(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103732222 B
(45)授权公告日 2018.12.28

(21)申请号 201280034719.6

(22)申请日 2012.05.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103732222 A

(43)申请公布日 2014.04.16

(30)优先权数据
61/484,934 2011.05.11 US
61/608,168 2012.03.08 US
61/609,974 2012.03.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.01.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/037541 2012.05.11

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/155053 EN 2012.11.15

(73)专利权人 儿童医疗中心有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 理查德·马利 陆英杰 张帆

(74)专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理有限责任公司 11290
代理人 洪俊梅 张淑珍

(51)Int.Cl.
A61K 31/00(2006.01)
A61K 39/085(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)

(56)对比文件
CN 101951948 A,2011.01.19,
Vesa P.Hytonen et al..Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in Escherichia coli.《Biochem. J.》.2004,第384卷第385-390页.
Satu H.Helppolainen et al.Rhizavidin from Rhizobium etli: the first natural dimer in the avidin protein family.《Biochem.J.》.2007,第405卷第397-405页.
Satu H.Helppolainen et al.Rhizavidin from Rhizobium etli: the first natural dimer in the avidin protein family.《Biochem.J.》.2007,第405卷第397-405页.

审查员 周英

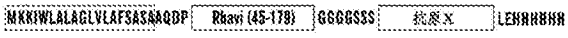
权利要求书2页 说明书65页 附图10页

(54)发明名称

修饰的生物素结合蛋白及其融合蛋白和应用

(57)摘要

本公开提供了能够在细菌中以可溶形式高产量地表达的修饰的生物素结合蛋白。还提供了包含所述修饰的生物素结合蛋白和抗原的融合蛋白。本公开进一步提供了金黄色葡萄球菌来源的α-溶血素的非溶血性变体、以及包含α-溶血素的非溶血性变体和生物素结合域的融合蛋白。本发明还公开了包含所述蛋白的免疫原性组合物,并且还公开了该免疫原性组合物用于诱发免疫应答或用于对受试者进行接种的用途。



CN 103732222 B

1.由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的可溶性重组生物素结合蛋白。

2.包含(i)可溶性生物素结合蛋白以及(ii)抗原蛋白质或抗原肽的融合蛋白,所述可溶性生物素结合蛋白由与SEQ ID NO:1相同或与SEQ ID NO:15相同的氨基酸序列组成。

3.如权利要求2所述的融合蛋白,其中,所述可溶性生物素结合蛋白由与SEQ ID NO:1相同的氨基酸序列组成,并且其中,所述可溶性生物素结合蛋白与所述抗原蛋白质或抗原肽通过肽接头彼此相连。

4.如权利要求3所述的融合蛋白,其中,所述肽接头包含氨基酸序列SEQ ID NO:22。

5.如权利要求2所述的融合蛋白,其中,所述抗原蛋白质或抗原肽为选自于由下列抗原所组成的组中的抗原:

肺炎球菌抗原、结核抗原、炭疽抗原、HIV抗原、季节性流感抗原或流行性流感抗原、百日咳抗原、金黄色葡萄球菌抗原、脑膜炎球菌抗原、嗜血杆菌抗原、HPV抗原、大肠杆菌抗原、沙门氏菌属抗原、肠杆菌属抗原、假单胞菌属抗原、克雷伯氏菌属抗原、柠檬酸杆菌属抗原、梭菌属抗原、志贺氏菌属抗原、病原性弯曲杆菌属抗原、霍乱弧菌抗原、类毒素、毒素、或毒素部分,或以上抗原的组合。

6.如权利要求2所述的融合蛋白,其中,所述抗原蛋白质或抗原肽为抗原,所述抗原为金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体。

7.如权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体包含位于野生型金黄色葡萄球菌α-溶血素第205位、213位或209-211位氨基酸残基处的突变。

8.如权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体包含野生型金黄色葡萄球菌α-溶血素中的下列突变中的一种:

(i)第205位残基由W变为A;(ii)第213位残基由W变为A;或者(iii)第209-211位残基由DRD变为AAA。

9.如权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体包含选自于由下列氨基酸序列所组成的组中的氨基酸序列:

SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25,以及上述氨基酸序列的功能变体和部分。

10.如权利要求2所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白在N端包含细菌信号序列。

11.如权利要求2所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白包含选自于由下列氨基酸序列所组成的组中的氨基酸序列:

SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28。

12.如权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白的溶血活性比等同效价的野生型α-溶血素(Hla)低至少25%。

13.如权利要求6所述的融合蛋白,其中,所述α-溶血素由金黄色葡萄球菌野生型α-溶血素第27-319位氨基酸的氨基酸序列组成。

14.如权利要求2-13中任一项所述的融合蛋白在制造用于在受试者中诱发免疫应答的免疫原性组合物中的用途。

15.如权利要求14所述的用途,其中,所述免疫应答为抗体应答或B细胞应答。

16.如权利要求14所述的用途,其中,所述免疫应答为CD4+ T细胞应答,所述CD4+ T细

胞应答包括Th1应答、Th2应答或Th17应答；或CD8+ T细胞应答；或CD4+/CD8+ T细胞应答。

17.如权利要求14所述的用途，其中，所述免疫应答为抗体应答或B细胞应答；以及T细胞应答。

修饰的生物素结合蛋白及其融合蛋白和应用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35 U.S.C.§119(e)，本申请要求2011年5月11日提交的美国临时申请号61/484,934、2012年3月8日提交的美国临时申请号61/608,168以及2012年3月13日提交的美国临时申请号61/609,974的优先权，以引用的方式将其各自的内容全部并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及生物素结合蛋白和包含此类生物素结合蛋白的融合蛋白/组合物。本文还描述了在细菌中以高产量和可溶方式表达所述生物素结合蛋白和/或其融合蛋白的方法。

背景技术

[0004] 生物素结合蛋白及其衍生物可在多种应用中广泛使用。然而，重组生物素结合蛋白的制备或纯化可能非常困难。当在大肠杆菌(E.coli)中表达时，大部分生物素结合蛋白倾向聚集于包涵体(inclusion bodies)中，在活性蛋白的制备中需要进行变性、重折叠及冗长的下游处理。在大肠杆菌中表达由于生产成本低廉、且具有进一步工程化的潜力，因而是优选的；能在大肠杆菌中高效生产的生物素结合蛋白因此备受追捧。进而，大肠杆菌表达也为产生用于多种应用的、含有生物素结合蛋白的重组融合蛋白提供了可能。

[0005] 因此，本领域中对于能在大肠杆菌中以可溶形式高产量地表达的生物素结合蛋白以及含有生物素结合蛋白的融合蛋白存在需求。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的为提供一种能在大肠杆菌中以可溶形式高产量地表达的重组生物素结合蛋白。因此，本发明提供了一种生物素结合蛋白以及含有该生物素结合蛋白的组合物。在一些实施方式中，所述重组生物素结合蛋白包含大肠杆菌信号序列，所述信号序列融合至包含野生型Rhizavidin(rhavi)第45-179位氨基酸的氨基酸序列的N端；所述野生型Rhizavidin(rhavi)第45-179位氨基酸为：

[0007]
(FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD,SEQ ID NO:1)

[0008] 。在一些实施方式中，所述大肠杆菌信号序列为

[0009] MKKIWLALAGLVLAFSASA(SEQ ID No:2)。所述信号序列可通过柔性肽接头与含有野生型rhavi第45-179位氨基酸的序列融合。

[0010] 本文还提供了在大肠杆菌中以可溶形式高产量地表达生物素融合蛋白的方法。在一些实施方式中，所述方法包括在大肠杆菌中表达生物素结合蛋白，其中，以大肠杆菌信号序列对生物素结合蛋白的天然信号序列进行替换。在一些实施方式中，所述信号序列为

