



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105214080 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201510703646. 0

(22) 申请日 2010. 07. 15

(30) 优先权数据

61/225, 805 2009. 07. 15 US

61/294, 426 2010. 01. 12 US

(62) 分案原申请数据

201080040594. 9 2010. 07. 15

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 K·斯旺森 P·R·道米策

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 陶启长

(51) Int. Cl.

A61K 39/155(2006. 01)

A61K 39/39(2006. 01)

C12N 15/45(2006. 01)

A61P 31/14(2006. 01)

权利要求书1页 说明书110页 附图13页

(54) 发明名称

RSV F 蛋白组合物和其制作方法

(57) 摘要

本发明涉及含 RSV F 蛋白的免疫原性组合物、制备含 RSV F 蛋白胞外域多肽的组合物的方法,和某些遗传改造的 RSV F 蛋白和编码该遗传改造的 RSV F 蛋白的核酸。用所述方法制备的组合物可在主要或单一所需形式和构型中包含 RSV F 蛋白胞外域多肽。本发明还涉及诱导对 RSV F 的免疫应答的方法。

1. 一种含一个或多个呼吸道合胞病毒 F(RSV F) 多肽的免疫原性组合物, 其中氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 ;SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:91 或 SEQ ID NO:92 替代。

2. 如权利要求 1 所述的免疫原性组合物, 其特征在于, 所述 RSV F 的氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:12 替代。

3. 如权利要求 1 所述的免疫原性组合物, 其特征在于, 所述 RSV F 的氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 ;SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:92 替代。

4. 如权利要求 1 所述的免疫原性组合物, 其特征在于, 所述氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:9 替代。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的免疫原性组合物, 其特征在于, 所述 RSV F 为单体、三聚体或单体和三聚体组合的形式。

6. 如权利要求 3 或 4 所述的免疫原性组合物, 其特征在于, 所述 RSV F 为单体、三聚体, 玫瑰花结或其任何组合的形式。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的免疫原性组合物, 其特征在于, 所述 RSV F 多肽是含所述 RSV 胞外域的可溶性多肽。

8. 如权利要求 1-7 所述的免疫原性组合物, 其特征在于, 所述组合物还包含佐剂, 其中任选所述佐剂选自下组: 铝盐、水包角鲨烯乳液、苯并萘啶化合物、磷脂化合物、小分子免疫增强剂和任何上述的组合。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的免疫原性组合物, 其特征在于, 所述重组多肽还包括异源寡聚化结构域、表位或信号肽, 任选所述异源寡聚化结构域选自下组: 来自流感血凝素, 来自 SARS 刺突, 或来自 HIV gp41、NadA、改良的 GCN4、天冬氨酸转氨甲酰酶或 T4 噬菌体次要纤维蛋白的三聚结构域。

10. 一种编码如权利要求 1-9 中任一项所述组合物中的多肽的分离的核酸, 其中任选所述核酸是自复制 RNA 分子。

RSV F 蛋白组合物和其制作方法

[0001] 本发明专利申请是国际申请号为PCT/US2010/042161,国际申请日为2010年07月15日,进入中国国家阶段的申请号为201080040594.9,名称为“RSV F蛋白组合物和其制作方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2009年7月15日提交的美国专利申请第61/225,805号以及2010年1月12日提交的美国专利申请第61/294,426号的权益。上述申请的全部说明通过参考纳入本文。

[0004] 发明背景

[0005] 呼吸道合胞病毒(RSV)是副粘病毒科(Paramyxoviridae)肺炎病毒属(Pneumovirus)中的包膜不分节负链RNA病毒。其为儿童出生后第一年中细支气管炎和肺炎的主要原因。RSV还引起重复感染包括严重下呼吸道疾病,其可在任何年龄发作,特别是在老年人或心脏、肺或免疫系统受损的人中。

[0006] 为了感染宿主细胞,与其他包膜病毒如流感病毒和HIV一样,副粘病毒如RSV需要病毒膜与宿主细胞膜融合。对于RSV,保守融合蛋白(RSV F)通过偶联不可逆的蛋白重折叠和膜并置来融合病毒和细胞膜。在基于副粘病毒研究的现有模型中,所述RSV F蛋白最初折叠为亚稳态“融合前”构型。进入细胞时,所述融合前构型经历重折叠且构型变化为其稳定的“融合后”构型。

[0007] RSV F蛋白由mRNA翻译为约574个氨基酸的蛋白,称为F₀。F₀的翻译后加工包括通过内质网中的信号肽酶移除N端信号肽。转运高尔基体内的细胞蛋白酶(特别是弗林蛋白酶(furin))还在两个位置(约109/110和约136/137)切割F₀。该切割导致短干扰序列移除并产生两种仍彼此相关的亚基,称为F₁(约50kDa;C端;约为残基137-574)和F₂(约20kDa;N端;约为残基1-109)。F₁在N端含疏水性融合肽以及2个两性七肽重复区(HRA和HRB)。HRA靠近所述融合肽,HRB靠近所述跨膜结构域。3个F₁-F₂异源二聚体在病毒粒子中组装为F₁-F₂同源三聚体。

[0008] 还未获得但需要针对RSV感染的疫苗。生产疫苗的一种可能方法为基于纯化的RSV F蛋白的亚基疫苗。然而,此方法需要纯化的RSV F蛋白为长期稳定的单一形式和构型,在疫苗批次之间保持一致且方便纯化。

[0009] RSV F蛋白可被截短,例如通过缺失跨膜结构域和胞质尾,以使其表达为可能可溶的胞外域。此外,尽管RSV F蛋白最初翻译为单体,但该单体切割并组装为三聚体。RSV F蛋白为切割的三聚体形式时会暴露所述疏水性融合肽。不同三聚体如可溶性胞外域三聚体上的所述暴露疏水性融合肽可彼此结合,形成玫瑰花结型。所述疏水性融合肽也可与来自例如用于表达重组可溶RSV F蛋白的细胞的脂质和脂蛋白结合。由于RSV F蛋白加工、构造和重折叠的复杂性,难以获得纯化的、均质的免疫原性制备物。

[0010] 因此,需要改善RSV F蛋白组合物和制作RSV F蛋白组合物的方法。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明涉及含一种或多种RSV F多肽的免疫原性组合物,和某些遗传改造的RSV F

蛋白和编码该遗传改造的 RSV F 蛋白的核酸。

[0013] 一方面所述 RSV F 蛋白可溶。例如,该 RSV F 蛋白可缺失跨膜区域和胞质尾。在一些方面,所述可溶 RSV F 含一种或多种的 1) 一或两个弗林蛋白酶切割位置的一种或多种突变,2) 融合肽的一种或多种突变,3) p27 接头的一种或多种突变,4) 含添加的寡聚化序列,和 5) 含提供蛋白酶切割位置的添加的氨基酸序列。在其他或替代的方面,所述 RSV F 蛋白为单体、三聚体或单体和三聚体的组合。所述三聚体可为单分散性或为玫瑰花结形式。在额外或替代方面,所述 RSV F 蛋白可为融合前构型、中间构型或融合后构型。

[0014] 在一个方面,所述免疫原性组合物含一种或多种呼吸道合胞病毒 F (RSV F) 多肽,其中氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 ;SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:91 或 SEQ ID NO:92 替代。在一些实施方式中,所述 RSV F 多肽可溶(如,胞外域)。

[0015] 在另一方面,所述免疫原性组合物含 RSV F 多肽,其中 RSV F 的氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:12 替代。在一些实施方式中,所述 RSV F 多肽可溶(如,胞外域)。

[0016] 在另一个方面,所述免疫原性组合物含 RSV F 多肽,其中 RSV F 的氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 ;SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:92 替代。在一些实施方式中,所述 RSV F 多肽可溶(如,胞外域)。

[0017] 在另一方面,所述免疫原性组合物含 RSV F 多肽,其中氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:9 替代。在一些实施方式中,所述 RSV F 多肽可溶(如,胞外域)。

[0018] 在另一方面,所述免疫原性组合物含 RSV F 多肽,其中 RSV F 含 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸 23-99 和 151-524。在一些实施方式中,所述 RSV F 多肽可溶(如,胞外域)。

[0019] 在一个方面,所述免疫原性组合物含选自下组的多肽:SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89 和 SEQ ID NO:93。在一些实施方式中,省略所述信号肽和 / 或 HIS 标记。在一些实施方式中,所述 RSV F 多肽可溶(如,胞外域)。

[0020] 在一方面,所述免疫原性组合物含 SEQ ID NO:68 或其中省略所述信号肽和任选所述 HIS 标记的 SEQ ID NO:68。

[0021] 在另一方面,所述免疫原性组合物含选自下组的多肽:SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:71 和其中省略所述信号肽和任选所述 HIS 标记的任何上述序列。在一些实施方式中,所述 RSV F 多肽可溶(如,胞外域)。

[0022] 在优选实施方式中,所述免疫原性组合物会包括佐剂。所述佐剂优选铝盐、水包角

鲨烯乳液（如 MF59）、苯并萘啶化合物、磷脂化合物（如 E6020）、小分子免疫增强剂或任何上述的任何两种或更多的组合。

[0023] 本发明的另一方面包括重组 RSV F 多肽。所述 RSV F 形式可为单体、三聚体、三聚体玫瑰花结或单体和三聚体的组合。所述重组多肽可包括异源寡聚化结构域、表位或信号肽。所述异源寡聚化结构域优选来自流感血凝素，来自 SARS 刺突，或来自 HIV gp41、NadA、改良的 GCN4、或天冬氨酸转氨甲酰酶（ATCase）的三聚结构域。

[0024] 在一个方面，所述重组 RSV F 多肽的氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:91 或 SEQ ID NO:92 替代。在一些实施方式中，所述 RSV F 多肽可溶（如，胞外域）。

[0025] 在另一方面，所述重组 RSV F 多肽中 RSV F 的氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:12 替代。在一些实施方式中，所述 RSV F 多肽可溶（如，胞外域）。

[0026] 在另一个方面，所述重组 RSV F 多肽中 RSV F 的氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7；SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13 或 SEQ ID NO:92 替代。在一些实施方式中，所述 RSV F 多肽可溶（如，胞外域）。

[0027] 在另一方面，所述重组 RSV F 多肽中 RSV F 的氨基酸 100-150 用氨基酸序列 SEQ ID NO:9 替代。在一些实施方式中，所述 RSV F 多肽可溶（如，胞外域）。

[0028] 在一个方面，所述重组多肽选自下组：SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:86、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:89、SEQ ID NO:93 及其任何组合。任选地，省略所述信号肽和 / 或 HIS 标记。在一些实施方式中，所述 RSV F 多肽可溶（如，胞外域）。

[0029] 另一方面包括编码任何上述多肽的核酸。所述核酸可为自复制 RNA 分子。

[0030] 本发明的另一方面为含编码 RSV F 多肽的自复制 RNA 的免疫原性组合物。所述免疫原性组合物可包括递送系统。

[0031] 本发明的另一方面包括通过给予任何所述免疫原性组合物来诱导对 RSV F 免疫应答的方法。

[0032] 本发明涉及制备组合物的方法以及含 RSV F 蛋白如可溶性 RSV F 胞外域多肽的组合物，包括免疫原性组合物。所述 RSV F 胞外域多肽可为单一形式，如未切割单体、未切割三聚体、切割三聚体或切割三聚体的玫瑰花结。所述 RSV F 胞外域多肽也可两种或更多形式，例如处于平衡的两种或更多形式如未切割单体和未切割三聚体之间的平衡。本发明提供数种优点。例如，将所述组合物给予对象时，免疫原性组合物中存在的单一所需形式的 RSV F 提供了更易预测的免疫应答，且配制到疫苗中时提供更一致的稳定性和其他物理和

化学特性。

[0033] 在一个方面,本发明是生产含经切割 RSV F 蛋白胞外域多肽的组合物的方法。所述方法包括 a) 提供含一种或多种蛋白酶切割位置的未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽,其切割时产生 F_1 和 F_2 片段,和 b) 用蛋白酶或识别所述蛋白酶切割位置或多个位置的蛋白酶切割所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。通常,所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列含改变的弗林蛋白酶切割位置,且所述 RSV F 蛋白胞外域多肽分泌自宿主细胞,该宿主细胞生成氨基酸 101-氨基酸 161 位没有被切割(如 106-109 和 131-136 位的弗林蛋白酶切割位置没有被切割)的所述多肽。在一些实施方式中,纯化 a) 中提供的未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽。

[0034] a) 中提供的所述未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽可包括完整融合肽或改变的融合肽(如缺失的融合肽或突变的融合肽)。a) 中提供的所述未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽包括完整融合肽时,步骤 b) 中的切割导致形成三聚体的玫瑰花结。a) 中提供的所述未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽包括改变的融合肽时,步骤 b) 中的切割导致形成三聚体。

[0035] 所述方法还可包括任意的步骤:纯化通过切割所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽生成的玫瑰花结或三聚体。在优选的实施方式中,按所述方法生成的经切割 RSV F 蛋白胞外域多肽基本不含脂质和脂蛋白。

[0036] 在另一个方面,本发明是生产含未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽单体、三聚体或单体和三聚体组合的组合物的方法。所述方法包括 a) 提供含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料;和 b) 从所述生物材料中纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体或三聚体。通常,所述未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列含改变的弗林蛋白酶切割位置,且所述 RSV F 蛋白胞外域多肽分泌自宿主细胞,该宿主细胞生成氨基酸 101-氨基酸 161 位没有被切割(如 106-109 和 131-136 位的弗林蛋白酶切割位置没有被切割)的所述多肽。在一些实施方式中,所述未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列还包括改变的胰蛋白酶切割位置,且胰蛋白酶没有在氨基酸 101-氨基酸 161 之间的位置切割所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。在另一个实施方式中,所述未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列还包括改变的融合肽。

[0037] 在一些实施方式中,未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽三聚体经纯化。在其他实施方式中,未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体经纯化。在其他实施方式中,可能处于动态平衡的未切割 RSV F 蛋白胞外域单体和三聚体的混合物经纯化。在优选的实施方式中,按所述方法生成的经切割 RSV F 蛋白胞外域多肽基本不含脂质和脂蛋白。

[0038] 在另一方面,本发明是生产含切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体、三聚体或单体和三聚体组合的组合物的方法。所述方法包括 a) 提供含切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料,所述多肽含改变的融合肽;和 b) 从所述生物材料中纯化切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。

[0039] 在一些实施方式中,切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽三聚体经纯化。在其他实施方式中,切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体经纯化。在其他实施方式中,可能处于动态平衡的切割的 RSV F 蛋白胞外域单体和三聚体的混合物经纯化。在优选的实施方式中,按所述方法生成的经切割 RSV F 蛋白胞外域多肽优选基本不含脂质和脂蛋白。在另一个实施方式中,含已改变融合肽的切割的 RSV F 蛋白胞外域三聚体经纯化。

[0040] 在其他方面,本发明提供用本发明方法生产的组合物,包括免疫原性组合物。

[0041] 附图简要说明

[0042] 图 1 显示野生型 RSV F (图 1A) 和移除跨膜结构域与胞质尾且在 C 末端任选地添加了 HIS6 标记的胞外域构建 (图 1B) 的示意图。为了清楚起见,残基编号涉及野生型 A2 株系 RSV F,从 N 端信号肽开始,且其在含氨基酸缺失的构建中没有改变。示意图中的标记为信号序列或信号肽 (sp)。图 1A 是 RSV F 蛋白的示意图,显示信号序列或信号肽 (SP)、p27 接头区、融合肽 (FP)、HRA 结构域 (HRA)、HRB 结构域 (HRB)、跨膜区 (TM) 和胞质尾 (CT)。所述胞外域的 C 末端边界可变化。图 1B 为 RSV F 胞外域构建的总体示意图,描述与图 1A 的示意图共有的特征,并包括任选的 HIS₆ 标记 (HIS TAG)。弗林蛋白酶切割位置位于氨基酸 109/110 和 136/137 位。图 1C 还显示 RSV F (野生型) 的氨基酸 100-150 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:108) 和其中一个或两个弗林蛋白酶切割位置和 / 或融合肽区域突变或缺失的数种蛋白 (Furmt-SEQ ID NO:3;Furdel-SEQ ID NO:4;Furx-SEQ ID NO:6;Furx R113Q,K123N,K124N-SEQ ID NO:5;Furx R113Q,K123Q,K124Q-SEQ ID NO:92;Delp21furx-SEQ ID NO:7;Delp23furx-SEQ ID NO:8;Delp23furdel-SEQ ID NO:9;N 末端弗林蛋白酶 (Furin)-SEQ ID NO:10;C 末端弗林蛋白酶-SEQ ID NO:11;融合肽缺失 1-SEQ ID NO:12;和 Xa 因子-SEQ ID NO:13)。在图 1C 中,符号“-”表示该位置的氨基酸缺失。

[0043] 图 2 显示从氨基酸 488 到 RSV F (野生型) 的 TM 区起始的羧基末端的氨基酸序列 (SEQ ID NO:94) 和数种含添加的蛋白酶切割位置的蛋白 (SEQ ID NOS:95-100)。在图 2 中,符号“-”表示该位置没有氨基酸。

[0044] 图 3 为用尺寸排阻色谱法的电泳凝胶的色谱图和图像,显示 RSV F 单体 (3) 的纯化。

[0045] 图 4A-4F 显示编码 pT7-TC83R-FL. RSVF (A317) 自复制 RNA 分子的质粒的核苷酸序列 (SEQ ID NO:101),所述分子编码呼吸道合胞病毒 F 糖蛋白 (RSV-F)。编码 RSV-F 的核苷酸序列有下划线。

[0046] 图 5 为数种 RSV 株系的 F 蛋白氨基酸序列比对。用 Corpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16 (22):10881-10890 公开的算法获得所述比对,使用默认参数 (Blossum 62 符号对照表,缺口开放罚分:12,缺口延伸罚分:A2,A2 株系的 F 蛋白 (登录号 AF035006) (SEQ ID NO:102);CP52,CP52 株系的 F 蛋白 (登录号 AF013255) (SEQ ID NO:103);B,B 株系的 F 蛋白 (登录号 AF013254) (SEQ ID NO:104);long,long 株的 F 蛋白 (登录号 AY911262) 株系 (SEQ ID NO:105),和 18537 株系,18537 株系的 F 蛋白 (登录号 Swiss Prot P13843) (SEQ ID NO:106)。还显示共有 F 蛋白序列 (SEQ ID NO:107)

[0047] 图 6 显示来自选择 RSV F 抗原纯化的尺寸排阻 (SEC) 色谱图的相关区域。含指示抗原的主峰用星号表示,Superdex P200 16/60 柱 (GE 医疗保健公司 (GE Healthcare)) 的保留时间用毫升数表示。在校准柱上,约 47mls、65mls 和 77mls 的保留时间分别对应于柱空体积、RSV F 三聚体保留和 RSV F 单体保留。在图 6A 中,未切割的 Delp23 Furdel (Δ p23 Furdel) 构建纯化自约 77mls 的单体峰值。用胰蛋白酶处理未切割的 Delp23 Furdel RSV F 抗原时,蛋白可形成玫瑰花结,其在约 47mls 的 SEC 空体积中迁移 (图 6B)。RSV F 融合肽缺失的经切割三聚体种类纯化自约 65mls 保留时间的三聚体峰值 (图 6C) 而未切割的 Delp21 Furx 构建 (Δ p21 Furx) 纯化自约 77mls 的单体峰值 (图 6D)。

[0048] 图 7 显示选择的 RSV F 抗原的典型 EM 图。图 7A 显示胰蛋白酶处理前 RSV F $\Delta p23(\Delta p23)$ 的 EM 图。图 7A 中的拐杖形状与融合后的三聚体构型一致,其并未总是在未切割的 $\Delta p23(\Delta p23)$ Furdel 构建中观察到。所述 $\Delta p23(\Delta p23)$ Furdel 构建用胰蛋白酶处理并从 SEC 柱的空体积中纯化并通过 EM 观察时,发现所述蛋白采用玫瑰花结构型(图 7B)。从 SEC 柱的所述三聚体峰中纯化 RSV F 融合肽缺失构建时观察到单分散的拐杖形状,与融合后三聚体一致(图 7C)。图 7D 所示为三种制备物: $\Delta p21(\Delta p21)$ furx RSV F(标记为单体)、融合肽缺失 RSV F(标记为三聚体的泳道)和纯化的 RSV F 玫瑰花结(标记为玫瑰花结)。所述凝胶含数个 GE 全范围标准(分子量标准标注在该凝胶左侧)的泳道,而 RSV F 片段的近似保留时间表示在该凝胶的右侧。

[0049] 图 8A-8C 表示棉鼠中 RSV F 胞外域多肽的单体(未切割的 $\Delta p21(\Delta p21)$ furx)、三聚体的玫瑰花结(切割的 $\Delta p23(\Delta p23)$ Furdel)和三聚体(融合肽缺失)为免疫原性。抗 RSV F IgG 和中和抗 RSV 抗体的血清效价在第一次疫苗接种后 2 周(2wp1)、第一次疫苗接种后 3 周(3wp1)和/或第二次疫苗接种后 2 周(2wp2)测量。

[0050] 发明详述

[0051] 本发明涉及呼吸道合胞病毒 F(RSV F)多肽和/或蛋白、含 RSV F 多肽和/或蛋白的免疫原性组合物、生产 RSV F 多肽和/或蛋白和含 RSV F 多肽和/或蛋白的组合物的方法以及编码 RSV F 多肽和/或蛋白的核酸。

[0052] 总体上,所述免疫原性组合物包括含突变(如氨基酸取代、缺失或插入)的 RSV F 多肽和/或蛋白,其能提供有益的特征,如一种或多种的 1) 稳定融合前或中间(非融合后)构型,2) 减少或消除融合肽的暴露,3) 改善稳定性(如减少聚集和/或降解),和 4) 更紧密地组装活性 F1/F2 病毒蛋白。这些特征为免疫原性组合物和免疫原性组合物的加工提供了优点。例如,如本文所述,RSV F 蛋白的非融合后构型(即融合前构型、中间构型)可以是更好的免疫原并引发更好的中和抗体应答。例如通过引起弗林蛋白酶切割位置的突变或缺失来减少或消除所述融合肽的暴露,能降低所述多肽的疏水性并有助于纯化,还能减少或消除 RSV F 蛋白与给予所述蛋白的对象的细胞膜的结合。给予对象所述组合物时,改善的蛋白稳定性有助于生产免疫原性组合物,其中所述蛋白聚集或降解的倾向降低,这提供了更有预测性的免疫应答。最终,突变的 RSV F 多肽或蛋白通过例如缺失全部或部分所述 p27 接头区而与 F1/F2 病毒蛋白类似,其可引发更好的中和抗体应答。本发明的其他优点如本文所述。

[0053] 本发明还涉及制备含 RSV F 蛋白,具体是含 RSV F 胞外域多肽的组合物,并涉及含 RSV F 蛋白的组合物,包括免疫原性组合物。所述 RSV F 胞外域多肽优选为单一形式或为已知形式之间的动态平衡。

[0054] 定义

[0055] 本文所用“群体”表示组合物中存在多于一种 RSV F 多肽或蛋白。所述群体可为基本均质,其中几乎所有 RSV F 多肽或蛋白为基本相同(如相同氨基酸序列、相同构型)、异质或具有需要程度的均质性(如至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 99%的所述 RSV F 多肽或蛋白是融合前构型、融合后构型、单体、三聚体。)

[0056] 所述 RSV F 蛋白的“融合后构型”为三聚体,特征为存在含 3HRB 和 3HRA 区域的六

螺旋束。

[0057] 所述 RSV F 蛋白的“融合前构型”的构型特征是含包括 3HRB 区域的三螺旋的三聚体。

[0058] 如本文所用,“RSV F 胞外域多肽”表示主要含成熟 RSV F 蛋白的胞外部分的 RSV F 蛋白多肽,其具有或不具有所述信号肽(如约氨基酸 1 到约氨基酸 524,或约氨基酸 22 到约氨基酸 524)但缺失天然产生的 RSV F 蛋白的跨膜结构域和胞质尾。

[0059] 如本文所用,“切割的 RSV F 胞外域多肽”指在约 101/102-约 160/161 的一个或多个位置上切割而产生两个亚基的 RSV F 胞外域多肽,其中一个所述亚基包括 F₁,另一个亚基包括 F₂。

[0060] 如本文所用,“C 末端未切割的 RSV F 胞外域多肽”指在约 101/102-约 131/132 的一个或多个位置上切割且在约 132/133-约 160/161 的一个或多个位置上没有切割而产生两个亚基的 RSV F 胞外域多肽,其中一个所述亚基包括 F₁,另一个亚基包括 F₂。

[0061] 如本文所用,“未切割的 RSV F 胞外域多肽”指在约 101/102-约 160/161 的一个或多个位置上没有切割的 RSV F 胞外域多肽。未切割的 RSV F 胞外域多肽可为例如单体或三聚体。

[0062] 如本文所用,“融合肽”表示 RSV F 蛋白的氨基酸 137-154。

[0063] 如本文所用,“改变的融合肽”表示其中一种或多种氨基酸独立地被替换或缺失的融合肽,包括替换或缺失 137-154 位的所有氨基酸。含“改变的融合肽”的经切割 RSV F 胞外域多肽优选不形成玫瑰花结。

[0064] 如本文所用,“纯化的”蛋白或多肽是重组或合成生产,或由其天然宿主产生的蛋白或多肽,其从所述重组或合成生产系统或天然宿主的其他组分中分离出,从而相对于组合物中存在的其他大分子组分,所述蛋白的含量明显高于粗品中存在的量。通常,纯化的蛋白质的均质性至少约 50%,更优选至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%或基本均质。

[0065] 如本文所用,“基本不含脂质和脂蛋白”表示在 SDS PAGE 凝胶上观察蛋白和/或多肽(如 RSV F 多肽)的纯度和用 UV280 吸收或 BCA 分析测量总蛋白含量,并用磷脂酶 C 试验(Wako, 编号 433-36201)测量脂质和脂蛋白含量时,质量上至少约 95%不含脂质和脂蛋白的组合物、蛋白或多肽。

[0066] 如本文所用,“改变的弗林蛋白酶切割位置”表示天然产生的 RSV F 蛋白中约 106-109 位和约 133-136 位上的氨基酸序列,所述序列被弗林蛋白酶或弗林蛋白酶样蛋白酶识别并切割,但在未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽中含一种或多种氨基酸替换、一种或多种氨基酸缺失、或一种或多种氨基酸替换和一种或多种氨基酸缺失的组合,从而含改变的弗林蛋白酶切割位置的 RSV F 胞外域多肽分泌自细胞,该细胞生成在所述改变的弗林蛋白酶切割位置未切割的所述多肽。

[0067] 适用于本发明的 RSV F 蛋白胞外域特征在本文中参考具体氨基酸描述,所述氨基酸由来自所述 A2 株系的 RSV F 蛋白序列 (SEQ ID NO:1) 中的氨基酸位置鉴别。RSV F 蛋白胞外域可具有来自所述 A2 株系或任何其他所需株系的 F 蛋白的氨基酸序列。使用非 A2 株系的株系 F 蛋白胞外域时,所述 F 蛋白的氨基酸编号参考所述 A2 株系的 F 蛋白的编号,需要时插入缺口。这可通过对任何所需 RSV F 蛋白和所述株系 A2 的 F 蛋白序列进行比对实

现,如本文所示的来自所述 A2 株系、CP52 株系、B 株系、long 株、和所述 18537 株系的 F 蛋白。参见图 5。优选用 Corpet, Nucleic Acids Research, 1998, 16 (22):10881-10890 公开的算法进行序列比对,使用默认参数 (Blossum 62 符号对照表,缺口开放罚分 :12,缺口延伸罚分 :2)。

[0068] 本发明提供可溶性 RSV F 多肽和蛋白、和含所述可溶性 RSV F 多肽和蛋白的免疫原性组合物、以及含编码所述可溶性 RSV F 多肽和蛋白的核酸 (如自复制 RNA 分子) 的组合物。

[0069] 所述 RSV F 多肽 (如胞外域多肽) 可为任何需要的形式如单一形式,例如未切割单体、未切割三聚体、切割三聚体或切割三聚体的玫瑰花结。所述 RSV F 胞外域多肽也可分为两种或更多形式,例如处于平衡中的两种或更多形式如未切割单体和未切割三聚体之间的平衡。本发明提供数种优点。例如,免疫原性组合物中存在 RSV 的单一需要形式,或已知形式之间的动态平衡提供了更易预测的配制、可溶性和稳定性,将所述组合物给予对象时还提供了更易预测的免疫应答。

[0070] 所述 RSV F 胞外域多肽优选为单一形式,如未切割单体、未切割三聚体、切割三聚体、切割三聚体的玫瑰花结或为这些形式的子集之间的动态平衡 (如未切割单体和未切割三聚体之间的平衡)。

[0071] 在本发明的一个方面,所述 RSV F 多肽和蛋白为融合前构型。所述融合前构型的表位可更好地引发能识别并中和天然病毒粒子的抗体。

[0072] 在本发明的一个实施方式中,免疫原性组合物包括融合前构型的呼吸道合胞病毒 F 糖蛋白群体。在本发明的另一方面,免疫原性组合物包括呼吸道合胞病毒 F 糖蛋白群体,所述糖蛋白与分离的 RSV F 糖蛋白相比不利于融合后构型。

[0073] 本发明还提供含多肽的免疫原性组合物,所述多肽展示的表位存在于呼吸道合胞病毒 F 糖蛋白的融合前或中间融合构型,但在所述糖蛋白的融合后构型中缺失。

[0074] F 糖蛋白

[0075] RSV 的 F 糖蛋白通过病毒包膜和宿主细胞质膜之间的融合指导病毒穿入。其为 I 型单次跨膜整合蛋白,具有四个一般结构域 :N 末端 ER- 移位信号序列 (SS)、胞外域 (ED)、跨膜结构域 (TM) 和胞质尾 (CT)。CT 含单一棕榈酰化半胱氨酸残基。RSV 分离物之间 F 蛋白的序列高度保守,但不断进化 (7)。与大多数副粘病毒不同,RSV 中的 F 蛋白可介导独立于其他病毒蛋白的进入和多核体形成 (其他副粘病毒中除了 F 外通常需要 HN)。

[0076] hRSV F 的 mRNA 翻译为称作 F_0 的 574 氨基酸前体蛋白,其在 N 末端包含信号肽序列,该序列在内质网中由信号肽酶移除。转运高尔基体中细胞蛋白酶 (具体为弗林蛋白酶) 在两个位置 (氨基酸 109/110 和 136/137) 切割 F_0 , 移除短糖基化干扰序列并产生两个亚基,称为 F_1 (约 50kDa ;C 末端 ;残基 137-574) 和 F_2 (约 20kDa ;N 末端 ;残基 1-109) (参见例如图 1)。 F_1 在 N 端含疏水性融合肽以及两个疏水性七肽重复区 (HRA 和 HRB)。HRA 靠近所述融合肽,HRB 靠近所述跨膜结构域 (参见例如图 1)。所述 F_1 - F_2 异源二聚体在病毒粒子中组装为同源三聚体。

[0077] RSV 以单一血清型存在,但具有两个抗原亚组 :A 和 B。所述两组的 F 糖蛋白约 90% 相同。所述 A 亚组、所述 B 亚组或两组的组合或混合可用于本发明。所述 A 亚组的示例序列为 SEQ ID NO:1 (A2 株系 ;GenBank GI:138251 ;Swiss Prot P03420),所述 B 亚组为 SEQ

ID NO:2(18537 株系 ;GI:138250 ;Swiss Prot P13843)。 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 均为 574 氨基酸序列。A2 株系中的信号肽为氨基酸 1-21,但 18537 株系中其为 1-22。两个序列中,所述 TM 结构域来自约氨基酸 530-550,但或者报道为 525-548。

[0078] SEQ ID NO:1

[0079]

```

1  MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIE 60
61  LSNIKENKCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTEQLLLMQSTPPTNNRARRRELPRFMNYTLN 120
121  NAKKTNVTL SKKRRRFLGFLLGVGSATASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVS 180
181  LSNGVSVLTSKVLDLKNIIDKQLLPVFNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVN 240
241  AGVTTTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300
301  VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKV 360
361  QSNRVFCDTMNSLTLPSEINLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKT 420
421  KCTASNKNRGIKTFPNGCDYVSNKGMDTVSVGNLYVYVKNQEGKSLYVKGEPIINFYDP 480
481  LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNIMITIIIVIIIVILLS 540
541  LIAVGLLLYCKARSTPVTLSKQQLSGINNI AFSN 574

```

[0080] SEQ ID NO:2

[0081]

```

1  MELLIHRSSAIFLTLAVNALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIE 60
61  LSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDKYKNAVTEQLLLMQNTPAANNRARRREAPQYMNNTIN 120
121  TTKNLNVSISKKRRRFLGFLLGVGSATASGIAVSKVLHLEGEVNIKNALLSTNKAVVS 180
181  LSNGVSVLTSKVLDLKNIINNRLPIVFNQSCRISNIETVIEFQQMNSRLEITREFSVN 240
241  AGVTTPLSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSSNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV 300
301  VQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQADTCKV 360
361  QSNRVFCDTMNSLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSKTDISSSVITSLGAIVSCYGKT 420
421  KCTASNKNRGIKTFPNGCDYVSNKGVDTVSVGNLYVYVKNLEGKNLYVKGEPIINYDP 480
481  LVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRRSDELHNVNTGKSTTNIMITIIIVIIIVLLS 540
541  LIAIGLLLYCKAKNTPVTLSKQQLSGINNI AFSK 574

```

[0082] 本发明可使用任何所需的 RSV F 氨基酸序列,如氨基酸序列 SEQ ID NO:1 或 2,或与 SEQ ID NO:1 或 2 有相同性的序列。通常其与 SEQ ID NO:1 或 2 有至少 75% 相同性,如与 SEQ ID NO:1 或 2 有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 相同性。所述序列可天然地存在于 RSV 中。

[0083] 本发明使用全部或部分 F 蛋白胞外域时,其可包括:

[0084] (i) 含 SEQ ID NO:1 的约氨基酸 22-525 的多肽。

[0085] (ii) 含 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 23-525 的多肽。

[0086] (iii) 含与 (i) 或 (ii) 有至少 75% 相同性(如至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 相同性)的氨基酸序列的多肽。

[0087] (iv) 含 (i)、(ii) 或 (iii) 的片段的多肽,其中所述片段含至少一种 F 蛋白表位。所述片段通常至少约 100 个氨基酸长度,如至少约 150、至少约 200、至少约 250、至少约

300、至少约 350、至少约 400、至少约 450 个氨基酸长度。

[0088] 所述胞外域可为具有或没有所述信号肽的 F_0 形式,或可包括彼此结合的一种分离的肽链(如 F_1 亚基和 F_2 亚基),例如所述亚基可通过二硫桥连接。因此,约氨基酸 101-约氨基酸 161 的全部或部分如氨基酸 110-136 可在所述胞外域中缺失。因此全部或部分所述胞外域可包括:

[0089] (v) 与所述第一多肽链结合的第一肽链和第二肽链,其中所述第一肽链含与 SEQ ID NO:1 的约氨基酸 22-约氨基酸 101 或 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 23-约氨基酸 101 有至少 75% 相同性(如至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或甚至 100% 相同性)的氨基酸序列,且所述第二肽链含与 SEQ ID NO:1 的约氨基酸 162-约 525 或 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 162-525 有至少 75% 相同性(如至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或甚至 100% 相同性)的氨基酸序列。

[0090] (vi) 与所述第一多肽链结合的第一肽链和第二肽链,其中所述第一肽链含包括 SEQ ID NO:1 的约氨基酸 22-约氨基酸 101 或 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 23-约氨基酸 109 的片段的氨基酸序列,且所述第二肽链含 SEQ ID NO:1 的约氨基酸 162-约氨基酸 525 或 SEQ ID NO:2 的约氨基酸 161-约氨基酸 525 的片段。一种或两种所述片段包括至少一种 F 蛋白表位。所述第一肽链中的片段通常为至少 20 个氨基酸长度,如至少 30、至少 40、至少 50、至少 60、至少 70、至少 80 个氨基酸长度。所述第二肽链中的片段通常为至少 100 个氨基酸长度,如至少 150、至少 200、至少 250、至少 300、至少 350、至少 400、至少 450 个氨基酸长度。

[0091] (vii) 通过弗林蛋白酶消化 (i)、(ii)、(iii) 或 (iv) 可获得的分子。

[0092] 因此本发明所用的氨基酸序列可天然存在于 RSV F 蛋白中(如缺失 TM 和 CT 的可溶性 RSV F 蛋白,约为 SEQ ID NO:1 或 2 的氨基酸 522-574),和/或其相对天然 RSV 序列可具有一种或多种(如 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 种)单一氨基酸突变(插入、缺失或替换)。例如,已知突变 F 蛋白消除其弗林蛋白酶切割序列,从而阻止细胞内加工。在某些实施方式中,所述 RSV F 蛋白缺失 TM 和 CT(约为 SEQ ID NO:1 或 2 的氨基酸 522-574)并含相对天然 RSV 序列的一种或多种(如 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 种)单一氨基酸突变(插入、缺失或替换)。

[0093] 弗林蛋白酶切割、胰蛋白酶切割和融合肽突变

[0094] RSV F 多肽或蛋白可含有防止一个或两个所述弗林蛋白酶切割位置(即 SEQ ID NO:1 和 2 的氨基酸 109 和 136)切割的一种或多种突变。这些突变可阻止所述可溶性多肽或蛋白的聚集并因此有助于纯化,如果所述 RSV F 蛋白在细胞表面表达如由病毒复制子表达(如 α 病毒复制子颗粒),或如果所述 RSV F 蛋白是病毒样颗粒的组分,所述突变可阻止细胞之间的融合。这些突变单独或与本文所述其他突变结合也可稳定所述融合前构型中的蛋白。

[0095] 合适的弗林蛋白酶突变的示例包括 SEQ ID NO:1 或 2 氨基酸残基 106-109 替换为 RARK(SEQ ID NO:77)、RARQ(SEQ ID NO:78)、QAQN(SEQ ID NO:79) 或 IEGR(SEQ ID NO:80)。或者或此外,SEQ ID NO:1 或 2 的氨基酸残基 133-136 可替换为 RKKK(SEQ ID NO:81)、

Δ Δ Δ R、QNQN(SEQ ID NO:82)、QQQR(SEQ ID NO:83) 或 IEGR(SEQ ID NO:80)。(Δ 表示所述氨基酸残基缺失。)如果需要,这些突变可与本文所述其他突变组合,如所述 p27 区域(SEQ ID NO:1 或 2 的氨基酸 110-136)的突变,包括所述 p27 区域全部或部分的缺失。

[0096] 如果需要,这些弗林蛋白酶切割突变可与本文所述其他突变组合,如胰蛋白酶切割突变和融合肽突变。合适的胰蛋白酶切割突变示例包括 SEQ ID NO:1 或 2 的约 101 位-161 位的任何赖氨酸或精氨酸残基的缺失,或任何所述赖氨酸或精氨酸残基被非赖氨酸或精氨酸的氨基酸替换。例如,所述 p27 区域(SEQ ID NO:1 或 2 的约氨基酸 110-136)中的赖氨酸和 / 或精氨酸残基可被替代或缺失,包括所述 p27 区域全部或部分的缺失。

[0097] 替代或除了所述弗林蛋白酶切割突变,RSV F 多肽或蛋白在所述融合肽区域可包含一种或多种突变(SEQ ID NO:1 或 2 的氨基酸 137 和 153)。例如,此区域可全部或部分缺失。

[0098] 在具体实施方式中,所述 RSV F 多肽或蛋白如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 100-150 的序列,或其可溶性胞外域为

[0099] (Furmt) TPATNNRARKELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKKKFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:3)

[0100] (Furdel) TPATNNRARQELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKK---RFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:4)

[0101] (Furx) TPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:6)

[0102] (Furx R113Q, K123N, K124N) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAKKTNTVLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:5)

[0103] (Furx R113Q, K123Q, K124Q) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAKKTNTVLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:92)

[0104] (Delp21Furx) TPATNNQAQN-----QNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:7)

[0105] (Delp23Furx) TPATNNQAQN-----QNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:8)

[0106] (Delp21 furdel) TPATNNRARQ-----QNQQQRFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:109)

[0107] (Delp23furdel) TPATNNRARQ-----QQQRFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:9)

[0108] (N 末端弗林蛋白酶) TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSQNQNQNFLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:10)

[0109] (C 末端弗林蛋白酶) TPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLLGVGSAIAS (SEQ ID NO:11)

[0110] (融合肽缺失 1) TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKR-----SAIAS (SEQ ID NO:12),

[0111] (融合肽缺失 2) TPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKR-----GVGSAIAS (SEQ ID NO:91), 或

[0112] (Xa 因子)TPATNNIEGRELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKIEGRFLGFLLGVSASIAS (SEQ ID NO:13);其中符号“-”表示该位置的氨基酸缺失。

[0113] 除了弗林蛋白酶切割和融合肽突变以外或者,可溶性 RSV F 多肽或蛋白如缺失所述跨膜区和胞质尾的那些可含一种或多种寡聚序列。存在寡聚序列时,优选三聚序列。本领域已知合适的寡聚序列,包括例如酵母 GCN4 亮氨酸拉链蛋白的卷曲螺旋、T4 噬菌体次要纤维蛋白 (fibritin) 的三聚化序列 (“折叠子 (foldon)”) 和流感 HA 的三聚体结构域。这些和其他合适的寡聚序列在本文中更详细地描述。

[0114] 在具体实施方式中,所述 RSV F 多肽或蛋白的羧基末端序列起始于 480 位,其为

[0115] (GCN)PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGE (SEQ ID NO:14)

[0116] (HA)PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEK (SEQ ID NO:15)

[0117] (理想螺旋)PLVFPSDEFDASISQINEKINQILAFIRKIDELLHNIN (SEQ ID NO:16)

[0118] (短 foldon)PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWLLSTFL (SEQ ID NO:17);或

[0119] (长 foldon)

[0120] PLVFPSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNKNDDKSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EWLLSTFL (SEQ ID NO:18)

[0121] 除了弗林蛋白酶切割突变、融合肽突变和添加的寡聚序列的任何组合以外或者,含跨膜区域的 RSV F 多肽或蛋白可含有提供蛋白酶切割位置的添加的氨基酸序列。这种类型的 RSV F 多肽或蛋白可通过在细胞表面表达而生成,并在用合适的蛋白酶从细胞表面切割后以可溶形式回收。通常,提供蛋白酶切割位置的氨基酸序列位于所述跨膜结构域氨基末端 (SEQ ID NO:1 或 2 的氨基酸 525) 的约 60 个氨基酸、约 50 个氨基酸、约 40 个氨基酸、约 30 个氨基酸、约 20 个氨基酸、约 10 个氨基酸内,或基本与之毗邻。本领域熟知许多可被市售蛋白酶切割的合适氨基酸序列。例如,凝血酶切割序列 LVPR (SEQ ID NO:75)、Xa 因子切割序列 IEGR 和肠激酶切割序列 DDDDK (SEQ ID NO:76)。这些氨基酸序列可导入 RSV F 多肽。在具体实施方式中,起始于 488 位到所述 TM 区域的所述 RSV F 多肽或蛋白的序列示于图 2。

[0122] 按照本发明使用的免疫原性多肽通常经分离或纯化。因此,其不与通常天然存在 (若可以) 的分子结合。例如,本发明使用的 F 蛋白不采用 RSV 病毒粒的形式 (尽管其可为人工病毒粒的形式,如病毒体或 VLP)。

[0123] 通常通过在重组宿主系统中表达来制备多肽。尽管可使用任何合适的方法,其 (如 RSV 胞外域) 生成通常是通过在合适的重组宿主细胞中表达编码所述胞外域的重组构建体。合适的重组宿主细胞包括例如,昆虫细胞 (如埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*)、家蚕蛾 (*Bombyx mori*)、果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 和粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*))、哺乳动物细胞 (如人、非人灵长类、马、牛、羊、狗、猫和啮齿类 (如仓鼠))、禽类细胞 (如鸡、鸭、鹅)、细菌 (如大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和链球菌属 (*Streptococcus* spp.))、酵母细胞 (如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*))、

白色念珠菌 (*Candida albicans*)、麦芽糖假丝酵母 (*Candida maltosa*)、多形汉森酵母 (*Hansenula polymorpha*)、脆壁克鲁维酵母 (*Kluyveromyces fragilis*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、季也蒙毕赤酵母 (*Pichia guilliermondii*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 和解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、四膜虫细胞 (如嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*)) 或其组合。本领域已知许多合适的昆虫细胞和哺乳动物细胞。合适的昆虫细胞包括例如, Sf9 细胞、Sf21 细胞、Tn5 细胞、Schneider S2 细胞和 High Five 细胞 (源自亲本粉纹夜蛾 BTI-TN-5B1-4 细胞系的克隆分离物 (英杰公司 (Invitrogen)))。合适的哺乳动物细胞包括例如, 中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、人胚胎肾细胞 (HEK293 细胞, 通常由剪切的腺病毒 5 型 DNA 转化成)、NIH-3T3 细胞、293-T 细胞、Vero 细胞、HeLa 细胞、PERC.6 细胞 (ECACC 保藏号 96022940)、Hep G2 细胞、MRC-5 (ATCC CCL-171)、WI-38 (ATCC CCL-75)、胎猴肺细胞 (ATCC CL-160)、Madin-Darby 牛肾 (“MDBK”) 细胞、Madin-Darby 狗肾 (“MDCK”) 细胞 (如 MDCK (NBL2)、ATCC CCL34 ; 或 MDCK 33016、DSM ACC 2219)、幼仓鼠肾 (BHK) 细胞如 BHK21-F、HKCC 细胞等。合适的禽类细胞包括例如, 鸡胚胎干细胞 (如 EBx® 细胞)、鸡胚胎成纤维细胞、鸡胚胎生殖细胞、鸭细胞 (如, 例如在 Vaccine 27:4975-4982 (2009) 和 WO2005/042728 中描述的 AGE1.CR 和 AGE1.CR.pIX 细胞系 (专业生物基因公司 (ProBioGen)))、EB66 细胞等。

[0124] 合适的昆虫细胞表达系统如杆状病毒系统为本领域技术人员已知, 描述于例如 Summers 和 Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)。杆状病毒 / 昆虫细胞表达系统的材料和方法以药盒形式购自加利福尼亚州圣迭戈的英杰公司等。禽类细胞表达系统也为本领域技术人员已知, 描述于例如美国专利号 5, 340, 740 ; 5, 656, 479 ; 5, 830, 510 ; 6, 114, 168 ; 和 6, 500, 668 ; 欧洲专利号 EP 0787180B ; 欧洲专利申请号 EP03291813.8 ; WO 03/043415 ; 和 WO 03/076601。相似地, 细菌和哺乳动物细胞表达系统也为本领域已知, 描述于例如 Yeast Genetic Engineering (《酵母遗传工程》) (Barr 等编著, 1989) 伦敦, 巴特沃思公司 (Butterworths)。

[0125] 编码 RSV F 蛋白胞外域的重构建体可用常规方法在合适的载体中制备。昆虫或哺乳动物细胞中用于重组蛋白表达的许多合适载体为本领域熟知且常用。合适的载体可含许多组分, 包括但不限于一种或多种下述组分: 复制起点; 可选的标记基因; 一种或多种表达控制元件如转录控制元件 (如启动子、增强子、终止子), 和 / 或一种或多种翻译信号; 和选择的宿主细胞 (如哺乳动物起源的或来自异源哺乳动物或非哺乳动物物种) 中用于靶向分泌途径的信号序列或前导序列。例如, 为了在昆虫细胞中表达, 使用合适的杆状病毒表达载体如 pFastBac (英杰公司) 生产重组杆状病毒颗粒。所述杆状病毒颗粒经扩增, 用于感染昆虫细胞以表达重组蛋白。为了在哺乳动物细胞中表达, 使用会驱动所述构建体在所需哺乳动物宿主细胞 (如中华仓鼠卵细胞) 中表达的载体。

