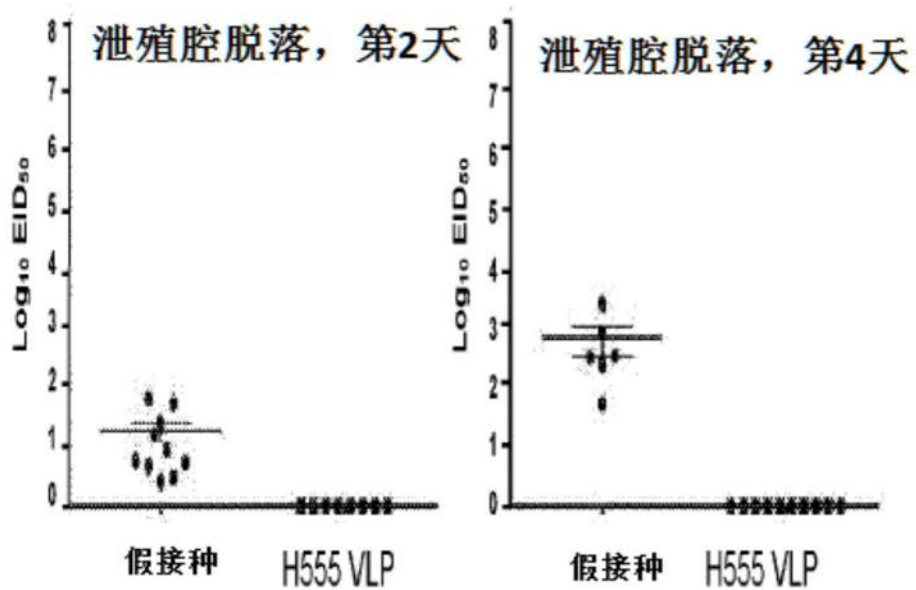


图39

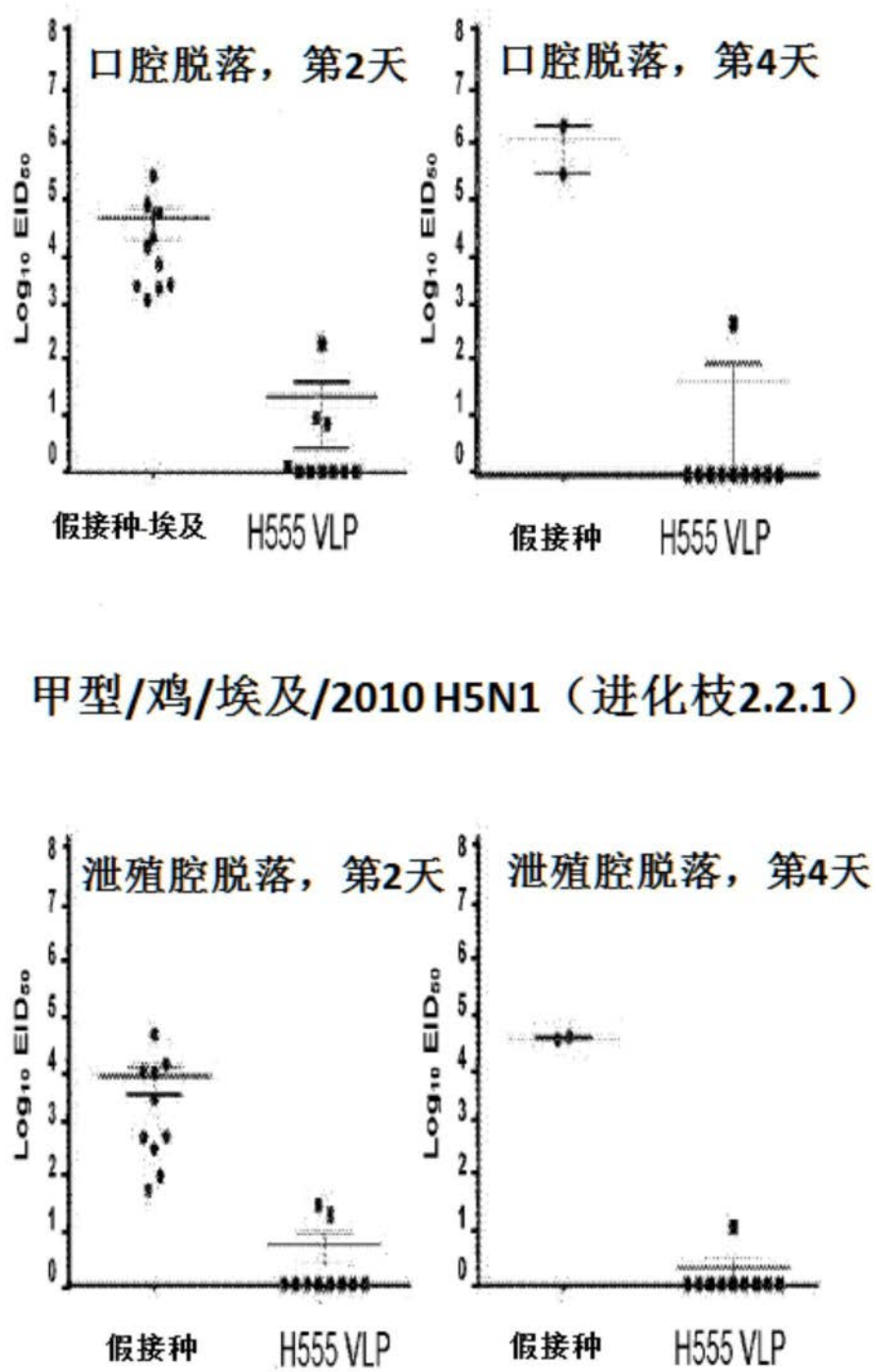
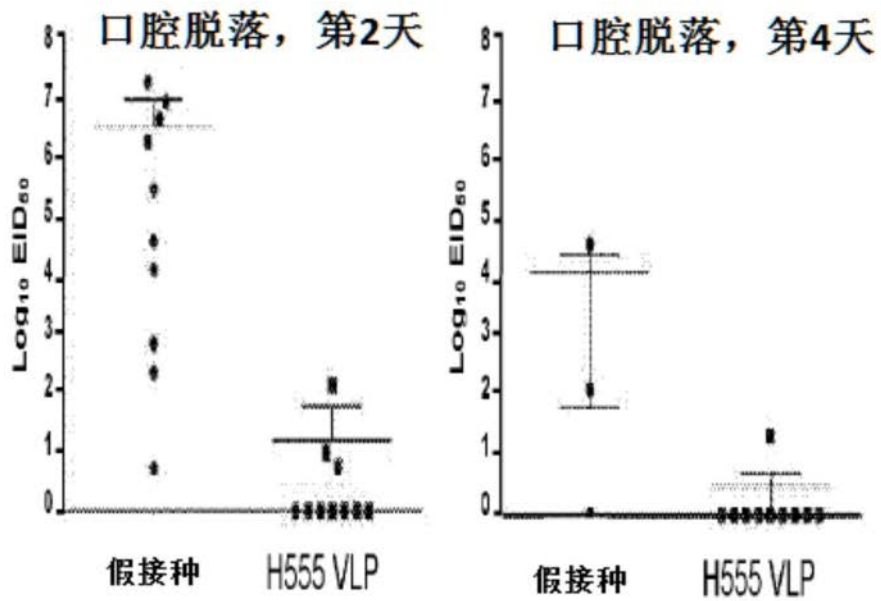