[0011] MKKIWLALAGLVLAFSASA(SEQ ID No:2)。

[0012] 在又一方面，本发明提供了包含生物素结合域以及蛋白质或肽的生物素结合融合蛋白。

[0013] 在另一方面，本文提供了脂化(lipidated)生物素结合蛋白。本文所使用的术语“脂化生物素结合蛋白”是指与脂质共价连接的生物素结合蛋白。脂化生物素结合蛋白是Toll样受体2的配体或激动剂。因此，本文还提供了在受试者中诱发免疫应答的方法。所述方法包括向受试者给予包含脂化生物素结合蛋白的组合物。

[0014] 本文还提供了在大肠杆菌中表达脂化生物素结合蛋白的方法。在一些实施方式中，所述方法包括在大肠杆菌中表达脂化生物素结合蛋白，其中，以含有脂化基序(motif)的大肠杆菌信号序列对生物素结合蛋白的天然信号序列进行替换。在一些实施方式中，所述信号系列为MKKVAAFVALSLLMAGC(SEQ ID No:3)。

[0015] 在又一方面，本文提供了金黄色葡萄球菌(Staphylococcal aureus)α-溶血素(Hla)的非溶血性衍生物。本文所述的Hla衍生物可处于融合蛋白的形式，其中，所述融合蛋白含有Hla衍生物域和生物素结合域这两者。在这一方面的一些实施方式中，所述生物素结合域为本文所述的生物素结合蛋白。

[0016] 与所述脂化生物素结合蛋白相类似，本文所述的Hla变体(variants)或其与生物素结合蛋白的融合蛋白也是Toll样受体或其它模式识别受体 (PRR)的配体或激动剂。因此，本文还提供了在受试者中诱发免疫应答的方法。在一些实施方式中，所述方法包括向受试者给予含有本文所述的非溶血性Hla变体或其与生物素结合蛋白的融合蛋白的组合物。

[0017] 在又一方面，本文还提供了免疫原性组合物或疫苗组合物，所述免疫原性组合物或疫苗组合物包含生物素结合蛋白、脂化生物素结合蛋白、含有生物素结合域和抗原蛋白或抗原肽的生物素结合融合蛋白。在这一方面的一些实施方式中，所述抗原蛋白为本文所述的Hla的非溶血性衍生物。

[0018] 本文还提供了以本文所公开的免疫原性组合物对受试者(例如哺乳动物，例如人)进行接种(vaccinating)的方法，所述方法包括向所述受试者给予本文公开的疫苗组合物。

附图说明

[0019] 图1为根据本文公开的实施方式的修饰的生物素结合蛋白的示意图。

[0020] 图2为纯化的本文所述的重组生物素结合蛋白的SDS-PAGE。

[0021] 图3为含有生物素结合蛋白和抗原X的融合蛋白的示意图。

[0022] 图4为纯化的rhizavidin融合蛋白的示例性SDS-PAGE。

[0023] 图5为根据本文公开的实施方式的脂化生物素结合蛋白的示意图。

[0024] 图6为本文所述的脂化生物素结合蛋白的SDS-PAGE。

[0025] 图7为示出了脂化生物素结合蛋白的剂量依赖性TLR2活性的柱状图。

[0026] 图8为本文所述的重组WT或突变型金黄色葡萄球菌α-溶血素(Hla)及其rhizavidin融合蛋白的示意图。在非溶血性Hla中，进行下列点突变：(i)残基205处W变为A；(ii)残基213处W变为A；或者(iii)残基209-211处DRD变为AAA。

[0027] 图9为纯化的野生型Hla或其非溶血性变体的SDS-PAGE。

[0028] 图10为纯化的野生型Hla或其非溶血性变体的生物素结合融合蛋白的SDS-PAGE。

[0029] 图11为示出WT Hla及其非溶血性变体的溶血活性的线形图。

[0030] 图12为示出野生型Hla、Hla的非溶血性变体、以及野生型Hla及其非溶血性变体的生物素结合融合蛋白的溶血活性的线形图。

[0031] 图13为示出以生物素结合融合蛋白(rhavi-Hla209)刺激巨噬细胞诱导了多种促炎性细胞因子的柱状图。

[0032] 图14为示出含有脂化rhizavidin或rhavi-Hla209的多抗原提呈系统(MAPS)复合物诱发针对抗原的增强的T细胞应答的柱状图。

具体实施方式

[0033] 应该理解的是,本发明并不限于本文所述的具体组合物、方法学、方案和试剂等,此类组合物、方法学、方案和试剂等可以变化。本文所使用的术语仅出于描述具体实施方式的目的,而并不意图限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求限定。

[0034] 不希望被理论所限,本领域中生物素结合蛋白的低表达可能是由于在大肠杆菌的细胞质中,生物素结合蛋白每一单体中的二硫键不形成、或形成水平较低,从而折叠较差。目前,发明人发现,可通过转运至大肠杆菌的周质空间(periplasmic space)中来完成正确折叠。因此,可通过将生物素结合蛋白的全部天然信号序列替换为大肠杆菌分泌信号序列,改善重组生物素结合蛋白的正确折叠。不希望被理论所限,这样促进了重组蛋白转位(translocate)至大肠杆菌细胞的周质空间中。重组蛋白转位至大肠杆菌周质空间中随后能够在生物素结合蛋白(例如Rhizavidin)中提供具有重要功能的二硫键,且所述蛋白能够以可溶形式高产量地正确折叠。

[0035] 在一方面,本文提供了能够在大肠杆菌中以可溶形式高产量地表达的生物素结合蛋白。本文所使用的术语“生物素结合蛋白”是指非共价结合至生物素或其类似物或衍生物的蛋白质。高产量是指蛋白能够以可溶形式在大肠杆菌中以约10mg/L、11mg/L、12mg/L、13mg/L、14mg/L、15mg/L、20mg/L、25mg/L、30mg/L、35mg/L、30mg/L、35mg/L、40mg/L、45mg/L、50mg/L以上的量表达。

[0036] 在一些实施方式中,所述生物素结合蛋白可为重组蛋白。为避免由 于原始来源的基因中存在稀有密码子而造成在大肠杆菌中表达困难,可使用大肠杆菌表达密码子对生物素结合蛋白的编码序列进行优化。

[0037] 通常,生物素结合蛋白包含生物素结合域。本文所使用的术语“生物素结合域”是指结合至生物素的多肽序列。尽管可将完整的生物素结合蛋白用作生物素结合域;然而也可仅使用蛋白上与生物素结合的部分。在一些实施方式中,生物素结合域来源于Rhizavidin。

[0038] 在一些实施方式中,所述生物素结合域由对应于野生型Rhizavidin第45-179位氨基酸的氨基酸序列组成,或基本由上述序列组成。野生型Rhizavidin的氨基酸序列为:

[0039]

MIITSLYATFGTIADGRRTSGGKTMIRTNAVAALVFAVATSALAFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(SEQ ID NO:4)。

[0040] 换言之,生物素结合域并不包含(即缺少)野生型Rhizavidin第1-44位的氨基酸(MIITSLYATFGTIADGRRTSGGKTMIRTNAVAALVFAVATSALA,SEQ ID NO:5)。在一些实施方式中,

所述生物素结合域含有氨基酸序列

[0041]

FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(SEQ ID NO:1).