[0126] RSV F 蛋白胞外域多肽可用任何合适的方法纯化。例如, 本领域已知通过免疫亲和层析纯化 RSV F 胞外域多肽的方法。Ruiz-Arguello 等, J. Gen. Virol., 85:3677-3687 (2004)。本领域已知纯化所需蛋白的合适方法, 包括沉淀和各种类型的色谱如疏水相互作用、离子交换、亲和、螯合和尺寸排阻。可用两种或更多这些或其他合适方法实现合适的纯化方案。如果需要, 所述 RSV F 蛋白胞外域多肽可包括有助于纯化的

“标记”，如表位标记或 HIS 标记。该标记的多肽可通过螯合层析或亲和层析方便地从例如条件培养基中纯化。

[0127] 所述 RSV F 多肽也可通过在对象细胞中表达其编码核酸而原位生成。例如，通过表达本文所述的自复制 RNA。

[0128] 除了所述 RSV 序列，多肽可包括额外序列。例如，多肽可包括有助于纯化的序列（如聚 His 序列）。相似地，为了表达的目的，F 蛋白的天然前导肽可替换为不同的肽。例如，参考文献 6 使用蜂毒素前导肽取代该天然肽。

[0129] 多肽的形式和构型

[0130] 本发明包括含本文公开的 RSV F 多肽和蛋白的任何形式和构型的免疫原性组合物，包括本文公开的 RSV F 多肽和蛋白的形式和构型的任何所需组合。所述 RSV F 多肽可为单体，或所述 RSV F 蛋白可为含 3 种单体多肽的三聚体。三聚体可为单分散或例如由于单独三聚体的融合肽之间的相互作用，其可为玫瑰花结的形式。免疫原性组合物可包括多肽，所述多肽为单体、三聚体、单体和三聚体的组合（如动态平衡中）、三聚体的玫瑰花结和上述任何组合。此外，如本文进一步描述，所述 RSV F 蛋白可为融合后构型、融合前构型或中间构型。

[0131] 所述 RSV F 蛋白可为融合前构型、融合后构型或中间构型。所述 RSV F 蛋白的“融合后构型”被认为是天然 RSV F 的低能量构型，是特征为存在含 3HRB 和 3HRA 区域的 6 螺旋束的三聚体。电子显微镜下所述融合后构型具有特有的“拐杖”或“高尔夫球座”形状。所述 RSV F 蛋白的“融合前构型”的构型特征是含包括 3HRB 区域的卷曲螺旋的三聚体。融合前构型中没有暴露所述融合肽，因此融合前构型通常不形成玫瑰花结，且电子显微镜下具有“棒棒糖”或“球和茎”形状。

[0132] 在一些方面，所述 RSV F 蛋白在所述融合后构型中。例如，所述融合后构型中所述 RSV F 蛋白可为单分散三聚体的形式，或为包含融合后三聚体的玫瑰花结形式。

[0133] 在一些实施方式中，所述 RSV F 多肽为单体。在一些实施方式中，所述 RSV F 多肽为三聚体。

[0134] 在其他方面，所述 RSV F 蛋白在所述融合前构型中。不希望受任何具体理论的限制，认为 RSV F 蛋白的融合前构型或中间形式可含与在天然 RSV 病毒粒上表达的 RSV 蛋白上相同的表位，并因此提供引发中和抗体的优点。

[0135] 本发明的一些方面使用不利于所述 F 蛋白的融合后构型的多肽。在从所述融合前构型向所述融合后构型转变中，所述多肽（全部或部分）优选展示所述融合前 F 蛋白的表位或中间构型的表位。这些多肽在融合前状态可为天然或突变的 F 蛋白，在中间构型中可为天然或突变的 F 蛋白，或可为天然或突变的蛋白群体，其中不利于所述融合后构型或其被优先排除。在某些情况下，所述天然或突变的蛋白可与一种或多种额外分子结合，所述分子协助维持上述一种状态中的多肽如优选结合所述融合前构型或中间构型的单克隆抗体。此外，所述多肽可为天然 F 蛋白衍生物。该衍生物包括含天然 F 蛋白的一种或多种片段的多肽、含天然 F 蛋白（或其片段）和异源序列的融合多肽以及含具有一种或多种突变的天然 F 蛋白序列的多肽。这些（或其他）修饰可能不利于所述融合后构型。不利于所述融合后构型的示例性方法包括稳定所述融合前构型、稳定所述中间构型、使所述融合后构型去稳定或增加引起所述融合后构型的一种或多种步骤的激活屏障。

[0136] 在另一实施方式中,本发明为展示至少一种表位的多肽,所述表位特异于所述融合前构型 F 蛋白或中间构型 F 蛋白。特异于所述融合前构型 F 蛋白或中间构型 F 蛋白的表位为融合后构型中不存在的表位。优选所述至少一种表位稳定存在,例如 所述表位在溶液中稳定存在至少 12 小时、至少 1 天、至少 2 天、至少 4 天、至少 6 天、至少 1 周、至少 2 周、至少 4 周或至少 6 周。

[0137] 所述多肽在融合前状态、中间状态或状态群体中可为天然或突变的 F 蛋白,所述状态群体中所述融合后状态含量不足或百分比低于分离的天然 F 蛋白,或其可为天然 F 蛋白的衍生物。该衍生物包括含天然 F 蛋白的一种或多种片段的多肽、含天然 F 蛋白(或其片段)和异源序列的融合多肽以及含具有一种或多种突变的天然 F 蛋白序列的多肽。这些(或其他)修饰可能将 F 蛋白氨基酸序列稳定为其融合前构型、将 F 蛋白氨基酸序列稳定为中间构型、使 F 蛋白氨基酸序列的融合后构型不稳定、增加引起 F 蛋白氨基酸序列的融合后构型转变的能量屏障,或上述两种或更多的组合。

[0138] 所述 F 蛋白的 TM 和/或 CT 结构域对稳定所述融合前构型很重要(8)。因此这些结构域可在本发明的免疫原中有效保留。由于可溶性免疫原中可能不需要包括跨膜结构域,但 TM 的功能效应可通过其他方法实现。例如,副流感病毒 5 的 F 蛋白的融合前和后表现已被详细研究(6),该作者通过融合异源三聚结构域与 ED 的 C 末端来稳定 ED 的融合前结构。

[0139] 寡聚化结构域

[0140] 本发明的另一实施方式中,所述组合物可包括含第一结构域和第二结构域的多肽(如重组多肽),其中(i)所述第一结构域含所述 RSV F 蛋白(如全部或部分的 RSV 胞外域),和(ii)所述第二结构域含异源寡聚化结构域。所述第二结构域允许所述多肽的寡聚化,从而有助于所述第一结构域采用融合前状态或中间状态。所述多肽优选为寡聚体,具体为三聚体。

[0141] 本领域技术人员可获得各种寡聚化结构域。这些氨基酸序列能形成与其他多肽(相同或不同)中的寡聚化结构域(相同或不同)相互作用的结构,从而所述多种多肽可结合(通常为非共价)以形成寡聚体如三聚体。例如,HIV 的 F 蛋白的三聚化(即 gp160)是通过将其融合到天然为稳定三聚体(9)的大肠杆菌天冬氨酸氨甲酰基转移酶(ATCase)的催化亚基上获得。因此 ATCase 的该亚基可用于本发明。相似地,HIV(10)和 PIV5 的 F 蛋白(6)的三聚化是通过将其胞外域融合到 GCNt 上获得。因此本发明所用的寡聚化结构域可包括酵母 GCN4 亮氨酸拉链蛋白的卷曲螺旋(11)。通过使用来自 T4 噬菌体次要纤维蛋白的三聚化序列(“折叠子”)(GSGYIPEAPRDGQ AYVRKDGWVLLSTFL - SEQ ID NO:19)获得来自 A 型流感病毒 HA 蛋白的胞外域三聚化(12)。因此本发明所用的寡聚化结构域可包括该折叠子。

[0142] 天然产生的蛋白寡聚体(异源寡聚体和同源寡聚体)以各种不同方式结合,如通过结合不同单体中的 β -片层、通过结合不同单体中的 α -螺旋、通过结合疏水性表面区域等。蛋白寡聚化中涉及的一种常见结构基序为卷曲螺旋结构域。所述卷曲 α -螺旋结构基序自身可形成螺旋,且 2、3、4 或 5 个 α -螺旋可彼此围绕形成左手超螺旋,称为“卷曲螺旋”,尽管已设计人工右手超螺旋(13-19)。所述卷曲螺旋结构域的简单性使其成为设计具有确定寡聚化状态的嵌合蛋白的普遍选择(16)。

[0143] 在卷曲螺旋结构中,所述 α -螺旋通过沿着各螺旋一侧形成非极性条的疏水残基

相互作用,且该条两边的侧链之间还可有稳定的静电相互作用。在 α -螺旋的 abcdefg 七残基重复序列中,用残基 a 和 d 处的疏水侧链和主要位于残基 e 和 g 的任何静电相互作用定义所述非极性条。位置 a 最常见为 Leu、Ile 或 Ala 且位置 d 通常为 Leu 或 Ala。残基 e 和 g 通常为 Glu 或 Gln,位置 g 也主要为 Arg 和 Lys。位置 b、c 和 f 常为带电残基,因为这些残基与溶剂接触。然而该常见七残基模式有例外,且所述七残基中有时存在 Pro 残基。所述例外常具有功能性意义包括例如,使所述寡聚化结构域不稳定以使其重折叠并重排,如发生在所述 F 蛋白中。

[0144] 本领域已知数百种卷曲螺旋结构域序列,且任何合适的序列可用作本发明的寡聚化结构域,只要其保留与其他卷曲螺旋结构域寡聚化的能力且其没有破坏所述多肽中其他结构域的功能。优选使用的卷曲螺旋结构域存在于细胞外 (20) 且天然作为寡聚化结构域。作为使用天然卷曲螺旋结构域的替代,可使用人工卷曲螺旋结构域 (21, 22)。由于卷曲螺旋结构域的高重复结构,所述结构域特别适于计算机建模,因为各氨基酸残基的主链部分可参数化而不是将残基的各主链部分作为具有其自身变量的单独单元。结构域 (b) 可包括亮氨酸拉链序列或丙氨酸拉链序列 (23)。

[0145] 本发明的多肽中所用的卷曲结构域优选是形成三聚体的结构域,从而本发明的所述多肽也可组装为三聚体。优选的卷曲螺旋结构域取自细菌跨膜蛋白。跨膜蛋白的优选子集为粘附素 (即介导与其他细胞或表面粘附的细胞表面蛋白)、具体为非菌毛粘附素 (如寡聚卷曲螺旋粘附素,或 'Oca' 家族)。本发明使用的具体序列包括参考文献 24 公开的序列,来自小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*) 粘附素 YadA、脑膜炎奈瑟球菌 (*Neisseria meningitidis*) 粘附素 NadA、粘膜炎莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*) 表面蛋白 UspA2,和其他粘附素如来自流感嗜血杆菌埃及生物型 (*Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius) 的 HadA 粘附素等 (参考文献 24 的 SEQ ID NO 28-31 和 42-58)。此外,所述真核热休克转录因子具有可分别表达的卷曲螺旋三聚化结构域,因此将其用于本发明。

[0146] 具有卷曲螺旋区域的多肽的氨基酸序列中,所述 α -螺旋的七残基重复区的性质说明所述卷曲螺旋结构域的界线可以一定精确度确定,但其中卷曲螺旋排列可视为终止的精确残基不能绝对准确地获知。然而,缺乏绝对精确性不是实施本发明的问题,因为常规测试可揭示所述卷曲螺旋是否需要任何具体的可能有疑问的氨基酸残基。即便如此,本发明不需要绝对精确地获知所述界线,因为本发明的唯一基本要求是所述卷曲螺旋结构域以使所述多肽与其他卷曲螺旋结构域寡聚化而不破坏所述多肽中的其他结构域功能的方式行使功能。

[0147] 在左手 3 螺旋中发现本发明可用的另一类寡聚化结构域,称为胶原螺旋 (25)。这些 3 螺旋形成序列包括基本三肽重复序列 $^1\text{Gly}-^2\text{Xaa}-^3\text{Xaa}$,其中 ^2Xaa 常为 Pro,且 ^3Xaa 常为 4-羟基脯氨酸。尽管该基序称为“胶原”螺旋,但在胶原以外的许多蛋白内都有发现。因此,所述寡聚化结构域可为含序列基序 $^1\text{Gly}-^2\text{Xaa}-^3\text{Xaa}$ 的多重复的序列,所述基序折叠形成螺旋结构,其可与其他多肽链中的相应螺旋结构寡聚化。

[0148] 胶原还提供另一类寡聚化结构域。参考文献 26 描述了 X 型胶原的非胶原结构域 1 (NC1) 中发现的基序,且该基序可用于形成三聚体和更高级的多体而没有 3 螺旋。所述三聚结合具有高度热稳定性而没有分子间二硫键。因此,所述寡聚化结构域可含 NC1 序列。

[0149] 其他寡聚化结构域可源自寡聚 TM 蛋白的跨膜结构域。由于这些通常为亲脂性的，所以位于其 TM 区域外侧的疏水残基可被带电残基替代以提供可溶的结构域。本领域已知通过蛋白工程改造使跨膜结构域增溶的方法，例如参考文献 27。所述方法也用于 GCN4，其中所述七残基重复位置“a”和“d”替换为异亮氨酸 (11) :KQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKL IGEA (SEQ ID NO:20)。用于所述寡聚化结构域的合适卷曲螺旋序列通常为 20-35 个氨基酸长度，如 23-30 个氨基酸残基长度。

[0150] 本发明所用的寡聚化结构域通常可维持寡聚化结构而不需要形成单体间二硫桥，但含二硫键连接单体的寡聚体不排除在本发明以外。

[0151] 或者或此外，为了使用寡聚化结构域以稳定 F 蛋白为其融合前构型，可使用突变。例如，参考文献 28 报道了猿病毒 5 或亨德拉病毒中 F 蛋白的 F2 亚基保守区域中的突变可影响所述融合前构型的稳定性。

[0152] 在一些情况中，也可使用低 pH 以有利于所述融合前构型。

[0153] HRB 结构域三聚体的稳定化

[0154] 在本发明另一优选方面，所述 HRB 结构域三聚体稳定化可能不利于所述 F 蛋白的融合后构型。在所述融合前和可能的中间形式中所述 HRB 结构域形成 3 链卷曲螺旋。如以上部分所讨论，由于其简单性，卷曲螺旋已被作为蛋白之间分子间相互作用的模式系统和长程分子内相互作用（即三级折叠相互作用）的模式系统而广泛研究。这些研究有助于指导可用于稳定所述三聚卷曲螺旋形式中 HRB 结构域的方法。例如，所述七残基重复区的 a 和 / 或 d 位置的一种或多种残基可替换为有利于形成稳定三聚卷曲螺旋的残基如 Ile 残基。此外，虽然次优选，但可删除 e 和 g 位置的不利离子相互作用或可添加 e 和 g 位置的有利离子相互作用。

[0155] 用于操作的所述 HRB 结构域的优选区域为 P484-N517 之间的七残基重复区。用于靶向以突变的 a 和 d 残基的优选示例为 F488、I492、V495、I499、S502、I506、S509、L512 和 V516。特别优选丝氨酸残基，因为将所述亲水残基替换为疏水残基会稳定所述卷曲螺旋的疏水核心。另一优选的靶标为具有较小疏水残基的苯丙氨酸，其能更好地包装入所述核心如异亮氨酸。

[0156] HRA 结构域三聚体的去稳定化

[0157] 在本发明另一优选方面，去所述 HRA 结构域三聚体去稳定化可能不利于所述 F 蛋白的融合后构型。在所述融合后和可能的一种或多种中间形式中所述 HRA 结构域形成 3 链卷曲螺旋。例如，所述七残基重复区的 a 和 / 或 d 位置的一种或多种残基可替换为不利于形成稳定三聚卷曲螺旋的残基。此外，虽然次优选，但可删除 e 和 g 位置的有利离子相互作用或可添加 e 和 g 位置的不利离子相互作用。所选的突变优选对所述融合前构型的 HRA 结构域的稳定性影响最小，其可基于融合前和融合后形式的 PIV5F 蛋白的可用晶体结构建模。

[0158] 其他修饰

[0159] 除了上述修饰，还可设计基于所述 hRSV F 蛋白的分子建模的修饰，所述建模基于融合前和融合后形式的 PIV5F 蛋白的可用晶体结构。可进行突变以去稳定化所述融合后构型如所述 HRA 和 HRB 结构域的 6HB 折叠或稳定化所述融合前构型如所述融合前构型中的 HRA 折叠。此外，可提高引起所述融合后构型的转变的能量屏障。虽然本领域技术人员会理

解稳定所述起始构型或去稳定所述最终构型可具有提高能量屏障的影响,但可引入自身影响所述转变状态的其他修饰。

[0160] 作为另一个例子,HRB 结构域 N 末端氨基酸(约氨基酸 449-482,优选 V459-F483)用作使所述 HRB 结构域从所述 F 蛋白三聚体的一侧移动到另一侧的“系绳”,从而该 HRB 结构域可参与所述融合后构型的 6HB 中。一种或多种这些氨基酸的缺失会影响或完全阻止所述 HRB 结构域参与所述 F 蛋白的融合后构型的 6HB 折叠中(参见图 3)。此外,可稳定所述融合前构型中所述系绳和所述 F 蛋白之间的相互作用以阻止所述系绳离开从而使所述 HRB 结构域参与所述 6HB 折叠。可进行的稳定化突变的例子为所述融合前构型中所述系绳和该系绳接触的所述 F 蛋白部分之间的半胱氨酸桥。

[0161] 另一例子是所述融合前构型中 HRA 的稳定化(残基 T50-Y306)。同样,基于同源 F 蛋白的晶体结构,可通过用大小相似的疏水残基替换包埋的亲水或离子残基来稳定所述疏水核心。也可在表面或核心内引入半胱氨酸桥。此外,如用溶菌酶突变体的大量晶体结构分析所证明的,所述疏水核心或蛋白相对刚硬,因此引入孔可预见地去稳定化所述溶菌酶突变体。相似地,重包装所述融合前构型中 F 蛋白的核心以消除任何天然孔可稳定融合前或中间形式的 F 蛋白,因此不利于所述融合后构型。

[0162] 制备组合物的方法

[0163] 本发明涉及制备组合物的方法,以及含 RSV F 蛋白具体为可溶性 RSV F 胞外域多肽的组合物,包括免疫原性组合物。所述 RSV F 胞外域多肽优选为单一形式,如未切割单体、未切割三聚体、切割三聚体、切割三聚体的玫瑰花结或为这些形式的子集之间的动态平衡(如未切割单体和未切割三聚体之间的平衡)。本发明提供数种优点。例如,如本文所述,本发明提供生产组合物的方法,所述组合物含主要需要形式的 RSV F 蛋白,或单一需要形式的 RSV F 蛋白如未切割单体、未切割三聚体、切割三聚体、切割三聚体的玫瑰花结、这些形式的子集之间的动态平衡(如未切割单体和未切割三聚体之间的平衡)或需要形式的 RSV F 蛋白混合物。这些组合物类型可用于各种用途,如生产可用于生产疫苗的免疫原性组合物。免疫原性组合物中存在 RSV F 的单一需要形式,或已知形式之间的动态平衡提供了更易预测的配制、可溶性和稳定性,将所述组合物给予对象时还提供了更易预测的免疫应答。

[0164] 在宿主细胞中通过常规重组表达生产 RSV F 蛋白胞外域多肽时,该宿主细胞生产期间所述多肽在分泌到培养基之前在约 109/110 位和约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置被切割。所述宿主细胞对所述多肽的切割允许 RSV F 蛋白胞外域多肽重折叠,这导致所述疏水融合肽的暴露。因此,由于存在暴露的融合肽,所述切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽形成玫瑰花结并与源自所述宿主细胞和培养基的脂质和脂蛋白结合。实际上,在昆虫细胞中生成并根据 HIS₆标记纯化的经切割 RSV F 胞外域的电子显微镜检查显示所述多肽具有与融合后形式一致的拐杖形状并结合似乎是残留的细胞碎片。因此,玫瑰花结和其他形式以及 RSV F 蛋白胞外域多肽构型的高纯度制品不易通过宿主细胞中常规重组表达获得。

[0165] 生产切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的方法

[0166] 在一个方面,本发明是制备含切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的组合物方法。总体上,所述方法涉及提供未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽且随后切割其以产生 F₁亚基和 F₂亚基。如本文所述,未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可容易地纯化并用合适的方法如尺寸排阻色谱法从污染脂质和脂蛋白中分离。不希望受任何具体理论的限制,认为疏水融合肽

不在所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽中暴露,因此所述未切割多肽不与脂质和脂蛋白污染物结合。如本文进一步所述,未切割的 RSV F 蛋白胞外域可进行切割以产生 F₁和 F₂亚基,其可被纯化为三聚体、三聚体的玫瑰花结、或三聚体与三聚体的玫瑰花结的混合物。

[0167] 未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可用任何合适的方法生产。例如,通过在生产所述 RSV F 蛋白胞外域多肽时在不含活性弗林蛋白酶或弗林蛋白酶样蛋白酶的宿主细胞中重组生成。可用各种方法实现该生产方法,如在进行突变以防止弗林蛋白酶或弗林蛋白酶样蛋白酶表达(有条件或完全地“敲除”)的重组宿主细胞中生产,和降低或防止弗林蛋白酶或弗林蛋白酶样蛋白酶在所述宿主细胞中表达的各种方法,例如用 RNA 干扰或其他相似方法,或用所述蛋白酶的抑制剂在宿主细胞中抑制弗林蛋白酶或弗林蛋白酶样蛋白酶活性。

[0168] 未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽优选编码 RSV F 蛋白胞外域的构建体的重组表达生产,其中所述弗林蛋白酶切割位置的氨基酸序列被改变,从而所述 RSV F 蛋白胞外域多肽由生成所述未切割多肽的宿主细胞分泌。所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可用任何合适的宿主细胞生产,例如昆虫细胞(如埃及伊蚊、苜蓿银纹夜蛾、家蚕蛾、果蝇、草地贪夜蛾和粉纹夜蛾)、哺乳动物细胞(如人、非人灵长类、马、牛、羊、狗、猫和啮齿类(如仓鼠))、禽类细胞(如鸡、鸭、鹅)、细菌(如大肠杆菌、枯草杆菌和链球菌属)、酵母细胞(如酿酒酵母、白色念珠菌、麦芽糖假丝酵母、多形汉森酵母、脆壁克鲁维酵母、乳酸克鲁维酵母、季也蒙毕赤酵母、巴斯德毕赤酵母、粟酒裂殖酵母和解脂耶氏酵母)、四膜虫细胞(如嗜热四膜虫)或其组合。本领域熟知许多合适的昆虫细胞和哺乳动物细胞。合适的昆虫细胞包括例如, Sf9 细胞、Sf21 细胞、Tn5 细胞、Schneider S2 细胞和 High Five 细胞(源自亲本粉纹夜蛾 BTI-TN-5B1-4 细胞系的克隆分离物(英杰公司(Invitrogen)))。合适的哺乳动物细胞包括例如,中华仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚胎肾细胞(HEK293 细胞,通常由剪切的腺病毒 5 型 DNA 转化成)、NIH-3T3 细胞、293-T 细胞、Vero 细胞、HeLa 细胞、PERC.6 细胞(ECACC 保藏号 96022940)、Hep G2 细胞、MRC-5(ATCC CCL-171)、WI-38(ATCC CCL-75)、胎猴肺细胞细胞(ATCC CL-160)、Madin-Darby 牛肾(“MDBK”)细胞、Madin-Darby 狗肾(“MDCK”)细胞(如 MDCK(NBL2)、ATCC CCL34;或 MDCK 33016、DSM ACC 2219)、幼仓鼠肾(BHK)细胞如 BHK21-F、HKCC 细胞等。合适的禽类细胞包括例如,鸡胚胎干细胞(如 EBx® 细胞)、鸡胚胎成纤维细胞、鸡胚胎生殖细胞、鸭细胞(如,例如在 Vaccine 27:4975-4982(2009) 和 WO2005/042728 中描述的 AGE1.CR 和 AGE1.CR.pIX 细胞系(专业生物基因公司(ProBioGen)))、EB66 细胞等。

[0169] 合适的昆虫细胞表达系统如杆状病毒系统为本领域技术人员已知,描述于例如 Summers 和 Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555(1987)。杆状病毒/昆虫细胞表达系统的材料和方法以药盒形式购自加利福尼亚州圣迭戈的英杰公司等。禽类细胞表达系统也为本领域技术人员已知,描述于例如美国专利号 5,340,740;5,656,479;5,830,510;6,114,168;和 6,500,668;欧洲专利号 EP 0787180B;欧洲专利申请号 EP03291813.8;WO 03/043415;和 WO 03/076601。相似地,细菌和哺乳动物细胞表达系统也为本领域已知,描述于例如 Yeast Genetic Engineering(《酵母遗传工程》)(Barr 等编著,1989) 伦敦,巴特沃思公司(Butterworths)。

[0170] 通常,改变未切割的 RSV F 蛋白胞外域的氨基酸序列以防止在约 109/110 位和约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置切割,但其含天然产生或引入的蛋白酶切割位置,切割时

产生 F₁亚基和 F₂亚基。例如,所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可具有改变的氨基酸序列以防止在约 109/110 位和约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置的切割,但其从约 101 位到约 161 位含天然产生或引入的蛋白酶切割位置。

[0171] 本领域普通技术人员可容易地设计并构想会使宿主细胞生产并表达未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的各种具体的氨基酸序列,包括没有在约 109/110 位和约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置切割的氨基酸序列。通常,独立替换或缺失约 109/110 位和约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置部分或邻近其的一种或多种氨基酸。已知适于阻止 RSV F 蛋白胞外域多肽切割的一些氨基酸替代和缺失。例如,抑制 109/110 切割的 R108N、R109N、R108N/R109N 的替换,抑制 136/137 切割的 K131Q 替换或 131-134 位氨基酸的缺失已在 Gonzalez-Reyes 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:9859-9864 (2001) 中描述。已描述含氨基酸替换 R108N/R109N/K131Q/R133Q/R135Q/R136Q 的未切割的 RSV F 胞外域多肽。Ruiz-Arguello 等, J. Gen. Virol., 85:3677687 (2004)。如本文详细描述,导致所述 RSV F 胞外域多肽从未切割的宿主细胞中分泌的额外 RSV F 蛋白氨基酸序列含改变的弗林蛋白酶切割位置,如改变约 106-109 位和约 133-136 位的氨基酸序列。所述改变的弗林蛋白酶切割位置在约 106-109 位含至少一种氨基酸替换或缺失,和在约 133-136 位含至少一种氨基酸替换或缺失。

[0172] 相似地,含蛋白酶切割位置(如天然产生或引入的)的未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽的各种具体氨基酸序列可能存在并可被容易地设计和构想,所述序列切割时产生含 F₁ 的第一亚基和含 F₂ 的第二亚基。例如,从约 101 位到约 161 位的 RSV F 蛋白的氨基酸序列含胰蛋白酶切割位置,且一种或多种所述胰蛋白酶切割位置可被胰蛋白酶切割以生成 F₁ 和 F₂ 亚基。如果需要,一种或多种合适的蛋白酶识别位置可被引入所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽,例如约 101 位到约 161 位之间。所引入的蛋白酶识别位置可用所述合适的蛋白酶切割以产生 F₁ 和 F₂ 亚基。将蛋白酶识别位置引入未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列时,优选所述位置被不切割天然产生的 RSV F 蛋白胞外域的蛋白酶识别。

[0173] 本发明这方面的方法包括:a) 提供含蛋白酶切割位置的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽,其切割时产生 F₁ 和 F₂ 亚基,和 b) 用识别所述蛋白酶切割位置的蛋白酶切割所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。通常,所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列含改变的弗林蛋白酶切割位置,且所述 RSV F 蛋白胞外域多肽分泌自宿主细胞,该细胞生成在约 106-109 位和约 131-136 位的弗林蛋白酶切割位置没有被切割的多肽。

[0174] 所提供的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可纯化到需要的程度。例如,所提供的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可作为基本未加工(如未加工或仅澄清)或者部分或基本纯化的形式的细胞裂解物、细胞匀浆或细胞条件培养基提供。在具体例子中,所提供的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽在选自下组的细胞条件培养基中提供:昆虫细胞条件培养基、哺乳动物细胞条件培养基、禽类细胞条件培养基、酵母细胞条件培养基、四膜虫细胞条件培养基、和其组合。

[0175] 通常优选纯化所提供的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽,例如纯化为至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95% 或基本均质。如本文所述,未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可容易地从脂质和脂蛋白中纯化,而常规生产的 RSV F 蛋白的切割形式与脂质和脂蛋白污染物共纯化。因此,提供纯化的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽时,本方法可

用于容易地生产含切割的 RSV F 蛋白胞外域而基本不含脂质或脂蛋白的组合物。

[0176] 本领域熟知并常用蛋白酶切割多肽的合适方法。通常,待切割的多肽与足量的蛋白酶在适于切割所述多肽的条件(如 pH、多肽和蛋白酶浓度、温度)下结合。许多合适的蛋白酶可市售获得,且已知许多蛋白酶进行多肽切割的合适条件。如果需要,切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可在蛋白酶切割后纯化。

[0177] 本方法的一个实施例中,提供含完整融合肽的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽,如 137-154 位氨基酸都未替换或缺失的未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽。在一些实施方式中,纯化所提供的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。切割所提供含完整融合肽的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽,且切割导致已切割 RSV F 蛋白胞外域多肽三聚体形成玫瑰花结。如果需要,所述玫瑰花结可用任何合适的方法如尺寸排阻色谱进一步纯化。

[0178] 本方法的另一实施例中,提供含已改变融合肽的未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽,如约 137-152 氨基酸、约 137-153 氨基酸、约 137-145 氨基酸或约 137-142 氨基酸缺失的未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽。还描述了其他合适的融合肽缺失,如 137-146 位氨基酸的缺失。Ruiz-Arguello 等, *J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004)。

[0179] 在一些实施方式中,纯化所提供的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。切割所提供的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽,且切割导致已切割 RSV F 蛋白胞外域多肽形成三聚体。如果需要,所述三聚体可用任何合适的方法如尺寸排阻色谱进一步纯化。

[0180] 在本方法的具体实施例中,所提供的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽含至少一种选自 furde1 和 delp23 furde1 的多肽(如均质胰蛋白酶可切割的 furde1、均质胰蛋白酶可切割的 delp23 furde1 或胰蛋白酶可切割的 furde1 和胰蛋白酶可切割的 delp23 furde1 的混合物)。例如用胰蛋白酶切割所提供的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽,且切割导致形成 RSV F 蛋白胞外域多肽的切割三聚体、切割三聚体的玫瑰花结或切割三聚体和切割三聚体的玫瑰花结的组合。如果需要,所述切割三聚体和 / 或切割三聚体的玫瑰花结可用任何合适的方法如尺寸排阻色谱进一步纯化。

[0181] 生产未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的方法

[0182] 在另一方面,本发明是生产含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的组合物方法。总体上,本方法涉及提供含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料,如细胞裂解物、细胞匀浆或细胞条件培养基,然后纯化所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。如本文所述,已发现纯化的未切割 RSV F 蛋白胞外域多肽单体能自我结合以形成未切割单体,以及存在未切割单体和未切割三聚体的混合物或未切割单体和未切割三聚体之间的平衡。不希望受任何具体理论的限制,认为所述平衡有利于所述单体,但浓缩溶液中所述平衡会移向所述三聚体。

[0183] 本发明这方面的方法包括:a) 提供含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料,如细胞裂解物、细胞匀浆或细胞条件培养基;和 b) 从所述生物材料中纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体、三聚体或单体和三聚体的组合。在一些实施方式中,纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体、或纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽三聚体、或纯化单体和三聚体。

[0184] 通常,所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列含改变的弗林蛋白酶切割位置,且所述 RSV F 蛋白胞外域多肽分泌自宿主细胞,该细胞生成约 101 位 - 约 161 位没

有被切割（包括 106-109 位和 131-136 位的弗林蛋白酶切割位置）的多肽。在更具体的实施方式中，含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料包括至少一种选自下组的多肽：furmt、furdel、delp21 furx、delp23 furx、delp21 furdel、delp23 furdel 和可用 Xa 因子切割的 Xa 因子构建体。

[0185] 在一些实施方式中，所述 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列含改变的弗林蛋白酶切割位置，且约 101 位 - 约 161 位之间的其他蛋白酶切割位置（如胰蛋白酶切割位置）被改变或缺失以阻止蛋白酶（如胰蛋白酶）切割。例如，已知胰蛋白酶在赖氨酸和精氨酸残基之后切割。在某些优选实施方式中，所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列含改变的弗林蛋白酶切割位置，约 101 位和约 161 位之间存在的一种或多种赖氨酸和 / 或精氨酸残基（如所有赖氨酸和精氨酸残基）缺失或被非赖氨酸或精氨酸的氨基酸替换，所述 RSV F 蛋白胞外域多肽分泌自宿主细胞，该细胞生成约 101 位和约 161 位之间没有切割的多肽，且所述 RSV F 蛋白胞外域多肽在约 101 位和约 161 位之间没有被胰蛋白酶切割。用千分之一体积的胰蛋白酶溶液（牛血浆胰蛋白酶在 25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl 中稀释为 1mg/ml 浓度；消化反应中的最终质量比胰蛋白酶：RSV F 胞外域为 0.001:1；胰蛋白酶以 10-15BAEE 单位 / 毫克蛋白使用）在 37°C 处理 1mg/ml RSV F 蛋白胞外域多肽溶液（在 25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl 中稀释）1 小时的时候，所述 RSV F 蛋白胞外域多肽优选没有被胰蛋白酶切割。

[0186] 如果需要，所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽（如含改变的弗林蛋白酶切割位置的多肽和含改变的弗林蛋白酶切割位置和改变的胰蛋白酶切割位置的多肽）还可含改变的融合肽，如未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽，其中例如约氨基酸 137-152 缺失、约氨基酸 137-154 缺失、约氨基酸 137-145 缺失或约氨基酸 137-142 缺失。还描述了其他合适的融合肽缺失，如 137-146 位氨基酸的缺失。Ruiz-Arguello 等, *J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004)。

[0187] 在具体实施方式中，本发明包括：a) 提供含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料，如细胞裂解物、细胞匀浆或细胞条件培养基，其中所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列含改变的弗林蛋白酶切割位置，约 101 位和约 161 位之间存在的一种或多种赖氨酸和精氨酸残基缺失或被非赖氨酸或精氨酸的氨基酸替换，所述 RSV F 蛋白胞外域多肽分泌自宿主细胞，该细胞生成约 101 位和约 161 位之间没有切割的多肽，且所述 RSV F 蛋白胞外域多肽在约 101 位和约 161 位之间没有被胰蛋白酶切割；和 b) 从所述生物材料中纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体、三聚体或单体和三聚体的组合。

[0188] 在更具体的实施例中，含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料包括至少一种选自下组的多肽：Furx、Furx R113Q K123N K124N、delp21 furx 和 delp23 furx。

[0189] 在其他具体实施方式中，本方法包括：a) 提供含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料，其中所述融合肽经突变（如至少部分所述融合肽缺失），如细胞裂解物、细胞匀浆或细胞条件培养基；和 b) 从所述生物材料中纯化所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可含改变的弗林蛋白酶切割位置，且所述 RSV F 蛋白胞外域多肽分泌自宿主细胞，该细胞生成约 101 位 - 约 161 位没有被切割（包括 106-109 和 131-136 位的弗林蛋白酶切割位置上）的多肽。如果需要，具有改变的弗林蛋白酶切割位置的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽还在约 101 位和约 161 位之间含改变或缺失的其他蛋

白酶位置（如胰蛋白酶切割位置）以防止蛋白酶（如胰蛋白酶）切割。例如，约 101 位和约 161 位之间存在的一种或多种赖氨酸和 / 或精氨酸残基（如所有赖氨酸和精氨酸残基）缺失或被非赖氨酸或精氨酸的氨基酸替换，且所述 RSV F 蛋白胞外域多肽在约 101 位和约 161 位之间没有被胰蛋白酶切割。

[0190] 所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体、三聚体以及单体和三聚体的组合可纯化到需要的程度。通常优选纯化所述未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体或三聚体，例如纯化为至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95% 或基本均质。如本文所述，未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可容易地用例如尺寸排阻色谱法从脂质和脂蛋白中纯化。因此，本方法可用于容易地生产含切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体、三聚体或单体和三聚体的组合而基本不含脂质和脂蛋白的组合物。

[0191] 在一个实施例中，所述方法包括提供昆虫细胞条件培养基、哺乳动物细胞条件培养基、禽类细胞条件培养基、酵母细胞条件培养基、四膜虫细胞条件培养基或其组合。在一些实施方式中，纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽三聚体。在其他实施方式中，纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体。在其他实施方式中，纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体和三聚体。

[0192] 生产具有已改变融合肽的切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的方法

[0193] 在一个方面，本发明是制备含切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的组合物方法，所述多肽含改变的融合肽。宿主细胞中表达不含改变的弗林蛋白酶位置切割位置的 RSV F 蛋白胞外域多肽时，所述宿主细胞加工所述多肽，部分通过在约 109/110 位和约 136/137 位的弗林蛋白酶位置切割所述多肽以产生 F_1 和 F_2 亚基。加工的多肽可分泌到所述培养基中且可作为结合的 F_1 - F_2 亚基（如二硫化物结合的 F_1 和 F_2 亚基）回收，其可通过聚集暴露的融合肽来形成三聚体的玫瑰花结。含改变的融合肽的 RSV F 蛋白胞外域多肽可在宿主细胞中生成并作为结合的 F_1 - F_2 亚基分泌，且优选不聚集为玫瑰花结或与脂质或脂蛋白污染物聚集。不希望受限于任何特定的理论，认为由于所述改变的融合肽不介导聚集，所述多肽不形成玫瑰花结或与脂质和脂蛋白污染物结合。

[0194] 本发明这方面的方法包括：a) 提供含切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料，其中所述多肽含改变的融合肽（如至少部分所述融合肽缺失），如细胞裂解物、细胞匀浆或细胞条件培养基；和 b) 从所述生物材料中纯化切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。所述纯化的经切割 RSV F 蛋白胞外域多肽可纯化为切割三聚体、切割三聚体的玫瑰花结或切割三聚体和切割三聚体的玫瑰花结的混合物。含已改变融合肽的合适的 RSV F 蛋白胞外域多肽在约 109/110 和约 136/137 含有可切割的弗林蛋白酶切割位置，还含有本文所述的改变的融合肽。例如，本方法中可用缺失约 137-152 氨基酸、缺失约 137-153 氨基酸、缺失约 137-145 氨基酸、缺失约 137-146 氨基酸、缺失约 137-142 氨基酸的 RSV F 蛋白胞外域多肽。在具体实施例中，含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料；至少包括所述融合肽缺失 1。

[0195] 所述切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽（如切割三聚体或切割三聚体和切割三聚体的玫瑰花结的混合物）可纯化到需要的程度。通常优选纯化所述切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽，例如纯化为至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95% 或基本均质。如本文所述，含已改变融合肽的切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可容易地用例如尺寸排阻色谱法从脂质和脂蛋白中纯化。因此，本方法可用于容易地生产含切割的 RSV F 蛋白胞

外域多肽三聚体、切割三聚体的玫瑰花结或切割三聚体和切割三聚体的玫瑰花结的组合而基本不含脂质和脂蛋白的组合物。

[0196] 生产具有 C 末端弗林蛋白酶突变的 RSV F 蛋白胞外域多肽的方法

[0197] 在另一方面,本发明是制备含 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的组合物的方法和制备切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的方法。不希望受限于任何具体理论,认为 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽在约 109/110 位的弗林蛋白酶切割位置而不是约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置被生产所述蛋白的细胞切割,其作为结合 F₂亚基的 F₁亚基被分泌到培养基中。还认为所述疏水融合肽不在 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽中暴露,因此 C 末端未切割的多肽不与脂质和脂蛋白污染物结合。如本文进一步所述,C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域还可被切割以产生结合 F₂亚基的 F₁亚基,其中氨基末端为 110 位 - 约 161 位。所述 F₁和 F₂亚基,可被纯化为三聚体、三聚体的玫瑰花结或三聚体和三聚体的玫瑰花结的混合物。

[0198] 通常,改变 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域的氨基酸序列以防止在约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置的切割,但其含天然产生或引入的蛋白酶切割位置,切割时产生 F₁亚基和 F₂亚基,所述 F₁亚基中氨基末端从 110 位到约 161 位。例如,所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可具有改变的氨基酸序列以防止在约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置的切割,但其从约 101 位到约 161 位含一种或多种天然产生或引入的蛋白酶切割位置。在具体实施例中,改变所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列以防止在约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置的切割,但其在约 109/110 位含天然产生的弗林蛋白酶切割位置。

[0199] 本领域普通技术人员可容易地设计并构想会使宿主细胞生产并表达 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的各种具体的氨基酸序列,包括没有在约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置切割的氨基酸序列。通常,独立替换或缺失约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置部分或邻近其的一种或多种氨基酸。本文描述了防止约 136/137 位切割的合适的氨基酸替代和缺失。例如,可使用 K131Q 替代、131-134 位的氨基酸缺失或 K131Q/R133Q/R135Q/R136Q 替代,这些各自抑制 136/137 上的切割。在某些实施方式中,C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽在约 133-136 位包括至少一种氨基酸替代或缺失。

[0200] 相似地,含蛋白酶切割位置(如天然产生或引入的)的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的各种具体氨基酸序列可能存在并可容易地设计和构想,所述序列切割时产生含 F₁的第一亚基和含 F₂的第二亚基。例如,从约 101 位到约 161 位的 RSV F 蛋白的氨基酸序列含胰蛋白酶切割位置,且一种或多种所述胰蛋白酶切割位置可被胰蛋白酶切割以生成 F₁和 F₂亚基。如果需要,一种或多种合适的蛋白酶识别位置可引入所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽,例如约 101 位到约 161 位之间。所引入的蛋白酶识别位置可用所述合适的蛋白酶切割以产生 F₁和 F₂亚基。将蛋白酶切割位置引入 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列时,优选所述位置被不切割天然产生的 RSV F 蛋白胞外域的蛋白酶识别。

[0201] C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可用任何合适的方法生产。优选的方法是通过编码 RSV F 蛋白胞外域的构建体的重组表达,其中约 136/137 位的弗林蛋白酶切割位置的氨基酸序列被改变,从而所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽由生成约 136/137

位的弗林蛋白酶切割位置没有被切割的多肽的宿主细胞分泌。所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽优选由将其生成为结合 F₂ 亚基的 F₁ 亚基的宿主细胞分泌, 其中 F₁ 亚基的氨基末端为 132 位 - 约 161 位, 而不是 137 位。所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可用本文所述任何合适的宿主细胞生成。

[0202] 本发明这方面的一种方法包括: a) 提供含 136/137 位弗林蛋白酶切割位置改变的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽, 且所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽分泌自宿主细胞, 该细胞以结合含 F₁ 的亚基但 136/137 位没有被切割的 F₂ 片段的形式生产所述多肽, 和 b) 用在约 101-161 位之间的位置切割 RSV F 蛋白胞外域的蛋白酶切割所提供的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽, 从而生产所述组合物。在具体实施方式中, 步骤 b) 包括用在约 101-132 位、或约 132-161 位或约 110-132 位之间的位置切割 RSV F 蛋白胞外域的蛋白酶切割所提供的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。或者或此外, 在一些实施方式中, 所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽在 136/137 位含改变的弗林蛋白酶切割位置, 条件为该改变的弗林蛋白酶切割位置不缺失氨基酸 131-134。在具体实施例中, 含 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料; 至少包括所述 N 末端弗林蛋白酶多肽。

[0203] 所提供的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可纯化到需要的程度。例如, 所提供的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可在基本未加工 (如未加工或仅澄清) 或者部分或基本纯化形式的细胞裂解物、细胞匀浆或细胞条件培养基中提供。在具体例子中, 所提供的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽在选自下组的细胞条件培养基中提供: 昆虫细胞条件培养基、哺乳动物细胞条件培养基、禽类细胞条件培养基、酵母细胞条件培养基、四膜虫细胞条件培养基、和其组合。

[0204] 通常优选纯化所提供的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽, 例如纯化为至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95% 或基本均质。如本文所述, C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可容易地从脂质和脂蛋白中纯化, 而常规生产的 RSV F 蛋白的切割形式与脂质和脂蛋白污染物共纯化。因此, 提供纯化的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽时, 本方法可用于容易地生产含切割的 RSV F 蛋白胞外域而基本不含脂质或磷脂的组合物。

[0205] 本领域熟知并常用蛋白酶切割多肽的合适方法。通常, 待切割的多肽与足量的蛋白酶在适于切割所述多肽的条件 (如 pH、多肽和蛋白酶浓度、温度) 下结合。许多合适的蛋白酶可市售获得, 且已知许多蛋白酶进行切割的合适条件。如果需要, 所述 RSV F 蛋白胞外域多肽可在蛋白酶切割后纯化。

[0206] 本方法的一个实施例中, 提供含完整融合肽的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽, 如 137-154 位氨基酸都未被替换或缺失的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。本方法的另一实施例中, 提供含已改变融合肽的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽, 如约 137-152 氨基酸、约 137-153 氨基酸、约 137-145 氨基酸或约 137-142 氨基酸缺失的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。还描述了其他合适的融合肽缺失, 如 137-146 位的氨基酸缺失。Ruiz-Arguello 等, *J. Gen. Virol.*, 85:3677-3687 (2004)。

[0207] 在一些实施方式中, 纯化所提供的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽。切割所提供的未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽, 且切割引起已切割 RSV F 蛋白胞外域多肽形成

三聚体。如果需要,所述三聚体可用任何合适的方法如尺寸排阻色谱进一步纯化。

[0208] 在本方法的具体实施例中,所提供的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽至少含所述 N 末端弗林蛋白酶多肽(图 1)。例如用胰蛋白酶切割所提供的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽,且切割引起 RSV F 蛋白胞外域多肽的切割三聚体、切割三聚体的玫瑰花结或切割三聚体和切割三聚体的玫瑰花结的组合的形成。如果需要,所述切割三聚体和/或切割三聚体的玫瑰花结可用任何合适的方法如尺寸排阻色谱进一步纯化。

[0209] 本发明这方面的另一方法包括:a) 提供含在 136/137 位含改变的弗林蛋白酶切割位置的 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料如细胞裂解物、细胞匀浆或细胞条件培养基,且所述可溶性 RSV F 蛋白胞外域多肽分泌自以结合含 F₁的亚基但 136/137 位没有被切割的 F₂片段的形式生成该多肽的细胞,条件为该改变的弗林蛋白酶切割位置不缺失氨基酸 131-134;和 b) 从所述生物材料中纯化所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽,从而生产所述组合物。所述 F₁亚基的氨基末端优选为约 110 位-约 132 位。所述 F₁亚基的氨基末端更优选为约 110 位。所述 F₁亚基的氨基末端特别优选不在 137 位。在具体实施例中,含 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料;至少包括所述 N 末端弗林蛋白酶多肽。

[0210] 如果需要,所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽还在约 101 位和约 161 位之间含改变或缺失的其他蛋白酶位置(如胰蛋白酶切割位置)以防止蛋白酶(如胰蛋白酶)切割。例如,约 101 位和约 161 位之间存在的一种或多种赖氨酸和/或精氨酸残基(如所有赖氨酸和精氨酸残基)缺失或被非赖氨酸或精氨酸的氨基酸替换,且所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽在约 101 位和约 161 位之间没有被胰蛋白酶切割。所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可含本文所述的完整融合肽或改变的融合肽。