图40



甲型/鸡/西爪哇苏横/2007 H5N1 (进化枝2.1.3)

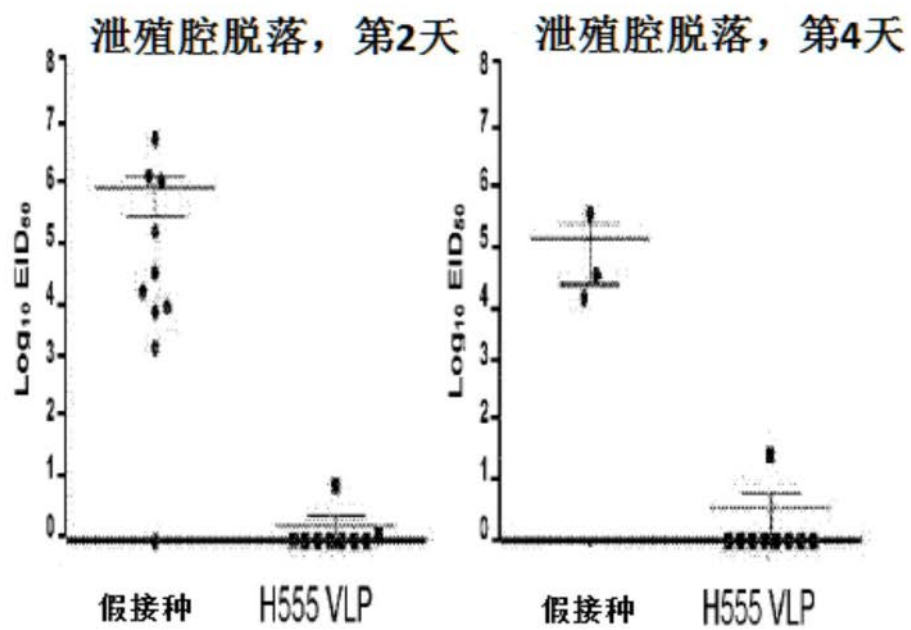


图41