[0042] 在一些实施方式中,所述生物素结合域包含与SEQ ID NO:1具有至少50%一致性、至少55%一致性、至少60%一致性、至少65%一致性、至少70%一致性、至少75%一致性、至少80%一致性、优选至少85%一致性、至少90%一致性、至少95%一致性、至少96%一致性、至少97%一致性、至少98%一致性、或至少99%一致性、或更优选至少99.3%一致性的氨基酸序列。

[0043] 尽管Helppolainen等(Biochem J.,2007,405:397-405)描述了仅去除全长Rhizavidin的前24个残基;然而本发明人发现,全长Rhizavidin的前44个残基对Rhizavidin的核心结构和功能来说都不是必须的。此外,出乎预料地,全长Rhizavidin第25-44位的氨基酸(MIRTNAVAALVFAVATSALA,SEQ ID NO:6)降低在大肠杆菌中表达的Rhizavidin的溶解性和分泌;而将全长Rhizavidin的前44个残基替换 为大肠杆菌信号肽则会导致本文所述的生物素蛋白在大肠杆菌中的溶解性和分泌增高。

[0044] 在本文所述的生物素结合蛋白中,生物素结合域可在N端或C端延伸一个或多个氨基酸,但所述生物素结合域的N端必须不包含对应于野生型Rhizavidin第1-44位的氨基酸序列的氨基酸序列。发明人发现,将野生型Rhizavidin N端的前44个氨基酸截除能够显著增加大肠杆菌中可溶形式的生物素结合蛋白的表达。因此,本文所述的生物素结合蛋白可含有序列X^1-X^2-X^3,其中X^2是具有对应于野生型Rhizavidin第45-179位氨基酸的氨基酸序列的肽,而X^1和X^3独立地空缺(absent)或为具有1至约100个氨基酸的肽,但X^1的N端必须不包含对应于野生型Rhizavidin N端第1-44位的氨基酸的氨基酸序列。

[0045] 在一些实施方式中,所述生物素结合蛋白可包含缀合至生物素结合蛋白N端的信号肽,即X^1可包含信号肽。信号肽也称为N端前导肽,其可在跨膜转位后被切除或不被切除。分泌/信号肽在下文详述。在一些实施方式中,信号序列是MKKIWLALAGLVLAFSASA(SEQ ID No:2);

[0046] MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRA(SEQ ID NO:7);

[0047] MKKVAAFVALSLLMAGC(SEQ ID No:3),或其衍生物或功能片段。

[0048] 可将信号肽直接(如通过键合)或间接(如通过接头)地连接至生物素结合域的N端。在一些实施方式中,可通过肽接头将信号肽连接至生物素结合域的N端。肽接头序列可为任何长度。例如,肽接头序列的长度可以是1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个以上氨基酸。在一些实施方式中,肽接头的长度为4个氨基酸。

[0049] 肽接头序列可包含任何氨基酸序列。例如,肽接头可包含能够被信号肽酶切割的氨基酸序列。在一些实施方式中,肽接头包含氨基酸序列AQDP(SEQ ID NO:8)或VSDP(SEQ ID NO:9)。

[0050] 在生物素结合蛋白中,生物素结合域可在其C端缀合1-100个氨基酸的肽。可将此类位于C端的肽用作纯化标签(tag)、与其它域的接头等。

[0051] 在一些实施方式中,所述生物素结合蛋白在其N端或C端包含一个或多个(例如1

个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个以上)纯化标签。纯化标签的示例包括但不限于:组氨酸标签、c-my标签、Halo标签、Flag标签等。在一些实施方式中,所述生物素结合蛋白在其C端包含组氨酸标签,例如,$(His)_6$(SEQ ID NO.10)。

[0052] 为增加标签暴露在外侧的概率,可通过肽接头将纯化标签缀合至生物素结合蛋白。所述接头的长度可为至少一个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个)氨基酸。接头肽可不受限制地包含任意氨基酸序列。在一些实施方式中,所述接头肽包含氨基酸序列VDKLAAALE(SEQ ID NO:11)或GGGGSSSVDKLAAALE(SEQ ID NO:12)。

[0053] 在一些实施方式中,所述生物素结合蛋白在其C端包含氨基酸序列VDKLAAALEHHHHH(SEQ ID NO:13)或GGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH(SEQ ID NO:14)。

[0054] 在一些实施方式中,所述生物素结合蛋白包含氨基酸序列:

[0055]

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH(SEQ ID NO:15).

[0056] 与已知的形成四聚体的生物素结合蛋白相比,本文所述的生物素结合蛋白形成二聚体。不希望被理论所限,形成二聚体可进一步提高本文所述的生物素结合蛋白在大肠杆菌中作为可溶蛋白的表达。

[0057] 虽然生物素结合蛋白为本领域所知,然而本文所述的生物素结合蛋白与本领域目前已知的亲和素(avidin)和亲和素样蛋白相比具有显著差别。首先,目前已知的亲和素在大肠杆菌中极难作为可溶蛋白表达。然而,如发明人所证明的,本文所述的生物素结合蛋白可在大肠杆菌中作为可溶蛋白高产量地表达。

[0058] 可通过在大肠杆菌中表达,以可溶形式高产量地(例如超过30mg每升培养液)获得本文所述的生物素结合蛋白。由此,本文所述的生物素结合蛋白比本领域所描述的生物素结合蛋白具有更强的溶解性,表现 出显著差别。不希望被理论所限,溶解性的差别可归结于本文所述的生物素结合蛋白和本领域已知的其它生物素结合蛋白之间显著的物理差别和/或化学差别和/或结构差别。

[0059] 第二,本文所述的生物素结合蛋白含有由野生型Rhizavidin第45-179位氨基酸组成的生物素结合域。尽管野生型Rhizavidin及其局部截短的部分是本领域已知的,然而对于包含野生型Rhizavidin第45-179位氨基酸的氨基酸序列、且具有大肠杆菌信号序列的生物素结合蛋白能够得到可在大肠杆菌中以高产量获得的可溶蛋白,本领域并无教导或暗示。根据Helppolainen等(Biochem J.,2007,405:397-405),野生型Rhizavidin第25-44位的氨基酸包含推定(putative)信号序列。然而,如本文所讨论的,发明人发现并证明,将所述推定信号序列替换为大肠杆菌信号序列导致在大肠杆菌中的可溶形式生物素结合蛋白表达提高。

[0060] 第三,本文所述的生物素结合蛋白含有氨基酸序列为

[0061] GGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH(SEQ ID NO:14)的肽。在C端的这一肽提供了用于纯化的组氨酸标签以及用于在生物素蛋白中插入其它域(如抗原域)的位置。此外,虽然Helppolainen等(Biochem J.,2007,405:397-405)描述了Rhizavidin在大肠杆菌中的表

达，然而Helppolainen等中并未对在Rhizavidin的生物素结合域的C端缀合一段额外的肽给出教导或暗示。

[0062] 第四，与其它亲和素样蛋白相比，Rhizavidin与卵亲和素具有较低的序列同源性(22.4％的序列一致性和35.0％的序列相似度)。因此，本文所述的生物素结合蛋白不同于亲和素和其它亲和素样蛋白。

[0063] 第五，与亲和素和其它亲和素样分子相比，本文所述的生物素结合蛋白具有低等电点(pI)。野生型Rhizavidin的等电点为4.0(Helppolainen等，Biochem J.，2007，405：397-405)。其它已知的生物素结合蛋白的等电点通常大于6.1(见Helppolainen等，Biochem J.，2007，405：397-405)。相比之下，本文所述的生物素结合蛋白的pI为5.4。本文所述的结合蛋白酸性的pI能够减少非特异性结合。使用目前已知的亲和素和亲和素样肽的问题是其非特异性结合。目前已知的亲和素和亲和素样肽不仅与细胞结合，而且与DNA、蛋白和生物材料(如膜)均能非特异性结合。例 如，在使用亲和素-生物素结合对物质进行检测时，亲和素非特异性结合至除待检测的目标材料以外的材料，从而导致背景升高。亲和素的高非特异性结合的原因之一包括了其高等电点。亲和素为强碱性蛋白，具有10以上的超高等电点，且总体而言为正电性。因此，可以认定亲和素易结合至许多情况下为负电性的生物材料。因此，本文所述的生物素结合蛋白的低pI优于目前已知的亲和素和亲和素样肽。

[0064] 第六，本文所述的生物素结合蛋白的大小相对小于目前已知的亲和素和亲和素样蛋白。所述生物素结合蛋白小于28kDa(二聚体大小)。然而，目前已知的亲和素和亲和素样蛋白大部分具有大于60kDa的大小(四聚体大小)。据记载野生型Rhizavidin的大小约为29kDa(二聚体大小)。较小的生物素结合蛋白可用于提高与感兴趣的分子的结合性缀合的负载量。例如，可用生物素结合蛋白将感兴趣的第一分子缀合至感兴趣的第二分子。其中一个感兴趣的分子可连接至一个或多个生物素或生物素样分子，而第二分子可连接、缀合或融合至生物素结合蛋白。相对于若第二分子是较大的目前已知的亲和素或亲和素样分子的情况，由于本文所述的生物素蛋白的大小较小，生物素或生物素样分子间隔较近，因此允许结合更多。