[0211] 所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽如单体、三聚体以及单体和三聚体的组合可纯化到需要的程度。通常优选纯化所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体或三聚体,例如纯化为至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%或基本均质。如本文所述,C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可容易地用例如尺寸排阻色谱法从脂质和脂蛋白中纯化。因此,本方法可用于容易地生产含 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽如单体、三聚体或单体和三聚体的组合而基本不含脂质和脂蛋白的组合物。在本发明的具体实施例中,所述 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽至少含所述 N 末端弗林蛋白酶多肽(图 1)。

[0212] 在一个实施例中,所述方法包括提供昆虫细胞条件培养基、哺乳动物细胞条件培养基、禽类细胞条件培养基、酵母细胞条件培养基、四膜虫细胞条件培养基或其组合。在一些实施方式中,纯化 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽三聚体。在其他实施方式中,纯化 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体。在其他实施方式中,纯化 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体和三聚体。

[0213] 自复制 RNA

[0214] 本文所述 RSV-F 多肽可通过在对象细胞中表达编码该多肽的重组核酸来生产。能给予对象以引起 RSV-F 多肽生产的优选核酸为自复制 RNA 分子。本发明的自复制 RNA 分子是基于 RNA 病毒的基因组 RNA,但缺失编码一种或多种结构蛋白的基因。所述自复制 RNA 分子能经翻译生成所述 RNA 病毒的非结构蛋白和自复制 RNA 编码的异源蛋白。

[0215] 所述自复制 RNA 通常含至少一种或多种选自下组的基因：病毒复制酶、病毒蛋白酶、病毒解旋酶和其他非结构性病毒蛋白，还含有 5'-和 3'-末端顺式激活复制序列和（如果需要）编码所需氨基酸序列（如蛋白、抗原）的异源序列。引导所述异源序列表达的亚基因组启动子可包括在所述自复制 RNA 中。如果需要，所述异源序列可与所述自复制 RNA 中的其他编码区域在框内融合和 / 或可在内部核糖体进入位点 (IRES) 的控制下。

[0216] 本发明的自复制 RNA 分子可设计成使所述自复制 RNA 分子不能诱导感染性病毒颗粒的生成。这可通过例如省略所述自复制 RNA 中的一种或多种编码结构蛋白的病毒基因实现，所述蛋白是病毒颗粒生成所必需的。例如，所述自复制 RNA 分子基于 α 病毒如辛德毕斯病毒 (SIN)、西门利克森林病毒和委内瑞拉马脑炎病毒 (VEE) 时，可省略一种或多种编码病毒结构蛋白如衣壳或包膜糖蛋白的基因。如果需要，本发明的自复制 RNA 分子可设计成诱导减毒或强毒的感染性病毒颗粒的生成，或生成能进行一轮后续感染的病毒颗粒。

[0217] 自复制 RNA 分子在甚至无任何蛋白下递送到脊椎动物细胞时，能通过其自身（或其自身的反义拷贝）转录引导生成多种子 RNA。所述自复制 RNA 递送到细胞后能直接翻译，且该翻译提供 RNA 依赖性 RNA 聚合酶，所述酶然后从该递送 RNA 中生成转录本。因此所递送 RNA 引导多种子 RNA 的生成。这些转录本相对所递送 RNA 为反义且可自身翻译以提供基因产物的原位表达，或可转录以进一步提供与该递送 RNA 同义的转录本，其经翻译提供编码的 RSV F 多肽的原位表达。

[0218] 实现自复制的一种合适系统为使用基于 α 病毒的 RNA 复制子。这些 + 链复制子在递送到细胞后翻译以得到复制酶（或复制酶 - 逆转录酶）。这些复制酶翻译为自切割产生复制复合物的聚蛋白，所述复合物形成所述 + 链递送 RNA 的基因组 - 链拷贝。这些 - 链转录本可自我转录以进一步得到所述 + 链亲本 RNA 的拷贝和得到编码所述 RSV-F 多肽的亚基因组转录本。因此所述亚基因组转录本的翻译引起所述感染细胞原位表达 RSV-F 多肽。合适的 α 病毒复制子可使用来自辛德毕斯病毒、西门利克森林病毒、东部马脑炎病毒、委内瑞拉马脑炎病毒等的复制酶。

[0219] 因此优选的自复制 RNA 分子编码 (i) 可从所述自复制 RNA 分子转录 RNA 的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶和 (ii) RSV-F 多肽。所述聚合酶可为 α 病毒复制酶例如包括 α 病毒蛋白 nsP4。

[0220] 尽管除了所述非结构复制酶聚蛋白，天然 α 病毒基因组还编码结构病毒体蛋白，但本发明中基于 α 病毒的自复制 RNA 分子优选不编码 α 病毒结构蛋白。因此所述自复制 RNA 可引导细胞中基因组 RNA 拷贝的自我生成，但不引导含 RNA 的 α 病毒病毒体的生成。不能生成这些病毒体说明所述自复制 RNA 分子不像野生型 α 病毒，其自身不能以感染形式永存。野生型病毒永存必需的 α 病毒结构蛋白在本发明的自复制 RNA 中缺失，且他们的位置被编码所需基因产物的基因占据，从而所述亚基因组转录本编码所需要的基因产物而不是所述结构 α 病毒病毒体蛋白。

[0221] 因此本发明有用的自复制 RNA 分子可具有两个开放阅读框。第一 (5') 开放阅读框编码复制酶；第二 (3') 开放阅读框编码 RSV-F 多肽。在一些实施方式中，所述 RNA 可具有额外的（下游）开放阅读框如编码其他需要的基因产物。自复制 RNA 分子可具有与所述编码的复制酶相容的 5' 序列。

[0222] 在一个方面，所述自复制 RNA 分子源自或基于 α 病毒。在其他方面，所述自复

制 RNA 分子源自或基于非 α 病毒的病毒, 优选正链 RNA 病毒, 更优选小 RNA 病毒、黄病毒、风疹病毒、痘病毒、丙型肝炎病毒、萼状病毒或冠状病毒。合适的野生型 α 病毒序列已知且可从序列保藏所如马里兰州罗克维尔的美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) 获得。合适的 α 病毒的代表示例包括奥拉病毒 (ATCC VR-368)、贝巴鲁病毒 (ATCC VR-600、ATCC VR-1240)、犰狳病毒 (ATCC VR-922)、基孔肯雅病毒 (ATCC VR-64、ATCC VR-1241)、东方马脑脊髓炎病毒 (Eastern equine encephalomyelitis virus) (ATCC VR-65、ATCC VR-1242)、摩根堡病毒 (ATCC VR-924)、格塔病毒 (ATCC VR-369、ATCC VR-1243)、克泽拉格齐病毒 (ATCC VR-927)、马亚罗 (Mayaro) (ATCC VR-66)、马亚罗病毒 (ATCC VR-1277)、米德尔堡病毒 (Middleburg) (ATCC VR-370)、穆坎博病毒 (ATCC VR-580、ATCC VR-1244)、恩杜姆病毒 (Ndumu) (ATCC VR-371)、皮春纳病毒 (ATCC VR-372、ATCC VR-1245)、罗斯河病毒 (ATCC VR-373、ATCC VR-1246)、西门利克森林病毒 (ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、辛德比斯病毒 (ATCC VR-68、ATCC VR-1248)、托纳特 (ATCC VR-925)、特里尼蒂病毒 (ATCC VR-469)、乌纳病毒 (ATCC VR-374)、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒 (ATCC VR-69、ATCC VR-923、ATCC VR-1250、ATCC VR-1249、ATCC VR-532)、西马脑脊髓炎病毒 (ATCC VR-70、ATCC VR-1251、ATCC VR-622、ATCC VR-1252)、沃达罗河病毒 (ATCC VR-926) 和 Y-62-33 (ATCC VR-375)。

[0223] 所述自复制 RNA 可与递送系统关联。所述自复制 RNA 可和或不和佐剂一起递送。

[0224] RNA 递送系统

[0225] 本发明的自复制 RNA 适于以各种形式递送, 如裸露 RNA 递送或与有助于进入细胞的脂质、聚合物或其他化合物结合。本发明的自复制 RNA 分子可用任何合适的技术如通过直接注射、微注射、电穿孔、脂质转染、生物裂解 (biolistics) 等引入靶细胞或对象。所述自复制 RNA 分子还可通过受体介导的胞吞作用导入细胞。参见例如美国专利第 6, 090, 619 号; Wu 和 Wu, *J. Biol. Chem.*, 263:14621 (1988); 和 Curiel 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8850 (1991)。例如, 美国专利第 6, 083, 741 号公开了通过将核酸连接聚阳离子组分 (如具有 3-100 个赖氨酸残基的聚 L 赖氨酸) 来导入外源核酸到哺乳动物细胞, 所述聚阳离子组分自身偶联整联蛋白受体结合组分 (如具有序列 Arg-Gly-Asp 的环肽)。

[0226] 本发明的自复制 RNA 分子可通过两亲物递送入细胞。参见例如, 美国专利号 6, 071, 890。通常, 核酸分子可形成具有阳离子两亲物的复合物。与该复合物接触的哺乳动物能容易地将其吸收。

[0227] 所述自复制 RNA 可作为裸露 RNA 递送 (如仅作为 RNA 水溶液), 但为了增强进入细胞以及随后的细胞间效应, 所述自复制 RNA 优选与递送系统如微粒或乳液递送系统组合给予。本领域技术人员熟知大量递送系统。所述递送系统包括例如基于脂质体的递送 (Debs 和 Zhu (1993) WO 93/24640; Mannino 和 Gould-Fogerite (1988) *BioTechniques* 6(7):682-691; Rose 美国专利号 5, 279, 833; Brigham (1991) WO 91/06309; 和 Felgner 等 (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7414), 以及病毒载体的应用 (如腺病毒 (参见例如 Berns 等 (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 772:95-104; Ali 等 (1994) *Gene Ther.* 1:367-384; 和 Haddada 等 (1995) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199(Pt 3):297-306 for review)、乳头瘤病毒、逆转录病毒 (参见例如 Buchscher 等 (1992) *J. Virol.* 66(5) 2731-2739; Johann 等 (1992) *J. Virol.* 66(5):1635-1640 (1992); Sommerfelt 等, (1990) *Viol.* 176:58-59;

Wilson 等 (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378 ; Miller 等 , *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991) ; Wong-Staal 等 , PCT/US94/05700, 和 Rosenberg 和 Fauci (1993), *Fundamental Immunology* (《基础免疫学》), 第三版 Paul (编辑) 纽约雷文出版社有限公司 (Raven Press, Ltd.) 和其参考文献, 和 Yu 等 , *Gene Therapy* (《基因治疗》) (1994) 同上)、和腺伴随病毒载体 (参见 West 等 (1987) *Virology* 160:38-47 ; Carter 等 (1989) 美国专利号 4,797,368 ; Carter 等 WO 93/24641 (1993) ; Kotin (1994) *Human Gene Therapy* (《人类基因治疗》) 5:793-801 ; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351 和 Samulski (同上) 的 an overview of AAV vectors (《AAV 载体概述》); 还参见 Lebkowski, 美国专利号 5,173,414 ; Tratschin 等 (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5(11):3251-3260 ; Tratschin, 等 (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4:2072-2081 ; Hermonat 和 Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470 ; McLaughlin 等 (1988) 和 Samulski 等 (1989) *J. Virol.*, 63:03822-3828) 等。

[0228] 三种特别有用的递送系统是 (i) 脂质体 (ii) 非毒性和可生物降解聚合物微粒 (iii) 阳离子亚微米水包油乳液。

[0229] 脂质体

[0230] 水环境下各种两亲性脂质能形成双分子层以包埋含 RNA 的水核心形成脂质体。这些脂质可具有阴离子、阳离子或两性离子亲水头基。从阴离子磷脂形成脂质体可追溯到上世纪六十年代,而形成阳离子脂质体的脂质从上世纪九十年代已开始研究。一些磷脂为阴离子型而其他为两性离子型。合适类型的磷脂包括但不限于:磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油和表 20 所列的一些有用的磷脂。有用的阳离子脂质包括但不限于:二油酰-三甲基铵丙烷 (DOTAP)、1,2-二硬脂氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷 (DSDMA)、1,2-二油烯氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷 (DODMA)、1,2-二亚油氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷 (DLinDMA)、1,2-二亚麻氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷 (DLenDMA)。两性脂质包括但不限于酰基两性脂质和醚基两性脂质。有用的两性脂质示例为 DPPC、DOPC 和十二烷基磷酸胆碱。所述脂质可为饱和或不饱和。

[0231] 脂质体可从单一脂质或脂质混合物形成。混合物可包括 (i) 阴离子脂质混合物 (ii) 阳离子脂质混合物 (iii) 两性脂质混合物 (iv) 阴离子脂质和阳离子脂质混合物 (v) 阴离子脂质和两性脂质混合物 (vi) 两性脂质和阳离子脂质混合物或 (vii) 阴离子脂质、阳离子脂质和两性脂质混合物。相似地,混合物可包括饱和和不饱和脂质。例如,混合物可包括 DSPC (两性、饱和)、DLinDMA (阳离子型、不饱和) 和 / 或 DMPG (阴离子型、饱和)。使用脂质混合物时,不是混合物中的所有组成脂质需要为两亲性,例如一种或多种两亲性脂质可与胆固醇混合。

[0232] 脂质的亲水部分可 PEG 化 (即通过聚乙二醇共价连接修饰)。这些修饰可增加稳定性并阻止所述脂质体的非特异性吸收。例如,脂质可用如 Heyes 等 . (2005) *J Controlled Release* 107:276-287 中公开的技术偶联 PEG。

[0233] 实施例中使用 DSPC、DLinDMA、PEG-DMPG 和胆固醇的混合物。本发明的单独部分为含 DSPC、DLinDMA、PEG-DMG 和胆固醇的脂质体。该脂质体优选包埋 RNA, 如例如编码免疫原的自复制 RNA。

[0234] 脂质体通常分为 3 组:多室脂囊 (MLV); 小单室脂囊 (SUV); 和大单室脂囊 (LUV)。

MLV 的各脂囊中具有多种双分子层,形成许多分离的水性隔室。SUV 和 LUV 具有包埋水核心的单一双分子层;SUV 通常直径 $\leq 50\text{nm}$,LUV 直径 $>50\text{nm}$ 。本发明所用的脂质体理想上为直径范围 50-220nm 的 LUV。对于含不同直径 LUV 群体的组合物:(i)至少数量上有 80% 的直径应为 20-220nm,(ii)所述群体的平均直径(Z_{av} ,强度)理想上为 40-200nm,和/或(iii)所述直径的多分散性指数应 <0.2 。

[0235] 本领域已知制备合适的脂质体的技术,例如参见 Liposomes:Methods and Protocols(《脂质体:方法和实验方案》),卷一:Pharmaceutical Nanocarriers:Methods and Protocols(《药物纳米载体:方法和实验方案》)(Weissig 编著)。哈马那(Humana)出版,2009。ISBN 160327359X;Liposome Technology(《脂质体技术》),卷 I、II 和 III(Gregoriadis 编著)。英富曼医疗保健公司(Informa Healthcare),2006;和 Functional Polymer Colloids and Microparticles(《功能性聚合物胶体和微粒》),卷 4(Microspheres, microcapsules & liposomes(微球、微囊和脂质体))。(Arshady 和 Guyot 编著)。辞塔斯图书公司(Citus Books),2002。一种有用的方法涉及混合(i)所述脂质的乙醇溶液(ii)所述核酸的水溶液和(iii)缓冲液,随后混合、平衡、稀释和纯化(Heyes 等。(2005)J Controlled Release 107:276-87.)。

[0236] RNA 优选包埋在所述脂质体中,且因此所述脂质体形成围绕含 RNA 水性核心的外层。发现所述包埋可保护 RNA 不受 RNA 酶消化。所述脂质体可包括一些外部的 RNA(如所述脂质体的表面),但至少包埋一半的 RNA(理想上为全部)。

[0237] 聚合微粒

[0238] 许多聚合物可形成微粒以包埋或吸收 RNA。基本使用非毒性聚合物表明受体可安全的接受所述颗粒,而使用可生物降解聚合物表明所述颗粒可在递送后代谢以避免长期留存。有用的聚合物还可进行灭菌,以辅助制备药物级别制剂。

[0239] 合适的非毒性和可生物降解的聚合物包括但不限于:聚(α -羟酸)、聚羟基丁酸、聚内酯(包括聚己内酯)、聚二烷酮、聚戊内酯、聚原酸酯、聚酸酐、聚氰基丙烯酸酯、酪氨酸源的聚碳酸酯、聚乙烯基吡咯烷酮或聚酯酰胺和其组合。

[0240] 在一些实施方式中,所述微粒形成自聚(α -羟酸)如聚(丙交酯) (“PLA”)、丙交酯和乙交酯的共聚物如聚(D, L-丙交酯-共-乙交酯) (“PLG”)、和 D, L-丙交酯和己内酯的共聚物。有用的 PLG 聚合物包括那些丙交酯/乙交酯摩尔比范围为例如 20:80-80:20 如 25:75、40:60、45:55、55:45、60:40、75:25。有用的 PLG 聚合物包括那些分子量为例如 5,000-200,000Da,如 10,000-100,000、20,000-70,000、40,000-50,000Da。

[0241] 所述微粒直径理想上为 $0.02\ \mu\text{m}$ - $8\ \mu\text{m}$ 。对于含直径不同的微粒群的组合物,至少数量上 80% 的直径应为 0.03 - $7\ \mu\text{m}$ 。

[0242] 本领域熟知制备合适的微粒的技术,例如参见 Functional Polymer Colloids and Microparticles(《功能性聚合物胶体和微粒》),卷 4(Microspheres, microcapsules & liposomes(微球、微囊和脂质体))。(Arshady 和 Guyot 编著)。辞塔斯图书公司(Citus Books),2002;Polymers in Drug Delivery(《药物递送中的聚合物》)。(Uchegbu 和 Schatzlein 编著)。CRC 出版社,2006。(具体第 7 章)和 Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines(《递送蛋白和疫苗的微粒系统》)。(Cohen 和 Bernstein 编著)。CRC 出版社,1996。为了有助于 RNA 的吸收,微粒可包括阳离子表面活

性剂和 / 或脂质, 如 O' Hagan 等 . (2001) J Virology 75:9037-9043 ; 和 Singh 等 . (2003) Pharmaceutical Research 20:247-251 中所公开。制作聚合微粒的替代方法是通过模塑和固化如 W02009/132206 中所公开。

[0243] 本发明的微粒可具有 40-100mV 的 ζ 电势。

[0244] RNA 可被所述微粒吸收, 且该吸收通过在所述微粒中纳入阳离子材料 (如阳离子脂质) 来促进。

[0245] 水包油阳离子乳液

[0246] 已知水包油乳液能辅助流感疫苗如 FLUAD™ 产品中的 MF59™ 佐剂和 PREPANDRIX™ 产品中的 AS03 佐剂。按照本发明的 RNA 递送能利用水包油乳液, 只要该乳液包括一种或多种阳离子分子。例如, 阳离子脂质可包括在所述乳液中, 以提供带负电 RNA 能结合的带正电液滴表面。

[0247] 所述乳液包含一种或多种油。合适的油包括来自例如动物 (如鱼) 或植物来源的油。所述油理想上是可生物降解 (可代谢) 和生物相容的。植物油的来源包括坚果、种籽和谷物。最常见花生油、大豆油、椰子油和橄榄油是坚果油的示例。可以使用例如获自霍霍巴豆的霍霍巴油。种籽油包括红花油、棉花籽油、葵花籽油、芝麻籽油等。在谷物油中, 最常见的是玉米油, 但也可以使用其它谷类的油, 如小麦、燕麦、黑麦、稻、画眉草、黑小麦等。可从坚果和种籽油开始, 通过水解、分离和酯化合适物质制备甘油和 1, 2- 丙二醇的 6-10 碳脂肪酸酯, 其不是种籽油中天然产生。来自哺乳动物乳液的脂肪和油可代谢并因而可以使用。获得动物来源纯油所必需的分、纯化、皂化和其它方法的过程为本领域熟知。

[0248] 大多数鱼类含有容易回收的可代谢油。例如, 鳕鱼肝油、鲨鱼肝油和诸如鲸蜡的鲸油是可以用于本发明的几种鱼油的示例。通过生化途径用 5- 碳异戊二烯单位合成许多支链油, 其总称为萜类。也可采用鲨烯的饱和类似物鲨烷。包括鲨烯和鲨烷在内的鱼油, 易于从商业来源获得, 或可以通过本领域已知的方法获得。

[0249] 其他有用的油为生育酚, 特别是和角鲨烯结合。当乳液的油相包含生育酚时, 可采用 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 或 ξ 生育酚中的任何一种, 但优选 α - 生育酚。可同时采用 D- α - 生育酚和 DL- α - 生育酚。优选的 α 生育酚是 DL- α 生育酚。可使用包括角鲨烯和生育酚 (如 DL- α - 生育酚) 的油组合。

[0250] 乳液优选包含角鲨烯, 其是一种支链不饱和萜类鲨鱼肝油 ($C_{30}H_{50}$; $[(CH_3)_2C[=CHCH_2CH_2C(CH_3)]_2=CHCH_2-$]₂; 2, 6, 10, 15, 19, 23- 六甲基 -2, 6, 10, 14, 18, 22- 二十四碳己烯 ; CAS RN 7683-64-9)。

[0251] 所述乳液中的油可包括油例如角鲨烯和至少一种其他油的组合。

[0252] 所述乳液的水性组分可为淡水 (如 w. f. i.) 或可包括其他组分如溶质。例如, 其可包括盐以形成缓冲液, 例如柠檬酸或磷酸盐如钠盐。常用缓冲剂包括 : 磷酸盐缓冲剂 ; Tris 缓冲剂 ; 硼酸盐缓冲剂 ; 琥珀酸盐缓冲剂 ; 组氨酸缓冲剂 ; 或柠檬酸缓冲剂。优选缓冲的水相, 且缓冲液的浓度一般是 5-20mM。

[0253] 所述乳液也包括阳离子脂质。优选此脂质为表面活性剂从而其有助于所述乳液的形成和稳定。有用的阳离子脂质通常含生理条件下带正电的氮原子如叔胺或季胺。所述氮可在两亲性表面活性剂的亲水头基里。有用的阳离子脂质包括但不限于 : 1, 2- 二油酰氧基 -3-(三甲基胺基) 丙烷 (DOTAP)、3'-[N-(N', N'- 二甲基氨基乙基)- 氨甲酰基] 胆固醇

(DC 胆固醇)、二甲基双十八烷基-铵 (DDA 如溴化物)、1,2-二肉豆蔻酰-3-三甲基-铵丙烷 (DMTAP)、二棕榈酰 (C16:0) 三甲基铵丙烷 (DPTAP)、二硬脂酰三甲基铵丙烷 (DSTAP)。其他有用的阳离子脂质是：苯扎氯铵 (BAK)、氯化苄乙铵、溴棕三甲铵 (其含十四烷基三甲基溴化铵和可能少量的十二烷基三甲基溴化铵和十六烷基三甲基溴化铵)、十六烷基氯化吡啶鎓 (CPC)、十六烷基三甲基氯化铵 (CTAC)、N,N',N'-聚氧乙烯 (10)-N-牛油-1,3-二氨基丙烷、十二烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基溴化铵、混合的烷基-三甲基-溴化铵、苄基二甲基十二烷基氯化铵、苄基二甲基十六烷基氯化铵、苄基三甲基甲醇铵、十六烷基二甲基乙基溴化铵、二甲基十八烷基溴化铵 (DDAB)、甲基氯化苄乙铵、氯化十烃季铵、甲基混合的三烷基氯化铵、甲基三辛基氯化铵)、N,N-二甲基-N-[2(2-甲基-4-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯氧基)-乙氧基]乙基]-苯甲烷-氯化铵 (DEBDA)、二烷基二甲基铵盐、[1-(2,3-二油烯基氧基)-丙基]-N,N,N,三甲基氯化铵、1,2-二酰基-3-(三甲基铵)丙烷 (酰基=二肉豆蔻酰、二棕榈酰、二硬脂酰、二油酰)、1,2-二酰基-3(二甲基铵)丙烷 (酰基=二肉豆蔻酰、二棕榈酰、二硬脂酰、二油酰)、1,2-二油酰-3-(4'-三甲基-铵)丁酰-sn-甘油、1,2-二油酰-3-琥珀酰-sn-甘油胆碱酯、(4'-三甲基铵)丁酸胆固醇)、N-烷基吡啶盐 (如溴化十六烷基吡啶和氯化十六烷基吡啶)、N-烷基哌啶盐、双阳离子波拉型电解质 (C12Me6 ;C12BU6)、二烷基甘油基磷酸胆碱、溶血卵磷脂、L- α 二油酰磷脂酰乙醇胺、胆固醇半琥珀酸胆碱酯、脂聚胺,包括但不限于双十八烷基酰胺基甘氨酸精胺 (DOGS)、二棕榈酰磷脂酰乙醇-酰胺基精胺 (DPPES)、脂聚-L(或D)-赖氨酸 (LPLL、LPDL)、聚(L(或D)-赖氨酸偶联 N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、具有侧接氨基的双十二烷基谷氨酸酯 (C[^]GluPhCnN)、具有侧接氨基的双十四烷基谷氨酸酯 (C14GluCnN+)、胆固醇阳离子衍生物,包括但不限于胆固醇基-3 β -氧琥珀酰胺基乙烯基三甲基铵盐、胆固醇基-3 β -氧琥珀酰胺基乙烯基-二甲基铵、胆固醇基-3 β -羧基酰氨基乙烯基三甲基铵盐、和胆固醇基-3 β -羧基酰氨基乙烯基二甲基铵。其它有用的阳离子脂质在美国 2008/0085870 和美国 2008/0057080 中描述,其通过引用纳入本文。

[0254] 阳离子脂质优选可生物降解(可代谢)和生物相容的。

[0255] 除了所述油和阳离子脂质,乳液可包括非离子型表面活性剂和/或两性表面活性剂。所述表面活性剂包括但不限于:聚氧乙烯去水山梨糖醇酯表面活性剂(通常称为吐温),特别是聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80;以商品名 DOWF AX™ 出售的环氧乙烷 (EO)、环氧丙烷 (PO) 和/或环氧丁烷 (BO) 的共聚物,如直链 EP/PO 嵌段共聚物;重复的乙氧基(氧-1,2-乙二基)数量不同的辛苯聚醇,特别感兴趣的是辛苯聚醇 9(曲通 (Triton) X-100,或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇);(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇 (IGEPAL CA-630/NP-40);磷脂如磷脂酰胆碱(卵磷脂);衍生自十二烷醇、十六烷醇、十八烷醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为苄泽表面活性剂),如三乙二醇单月桂基醚(苄泽 30);聚氧乙烯-9-月桂醚以及去水山梨糖醇酯(通常称为司盘),如去水山梨糖醇三油酸酯(司盘 85)和去水山梨糖醇单月桂酸酯。乳液中包含的优选表面活性剂是聚山梨酯 80(吐温 80;聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯)、司盘 85(去水山梨糖醇三油酸酯)、卵磷脂和曲通 X100。

[0256] 所述乳液中可包括这些表面活性剂的混合物,如吐温 80/司盘 85 混合物或吐温 80/曲通-X100 混合物。聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(吐温 80)和辛苯聚醇如叔辛基苯氧基-聚乙氧基乙醇(曲通 X-100)的组合也适用。另一种

有用的组合包含月桂醇聚醚-9和聚氧乙烯去水山梨糖醇酯和/或辛苯聚醇。有用的混合物可包括HLB值为10-20的表面活性剂(如聚山梨酯80,HLB为15.0)和HLB值为1-10的表面活性剂(如去水山梨糖醇三油酸酯,HLB为1.8)。

[0257] 最终乳液中油的含量(体积%)优选为2-20%,如5-15%、6-14%、7-13%、8-12%。约4-6%或约9-11%的角鲨烯含量特别有用。

[0258] 最终乳液中角鲨烯的含量(重量%)优选在0.001%和8%之间。例如:聚氧乙烯去水山梨糖醇酯(如聚山梨酯80)0.2-4%,具体为0.4-0.6%、0.45-0.55%、约0.5%或1.5-2%、1.8-2.2%、1.9-2.1%、约2%、或0.85-0.95%、或约1%;去水山梨糖醇酯(如去水山梨糖醇三油酸酯)0.02-2%,具体约0.5%或约1%;辛基-或壬基苯氧基聚氧乙醇(如曲通X-100)0.001-0.1%,具体为0.005-0.02%;聚氧乙烯酯(如月桂醇聚醚9)0.1-8%,优选0.1-10%且具体为0.1-1%或约0.5%。

[0259] 油和表面活性剂的绝对含量和其比例可在较广范围内变化而仍能形成乳液。技术人员可容易地改变组分的相对比例以获得需要的乳液,但油和表面活性剂常用4:1-5:1的重量比(油过量)。

[0260] 确保乳液的免疫刺激活性的重要参数,特别是在大型动物中,是油滴尺寸(直径)。最有效的乳液液滴尺寸为亚微米范围。所述液滴尺寸适于为50-750nm。最常用的平均液滴尺寸小于250nm如小于200nm、小于150nm。平均液滴尺寸常用80-180nm。理想地,至少80%(数量)的乳液油滴直径小于250nm,且优选至少90%。测量乳液中平均液滴尺寸和尺寸分布的仪器可市售获得。这些通常使用动态光散射和/或单颗粒光学感应的技术如获自颗粒尺寸系统公司(Particle Sizing Systems)的Accusizer™和Nicomp™系列仪器(美国圣塔芭芭拉),或马文仪器公司(Malvern Instruments)的Zetasizer™仪器(英国),或厚利巴公司(Horiba)的颗粒尺寸分布分析仪(Particle Size Distribution Analyzer instruments)(日本京都)。

[0261] 理想地,液滴尺寸分布(数量)仅有一个最大值而不是两个最大值,即围绕平均值(模式)分布有单一液滴群。优选的乳液的多分散性<0.4如0.3、0.2或更小。

[0262] 含亚微米液滴和窄尺寸分布的合适乳液可通过使用微流化获得。该技术通过几何学固定的通道以高压和高速推动输入流组分来降低油滴平均尺寸。这些流接触通道壁、室壁和彼此。造成的剪切力、冲击力和空化力使液滴尺寸变小。可重复微流化步骤直至得到的乳液含所需平均液滴尺寸和分布。

[0263] 作为微流化的替代,加热法可用于引起相转化。这些方法还可提供颗粒尺寸分布紧密的亚微米乳液。

[0264] 优选的乳液可过滤灭菌,即其液滴可穿过220nm滤器。除了提供灭菌,这个过程还去除所述乳液中的任何大液滴。

[0265] 在某些实施方式中,所述乳液中的阳离子脂质是DOTAP。所述阳离子水包油乳液可含约0.5mg/ml-约25mg/ml的DOTAP。例如,所述阳离子水包油乳液包含的DOTAP可为约0.5mg/ml-约25mg/ml、约0.6mg/ml-约25mg/ml、约0.7mg/ml-约25mg/ml、约0.8mg/ml-约25mg/ml、约0.9mg/ml-约25mg/ml、约1.0mg/ml-约25mg/ml、约1.1mg/ml-约25mg/ml、约1.2mg/ml-约25mg/ml、约1.3mg/ml-约25mg/ml、约1.4mg/ml-约25mg/ml、约1.5mg/ml-约25mg/ml、约1.6mg/ml-约25mg/ml、约1.7mg/ml-约25mg/ml、约0.5mg/ml-约24mg/ml、约

0.5mg/ml-约22mg/ml、约0.5mg/ml-约20mg/ml、约0.5mg/ml-约18mg/ml、约0.5mg/ml-约15mg/ml、约0.5mg/ml-约12mg/ml、约0.5mg/ml-约10mg/ml、约0.5mg/ml-约5mg/ml、约0.5mg/ml-约2mg/ml、约0.5mg/ml-约1.9mg/ml、约0.5mg/ml-约1.8mg/ml、约0.5mg/ml-约1.7mg/ml、约0.5mg/ml-约1.6mg/ml、约0.6mg/ml-约1.6mg/ml、约0.7mg/ml-约1.6mg/ml、约0.8mg/ml-约1.6mg/ml、约0.5mg/ml、约0.6mg/ml、约0.7mg/ml、约0.8mg/ml、约0.9mg/ml、约1.0mg/ml、约1.1mg/ml、约1.2mg/ml、约1.3mg/ml、约1.4mg/ml、约1.5mg/ml、约1.6mg/ml、约12mg/ml、约18mg/ml、约20mg/ml、约21.8mg/ml、约24mg/ml等。在一个示范性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约0.8mg/ml-约1.6mg/ml DOTAP,如0.8mg/ml、1.2mg/ml、1.4mg/ml或1.6mg/ml。

[0266] 在某些实施方式中,所述阳离子脂质为DC胆固醇。所述阳离子水包油乳液可含约0.1mg/ml-约5mg/ml的DC胆固醇。例如,所述阳离子水包油乳液包含的DC胆固醇可为约0.1mg/ml-约5mg/ml、约0.2mg/ml-约5mg/ml、约0.3mg/ml-约5mg/ml、约0.4mg/ml-约5mg/ml、约0.5mg/ml-约5mg/ml、约0.62mg/ml-约5mg/ml、约1mg/ml-约5mg/ml、约1.5mg/ml-约5mg/ml、约2mg/ml-约5mg/ml、约2.46mg/ml-约5mg/ml、约3mg/ml-约5mg/ml、约3.5mg/ml-约5mg/ml、约4mg/ml-约5mg/ml、约4.5mg/ml-约5mg/ml、约0.1mg/ml-约4.92mg/ml、约0.1mg/ml-约4.5mg/ml、约0.1mg/ml-约4mg/ml、约0.1mg/ml-约3.5mg/ml、约0.1mg/ml-约3mg/ml、约0.1mg/ml-约2.46mg/ml、约0.1mg/ml-约2mg/ml、约0.1mg/ml-约1.5mg/ml、约0.1mg/ml-约1mg/ml、约0.1mg/ml-约0.62mg/ml、约0.15mg/ml、约0.3mg/ml、约0.6mg/ml、约0.62mg/ml、约0.9mg/ml、约1.2mg/ml、约2.46mg/ml、约4.92mg/ml等。在一个示范性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约0.62mg/ml-约4.92mg/ml DC胆固醇,如2.46mg/ml。

[0267] 在某些实施方式中,所述阳离子脂质为DDA。所述阳离子水包油乳液可含约0.1mg/ml-约5mg/ml的DDA。例如,所述阳离子水包油乳液包含的DDA可为约0.1mg/ml-约5mg/ml、约0.1mg/ml-约4.5mg/ml、约0.1mg/ml-约4mg/ml、约0.1mg/ml-约3.5mg/ml、约0.1mg/ml-约3mg/ml、约0.1mg/ml-约2.5mg/ml、约0.1mg/ml-约2mg/ml、约0.1mg/ml-约1.5mg/ml、约0.1mg/ml-约1.45mg/ml、约0.2mg/ml-约5mg/ml、约0.3mg/ml-约5mg/ml、约0.4mg/ml-约5mg/ml、约0.5mg/ml-约5mg/ml、约0.6mg/ml-约5mg/ml、约0.73mg/ml-约5mg/ml、约0.8mg/ml-约5mg/ml、约0.9mg/ml-约5mg/ml、约1.0mg/ml-约5mg/ml、约1.2mg/ml-约5mg/ml、约1.45mg/ml-约5mg/ml、约2mg/ml-约5mg/ml、约2.5mg/ml-约5mg/ml、约3mg/ml-约5mg/ml、约3.5mg/ml-约5mg/ml、约4mg/ml-约5mg/ml、约4.5mg/ml-约5mg/ml、约1.2mg/ml、约1.45mg/ml等。或者,所述阳离子水包油乳液包含约20mg/ml、约21mg/ml、约21.5mg/ml、约21.6mg/ml、约25mg/ml DDA。在一个示范性实施方式中,所述阳离子水包油乳液包含约0.73mg/ml-约1.45mg/ml DDA,如1.45mg/ml。

[0268] 导管或类似设备可用于将本发明的自复制RNA分子以裸露RNA或与递送系统组合递送到靶器官或组织。合适的导管在例如美国专利号4,186,745;5,397,307;5,547,472;5,674,192;和6,129,705中公开,其都通过引用纳入本文。

[0269] 本发明包括使用合适的递送系统如包埋或吸收有自复制RNA的脂质体、聚合微粒或亚微米乳液微粒来递送编码RSV-F多肽的自复制RNA分子,以例如单独或结合其他大分子激发免疫应答。本发明包括吸收和/或包埋有自复制RNA分子的脂质体、微粒和亚微米

乳液及其组合。

[0270] 如实施例中进一步证明,与脂质体和亚微米乳液微粒结合的自复制 RNA 分子可有效地递送到所述宿主细胞,且可引起针对所述自复制 RNA 编码的蛋白的免疫应答。

[0271] 免疫原性组合物

[0272] 本发明提供免疫原性组合物。所述免疫原性组合物可包括单一活性免疫原性剂或数种免疫原性剂。例如,所述免疫原性组合物可包括单一形式(如单体、三聚体或玫瑰花结)或两种或更多形式(如单体和三聚体的混合物或单体和三聚体之间的动态平衡)的 RSV F 多肽。所述免疫组合物可包括编码 RSV-F 多肽的自复制 RNA,且优选还包括合适的递送系统如脂质体、多聚微粒、水包油乳液及其组合。

[0273] 本发明免疫原性组合物也可包含一种或多种免疫调节剂。一种或多种所述免疫调节剂优选包括一种或多种佐剂,例如两种、三种、四种或更多佐剂。佐剂可包括 TH1 佐剂和/或 TH2 佐剂,详述见下。

[0274] 在另一个实施方式中,本发明的免疫原性组合物包含多肽,所述多肽展示 RSV-F 糖蛋白融合前或中间融合构型中存在的表位,但不展示所述糖蛋白的融合后构型。

[0275] 在另一个实施方式中,本发明的免疫原性组合物包含第一多肽和第二多肽,其中所述第一多肽含完整或部分 RSV F 蛋白,且所述第二多肽含异源寡聚结构域。所述第一多肽可含 RSV F 蛋白胞外域。所述第二多肽可为来自流感血凝素的三聚结构域,来自 SARS 刺突的三聚结构域,来自 HIV gp41、NadA、改良的 GCN4、或 ATCase 的三聚结构域。

[0276] 在一个方面,本发明是包含切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的组合物,其生成是如本文所述通过提供未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽或 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽并切割它们以产生 F₁和 F₂亚基。

[0277] 在另一个方面,本发明是包含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽三聚体和/或单体的组合物,其生成是如本文所述通过提供含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料,并从所述生物材料中纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体、未切割的三聚体或未切割的单体和未切割的三聚体的组合(如混合物或动态平衡)。在一些实施方式中,所述 RSV F 蛋白胞外域多肽在约 106-109 位和约 133-136 位含改变的弗林蛋白酶切割位置,且如果需要还可含改变的融合肽。在其他实施方式中,所述 RSV F 蛋白胞外域在约 106-109 位和约 133-136 位含改变的弗林蛋白酶切割位置,在约 101 位和约 161 位之间含改变的胰蛋白酶切割位置,且如果需要还可含改变的融合肽。

[0278] 在另一个方面,本发明是包含 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽三聚体和/或单体的组合物,其生成是如本文所述通过提供含 C 末端未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料,并从所述生物材料中纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体、未切割的三聚体或未切割的单体和未切割的三聚体的组合(如混合物或动态平衡)。

[0279] 在另一个方面,本发明是包含切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的组合物,其生成是如本文所述通过提供含切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料,所述多肽含改变的融合肽(如至少部分所述融合肽缺失),并从所述生物材料中纯化切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽三聚体。

[0280] 在另一个方面,本发明是包含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的组合物,其生成是如本文所述通过提供含未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽的生物材料,所述多肽含改变的融

合肽（如至少部分所述融合肽缺失），并从所述生物材料中纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽单体。

[0281] 本发明的组合物优选适于给予哺乳动物对象如人，且包括一种或多种药学上可接受的载体和 / 或赋形剂包括佐剂。对这类组分的充分讨论参见参考文献 29。组合物通常是水性形式。当所述组合物是免疫原性组合物并给予哺乳动物如人时，其会引发免疫应答。所述免疫原性组合物可用于制备用于免疫哺乳动物的疫苗制剂。

[0282] 所述免疫原性组合物可包括单一活性免疫原性剂或数种免疫原性剂。例如，所述 RSV F 蛋白胞外域多肽可为单一形式（如未切割单体、切割单体、未切割三聚体、切割三聚体或切割三聚体的玫瑰花结）或两种或更多形式（如未切割单体和未切割三聚体的混合物或未切割单体和未切割三聚体之间的动态平衡）。此外，所述组合物可包含 RSV F 蛋白胞外域多肽及一种或多种其他 RSV 蛋白（如 G 蛋白和 / 或 M 蛋白）和 / 或其可结合来自其他病原体的免疫原。

[0283] 该组合物可含有防腐剂，如硫柳汞或 2- 苯氧乙醇。然而，疫苗优选应基本无（即小于 $5 \mu\text{g/ml}$ ）含汞物质，如不含硫柳汞。更优选无汞的免疫原性组合物。特别优选不含防腐剂的免疫原性组合物。

[0284] 为了控制张度，优选包含生理性盐如钠盐。优选氯化钠 (NaCl)，其浓度可为 1-20mg/ml。可以存在其它盐，包括氯化钾、磷酸二氢钾、二水合磷酸氢二钠、氯化镁、氯化钙等。

[0285] 组合物的渗透压通常为 200mOsm/kg-400mOsm/kg，优选为 240-360mOsm/kg，更优选为 290-310mOsm/kg。

[0286] 组合物可含有一种或多种缓冲剂。常用缓冲剂包括：磷酸盐缓冲剂；Tris 缓冲剂；硼酸盐缓冲剂；琥珀酸盐缓冲剂；组氨酸缓冲剂（具体是有氢氧化铝佐剂）；或柠檬酸盐缓冲剂。包含的缓冲剂一般是 5-20mM。组合物的 pH 通常为 5.0-8.1，更常为 6.0-8.0，例如 6.5-7.5，或者 7.0-7.8。因此，本发明方法可包括在包装前调整散装疫苗 pH 的步骤。

[0287] 该组合物优选无菌。该组合物优选无热原，如每剂量含有 <1EU（内毒素单位，标准量度），优选每剂量 <0.1EU。该组合物优选不含谷蛋白。人疫苗的给药剂量体积一般为约 0.5ml，但可将一半剂量（即约 0.25ml）给予儿童。

[0288] 佐剂

[0289] 本发明的组合物含 RSV-F 多肽或编码 RSV-F 多肽的核酸，其还可包含一种或多种佐剂，例如 2 种、3 种、4 种或更多佐剂，所述佐剂可用于提高接受所述组合物的患者体内引发的免疫应答（体液和 / 或细胞）。所述佐剂可包括 TH1 佐剂和 / 或 TH2 佐剂。可以用于本发明组合物的佐剂包括但不限于：

[0290] •含矿物质的组合物。本发明中适合用作佐剂的含有矿物质的组合物包括矿物盐，例如钙盐和铝盐（或其混合物）。本发明包括无机盐，例如氢氧化物（如羟基氧化物）、磷酸盐（如羟磷酸盐、正磷酸盐）、硫酸盐等，或不同无机化合物的混合物，这些化合物可采用任何合适的形式（如凝胶、晶体、无定形等），优选具有吸附性。钙盐包括磷酸钙（如参考文献 38 公开的“CAP”颗粒）。铝盐包括氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝等，也可将含有矿物质的组合物制成金属盐的颗粒 (39)。铝盐佐剂详述于下。

[0291] •油乳液组合物（详述见下）。适用作本发明佐剂的油乳液组合物包含角鲨烯 - 水

乳液,如MF59(5%角鲨烯、0.5%吐温80和0.5%司盘85,用微流化床配制成亚微米颗粒)。

[0292] • 细胞因子诱导剂(详述见下)。适用于本发明的细胞因子诱导剂包括 to11 样受体 7(TLR7) 激动剂(如 WO 2009/111337 中公开的苯并萘啶化合物)。

[0293] • 皂苷(参考文献 74 第 22 章)是在许多植物种类的树皮、叶、茎干、根甚至花中发现的甾醇糖苷和三萜糖苷的异质群。已广泛研究了作为佐剂的来自皂树(*Quillaja saponaria*)Molina 树皮的皂苷。皂苷也可购自丽花菝葜(*Smilax ornata*)(墨西哥菝葜)、满天星(*Gypsophilla paniculata*)(婚纱花)和肥皂草(*Saponaria officianalis*)(皂根)。皂苷佐剂制剂包括纯化制剂如 QS21,以及脂质制剂如 ISCOM。QS21 以 STIMULON(TM) 出售。已采用 HPLC 和 RP-HPLC 纯化皂苷组合物。已鉴定了用这些技术纯化的特定组分,包括 QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-B 和 QH-C。所述皂苷优选 QS21。生产 QS21 的方法在参考文献 40 中公开。皂苷制剂也可以包含甾醇,如胆固醇(41)。皂苷和胆固醇的组合可用于形成称为免疫刺激复合物(ISCOM)的独特颗粒(参考文献 74 的第 23 章)。ISCOM 通常还包含磷脂,如磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。任何已知的皂苷均可用于 ISCOM 中。ISCOM 优选包含 Qui1A、QHA 和 QHC 中的一种或多种。参考文献 41-43 中进一步描述了 ISCOM。41-43。任选地,所述 ISCOM 可以不含另外的去污剂(44)。关于开发基于皂苷的佐剂的综述可以参见参考文献 45 和 46。

[0294] • 脂肪佐剂(详见下)包括水包油乳液、源自肠细菌脂多糖的改良的天然脂质 As、磷脂化合物(如合成磷脂二聚体,E6020)等。

[0295] • 细菌 ADP-核糖基化毒素(如大肠杆菌不耐热肠毒素“LT”、霍乱毒素“CT”或百日咳毒素“PT”)及其脱毒衍生物,如称为 LT-K63 和 LT-R72 的突变毒素(47)。参考文献 48 中描述了将脱毒的 ADP-核糖基化毒素用作粘膜佐剂,参考文献 49 中描述了将其用作胃肠道外佐剂。

[0296] • 生物粘附剂和粘膜粘附剂,如酯化透明质酸微球(50)或壳聚糖及其衍生物(51)。

[0297] • 由可生物降解和无毒材料(例如聚(α -羟酸)、聚羟基丁酸、聚正酯、聚酞、聚己酸内酯等),优选丙交酯-乙交酯共聚物形成的微粒(即直径约 100nm-150 μ m,更优选约 200nm-30 μ m,或约 500nm-10 μ m 的颗粒),任选处理以具有带负电表面(如用 SDS 处理)或带正电表面(例如用阳离子去污剂如 CTAB 处理)。

[0298] • 脂质体(参考文献 74 的第 13 和 14 章)。适用作佐剂的脂质体制剂的例子见参考文献 52-54 所述。

[0299] • • 聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯制剂(55)。该类制剂还包括聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂和辛苯糖醇的组合(56),以及聚氧乙烯烷基醚或酯表面活性剂和至少一种另外的非离子表面活性剂如辛苯糖醇的组合(57)。优选的聚氧乙烯醚选自下组:聚氧乙烯-9-月桂醚(月桂醇聚醚 9)、聚氧乙烯-9-硬脂醚、聚氧乙烯-8-硬脂醚、聚氧乙烯-4-月桂醚、聚氧乙烯-35-月桂醚和聚氧乙烯-23-月桂醚。

[0300] • 胞壁酰肽,例如 N-乙酰胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰-去甲胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(去甲 MDP)、N-乙酰葡萄糖胺酰-N-乙酰胞壁酰-L-A1-D-异谷氨酸-L-A1a-二棕榈酰丙酰胺(“DTP-DPP”或“Theramide™”)和 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟

基磷酰氧基)-乙胺 (MTP-PE)。

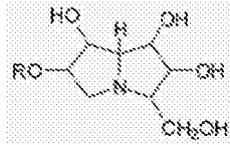
[0301] • 由第一种革兰氏阴性菌制备的外膜蛋白蛋白质体制剂与衍生自第二种革兰氏阴性菌脂多糖制剂的组合,其中外膜蛋白蛋白质体和脂多糖制剂形成稳定的非共价连接佐剂复合物。这类复合物包括“IVX-908”,它是由脑膜炎奈瑟球菌外膜和脂多糖组成的复合物。

[0302] • 聚氧鎇 (polyoxidonium) 聚合物 (58, 59) 或其它 N-氧化的聚乙烯-哌嗪衍生物。

[0303] • 甲基肌苷 5'-单磷酸酯 (“MIMP”) (60)。

[0304] • 多聚羟化吡咯双烷类化合物 (61), 如下式化合物:

[0305]



[0306] 其中, R 选自:氢,直链或支链、未取代或取代、饱和或不饱和的酰基、烷基(如环烷基)、烯基、炔基和芳基或其药学上可接受的盐或衍生物。例子包括但不限于:木麻黄(casuarine)、木麻黄-6- α -D-吡喃葡萄糖、3-表-木麻黄、7-表-木麻黄、3,7-二表-木麻黄等。

[0307] • CD1 配体,如 α -糖基神经酰胺 (62-69) (如 α -半乳糖基神经酰胺)、含植物鞘氨醇的 α -葡萄糖糖神经酰胺、OCH、KRN7000 [(2S, 3S, 4R)-1-O-(α -D-吡喃半乳糖基)-2-(N-二十六烷酰氨基)-1,3,4-十八烷三醇、CRONY-101、3''-O-硫代-半乳糖基神经酰胺等等。

[0308] • γ 菊糖 (70) 或其衍生物,如阿尔加穆林 (algammulin)。

[0309] • 病毒体和病毒样颗粒 (VLP)。这些结构通常包含一种或多种任选与磷脂组合或一起配制的病毒蛋白质。其通常无病原性,不能复制,且通常不含任何天然病毒基因组。所述病毒蛋白可重组生成或分离自全病毒。这些适用于病毒体或 VLP 的病毒蛋白包括源自流感病毒(例如 HA 或 NA)、乙肝病毒(例如核心蛋白或衣壳蛋白)、戊肝病毒、麻疹病毒、辛德比斯病毒、轮状病毒、口蹄疫病毒、逆转录病毒、诺沃克病毒、人乳头状瘤病毒、HIV、RNA-噬菌体、Q β -噬菌体(如外壳蛋白)、GA-噬菌体、fr-噬菌体、AP205 噬菌体和 Ty(如反转录转座子 Ty 蛋白 p1) 的蛋白。

[0310] 参考文献 74 和 75 中更详细地讨论了这些和其它佐剂活性物质。

[0311] 组合物可包含 2 种、3 种、4 种或更多佐剂。例如,本发明的组合物可优选包括水包油乳剂和细胞因子诱导剂,或含矿物质的组合物和细胞因子诱导剂,或两种水包油乳液佐剂、或两种苯并萘啶化合物等。

[0312] 组合物中的抗原和佐剂通常形成混合物。

[0313] 油乳液佐剂

[0314] 适用作本发明佐剂的油乳液组合物包含角鲨烯-水乳液,如 MF59 (5% 角鲨烯、0.5% 吐温 80 和 0.5% 司盘 85,用微流化床配制成亚微米颗粒)。也可以使用完全弗氏佐剂 (CFA) 和不完全弗氏佐剂 (IFA)。

[0315] 已知各种水包油乳液,它们通常包括至少一种油和至少一种表面活性剂,所述油和表面活性剂是可生物降解(可代谢)和生物相容的。乳液中的油滴直径通常小于 5 μ m,甚

至可具有亚微米直径,通过微流化床实现这种小尺寸以提供稳定乳液。优选尺寸小于 220nm 的液滴,因为其可进行过滤灭菌。

[0316] 本发明可使用的油诸如来自动物(如鱼)或植物的油。植物油的来源包括坚果、种籽和谷物。最常见花生油、大豆油、椰子油和橄榄油是坚果油的示例。可以使用例如获自霍霍巴豆的霍霍巴油。种籽油包括红花油、棉花籽油、葵花籽油、芝麻籽油等。在谷物油中,最常见的是玉米油,但也可以使用其它谷类的油,如小麦、燕麦、黑麦、稻、画眉草、黑小麦等。可从坚果和种籽油开始,通过水解、分离和酯化合适物质制备甘油和 1,2-丙二醇的 6-10 碳脂肪酸酯,其不是种籽油中天然产生。来自哺乳动物乳汁的脂肪和油类是可代谢的,因此可以用于实施本发明。获得动物来源纯油所必需的分离、纯化、皂化和其它方法的过程为本领域熟知。大多数鱼类含有容易回收的可代谢油。例如,鳕鱼肝油、鲨鱼肝油和诸如鲸蜡的鲸油是可以用于本发明的几种鱼油的示例。通过生化途径用 5-碳异戊二烯单位合成许多支链油,其总称为萜类。鲨鱼肝油含有称为角鲨烯的支链不饱和萜类化合物,2,6,10,15,19,23-六甲基-2,6,10,14,18,22-二十四碳六烯,其为本文特别优选。角鲨烯的饱和类似物角鲨烷也是优选的油。包括角鲨烯和角鲨烷在内的鱼油,易于从商业来源获得,或可以通过本领域已知的方法获得。其它优选油是生育酚(见下)。可以使用油的混合物。

[0317] 表面活性剂可以按其‘HLB’(亲水/亲脂平衡)分类。本发明优选的表面活性剂的 HLB 为至少 10,优选至少 15,更优选至少 16。可以与本发明一起使用的表面活性剂包括但不限于:聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯表面活性剂(通常称为吐温),特别是聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80;以商品名 DOWFAX(TM)出售的环氧乙烷(EO)、环氧丙烷(PO)和/或环氧丁烷(BO)的共聚物,如直链 EP/PO 嵌段共聚物;重复的乙氧基(氧-1,2-乙二基)数量不同的辛苯聚醇,特别感兴趣的是辛苯聚醇 9(曲通(Triton)X-100,或叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇);(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇(IGEPAL CA-630/NP-40);磷脂,如磷脂酰胆碱(卵磷脂);壬酚乙醇酯,如 TERGITOL(TM)NP 系列;衍生自月桂醇、鲸蜡醇、硬脂醇和油醇的聚氧乙烯脂肪醚(称为苳泽(Brij)表面活性剂),如三甘醇单月桂基醚(苳泽 30);以及脱水山梨糖醇酯(通常称为司盘(SPAN)),如脱水山梨糖醇三油酸酯(司盘 85)和脱水山梨糖醇单月桂酸酯。优选非离子型表面活性剂。乳液中包含的表面活性剂优选吐温 80(TM)(聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯)、司盘 85(去水山梨糖醇三油酸酯)、卵磷脂和曲通 X-100。

[0318] 可使用表面活性剂的混合物,如吐温 80(TM)/司盘 85 混合物。聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯(吐温 80(TM))和辛苯聚醇如叔辛基苯氧基聚乙氧基乙醇(曲通 X-100)的混合物也适用。另一种有用的组合包含月桂醇聚醚-9 加聚氧乙烯去水山梨糖醇酯和/或辛苯聚醇。

[0319] 优选的表面活性剂的含量(重量%)为:聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯(如吐温 80(TM))0.01-1%,特别是约 0.1%;辛基-或壬基苯氧基聚氧乙醇(如曲通 X-100 或曲通系列的其它去污剂)0.001-0.1%,特别是 0.005-0.02%;聚氧乙烯醚(如月桂醇聚醚 9)0.1-20%,优选 0.1-10%,特别是 0.1-1%或约 0.5%。

[0320] 本发明所用的具体水包油乳液佐剂包括但不限于:

[0321] • 角鲨烯、吐温 80(TM)和司盘 85 的亚微米乳液。所述乳液的体积组成可以是约 5%角鲨烯、约 0.5%聚山梨酯 80 和约 0.5%司盘 85。以重量计,这些比例为 4.3%鲨烯、

0.5%聚山梨酯 80 和 0.48%司盘 85。这种佐剂称为‘MF59’ [71-73], 参考文献 74 的第 10 章和参考文献 75 的第 12 章有更详细的描述。MF59 乳液宜包含柠檬酸根离子, 如 10mM 柠檬酸钠缓冲液。

[0322] • 角鲨烯、生育酚和吐温 80(TM) 的乳液。所述乳液可包含磷酸盐缓冲盐水。其还可包含司盘 85(例如 1%) 和 / 或卵磷脂。这些乳液可含有 2-10%角鲨烯、2-10%生育酚和 0.3-3%吐温 80(TM), 角鲨烯:生育酚的重量比优选 <1, 因为这能使乳液更稳定。角鲨烯和吐温 80(TM) 的体积比可约为 5:2。可通过下述方法制备一种此类乳液:将吐温 80(TM) 溶解于 PBS 得到 2%溶液, 然后将 90ml 该溶液与 5g DL- α -生育酚和 5ml 角鲨烯的混合物混合, 然后微流体化该混合物。得到的乳液可含有(如)平均直径为 100-250nm, 优选约 180nm 的亚微米油滴。

[0323] • 角鲨烯、生育酚和曲通去污剂(如曲通 X-100)的乳液。该乳液也可包含 3d-MPL(见下)。所述乳液可包含磷酸盐缓冲液。

[0324] • 含有聚山梨酯(如聚山梨酯 80)、曲通去污剂(如曲通 X-100)和生育酚(如琥珀酸 α -生育酚)的乳液。该乳液可包含这三种组分, 其质量比约为 75:11:10(如 750 μ g/ml 聚山梨酯 80、110 μ g/ml 曲通 X-100 和 100 μ g/ml 琥珀酸 α -生育酚), 这些浓度应包括抗原中这些组分的贡献。所述乳液还可包含鲨烯。该乳液也可包含 3d-MPL(见下)。所述水相可包含磷酸盐缓冲液。

[0325] • 角鲨烷、聚山梨酯 80 和泊洛沙姆 401(“普流罗尼克(TM)L121”)的乳液。所述乳液可用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水配制。该乳液是一种有用的胞壁酰二肽递送载体, 已与苏氨酸基-MDP 一起用于“SAF-I”佐剂(0.05-1% Thr-MDP、5% 鲨烯、2.5% 普流罗尼克(Pluronic)L121 和 0.2% 聚山梨酯 80) 中(76)。也可不与 Thr-MDP 一起使用, 例如用“AF”佐剂(5% 鲨烯、1.25% 普流罗尼克 L121 和 0.2% 聚山梨酯 80)(77)。优选微流体化。

[0326] • 含有鲨烯、水性溶剂、聚氧乙烯烷基醚亲水性非离子型表面活性剂(如聚氧乙烯(12)十六十八醚)和疏水性非离子型表面活性剂(如去水山梨糖醇酯或二缩甘露醇酯, 如去水山梨糖醇单油酸酯或‘司盘 80’)的乳液。该乳液优选为热可逆的和 / 或其中至少 90% 油滴(以体积计)的尺寸小于 200nm。该乳液也可含有以下一种或多种物质:糖醇;低温保护剂(例如, 糖, 如十二烷基麦芽苷和 / 或蔗糖);和 / 或烷基糖苷(alkylpolyglycoside)。这类乳液可冻干。

[0327] • 含有 0.5-50%油、0.1-10%磷脂和 0.05-5%非离子型表面活性剂的乳液。如参考文献 78 所述, 优选的磷脂组分是磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油、磷脂酸、鞘磷脂和心磷脂。优选亚微米液滴尺寸。

[0328] • 不可代谢油(如轻质矿物油)和至少一种表面活性剂(如卵磷脂、吐温 80(TM) 或司盘 80)的亚微米水包油乳液。可包含添加剂, 例如 QuilA 皂苷、胆固醇、皂苷-亲脂体偶联物(如通过葡糖醛酸的羧基将脂族胺加到脱酰基皂苷上而产生的 GPI-0100, 如参考文献 79 所述)、二甲基双十八烷基溴化铵和 / 或 N,N-双十八烷基-N,N-双(2-羟乙基)丙二胺。

[0329] • 包含矿物油、非离子亲脂性乙氧基化脂肪醇和非离子亲水性表面活性剂(例如, 乙氧基化脂肪醇和 / 或聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物)的乳液。

[0330] • 包含矿物油、非离子亲水性乙氧基化脂肪醇和非离子亲脂性表面活性剂(例如,

乙氧基化脂肪醇和 / 或聚氧乙烯 - 聚氧丙烯嵌段共聚物) 的乳液。

[0331] • 皂苷 (如 QuilA 或 QS21) 和固醇 (如胆固醇) 结合成螺旋胶束的乳液 (80)。

[0332] 可以在递送时,将该乳液与抗原临时混合。因此,在包装或出售的疫苗中该佐剂 和抗原可分开保存,使用时配制成最终制剂。所述抗原通常是水性形式,从而最终通过混合 两种液体制备疫苗。所述两种液体的混合体积比可变 (例如 5:1-1:5),但通常约为 1:1。

[0333] 细胞因子诱导剂

[0334] 包含在本发明组合物中的细胞因子诱导剂在给予患者时能够引发免疫应答,以释 放细胞因子,包括干扰素和白介素。优选的药剂可引发以下一种或多种物质的释放:干扰 素- γ ;白介素-1;白介素-2;白介素-12;TNF- α ;TNF- β ;和 GM-CSF。优选的药剂可诱发 与 Th1-型免疫应答有关的细胞因子的释放,例如干扰素 γ 、TNF α 、白介素 2。优选刺激干 扰素 γ 和白介素 2。

[0335] 因此,接受本发明组合物的结果是,用 RSV F 蛋白刺激时,患者会具有以抗原特异 性方式释放所需细胞因子的 T 细胞。例如,由其血液纯化的 T 细胞在体外接触 F 蛋白时会 释放 γ -干扰素。测定外周血单核细胞 (PBMC) 中这种应答的方法是本领域已知的,这些方 法包括 ELISA,ELISPOT,流式细胞术和实时 PCR。例如,参考文献 81 报道的研究监测针对破 伤风类毒素的抗原特异性 T 细胞介导的免疫应答,特别是 γ 干扰素应答,发现 ELISPOT 是 区别抗原特异性 TT-诱导的应答与自发应答的灵敏度最高的方法,但流式细胞术检测胞质 内细胞因子是测定重刺激效果的最有效方法。

[0336] 合适的细胞因子诱导剂包括但不限于:

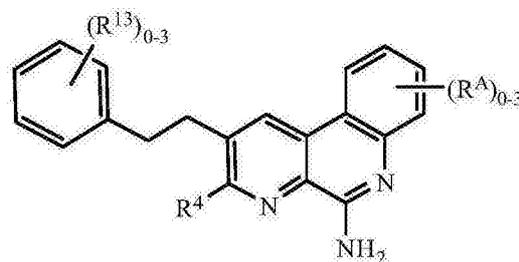
[0337] • 免疫调节性寡核苷酸,如含有 CpG 基序的寡核苷酸 (含有通过磷酸键连接于鸟嘌 呤的未甲基化胞嘧啶的二核苷酸序列)、或双链 RNA、或含有回文序列的寡核苷酸、或含有 聚 (dG) 序列的寡核苷酸。

[0338] • 3-O-去酰基单磷酸脂质 A (“3dMPL”,也称为“MPL(TM)”) (82-85)。

[0339] • 咪唑喹啉化合物,如 IMIQUIMOD(TM) (“R-837”) (86-87)、RESIQUIMOD(TM) (“R-848”) (88) 和其类似物;及其盐 (如盐酸盐)。有关免疫刺激性咪唑喹啉的其它细节可 参见参考文献 89-93。

[0340] • 苯并萘啉化合物,例如:(a) 具有下式的化合物:

[0341]



[0342] 式中:

[0343] R^4 选自 H、卤素、 $-C(O)OR^7$ 、 $-C(O)R^7$ 、 $-C(O)N(R^{11}R^{12})$ 、 $-N(R^{11}R^{12})$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NHN(R^9)_2$ 、 $-SR^7$ 、 $-(CH_2)_nOR^7$ 、 $-(CH_2)_nR^7$ 、 $-LR^8$ 、 $-LR^{10}$ 、 $-OLR^8$ 、 $-OLR^{10}$ 、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_2-C_8 烯烃、 C_2-C_8 炔烃、 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 卤代烷氧基、芳基、杂芳基、 C_3-C_8 环烷基和 C_3-C_8 杂环烷基,其中 R^4 的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_2-C_8 烯烃、 C_2-C_8 炔

烃、 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 卤代烷氧基、芳基、杂芳基、 C_3-C_8 环烷基和 C_3-C_8 杂环烷基各自任选由 1-3 个取代基取代,所述取代基独立地选自卤素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-R^7$ 、 $-OR^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-C(O)OR^8$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-P(O)(OR^8)_2$ 、 $-OP(O)(OR^8)_2$ 、 $-P(O)(OR^{10})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{10})_2$ 、 $-C(O)N(R^9)_2$ 、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)R^8$ 、 $-S(O)_2N(R^9)_2$ 和 $-NR^9S(O)_2R^8$;

[0344] 各 L 独立地选自键、 $-(O(CH_2)_m)_t-$ 、 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 亚烯基和 C_2-C_6 亚炔基,其中 L 的 C_1-C_6 烷基、 C_2-C_6 亚烯基和 C_2-C_6 亚炔基各自可任选由 1-4 个取代基取代,所述取代基独立地选自卤素、 $-R^8$ 、 $-OR^8$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-P(O)(OR^8)_2$ 、 $-OP(O)(OR^8)_2$ 、 $-P(O)(OR^{10})_2$ 和 $-OP(O)(OR^{10})_2$;

[0345] R^7 选自 H、 C_1-C_6 烷基、芳基、杂芳基、 C_3-C_8 环烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_2-C_8 烯烃、 C_2-C_8 炔烃、 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 卤代烷氧基、 C_3-C_8 杂环烷基,其中 R^7 的 C_1-C_6 烷基、芳基、杂芳基、 C_3-C_8 环烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_2-C_8 烯烃、 C_2-C_8 炔烃、 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 卤代烷氧基、 C_3-C_8 杂环烷基各自可任选由 1-3 个 R^{13} 基团取代;

[0346] 各 R^8 独立地选自 H、 $-CH(R^{10})_2$ 、 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯烃、 C_2-C_8 炔烃、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_1-C_6 烷氧基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_3-C_8 环烷基、 C_2-C_8 杂环烷基、 C_1-C_6 羟基烷基和 C_1-C_6 卤代烷氧基,其中 R^8 的 C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯烃、 C_2-C_8 炔烃、 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、 C_1-C_6 烷氧基、 C_3-C_8 环烷基、 C_2-C_8 杂环烷基、 C_1-C_6 羟基烷基和 C_1-C_6 卤代烷氧基各自可任选由 1-3 个取代基取代,所述取代基独立地选自 $-CN$ 、 R^{11} 、 $-OR^{11}$ 、 $-SR^{11}$ 、 $-C(O)R^{11}$ 、 $-OC(O)R^{11}$ 、 $-C(O)N(R^9)_2$ 、 $-C(O)OR^{11}$ 、 $-NR^9C(O)R^{11}$ 、 $-NR^9R^{10}$ 、 $-NR^{11}R^{12}$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-OR^9$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-C(O)NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)NR^{11}OH$ 、 $-S(O)_2R^{11}$ 、 $-S(O)R^{11}$ 、 $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$ 、 $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$ 、 $-P(O)(OR^{11})_2$ 和 $-OP(O)(OR^{11})_2$;

[0347] 各 R^9 独立地选自 H、 $-C(O)R^8$ 、 $-C(O)OR^8$ 、 $-C(O)R^{10}$ 、 $-C(O)OR^{10}$ 、 $-S(O)_2R^{10}$ 、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 杂烷基和 C_3-C_6 环烷基,或各 R^9 独立为与所连 N 一起形成 C_3-C_8 杂环烷基的 C_1-C_6 烷基,其中所述 C_3-C_8 杂环烷基环可任选含有选自 N、O 和 S 的额外杂原子,且其中 R^9 的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_3-C_6 环烷基或 C_3-C_8 杂环烷基各自可任选由 1-3 个取代基取代,所述取代基独立地选自 $-CN$ 、 R^{11} 、 $-OR^{11}$ 、 $-SR^{11}$ 、 $-C(O)R^{11}$ 、 $-OC(O)R^{11}$ 、 $-C(O)OR^{11}$ 、 $-NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)NR^{11}OH$ 、 $-S(O)_2R^{11}$ 、 $-S(O)R^{11}$ 、 $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$ 、 $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$ 、 $-P(O)(OR^{11})_2$ 和 $-OP(O)(OR^{11})_2$;

[0348] 各 R^{10} 独立地选自芳基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 杂环烷基和杂芳基,其中所述芳基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 杂环烷基和杂芳基可任选由 1-3 个取代基取代,所述取代基选自卤素、 $-R^8$ 、 $-OR^8$ 、 $-LR^9$ 、 $-LOR^9$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NR^9C(O)R^8$ 、 $-NR^9CO_2R^8$ 、 $-CO_2R^8$ 、 $-C(O)R^8$ 和 $-C(O)N(R^9)_2$;

[0349] R^{11} 和 R^{12} 独立地选自 H、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、芳基、杂芳基、 C_3-C_8 环烷基和 C_3-C_8 杂环烷基,其中 R^{11} 和 R^{12} 的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、芳基、杂芳基、 C_3-C_8 环烷基和 C_3-C_8 杂环烷基各自可任选由 1-3 个取代基取代,所述取代基独立地选自卤素、 $-CN$ 、 R^8 、 $-OR^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-C(O)OR^8$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NR^8C(O)R^8$ 、 $-NR^8C(O)OR^8$ 、 $-C(O)N(R^9)_2$ 、 C_3-C_8 杂环烷基、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)_2N(R^9)_2$ 、 $-NR^9S(O)_2R^8$ 、 C_1-C_6 卤代烷基和 C_1-C_6 卤代烷氧基;

[0350] 或者 R^{11} 和 R^{12} 各自独立为 C_1-C_6 烷基,并与所连接的 N 原子一起形成可任选取代的 C_3-C_8 杂环烷基环,该环可任选含有选自 N、O 和 S 的额外杂原子;

[0351] 各 R^{13} 独立地选自卤素、 $-CN$ 、 $-LR^9$ 、 $-LOR^9$ 、 $-OLR^9$ 、 $-LR^{10}$ 、 $-LOR^{10}$ 、 $-OLR^{10}$ 、 $-LR^8$ 、 $-LOR^8$ 、 $-OLR^8$ 、 $-LSR^8$ 、 $-LSR^{10}$ 、 $-LC(O)R^8$ 、 $-OLC(O)R^8$ 、 $-LC(O)OR^8$ 、 $-LC(O)R^{10}$ 、 $-LOC(O)OR^8$ 、 $-LC(O)NR^9R^{11}$ 、 $-LC(O)NR^9R^8$ 、 $-LN(R^9)_2$ 、 $-LNR^9R^8$ 、 $-LNR^9R^{10}$ 、 $-LC(O)N(R^9)_2$ 、 $-LS(O)_2R^8$ 、 $-LS(O)R^8$ 、 $-LC(O)NR^8OH$ 、 $-LNR^9C(O)R^8$ 、 $-LNR^9C(O)OR^8$ 、 $-LS(O)_2N(R^9)_2$ 、 $-OLS(O)_2N(R^9)_2$ 、 $-LNR^9S(O)_2R^8$ 、 $-LC(O)$

$\text{NR}^9\text{LN}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{LP}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ 、 $-\text{LOP}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ 、 $-\text{LP}(\text{O})(\text{OR}^{10})_2$ 和 $-\text{OLP}(\text{O})(\text{OR}^{10})_2$;

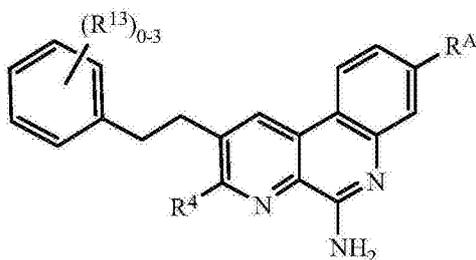
[0352] 各 R^A 独立地选自 $-\text{R}^8$ 、 $-\text{R}^7$ 、 $-\text{OR}^7$ 、 $-\text{OR}^8$ 、 $-\text{R}^{10}$ 、 $-\text{OR}^{10}$ 、 $-\text{SR}^8$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{NR}^9\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ 、 $-\text{NR}^9\text{C}(\text{S})\text{R}^8$ 、 $-\text{NR}^9\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{NR}^9\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{NR}^9\text{CO}_2\text{R}^8$ 、 $-\text{NR}^9\text{NR}^9\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ 、 $-\text{NR}^9\text{NR}^9\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{NR}^9\text{NR}^9\text{CO}_2\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^8$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{C}(\text{S})\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{OR}^8)\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(\text{NOR}^8)\text{R}^8$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^8$ 、 $-\text{S}(\text{O})_3\text{R}^8$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^8$ 、 $-\text{NR}^9\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{NR}^9\text{SO}_2\text{R}^8$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{10})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^{10})_2$ 、 $-\text{N}(\text{OR}^8)\text{R}^8$ 、 $-\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})-\text{N}(\text{R}^9)_2$ 和 $-(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(\text{O})\text{R}^8$;或环 A 上的两个相邻 R^A 取代基形成含最多两个杂原子作为环成员的 5-6 元环;

[0353] 各 n 独立地为 0、1、2、3、4、5、6、7 或 8;

[0354] 各 m 独立地选自 1、2、3、4、5 和 6, 以及

[0355] t 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8; (b) 具有下式的化合物:

[0356]



[0357] 式中:

[0358] R^A 选自 H、卤素、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^7$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{11}\text{R}^{12})$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{11}\text{R}^{12})$ 、 $-\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{NHN}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{SR}^7$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{OR}^7$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{R}^7$ 、 $-\text{LR}^8$ 、 $-\text{LR}^{10}$ 、 $-\text{OLR}^8$ 、 $-\text{OLR}^{10}$ 、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 杂烷基、 C_1 - C_6 卤代烷基、 C_2 - C_8 烯烃、 C_2 - C_8 炔烃、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 卤代烷氧基、芳基、杂芳基、 C_3 - C_8 环烷基和 C_3 - C_8 杂环烷基, 其中 R^A 的 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 杂烷基、 C_1 - C_6 卤代烷基、 C_2 - C_8 烯烃、 C_2 - C_8 炔烃、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 卤代烷氧基、芳基、杂芳基、 C_3 - C_8 环烷基和 C_3 - C_8 杂环烷基各自任选由 1-3 个取代基取代, 所述取代基独立地选自卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{R}^7$ 、 $-\text{OR}^8$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^8$ 、 $-\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{10})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^{10})_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^8$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^8$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^9)_2$ 和 $-\text{NR}^9\text{S}(\text{O})_2\text{R}^8$;

[0359] 各 L 独立地选自键、 $-(\text{O}(\text{CH}_2)_m)_t$ 、 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 亚烯基和 C_2 - C_6 亚炔基, 其中 L 的 C_1 - C_6 烷基、 C_2 - C_6 亚烯基和 C_2 - C_6 亚炔基各自可任选由 1-4 个取代基取代, 所述取代基独立地选自卤素、 $-\text{R}^8$ 、 $-\text{OR}^8$ 、 $-\text{N}(\text{R}^9)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ 、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^8)_2$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{10})_2$ 和 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^{10})_2$;

[0360] R^7 选自 H、 C_1 - C_6 烷基、芳基、杂芳基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_1 - C_6 杂烷基、 C_1 - C_6 卤代烷基、 C_2 - C_8 烯烃、 C_2 - C_8 炔烃、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 卤代烷氧基、 C_3 - C_8 杂环烷基, 其中 R^7 的 C_1 - C_6 烷基、芳基、杂芳基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_1 - C_6 杂烷基、 C_1 - C_6 卤代烷基、 C_2 - C_8 烯烃、 C_2 - C_8 炔烃、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 卤代烷氧基、 C_3 - C_8 杂环烷基各自可任选由 1-3 个 R^{13} 基团取代;

[0361] 各 R^8 独立地选自 H、 $-\text{CH}(\text{R}^{10})_2$ 、 C_1 - C_8 烷基、 C_2 - C_8 烯烃、 C_2 - C_8 炔烃、 C_1 - C_6 卤代烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_1 - C_6 杂烷基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_2 - C_8 杂环烷基、 C_1 - C_6 羟基烷基和 C_1 - C_6 卤代烷氧基, 其中 R^8 的 C_1 - C_8 烷基、 C_2 - C_8 烯烃、 C_2 - C_8 炔烃、 C_1 - C_6 杂烷基、 C_1 - C_6 卤代烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、 C_3 - C_8 环烷基、 C_2 - C_8 杂环烷基、 C_1 - C_6 羟基烷基和 C_1 - C_6 卤代烷氧基各自可任选由 1-3 个取代基取代, 所述取代基独立地选自 $-\text{CN}$ 、 R^{11} 、 $-\text{OR}^{11}$ 、 $-\text{SR}^{11}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{11}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^{11}$ 、 $-\text{C}(\text{O})$

$N(R^9)_2$ 、 $-C(O)OR^{11}$ 、 $-NR^9C(O)R^{11}$ 、 $-NR^9R^{10}$ 、 $-NR^{11}R^{12}$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-OR^9$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-C(O)NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)NR^{11}OH$ 、 $-S(O)_2R^{11}$ 、 $-S(O)R^{11}$ 、 $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$ 、 $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$ 、 $-P(O)(OR^{11})_2$ 和 $-OP(O)(OR^{11})_2$;

[0362] 各 R^9 独立地选自 H 、 $-C(O)R^8$ 、 $-C(O)OR^8$ 、 $-C(O)R^{10}$ 、 $-C(O)OR^{10}$ 、 $-S(O)_2R^{10}$ 、 $-C_1-C_6$ 烷基、 C_1-C_6 杂烷基和 C_3-C_6 环烷基, 或各 R^9 独立地为与所连 N 一起形成 C_3-C_8 杂环烷基的 C_1-C_6 烷基, 其中所述 C_3-C_8 杂环烷基环可任选含有选自 N 、 O 和 S 的额外杂原子, 且其中 R^9 的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_3-C_6 环烷基或 C_3-C_8 杂环烷基可任选由 1-3 个取代基取代, 所述取代基独立地选自 $-CN$ 、 R^{11} 、 $-OR^{11}$ 、 $-SR^{11}$ 、 $-C(O)R^{11}$ 、 $-OC(O)R^{11}$ 、 $-C(O)OR^{11}$ 、 $-NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)NR^{11}R^{12}$ 、 $-C(O)NR^{11}OH$ 、 $-S(O)_2R^{11}$ 、 $-S(O)R^{11}$ 、 $-S(O)_2NR^{11}R^{12}$ 、 $-NR^{11}S(O)_2R^{11}$ 、 $-P(O)(OR^{11})_2$ 和 $-OP(O)(OR^{11})_2$;

[0363] 各 R^{10} 独立地选自芳基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 杂环烷基和杂芳基, 其中所述芳基、 C_3-C_8 环烷基、 C_3-C_8 杂环烷基和杂芳基可任选由 1-3 个取代基取代, 所述取代基选自卤素、 $-R^8$ 、 $-OR^8$ 、 $-LR^9$ 、 $-LOR^9$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NR^9C(O)R^8$ 、 $-NR^9CO_2R^8$ 、 $-CO_2R^8$ 、 $-C(O)R^8$ 和 $-C(O)N(R^9)_2$;

[0364] R^{11} 和 R^{12} 独立地选自 H 、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、芳基、杂芳基、 C_3-C_8 环烷基和 C_3-C_8 杂环烷基, 其中 R^{11} 和 R^{12} 的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 杂烷基、 C_1-C_6 卤代烷基、芳基、杂芳基、 C_3-C_8 环烷基和 C_3-C_8 杂环烷基各自可任选由 1-3 个取代基取代, 所述取代基独立地选自卤素、 $-CN$ 、 R^8 、 $-OR^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-C(O)OR^8$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NR^8C(O)R^8$ 、 $-NR^8C(O)OR^8$ 、 $-C(O)N(R^9)_2$ 、 C_3-C_8 杂环烷基、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)_2N(R^9)_2$ 、 $-NR^9S(O)_2R^8$ 、 C_1-C_6 卤代烷基和 C_1-C_6 卤代烷氧基;

[0365] 或者 R^{11} 和 R^{12} 各自独立为 C_1-C_6 烷基, 并与所连接的 N 原子一起形成可任选取代的 C_3-C_8 杂环烷基环, 该环可任选含有选自 N 、 O 和 S 的额外杂原子;

[0366] 各 R^{13} 独立地选自卤素、 $-CN$ 、 $-LR^9$ 、 $-LOR^9$ 、 $-OLR^9$ 、 $-LR^{10}$ 、 $-LOR^{10}$ 、 $-OLR^{10}$ 、 $-LR^8$ 、 $-LOR^8$ 、 $-OLR^8$ 、 $-LSR^8$ 、 $-LSR^{10}$ 、 $-LC(O)R^8$ 、 $-OLC(O)R^8$ 、 $-LC(O)OR^8$ 、 $-LC(O)R^{10}$ 、 $-LOC(O)OR^8$ 、 $-LC(O)NR^9R^{11}$ 、 $-LC(O)NR^9R^8$ 、 $-LN(R^9)_2$ 、 $-LNR^9R^8$ 、 $-LNR^9R^{10}$ 、 $-LC(O)N(R^9)_2$ 、 $-LS(O)_2R^8$ 、 $-LS(O)R^8$ 、 $-LC(O)NR^8OH$ 、 $-LNR^9C(O)R^8$ 、 $-LNR^9C(O)OR^8$ 、 $-LS(O)_2N(R^9)_2$ 、 $-OLS(O)_2N(R^9)_2$ 、 $-LNR^9S(O)_2R^8$ 、 $-LC(O)NR^9LN(R^9)_2$ 、 $-LP(O)(OR^8)_2$ 、 $-LOP(O)(OR^8)_2$ 、 $-LP(O)(OR^{10})_2$ 和 $-OLP(O)(OR^{10})_2$;

[0367] 各 R^A 独立地选自 $-R^8$ 、 $-R^7$ 、 $-OR^7$ 、 $-OR^8$ 、 $-R^{10}$ 、 $-OR^{10}$ 、 $-SR^8$ 、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-N(R^9)_2$ 、 $-NR^9C(O)R^8$ 、 $-NR^9C(S)R^8$ 、 $-NR^9C(O)N(R^9)_2$ 、 $-NR^9C(S)N(R^9)_2$ 、 $-NR^9CO_2R^8$ 、 $-NR^9NR^9C(O)R^8$ 、 $-NR^9NR^9C(O)N(R^9)_2$ 、 $-NR^9NR^9CO_2R^8$ 、 $-C(O)C(O)R^8$ 、 $-C(O)CH_2C(O)R^8$ 、 $-CO_2R^8$ 、 $-(CH_2)_nCO_2R^8$ 、 $-C(O)R^8$ 、 $-C(S)R^8$ 、 $-C(O)N(R^9)_2$ 、 $-C(S)N(R^9)_2$ 、 $-OC(O)N(R^9)_2$ 、 $-OC(O)R^8$ 、 $-C(O)N(OR^8)R^8$ 、 $-C(NOR^8)R^8$ 、 $-S(O)_2R^8$ 、 $-S(O)_3R^8$ 、 $-SO_2N(R^9)_2$ 、 $-S(O)R^8$ 、 $-NR^9SO_2N(R^9)_2$ 、 $-NR^9SO_2R^8$ 、 $-P(O)(OR^8)_2$ 、 $-OP(O)(OR^8)_2$ 、 $-P(O)(OR^{10})_2$ 、 $-OP(O)(OR^{10})_2$ 、 $-N(OR^8)R^8$ 、 $-CH=CHCO_2R^8$ 、 $-C(=NH)-N(R^9)_2$ 和 $-(CH_2)_nNHC(O)R^8$;

[0368] 各 n 独立地为 0、1、2、3、4、5、6、7 或 8;

[0369] 各 m 独立地选自 1、2、3、4、5 和 6, 以及

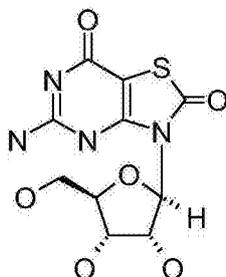
[0370] t 为 1、2、3、4、5、6、7 或 8; 或 (c) 任意 (a) 或 (b) 的药学上可接受的盐。其他苯并萘啶化合物和制备苯并萘啶化合物的方法描述于 WO 2009/111337。苯并萘啶化合物或其盐可单独使用, 或者与一种或多种其它化合物联用。例如, 苯并萘啶化合物可与水包油乳液或含矿物质的组合物联用。在具体的实施方式中, 苯并萘啶化合物与水包油乳液 (如角鲨烯-水乳液如 MF59) 或含矿物质的组合物 (如无机盐如铝盐或钙盐) 联用。

[0371] • 缩氨基硫脲化合物, 如参考文献 94 所述的化合物。参考文献 94 中也描述了配制、制备和筛选活性化合物的方法。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如

TNF- α 方面特别有效。

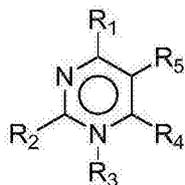
[0372] • 色胺酮化合物,如参考文献 95 所述的化合物。参考文献 95 中也描述了配制、制备和筛选活性化合物的方法。缩氨基硫脲在刺激人外周血单核细胞产生细胞因子如 TNF- α 方面特别有效。

[0373] • 核苷类似物,如 (a) 埃索他宾 (Isatorabine) (ANA-245 ;7- 硫杂 -8- 氧代鸟苷) ;
[0374]



[0375] 及其前药 ;(b) ANA975 ;(c) ANA-025-1 ;(d) ANA380 ;(e) 参考文献 96-98 所述的化合物 ;(f) 具有下式的化合物 :

[0376]



[0377] 式中 :

[0378] R_1 和 R_2 各自独立地是氢、卤素、 $-NR_aR_b$ 、 $-OH$ 、 C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基、杂环基、取代的杂环基、 C_{6-10} 芳基、取代的 C_{6-10} 芳基、 C_{1-6} 烷基或取代的 C_{1-6} 烷基 ;

[0379] R_3 为缺失、 H 、 C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基、 C_{6-10} 芳基、取代的 C_{6-10} 芳基、杂环基或取代的杂环基 ;

[0380] R_4 和 R_5 各自独立地是氢、卤素、杂环基、取代的杂环基、 $-C(O)R_d$ 、 C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基,或结合在一起形成 5 元环,如 R_{45} :

[0381]



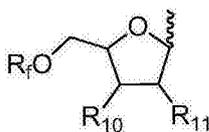
[0382] 在 \sim 所示的化学键处实现结合

[0383] X_1 和 X_2 各自独立地是 N 、 C 、 O 或 S ;

[0384] R_8 是氢、卤素、 $-OH$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 $-OH$ 、 $-NR_aR_b$ 、 $-(CH_2)_n-O-R_c$ 、 $-O-(C_{1-6}$ 烷基)、 $-S(O)_pR_e$ 或 $-C(O)R_d$;

[0385] R_9 是氢、 C_{1-6} 烷基、取代的 C_{1-6} 烷基、杂环基、取代的杂环基或 R_{9a} ,其中 R_{9a} 是 :

[0386]

R_{9a}

[0387] 在  所示的化学键处实现结合

[0388] R₁₀和 R₁₁各自独立地是氢、卤素、C₁₋₆烷氧基、取代的 C₁₋₆烷氧基、-NR_aR_b或 -OH；

[0389] R_a和 R_b各自独立地是氢、C₁₋₆烷基、取代的 C₁₋₆烷基、-C(O)R_d、C₆₋₁₀芳基；

[0390] R_c各自独立地是氢、磷酸酯、二磷酸酯、三磷酸酯、C₁₋₆烷基或取代的 C₁₋₆烷基；

[0391] R_d各自独立地是氢、卤素、C₁₋₆烷基、取代的 C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、取代的 C₁₋₆烷氧基、-NH₂、-NH(C₁₋₆烷基)、-NH(取代的 C₁₋₆烷基)、-N(C₁₋₆烷基)₂、-N(取代的 C₁₋₆烷基)₂、C₆₋₁₀芳基或杂环基；

[0392] R_e各自独立地是氢、C₁₋₆烷基、取代的 C₁₋₆烷基、C₆₋₁₀芳基、取代的 C₆₋₁₀芳基、杂环基或取代的杂环基；

[0393] R_f各自独立地是氢、C₁₋₆烷基、取代的 C₁₋₆烷基、-C(O)R_d、磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯基；

[0394] n 各自独立地是 0、1、2 或 3；

[0395] p 各自独立地是 0、1 或 2；或者

[0396] 或 (g) (a)-(f) 中任一项的药学上可接受的盐，(a)-(f) 中任一项的互变异构体，或互变异构体的药学上可接受的盐。

[0397] • 洛索立宾 (Loxoribine) (7-烯丙基-8-氧代鸟苷) (99)。

[0398] • 参考文献 100 所述化合物，包括：酰基哌嗪化合物、吡啶二酮化合物、四氢异喹啉 (THIQ) 化合物、苯并环二酮化合物、氨基氮乙基化合物、氨基苯并咪唑喹啉酮 (ABIQ) 化合物 (101, 102)，水合邻苯二甲酰亚胺 (hydraphtalamide) 化合物、苯并苯基酮化合物、异喹啉化合物、固醇化合物、喹唑啉酮 (quinazolinone) 化合物、吡咯化合物 (103)、葱醌化合物、喹啉化合物、三嗪化合物、吡啶嘧啶化合物和吡啶化合物 (104)。

[0399] • 参考文献 105 所述化合物。

[0400] • 氨烷基氨基葡萄糖苷磷酸衍生物，如 RC-529 (106, 107)。

[0401] • 磷腈，如例如参考文献 108 和 109 中所述的聚 [二 (羧基苯氧基) 磷腈] (poly[di(carboxylatophenoxy)phosphazene]) (“PCPP”)。

[0402] • 小分子免疫增强剂 (SMIP)，例如：

[0403] N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；

[0404] N2,N2-二甲基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；

[0405] N2-乙基-N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；

[0406] N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-N2-丙基-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；

[0407] 1-(2-甲基丙基)-N2-丙基-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；

[0408] N2-丁基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；

[0409] N2-丁基-N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；

[0410] N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-N2-戊基-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；

[0411] N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-N2-丙-2-烯基-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；

[0412] 1-(2-甲基丙基)-2-[(苯基甲基)硫]-1H-咪唑并 [4,5-c] 喹啉-4-胺；

- [0413] 1-(2-甲基丙基)-2-(丙硫基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-4-胺；
- [0414] 2-[[4-氨基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2-基](甲基)氨基]乙醇；
- [0415] 2-[[4-氨基-1-(2-甲基丙基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2-基](甲基)氨基]乙酸乙酯；
- [0416] 4-氨基-1-(2-甲基丙基)-1,3-二氢-2H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2-酮；
- [0417] N2-丁基-1-(2-甲基丙基)-N4,N4-双(苯基甲基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；
- [0418] N2-丁基-N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-N4,N4-双(苯基甲基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；
- [0419] N2-甲基-1-(2-甲基丙基)-N4,N4-双(苯基甲基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；
- [0420] N2,N2-二甲基-1-(2-甲基丙基)-N4,N4-双(苯基甲基)-1H-咪唑并 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺；
- [0421] 1-[4-氨基-2-[甲基(丙基)氨基]-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-1-基]-2-甲基丙-2-醇；
- [0422] 1-[4-氨基-2-(丙基氨基)-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-1-基]-2-甲基丙-2-醇；
- [0423] N4,N4-二苄基-1-(2-甲氧基-2-甲基丙基)-N2-丙基-1H-咪唑 [4,5-c] 喹啉-2,4-二胺。

[0424] 用于本发明的细胞因子诱导剂可以是 T₀₁₁ 样受体 (TLR) 的调节剂和 / 或激动剂。例如,它们可以是人 TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8 和 / 或 TLR9 蛋白中一种或多种的激动剂。优选的试剂为 TLR4 (如源自肠细菌脂多糖的改良的天然脂质 As、磷脂化合物如合成磷脂二聚体, E6020)、TLR7 (如苯并萘啶、咪唑喹啉) 和 / 或 TLR9 (CpG 寡核苷酸) 的激动剂。这些药剂可用于激活先天性免疫途径。

[0425] 可以在本发明组合物生产过程的各个阶段加入细胞因子诱导剂。例如,它可位于抗原组合物内,然后将该混合物加入到水包油乳液中。或者,它可位于水包油乳液中,在这种情况下,可将试剂在乳化之前加入乳液组分,或者可以在乳化之后加入乳液中。类似地,试剂可以凝聚在乳液滴中。细胞因子诱导剂在最终组合物中的位置和分布将取决于其亲水 / 亲脂特性,例如该药剂可位于水相、油相和 / 或油水界面上。

[0426] 该细胞因子诱导剂可偶联于另一种药剂,如抗原 (如 CRM197)。参考文献 110 中提供了有关小分子偶联技术的综述。作为替代,佐剂可与其它药剂非共价结合,例如通过疏水作用或离子相互作用。

[0427] 优选的细胞因子诱导剂是 (a) 苯并萘啶 (benzophenanthridine) 化合物; (b) 免疫刺激性寡核苷酸和 (c) 3dMPL。

[0428] 免疫刺激性寡核苷酸可包含核苷酸修饰 / 类似物如硫代磷酸修饰,可以是双链或 (除 RNA 外) 单链。参考文献 111、112 和 113 公开了可能的类似物取代,例如用 2'-脱氧-7-脱氮鸟苷取代鸟苷。参考文献 114-119 中进一步讨论了 CpG 寡核苷酸的佐剂作用。CpG 序列可导向 TLR9,例如基序 GTCGTT 或 TTCGTT (120)。CpG 序列可特异性诱导 Th1 免疫应答,例如 CpG-A ODN (寡脱氧核苷酸),或更特异地诱导 B 细胞应答,例如 CpG-B ODN。参

考文献 121-123 中讨论了 CpG-A 和 CpG-B ODN。优选 CpG 为 CpG-A ODN。CpG 寡核苷酸优选构建成 5' 末端可被受体识别。任选将两个 CpG 寡核苷酸序列的 3' 端相连接形成“免疫聚体”。参见例如,参考文献 120 和 124-126。有用的 CpG 佐剂是 CpG7909,也称为 PROMUNE (TM) (科雷制药集团公司 (Coley Pharmaceutical Group, Inc.))。

[0429] 作为使用 CpG 序列的替代或除此之外,可使用 TpG 序列 (127)。这些寡核苷酸可不含未甲基化的 CpG 基序。

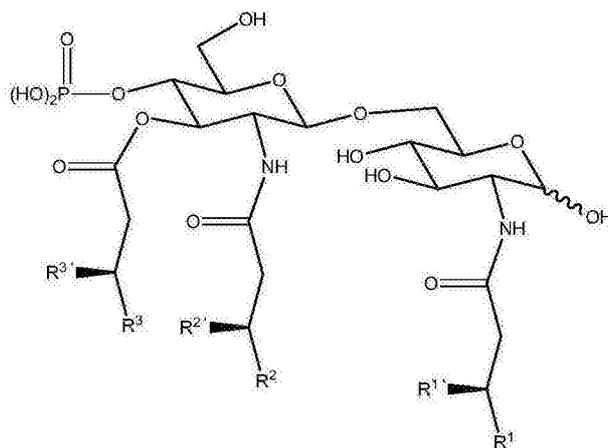
[0430] 免疫刺激性寡核苷酸可能富含嘧啶。例如,其可包含一个以上连续的胸腺嘧啶核苷酸 (例如参考文献 127 公开的 TTTT) 且 / 或其核苷酸组成中可具有 >25% 的胸腺嘧啶 (例如, >35%、>40%、>50%、>60%、>80% 等)。例如,它可能含有一个以上连续的胞嘧啶核苷酸 (例如,参考文献 127 所公开的 CCCC), 和 / 或它的核苷酸组成中可能含有 >25% 胞嘧啶 (例如 >35%、>40%、>50%、>60%、>80% 等)。这些寡核苷酸可不含未甲基化的 CpG 基序。