[0065] 第七，本文所述的生物素结合蛋白是二聚体。形成二聚体可进一步增加本文所述的生物素结合蛋白在大肠杆菌中作为可溶蛋白的表达。此外，由于生物素结合蛋白形成二聚体，而非如所有其它已知的亲和素样蛋白形成四聚体，1)降低了融合抗原的结构复杂性；2)还降低了表达重组生物素结合蛋白融合蛋白的难度；3)使得生物素结合蛋白融合操作的空间位阻降至最小，这有利于与例如但不限于生物素、生物素模拟物或生物素衍生物进行进一步操作；以及4)生物素结合蛋白融合物的溶解性显著增加。因此，证明了本文所述的生物素结合蛋白与本领域已知的生物素结合蛋白之间的显著区别。

[0066] 第八，本文所述的生物素结合蛋白降低了包含该生物素结合蛋白的免疫原性组合物在受试者中诱发卵相关过敏反应的风险。此外，针对本文所述的生物素结合域的抗体与卵亲和素不具有明显的交叉反应性，反之亦然。

[0067] 此外，本文所述的生物素结合蛋白具有改善的性质，例如减少了非特异性结合或进一步改善了与生物素的结合，同时保留了野生型Rhizavidin的性质。将本文所述的生物素结合蛋白用于例如免疫分析或核酸杂交分析中的检测、用于利用亲和素-生物素结合的分析物测定中，可减少背景、增加灵敏度、并在极端(severe)条件下保持与生物素的结合性

质。

[0068] 本研究清楚地表明了本文所述的生物素结合蛋白相比于亲和素和其它亲和素样蛋白的优势和区别。因此，在利用亲和素-生物素技术的广泛应用中，本文所述的生物素结合蛋白具有作为强大且通用的工具的潜力。

[0069] 不受限制地，可将生物素结合蛋白用于任何需要使用亲和素-生物素系统的方法学、组合物或系统。作为本领域技术人员能够理解的是，亲和素-生物素系统可用于多种实验室方法，例如：生物缀合；目标分子检测；或从样品中对目标分子进行分离、纯化或富集；蛋白检测；核酸检测；蛋白分离、纯化或富集；核酸分离、纯化或富集；ELISA；流式细胞术等。

[0070] 因此，本文所述的重组生物素结合蛋白的示例性用途包括但不限于：生物缀合；目标分子检测；从样品中对目标分子进行分离、纯化或富集；蛋白检测；核酸检测；蛋白分离、纯化或富集；核酸分离、纯化或富集；ELISA；流式细胞术等。

[0071] 在一些实施方式中，在如美国临时申请号61/48,934(申请日为2012年5月11日)、61/608,168(申请日为2012年3月8日)、61/609,974(申请日为2012年3月13日)和PCT申请号PCT/US12/37412(申请日为2012年5月11日)中所述的多抗原提呈系统(MAPS)中，可将本文所述的生物素结合蛋白用作亲合对的一部分，以引用的方式上述全部文献的内容并入本文。本文也将在下文中对MAPS进行详述。不希望被理论所限，使用本文所述的生物素结合蛋白减少了MAPS在受试者中引起卵相关过敏反应的风险。此外，针对重组修饰Rhizavidin的抗体对卵亲和素不具有明显的交叉反应性，反之亦然。

[0072] 脂化生物素结合蛋白

[0073] 本文另一方面提供了脂化生物素结合蛋白。本文所使用的术语“脂化生物素结合蛋白”是指与脂质共价缀合的生物素结合蛋白。所述脂质部分可以是二酰基脂质或三酰基脂质。

[0074] 可使用脂化序列制备所述脂化生物素结合蛋白。本文所用的术语“脂化序列”是指在细菌(如大肠杆菌)中促进携带该脂化序列的多肽发生脂化的氨基酸序列。脂化序列可存在于蛋白的N端或C端处。可将脂化序列连接至重组生物素结合蛋白以形成融合蛋白，该融合蛋白在通过常规重组技术在大肠杆菌中表达时处于脂化形式。在一些实施方式中，脂化序列位于生物素结合蛋白的N端。

[0075] 可使用任何本领域普通技术人员已知的脂化序列。在一些实施方式中，脂化序列是MKKVAAFVALSLLMAGC(SEQ ID No:3)或其衍生物或功能部分。其它示例性脂化序列包括但不限于

[0076] MNSKKLCCICVLFSLLAGCAS(SEQ ID NO:16)，MRYSKLTMLIPCALLLSAC(SEQ ID NO:17)，MFVTSKKMTAAVLAITLAMSLSAC(SEQ ID NO:18)，MIKRVLVVSMVGLSLVGC(SEQ ID NO:19)，及它们的衍生物或功能部分。

[0077] 在一些实施方式中，可通过肽接头将脂化序列融合至生物素结合蛋白，其中所述肽接头将所述脂化序列连接至所述生物素结合蛋白。

[0078] 在一些实施方式中，所述肽接头包含氨基酸序列VSDP(SEQ ID NO:9)。

[0079] 在一些实施方式中，所述生物素结合脂蛋白包含氨基酸序列

[0080]

MKKVAAFVALSLLMAGCVSDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYP

LTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLL KD(SEQ ID NO:20).

[0081] 所述脂化生物素结合蛋白为Toll样受体(TLR)的配体。就这一点而言,可将本文所述的脂化生物素结合蛋白用作TLR配体。例如,可将所述脂化生物素结合蛋白用于组合物中,以诱导TLR2刺激。这可用于诱导针对其它抗原/病原体的免疫原性。因此,可将所述生物素结合脂蛋白作为抗原的共刺激因子或佐剂用于免疫原性组合物中。

[0082] 本文所用的术语"Toll样受体"通常是指任何生物物种的任何Toll样受体。TLR可来自于任何哺乳动物物种。TLR已在多种哺乳动物物种(包括但不限于:例如人、豚鼠和小鼠)中得以确认。特定的TLR可进 一步通过引述原始来源的物种(例如人、鼠等)、具体的受体(例如TLR2、TLR3、TLR9等)或两者兼有来确定。在一些实施方式中,所述脂化生物素结合蛋白为TLR2配体。

[0083] Toll样受体(TLR)是促进固有免疫系统活化和病原体识别的生殖细胞系编码的跨膜蛋白家族。Toll样受体(TLR)为模式识别受体(PRR),由固有免疫系统的细胞表达,所述细胞包括巨噬细胞、树突细胞和NK细胞。已知的TLR配体的实例包括革兰氏阳性细菌(TLR-2)、细菌内毒素(TLR-4)、鞭毛蛋白(TLR-5)、细菌DNA(TLR-9)、双链RNA和聚肌胞苷酸(poly I:C)(TLR-3)和酵母(TLR-2)。其它结合内吞(endocytic)模式识别受体、清道夫受体或甘露糖结合受体的配体也可由本发明得以预期。TLR作用于保守病原体衍生的配体,随后激活TLR/IL-1R信号转导通路,从而诱导多种效应基因。Toll样受体(TLR)代表了PRR的重要类群,这一类群能够感知病原体相关分子模式或微生物相关分子模式。它们由多种类型的细胞(特别是树突细胞(DC),还有巨噬细胞、上皮细胞和淋巴细胞)在血液、脾、肺、肌肉和肠道中得以广泛表达。

[0084] 某些定位于细胞表面的TLR特异性针对微生物的脂质和蛋白,另一些与细胞内的内体区室(endosomal compartments)相关的TLR则特异性针对核酸。通过TLR的特定配体将TLR连接引起受体构象变化、并引起下游信号转导,所述信号转导主要涉及MyD88依赖性和TRIF依赖性通路。除了TLR3以外,其它TLR均能够通过MyD88通路传导信号,以诱导促炎性细胞因子(参与激活包含IB激酶(IKK)-NF-B在内的胞内蛋白激酶级联反应)、以及胞外信号调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun N端激酶(JNK)和p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)。独立于MyD88的TRIF通路被TLR3和TLR4两者使用,并介导I型干扰素的诱导。

[0085] 本文所述的重组生物素结合脂蛋白具有增强的免疫原性。不希望被理论所限,位于脂蛋白或脂肽N端的脂质部分提供了佐剂活性。因此,另外的实施方式提供了用于引起免疫应答的免疫原性组合物或疫苗组合物,所述组合物包含分离的生物素结合脂蛋白,或用于所述生物素结合脂蛋白体内表达的适合载体(vector),或二者兼有;以及合适的载体(carrier);以及提供了引发免疫应答或保护性应答的方法,所述方法包 括以足以引发所述应答的量向宿主给予所述分离的重组生物素结合脂蛋白、表达所述重组生物素结合脂蛋白的载体、或含有所述重组脂蛋白或载体的组合物。

[0086] 包含所述生物素结合脂蛋白的免疫组合物或免疫原性组合物引发局部或系统性免疫应答。该应答可以为保护性的,但并非必需。需要指出的是,本文所用的术语"免疫组合物"和"免疫原性组合物"包括"疫苗组合物"(前二者可为保护性组合物)。不受限制地,本文所述的脂化生物素结合蛋白可作为抗原、佐剂或共刺激剂用于免疫组合物、免疫原性组合

物或疫苗组合物中。此外，由于所述脂化生物素结合蛋白包含生物素结合域，因此可将该脂化蛋白组装至MAPS的聚合物骨架。因此，本文还提供了在哺乳动物宿主中诱导免疫应答的方法。所述方法包括向宿主给予包含本文所述的脂化生物素结合蛋白以及药学上可接受的载体或稀释剂的免疫原性组合物、免疫组合物或疫苗组合物。

[0087] 在一些实施方式中，所述脂化生物素结合蛋白是包含脂化生物素结合蛋白以及蛋白或肽的融合蛋白。

[0088] 非溶血性Hla

[0089] 溶血素是细菌产生的外毒素(exotoxins)，引起红细胞裂解。尽管溶血素具有强免疫原性，然而由于会引起红细胞裂解，因而其在疫苗中的用途有限。因此，本文另一方面提供了金黄色葡萄球菌α-溶血素(Hla)的变体，其与生物素结合蛋白的融合构建体及其应用。这些变体在本文中称为“mHla”，基本上为非溶血性，即基本上具有低溶血活性。本文所用的短语“基本上为非溶血性”意味着在与野生型Hla等同的效价(titer)下不能裂解红细胞。术语“野生型Hla”与这类短语惯用的定义一致，即由具有能力的细菌来源天然分泌而来的Hla。定义的“野生型Hla”不包括例如，通过重组DNA技术衍生而得的Hla融合产物。在一些实施方式中，mHla的溶血活性比等同效价的野生型Hla低了至少5％、至少10％、至少15％、至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％。在一些实施方式中，检测不到mHla的溶血活性。发明人还发现，可通过将mHla与生物素结 合蛋白连接，从而进一步降低mHla的溶血活性。因此，本公开还描述了包含mHla蛋白和生物素结合蛋白的融合蛋白。

[0090] 如本文所提供的，可生成非溶血性Hla，其中，野生型Hla中的W205或W213残基被丙氨酸(A)替代、或DRD209-211三肽被三个丙氨酸的肽(AAA)替代。突变型Hla蛋白可由大肠杆菌表达系统表达和纯化。可使用Quick Change诱变进行点突变得到突变体。例如，可改变编码野生型Hla的核酸的核苷酸序列，将野生型Hla中给定的氨基酸替换为另一氨基酸。

[0091] 在一些实施方式中，mHla为包含mHla和生物素结合蛋白的融合蛋白。在一些实施方式中，所述生物素结合mHla融合蛋白含有氨基酸序列

[0092]

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(SEQ ID NO:21)。

[0093] 本文所述的Hla变体为Toll样受体(TLR)的配体。就这一点而言，本文所述的Hla变体可用作TLR配体。例如，可将Hla变体用于组合物中诱导TLR2刺激。这对于诱导针对其它抗原/病原体的免疫原性是有用的。因此，可将本文所述的Hla变体作为抗原的共刺激因子或佐剂用于免疫原性组合物中。此外，当mHla与生物素结合蛋白融合时，可将所述融合蛋白缀合至MAPS的聚合物骨架。

[0094] 在一些实施方式中，可将mHla作为共刺激因子用于免疫原性组合物或疫苗组合物中。

[0095] 此外，由于mHla在受试者中诱导免疫应答，因此可将mHla用于免疫原性组合物或疫苗组合物中，以对受试者进行针对金黄色葡萄球菌的接种。

[0096] 本文所述的mHla具有增强的免疫原性。因此，附加实施方式提供了用于诱导免疫应答的免疫原性组合物或疫苗组合物，所述组合物包含 mHla，或用于所述mHla体内表达的适合载体(vector)，或二者兼有；以及合适的载体(carrier)；以及提供了引发免疫应答或保护性应答的方法，所述方法包括以足以引发所述应答的量向宿主给予分离的mHla、表达mHla的载体、或含有mHla或载体的组合物。

[0097] 包含mHla的免疫组合物或免疫原性组合物能够引发局部或系统性免疫应答。所述应答可以为保护性的，但并非必需。因此，本文所述的非溶血性Hla突变体可以作为免疫组合物、免疫原性组合物或疫苗组合物中的抗原、佐剂或共刺激物。

[0098] 此外，本文还提供了在哺乳动物宿主中诱导免疫应答的方法。所述方法包括向宿主给予包含本文所述的非溶血性Hla突变体及药学上可接受的载体或稀释剂的免疫原性组合物、免疫组合物或疫苗组合物。

[0099] 另一方面，本文还提供了包含本文所述的生物素结合蛋白(连接至抗原蛋白或抗原肽)的融合蛋白。本文中这些融合蛋白也称为生物素结合融合蛋白或抗原融合蛋白。所述生物素结合蛋白与所述抗原蛋白或抗原肽可以任何构象相连，例如，生物素结合蛋白可在融合蛋白的N端、而抗原肽在融合蛋白的C端，或与此相反。

[0100] 在一些实施方式中，所述生物素结合蛋白与所述抗原蛋白或抗原肽通过肽接头彼此相连。非限定地，所述肽接头可含有任何氨基酸序列并可为任何长度。例如，所述肽接头序列的长度可以是1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个以上氨基酸。在一些实施方式中，将抗原域与生物素结合域相连的肽接头的长度是8个氨基酸。

[0101] 在一些实施方式中，将抗原域连接至生物素结合域的肽接头具有氨基酸序列GGGGSSS(SEQ ID NO:22)。

[0102] 在一些实施方式中，所述抗原蛋白为本文所述的非溶血性Hla。

[0103] 在一些实施方式中，所述非溶血性Hla蛋白为包含本文所述的生物素结合蛋白和非溶血性Hla的融合蛋白。

[0104] 在一些实施方式中，所述非溶血性Hla蛋白为包含本文所述的脂化生物素结合蛋白和非溶血性Hla的融合蛋白。

[0105] 免疫原性组合物

[0106] 本文另一方面提供了含有本文所述的抗原融合蛋白、脂化生物素结合蛋白或非溶血性Hla变体的免疫原性组合物。此外，本文还提供了包含免疫原性复合物的免疫原性组合物和疫苗组合物，该免疫原性复合物包含连接至聚合物支架的至少一种抗原融合蛋白或多种抗原融合蛋白；该组合物用于在给予受试者时引发针对连接至所述聚合物的每一种抗原的免疫应答，以及任选地对所述聚合物本身的免疫应答。不希望被理论所限，本文所述的免疫原性组合物刺激体液免疫应答和细胞免疫应答：它可使用单个MAPS免疫原性构建体产生针对多种蛋白抗原的抗体和Th1/Th17应答。赋予生物体的联合的B细胞免疫力和T细胞免疫