[0431] 免疫刺激性寡核苷酸通常包含至少 20 个核苷酸。其可包含少于 100 个核苷酸。

[0432] 3dMPL (也称为 3 脱 -O- 酰化单磷酸脂质 A 或 3-O- 脱酰化 4' - 单磷酸脂质 A) 是单磷酸脂质 A 的还原性末端葡萄糖胺的 3 位脱酰化的佐剂。3dMPL 可由明尼苏达沙门菌 (*Salmonella minnesota*) 的无庚糖突变体制备,在化学上类似于脂质 A,但缺少酸不稳定性磷酸基和碱不稳定性酰基。它能激活单核细胞 / 巨噬细胞谱系的细胞,并刺激释放数种细胞因子,包括 IL-1、IL-12、TNF- α 和 GM-CSF (也参见参考文献 128)。参考文献 129 最先描述了 3dMPL 的制备。

[0433] 3dMPL 可以取酰基化不同的相关分子 (如具有 3、4、5 或 6 个酰基链,它们的长度可以不同) 的混合物的形式。两个葡萄糖胺 (也称为 2- 脱氧 -2- 氨基 - 葡萄糖) 单糖在其 2- 位 (即 2 和 2' 位) 碳上 N- 酰基化,3' 位上也有 O- 酰基化。连接于 C2 的基团具有下式: $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^1\text{R}^{1'}$ 。连接于 C2' 的基团具有下式: $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^2\text{R}^{2'}$ 。连接于 C3' 的基团具有下式: $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^3\text{R}^{3'}$ 。代表性结构为:

[0434]



[0435] 基团 R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地是 $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ 。n 值优选为 8-16,更优选为 9-12,最优选为 10。

[0436] 基团 $\text{R}^{1'}$ 、 $\text{R}^{2'}$ 和 $\text{R}^{3'}$ 各自独立地是:(a) -H; (b) -OH; 或 (c) $-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^4$, 其中 R^4 是 -H 或 $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$, 其中 m 值优选为 8-16,更优选为 10、12 或 14。在 2 位上, m 优选为 14。在 2' 位上, m 优选为 10。在 3' 位上, m 优选为 12。因此基团 R^1 、 R^2 和 R^3 优选为来自十二烷

酸、十四烷酸或十六烷酸的 -O- 酰基。

[0437] R^1 、 R^2 和 R^3 均为 -H 时, 3dMPL 仅含有 3 条酰基链 (2、2' 和 3' 位上各有一条)。 R^1 、 R^2 和 R^3 中仅有两个是 -H 时, 3dMPL 可含有 4 条酰基链。 R^1 、 R^2 和 R^3 中仅有一个是 -H 时, 3dMPL 可含有 5 条酰基链。 R^1 、 R^2 和 R^3 中没有一个是 -H 时, 3dMPL 可含有 6 条酰基链。 本发明所用的 3dMPL 佐剂可以是含有 3-6 条酰基链的这些形式的混合物, 但混合物中优选包含具有 6 条酰基链的 3dMPL, 具体说, 保证 6 条酰基链的形式占 3dMPL 总重的至少 10%, 例如 >20%、>30%、>40%、>50% 或更多。 发现具有 6 条酰基链的 3dMPL 是佐剂活性最高的形式。

[0438] 因此, 本发明组合物包含的 3dMPL 的最优选形式具有下式 (IV)。

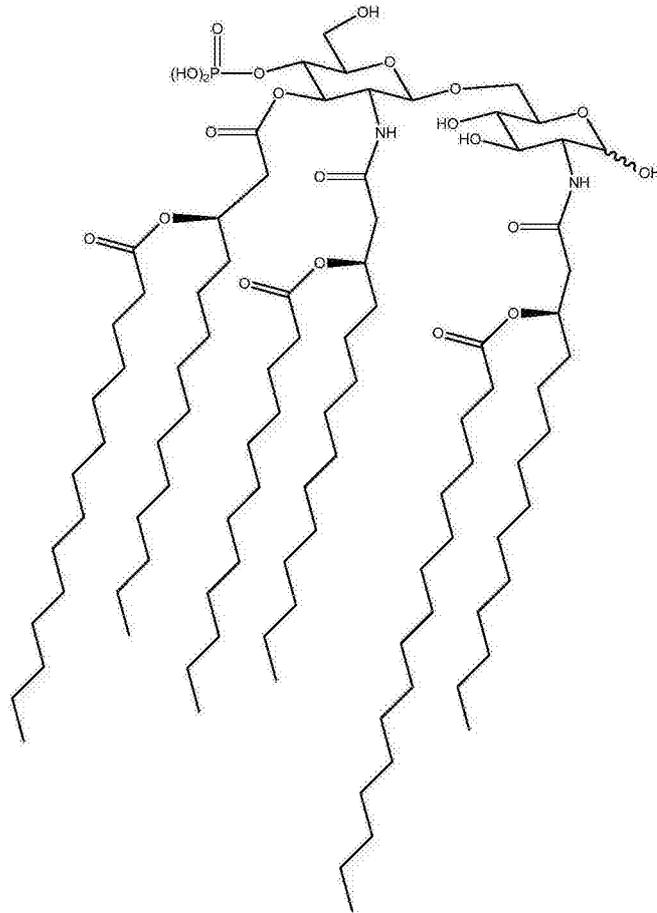
[0439] 以混合物的形式使用 3dMPL 时, 提到 3dMPL 在本发明组合物中的含量或浓度, 是指混合物中的混合 3dMPL 物质。

[0440] 在水性条件下, 3dMPL 可形成不同大小如直径 <150nm 或 >500nm 的胶束聚集体或颗粒。 这些中的一种或两种可用于本发明, 可通过常规试验选择较好的颗粒。 本发明优选使用较小的颗粒 (例如小到足以产生澄清的 3dMPL 水悬液), 因为其具有优良的活性 (130)。 优选颗粒的平均直径小于 220nm, 更优选小于 200nm 或小于 150nm 或小于 120nm, 甚至平均直径小于 100nm。 然而在大多数情况下, 所述平均直径不小于 50nm。 这些颗粒足够小, 以便适合过滤除菌。 可用揭示平均粒径的常规动态光散射技术评价粒径。 据称颗粒的直径为 x nm 时, 颗粒通常分布在此平均值附近, 但至少 50 数量% (例如 >60%、>70%、>80%、>90% 或更多) 颗粒的直径在 $x \pm 25\%$ 的范围内。

[0441] 3dMPL 宜与水包油乳液联用。 基本上所有 3dMPL 均位于该乳液的水相中。

[0442] 3dMPL 可以单独使用, 或者与一种或多种其它化合物联用。 例如, 已知将 3dMP 与以下物质联用: QS21 皂苷 (131) (包含在水包油乳液中 (132))、免疫刺激性寡核苷酸、QS21 和免疫刺激性寡核苷酸、磷酸铝 (133)、氢氧化铝 (134) 或磷酸铝和氢氧化铝。

[0443]



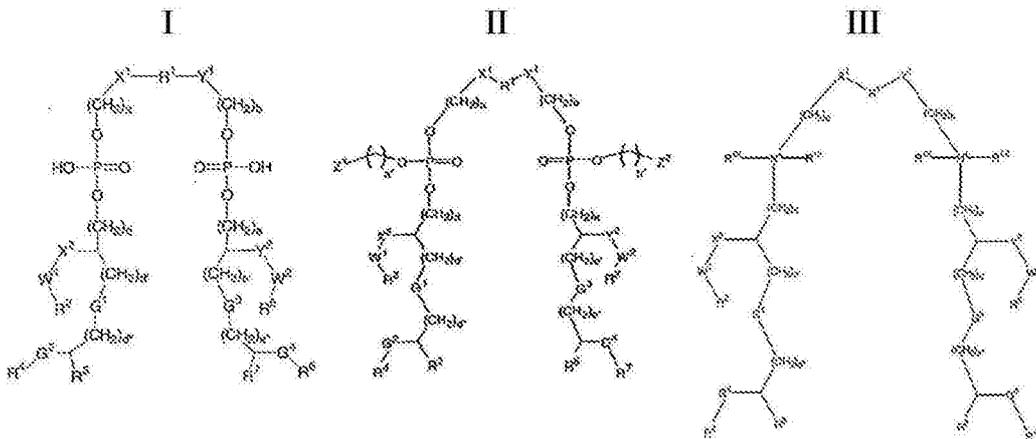
式(IV)

[0444] 脂肪佐剂

[0445] 本发明可使用的脂肪佐剂包括上述水包油乳液,还包括例如:

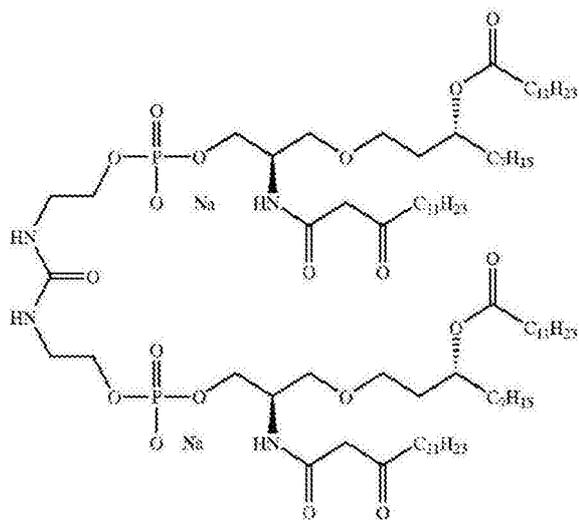
[0446] • 式 I、II 或 III 的磷脂化合物或其盐:

[0447]

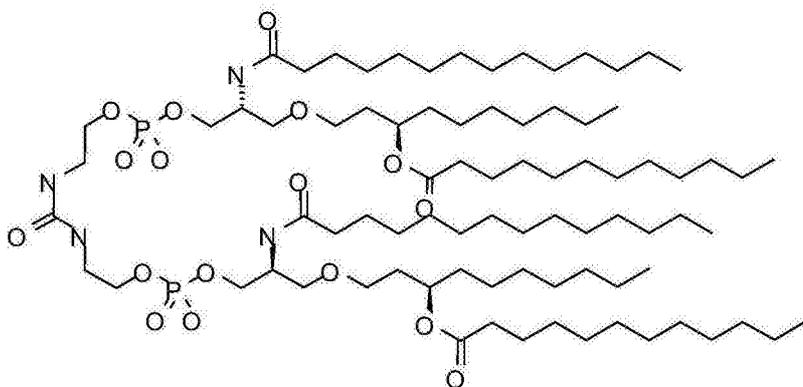


[0448] 如参考文献 135 所述,例如‘ER 803058’、‘ER 803732’、‘ER 804053’、ER 804058’、‘ER 804059’、‘ER 804442’、‘ER 804680’、‘ER 804764’、ER 803022 或 ‘ER 804057’,如:

[0449]



ER804057



ER-803022.

[0450] ER804057 还称为 E6020。式 I、II 或 III 的磷脂化合物或其盐可单独使用,或者与一种或多种其它化合物联用。例如,式 I、II 或 III 的化合物可与水包油乳液或含矿物质的组合物联用。在具体的实施方式中, E6020 与水包油乳液(如角鲨烯-水乳液如 MF59)或含矿物质的组合物(如无机盐如铝盐或钙盐)联用。

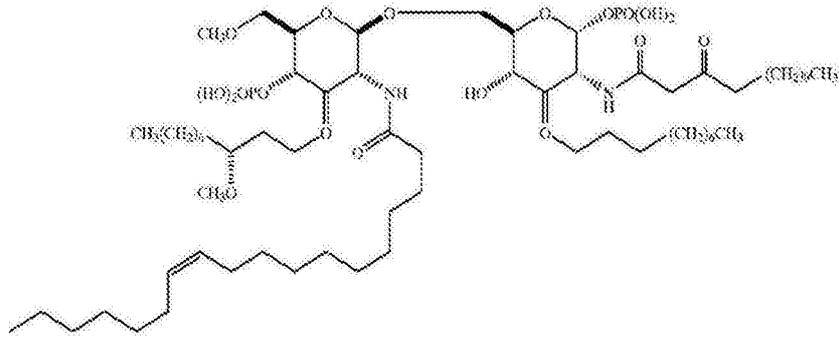
[0451] • 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 如 OM-174 的脂质 A 的衍生物(如参考文献 136 和 137 所述)。

[0452] • 阳离子脂质与(通常为中性)共脂质 (co-lipid), 如氨基丙基-二甲基-肉豆蔻烯酰氧基-溴化丙铵-二植酰基磷脂酰-乙醇胺("VAXFECTIN(TM)") 或氨基丙基-二甲基-双十二烷基氧基-溴化丙铵-二油酰基磷脂酰-乙醇胺("GAP-DLRIE:DOPE") 的制剂。优选含有 (+)-N-(3-氨基丙基)-N,N-二甲基-2,3-双(顺-9-四癸烯氧基)-1-丙铵盐的制剂 (138)。

[0453] • 3-O-脱酰化单磷酸脂质 A(见上)。

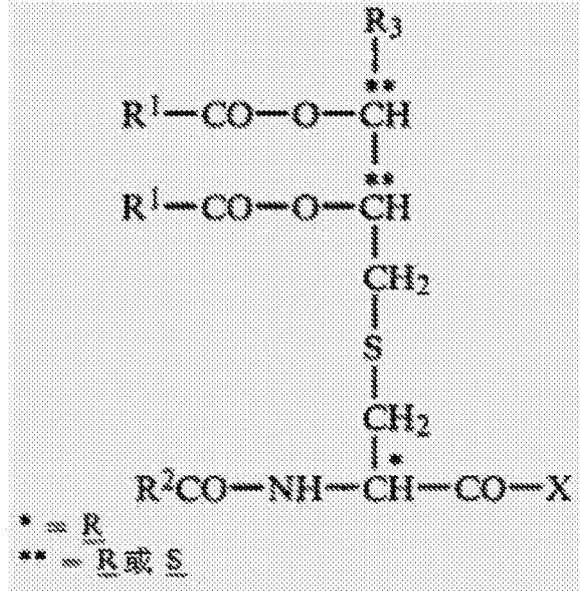
[0454] • 含有连接于含磷酸无环主链的脂质的化合物, 如 TLR4 拮抗剂 E5564 (139, 140) :

[0455]



[0456] •脂肽（即含一种或多种脂肪酸残基和两种或更多氨基酸残基的化合物），如基于甘油半胱氨酸的脂肽。该肽的特定例子包括具有下式的化合物

[0457]

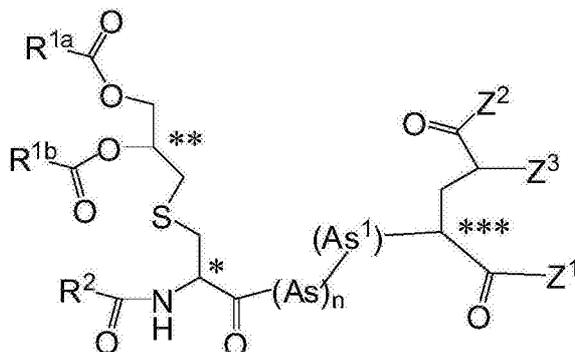


[0458] 其中 R¹和 R²各代表具有 8-30, 优选 11-21 个碳原子的饱和或不饱和, 脂族或混合的脂族 - 脂环族烃基, 其也任选地由氧功能团取代, R³代表氢或基团 R₁-CO-O-CH₂-, 其中 R¹与上述相同, 且 X 代表肽键结合的氨基酸, 其含游离、酯化或酰胺化的羧基或末端羧基基团为游离、酯化或酰胺化的 2-10 个氨基酸的氨基酸序列。在某些实施方式中, 所述氨基酸序列含 D-氨基酸, 例如 D-谷氨酸 (D-Glu) 或 D-γ-羧基-谷氨酸 (D-Gla)。

[0459] 细菌脂肽通常识别 TLR2, 不需要 TLR6 参与。(TLR 协同操作以提供各种激发的特异识别, TLR2 和 TLR6 一起识别肽聚糖, 而 TLR2 识别脂肽但不需要 TLR6。) 这些有时分类为天然脂肽和合成脂肽。合成脂肽往往表现相似, 且主要被 TLR2 识别。

[0460] 适合用作佐剂的脂肽包括具有下式的化合物:

[0461]



[0462] 其中 * 标记的手性中心和 *** 标记的都在 R 构型中；

[0463] ** 标记的手性中心在 R 或 S 构型中；

[0464] R^{1a}和 R^{1b}各自独立为具有 7-21 个碳原子的脂族或脂环族 - 脂族烷基基团, 任选由氧功能团取代, 或者 R^{1a}和 R^{1b}之一但非全部是 H；

[0465] R²是具有 1-21 个碳原子的脂族或脂环族烷基基团且任选由氧功能团取代；

[0466] n 是 0 或 1；

[0467] As 代表 -O-Kw-CO- 或 -NH-Kw-CO-, 其中 Kw 是具有 1-12 碳原子的脂族烷基基团。

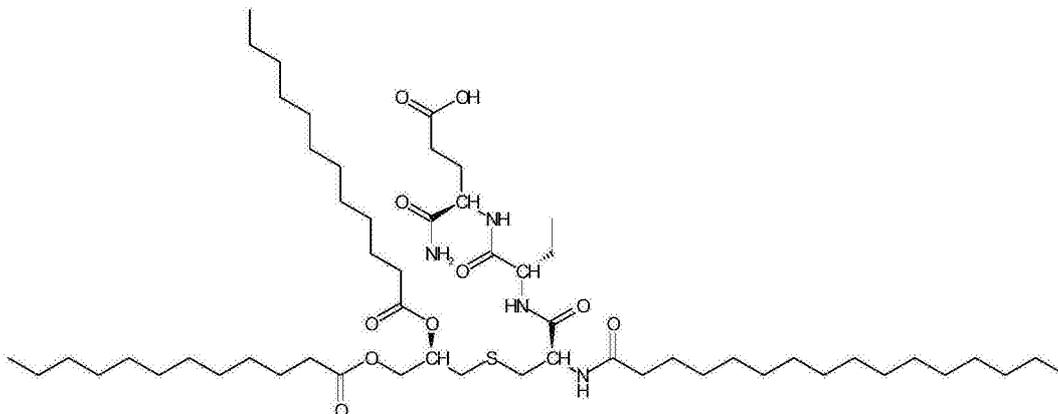
[0468] As¹是 D- 或 L- α -氨基酸；

[0469] Z¹和 Z²各自独立代表 -OH 或者氨基-(低级烷基)-磺酸的 D- 或 L- α -氨基酸 N 末端基团或选自 D- 和 L- α -氨基酸和氨基-低级烷基-磺酸的至多 6 氨基酸的肽的 N 末端基团；和

[0470] Z³为 H 或 -CO-Z⁴, 其中 Z⁴为 -OH 或者氨基-(低级烷基)-磺酸的 D- 或 L- α -氨基酸 N 末端基团或选自 D- 和 L- α -氨基酸和氨基-低级烷基-磺酸的至多 6 氨基酸的肽的 N 末端基团；或从所述化合物的羧酸形成的酯或酰胺。合适的酰胺包含 -NH₂和 NH(低级烷基), 合适的酯包含 C1-C4 烷基酯。(本文所用的低级烷基或低级烷基指 C₁-C₆直连或支链烷基)。

[0471] 所述化合物在 US 4, 666, 886 中更详细描述。在一个具体实施方式中, 所述脂肽具有式：

[0472]



[0473] 脂肽种类的另一示例称为 LP40, 且其是 TLR2 的激动剂。Akdis 等, Eur. J. Immunology, 33:2717-26 (2003)。

[0474] 这些涉及来自大肠杆菌的已知脂肽种类, 称为胞壁质脂肽。这些蛋白的某些部

分降解产物称为胞壁质脂肽，描述于 Hantke 等，Eur. J. Biochem., 34:284-296(1973)。这些包含连接 N-乙酰胞壁酸的肽且因此涉及胞壁酰肽，描述于 Baschang 等，Tetrahedron, 45(20):6331-6360(1989)。

[0475] 铝盐佐剂

[0476] 可采用称为“氢氧化铝”和“磷酸铝”的佐剂。这些名称是常规名称，但仅为方便使用，因为它们都不是所存在的实际化合物的准确描述（例如参见参考文献 74 的第 9 章）。本发明可采用通常用作佐剂的任何“氢氧化物”或“磷酸盐”佐剂。

[0477] 称为“氢氧化铝”的佐剂一般是羟基氧化铝盐，其通常至少部分为晶体。羟基氧化铝以分子式 $AlO(OH)$ 表示，与其它铝化合物例如氢氧化铝 $Al(OH)_3$ 的区别在于红外 (IR) 光谱，特别是在 1070cm^{-1} 处存在吸收带和在 $3090-3100\text{cm}^{-1}$ 处存在强烈的肩峰（参考文献 74 的第 9 章）。半峰高处衍射带的宽度 (WHH) 反映了氢氧化铝佐剂的结晶程度，结晶不佳的颗粒因晶体尺寸较小而显示更强的谱线增宽。表面积随 WHH 的增加而增加，WHH 值较大的佐剂显示吸附抗原的能力较强。氢氧化铝佐剂呈典型的纤维形态（例如，由电子透射显微照片所见）。氢氧化铝佐剂的 pI 通常约 11，即在生理 pH 下佐剂本身具有表面正电荷。据报道，pH 7.4 时，氢氧化铝佐剂的吸附容量为每 mg Al^{+++} 1.8-2.6mg 蛋白质。

[0478] 称为“磷酸铝”的佐剂一般是羟基磷酸铝，也常常含有少量硫酸盐（即羟基磷酸硫酸铝）。可通过沉淀获得这些佐剂，沉淀期间的反应条件和浓度影响磷酸根取代所述盐中羟基的程度。羟基磷酸盐中 PO_4/Al 摩尔比通常为 0.3-1.2。羟基磷酸盐因存在羟基而有别于严格的 $AlPO_4$ 。例如， 3164cm^{-1} 的 IR 光谱带（例如，当加热至 200°C 时）表明存在结构性羟基（参考文献 74 的第 9 章）。

[0479] 磷酸铝佐剂的 PO_4/Al^{3+} 摩尔比通常为 0.3-1.2，优选为 0.8-1.2，更优选为 0.95 ± 0.1 。磷酸铝通常是无定形的，尤其是羟基磷酸盐。典型的佐剂是 PO_4/Al 摩尔比为 0.84-0.92 的无定形的羟基磷酸铝，包含 $0.6\text{mg } Al^{3+}/\text{ml}$ 。磷酸铝通常是颗粒（如在透射电子显微镜照片上观察到的板状形态）。抗原吸附后颗粒直径一般是 $0.5-20\ \mu\text{m}$ （如约 $5-10\ \mu\text{m}$ ）。据报道，pH 7.4 时磷酸铝佐剂的吸附容量为 0.7-1.5 毫克蛋白质 / 毫克 Al^{+++} 。

[0480] 磷酸铝的零电点 (PZC) 与磷酸对羟基的取代程度逆相关，这种取代程度的变化可能取决于用于沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度。也通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度（更多磷酸根 = 更多酸性 PZC）或加入缓冲剂如组氨酸缓冲剂（使 PZC 碱性更强）改变 PZC。本发明所用的磷酸铝的 PZC 通常为 4.0-7.0，更优选为 5.0-6.5，例如约为 5.7。

[0481] 用于制备本发明组合物的铝盐悬浮液可以，但不一定含有缓冲液（如磷酸盐或组氨酸或 Tris 缓冲液）。该悬浮液优选无菌且无热原。悬浮液可含有游离的水性磷酸根离子，如存在浓度为 1.0-20mM，优选 5-15mM，更优选约 10mM。该悬浮液也可含有氯化钠。

[0482] 本发明可使用氢氧化铝和磷酸铝的混合物。在这种情况下，磷酸铝多于氢氧化铝，例如重量比为至少 2:1，例如，>5:1、>6:1、>7:1、>8:1、>9:1 等。

[0483] 给予患者的组合物中 Al^{+++} 的浓度优选小于 $10\text{mg}/\text{ml}$ ，例如 <5mg/ml、<4mg/ml、<3mg/ml、<2mg/ml、<1mg/ml 等。优选范围是 0.3-1mg/ml。优选最大值是 0.85mg/剂。

[0484] 除包含一种或多种铝盐佐剂外，佐剂组分还可包含一种或多种其它佐剂或免疫刺激剂。其它这类组分包括但不限于：苯并萘啶化合物，3-O-脱酰化单磷酰脂质 A 佐剂（'3d-MPL'）；和 / 或水包油乳液。3dMPL 也称为 3 脱 -O- 酰化单磷酰脂质 A 或 3-O- 脱酰化

4'-单磷酸脂质 A。该命名表明单磷酸脂质 A 的还原性末端葡萄糖胺的 3 位脱酰化。它是由明尼苏达沙门菌 (*S. minnesota*) 的无庚糖突变体制备,在化学上类似于脂质 A,但缺少酸不稳定性磷酸基和碱不稳定性酰基。它能激活单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞,并刺激释放数种细胞因子,包括 IL-1、IL-12、TNF- α 和 GM-CSF。最初在参考文献 129 中描述了 3d-MPL 的制备,该产品由科雷莎公司 (Corixa Corporation) 生产并以商品名 MPL(TM) 出售。其它详情可参见参考文献 82-85。

[0485] 特别是在儿童中,使用氢氧化铝和/或磷酸铝佐剂有效,且抗原通常吸附于这些盐。也优选水包角鲨烯乳液,特别是在老年人中。有用的佐剂组合包括 Th1 和 Th2 佐剂的组合,如 CpG 和明矾或雷西莫特和明矾。可以使用磷酸铝和 3dMPL 的组合。其他可用的组合包括:明矾和苯并萘啶化合物或 SMIP、水包角鲨烯乳液(如 MF59)和苯并萘啶化合物或 SMIP 以及 E6020 和水包角鲨烯乳液(如 MF59)或明矾。

[0486] 本发明组合可引起细胞介导的免疫应答以及体液免疫应答。

[0487] 通常认为两种 T 细胞类型 CD4 和 CD8 细胞是启动和/或增强细胞介导免疫和体液免疫所必需的。CD8 T 细胞可表达 CD8 共受体,通常称为细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)。CD8 T 细胞能够识别 MHC I 型分子上展示的抗原或与之相互作用。

[0488] CD4 T 细胞可表达 CD4 共受体,通常称为 T 辅助细胞。CD4 T 细胞能够识别结合于 MHC II 型分子的抗原性肽。与 MHC II 型分子相互作用时,CD4 细胞可分泌诸如细胞因子等因子。这些分泌的细胞因子可激活 B 细胞、细胞毒性 T 细胞、巨噬细胞和参与免疫应答的其它细胞。辅助 T 细胞或 CD4+ 细胞可进一步分成两个功能不同的亚组:即细胞因子和效应功能不同的 TH1 表型和 TH2 表型。

[0489] 活化的 TH1 细胞能增强细胞免疫(包括抗原特异性 CTL 生成增加),因而对响应胞内感染具有特定价值。活化的 TH1 细胞可分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- β 中的一种或多种。TH1 免疫应答可通过激活巨噬细胞、NK(自然杀伤)细胞和 CD8 细胞毒性 T 细胞 (CTL) 导致局部炎症反应。通过用 IL-12 刺激 B 和 T 细胞的生长,TH1 免疫应答也可用于放大免疫应答。TH1 刺激的 B 细胞可分泌 IgG2a。

[0490] 活化的 TH2 细胞提高抗体产量,因此对响应胞外感染具有价值。活化的 TH2 细胞可分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 中的一种或多种。TH2 免疫应答可引起生成 IgG1、IgE、IgA 和用于未来保护的记忆 B 细胞。

[0491] 增强的免疫应答可包括增强的 TH1 免疫应答和 TH2 免疫应答中的一种或多种。

[0492] TH1 免疫应答可包括一种或多种的 CTL 增加,与 TH1 免疫应答相关的一种或多种细胞因子(如 IL-2、IFN γ 和 TNF- β) 增加,活化巨噬细胞增加,NK 活性增加,或者 IgG2a 产量增加。增强的 TH1 免疫应答优选包括 IgG2a 生成增加。

[0493] 可使用 TH1 佐剂引发 TH1 免疫应答。相对于不用佐剂的抗原免疫,TH1 佐剂通常引起 IgG2a 生成水平增加。适用于本发明的 TH1 佐剂可包括例如,皂苷制剂、病毒体和病毒样颗粒、肠细菌脂多糖 (LPS) 的无毒衍生物、免疫刺激性寡核苷酸。免疫刺激性寡核苷酸,如含有 CpG 基序的寡核苷酸是本发明所用的优选 TH1 佐剂。

[0494] TH2 免疫应答可包括以下一种或多种:与 TH2 免疫应答相关的一种或多种细胞因子(如 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10) 增加,或者 IgG1、IgE、IgA 和记忆 B 细胞生成增加。增强的 TH2 免疫应答优选包括 IgG1 产量增加。

[0495] 可使用 TH2 佐剂引发 TH2 免疫应答。相对于不用佐剂的抗原免疫, TH2 佐剂通常引起 IgG1 生成水平增加。适用于本发明的 TH2 佐剂包括例如, 含矿物质组合物、油乳剂和 ADP-核糖基化毒素和其脱毒衍生物。含矿物质组合物如铝盐是本发明使用的优选 TH2 佐剂。

[0496] 组合物可包括 TH1 佐剂和 TH2 佐剂的组合。这种组合物优选引起增强的 TH1 和增强的 TH2 应答, 即 IgG1 和 IgG2a 的生成相对于不用佐剂的免疫均有增加。更优选地, 相对于用单一佐剂的免疫(即, 相对于只用 TH1 佐剂的免疫或只用 TH2 佐剂的免疫), 包含 TH1 和 TH2 佐剂组合的组合物引起 TH1 和 / 或 TH2 免疫应答增强。

[0497] 所述免疫应答可以是 TH1 免疫应答和 TH2 免疫应答之一或两种。免疫应答优选提供增强的 TH1 应答和增强的 TH2 应答之一或两种。

[0498] 增强的免疫应答可以是全身免疫应答和粘膜免疫应答之一或两种。该免疫应答优选提供增强的全身免疫应答和增强的粘膜免疫应答之一或两种。优选粘膜免疫应答为 TH2 免疫应答。粘膜免疫应答优选包括 IgA 生成增加。

[0499] 治疗方法和给药

[0500] 本发明组合物适合给予哺乳动物, 且本发明提供了在哺乳动物中诱导免疫应答的方法, 所述方法包括将本发明组合物(如免疫原性组合物)给予哺乳动物的步骤。所述组合物(如免疫原性组合物)可用于生成疫苗制剂以免疫哺乳动物。所述哺乳动物一般是人, 且所述 RSV F 蛋白胞外域一般是人 RSV F 蛋白胞外域。然而, 所述哺乳动物可为任何其他易于感染 RSV 的哺乳动物, 如可感染牛 RSV 的牛。例如, 所述免疫应答可在给予纯 RSV F 蛋白、 α 病毒颗粒或自复制 RNA 后产生。

[0501] 本发明还提供本发明组合物用作药物, 例如用于免疫患者抵御 RSV 感染。

[0502] 本发明还提供上述多肽在生产引起患者免疫应答的药物中的应用。

[0503] 这些方法和应用引起的免疫应答通常包括抗体应答, 优选保护性抗体应答。评价 RSV 疫苗免疫后抗体应答的方法为本领域熟知。

[0504] 本发明的组合物可以多种合适方式给予, 如肌肉内注射(如入臂或腿中)、皮下注射、鼻内给药、口服给药、皮内给药、经皮给药、透皮给药等。给药的合适途径取决于所述动物的年龄、健康和其他特征。临床医生能基于这些和其他因素确定给药的合适途径。

[0505] 免疫原组合物和疫苗制剂可用于治疗儿童和成年人, 包括孕妇。因此, 对象可小于 1 岁、1-5 岁、5-15 岁、15-55 岁或至少 55 岁。接受所述疫苗的优选对象为老年人(如 >50 岁、>60 岁且优选 >65 岁)、年轻人(如 <6 岁, 如 4-6 岁、<5 岁)和孕妇。然而所述疫苗不仅适用于这些人群, 还可用于更广泛的人群。

[0506] 可通过单剂量方案或多剂量方案进行治疗。多剂量可用于初免方案和 / 或加强免疫方案。在多剂量方案中, 可通过相同或不同的途径如胃肠道外初次和粘膜加强、粘膜初次和胃肠道外加强等给予各剂量。对于首次免疫患者, 给予一个以上的剂量(一般是两个剂量)特别有效。一般以至少 1 周(例如约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 6 周、约 8 周、约 10 周、约 12 周、约 16 周等)的间隔给予多个剂量。

[0507] 可在与其它疫苗基本相同的时间(例如在向医疗保健专业人员或疫苗接种中心的同一次医疗咨询或就诊期间), 将用本发明组合物生产的疫苗制剂给予患者。

[0508] 本发明其它方面

[0509] 本发明还提供了含第一结构域和第二结构域的多肽（如重组多肽），其中 (i) 所述第一结构域含完整或部分 RSV F 糖蛋白胞外域，和 (ii) 所述第二结构域含异源寡聚化结构域。其它详情如上所述。如果所述寡聚化结构域含七残基序列（如上述来自 GCN 的序列），则其优选在具有所述胞外域 HR2 序列（如果有）的七残基重复相中。

[0510] 本发明还提供编码该多肽的核酸（如 DNA）。本发明还提供包含所述核酸的载体和包含所述载体的宿主细胞。所述载体可用于例如重组表达目的、核酸免疫等。

[0511] 本发明还提供含包含 RSV F 糖蛋白胞外域的分子的组合物，其中所述分子至少 50%（如 50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% 或 100%）的胞外域存在于融合前构型中。

[0512] 其他病毒

[0513] 除了使用人 RSV，本发明还可使用肺炎病毒 (Pneumoviridae) 和副粘病毒 (Paramyxoviridae) 的其他成员，包括但不限于牛呼吸道合胞病毒 (RSV)、副流感病毒 1、副流感病毒 2、副流感病毒 3 和副流感病毒 5。

[0514] 因此，本发明提供含来自肺炎病毒或副粘病毒的 F 糖蛋白的免疫原性组合物，其中所述 F 糖蛋白在融合前构型中。

[0515] 本发明还提供含多肽的免疫原性组合物，所述多肽展示的表位存在于肺炎病毒或副粘病毒的 F 糖蛋白的融合前构型，但在所述糖蛋白的融合后构型中缺失。

[0516] 本发明还提供了含第一结构域和第二结构域的多肽，其中 (i) 所述第一结构域含完整或部分肺炎病毒或副粘病毒的 F 糖蛋白胞外域，和 (ii) 所述第二结构域含异源寡聚化结构域。

[0517] 本发明还提供这些多肽和组合物用于免疫接种等。

[0518] 本发明还提供含包含 RSV F 糖蛋白胞外域的分子的组合物，其中所述分子至少 50%（如 50%、60%、70%、80%、85%、90%、95% 或 100%）的胞外域存在于融合前或中间构型中。

[0519] RSV F 蛋白胞外域多肽

[0520] 本发明的一些实施方式中使用或包括具体 RSV F 蛋白胞外域多肽。一些所述具体的 RSV F 蛋白胞外域多肽在约 100 位 - 约 161 位含改变的氨基酸序列。数种具体的 RSV F 蛋白胞外域多肽的 100 位 - 150 位的氨基酸序列示于图 1C。本文提供数种具体的 RSV F 蛋白胞外域多肽的氨基酸序列，如实施例 1。

[0521] 概述

[0522] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由...组成”和“主要由...组成”，例如，“包含”X 的组合物可以仅由 X 组成或可以包括其它物质，例如 X+Y。

[0523] 术语“基本上”不排除“完全”，如“基本上不含”Y 的组合物可能完全不含 Y。必要时，术语“基本上”可从本发明定义中省略。

[0524] 与数值 x 相关的术语“约”表示例如， $x \pm 10\%$ 。

[0525] 除非另有说明，包括混合两种或多种组分的步骤的过程不要求任何特定的混合顺序。因此，组分可以任何顺序混合。在有三种组分时，可将两种组分相互合并，然后可将合并物再与第三种组分混合等。

[0526] 将动物（具体是牛）材料用于培养细胞时，其应获自未患传染性海绵状脑病

(TSE), 具体是未患牛海绵状脑病 (BSE) 的来源。总之, 优选在完全不含动物来源材料的情况下培养细胞。

[0527] 在将化合物作为组合物的一部分给予机体时, 该化合物可另外由合适的前药替代。

[0528] 当细胞底物用于重组或反向遗传学方法时, 优选批准用于人类疫苗生产的细胞底物, 例如 Ph Eur (《欧洲药典》) 总纲 5.2.3 所述的细胞底物。

[0529] 优选通过 MPSRCH 程序 (牛津分子科技公司 (Oxford Molecular)) 执行的 Smith-Waterman 同源性搜索算法, 利用仿射缺口搜索测定多肽序列之间的相同性, 其中参数为缺口开放罚分 = 12、缺口延伸罚分 = 1。

[0530] 表 1. 磷脂

[0531]

DDPC	1,2-二癸酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DEPA	1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷酸盐
DEPC	1,2-芥酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DEPE	1,2-二芥酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DEPG	1,2-二芥酰-sn-甘油-3-[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DLOPC	1,2-亚麻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DLPA	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸盐
DLPC	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DLPE	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DLPG	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DLPS	1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸
DMG	1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DMPA	1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸盐
DMPC	1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

[0532]

DMPE	1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DMPG	1,2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DMPS	1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸
DOPA	1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸盐
DOPC	1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DOPE	1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DOPG	1,2-二油酰-sn-甘油-3-[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DOPS	1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸
DPPA	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸盐
DPPC	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DPPE	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DPPG	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DPPS	1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸
DPyPE	1,2-二植烷酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DSPA	1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸盐
DSPC	1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
DSPE	1,2-二硬脂酰(Diostearpyl)-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
DSPG	1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-[磷脂酰-外消旋-(1-甘油...)]
DSPS	1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰丝氨酸
EPC	卵-PC
HEPC	氢化卵 PC
HSPC	高纯度氢化大豆 PC
HSPC	氢化大豆 PC
LYSOPC MYRISTIC	1-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
LYSOPC PALMITIC	1-棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
LYSOPC STEARIC	1-硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
乳鞘磷脂 MPPC	1-肉豆蔻酰,2-棕榈酰-sn-甘油 3-磷脂酰胆碱
MSPC	1-肉豆蔻酰,2-硬酯酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
PMPC	1-棕榈酰,2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

[0533]

POPC	1-棕榈酰,2-油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
POPE	1-棕榈酰,2-油酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺
POPG	1,2-二油酰-sn-甘油-3-[磷脂酰-外消旋-(1-甘油)...]
PSPC	1-棕榈酰,2-硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
SMPC	1-硬脂酰,2-肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
SOPC	1-硬脂酰,2-油酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱
SPPC	1-硬脂酰,2-棕榈酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱

实施例

[0534] 实施例 1-RSV F 多肽

[0535] 本实施例提供多种多肽例子（如含信号序列）的序列和可用于表达本发明 RSV F 多肽核酸序列的核酸序列。列出的氨基酸序列包括所述信号肽且含任选的 C 末端接头和 His 标记 (GGSAGSGHHHHH(SEQ ID NO:90))。在宿主细胞中生成这些多肽时,所述多肽通常被所述细胞加工以去除所述信号肽且如本文所述一些所述多肽会在例如未修饰的弗林蛋白酶切割位置被切割。本发明包括的组合物含本文所述所有形式的具体 RSV F 蛋白胞外域多肽,包括缺失所述信号肽的成熟形式、可切割为含 F₁和 F₂的亚基的形式以及缺失所述任选的 C 末端 His 标记的形式。以下实施例仅用于说明本发明的范围,因此并非旨在以任何方式限制该范围。

[0536] 野生型弗林蛋白酶切割的示例为 RSV F 野生型截短 HIS(SEQ ID NO:84)。

[0537] 可生产为单体的多肽示例包括:RSV F Furx(SEQ ID NO:45);RSV F 老 furx 截短 HIS(SEQ ID NO:88);RSV F Furx R113Q K123N K124N 截短 HIS(SEQ ID NO:89);RSV F delp21 furx 截短 HIS(SEQ ID NO:47);和 RSV F delP23 furx 截短 HIS(SEQ ID NO:48)。

[0538] 可生产为三聚体的多肽示例包括:RSV F N 末端弗林蛋白酶截短 HIS(SEQ ID NO:85);RSV F 融合缺失截短 HIS(SEQ ID NO:67);和 RSV F 融合缺失 2 截短 HIS(SEQ ID NO:68)。

[0539] 可生产为单体或三聚体的玫瑰花结的多肽示例包括:RSV F furmt 截短 HIS(SEQ ID NO:50);RSV F furdel 截短 HIS(SEQ ID NO:51);RSV F delP21 furdel 截短 HIS(SEQ ID NO:86);和 RSV F delP23 furdel 截短 HIS(SEQ ID NO:49), 和 RSV FXa 因子截短 HIS(SEQ ID NO:52)。

[0540] 可能产生玫瑰花结构成的野生型切割的示例为 RSV F C 末端弗林蛋白酶截短 HIS(SEQ ID NO:87)。

[0541] 全长

[0542] 下述多肽是全长 RSV F 多肽。

[0543]

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGONITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTL S KKRKRFLGF LLGVSASIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
 181 LSNGVSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPIVVKQ SCSISNIETV IEFQOKNNRL LEITREFSVN
 241 AGVTTVPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYV KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
 541 LIAVGLLLYC KARSTPVTL S KDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO: 21)

[0544] 下述核酸序列为上述多肽序列的优化编码序列。

[0545]

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCGGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCGAGCTG CCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCCGGGG
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC

[0546]

1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
 1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
 1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACTGAAG (SEQ ID NO: 22)

[0547] 全长 HIS

[0548] 下述多肽包括全长 RSV F 多肽, 然后是六组氨酸标记。

[0549]

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EPHYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNQSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVFNKQ SCSISNIETV IEFQOKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTPPVSTY MLTNSELLSL INDMPTINDQ KKLMSNNVQI VRQOSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFENSGCD YVSNKGVDTV SVGNLTLYVN KQEGKSPLYK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNSGGSAG SGHHHHHH (SEQ ID NO: 23)

```

[0550] 下述核酸序列为上述多肽序列的优化编码序列。

[0551]

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCAGC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT

```

[0552]

```

1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACAGCGGCGG CAGCGCCGGC
1741 TCTGGCCACC ACCACCATCA CCACTGAAG (SEQ ID NO: 24)

```

[0553] 全长前 HIS

[0554] 下述多肽包括全长 RSV F 多肽, GCN4 的三聚化结构域(下划线)连接所述 RSV F 多肽的 C 末端, 然后是六组氨酸标记。

[0555]

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRREFLG LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVVKQ SCSISNIETV IEFQQKNRNL LEITREFSVN
241 AGVTPPVSTY MLTNSELLSL INDMPIITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGRM KQIEDKIEEI LSKYHIENE
601 IARIKKLIGE SGGGAGSGHH HHHH (SEQ ID NO: 25)

```

[0556] 下述核酸序列为上述多肽序列的优化编码序列。

[0557]

```

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTTCGT CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC

```

[0558]

```

1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCCGGATG
1741 AAGCAGATCG AGGACAAGAT CGAGGAAATC CTGAGCAAGA TCTACCACAT CGAGAACGAG
1801 ATCGCCCGGA TCAAGAAGCT GATCGGCGAA AGCGGCGGCT CTGCCGGAAG CGGCCACCAC
1861 CACCATCACC ACTGAAG (SEQ ID NO: 26)

```

[0559] 全长前 HIS 2

[0560] 下述多肽包括全长 RSV F 多肽, GCN4 的三聚化结构域(下划线)连接所述 RSV F 多肽的 C 末端, 然后是六组氨酸标记。

[0561]

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQONITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPREMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGSG RMKQIEDKIE EILSKIYHIE
601 NEIARIKKLI GESGGSAGSG HHHHHH (SEQ ID NO: 27)

```

[0562] 下述核酸序列为上述多肽序列的优化编码序列。

[0563]

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG

```

[0564]

```

781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCAGCGGC
1741 CGGATGAAGC AGATCGAGGA CAAGATCGAG GAAATCCTGA GCAAGATCTA CCACATCGAG
1801 AACGAGATCG CCCGGATCAA GAAGCTGATC GCGGAAAGCG GCGGCTCTGC CGGAAGCGGC
1861 CACCACCACC ATCACCCTG AAG (SEQ ID NO: 28)

```

[0565] 胞外 HIS

[0566] 下述多肽包括 RSV F 多肽的胞外域, 然后是六组氨酸标记。

[0567]

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLN KKRKRRLGFL LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
181 LSNQVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVINKQ SCISISNIETV IEFQQKNRRL LEITREFSVN
241 AGVTPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNMSG SAGSGHHHHH H

```

(SEQ ID NO: 29)

[0568] 下述核酸序列为上述多肽序列的优化编码序列。

[0569]

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGGC TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC

[0570]

541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCCGGGG
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TAGCGGCGGC
 1561 AGCGCCGGCT CTGGCCACCA CCACCATCAC CACTGAAG (SEQ ID NO: 30)

[0571] 胞外前 HIS

[0572] 下述多肽包括 RSV F 多肽的胞外域, GCN4 的三聚化结构域 (下划线) 插入上游的所述 RSV F 多肽, 其中所述 RSV 蛋白的 TM 结构域 (起始于氨基酸 517) 后是六组氨酸标记。

[0573]

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLN KRRKRRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
 181 LSNGVSVLTS KVLDLKNYID KQLLPVKNQ SCSISNIETV IEFQOKNRL LEITREFSVN
 241 AGVTPPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VROQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVECDTM NSLTLPEVN LCNVDIENPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVDKI EEILSKIYHI ENEIARIKKL
 541 IGESGGSAGS GHHHHHH (SEQ ID NO: 31)

[0574] 下述核酸序列为上述多肽序列的优化编码序列。

[0575]

```

1 ATGGAACTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCAACCGAC CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC

```

[0576]

```

421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGACAAGATC
1561 GAGGAAATCC TGAGCAAGAT CTACCACATC GAGAACGAGA TCGCCCGGAT CAAGAAGCTG
1621 ATCGGCGAAA GCGGCGGCTC TGCCGGAAGC GGCCACCACC ACCATCACCA CTGAAG

```

(SEQ ID NO: 32)

[0577] 全长前 HA HIS

[0578] 下述多肽包括全长 RSV F 多肽, 流感血凝素多肽的融合后三聚化结构域 (下划线) 连接所述 RSV F 多肽的 C 末端, 然后是六组氨酸标记。

[0579]

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLS KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
181 LSNGVSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPIVNKQ SCSISNIETV IEFQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTPPVSTY MLTNSSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNTLYYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVIIVILLS
541 LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNGSSGNE KEHQIEKEFS EVEGRIQDLE
601 GACTAGATCTGGGTCAAGGCAGAAGAATTCCGCC (SEQ ID NO: 33)

```

[0580] 下述核酸序列为上述多肽序列的优化编码序列。

[0581]

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC COTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG

```

[0582]