力代表了针对多种疾病(包含肺炎球菌疾病相关的侵袭性感染和鼻咽携带(carriage))的最佳疫苗策略。在一些实施方式中,所述免疫原性组合物为疫苗或包含在疫苗中。

[0107] 因此,本文的实施方式提供了对引发受试者中的免疫应答有用的免疫原性组合物和方法,所述免疫原性组合物和方法可使用其自身或与基本上任意已存在的疫苗方法结合或混合使用。

[0108] 在一些实施方式中,本文公开的免疫原性组合物包含至少2种抗原、或至少3种抗原、或至少5种抗原、或2-10种之间的抗原、或10-15种之间的抗原、或15-20种之间的抗原、或20-50种之间的抗原、或50-100种之间的抗原或超过100种抗原,包括端值。在一些实施方式中,当本文所公开的免疫原性组合物包含至少2种抗原时,所述抗原可为相同的抗原或至少2种不同的抗原。在一些实施方式中,所述抗原可以来自相同病原体或不同病原体,或者可为相同抗原蛋白的不同表位或不同部分,或者可为对相同病原体的不同血清型或季节性变型(如流感病毒A、B和C)具有特异性的相同抗原。

[0109] 在一些实施方式中,本文公开的免疫原性组合物包含来自病原性生物体或异常组织的抗原。在一些实施方式中,所述抗原为肿瘤抗原。在一些实施方式中,抗原可为选自于寄生虫或病原体抗原的至少一种抗原,例如如下抗原:肺炎链球菌抗原、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)抗原或破伤风分枝杆菌(M.tetanus)抗原、炭疽杆菌(Bacillus anthracis)抗原、HIV抗原、季节性或流行性流感抗原(如H1N1或H5N1)、百日咳博德特氏菌(Bordetella pertussis)抗原、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)抗原、脑膜炎奈瑟氏菌(Neisseria meningitides)抗原或淋病奈瑟氏菌(N.gonorrhoeae)抗原、HPV抗原、沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)抗原、HSV抗原或其它疱疹病毒抗原、或疟原虫(Plasmodia)sp抗原。这些抗原可包括肽、蛋白、糖蛋白或多糖。在一些实施方式中,所述抗原为类毒素或毒素的一部分。

[0110] 在一些实施方式中,本文公开的免疫原性组合物包含抗原多糖,例如,如Vi抗原(伤寒沙门氏菌荚膜多糖)、肺炎球菌荚膜多糖、肺炎球菌细胞壁多糖、Hib(B型流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae type B))荚膜多糖、脑膜炎球菌(meningococcal)荚膜多糖、炭疽杆菌的多糖(炭疽的病原体(causative agent))、以及其它细菌荚膜多糖或细胞壁多糖,或上述多糖的任意组合。所述多糖可具有蛋白组分,例如,如来源于病毒的糖蛋白。

[0111] 在一些实施方式中,本文公开的免疫原性组合物进一步包含至少一种与所述聚合物或多糖缔合(associated with)的共刺激因子,其中,所述共刺激因子可直接或间接缔合。例如,在一些实施方式中,共刺激因子可共价连接至所述聚合物。例如,在一些实施方式中,共刺激因子可共价连接至所述第一亲和分子,然后将其交联至所述聚合物。例如,在一些实施方式中,共刺激因子可连接至互补亲和分子,所述互补亲和分子与第一亲和分子缔合,从而将所述共刺激因子连接至所述聚合物。在一些实施方式中,共刺激因子为佐剂(adjuvant)。在替代的实施方式中,共刺激因子可为本领域普通技术人员所知的任何共刺激因子,并包括任意组合,例如但不限于,Toll样受体激动剂(TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8和TLR9等的激动剂)、NOD激动剂或炎性小体(inflammasome)激动剂。

[0112] 在一些实施方式中,所述共刺激因子可以是本文所述的脂化生物素结合蛋白、或α-溶血素的非溶血性变体、或mHla与生物素结合蛋白形成的融合蛋白。

[0113] 本发明的另一方面涉及将本文所公开的免疫原性组合物给予受试者 以在所述受

试者中引发免疫应答的用途。在一些实施方式中，所述免疫应答为抗体应答/B细胞应答、CD4+T细胞应答(包括Th1、Th2和Th17细胞)和/或CD8+T细胞应答。在一些实施方式中，将至少一种佐剂与所述免疫原性组合物联合给药。

[0114] 本发明的另一方面涉及用于在受试者中诱导针对至少一种抗原的免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者给予本文所公开的免疫原性组合物。

[0115] 本发明的另一方面涉及针对至少一种抗原对动物(例如鸟类、哺乳动物或人)进行接种的方法，所述方法包括给予含有本文所公开的免疫原性组合物的疫苗组合物。

[0116] 在本文公开的所有方面中，动物或受试者可为人。在一些实施方式中，所述受试者可为农业动物或非驯养动物(non-domestic animal)、或驯养动物。在一些实施方式中，含有本文所公开的免疫原性组合物的疫苗组合物可经由以下方式给药：皮下、鼻内、口腔、舌下、阴道、直肠、皮内、腹腔内或肌内注射。

[0117] 在本文公开的所有方面中，免疫应答是针对蛋白/肽抗原的抗体应答/B细胞应答、CD4+T细胞应答(包括Th1、Th2和Th17应答)或CD8+T细胞应答。在一些实施方式中，免疫应答是针对所述聚合物(例如，肺炎球菌多糖)的抗体应答/B细胞应答。在一些实施方式中，将至少一种佐剂与所述免疫原性组合物联合给药。

[0118] 本发明的另一方面涉及本文所公开的免疫原性组合物在对暴露于病原体或免疫原性剂进行诊断中的用途。

[0119] 多抗原提呈系统

[0120] 本文还提供了免疫原性多抗原提呈系统(MAPS)，该免疫原性多抗原提呈系统对免疫原性组合物(例如，在疫苗中有用的组合物)的生产有用。特别地，本发明涉及含有免疫原性复合物(immunogenic complex)的组合物，所述免疫原性复合物含有至少一种类型的聚合物(例如多糖)，所述聚合物可任选为抗原性的；至少一种抗原蛋白或抗原肽；以及至少一种互补亲和分子对，所述互补亲和分子对含有(i)与所述聚合物缔合 (associate with)的第一亲和分子，以及(ii)与所述蛋白或肽缔合的互补亲和分子，以使得所述第一亲和分子和互补亲和分子作为所述聚合物与所述抗原蛋白或抗原肽之间的间接连接。因此，所述聚合物可连接至少1种、或至少2种、或多种相同或不同的蛋白抗原或肽抗原。在一些实施方式中，所述聚合物为抗原性的，例如，所述聚合物为肺炎球菌荚膜多糖。在一些实施方式中，所述蛋白抗原或肽抗原为重组蛋白抗原或肽抗原。

[0121] 本文所公开的免疫原性组合物可同时引发针对一种或多种抗原的体液应答和细胞应答这两种应答。所述免疫原性组合物提供了长期记忆应答，潜在地保护受试者免于以后的感染。这允许单个免疫原性组合物产生高效价(titer)的功能性抗多糖抗体，并使其诱发的抗体水平类似于或高于由传统缀合疫苗诱发的抗体水平。此外，对具体的载体蛋白没有限制，并且多种抗原蛋白可用于MAPS构建体中来生成稳健的抗多糖抗体应答。

[0122] 此外，强烈的抗体应答和Th17/Th1应答对经由所述MAPS组合物提呈的多种蛋白抗原具有特异性。这呈现出作为用一种构建体引发两种形式的免疫的手段的主要优点。除了针对缀合至蛋白载体的抗原多糖的更传统的免疫应答之外，本发明提供了针对全身性注射的蛋白的T细胞应答以及，更具体地说，为Th17和Th1应答。此外，本免疫原性组合物可将配体并入到所述聚合物骨架上。这提供了如下潜能：通过改变蛋白/聚合物比例、复合物大小，或通过将特定共刺激因子(如TLR2/4配体等)并入所述组合物中，来增强特异性B细胞应答

或T细胞应答。

[0123] 与典型的缀合技术(涉及对蛋白的严苛处理)相比,本方法避免了肽抗原的其它修饰的变性风险。这提供了如下很大的优势:保持所包含的蛋白的抗原性,并增加蛋白本身将作为抗原(而不只是载体)的可能性。同样地,本方法避免了对多糖骨架不必要的修饰/损坏,因为没有重度化学交联:可精确地控制生物素化以使其与多糖的特定官能团进行反应,并且可容易地对生物素化水平进行调节。这有利于避免缀合的典型过程,所述缀合的典型过程导致关键侧链或表位的损坏,这可能会导致降低的免疫原性和保护。

[0124] 本发明的基于亲和的组装(assembly)提供了简单且高度灵活的免疫原性组合物的制备。它高度特异和稳定;它可以在寒冷中保存数月并保持其效力。组装过程足够简单以确保了高重现性;仅需要几个步骤,这降低了批次间存在偏差的风险,并具有巨大的工业优势。即使在低浓度的蛋白和多糖(如0.1mg/ml)中,MAPS组装也是高效的(超过95%);这是主要优点,因为缀合制造的低效率(效率通常在<50%的范围内)是主要障碍和疫苗高成本的原因。就制剂(formulation)而言:其易于调整终产物的组成和物理性质。在复合物中蛋白:聚合物的比例是可调节的;就聚合物适度的生物素化而言,蛋白:聚合物可为10:1(w/w)以上;相反,如果这就是基于免疫目标的兴趣,所述比例可为1:10以下。此外,免疫原性MAPS组合物的大小可通过对聚合物大小的选择来进行调节。制备MAPS的方法在将聚合物与蛋白联合而几乎无需修饰这方面提供了方便。通过在单一的免疫原性构建体中装载来自相同或不同病原体(例如,肺炎球菌和肺结核)的多种蛋白抗原而得到的终产物的可能的多价性提供了如下组合物:所述组合物可用于减少针对超过一种疾病对受试者进行免疫时所需的疫苗的数量。此外,MAPS组合物高度稳定;只有在煮沸时才会解离(dissociated),并且在4℃甚至许多个月后仍保持免疫原性。MAPS复合物的免疫原性可能会受到抗原蛋白或抗原肽组分的稳定性的限制,所述抗原蛋白或抗原肽的稳定性可通过包含于MAPS复合物中而被延长。本文所用的特定抗原在室温下以及在至少一个冷冻-解冻循环后具有稳定性。这提供了相比于当前疫苗的重要优点,如果没有仔细维持“冷链”的话,当前疫苗会受到损害。

[0125] 因此,本发明一方面涉及免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含聚合物、至少一种蛋白抗原或肽抗原、以及至少一种互补亲和分子对,其中,所述互补亲和分子对包含与所述聚合物缔合的第一亲和分子以及与所述蛋白抗原或肽抗原缔合的互补亲和分子,以使得当所述第一亲和分子与所述互补亲和分子缔合时,间接地将所述抗原连接至所述聚合物。

[0126] 在一些实施方式中,用交联剂将所述第一亲和分子交联至所述聚合物,例如,交联剂选自于:CDAP(1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐)、EDC(1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐)、氰基硼氢化钠;溴化氰;或碳酸氢铵/碘乙酸。在一些实施方式中,所述第一亲和分子交联至所述聚合物的羧基、羟基、氨基、苯氧基、半缩醛以及巯基官能团。在一些实施方式中,所述第一亲和分子共价键合至所述聚合物。

[0127] 在一些实施方式中,所述第一亲和分子为生物素或其衍生物、或具有与生物素类似的结构或物理性质的分子,例如,胺-PEG3-生物素((+)-生物素酰-3,6,9-三氧代十一烷二胺(trixaundecanediamine))或其衍生物。

[0128] 在一些实施方式中,所述免疫原性组合物的蛋白抗原或肽抗原为融合蛋白,所述融合蛋白含有融合至互补亲和结合分子的抗原蛋白或抗原肽。所述融合可为遗传构建体,

即重组融合肽或重组融合蛋白。在一些实施方式中，抗原可作为融合蛋白共价连接至所述互补亲和分子。在替代的实施方式中，所述抗原非共价连接至所述互补亲和分子。

[0129] 在一些实施方式中，所述互补亲和分子为生物素结合蛋白或其衍生物或功能部分。在一些实施方式中，互补亲和分子为亲和素样蛋白或其衍生物或功能部分，例如但不限于，rhizavidin或其衍生物。在一些实施方式中，互补亲和分子为亲和素或链霉亲和素或它们的衍生物或功能部分。

[0130] 在一些实施方式中，分泌信号肽位于所述亲和素样蛋白的N端。本领域普通技术人员所知的任何信号序列均可使用；在一些实施方式中，所述信号序列为MKKIWLALAGLVLAFSASA(SEQ ID NO:2)或其衍生物或功能部分。在一些实施方式中，所述抗原可经由柔性接头肽融合至互补亲和分子，其中，所述柔性接头肽将所述抗原连接至所述互补亲和分子。

[0131] 在一些实施方式中，免疫原的聚合物组分包含来自活生物体(living organism)的聚合物，例如多糖。在一些实施方式中，聚合物可从天然来源中纯化和分离得到，或者可将所述聚合物合成为具有天然组成/结构，或者所述聚合物可为合成(例如，具有人造组成/结构)聚合物。在一些实施方式中，聚合物来源于选自于由以下生物体所组成的组中的生物体：细菌、古生菌、或真核细胞例如真菌、昆虫、植物，或上述生物体的嵌合体。在一些实施方式中，所述聚合物为来源于病原性细菌的多糖。在 具体实施方式中，所述多糖为肺炎球菌荚膜多糖、肺炎球菌细胞壁多糖或伤寒沙门氏菌Vi多糖。

[0132] 在一些实施方式中，本文所公开的免疫原性组合物的聚合物为支链聚合物，例如分支多糖；或者，可为直链聚合物，例如单链聚合物，例如多糖。在一些实施方式中，所述聚合物为多糖，例如，葡聚糖或其衍生物。在一些实施方式中，聚合物(例如葡聚糖多糖)的平均分子量可为425kD-500kDa(包括端值)；或者，在一些实施方式中，为大于500kDa。在一些实施方式中，聚合物(例如葡聚糖多糖)的平均分子量可为60kD-90kDa(包括端值)；或者，在一些实施方式中，为小于70kDa。所述葡聚糖聚合物可来源于细菌，如肠膜明串珠菌(Leuconostoc mesenteroides)。

[0133] 在一些实施方式中，本文公开的免疫原性组合物包含至少2种抗原、或至少3种抗原、或至少5种抗原、或2-10种之间的抗原、或10-15种之间的抗原、或15-20种之间的抗原、或20-50种之间的抗原、或50-100种之间的抗原或超过100种抗原，包括端值。在一些实施方式中，当本文所公开的免疫原性组合物包含至少2种抗原时，所述抗原可为相同的抗原或至少2种不同的抗原。在一些实施方式中，所述抗原可以来自相同病原体或不同病原体，或者可为相同抗原蛋白的不同表位或不同部分，或者可为对相同病原体的不同血清型或季节性变型(如流感病毒A、B和C)具有特异性的相同抗原。