241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCCTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTTC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCCGGGG
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCAGGCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
 1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
 1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
 1561 AGCACCACCA ATATCATGAT CACCACAATC ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT
 1621 CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC
 1681 AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC GCCTTCTCCA ACGGCAGCAG CGGCAATGAG
 1741 AAGTCCACC AGATCGAGAA AGAATTCAGC GAGGTGGAGG GCCGGATCCA GGACCTGGAA
 1801 AAGAGCGGCG GCTCTGCCG AAGCGGCCAC CACCACCATC ACCACTGAAG

(SEQ ID NO: 34)

[0583] 胞外前 HA HIS

[0584] 下述多肽包括 RSV F 多肽的胞外域, 流感血凝素多肽的融合后三聚化结构域 (下划线) 插入上游的所述 RSV F 多肽, 其中所述 RSV 蛋白的 TM 结构域 (起始于氨基酸 517) 后是六组氨酸标记。

[0585]

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQHITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRR LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLS KKRKRRLGFL LGVGSATAS GVAVSKVLHL EGEVNKIKSA LLSTNKAVVS
 181 LSNGVSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPIVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
 241 AGVTTVPVSTY MLTNSSELLSL INDMPIITNDQ KKLMSNNVQI VRQOSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLTLYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
 481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNEKF HQIEKEFSEV EGRIQDLEKS

[0586]

541 GGSAGSGHHH HHH (SEQ ID NO: 35)

[0587] 下述核酸序列为上述多肽序列的优化编码序列。

[0588]

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCGGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGAGAAGTTC
1561 CACCAGATCG AGAAAGAATT CAGCGAGGTG GAGGGCCGGA TCCAGGACCT GGAAAAGAGC
1621 GSCGGCTCTG CCGGAAGCGG CCACCACCAC CATCACCACT GAAG (SEQ ID NO: 36)

```

[0589] 全长 Δ HRB HIS

[0590] 下述多肽包括缺失 HRB 结构域的全长 RSV F 多肽, 然后是六组氨酸标记。

[0591]

1 MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
 61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST PATNNRARRR LPRFMNYTLN
 121 NAKKTNVTLN KKRKRFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
 181 LSNGVSVLTS KVLDLKNIYD KQLLPIVKNQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
 241 AGVTPPVSTY MLTNSELLSL INDMPITNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
 301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
 361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
 421 KCTASNKNRG IIKTFNSGCD YVSNKGVDTV SVGNTRYVYV NQEGKSLYVK GEPNIMITTI
 481 IIVIIVILLS LIAVGLLLYC KARSTPVTLS KDQLSGINNI AFSNMGGSHH HHHH

[0592]

(SEQ ID NO: 37)

[0593] 下述核酸序列为上述多肽序列的优化编码序列。

[0594]

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
 61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCAGG GAATTCCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
 121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
 181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
 241 CAGGAACTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
 301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
 361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
 421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
 481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
 541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
 601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
 661 ATCGAGTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
 721 GCCGGCGTGA CCACCCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
 781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
 841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
 901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
 961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
 1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
 1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
 1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
 1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
 1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
 1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCGTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
 1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GCGGAGCCCA ATATCATGAT CACCACAATC
 1441 ATCATCGTGA TCATTGTGAT CCTGCTGTCT CTGATTGCCG TGGGCCTGCT GCTGTACTGC
 1501 AAGGCCCGCA GCACCCCTGT GACCCTGTCC AAGGACCAGC TGTCCGGCAT CAACAATATC
 1561 GCCTTCTCCA ACATGGGGGG TTCTCATCAT CATCATCATC ATTGAAG

(SEQ ID NO: 38)

[0595] 胞外

[0596] 下述多肽仅包含所述 RSV F 多肽的胞外域。

[0597]

```

1 MELLILKANA ITTILTAVTFCFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT GWYTSVITIE
61 LSNIKENKCN GTDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLMQST PATNNRARRE LPRFMNYTLN
121 NAKKTNVTLK KKRKRRLFLGF LLGVGSAIAS GVAVSKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS
181 LSNVSVLTS KVLDLKNIYID KQLLPIVVKQ SCSISNIETV IEFQQKNNRL LEITREFSVN
241 AGVTFPVSTY MLTNSELLSL INDMPTNDQ KKLMSNNVQI VRQQSYSIMS IIKEEVLAYV
301 VQLPLYGVID TPCWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRDRG WYCDNAGSVS FFPQAETCKV
361 QSNRVFCDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT DVSSSVITSL GAIVSCYGKT
421 KCTASNKNRG IIKTFSNGCD YVSNKGVDTV SVGNLYVYVN KQEGKSLYVK GEPIINFYDP
481 LVFPSDEFDA SISQVNEKIN QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTN (SEQ ID NO: 39)

```

[0598] 下述核酸序列为上述多肽序列的优化编码序列。

[0599]

```

1 ATGGAAGTGC TGATCCTGAA GGCCAACGCC ATCACCACCA TCCTGACCGC CGTGACCTTC
61 TGCTTCGCCA GCGGCCAGAA CATCACCGAG GAATTCCTACC AGAGCACCTG CAGCGCCGTG
121 AGCAAGGGCT ACCTGAGCGC CCTGCGGACC GGCTGGTACA CCAGCGTGAT CACCATCGAG
181 CTGTCCAACA TCAAAGAAAA CAAGTGCAAC GGCACCGACG CCAAGGTGAA ACTGATCAAG
241 CAGGAAGTGG ACAAGTACAA GAACGCCGTG ACCGAGCTGC AGCTGCTGAT GCAGAGCACC
301 CCCGCCACCA ACAACCGGGC CAGAAGAGAG CTGCCCCGGT TCATGAACTA CACCCTGAAC
361 AACGCCAAGA AAACCAACGT GACCCTGAGC AAGAAGCGGA AGCGGCGGTT CCTGGGCTTC
421 CTGCTGGGCG TGGGCAGCGC CATCGCCAGC GGGGTGGCCG TGTCCAAGGT GCTGCACCTG
481 GAAGGCGAGG TGAACAAGAT CAAGTCCGCC CTGCTGTCCA CCAACAAGGC CGTGGTGTCC
541 CTGAGCAACG GCGTGAGCGT GCTGACCAGC AAGGTGCTGG ATCTGAAGAA CTACATCGAC
601 AAGCAGCTGC TGCCCATCGT GAACAAGCAG AGCTGCAGCA TCAGCAACAT CGAGACCGTG
661 ATCGAGTTCC AGCAGAAGAA CAACCGGCTG CTGGAAATCA CCCGGGAGTT CAGCGTGAAC
721 GCCGGCGTGA CCACCCCGT GAGCACCTAC ATGCTGACCA ACAGCGAGCT GCTGTCCCTG
781 ATCAATGACA TGCCCATCAC CAACGACCAG AAAAAGCTGA TGAGCAACAA CGTGCAGATC
841 GTGCGGCAGC AGAGCTACTC CATCATGAGC ATCATCAAAG AAGAGGTGCT GGCCTACGTG
901 GTGCAGCTGC CCCTGTACGG CGTGATCGAC ACCCCCTGCT GGAAGCTGCA CACCAGCCCC
961 CTGTGCACCA CCAACACCAA AGAGGGCAGC AACATCTGCC TGACCCGGAC CGACCGGGGC
1021 TGGTACTGCG ACAACGCCGG CAGCGTGAGC TTCTTCCCCC AAGCCGAGAC CTGCAAGGTG
1081 CAGAGCAACC GGGTGTCTTG CGACACCATG AACAGCCTGA CCCTGCCCTC CGAGGTGAAC
1141 CTGTGCAACG TGGACATCTT CAACCCCAAG TACGACTGCA AGATCATGAC CTCCAAGACC
1201 GACGTGAGCA GCTCCGTGAT CACCTCCCTG GGCGCCATCG TGAGCTGCTA CGGCAAGACC
1261 AAGTGCACCG CCAGCAACAA GAACCGGGC ATCATCAAGA CCTTCAGCAA CGGCTGCGAC
1321 TACGTGAGCA ACAAGGGCGT GGACACCCTG AGCGTGGGCA ACACACTGTA CTACGTGAAT
1381 AAGCAGGAAG GCAAGAGCCT GTACGTGAAG GGCGAGCCCA TCATCAACTT CTACGACCCC
1441 CTGGTGTTC CCAGCGACGA GTTCGACGCC AGCATCAGCC AGGTCAACGA GAAGATCAAC
1501 CAGAGCCTGG CCTTCATCCG GAAGAGCGAC GAGCTGCTGC ACAATGTGAA TGCCGGCAAG
1561 AGCACCACCA ATTGAAG (SEQ ID NO: 40)

```

[0600] RSV F 全长

[0601] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNIIEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC

NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEF
 QQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
 EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNIMITTII
 IVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO:41)

[0602] 理想化的 RSV F 切割肠激酶

[0603] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEF
 QQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
 EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQINEKINQILAFIRKIDELHNI NAGKSTTNGSGSGDD
 DDDKSGSGIMITTTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO:42)

[0604] 理想化的 RSV F 切割凝血酶

[0605] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEF
 QQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
 EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQINEKINQILAFIRKIDELHNI NAGKSTTNGSGSGLV
 PRGSGSGIMITTTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO:43)

[0606] 理想化的 RSV F 切割 Xa 因子

[0607] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRFLGFLLGVGS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEF
 QQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
 EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQINEKINQILAFIRKIDELHNI NAGKSTTNGSGSGIE
 GRGSGSGIMITTTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO:44)

[0608] RSV F furx 截短 HIS

[0609] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SQNQNF LGFLLGVGS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEF
 QQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV

VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
HHHHHH(SEQ ID NO:45)

[0610] RSV F furx R113Q, K123N, K124N 截短 HIS

[0611] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNANNTNVTL SQNQNF LFGFL LGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
HHHHHH(SEQ ID NO:46)

[0612] RSV F furx R113Q, K123Q, K124Q 截短 HIS

[0613] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTL SQNQNF LFGFL LGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
HHHHHH(SEQ ID NO:93)

[0614] RSV F de1P21 furx 截短 HIS

[0615] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQ-----QNQNQNF LFGFL LGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
HHHHHH(SEQ ID NO:47) (符号“-”表示该位置的氨基酸缺失)

[0616] RSV F de1P23 furx 截短 HIS

[0617] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQ-----QNQNFLFGFL LGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG

HHHHHH (SEQ ID NO:48) (符号“-”表示该位置的氨基酸缺失)

[0618] RSV F de1P23 furde1 截短 HIS

[0619] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----QQQRFLGFLLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTPLS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNGKVDVTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
HHHHHH (SEQ ID NO:49) (符号“-”表示该位置的氨基酸缺失)

[0620] RSV F furmt 截短 HIS

[0621] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARKELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKRRKKKFLGFLLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTPLS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNGKVDVTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
HHHHHH (SEQ ID NO:50)

[0622] RSV F furde1 截短 HIS

[0623] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQELPRFMNYTLNNAKKTNTLSK---RFLGFLLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTPLS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNGKVDVTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
HHHHHH (SEQ ID NO:51) (符号“-”表示该位置的氨基酸缺失)

[0624] RSV F Xa 因子截短 HIS

[0625] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNIEGRELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKIEGRFLGFLLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTPLS
EVNLCNVD IFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNGKVDVTVSV
GNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSA
GSGHHHHHH (SEQ ID NO:52)

[0626] RSV F 短接头折叠子 HIS

[0627] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC

NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVLGVS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEF
 QQQNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
 EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNGSGYIPE
 APRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGSAGSGHHHHH (SEQ ID NO:53)

[0628] RSV F 长接头折叠子 HIS

[0629] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVLGVS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEF
 QQQNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
 EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNAGKSTTNNKNDKDG
 SGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGSAGSGHHHHH (SEQ ID NO:54)

[0630] RSV_F_胞外_前_his

[0631] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVLGVS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEF
 QQQNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
 EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNDKIEEILSKIYHIE
 NEIARIKKLIGESGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:55)

[0632] 胞外前 HA HIS

[0633] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNTVLSKKRKRRLGFLGVLGVS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIE
 FQQKNNRLL EITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVL
 AYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSL
 TLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDT
 VSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELHNVNEKFKHQIE
 KEFSEVEGRIQDLEKSGGSAGSGHHHHHH (SEQ ID NO:56)

[0634] RSV F 胞外 Furx GCN HIS

[0635] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNANNTNTVLSQNNQNFLGFLGVLGVS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVVKQSCSISNIETVIEF
 QQQNNRLLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV

VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVS NKGVDTVSVGN
TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVDKIEEILSKIYHIE
NEIARIK KLIGESGGSAGSGHHHHHHH (SEQ ID NO:57)

[0636] RSV F 胞外 delp21 GCN HIS

[0637] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN-----QNQNQNFLGFLLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVS NKGVDTVSVGN
TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVDKIEEILSKIYHIE
NEIARIK KLIGESGGSAGSGHHHHHHH (SEQ ID NO:58) (符号“-”表示该位置的氨基酸缺失)

[0638] RSV F 胞外 delp23 Furx GCN HIS

[0639] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN-----QNQNFLGFLLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVS NKGVDTVSVGN
TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVDKIEEILSKIYHIE
NEIARIK KLIGESGGSAGSGHHHHHHH (SEQ ID NO:59)

[0640] (符号“-”表示该位置的氨基酸缺失)

[0641] RSV F 胞外 delp23 Furdel GCN HIS

[0642] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKEN
KCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----QQQRFLGFL
GVGSAIASGVAV SKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIE
TVIEFQQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEE
VLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTM
SLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVS NKG
VDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVDKIEEIL
SKIYHIENEIARIK KLIGESGGSAGSGHHHHHHH (SEQ ID NO:60) (符号“-”表示该位置的氨基酸缺
失)

[0643] RSV F 全长 Furx

[0644] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNANNTNVTL SQNQNFLGFLLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS

EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITII
IVII VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO:61)

[0645] RSV F 全长 de1p21

[0646] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN-----QNQNQNFLGFL LGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITII
IVII VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO:62) (符号“-”表示该位置的
氨基酸缺失)

[0647] RSV F 全长 p23 Furx GCN HIS

[0648] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQN-----QNQNFLGFL LGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITII
IVII VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO:63) (符号“-”表示该位置的
氨基酸缺失)

[0649] RSV F 全长 p23 Furde1 GCN HIS

[0650] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----QQQRFLGFL LGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNIMITII
IVII VILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN (SEQ ID NO:64) (符号“-”表示该位置的
氨基酸缺失)

[0651] RSV F N 末端弗林蛋白酶 Furx 截短 HIS

[0652] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTL SKKRKR RFLGFL LGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLTNSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMS I I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS

EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
HHHHHH(SEQ ID NO:65)

[0653] RSV F C 末端弗林蛋白酶 Furx 截短 HIS

[0654] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNAQQTNVTL SQNQNF LGFLLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLT NSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLT LPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
HHHHHH(SEQ ID NO:66)

[0655] RSV F 融合缺失 1 截短 HIS

[0656] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKRRAIASGVAVS
KVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNR LLE
ITREFSVNAGV TTPVSTYMLT NSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLYGVI
DTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNVDI
FNPKYDCK IMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVK
QEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHHH
(SEQ ID NO:67)

[0657] RSV F 融合缺失 2 截短 HIS

[0658] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKR RGVGSAIASGV
AVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNR
LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLT NSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYVVQLPLY
GVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCN
VDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVN
KQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSGHHHHHHH
(SEQ ID NO:68)

[0659] RSV F Furx 截短 HIS

[0660] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNAQNELPRFMNYTLNNAQQTNVTL SQNQNF LGFLLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEV NKIKSALLSTNKAVVSL SNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP IVNKQSCSISNIETVIEF
QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLT NSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI I KEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLT LPS
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
HHHHHH(SEQ ID NO:69)

[0661] RSV F Furx 截短

[0662] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTL SQNQNF LFGFL LGVGS AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLT NSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQ I VRQQSYSIMS I I KEEVLAYV VQLPLYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICL TRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLT LPS EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGN TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN (SEQ ID NO:70)

[0663] RSV F de1P23 furde1 截短无 HIS (用于 CHO 细胞)

[0664] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKEN KCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----QQQRFLGFL LGVGS AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNI ETVIEFQQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLT NSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQ I VRQQSYSIMS I I KEEVLAYVVVQLPLYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICL TRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFC DTMNSLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNK GVDTVSVGN TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKST TN (SEQ ID NO:71) (符号“-”表示该位置的氨基酸缺失)

[0665] RSV F (Wt) 截短 HIS

[0666] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRRELPRFMNYTLNNAKKTNVTL SKKRKR RFLGFL LGVGS AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLT NSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQ I VRQQSYSIMS I I KEEVLAYV VQLPLYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICL TRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLT LPS EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGN TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG HHHHHH (SEQ ID NO:84)

[0667] RSV F 老 furx 截短 HIS

[0668] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELQRFMNYTLNANNTNVTL SQNQNF LFGFL LGVGS AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKISALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEF QQKNNR LLEITREFSVNAGV TTPVSTYMLT NSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQ I VRQQSYSIMS I I KEEVLAYV VQLPLYGV IDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICL TRTDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLT LPS EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTV SVGN TLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG HHHHHH (SEQ ID NO:88)

[0669] RSV F Furx R113Q, K123N, K124N 截短 HIS

[0670] MELLILKANAI TTTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTL SQNQNF LFGFL LGVGS

AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEF
 QQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
 EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
 HHHHHH(SEQ ID NO:89)

[0671] RSV F N 末端弗林蛋白酶截短 HIS

[0672] MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKEN
 KCNGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPQFMNYTLNNAQQTNVTLNQNNQNLGFL
 GVGSATIASGVAV SKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIE
 TVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEE
 VLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMN
 SLTLPSEVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGV
 DTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTN
 GGSAGSGHHHHHHH(SEQ ID NO:85)

[0673] RSV F de1P21 furde1 截短 HIS

[0674] MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARQ-----QNQQQRFLGFLGVLGVS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEF
 QQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
 EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
 HHHHHH(SEQ ID NO:86)

[0675] RSV F C 末端弗林蛋白酶截短 HIS

[0676] MELLILKANAIITILTAVTFCFASGQNIITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
 NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNQAQNELPQFMNYTLNNAQQTNVTLNKKRKRRLGFLGVLGVS
 AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNIYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEF
 QQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPIITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
 VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPS
 EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGN
 TLYYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTTNGGSAGSG
 HHHHHH(SEQ ID NO:87)

[0677] 实施例 2 - RSV F 构建体的表达和纯化

[0678] 将 RSV F ECTO 和截短的构建体克隆到 pFastBac 杆状病毒表达载体（英杰公司）中，所述构建体缺失跨膜结构域和胞质尾区域，具有野生型弗林蛋白酶切割位置或携带所述弗林蛋白酶切割位置的敲除突变，并且有或没有融合前稳定化突变。数种这些构建体含 C 末端柔性接头，然后是 His6 标记序列用于螯合纯化。制作高效价杆状病毒原液在 Sf9 昆虫细胞中传代。通过用需要的杆状病毒感染 Sf9、Tn5 或 High Five 昆虫细胞并在感染后 2

或 3 天收获培养基上清来表达蛋白,并用抗 RSV F 或抗 6HIS 的抗体通过 western 印迹来监控。

[0679] 大规模表达培养基通过两种常用策略之一来浓缩 / 纯化以消除昆虫细胞培养基中存在的铁蛋白破坏螯合树脂的不利影响。第一种方法是用 GE 医疗保健 (GE Healthcare) Hollotube 滤器浓缩柱将约 10-20 升昆虫表达培养基浓缩到约 300ml。在该浓缩混合物中添加硫酸铜到终浓度为 500 μ M,并将得到的溶液上样于 5ml HiTrap 螯合柱。然后用 25mM Tris pH 7.5、300mM NaCl 和咪唑梯度从所述柱上洗脱结合的 HIS 标记蛋白。

[0680] 在第二种纯化策略中,将 CuCl_2 加入培养基上清至终浓度 500 μ M。每 1 升培养基加入 4 毫升螯合树脂 (螯合树脂 (Chelating Resin),伯乐公司 (BioRad)),4 摄氏度摇动该浆液至少 30 分钟,然后通过重力柱将所述树脂和培养基分离。用 10 倍柱体积的平衡缓冲液 (25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl) 清洗所述树脂,并用 10 倍柱体积的洗脱缓冲液 (含 250mM 咪唑的平衡缓冲液) 洗脱 F 蛋白。用 25mM Tris 缓冲液 pH 7.5 透析所述洗脱物,并将所得的溶液上样于加入 NiSO_4 的 5ml Hitrap 螯合树脂,并用 25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl 和咪唑梯度洗脱。

[0681] 用抗 6HIS western 和考马斯蓝凝胶评价两种情况的咪唑梯度洗脱。收集含纯构建体的组分,用不同缓冲液 / 盐水溶液透析并用密理博 (Millipore) CP (Centriprep) 浓缩器和 / 或 VS (Vivaspin) 浓缩单元将其浓缩用于随后的分析。我们还开发了尺寸排阻纯化实验方案,该方案能进一步从玫瑰花结中纯化单分散 RSV 三聚体 (见下)。

[0682] RSV F 蛋白的 SEC 分析:

[0683] 在融合前构型中稳定化的其他副粘病毒融合蛋白的记录特征是其不形成融合后构型中观察到的玫瑰花结,即使被切割时暴露所述融合肽。简单的尺寸排阻色谱分析可鉴定蛋白并确定蛋白是否形成玫瑰花结。开发了两种方法, HPLC-SEC 和 FPLC-SEC, 其还用做有效的纯化步骤。

[0684] 用伯乐 (Biorad) SEC 柱 (18mm) 进行 HPLC-SEC, 移动相为 25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl。使用伯乐 HPLC-SEC 标准校准所述系统,我们发现所述 RSV 玫瑰花结 (代表切割的融合后构型) 洗脱在分析的柱空体积中,而 RSV 单分散三聚体 (来自随后 EM 分析的推测三聚体) 以约 100kDa 的表观分子量洗脱。

[0685] 在 GE 医疗保健 FPLC 上用 16/60 Superdex 200 柱进行 FPLC-SEC, 移动相为 25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl。使用 GE 医疗保健高分子量标准校准所述系统,我们发现所述 RSV 玫瑰花结洗脱在分析的柱空体积中,而 RSV 单分散三聚体以约 100kDa 的表观分子量洗脱。

[0686] RSV F 蛋白的电子显微镜观察 (EM)。

[0687] 约 50 微克 / 毫升 RSV F 构建体的蛋白溶液吸收在辉光放电的碳涂覆栅网上,并用 2% 磷钨酸钠 (pH 7.0) 或 0.75% 甲酸铀 (Urynal-formate) (未测量的低 pH) 进行负染。在 TS (Technai Spirit) 或 JOEL 1230 透射电子显微镜上于 80-120kV 操作下观察所述栅网,基于所需的分辨率放大 20,000-150,000 倍。

[0688] 表 2

[0689]

构建体	EM 下构型
RSV F 胞外 HIS	主要是玫瑰花结
RSV FFurdel 胞外 (切割)	主要是玫瑰花结
RSV F Delp23 Furdel 截短 (未切割)	观察到三聚体
RSV F 融合肽缺失 1 截短 (未切割)	三聚体
RSV F Delp23 Furdel 截短 (纯化后用胰蛋白酶切割)	主要是玫瑰花结和一些三聚体
RSV F Delp23 Furdel 截短 (纯化后在纳米脂质盘 (nanolipid disk) 存在下用胰蛋白酶切割)	不对称玫瑰花结, 玫瑰花结中心有明显的纳米脂质盘

[0690] 实施例 3 - 检测融合前和融合后 RSV F

[0691] 可用许多方法检测 RSV F 蛋白的构型以分析对该 RSV F 多肽的修饰或添加的分子是否不利于融合后构型。示例包括脂质体关联、构型特异性单克隆抗体 (包括用于 FACS、ELISA 等)、电子显微镜、构型之间的差异蛋白酶敏感性、凝胶过滤色谱、分析超速离心、动态光散射、氘交换 NMR 实验、质谱、圆二色谱、等温滴定量热法、色氨酸光谱法和 X 射线晶体学。

[0692] 脂质体关联

[0693] 脂质体关联可用于分析所述 RSV F 蛋白的构型。合适形式的 RSV F 蛋白在融合前构型中不关联脂质体而融合后构型关联脂质体。

[0694] 脂质体可如下制备: 1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰胆碱、1- 棕榈酰 -2- 油酰 -sn- 甘油 -3- 磷脂酰乙醇胺和氯仿中的胆固醇 (获自阿凡提极性脂质公司 (Avanti Polar Lipids)) 以 8:2:5 的摩尔比混合。在氩气中蒸发氯仿。真空干燥过夜并以 40mM 总脂质重悬于 PBS 会形成脂质膜。5 次冻融后, 涡旋所述脂质并用小型挤压机 (获自阿凡提极性脂质公司) 将其挤压穿过 2 个 100 μm 滤器 21 次。

[0695] 一旦所述脂质体制备完成, 进行所述脂质体关联实验。对于各待测样品, 用溶于 100mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.1) 的 25 毫单位胰蛋白酶 (获自沃明顿生物化学公司 (Worthington Biochemical)) 于 25°C 切割检测的 2 μg RSV F 多肽 30 分钟。切割后, 各样品中添加 40pg 大豆胰蛋白酶抑制剂 (获自沃明顿生物化学公司) 以终止反应。60°C 预处理所述样品 30 分钟, 这会诱导天然分离的 RSV F 蛋白从所述融合前向所述融合后构型的转变。加入脂质体 (每样品 40 μl) 和 PBS (终体积 80 μl), 并将所述样品在 60°C 孵育 30 分钟。加入蔗糖至终浓度为 50% (终体积 500 μl)。用各 500 μl 的 40% 蔗糖、25% 蔗糖和 PBS 覆盖所述样品并在 TLS55 转子中于 25°C, 49,000rp 旋转 3 小时。从所述梯度的顶部收集组分 (500 μl)。蛋白溶解于 0.5% 曲通 X-100 并用 12.5% v/v 三氯乙酸沉淀。用 SDS/PAGE 分离多肽并转移到 PVDF 膜上。用抗 RSV F 单克隆抗体探测印迹。

[0696] 电子显微镜

[0697] 电子显微镜用于分析 RSV F 多肽的构型分布。融合前形式中的 RSV F 多肽具有约 12nm 长的“球和茎”形状。相反, 融合后形式中的 RSV F 多肽具有约 16nm 长的“高尔夫球座”形状。此外, 所述“高尔夫球座”的窄末端的融合肽聚集形成玫瑰花结结构。因此, 由于可容易区分形状, 电子显微镜可用于分析 RSV F 多肽样品中的构型分布。

[0698] 实施例 4RSV F胞外域三聚体和玫瑰花结

[0699] 将 RSV F 蛋白胞外域构建体克隆到 pFastBac 杆状病毒表达载体 (英杰公司) 中, 所述构建体编码的多肽缺失跨膜结构域和胞质尾区域、具有野生型弗林蛋白酶切割位置或携带所述弗林蛋白酶切割位置的敲除突变和 / 或融合肽突变。数种这些构建体含 C 末端柔性接头, 然后是 HIS₆ 标记序列用于整合纯化。通过在 Sf9 昆虫细胞中传代获得高效价杆状病毒原液。通过用需要的杆状病毒感染 Sf9、Tn5 或 High Five 昆虫细胞并在感染后 2 或 3 天收获条件培养基上清来表达蛋白。用抗 RSV F 或抗 HIS₆ 的抗体通过 western 印迹来监控蛋白生成。

[0700] 大规模表达培养基用两种常用策略之一来浓缩 / 纯化以消除昆虫细胞培养基中存在的铁蛋白破坏螯合树脂的不利影响。第一种方法是用 GE 健康护理公司 (GE Healthcare) 的 Holutube 滤器浓缩柱将约 10-20 升昆虫表达培养基浓缩到约 300ml 在该浓缩混合物中添加硫酸铜到终浓度 500 μM, 并将得到的溶液上样于 5ml HiTrap 螯合柱。然后用 25mM Tris pH 7.5、300mM NaCl 和咪唑梯度将结合的 HIS 标记蛋白从所述柱上洗脱。

[0701] 在第二种纯化策略中, 将 CuCl₂ 加入培养基上清至终浓度 500 μM。每 1 升培养基加入约 4-10 毫升螯合树脂 (螯合树脂 (Chelating Resin), 伯乐公司 (BioRad)), 4 摄氏度摇动该浆液至少 30 分钟, 然后用重力柱将所述树脂和培养基分离。用约 10 倍柱体积的平衡缓冲液 (25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl) 清洗所述树脂, 并用约 10 倍柱体积的洗脱缓冲液 (含 250mM 咪唑的平衡缓冲液) 洗脱 F 蛋白胞外域。用 pH 7.5 的 25mM Tris 缓冲液透析所述洗脱物, 并将所得的溶液上样于加入 NiSO₄ 的 5ml Hitrap 螯合树脂。用 25mM Tris pH 7.5、300mM NaCl 和咪唑梯度洗脱结合的蛋白。

[0702] 用抗 HIS₆ western 印迹和 / 或考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶评价两种情况的咪唑梯度洗脱。收集含纯构建体的组分, 用不同缓冲液 / 盐水溶液透析并用密理博 CP (Centriprep) 浓缩器和 / 或 VS (Vivaspin) 浓缩单元将其浓缩用于随后的分析。在一些情况中, 用尺寸排阻色谱进一步纯化单体、三聚体或玫瑰花结。

[0703] RSV F 胞外域的 SEC 分析和纯化

[0704] 尺寸排阻色谱用于纯化和分析 RSV F 蛋白胞外域单体、三聚体和玫瑰花结。本方法也可从宿主细胞中或培养基衍生的脂质和脂蛋白污染物中纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域。开发了两种方法 HPLC-SEC 和 FPLC-SEC, 其还可用做有效的纯化步骤。

[0705] 用伯乐 (Biorad) SEC 柱 (18mm) 进行 HPLC-SEC, 移动相为 25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl。使用伯乐 HPLC-SEC 标准校准所述系统, 我们发现所述 RSV 玫瑰花结 (代表切割的融合后构型) 洗脱在分析的柱空体积中, 而 RSV F 单体以约 75-85kDa 的表观分子量洗脱。

[0706] 在 GE 医疗保健 FPLC 上用 16/60 Superdex 200 柱进行 FPLC-SEC, 移动相为 25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl。使用 GE 医疗保健高分子量标准校准所述系统, 我们发现所述 RSV 玫瑰花结洗脱在分析的柱空体积中, 而 RSV 单分散三聚体以约 140-160kDa 的表观分子量洗脱且 RSV F 单体以约 75-85kDa 的表观分子量洗脱。

[0707] 为了纯化, 使用所述 FPLC-SEC 方法并收集 1ml 组分。

[0708] 胰蛋白酶切割 Furdel 或 Delp23 Furdel 构建体形成融合后玫瑰花结

[0709] 通常, 用重量 1:1000 的胰蛋白酶 : RSV F 进行 Delp23 Furdel 单体的胰蛋白酶消化, 或 1mg RSV F 抗原用 10-15BAEE 单位的胰蛋白酶。在典型反应中, 来自牛血浆的胰蛋白

酶（西格玛-奥德里奇公司 (Sigma Aldrich) T8802:10,000-15,000BAEE 单位 / 毫克胰蛋白酶）在 25mM Tris pH 7.5、300mM NaCl 中稀释为 1mg/ml 浓度。用 1 微升胰蛋白酶溶液（胰蛋白酶:RSV 终质量比 0.001:1, 或每毫克 RSV F 中约 10-15BAEE 单位胰蛋白酶）于 37°C 处理 1mg/ml RSV F 蛋白胞外域多肽溶液（稀释于 25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl 中）1 小时。通常, 切割反应的过程由 SDS-PAGE 凝胶监控。所述切割反应用胰蛋白酶抑制剂停止。所述切割的 RSV F 蛋白用尺寸排阻色谱进一步纯化。

[0710] 有时, 将 1:100 体积的固定胰蛋白酶抑制剂（西格玛公司 (Sigma)）或 1 微升 1mM 大豆胰蛋白酶抑制剂加入所述切割溶液且该混合物室温孵育并温和摇动约 15-30 分钟以终止胰蛋白酶反应。用微量离心柱将抑制剂树脂从所述蛋白溶液中分离。得到的溶液用 SEC 纯化法纯化。

[0711] RSV F 蛋白的电子显微镜观察 (EM)。

[0712] RSV F 蛋白胞外域多肽（约 50 微克 / 毫升）吸收在辉光放电的碳涂覆栅网上, 并用 2% 磷钨酸钠 (pH 7.0) 或 0.75% 甲酸铀 (Urynal-formate)（未测量的低 pH）进行负染。在 TS (Technai Spirit) 或 JOEL 1230 透射电子显微镜上于 80-120kV 操作下观察所述栅网, 基于所需的分辨率放大 20,000-150,000 倍。

[0713] 磷脂实验

[0714] 本实验是基于瓦克纯化学工业有限公司 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 实验磷脂 C 胆碱氧化酶 - DAOS 方法（目录号 433-36201）。相对生产商的通用实验方案, 所述实验方案仅改变以减少实验中使用的材料含量, 并降低反应中的样品稀释。为了确定所述 RSV F 样品的脂质含量, 通过用一瓶缓冲液溶解一瓶显色剂 (Color Reagent) 来产生显色剂（显色剂在 4°C 下稳定 1 周）。用蒸馏水稀释所述 300mg/dL (3mg/ml) 磷脂标准到 1.5、1.0、0.75、0.5 和 0.25mg/ml。对于各标准、水空白和样品反应, 在微量离心管中加入 10 μ l 显色剂和 2 μ l 各标准、蒸馏水 (0mg/ml 标准) 或样品。进行短暂离心反应以确保混合适当并于 37°C 孵育该管 15 分钟。记录各标准点 595nm 处的吸光度并生成标准曲线。记录各样品 595nm 处的吸光度并从制备得到的校准曲线中计算磷脂浓度。

[0715] 棉鼠中的免疫原性

[0716] 在两个研究中检测棉鼠（刚毛棉花鼠 (*Sigmodon hispidus*））中单体（未切割的 delp21 furx）、三聚体的玫瑰花结（切割的 delp23 furdel）和三聚体（融合肽缺失）形式的 RSV F 蛋白胞外域多肽的免疫原性。在研究 1 中（图 8A 和 8B），在第 0 天和第 21 天每组 10 只棉鼠肌肉内免疫接种 10 μ g 单体或玫瑰花结（各吸收到氢氧化铝上）。血清抗 RSV F 蛋白 IgG 和 RSV 中和抗体效价在第一次疫苗接种后 2 周 (2wp1) 和第二次疫苗接种后 2 周 (2wp2) 或第一次疫苗接种后 3 周 (3wp1) 和第二次疫苗接种后 2 周 (2wp2) 测量。用 RSV F 蛋白包被板和马辣根过氧化物酶偶联的鸡抗棉鼠 IgG 检测抗体, 通过 ELISA 检测抗 RSV F 蛋白 IgG（图 8A）。数据显示为 \log_{10} 几何平均效价 (GMT) + 个体棉鼠的标准偏差。通过蚀斑减少中和试验 (PRNT) 测量 RSV 中和效价（图 8B）。简而言之, 热灭活血清的稀释物用 RSV Long 预孵育, 然后接种在在 12 孔板中的 HEp-2 细胞上。感染 2 小时后, 移除所述接种物并用琼脂糖覆盖细胞。5 天后用中性红色染料计数空斑。中和效价定义为相对对照（无血清），产生每孔至少 60% 的空斑数量减少的血清稀释度的倒数。数据显示为 \log_{10} GMT + 每组 5 只棉鼠的 2 个库的标准差。

[0717] 在研究 2 中 (图 8C), 每组 9 只棉鼠肌肉免疫接种指定剂量的单体、三聚体或玫瑰花结 (各吸收到氢氧化铝上)。如上在 2wp1 测量血清抗 RSV F 蛋白 IgG 效价。

[0718] 结果

[0719] 表达了可溶性 RSV F 胞外域 (具有未突变的弗林蛋白酶切割位置), 但其不能用尺寸排阻色谱从源自宿主细胞或培养基的脂质和脂蛋白杂质中纯化。这些 RSV F 胞外域多肽在 SEC 柱空体积中和所述脂质和脂蛋白污染物一起洗脱。

[0720] 制备数种构建体以制作含弗林蛋白酶切割位置突变的 RSV F 胞外域多肽, 包括所述 Furdel 构建体。参见图 1。通过表达该 Furdel 构建体产生的多肽以约 65kDa 未切割种类从细胞中分泌。该 Furdel 突变还阻止融合肽暴露, 继而阻止玫瑰花结形成。因此, 可溶性 RSV F Furdel 迁移至 Superdex 200 制备柱的内体积中, 使得其与脂质碎片和昆虫蛋白杂质分离, 所述脂质碎片洗脱在空体积中。这些结果显示弗林蛋白酶切割位置突变的 RSV F 胞外域多肽可作为能用 SEC 纯化的未切割多肽生成。此外, 所述未切割的 RSV F 保留时间的分析与所述多肽单体而不是三聚体相一致。

[0721] 无论 RSV F furdel 多肽是单体、三聚体或单体和三聚体的混合物, 用分析超速离心进一步评价。用纯化自 SEC 纯化中单体峰的蛋白进行分析超速离心研究。未切割的 RSV F 的沉降速率数据显示阶段型图, 表明溶液中有两种。沉降速率实验的分析显示在溶液中所述未切割的 RSV F 胞外域具有大群体单体和小群体的明显三聚体。收集平衡运行数据并尝试将该数据拟合理想的单体模型或单体-三聚体平衡模型。然而, 所述残差的拟合较差, 尤其是在蛋白浓度更高的细胞底部。这些观察表明所述未切割的 RSV F 胞外域多肽主要是小群体单体, 其自结合 (可能为三聚体) 或高浓度聚集。

[0722] 用尺寸排阻 (SEC) 色谱进行所选 RSV F 蛋白胞外域多肽的进一步分析。图 6A-6D。图 6A-6D 中含单体、三聚体或三聚体的玫瑰花结的主峰用星号表示, Superdex P200 16/60 柱 (GE 医疗保健公司 (GE Healthcare)) 的保留时间用毫升表示。在校准柱上, 约 47mls、65mls 和 77mls 的保留时间分别对应于柱空体积、F 三聚体保留和单体保留。在图 6A 中, 未切割的 Delp23 Furdel ($\Delta p23$ Furdel) 构建体纯化自所述单体峰。用胰蛋白酶处理未切割的 Delp23 Furdel RSV F 抗原时, 蛋白形成玫瑰花结, 其在 SEC 空体积中迁移 (图 6B)。RSV F 融合肽缺失的经切割三聚体种类纯化自约 65mls 保留时间的三聚体峰 (图 6C) 而未切割的 Delp21 Furx 构建体 ($\Delta p21$ Furx) 纯化自约 77mls 的单体峰 (图 6D)。

[0723] 用 EM 评价未切割形式或胰蛋白酶切割后的数种 RSV F 蛋白胞外域多肽。RSV F Furdel 和 delp23 Furdel 构建体在弗林蛋白酶切割位置仍有精氨酸残基。这些精氨酸易于被胰蛋白酶切割。切割后, 所述未切割的 F_0 种类转化为 F_1/F_2 种类, 其中所述融合肽暴露。EM 分析证实了胰蛋白酶切割后, 所述未切割的 RSV 胞外域由于其融合肽而形成了三聚体的玫瑰花结, 这已在相关融合蛋白中观察到。结果示于表 3, 显示未切割的 RSV F 蛋白胞外域多肽可切割形成三聚体的玫瑰花结。所述融合肽缺失的构建体被弗林蛋白酶切割, 形成单分散三聚体。参见图 7A-7D。有利的是, 用这种方式生成三聚体的玫瑰花结可产生基本不含脂质碎片和脂蛋白的三聚体的玫瑰花结。

[0724] 免疫原性研究的结果显示棉鼠 (刚毛棉花鼠 (*Sigmodon hispidus*)) 中单体 (未切割的 delp21 furx)、三聚体的玫瑰花结 (切割的 delp23 furdel) 和三聚体 (融合肽缺失) 形式的 RSV F 蛋白胞外域多肽具有免疫原性, 并诱导中和抗体。图 8A-8C。

[0725]

表 3	
构建体	EM 下构型
RSV F 野生型胞外域 (表达期间在宿主细胞中切割)	关联脂质碎片的三聚体玫瑰花结
可被胰蛋白酶切割的 Furdel (纯化的单体峰-未切割)	变量通过 EM 下负染色材料, 一些制品显示单分散的三聚体; 其他显示很少的可见材料
可被胰蛋白酶切割的 Furdel (纯化的单体峰-纯化后胰蛋白酶切割)	三聚体的玫瑰花结
可被胰蛋白酶切割的 delp23 furdel (纯化的单体峰-未切割)	变量通过 EM 下负染色材料, 一些制品显示单分散的三聚体; 其他显示很少的可见材料
可被胰蛋白酶切割的 delp23 Furdel (纯化的单体峰-纯化后胰蛋白酶切割)	三聚体的玫瑰花结
切割的融合肽缺失 (纯化的单体峰)	单分散三聚体

[0726] 实施例 5 - 在昆虫或 CHO 细胞中制作 RSV F 亚基抗原的方法

[0727] 从昆虫细胞纯化 RSV F 抗原:

[0728] 包括 Delp21 Furx、Delp23 Furdel 和融合肽缺失构建体的 RSV F 胞外域亚基用 pFAST Bac 杆状病毒系统在 HiFive 昆虫细胞 (英杰公司) 中表达。所述 RSV F 亚基通过 2 步螯合法从 10-25 升的大规模表达中纯化, 所述方法降低昆虫细胞培养基中存在的铁蛋白能破坏螯合树脂的不利影响。将 CuSO_4 加入培养基上清至终浓度 $500 \mu\text{M}$ 。每 1 升培养基加入约 10-20 毫升螯合树脂 (螯合树脂 (Chelating Resin), 伯乐公司 (BioRad)), 4°C 摇动该浆液至少 30 分钟, 然后用重力柱将所述树脂和培养基分离。用约 2 倍树脂体积的平衡缓冲液 (25mM Tris pH 7.5, 300mM NaCl) 清洗所述树脂, 并用约 2 倍柱体积的洗脱缓冲液 (含 250mM 咪唑的平衡缓冲液) 洗脱 F 蛋白胞外域。用 pH 7.5, 300mM NaCl 的 25mM Tris 缓冲液透析所述洗脱物, 并将所得的溶液上样于加入 NiSO_4 的 5ml Hitrap 螯合树脂 (GE 医疗保健公司)。用 25mM Tris pH 7.5、300mM NaCl 和咪唑梯度洗脱结合的蛋白。

[0729] 用抗 HIS_6 western 印迹和 / 或考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶评价两种情况的咪唑梯度洗脱。收集含纯化构建体的组分并用密理博 CP (Centriprep) 浓缩器和 / 或 VS (Vivaspin) 浓缩单元浓缩至约 1mg/ml 用于随后通过尺寸排阻色谱的分析 / 纯化。

[0730] RSV F 胞外域的 SEC 分析和纯化

[0731] 尺寸排阻色谱 (SEC) 用于纯化和分析 RSV F 蛋白胞外域未切割单体和切割的三聚体。本方法也可从宿主细胞中或培养基衍生的脂质和脂蛋白污染物中纯化未切割的 RSV F 蛋白胞外域。在纯玫瑰花结产生中, 所述未切割的 Delp23 Furdel 构建体最初纯化为单体, 然后用蛋白酶处理并用 SEC 再次纯化以纯化均质的玫瑰花结 (见下)。开发了两种方法用于分析 RSV F 寡聚化, HPLC-SEC 和 FPLC-SEC, 其还可用做有效的纯化步骤。

[0732] 用伯乐 (Biorad) SEC 柱 (18mm) 进行 HPLC-SEC, 移动相为 25mM Tris pH 7.5, 300mM

NaCl。使用伯乐 HPLC-SEC 标准校准所述系统,我们发现所述 RSV 玫瑰花结(代表切割的融合后构型)洗脱在分析的柱空体积中,而 RSV F 单体以约 75-85kDa 的表观分子量洗脱。

[0733] 在 GE 医疗保健 FPLC 上用 16/60 Superdex 200 柱进行 FPLC-SEC,移动相为 25mM Tris pH 7.5,300mM NaCl。使用 GE 医疗保健高分子量标准校准所述系统,我们发现所述 RSV 玫瑰花结洗脱在分析的柱空体积中,而 RSV 单分散三聚体以约 140-160kDa 的表观分子量洗脱且 RSV F 单体以约 75-85kDa 的表观分子量洗脱。对于 RSV 未切割 Delp21 Furx 或 Delp23 Furdel(单体)或融合肽缺失(三聚体)的纯化,将 0.5-2ml 约 1mg/ml 螯合纯化的材料上样到平衡的 Superdex P200 16/60 柱上,流速 0.5-2ml/分钟,并收集相关组分。

[0734] 胰蛋白酶切割 Delp23 Furdel 构建体形成融合后玫瑰花结

[0735] 来自牛血浆的胰蛋白酶(西格玛-奥德里奇公司 T8802:10,000-15,000BAEE 单位/毫克胰蛋白酶)在 25mM Tris pH 7.5、300mM NaCl 中稀释为 1mg/ml 浓度。用 1 微升胰蛋白酶溶液(胰蛋白酶:RSV 终质量比 0.001:1,或每毫克 RSV F 中约 10-15BAEE 单位胰蛋白酶)于 37℃处理 1mg/ml RSV F 蛋白胞外域多肽溶液(稀释于 25mM Tris pH 7.5,300mM NaCl 中)1 小时。用 SDS-PAGE 凝胶监控切割反应的过程。用胰蛋白酶抑制剂(吉布可大豆胰蛋白酶抑制剂公司(Gibco Soy Bean Trypsin Inhibitor),用与胰蛋白酶相等质量的抑制剂)终止所述切割反应。发现所述切割步骤和随后的玫瑰花结纯化之间需要孵育期以使单体更效率的转化为玫瑰花结。37℃进行 1-6 小时孵育期以提供更高的玫瑰花结形成效率。用尺寸排阻色谱(如上所述)从未切割单体种类中进一步纯化切割的 RSV F 蛋白,其中可在柱空体积组分中收集均质的玫瑰花结。

[0736] 从 CHO 细胞纯化 RSV F 抗原:

[0737] 不含 HIS 标记的 RSV F 融合肽缺失构建体用阳离子纯化法纯化。在 GE 健康医疗公司中空纤维筒浓缩系统(MWCO 10,000kDa)上将含表达的 RSV F 三聚体抗原的 CHO 材料浓缩到初始体积的约十分之一。然后用等体积 pH 6.0,25mM NaCl 的 25mM 乙酸钠将所述浓缩溶液的缓冲液替换四次。得到的溶液含乙酸/盐水缓冲液中的浓缩 RSV F 三聚体,将其上样于已用乙酸/盐水缓冲液平衡的预加的 GE 健康医疗公司 HiTrap CM 柱上。用含 25、150、250、500 或 1000mM NaCl 的 25mM 乙酸缓冲液分级梯度从所述柱中洗脱所述蛋白(所述 250mM 和 500mM NaCl 组合含大部分的洗脱材料)。该肽了可用与上述实验方案相似的 SEC 纯化法进一步纯化。

[0738] 实施例 6 - 棉鼠中 RSV F 亚基的免疫原性

[0739] 在棉鼠模型中评价各用明矾或 MF59 配制的 RSV-F 三聚体(RSV-F-融合-肽-缺失-截短)和玫瑰花结(RSV-F-delp23-furdel-截短,切割)亚基的免疫原性和保护能力。本研究中用于 ELISA 的抗原是 RSV-F-融合-肽-缺失-截短(表 4)。中和反应针对感染性 RSV, Long 株(表 5)。所有组合具有免疫原性,引发高效价的 RSV-F-特异性 IgG 和 RSV 中和抗体应答,所述应答被第二次疫苗接种加强,并提供保护抵御鼻 RSV 攻击。

[0740] 方法

[0741] 棉鼠的疫苗接种和攻击

[0742] 雌性棉鼠(刚毛棉花鼠(Sigmodon hispidis))获自哈伦实验室(Harlan Laboratories)。

[0743] 在第 0 天和第 21 天动物组肌肉内接种(i.m., 100 μl)指定的疫苗。

[0744] 第一次免疫后 3 周 (3wp1) 和第二次免疫后 2 周 (2wp2) 收集血清样品。第一次免疫后 4 周用 1×10^5 pfu RSV Long 鼻内攻击 (i. n.) 免疫或未免疫接种的对照动物。3% 异氟烷麻醉下用精密蒸发器进行血液收集和 RSV 攻击。

[0745] RSV F-特异性 ELISA

[0746] 通过酶联免疫吸附实验 (ELISA) 分析个体血清样品中 RSV F 特异性 IgG 的存在。用溶于 PBS 的 $1 \mu\text{g/ml}$ 纯化 RSV F (融合-肽缺失-截短) 在 4°C 过夜包被 ELISA 板 (MaxiSorp 96 孔, 纽恩克公司 (Nunc))。清洗 (含 0.1% 吐温-20 的 PBS) 后, 于 37°C 用溶于 PBS 的 Superblock 封闭缓冲液 (赛默科技公司 (Thermo Scientific)) 封闭板至少 1.5 小时。然后清洗所述板, 加入实验稀释剂 (含 0.1% 吐温-20 和 5% 山羊血清的 PBS) 中实验或对照棉鼠的血清连续稀释物, 并在 37°C 孵育所述板 2 小时。清洗后, 用马辣根过氧化物酶 (HRP)-偶联的鸡抗棉鼠 IgG (免疫学咨询实验室公司 (Immunology Consultants Laboratory, Inc), 实验稀释剂中 1:5,000 稀释) 在 37°C 孵育所述板 1 小时。最后, 清洗所述板并在各孔中加入 $100 \mu\text{l}$ TMB 过氧化物酶底物溶液 (柯克加德和佩里实验室公司 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc))。通过添加 $100 \mu\text{l}$ 1M H_3PO_4 终止反应, 并用读板仪读取 450nm 的吸光度。对各血清样品, 通过非线性回归 (GP 公司 (GraphPad Prism)) 产生光密度 (OD) 与血清稀释度倒数的对数曲线。效价定义为约 0.5OD 时血清稀释度的倒数 (根据来自 RSV 感染棉鼠的标准、合并血清归一化, 效价定义为 1:2500, 其包括在每个板上)。

[0747] 微中和实验

[0748] 用微中和实验检测血清样品中是否存在中和抗体。热灭活 (HI) 血清的 2 倍连续稀释物 (在含 5% HI 胎牛血清 (FBS) 的 PBS 中) 加入等体积的预先滴定以达到约 115PFU/ $25 \mu\text{l}$ 的 RSV Long 株中。 37°C 和 5% CO_2 下孵育血清/病毒混合物 2 小时以发生病毒中和, 然后将 $25 \mu\text{l}$ 该混合物 (含约 115PFU) 接种到 96 孔板中 HEp-2 细胞的两重孔上。 37°C 和 5% CO_2 持续 2 小时后, 用 0.75% 甲基纤维素/EMEM 5% HI-FBS 覆盖所述细胞并孵育 42 小时。通过用免疫染色检测合胞体形成然后自动计数来确定感染性病毒颗粒的数量。中和效价定义为相对对照 (无血清), 产生每孔至少 60% 合胞体数量减少的血清稀释度的倒数。

[0749] 病毒负荷

[0750] 通过空斑实验检测肺中的病毒负荷。具体地说, RSV 感染后 5 天收集肺, 将一个右叶放入含 25% 蔗糖的 2.5ml 达氏修正伊氏培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, 英杰公司) 并用组织匀化器破碎。来自这些样品的无细胞上清保存于 -80°C 。为了分析感染性病毒, 澄清的肺匀浆稀释物 (在含 5% HI-FBS 的 PBS 中) 以 $200 \mu\text{l}$ /孔的体积接种在 12 孔板的融合 HEp-2 细胞单层上。周期性温和摇动 (37°C , 5% CO_2) 2 小时后移除接种物, 用 1.5ml 溶解于补充有 5% HI-FBS、谷氨酰胺和抗体的 Eagle 极限必需培养基 (Eagle's Minimal Essential Medium, EMEM, 龙沙公司 (Lonza)) 中的 1.25% SeaPlaque 琼脂糖 (龙沙公司) 覆盖细胞。孵育 3-4 天后, 再次用 1ml 溶于含 0.1% 中性红 (西格玛公司) 的 EMEM (西格玛公司) 中的 1.25% 琼脂糖覆盖细胞。一天后在光盒协助下计数空斑。

[0751] 检测病毒负荷的替代方法是定量实时 PCR (qRT-PCR)。用 RSV-F 基因特异性寡核苷酸引物通过 qRT-PCR 检测病毒负荷, 如 (I. Borg 等, Eur Respir J 2003;21:944-51) 所述, 略作改动。简而言之, 从 $140 \mu\text{l}$ 澄清的肺匀浆或已知数量的 RSV 噬斑形成单位

(PFU) (通过斑块实验确定,并在未感染动物的肺匀浆中稀释)中分离 RNA,使用 RNeasy 试剂盒(凯杰公司(Qiagen)),最终洗脱体积为 100 μ l 水。使用 SuperScript III Platinum 一步定量 RT-PCR 试剂盒(英杰公司)在单管中进行 cDNA 合成和 PCR,用 5 μ L 洗脱 RNA、10 μ M 各引物和 50 μ M 探针(引物和探针来自整合 DNA 技术公司(Integrated DNA Technologies))。正向引物:TTGGATCTGCAATCGCCA(SEQ ID NO:72)。反向引物:CTTTTGATCTTGTTCACTTCTCCTTCT(SEQ ID NO:73)。探针:5'-羧基荧光素(FAM)-TGGCACTGCTGTATCTAAGGTCCTGCACT-四甲基羧基罗丹明(TAMRA)-3'(SEQ ID NO:74)。用 ABI Prism 7900HT 或 7500(应用生物系统公司(Applied Biosystems))进行扩增和检测。循环阈值(Ct)定义为各样品荧光信号首次超出设定阈值成为可检测时的循环数。然后基于 Ct 相对所定义病毒 RNA 拷贝数的对数的标准曲线检测各样品的 PFU 当量。

[0752] 结果

[0753] 棉鼠作为模型已被广泛用于 RSV 发病机理和免疫的研究,这是由于棉鼠和人之间 RSV 诱导的疾病有许多相似性。两种重要的类比是中和抗体的功效和有关福尔马林灭活的 RSV 疫苗接种的肺组织病理学加强。棉鼠比其他小动物如小鼠还更易于被 RSV 感染。

[0754] 为了评价我们 RSV-F 亚基疫苗的免疫原性,雌性棉鼠组肌肉内免疫接种各种剂量的三聚体(RSV-F-融合-肽-缺失-截短)或玫瑰花结(RSV-F-del_{p23}-furdel-截短,切割),其各用明矾或 MF59 配制。在所有情况中,第一次疫苗接种后 3 周(3wp1)测量时,单一免疫足以在所述血清中诱导 F 特异和中和抗体。第一次 3 周后对所有的棉鼠给予同源加强免疫,这导致 2 周后(2wp2)检测时 F 特异性 IgG 和中和抗体显著增加。总体上,所述玫瑰花结的免疫原性等同于或高于三聚体的免疫原性, MF59 制剂的效价高于明矾制剂,且更高的蛋白剂量产生更高的效价,尽管有一些例外。

[0755] 为了检测所述亚基疫苗的保护能力,所有棉鼠在第二次疫苗接种 4 周后经鼻途径感染 RSV,并在 5 天后用空斑实验测量所述肺中的病毒负荷。在所有情况中,亚基疫苗接种产生保护免受攻击,疫苗接种的棉鼠的肺部病毒负荷比未免疫但受到攻击的对照动物低超过三个数量级。

[0756] 表 4 :F 特异性血清 IgG 效价

[0757]

血清收集	蛋白剂量(μ g)	F 特异性血清 IgG 效价 ^a			
		明矾		MF59	
		三聚体	玫瑰花结	三聚体	玫瑰花结
3wp1	10	20276	36841	10251	22415
	1	18341	20802	3712	28610
	0.1	2698	6896	1065	8293
2wp2	10	103670	97174	130016	156144
	1	142331	102405	177441	299501
	0.1	11581	34354	50238	111099

[0758] ^a个体棉鼠的几何平均效价(每组 7-8 只)

[0759] 三聚体免疫原为 RSV-F-融合-肽-缺失-截短

[0760] 玫瑰花结免疫原为 RSV-F-del_{p23}-furdel-截短,切割。

[0761] 表 4A:RSV 攻击 5 天后的肺病毒效价

[0762]

疫苗接种	蛋白剂 量(μg)	病毒效 价 ^b
无	-	822760
三聚体/明矾	10	546
	1	636
	0.1	903
玫瑰花结/明矾	10	305
	1	341
	0.1	548
三聚体/MF59	10	360
	1	301
	0.1	456
玫瑰花结/MF59	10	244
	1	257
	0.1	716

[0763] ^a用 1×10^5 空斑形成单位 (pfu) 的 RSV Long 鼻内攻击[0764] ^bpfu/g 肺, 攻击 5 天后

[0765] 7-8 只个体棉鼠 / 组的几何平均效价

[0766] 若个体动物效价 < 203 (检测界限), 则其效价为 100

[0767] 表 5 :RSV 血清中和效价

[0768]

		RSV 血清中和效价 ^a			
		明矾		MF59	
血清收集	蛋白剂量(μg)	三聚体	玫瑰花结	三聚体	玫瑰花结
3wp1	10	628	1050	578	229
	1	208	633	165	205
	0.1	57	200	51	65
2wp2	10	3669	4015	3983	3436
	1	3369	2844	5728	3940
	0.1	744	1902	2414	2093

[0769] ^a60% 合胞体减少中和效价

[0770] 3-4 只棉鼠 / 组的 2 个实验库的几何平均效价

[0771] 实施例 7-RSV RNA 疫苗

[0772] RNA 合成

[0773] 编码 α 病毒复制子的质粒 DNA (图 4, SEQ ID NO:77) 作为体外合成 RNA 的模板。这些实验使用 RSV 的全长表面融合糖蛋白 (RSV-F, 图 4)。将所述复制子递送给真核细胞后, 正义链 RNA 翻译产生 4 种非结构性蛋白, 它们一起复制基因组 RNA 并转录大量编码异源基因产物的亚基因组 mRNA。由于缺少 α 病毒结构蛋白的表达, 复制子不能诱导产生感染性颗粒。所述 α 病毒 cDNA 上游的噬菌体 (T7 或 SP6) 启动子促进所述复制子 RNA 体外合成,

且紧邻聚(A)尾下游的丁型肝炎病毒(HDV)核酶通过其自切割活性产生校正的3'末端。

[0774] 所述HDV核酶下游的质粒DNA用合适的限制性内切核酸酶线性化后,用T7或SP6噬菌体来源的DNA依赖性RNA聚合酶体外合成流出转录本。按照生产商(得克萨斯州奥斯汀的安碧公司(Ambion))提供的说明,在存在7.5mM(T7 RNA聚合酶)或5mM(SP6 RNA聚合酶)的各三磷酸核苷(ATP、CTP、GTP和UTP)时于37°C转录2小时。转录后,用TURBO DNA酶(得克萨斯州奥斯汀的安碧公司)消化模板DNA。用LiCl沉淀所述复制子RNA并复溶于无核酸酶的水中。如用户手册所述,未加帽的RNA转录后通过牛痘加帽酶(VCE)用ScriptCap m⁷G加帽系统(威斯康星州麦迪逊的艾比森得(Epicentre)生物技术公司)加帽。用LiCl沉淀转录后加帽的RNA并复溶于无核酸酶的水中。通过测量260nm下的光密度确定RNA样品的浓度。体外转录本的完整性通过变性琼脂糖凝胶电泳证实。

[0775] 脂质纳米颗粒(脂质体)制剂RV01(01)

[0776] 用先前发表的方法[Heyes, J., Palmer, L., Bremner, K., MacLachlan, I. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids. (阳离子脂质饱和和影响包埋核酸的细胞内递送)Journal of Controlled Release, 107:276-287(2005)]合成1,2-二亚油基氧基-N,N-二甲基-3-氨基丙烷(DlinDMA)。1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DSPC)购自基酶公司(Genzyme)。胆固醇获自西格玛-奥德里奇公司(密苏里州圣路易斯)。1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙烯甘油)-2000](铵盐)(PEG DMG 2000)、1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷脂酰乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙烯甘油)-2000](铵盐)获自阿凡提极性脂质制品公司(阿拉巴马州阿拉巴斯特)。

[0777] 在乙醇中配制新鲜的脂质储液。称量37mg DlinDMA、11.8mg DSPC、27.8mg胆固醇和8.07mg PEG DMG 2000并溶于7.55mL乙醇中。37°C温和摇动新鲜配制的脂质储液约15分钟以形成均质混合物。然后将755 μL所述储液加入1.245mL乙醇中形成2mL工作脂质储液。该含量的脂质用于以8:1的N:P(氮比磷)比形成含250 μg RNA的LNP。DlinDMA(所述阳离子脂质)上可质子化的氮和RNA上的磷酸盐用于所述计算。假定每μg自复制RNA分子含3nmol阴离子磷酸盐,假定每μg DlinDMA含1.6nmol阳离子氮。还从100mM柠檬酸缓冲液(pH 6)(加利福尼亚州霍利斯顿的天惠华公司(Teknova))中的约1 μg/μL储液制备2mL RNA工作液。使用前用RNA酶去除(RNase Away)液(加利福尼亚州圣迭戈的分子生物产品公司(Molecular BioProducts))冲洗3个20mL的玻璃瓶(有搅拌棒)并用大量MilliQ水清洗以去除瓶的RNA酶污染。所述瓶之一用于所述RNA工作液,其他的用于收集所述脂质和RNA混合物(如下所述)。工作脂质和RNA溶液在37°C加热10分钟,然后加入3cc鲁尔接口(luer-lok)注射器(新泽西州富兰克林湖的BD医疗公司(BD Medical))。2mL柠檬酸缓冲液(pH 6)加入另一3cc注射器中。含RNA和所述脂质的注射器用FEP管([氟化乙烯-丙烯]2mm ID x 3mm OD,华盛顿州奥克港的艺达思健康科学公司(Idex Health Science))连接T混合器(PEEK™500 μm ID接头,华盛顿州奥克港的艺达思健康科学公司)。所述T混合器的出口也是FEP管(2mm ID x 3mm)。含所述柠檬酸缓冲液的第三注射器接管(2mm ID x 3mm OD)的分离部分。然后用注射泵(型号KDS-220,马萨诸塞州霍利斯顿的KD科学公司(kdScientific))以7mL/分钟的流速驱动所有注射器。所述管出口置成将所述混合物收集到20mL玻璃瓶(搅拌时)。取出搅拌棒并将乙醇/水性溶液室温平衡

1 小时。将 4mL 混合物加入连接部分 FEP 管 (2mm ID x 3mm OD, 华盛顿州奥克港的艺达思健康科学公司) 的 5cc 注射器 (BD 医疗公司) 中, 在另一个连接等长 FEP 管的 5cc 注射器中加入等量 100mM 柠檬酸缓冲液 (pH 6)。用注射泵以 7mL/ 分钟的流速驱动所述两个注射器, 并将最终混合物收集到 20mL 玻璃瓶中 (搅拌时)。之后, 第二混合步骤 (脂质体) 收集的混合物穿过 Mustang Q 膜 (结合并移除阴离子分子的阴离子交换支持物, 获自美国密歇根州安娜堡的波乐公司 (Pall Corporation))。穿过所述脂质体前, 用 4mL 的 1M NaOH、4mL 的 1M NaCl 和 10mL 的 100mM 柠檬酸缓冲液 (pH 6) 依次通过所述 Mustang 膜。穿过所述 mustang 膜前, 脂质体在 37°C 升温 10 分钟。之后, 在回收终产物前, 将脂质体浓缩到 2mL 并使用切向流过滤 (TFF) 系统用 10-15 体积 1X PBS (来自天惠华公司) 透析。所述 TFF 系统和中空纤维素过滤膜购自斯派实验室 (Spectrum Labs) (加利福尼亚州多明格斯牧场 (Rancho Dominguez, CA)) 并按照生产商指南使用。使用 100kD 孔径截止值和 8cm² 面积的聚砜中空纤维素过滤膜 (部件编号 P/N: X1AB-100-20P)。体外和体内实验中, 制剂用 1X PBS (来自天惠华公司) 稀释到所需的 RNA 浓度。

[0778] 制备阳离子乳液 17 (CNE17) 的方法

[0779] 角鲨烯、去水山梨糖醇三油酸酯 (司盘 85) 和聚氧乙烯去水山梨糖醇单油酸酯 (吐温 80) 获自西格玛公司 (美国密苏里州圣路易斯)。1,2-二油酰-3-三甲基铵-丙烷 (DOTAP) 购自类脂公司 (Lipoid) (德国路德维希)。配制阳离子纳米乳液 (CNE) 与加入的 MF59 相似, 如先前描述并略作修改 (Ott 等. *Journal of Controlled Release*, 79(1-3):1-5 (2002))。简单的说, 油可溶性组分 (即角鲨烯、司盘 85、阳离子脂质、脂质表面活性剂) 在烧杯中结合, 脂质组分溶于氯仿 (CHCl₃) 或二氯甲烷 (DCM)。得到的脂质溶液直接加入到油和司盘 85 中。溶剂在通风橱中室温蒸发 2 小时, 然后结合水相并用 IKA T25 匀化器以 24K RPM 均质化所述样品以提供均质原料。原始乳液穿过具有冰浴冷却螺旋微射流 (Microfluidezer) M110S 或 M110PS 均质机 3-5 次, 均质压力为约 15k - 20k PSI (马萨诸塞州牛顿市的微流体公司 (Microfluidics))。从单元中移出 20ml 批料样品并贮存于 4°C。下表描述了 CNE17 的组合物。

[0780] 表 6 :CNE17 的组合物

[0781]

CNE	阳离子脂质 (+)	mg/ml +脂质	表面活性剂	角鲨烯	缓冲液/水
CNE17	DOTAP (DCM 中)	1.40	0.5% 司盘 85 0.5% 吐温 80	4.3%	10mM 柠檬酸缓冲液 pH 6.5

[0782] RNA 络合

[0783] 从所述阳离子脂质浓度计算溶液中氮的量, 例如 DOTAP 每分子有 1 个可质子化的氮。所述 RNA 浓度用于计算溶液中磷酸盐的量, 所用估值为每微克 RNA 约 3nmol 磷酸盐。通过改变 RNA :脂质的量可调节 N/P 比。氮 / 磷比 (N/P) 为 10:1 时 RNA 络合 CNE17。用这些值在无 RNA 酶水中将所述 RNA 稀释到合适的浓度, 并在轻微涡旋时直接加到等体积乳液中。该溶液在室温静置约 2 小时。一旦络合后, 给药前将得到的溶液稀释到需要的浓度。

[0784] 电穿孔

[0785] 电穿孔是递送 pDNA 疫苗的非常有效的方法, 该技术用于递送自复制 RNA。用异氟

烷麻醉小鼠,双后腿几乎刮光以暴露肢上待处理的区域。用 1/2cc 胰岛素注射器将 30 μ l 剂量的疫苗注射到所述后腿的小腿肌肉中。用 Elgen® DNA 递送系统(圣迭戈的因诺公司(Inovio))电穿孔所述肌肉。仪器参数如下:60V,每 60ms² 脉冲。将另一剂量相似地递送到第二肢,然后电穿孔。

[0786] 病毒复制子颗粒 (VRP)

[0787] 为了对比 RNA 疫苗和传统 RNA 载体方法的体内报告基因或抗原表达的实现,我们通过 Perri 等描述的方法使用 BHK 细胞生产的病毒复制子颗粒 (VRP)。本系统中,由源自委内瑞拉马脑炎病毒 (VEEV) 基因组的 α 病毒嵌合复制子 (VCR) 组成的抗原(或报告基因)复制子经遗传工程改造以包含辛德毕斯病毒的 3'末端序列(3'UTR)和辛德毕斯病毒包装信号(PS)(参见 Perri 等的图 2)。通过这些复制子与编码辛德毕斯病毒衣壳和糖蛋白基因的缺陷性辅助 RNA 一起共同电穿孔入幼仓鼠肾(BHK)细胞来将其包装在 VRP 中(参见 Perri 等的图 2)。然后收获所述 VRP 并用标准方法滴定,并在培养液体或其他等渗缓冲液中接种到动物内。Perri S, Greer CE, Thudium K, Doe B, Legg H, Liu H, Romero RE, Tang Z, Bin Q, 小Dubensky TW, 等(2003) An alphavirus replicon particle chimera derived from venezuelan equine encephalitis and sindbis viruses is a potent gene-based vaccine delivery vector. (源自委内瑞拉马脑炎和辛德毕斯病毒的 α 病毒复制子颗粒嵌合体是有效的基于基因的疫苗递送载体) J Virol 77:10394-10403

[0788] RSV F 三聚体亚基疫苗

[0789] 所述 RSV F 三聚体是含 RSV F 胞外域的重组蛋白,该 RSV F 胞外域缺失所述融合肽区域以阻止结合其他三聚体。如尺寸排阻色谱所观察到的,得到的构建体形成均质的三聚体,且具有与电子显微镜观察到的融合后 F 构型一致的预期表型。所述蛋白在昆虫细胞中表达并用融合所述构建体 C 末端的 HIS 标记纯化,然后用常规技术进行尺寸排阻色谱。得到的蛋白样品表现出超过 95% 的纯度。为了 F 亚基疫苗的体内评价,使用 pH6.3 且用氯化钠调节至与 150mM 等渗的 10mM 组氨酸缓冲液将 100 μ g/mL 三聚体蛋白吸收在 2mg/mL 明矾上。2-8 $^{\circ}$ C 搅拌温和过夜使 F 亚基蛋白吸收到明矾上。所述最终疫苗的 pH 和渗透压设定为 6.5-7.5 和 240-360mOsm/kg。所述疫苗用 SDS-PAGE(美国英杰集团公司(Invitrogen Corporation))表征蛋白吸收,并用 LAL 实验(美国查尔斯河实验室(Charles River Laboratories))表征内毒素含量。免疫接种前通过温和转化来混合所述疫苗。

[0790] 鼠免疫原性研究

[0791] 10 只 8-10 周龄且重约 20 克的雌 BALB/c 小鼠组在第 0 天和第 21 天免疫接种,第 14、35 和 49 天提取血液。所有动物双后腿四头肌各注射等体积(每处 50 μ l)共 100 μ l 疫苗以递送 10 μ g 抗原剂量。当需要检测 T 细胞应答时,在第 35 天或 49 天收获脾脏。

[0792] 棉鼠的疫苗接种和攻击

[0793] 雌性棉鼠(刚毛棉花鼠(Sigmodon hispidis))获自哈伦实验室(Harlan Laboratories)。所有实验依照诺华动物保护和使用委员会批准和进行。在第 0 天和第 21 天,动物组肌肉内免疫接种(肌内(i.m.))100 μ l 指定的疫苗。每次免疫接种后 2 周收集血清样品。第一次免疫后 4 周用 1×10^5 PFU RSV 鼻内(i.n.)攻击免疫或未免疫接种的对照动物。3%异氟烷麻醉下用精密蒸发器进行血液收集和 RSV 攻击。

[0794] 小鼠 T 细胞功能实验

[0795] 细胞内细胞因子免疫荧光实验

[0796] 收集来自相同免疫的 BALB/c 小鼠的 2-5 个脾脏,并制备单细胞悬浮液用于培养。建立 2 种抗原刺激培养物和 2 种未刺激培养物用于各脾细胞库。抗原刺激的培养物含 1×10^6 脾细胞、RSV F 肽 85-93 (1×10^{-6} M)、RSV F 肽 249-258 (1×10^{-6} M)、RSV F 肽 51-66 (1×10^{-6} M)、抗 CD28mAb (1mcg/mL) 和布雷菲德菌素 A (Brefeldin A) (1:1000)。未刺激的培养物不含 RSV 肽,其他和所述刺激的培养物相同。37°C 培养 6 小时后,加工培养物用于免疫荧光。清洗细胞,然后用荧光标记的抗 CD4 和抗 CD8 单克隆抗体 (mAb) 染色。再次清洗细胞,然后用细胞固定 / 细胞通透剂 (Cytotfix/cytoperm) 固定 20 分钟。然后用 Perm 洗涤缓冲液清洗该固定细胞,随后用荧光标记的 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 和 IL-5 特异性 mAb 染色。清洗染色细胞,然后在 LSR II 流式细胞仪上分析。用 FlowJo 软件分析所得数据。分别分析 CD4+8- 和 CD8+4-T 细胞子集。在给定样品的各子集中,检测细胞因子阳性细胞%。RSV F 抗原特异性 T 细胞% 计算为抗原刺激的培养物中细胞因子阳性细胞% 和未刺激的培养物中细胞因子阳性细胞% 的差异。用标准方法 (Statistical Methods 《统计方法》第 7 版, G. W. Snedecor 和 W. G. Cochran) 确定抗原特异性细胞% 的 95% 置信界限。

[0797] 分泌细胞因子实验

[0798] 分泌细胞因子实验的培养物与用于细胞内细胞因子免疫荧光实验的相似,除了省略布雷菲德菌素 A。37°C 过夜培养后收集培养物上清液,并用美索规模发现公司 (Meso Scale Discovery) 的小鼠 Th1/Th2 细胞因子试剂盒分析多种细胞因子。每种培养物中各细胞因子的量从标准曲线中确定,所述标准曲线用生产商提供的纯化的重组细胞因子产生。

[0799] RSV F- 特异性 ELISA

[0800] 通过酶联免疫吸附实验 (ELISA) 分析个体血清样品中 RSV F 特异 IgG 性存在。用溶于 PBS 的 $1 \mu\text{g/ml}$ 纯化 RSV F (delp23-furdel- 截短未切割) 在 4°C 过夜包被 ELISA 板 (MaxiSorp 96 孔, 纽恩克公司)。清洗 (含 0.1% 吐温 -20 的 PBS) 后,在 37°C 用溶于 PBS 的 Superblock 封闭缓冲液 (赛默科技公司 (Thermo Scientific)) 封闭板至少 1.5 小时。然后清洗所述板,加入实验稀释剂 (含 0.1% 吐温 -20 和 5% 山羊血清的 PBS) 中实验或对照棉鼠的血清连续稀释物,并将板在 37°C 孵育 2 小时。清洗后,用马辣根过氧化物酶 (HRP) - 偶联的鸡抗棉鼠 IgG (免疫学咨询实验室公司 (Immunology Consultants Laboratory, Inc), 实验稀释剂中 1:5,000 稀释) 在 37°C 孵育所述板 1 小时。最后,清洗所述板并在各孔中加入 $100 \mu\text{l}$ TMB 过氧化物酶底物溶液 (柯克加德和佩里实验室公司 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc))。通过添加 $100 \mu\text{l}$ 1M H_3PO_4 终止反应,并用读板仪读取 450nm 的吸光度。对各血清样品,通过非线性回归 (GP 公司 (GraphPad Prism)) 产生光密度 (OD) 与血清稀释度倒数的对数曲线。效价定义为约 0.5OD 时血清稀释度的倒数 (根据来自 RSV 感染棉鼠的标准、合并血清归一化,效价定义为 1:2500,其包括在每个板上)。

[0801] 微中和实验

[0802] 用空斑减少中和测试 (PRNT) 检测血清样品中是否存在中和抗体。将 HI 血清的 2 倍连续稀释物 (在含 5% HI-FBS 的 PBS 中) 加入等体积的预先滴定以达到约 115PFU/25 μl 的 RSV Long 中。37°C 和 5% CO₂ 下孵育血清 / 病毒混合物 2 小时以发生病毒中,然后将 25 μl 该混合物 (含约 115PFU) 接种到 96 孔板中 HEp-2 细胞的两重孔上。37°C 和 5% CO₂ 持续 2 小时后,用 0.75% 甲基纤维素 / EMEM 5% HI-FBS 覆盖所述细胞并孵育 42 小时。通

过用免疫染色检测合胞体形成然后自动计数来确定感染性病毒颗粒的数量。中和效价定义为相对对照（无血清），产生每孔至少 60% 合胞体数量减少的血清稀释度的倒数。

[0803] 病毒负荷

[0804] 通过空斑实验检测肺中的病毒负荷。具体地说，RSV 感染后 5 天收集肺，将一个右叶放入含 25% 蔗糖的 2.5ml 达氏修正伊氏培养基 (DMEM, 英杰公司) 并用组织匀化器破碎。来自这些样品的无细胞上清保存于 -80°C 。为了分析感染性病毒，澄清的肺匀浆稀释物 (含 5% 热灭活的胎牛血清 HI-FBS 的 PBS 中) 以 $200\ \mu\text{l}$ /孔的体积接种在 12 孔板的融合 HEp-2 细胞单层上。周期性温和摇动 (37°C , 5% CO_2) 2 小时后移除接种物, 用 1.5ml 溶解于补充有 5% HI-FBS、谷氨酰胺和抗体的 Eagle 极限必需培养基 (EMEM, 龙沙公司 (Lonza)) 中的 1.25% SeaPlaque 琼脂糖 (龙沙公司) 覆盖细胞。孵育 3-4 天后, 再次用 1ml 溶于含 0.1% 中性红 (西格玛公司) 的 EMEM (西格玛公司) 中的 1.25% 琼脂糖覆盖细胞。一天后在光盒协助下计数空斑。

[0805] 棉鼠肺病理学

[0806] RSV 攻击 5 天后收集肺, 用 10% 中性缓冲福尔马林 (NBF) 通过温和鼻内灌注然后浸没固定收集并固定每只动物的 4 叶。组织经常规加工以制备显微镜检验所用的苏木精和伊红染色切片。用先前发表标准 [Prince GA, 等, 2001] 的改良评价发现, 参数如下: 细支气管周炎 (peribronchiolitis)、肺泡炎、支气管炎、血管周围细胞浸润和间质性肺炎。损伤按 4 分半定量表分级。最小 (+) 变化包括一或很少小灶点; 轻度 (++) 变化由小-中等大小灶点组成; 中度 (+++) 变化含频繁和 / 或中等大小灶点; 和显著 (++++) 变化显示影响大多数 / 所有组织的大量到融合的灶点。

[0807] 实施例 7

[0808] A - 棉鼠 RSV 攻击研究 (CRIS14)

[0809] 本实验使用表达 RSV 表面融合糖蛋白 (RSV-F) 的 A317 复制子。棉鼠 (刚毛棉花鼠 (*Sigmodon hispidus*)), 每组 8 只, 第 0 天和第 21 天进行双侧肌肉内免疫接种 ($50\ \mu\text{L}$ /腿) 裸露自复制 RNA (A317, $1\ \mu\text{g}$ 或 $10\ \mu\text{g}$)、LNP 中配制的自复制 RNA [RV01 (01), A317, $0.1\ \mu\text{g}$ 或 $1\ \mu\text{g}$]、表达 RSV-F 的 VRP (5×10^6 IU)、F- 三聚体 / 明矾亚基 ($10\ \mu\text{g}$)、或福尔马林灭活的 RSV 疫苗 (5200FI-pfu)。第 14 天 (2wp1) 和 35 天 (2wp2) 收集血清用于抗体分析。第 49 天用 1×10^5 pfu RSV 鼻内攻击所有动物并在第 54 天 (5dpc) 收集肺用于检测病毒负荷和肺病理学。

[0810] 结果

[0811] 表 7: 第 14 天和 35 天的 F- 特异性血清 IgG 效价

[0812]

疫苗	剂量	F-特异性 IgG	F-特异性 IgG
		2wp1	2wp2
A317	10 µg	198	1599
A317	1 µg	78	526
CNE17	1 µg	408	4918
CNE17	0.1 µg	325	2512
RV01(01)	1 µg	531	4351
RV01(01)	0.1 µg	134	1033
VRP	5x10 ⁶ IU	961	5864
F-三聚体/明矾	10 µg	3526	111893
FI-RSV	5200 FI-pfu	17	2074
无		5	5

[0813] 表 7 第 0 天和 21 天肌肉内免疫后, 每组 8 只的棉鼠 (刚毛棉花鼠 (*Sigmodon hispidus*)) 的 F 特异性血清 IgG 效价。在第 14 天 (2wp1) 和 35 天 (2wp2) 收集血清用于抗体分析, 第 49 天用 1×10^5 pfu RSV 鼻内攻击所有动物。第 54 天 (5dpc) 收集肺用于检测病毒负荷和肺病理学。数据用每组 8 只个体棉鼠的几何平均效价表示。若个体动物效价 < 25 (检测界限), 则其效价为 5。

[0814] 表 8 : 第 14 天和 35 天的 RSV 血清中和效价

[0815]

疫苗	剂量	PRNT60	PRNT60
		2wp1	2wp2
A317	10 µg	78	240
A317	1 µg	58	70
CNE17	1 µg	91	269
CNE17	0.1 µg	63	145
RV01(01)	1 µg	103	667
RV01(01)	0.1 µg	46	130
VRP	5×10^6 IU	149	683
F-三聚体/明矾	10 µg	142	>5120
FI-RSV	5200 FI-pfu	28	38
无		30	<20

[0816] 表 8 第 0 天和 21 天肌肉内免疫后, 每组 8 只的棉鼠 (刚毛棉花鼠 (*Sigmodon hispidus*)) 的 RSV 血清中和效价。在第 14 天 (2wp1) 和 35 天 (2wp2) 收集血清用于分析。数据用 60% 空斑减少中和效价表示。4 只棉鼠 / 组的 2 个实验库的几何平均效价。若个体动物效价 < 25 (检测界限), 则其效价为 5。

[0817] 表 9: RSV 攻击 5 天后的肺病毒效价

[0818]

疫苗	剂量	pfu/g 肺 5dpc
A317	10 μ g	397
A317	1 μ g	659
CNE17	1 μ g	414
CNE17	0.1 μ g	572
RV01(01)	1 μ g	445
RV01(01)	0.1 μ g	716
VRP	5×10^6 IU	359
F-三聚体/明矾	10 μ g	190
FI-RSV	5200 FI-pfu	5248
无 (攻击)		728618

[0819] 表 9 :第 0 天和 21 天肌肉内免疫后,每组 8 只的棉鼠 (刚毛棉花鼠 (*Sigmodon hispidus*)) 的 RSV 攻击 5 天后肺病毒效价。第 49 天用 1×10^5 pfu RSV 鼻内攻击所有动物。第 54 天 (5dpc) 收集肺用于检测病毒负荷和肺病理学。数据用空斑实验检测的空斑形成单位 / 克肺表示。8 只个体棉鼠 / 组的几何平均效价在效价 <200 (检测界限) 的个体动物中,其效价为 100。

[0820] 表 10 :RSV 攻击 5 天后的肺肺炎分值

[0821]

疫苗	剂量	具有所示肺炎分值的棉鼠#				
		0	1	2	3	4
A317I	10 μ g	8				
A317I	1 μ g	8				
CNE17	1 μ g	8				
CNE17	0.1 μ g	7	1			
RV01(01)	1 μ g	6	2			
RV01(01)	0.1 μ g	8				
VRP	5×10^6 IU	3	4	1		
F-三聚体/明矾	10 μ g	7	1			
FI-RSV	5200 FI-pfu	1	4	3		
无 (攻击)		5	3			

[0822] 表 10 第 0 天和 21 天肌肉内免疫后,每组 8 只的棉鼠 (刚毛棉花鼠 (*Sigmodon hispidus*)) 的 RSV 攻击 5 天后的肺炎。第 49 天用 1×10^5 pfu RSV 鼻内攻击所有动物。第 54 天 (5dpc) 收集肺用于检测病毒负荷和肺病理学。损伤按 4 分半定量表分级。最小 (1) 变化包括一个或很少小灶点;轻度 (2) 变化由小-中等大小灶点组成;中度 (3) 变化含频繁和 / 或中等大小灶点;和显著 (4) 变化显示影响大多数 / 所有组织的大量到融合的灶点。

[0823] 结论

[0824] 本发明的一个目的是确定棉鼠 RSV 模型中复制子 RNA 的免疫原性和保护能力。另一目的是评价脂质体和 CNE17 制剂对疫苗免疫原性和功效的影响。未配制的复制子 RNA 在一次疫苗接种后诱导血清 F 特异性 IgG 和 RSV 中和抗体,且此应答被第二次疫苗接种加强。此模型中脂质体和 CNE17 制剂效果相似,在第二次免疫接种后使 F 特异性 IgG 效价对 1 μ g

复制子 RNA 加强约 8 倍且中和效价加强 4-10 倍（分别为 CNE17 和脂质体）。5 天后检测时，所有复制子 RNA 疫苗提供保护免受鼻 RSV 攻击，降低肺病毒负荷超过 3 个数量级。脂质体制配的 1 μ g 复制子 RNA 产生的免疫应答的程度和保护能力在 5×10^6 VRP 引发的应答的 2 倍之内。在本研究测试的任何疫苗制剂的攻击下，所述明矾辅助的三聚体亚基在肺中产生最高的总抗 F IgG ELISA 效价，产生最高的中和效价，并产生最大程度的保护抵御 RSV 效价。

[0825] 实施例 7B - RSV-F 免疫原性研究 (10-1001)

[0826] 本实验使用表达 RSV 表面融合糖蛋白 (RSV-F) 的 A317 复制子。每组 10 只的 BALB/c 小鼠在第 0 天和第 21 天双侧肌肉内免疫接种 (50 μ L/ 腿) 表达 RSV-F 的 VRP (1×10^6 IU)、裸露自复制 RNA (A317, 1 μ g)、用电穿孔递送的自复制 RNA (A317, 10 μ g)、脂质体中配制的自复制 RNA [RV01 (01), A317, 0.1 μ g 或 1 μ g] 和用 CNE17 配制的自复制 RNA (A317, 0.1 μ g 或 1 μ g)。在第 14 天 (2wp1)、35 天 (2wp2) 和 49 天 (4wp2) 收集血清用于抗体分析。第 49 天 (4wp2) 从每组 5 只小鼠中收获脾脏用于 T 细胞分析。

[0827] 结果

[0828] 表 11 : 第 14 天的 F 特异性血清 IgG 效价

[0829]

1 μ g A317	0.1 μ g RV01(01)	1 μ g RV01(01)	0.1 μ g CNE17	1 μ g CNE17	10 μ g A317 + EP	1E6 IU VRP
529	14385	19299	2429	3373	5	6041
1530	10713	19170	2060	4417	88	4912
2734	12756	13860	2012	1927	964	12923
2503	11546	17352	1887	3597	7235	7075
5539	15300	22094	3174	5731	2558	6829
1033	14072	21213	3904	2852	5105	4885

[0830]

	5110	18274	17915	1481	3739	9806	3680
	1106	7873	15659	2345	4904	2787	9813
	1493	17175	6669	3084	3824	2576	8631
	3456	19730	13259	2497	3004	1858	6314
GMT	1980	13731	15903	2398	3590	1180	6685

[0831] 表 11 (10-1001) 肌肉免疫接种 14 天后的每组 10 只小鼠的 F 特异性血清 IgG 效价。数据用个体小鼠的效价和每组 10 只个体小鼠的几何平均效价表示。若个体动物效价 < 25 (检测界限)，则其效价为 5。

[0832] 表 12 : 第 35 天的 F 特异性血清 IgG 效价

[0833]

1 μg A317	0.1 μg RV01(01))	1 μg RV01(01))	0.1 μg CNE17	1 μg CNE17	10 μg A317 + EP	1E6 IU VRP	
958	128208	227021	48079	8473	14612	813045	
12518	191729	212911	17589	58556	22805	365485	
4839	315786	303987	8522	12053	32156	961601	
10128	218147	335071	10985	20395	24090	349215	
18451	225622	155893	30801	51514	31053	297526	
9805	182693	519162	13372	26348	18105	207652	
19154	185342	169332	5137	80686	23918	158006 6	
4490	82744	489441	47173	21014	9091	900889	
14674	190010	131361	78232	61076	21006	822285	
15223	553164	254500	24135	25499	9835	587121	
GMT	8532	201892	253687	20767	29111	19117	579033

[0834] 表 12(10-1001) 第 0 和 21 天肌肉免疫接种后的每组 10 只小鼠的 F 特异性血清 IgG 效价。第 35 天 (2wp2) 收集血清用于抗体分析。数据用个体小鼠的效价和每组 10 只个体小鼠的几何平均效价表示。若个体动物效价 <25(检测界限制), 则其效价为 5。

[0835] 表 13 :第 49 天的 F 特异性血清 IgG 效价

[0836]

1 μg A317	0.1 μg RV01(01)	1 μg RV01(01)	0.1 μg CNE17	1 μg CNE17	10 μg A317 + EP	1E6 IU VRP	
1248	140407	133787	52747	34245	30388	366771	
12441	155669	182995	29352	128030	20768	209400	
4967	203059	211020	10857	17016	53763	360615	
14536	134253	488698	28800	57250	28373	191475	
31556	370726	158816	44613	76576	34318	139148	
13815	184738	185184	20314	42357	35736	63839	
20495	141644	103026	4546	101445	34611	192101	
4800	76711	312096	27476	47285	10138	177858	
19159	143275	139811	68386	55865	23958	130218	
26836	479594	230331	24360	52871	13624	174378	
GMT	10947	177168	194350	24891	53615	25888	180420

[0837] 表 13(10-1001) 第 0 和 21 天肌肉免疫接种后的每组 10 只小鼠的 F 特异性血清 IgG 效价。第 49 天 (4wp2) 收集血清用于抗体分析。数据用个体小鼠的效价和每组 10 只个体小鼠的几何平均效价表示。若个体动物效价 <25(检测界限), 则其效价为 5。

[0838] 表 14 :第 35 天的 RSV 血清中和效价

[0839]

A317, 1 μ g	RV01(01)) 0.1 μ g	RV01(01)) 1 μ g	CNE1 7 0.1 μ g	CNE1 7 1 μ g	VRP 1E6 IU	
2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	2wp2	
NA	143	106	NA	NA	265	
NA	272	62	NA	NA	73	
NA	294	<40	NA	NA	77	
NA	814	334	NA	NA	140	
NA	67	86	NA	NA	290	
NA	420	125	NA	NA	134	
NA	<40	566	NA	NA	466	
NA	104	292	NA	NA	127	
NA	241	<40	NA	NA	75	
NA	223	44	NA	NA	77	
GMT	NA	176	96	NA	NA	139

[0840] 表 14 : (10-1001) 第 0 和 21 天肌肉免疫接种后的每组 10 只小鼠的 RSV 血清中和效价。第 35 天 (2wp2) 收集血清用于分析。数据用个体小鼠的 60% 空斑减少中和效价和每组 10 只个体小鼠的几何平均效价表示。若个体动物效价 <40 (检测界限), 则其效价为 20。NA = 无分析

[0841] 表 15 : 第 49 天的 RSV 血清中和效价

[0842]

A317, 1 μ g	RV01(01)) 0.1 μ g	RV01(01)) 1 μ g	CNE1 7 0.1 μ g	CNE1 7 1 μ g	VRP 1E6 IU	
4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	4wp2	
<40	194	82	<40	<40	161	
<40	272	165	<40	70	64	
<40	142	<40	<40	<40	126	
<40	881	442	<40	76	151	
<40	61	108	42	57	194	
<40	426	156	52	<40	123	
<40	78	814	<40	<40	1033	
<40	<40	291	173	<40	174	
<40	246	103	<40	<40	122	
<40	574	396	<40	<40	76	
GMT	<40	231	215	29	29	155

[0843] 表 15 : (10-1001) 第 0 和 21 天肌肉免疫接种后的每组 10 只小鼠的 RSV 血清中和效价。第 49 天 (4wp2) 收集血清用于分析。数据用个体小鼠的 60% 空斑减少中和效价和每组 10 只个体小鼠的几何平均效价表示。若个体动物效价 <40 (检测界限), 则其效价为 20。

NA = 无分析

[0844] 表 16 : 第 49 天的 T 细胞应答

[0845]

4wp2 脾 CD4 T 细胞应答	CD4+CD8-脾 T 细胞: RSV F51-66 肽的细胞因子阳性和特异性%			
	IFN γ +	IL2+	IL5	TNF α +
VRP 1E6 IU	0.07 \pm 0.06	0.04 \pm 0.05	0.00 \pm 0.02	0.10 \pm 0.04
1 μ g A317	0.00 \pm 0.05	0.05 \pm 0.04	0.00 \pm 0.01	0.03 \pm 0.02
RV01(01) 1 μ g	0.04 \pm 0.06	0.07 \pm 0.05	0.00 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03
RV01(01) 0.1 μ g	0.06 \pm 0.05	0.08 \pm 0.04	0.00 \pm 0.01	0.10 \pm 0.03
CNE17 1 μ g	0.00 \pm 0.05	0.04 \pm 0.04	0.00 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02
CNE17 0.1 μ g	0.00 \pm 0.05	0.02 \pm 0.04	0.00 \pm 0.01	0.02 \pm 0.02
10 μ g vA317 + EP	0.02 \pm 0.06	0.04 \pm 0.04	0.01 \pm 0.01	0.05 \pm 0.03
无	0.04 \pm 0.06	0.00 \pm 0.05	0.00 \pm 0.02	0.00 \pm 0.01

[0846] 表 16 (10-1001) 第 49 天 (4wp2) RSV F 特异性 CD4+ 脾 T 细胞的频率。显示的是净 (抗原特异的) 细胞因子阳性频率 (%) \pm 95% 置信半区间。粗体显示的净频率表示统计上显著 >0 的刺激应答。

[0847] 表 17 : 第 49 天的 T 细胞应答

[0848]

4wp2 脾 CD8 T 细胞应答	CD4+CD8-脾 T 细胞: RSV F 肽 F85-93 和 F249-258 的细胞因子阳性和特异性%
-------------------	--

[0849]

	IFN γ +	IL2+	IL5	TNF α +
VRP 1E6 IU	3.48 \pm 0.29	1.21 \pm 0.18	-0.03 \pm 0.05	3.31 \pm 0.28
1 μ g A317	0.74 \pm 0.15	0.46 \pm 0.11	-0.03 \pm 0.04	0.70 \pm 0.14
RV01(01) 1 μ g	3.69 \pm 0.28	1.43 \pm 0.18	-0.01 \pm 0.04	3.44 \pm 0.27
RV01(01) 0.1 μ g	2.52 \pm 0.23	1.10 \pm 0.15	0.03 \pm 0.03	2.31 \pm 0.22
CNE17 1 μ g	1.25 \pm 0.17	0.60 \pm 0.12	0.01 \pm 0.03	1.15 \pm 0.16
CNE17 0.1 μ g	0.89 \pm 0.15	0.49 \pm 0.11	-0.03 \pm 0.04	0.83 \pm 0.14
10 μ g A317 + EP	0.85 \pm 0.15	0.53 \pm 0.11	0.01 \pm 0.04	0.72 \pm 0.15
无	0.01 \pm 0.07	0.00 \pm 0.05	-0.02 \pm 0.05	0.02 \pm 0.06

[0850] 表 17 (10-1001) 第 49 天 (4wp2) RSV F 特异性 CD8+ 脾 T 细胞的频率。显示的是净 (抗原特异的) 细胞因子阳性频率 (%) \pm 95% 置信半区间。粗体显示的净频率表示统计上显著 >0 的刺激应答。

[0851] 结论

[0852] 与所述裸露 RNA 对照相比, 脂质体制剂显著提高了免疫原性, 如 F 特异性 IgG 效价 (8-30 倍的增加)、中和效价、和 CD4 及 CD8 T 细胞应答的增加所测得。令人惊讶的是, 0.1 和 1.0 μ g 剂量的 RV01(01) 的 F 特异性 IgG 效价和中和效价与 VRP (1×10^6 IU) 相等。LNP 制剂的 T 细胞应答在更高的剂量时与 VRP (1×10^6 IU) 相等。与所述裸露 RNA 对照相比, 用 CNE17 配制自复制 RNA 显著提高了免疫原性, 如 F 特异性 IgG 效价 (2-5 倍的增加)、中和效价、和 CD4 和 CD8 T 细胞应答的增加所测得。相对所述裸露 RNA 对照, RNA 电穿孔免疫原性升高,

但显著低于脂质体递送。

[0853] 实施例 7C - RSV-F 免疫原性研究 (10-1018)

[0854] 本实验使用表达 RSV 表面融合糖蛋白 (RSV-F) 的 A317 复制子。每组 8 只的 BALB/c 小鼠在第 0 天和第 21 天双侧肌肉内免疫接种 (50 μ L/ 腿) 表达 RSV-F 的 VRP (1×10^6 IU)、裸露自复制 RNA (A306, 1、0.1、0.01 μ g) 和脂质体中配制的自复制 RNA (RV01 (01), 用方法 1 (A317, 10.0、1.0、0.1、0.01 μ g))。在第 14 天 (2wp1) 天和 (2wp2) 收集血清用于抗体分析。第 49 天 (4wp2) 从每组 5 只小鼠中收获脾脏用于 T 细胞分析。

[0855] 结果

[0856] RV01 (01) 脂质体制剂的 Z 平均颗粒直径为 158nm, 多分散性指数为 0.14, 包埋功效为 96%。第 14 天和 35 天 F- 特异性血清 IgG 效价示于表 18 和 19, 第 49 天的 T 细胞应答示于表 20 和 21。

[0857] 表 18 : 第 14 和 35 天的 F 特异性血清 IgG 效价

[0858]

VRP 1E6 IU		A317					
		1 μ g		0.1 μ g		0.01 μ g	
2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2
6334	39539	772	4687	5	2334	143	1377
1500	14895	5	142	5	161	5	333
5450	38252	109	2972	5	145	5	5
1835	12831	5	3674	5	97	5	5
2277	30326	5	5003	5	1077	5	175
2818	33437	663	8258	221	457	5	5
2405	22551	257	845	5	1558	5	456
2137	19179	5	1765	5	5	5	180
GMT	2735	24427	41	2144	8	259	73

[0859] 表 18 : (10-1018) 第 0 和 21 天肌肉免疫接种后的每组 8 只小鼠的 F 特异性血清 IgG 效价。第 14 天 (2wp1) 和 35 天 (2wp2) 收集血清用于抗体分析。数据用个体小鼠和每组 8 只个体棉鼠的几何平均效价表示。若个体动物效价 < 25 (检测界限), 则其效价为 5。

[0860] 表 19 : 第 14 和 35 天的 F 特异性血清 IgG 效价

[0861]

RV01(01)								
10 µg		1 µg		0.1 µg		0.01 µg		
2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	2wp1	2wp2	
5880	82689	7255	45018	4072	22174	619	2872	
6126	42529	3009	22288	3974	27730	474	3603	
8069	76263	5385	23561	3272	15328	914	2692	
5966	108234	4148	53675	3968	24456	2011	11542	
8590	57912	4210	37004	4950	13014	903	4684	
7172	74162	2179	24179	2856	13694	1575	6720	
8072	122796	1640	5994	4073	17849	438	16514	
8706	83601	5725	28760	3797	17342	1058	13665	
GMT	7235	77338	3783	25790	3826	18325	879	6235

[0862] 表 19 : 上接 23A。(10-1018) 第 0 和 21 天肌肉免疫接种后的每组 8 只小鼠的 F 特异性血清 IgG 效价。在第 14 天 (2wp1) 和 35 天 (2wp2) 收集血清用于抗体分析。数据用个体动物和每组 8 只个体棉鼠的几何平均效价 (GMT) 表示。若个体动物效价 <25 (检测界限), 则其效价为 5。

[0863] 表 20 : 第 49 天的 T 细胞应答

[0864]

4wp2 脾 T 细胞应答	CD4+CD8-脾 T 细胞: RSV F51-66 肽的细胞因子阳性和特异性%			
	IFN γ +	IL2+	IL5	TNF α +
VRP 1E6 IU	0.00 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.00 ± 0.01	0.07 ± 0.03
1 µg A317	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.00 ± 0.01	0.03 ± 0.02
0.1 µg A317	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
0.01 µg A317	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01
RV01(01), 10 µg	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.02
RV01(01), 1 µg	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.00 ± 0.01	0.09 ± 0.02
RV01(01), 0.1 µg	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.03 ± 0.02
RV01(01), 0.01 µg	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02
无	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01

[0865] 表 20 第 49 天 (实验 10-1018, 4wp2) RSV F 特异性 CD4+ 脾 T 细胞的频率。显示的是净 (抗原特异的) 细胞因子阳性频率 (%) ± 95% 置信半区间。粗体显示的净频率表示统计上显著 >0 的刺激应答。

[0866] 表 21 : 第 49 天的 T 细胞应答

[0867]

4wp2 脾 T 细胞 应答	CD4+CD8-脾 T 细胞: RSV F 肽 F85-93 和 F249-258 的细胞因子阳性和特异性%			
	IFN γ +	IL2+	IL5	TNF α +
VRP 1E6 IU	2.45 \pm 0.21	0.58 \pm 0.10	0.00 \pm 0.01	2.64 \pm 0.21
1 μ g A317	1.68 \pm 0.17	0.45 \pm 0.09	0.00 \pm 0.02	1.75 \pm 0.18
0.1 μ g A317	0.21 \pm 0.07	0.08 \pm 0.04	0.01 \pm 0.02	0.30 \pm 0.08
0.01 μ g A317	0.06 \pm 0.05	0.05 \pm 0.03	0.01 \pm 0.02	0.16 \pm 0.06
RV01(01), 10 μ g	3.32 \pm 0.23	0.69 \pm 0.11	0.00 \pm 0.02	3.90 \pm 0.25
RV01(01), 1 μ g	1.81 \pm 0.17	0.59 \pm 0.10	0.00 \pm 0.02	2.04 \pm 0.20
RV01(01), 0.1 μ g	0.91 \pm 0.12	0.32 \pm 0.07	0.00 \pm 0.01	1.06 \pm 0.14
RV01(01), 0.01 μ g	0.58 \pm 0.10	0.33 \pm 0.08	0.00 \pm 0.01	0.64 \pm 0.11
无	0.01 \pm 0.02	0.01 \pm 0.01	0.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.05

[0868] 表 21 第 49 天 (实验 10-1018, 4wp2) F 特异性脾 CD8⁺T 细胞的频率。显示的是净 (抗原特异的) 细胞因子阳性频率 (%) \pm 95% 置信半区间。粗体显示的净频率表示统计上显著 >0 的刺激应答。

[0869] 结论

[0870] 与所述裸露 RNA 对照相比, 脂质体制剂显著提高了免疫原性, 如 F 特异性 IgG 效价和 T 细胞频率的增加所测得。10 μ g RNA 剂量下 RV01(01) 的 F 特异性 IgG 效价和 CD8 T 细胞频率比 VRP 组 (1×10^6 IU) 高。

[0871] 其他参考文献

[0872] 下述参考文献通过引用全文纳入本文。

[0873] 1. Fields Virology. (《菲尔兹病毒学》) 第四版, 2001.

[0874] 2. Snell 等. (1997) Virus Genes 14:63-72.

[0875] 3. Bembridge 等. (1999) J Virol 73:10086-10094.

[0876] 4. Li 等. (1998) J Exp Med 188:681-688

[0877] 5. 美国专利号 6, 060, 308.

[0878] 6. Yin 等. (2006) Nature 439:38-45.

[0879] 7. Kim 等. (2007) J Med Virol 79:820-828.

[0880] 8. Yin 等. (2005) Proc Natl Acad Sci USA. 102(26):9288-93.

[0881] 9. Chen 等. (2004) J Virol 78:4508-16.

[0882] 10. Yang 等. (2002) J Virol 76:4634-42.

[0883] 11. Harbury 等. (1993) Science 262:1401-1407.

[0884] 12. Stevens 等. (2004) Science 303:1866-70.

[0885] 13. Burkhard 等. (2001) Trends Cell Biol 11:82-88.

[0886] 14. Creighton, Proteins 《蛋白》第 5.5.2 节 (ISBN 0-7167-2317-4).

[0887] 15. Yu (2002) Adv Drug Deliv Rev 54:1113-1129.

[0888] 16. Muller 等. (2000) Methods Enzymol 328:261-282.

[0889] 17. Beck 和 Brodsky (1998) J Struct Biol 122:17-29.

- [0890] 18. Lupas(1996)Trends Biochem Sci 21:375-382.
- [0891] 19. Adamson 等.(1993)Curr Opin Biotechnol 4:428-347.
- [0892] 20. Kammerer(1997)Matrix Biol 15:555-568.
- [0893] 21. Chao 等.(1998)J Chromatog B Biomed Sci Appl 715:307-329.
- [0894] 22. Arndt 等.(2002)Structure 10:1235-1248.
- [0895] 23. Liu 和 Lu(2002)J Biol Chem 277:48708-48713.
- [0896] 24. W02006/011060.
- [0897] 25. Creighton, Proteins 《蛋白》第 5.5.3 节 (ISBN 0-7167-2317-4).
- [0898] 26. Zhang 和 Chen(1999)J Biol Chem 274:22409-22413.
- [0899] 27. Slovic 等.(2003)Protein Sci 12:337-348
- [0900] 28. Gardner 和 Dutch(2007)J Virol 81:8303-14.
- [0901] 29. Gennaro(2000)Remington:The Science and Practice of Pharmacy. (《雷明登：药物科学与实践》) 第 20 版, ISBN:0683306472.
- [0902] 30. Nony 等.(2001)Vaccine 27:3645-51.
- [0903] 31. Greenbaum 等.(2004)Vaccine 22:2566-77.
- [0904] 32. Zurbriggen 等.(2003)Expert Rev Vaccines 2:295-304.
- [0905] 33. Piascik(2003)J Am Pharm Assoc (Wash DC). 43:728-30.
- [0906] 34. Mann 等.(2004)Vaccine 22:2425-9.
- [0907] 35. Halperin 等.(1979)Am J Public Health 69:1247-50.
- [0908] 36. Herbert 等.(1979)J Infect Dis 140:234-8.
- [0909] 37. Chen 等.(2003)Vaccine 21:2830-6.
- [0910] 38. 美国专利号 6355271.
- [0911] 39. W000/23105.
- [0912] 40. 美国专利号 5,057,540.
- [0913] 41. W096/33739.
- [0914] 42. EP-A-0109942.
- [0915] 43. W096/11711.
- [0916] 44. W000/07621.
- [0917] 45. Barr 等.(1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32:247-271.
- [0918] 46. Sjolanderet 等.(1998)Advanced Drug Delivery Reviews 32:321-338.
- [0919] 47. Pizza 等.(2000)Int J Med Microbiol 290:455-461.
- [0920] 48. W095/17211.
- [0921] 49. W098/42375.
- [0922] 50. Singh 等(2001)J Cont Release 70:267-276.
- [0923] 51. W099/27960.
- [0924] 52. 美国专利号 6,090,406.
- [0925] 53. 美国专利号 5,916,588.
- [0926] 54. EP-A-0626169.
- [0927] 55. W099/52549.

- [0928] 56. W001/21207.
- [0929] 57. W001/21152.
- [0930] 58. Dyakonova 等. (2004) *Int Immunopharmacol* 4(13):1615-23.
- [0931] 59. FR-2859633.
- [0932] 60. Signorelli 和 Hadden(2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86.
- [0933] 61. W02004/064715.
- [0934] 62. De Libero 等, (2005) *Nature Reviews Immunology* 5:485-496
- [0935] 63. 美国专利号 5, 936, 076.
- [0936] 64. Old 等., *J Clin Investig*, 113:1631-1640
- [0937] 65. US2005/0192248
- [0938] 66. Yang 等. (2004) *Angew Chem Int Ed* 43:3818-3822
- [0939] 67. W02005/102049.
- [0940] 68. Goffet 等 (2004) *Am Chem Soc* 126:13602-13603
- [0941] 69. W003/105769.
- [0942] 70. Cooper(1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80.
- [0943] 71. W090/14837.
- [0944] 72. Podda 和 Del Giudice(2003) *Expert Rev Vaccines* 2:197-203.
- [0945] 73. Podda(2001) *Vaccine* 19:2673-2680.
- [0946] 74. *Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach*(《疫苗设计:亚基和佐剂方法》)(Powell 和 Newman 编), 普莱努出版社 (Plenum Press)1995(ISBN 0-306-44867-X).
- [0947] 75. *Vaccine Adjuvants:Preparation Methods and Research Protocols*(《疫苗佐剂:制备方法和研究方案》)(Volume 42 of *Methods in Molecular Medicine* series (《分子医学方法丛书》第 42 卷)). ISBN:1-59259-083-7. Ed. O' Hagan.
- [0948] 76. Allison 和 Byars(1992) *Res Immunol* 143:519-25.
- [0949] 77. Hariharan 等. (1995) *Cancer Res* 55:3486-9.
- [0950] 78. W095/1 1700.
- [0951] 79. 美国专利号 . 6, 080, 725.
- [0952] 80. W02005/0971 81.
- [0953] 81. Tassignon 等. (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98.
- [0954] 82. Myers 等. (1990) *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions.* (《内毒素反应的细胞和分子方面》) 第 145-156 页
- [0955] 83. Ulrich(2000) 参考文献 75 的第 16 章 (273-282 页)
- [0956] 84. Johnson 等. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9.
- [0957] 85. Baldrick 等. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.
- [0958] 86. 美国专利号 4, 680, 338.
- [0959] 87. 美国专利号 4, 988, 815.
- [0960] 88. W092/15582.
- [0961] 89. Stanley(2002) *Clin Exp Dermatol* 27:57 1-577.

- [0962] 90. Wu 等. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83.
- [0963] 91. Vasilakos 等. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74.
- [0964] 92. 美国专利号 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6664264, 6664265, 6667312, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000, 和 6924293.
- [0965] 93. Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [0966] 94. W02004/060308.
- [0967] 95. W02004/064759.
- [0968] 96. 美国专利号 6, 924, 271.
- [0969] 97. US2005/0070556.
- [0970] 98. 美国专利号 5, 658, 731.
- [0971] 99. 美国专利号 5, 011, 828.
- [0972] 100. W02004/87 153.
- [0973] 101. 美国专利号 6, 605, 617.
- [0974] 102. W002/18383.
- [0975] 103. W02004/018455.
- [0976] 104. W003/082272.
- [0977] 105. W02006/002422.
- [0978] 106. Johnson 等. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [0979] 107. Evans 等. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [0980] 108. Andrianov 等. (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [0981] 109. Payne 等. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [0982] 110. Thompson 等. (2003) *Methods in Molecular Medicine* 94:255-266.
- [0983] 111. Kandimalla 等. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [0984] 112. W002/26757.
- [0985] 113. W099/62923.
- [0986] 114. Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [0987] 115. McCluskie 等. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [0988] 116. W098/40100.
- [0989] 117. 美国专利号 6, 207, 646.
- [0990] 118. 美国专利号 6, 239, 116.
- [0991] 119. 美国专利号 6, 429, 199.
- [0992] 120. Kandimalla 等. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31(第3部分):654-658.
- [0993] 121. Blackwell 等. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [0994] 122. Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [0995] 123. W001/95935.

- [0996] 124. Kandimalla 等. (2003)BBRC 306:948-953.
- [0997] 125. Bhagat 等. (2003)BBRC 300:853-861.
- [0998] 126. W003/035836.
- [0999] 127. W001/22972.
- [1000] 128. Thompson 等. (2005)J Leukoc Biol 78: 'The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+T cells'. (低毒素形式的 LPS、MPL®佐剂和 RC529 是 CD4+T 细胞的有效佐剂。)
- [1001] 129. 英国专利申请 GB-A-22202 11.
- [1002] 130. W094/21292.
- [1003] 131. W094/00153.
- [1004] 132. W095/17210.
- [1005] 133. W096/26741.
- [1006] 134. W093/19780.
- [1007] 135. W003/011223.
- [1008] 136. Meraldi 等. (2003)Vaccine 21:2485-249 1.
- [1009] 137. Pajak 等. (2003)Vaccine 21:836-842.
- [1010] 138. 美国专利号 6, 586, 409.
- [1011] 139. Wong 等. (2003)J Clin Pharmacol 43(7):735-42.
- [1012] 140. US2005/0215517.
- [1013] 本文引用的所有文件的全部内容通过引用纳入本文。

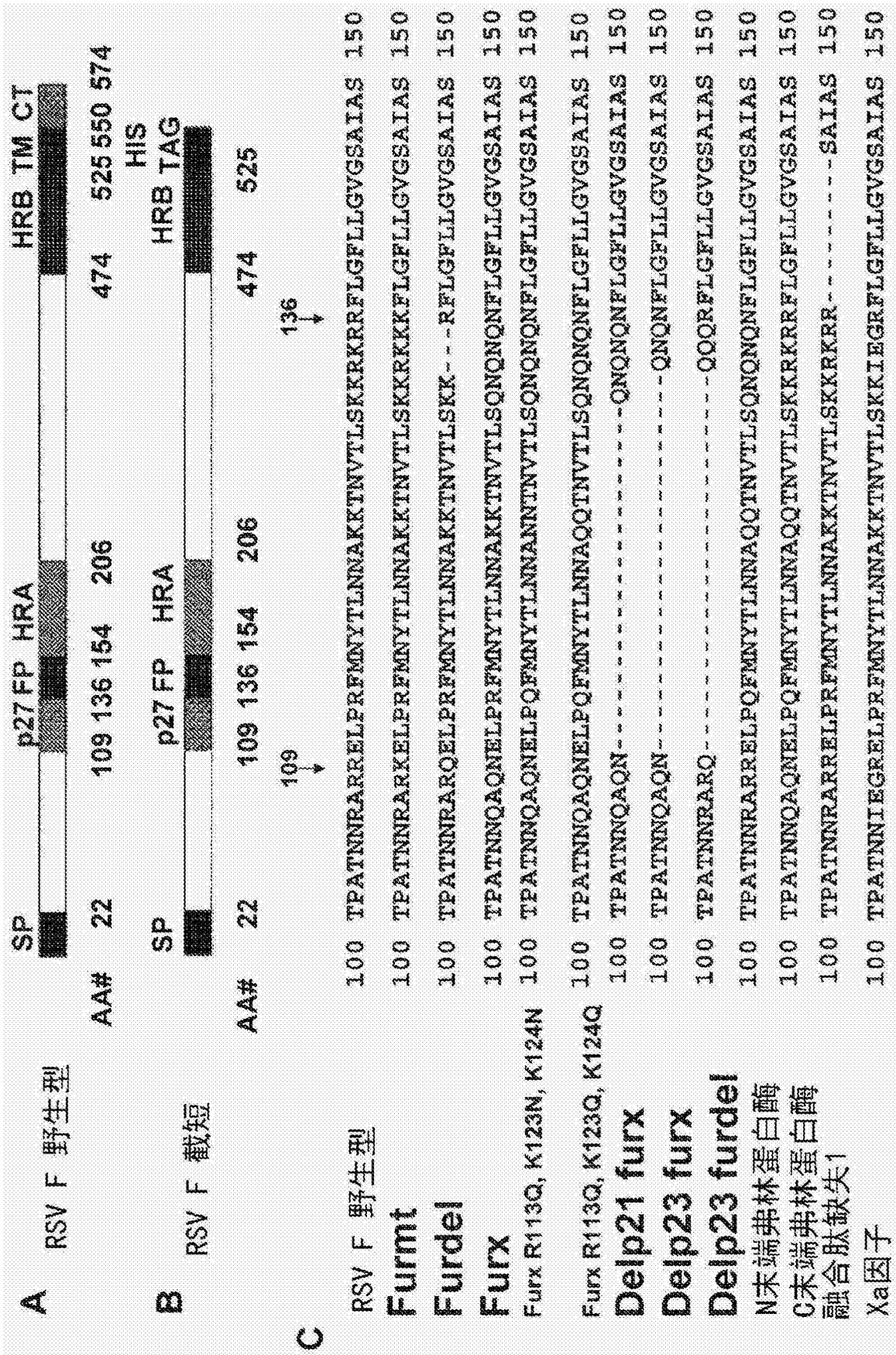


图 1

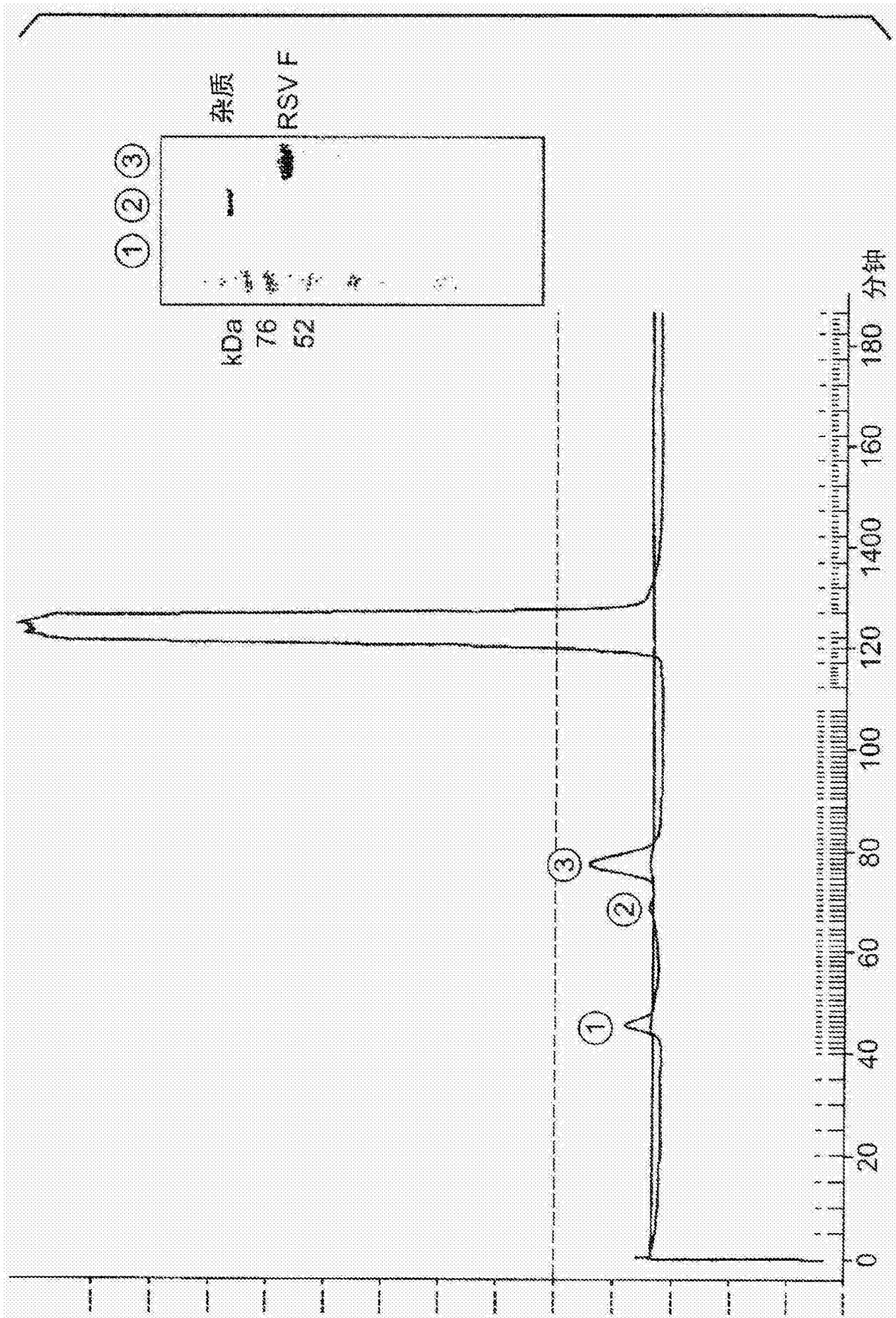


图 3

ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCAGACCAATTACCTACCCAAAATGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGA
 GGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTC
 ACTGATAATGACCATGCTPAATGCCAGAGCGTTTTTCGCATCTGGCTTCAAACCTGATCGAAACGGAGGTGG
 ACCCATCCGACACGATCCPTGACATTGGAAGTGGCCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCA
 TTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAA
 AACTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATCAAGGAGCTCGCCGCGTCATGAGCGACC
 CTGACCTGGAAACTGAGACTATGTCCCTCCACGACGACGAGTCGTGTCTGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGT
 TTACCAGGATGTATAACGCGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTC
 GCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTATGTTAAGAAGTTGGCTGGAGCATATCCATCATACT
 CTACCAACTGGCCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTATGGA
 GCGGTACGTTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCT
 GTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCGTATTTCACT
 TACGTGGCAAGCAAAATFACACATGTCCGTGTGAGACTATAGTPTAGTTGCCGACGGGTACGTCGTTAAAAG
 AATAGCTATCAGTCCAGGCCGTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCCGCGAGGGATTC
 TTGTGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAG
 CTACATTTGTGTGACCAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGGGACGACCGCAAAAACCTGCT
 GGTGGGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCCGACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAAATTAC
 CTTTTGCCCGTAGTGGCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAGGCAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAA
 GGCCACTAGGACTACGAGATAGACASTTAGTCATGGGGTGTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGATAAC
 ATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCRAACCATCATCAAAGTGAAACGCGATTTCCACTCATTCCGTGCTG
 CCCAGGATAGGCAGTAACACATTTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCACA
 AGGAGCCGTACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGGCAGCCGATGAGGCTAAGGA
 GGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCTG
 GAAGCCGATGTAGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAA
 AGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCGAGGCTGTACTCAA
 GAGTGAAAAATTATCTTGATCCACCCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAA
 GGGCGTTATGCCGTGGAACCATAACCATGGTAAAGTAGTGGTGGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCAGG
 ACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCA
 CCATATTTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAACCTGTCAAGCCCAGCGAG
 CACGACGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTSCGTCAAGAAAGAAGTACTGACTGGGCTAG
 GGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGC
 CGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAA
 AGCGCACTCACCAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAGAAAACCTGTGCAGAAATTATAAGGGACG
 TCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCAACA
 CCCCCTAGAGACCCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCTGTTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCC

图 4A

A'TTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGCGGT'TTTTTAACATGATGTGCC
TGAAAGTGCATTTTAACCAACGAGATTGTCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAA
ATCTGTGACTTCCGTGCTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACT
AAGATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTCAGAG
GGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAAAGAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCT
GACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTCCGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCAGAA
CATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGA
TAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGA
TGCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGCTTCCAGAATAAGGCAAACGTTGT
TGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACTG
TGGATTATTTTGAACCGACAAAGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCCGTGAGSTCTT
TGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGG
GATAACTCCCGTCCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCCGAGGTACC
CACAACCTGCCTCCGGCAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGA
TCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCATGCTTTTAGTCCCTCCACCATAATGAACAC
CCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCTGTCAGCAAATTTGAAGGGCAGAAGTGTCTGGTGGTCCGGGAAAAGT
TGTCCGTCCCAGGCAAATGGTGTGACTGGTTGTGACACCGGCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCCGGCTGGA
TTTAGGCATCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATAC
CATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATC
TGAATCCCGGCGGAACCTGTGTGACATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGG
TGCTATAGCGCGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACCGAAGTT
CTGTTTGTATTTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTTCATCAACCTTGA
CCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGGTGGCAGGGGA
TATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTG
TGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCCCGAC
TGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTTCATGCCGTAGGACCAAACCTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGA
AGGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCA
GTAGCGATTCCTACTGTTGTCCACCGGCATCTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACC
ATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAAT
GACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTG
ACAGAACCCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCA
CAAGCGATGGCAAACCTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGCCGGCCAAGGATATAGCAGA
AATTAATGCCATGTGGCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCCGAGAAAGC
ATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCGTCCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTT
GCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCAGAACRAATTAC

图 4B

TGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCT
 ATATTGTTCTCACCCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAG
 ACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACCTTATAAC
 CGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGT
 TTGCTGTGAGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTAT
 CTAGCTCATCCTGGTCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCT
 GGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAG
 TTTCTGGCGCGACCGGTGCCCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAA
 GAACACCSTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAA
 TAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGGCGCTTACCCCGTCAAGCACTCCTAGCAGGTCCGTCTCGAGA
 ACCAGCCTGGTCTCCAACCCCGCCAGGCSTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCGTAG
 CACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTTCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACA
 AAAAAATCAGTAAGGCAAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTGGAGAGGACCGAATTGGAGATTTCTGAT
 GCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAGAAGATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCACACCTGCTA
 ACAGAAGCAGATAACAGTCCAGGAAGSTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGG
 CCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGAACCCCTGCATCCTGTTCTTTGTAT
 TCATCTAGTSTGAACCGTGCCFTTCAAGCCCCAAGGTCCAGTGGAAAGCCTGTAACGCCATGTTGAAAG
 AGAACTTTCGACTGTGGCTTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGCCCTATTTGGACATGGTTGACCG
 AGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGGCCCTGCAAAGCTGCCGAGCTTTCCAAAGAAACACTCC
 TATTTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCCTCAGCGATCCAGAACACGCTCCAGAAGCTCCTGGCAG
 CTGCCACAAAAGAAATTCGAATGTCACGCAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTCCGGCGGCCTTTAA
 TGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCSTGTAATAATGARTATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGG
 CTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATFACAITTACCAAATTTAAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGA
 AGACACATAATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAAAGAGAGACGT
 GAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCG
 CTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCTGCTTCCGA
 ACATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGG
 GGATTGTGTTCTGGAAACTGACATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCTGACCGCG
 TTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGGACGAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCCGGCGAAA
 TTTTATCAATACATTTGCCCACTAAAACATAATTTAAATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCTT
 CACACTGTTTGTGAACACAGTCATTAACATTTGTAATCGCAAGCAGAGTGTGAGAGAACGGCTAACCGGA
 TCACCATGTGCAGCATTCAATGGAGATGACAATATCGJGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAG
 ACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTA
 TTTCTGTGGAGGGTTAATTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTSCCGTGTGGCAGACCCCTAAAA
 AGGCTGTTTAAAGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGGGCATTGC

图 4C

ATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTA
 TGA AACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTAAATCATTCAGC
 TACCTGAGAGGGGCCCCATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCGACGCC
 ACCATGGAAGTCTGATCCTGAAGGCCAACGCCATCACCACCATCCTGACCGCCGTGACCTTCTGCTTCG
 CCAGCGGCCAGAACATCACCGAGGAATTCTACCAGAGCACCTGCAGEGCCGTGAGCAAGGGCTACCTGAG
 CGCCCTGCGGACCGGCTCGTACACCAGCGTGATCACCATCGAGCTGTCCAACATCAAAGAAAACAAGTGC
 AACGGCACCGACGCCAAGGTGAAACTGATCAAGCAGGAACTGGACAAGTACAAGAACGCCGTGACCGAGC
 TGCAGCTGCTGATGCAGAGCACCCCGCCACCACAACCGGGCCAGAAGAGAGCTGCCCCGGTTCATGAA
 CTACACCCTGAACAAACGCCAAGAAAACCAACGTGACCCTGAGCAAGAAGCGGAAGCGGCGGTTCTCTGGGC
 TTCCTGCTGGGCGTGGGCAGCGCCATCGCCAGCGGGGTGGCCGTGTCCAAGGTGCTGCACCTGGAAGGCG
 AGGTGAACAAGATCAAGTCCGCCCTGCTGTCCACCAACAAGGCCGTGGTGTCCCTGAGCAACGGCGTGAG
 CGTGCTGACCAGCAAGGTGCTGGATCTGAAGAACTACATCGACAAGCAGCTGCTGCCATCGTGAACAAG
 CAGAGCTGCAGCATCAGCAACATCGAGACCGTGATCGAGTTCACAGCAGAAGAACAACCGGCTGCTGGAAA
 TCACC CGGGAGTTTACGCGTGAAACGCCCGGCGTGACCACCCCGTGAGCACCTACATGCTGACCAACAGCGA
 GCTGCTGTCCCTGATCAATGACATGCCCATCACCAACGACCAGAAAAGCTGATGAGCAACAACGTGCAG
 ATCGTGCGGCAGCAGAGCTACTCCATCATGAGCATCATCAAAGAAGAGGTGCTGGCCTACGTGGTGCAGC
 TGCCCTGTACGGCGTGATCGACACCCCTGCTGGAAGCTGCACACCAGCCCCCTGTGCACCACCAACAC
 CAAAGAGGGCAGCAACATCTGCCTGACC CGGACCGACCGGGGCTGCTACTGCGACAACGCCGGCAGCGTG
 AGCTTCTTCCCCAAGCCGAGACCTGCAAGGTGCAGAGCAACCGGGTGTCTGCGACACCATGAACAGCC
 TGACCCTGCCCTCCGAGGTGAACCTGTGCAACGTGGACATCTTCAACCCCAAGTACGACTGCAAGATCAT
 GACCTCCAAGACCGACGTGAGCAGCTCCGTGATCACCTCCCTGGCGCCATCGTGAGCTGCTACGGCAAG
 ACCAAGTGCACCGCCAGCAACAAGAACCGGGGCATCATCAAGACCTTCAGCAACGGCTGCGACTACGTGA
 GCAACAAGGGCGTGGACACCCTGAGCGTGGGCAACACACTGTACTACGTGAATAAGCAGGAAGGCAAGAG
 CCTGTACGTGAAGGGCGAGCCCCATCATCAACTTCTACGACCCCTGGTGTTC CCCAGCGACGAGTTCGAC
 GCCAGCATCAGCCAGGTCAACGAGAAGATCAACCAGAGCCTGGCCCTTCATCCGGAAGAGCGACGAGCTGC
 TGCACAATGTGAATGCCGGCAAGAGCACCACCAATATCATGATCACCACAATCATCATCGTGATCATTTGT
 GATCCTGCTGTCTCTGATTGCCGTGGCCCTGCTGCTGTA CTGCAAGGCCCGCAGCACCCCTGTGACCCTG
 TCCAAGGACCAGCTGTCCGGCATCAACAATATCGCCTTCTCCAACTGAAGTCTAGACGGCGCGCCACCC
 AGCGGCCGCATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGA ACTCGCGCCGATTGGCATGCCGCTTAA
 AATTTTATTTTATTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGT TTTTAATAATTTCAAAAAAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGA
 AGGAGGACGCACGTCCACTCGGATGGCTAAGGGAGAGCCACGTTTAAACCAGCTCCAATTCGCCCTATAG
 TGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGCTCGTTTACAACTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACC
 CAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATC
 GCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG

图 4D

GGGTGTGGTGGTTACGGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTC
TTCCTTCTCTTCTCGCCACGTTTCGCGGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT
TCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCC
ATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTT
CAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGG
CCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGGCAATTTTAACAAAATATTAACGCTTAC
AATTTAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAA
ATATGTATCCGCTCATGAGACARTAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCTGTTTTTGCTCACCCA
GAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATC
TCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGT
TCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGGCATACACTAT
TCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCACTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACAATGCGGCCAACCTTACTTCTGACAAAGATCGGAGG
ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACAATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCG
GAGCTGAATGAAGCCATAACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC
GCAAACCTAATAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGA
TAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC
GGTGAGCGTGGGTCTCGCGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
TCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACT
GATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTT
TAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTT
CGTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCTGATCAGAGCTACCA
ACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGT
AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGT
GGCTGCTGCCASTGGCGATAAGTCGTGCTTACCBSGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG
CAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGA
GATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGT
AAGCGGCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGT
CCTGTCCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACCGGGCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT
TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC
AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCCTC
TCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGTTTTCCCGACTGGAAAAGCGGCAGTGA

图 4E

```
GCGCAACGCAATTAATGTGAGTPAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCT  
CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCA  
AGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCGGCCACGCGTAATACGACTCACTA  
TAG
```

图 4F

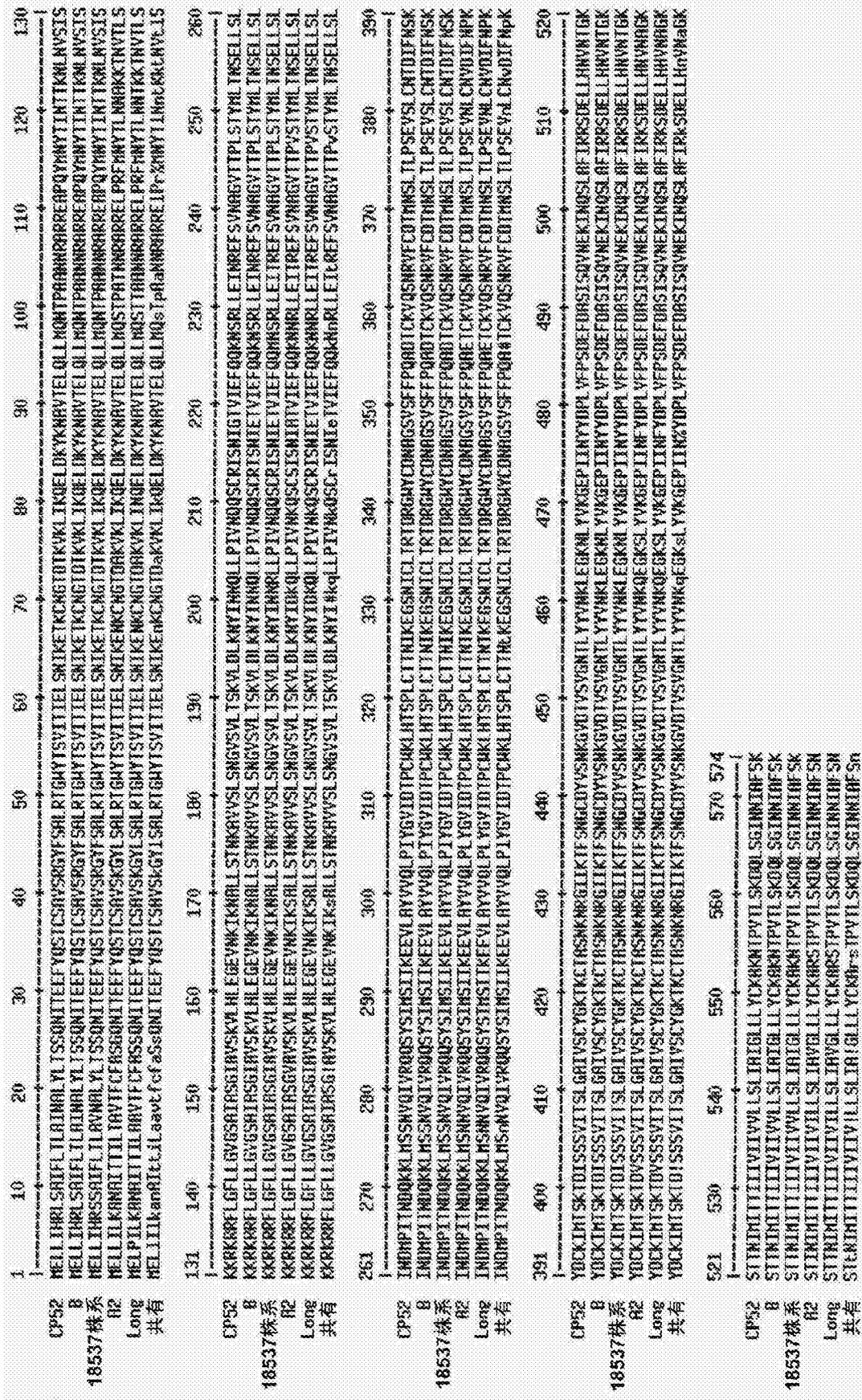


图 5

图6: 选择RSV F抗原的常用SEC纯化色谱

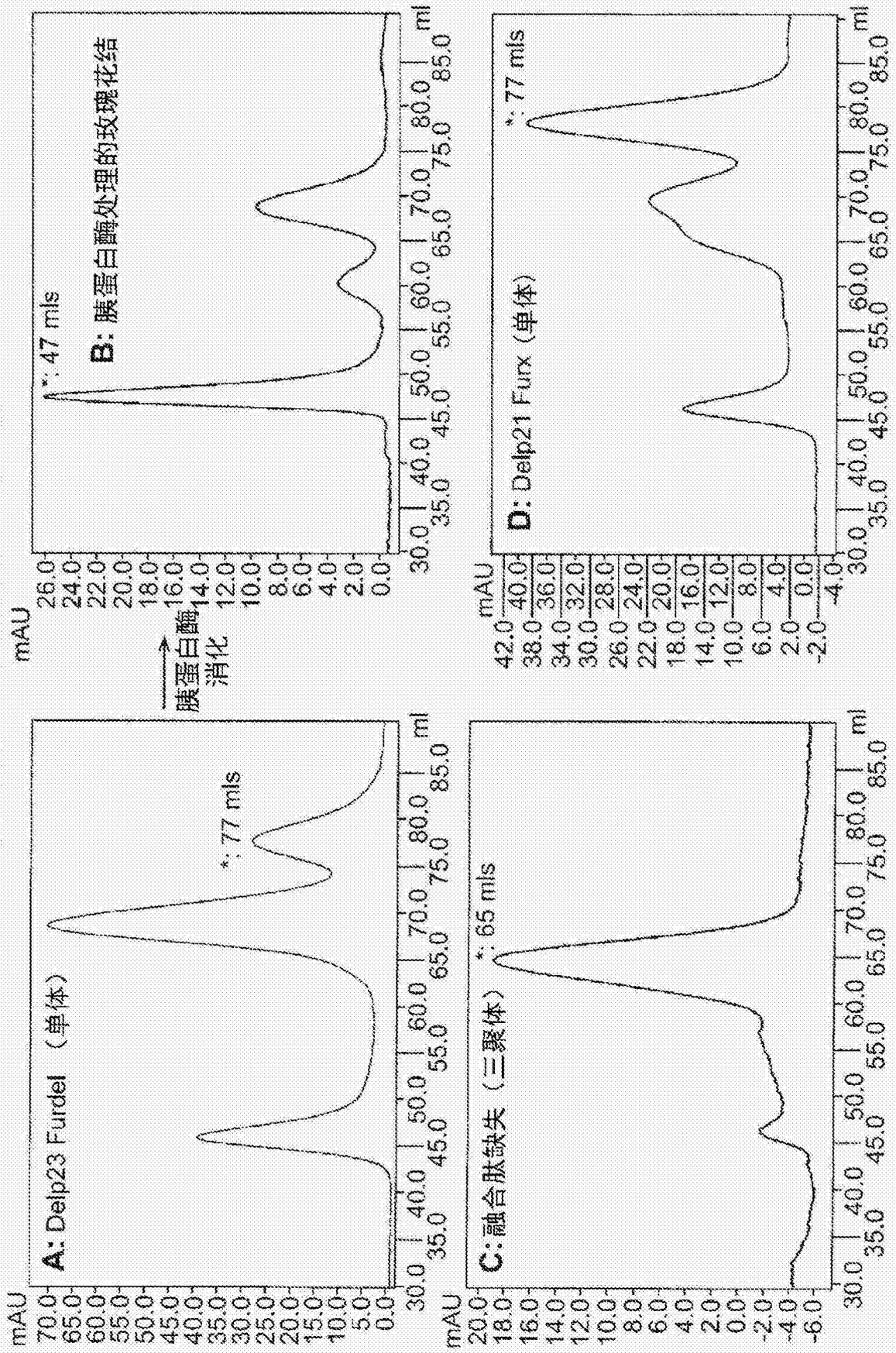


图7: RSV F抗原的EM和SDS-PAGE分析

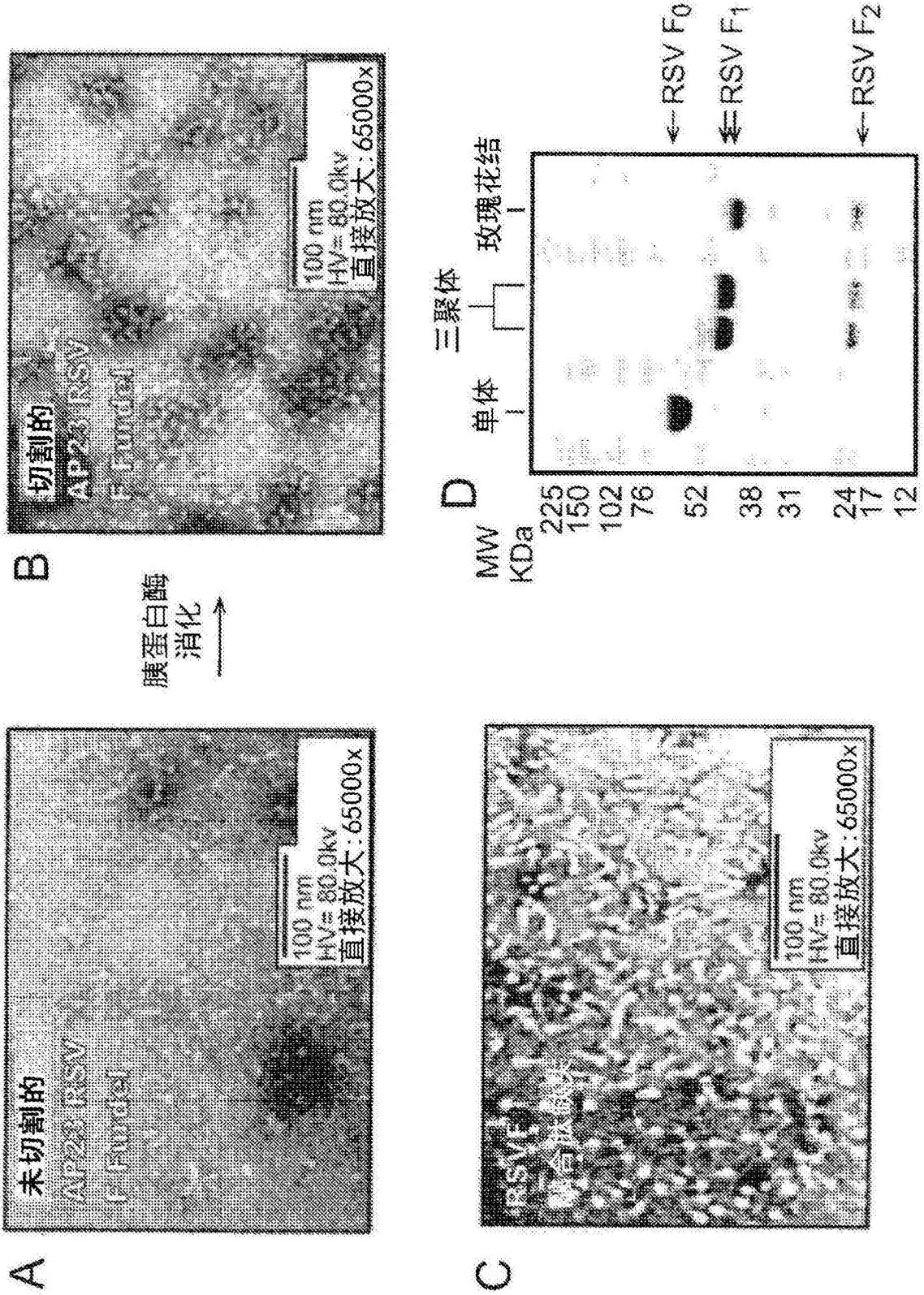


图8: 棉鼠中RSV-F亚基的免疫原性