[0134] 在一些实施方式中，本文公开的免疫原性组合物包含来自病原性生物体或异常组织的抗原。在一些实施方式中，所述抗原为肿瘤抗原。在一些实施方式中，抗原可为选自于寄生虫或病原体抗原的至少一种抗原，例如如下抗原：肺炎链球菌抗原、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)抗原或破伤风分枝杆菌(M.tetanus)抗原、炭疽杆菌(Bacillus anthracis)抗原、HIV抗原、季节性或流行性流感抗原(如H1N1或H5N1)、百日咳博德特氏菌(Bordetella pertussis)抗原、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)抗原、脑膜炎奈瑟氏菌(Neisseria meningitides)抗原或淋病奈瑟氏菌(N.gonorrhoeae)抗

原、HPV抗原、沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)抗原、HSV抗原或其它疱疹病毒抗原、或疟原 虫(Plasmodia)sp抗原。这些抗原可包括肽、蛋白、糖蛋白或多糖。在一些实施方式中，所述抗原为类毒素或毒素的一部分。

[0135] 在一些实施方式中，本文公开的免疫原性组合物包含抗原多糖，例如，如Vi抗原(伤寒沙门氏菌荚膜多糖)、肺炎球菌荚膜多糖、肺炎球菌细胞壁多糖、Hib(B型流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae type B))荚膜多糖、脑膜炎球菌(meningococcal)荚膜多糖、炭疽杆菌的多糖(炭疽的病原体(causative agent))、以及其它细菌荚膜多糖或细胞壁多糖，或上述多糖的任意组合。所述多糖可具有蛋白组分，例如，如来源于病毒的糖蛋白。

[0136] 在一些实施方式中，本文公开的免疫原性组合物进一步包含至少一种与所述聚合物或多糖缔合的共刺激因子，其中，所述共刺激因子可直接或间接缔合。例如，在一些实施方式中，共刺激因子可共价连接至所述聚合物。例如，在一些实施方式中，共刺激因子可共价连接至所述第一亲和分子，然后将其交联至所述聚合物。例如，在一些实施方式中，共刺激因子可连接至互补亲和分子，所述互补亲和分子与第一亲和分子缔合，从而将所述共刺激因子连接至所述聚合物。在一些实施方式中，共刺激因子为佐剂(adjuvant)。在替代的实施方式中，共刺激因子可为本领域普通技术人员所知的任何共刺激因子，并包括任意组合，例如但不限于，Toll样受体激动剂(TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7、TLR8和TLR9等的激动剂)、NOD激动剂或炎性小体(inflammasome)激动剂。

[0137] 本发明的另一方面涉及将本文所公开的免疫原性组合物给予受试者以在所述受试者中引发免疫应答的用途。在一些实施方式中，所述免疫应答为抗体应答/B细胞应答、CD4+T细胞应答(包括Th1、Th2和Th17细胞)和/或CD8+T细胞应答。在一些实施方式中，将至少一种佐剂与所述免疫原性组合物联合给药。

[0138] 本发明的另一方面涉及用于在受试者中诱导针对至少一种抗原的免疫应答的方法，所述方法包括向所述受试者给予本文所公开的免疫原性组合物。

[0139] 本发明的另一方面涉及针对至少一种抗原对动物(例如鸟类、哺乳 动物或人)进行接种的方法，所述方法包括给予含有本文所公开的免疫原性组合物的疫苗组合物。

[0140] 在本文公开的所有方面中，动物或受试者可为人。在一些实施方式中，所述受试者可为农业动物或非驯养动物(non-domestic animal)、或驯养动物。在一些实施方式中，含有本文所公开的免疫原性组合物的疫苗组合物可经由以下方式给药：皮下、鼻内、口腔、舌下、阴道、直肠、皮内、腹腔内、肌内注射，或经由皮肤贴剂来经皮免疫。

[0141] 在本文公开的所有方面中，免疫应答是针对蛋白/肽抗原的抗体应答/B细胞应答、CD4+T细胞应答(包括Th1、Th2和Th17应答)或CD8+T细胞应答。在一些实施方式中，免疫应答是针对所述聚合物(例如，肺炎球菌多糖)的抗体应答/B细胞应答。在一些实施方式中，将至少一种佐剂与所述免疫原性组合物联合给药。

[0142] 本发明的另一方面涉及本文所公开的免疫原性组合物在对暴露于病原体或免疫原性剂进行诊断中的用途。

[0143] 本文还提供了以本文所公开的免疫原性组合物对受试者(例如哺乳动物，如人)进行接种的方法，所述方法包括向所述受试者给予本文所公开的疫苗组合物。

[0144] 通常而言，所述含有免疫原性复合物的组合物和免疫原性组合物可包含至少一种抗原或多种抗原，所述至少一种抗原或多种抗原连接至聚合物支架以在给予受试者时用于

引发针对连接至所述聚合物的各抗原的免疫应答，以及任选的针对所述聚合物本身的免疫应答。该多抗原提呈系统(MAPS)刺激体液免疫应答和细胞免疫应答：它可使用单个MAPS免疫原性构建体来产生针对多种蛋白抗原的抗多糖抗体和B细胞/Th1/Th17应答。赋予生物体的联合的B细胞免疫力和T细胞免疫力可能代表了针对多种疾病的最佳疫苗策略，所述疾病包括肺炎球菌疾病相关的侵袭性感染和鼻咽携带(carriage)。在一些实施方式中，所述免疫原性组合物为疫苗或包含于疫苗中。

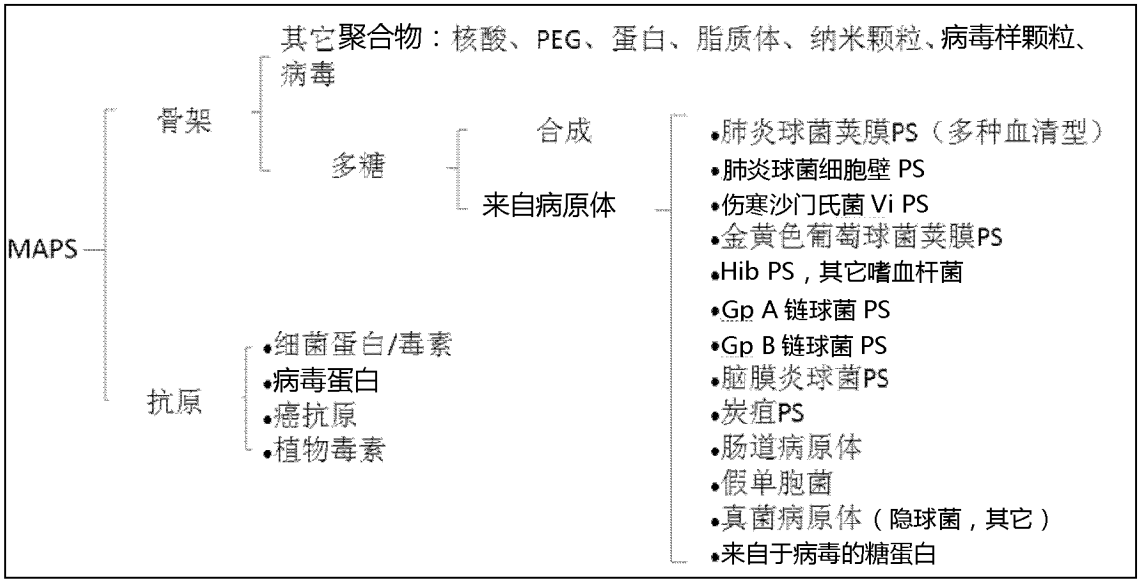
[0145] 因此，本发明一方面涉及免疫原性组合物(多抗原提呈系统，或MAPS)，所述免疫原性组合物包含至少一种聚合物(例如，一种多糖)、至少一种蛋白抗原或肽抗原及至少一种互补亲和分子对，所述互补亲和分子对包含(i)与所述聚合物缔合的第一亲和分子以及(ii)与所述抗原缔合的互补亲和分子，所述互补亲和分子对用于间接地将所述抗原连接至所述聚合物(例如，所述第一亲和分子与所述互补亲和分子缔合，以将所述抗原连接至所述聚合物)。因此，可将所述聚合物用作支架以连接至少1种、或至少2种或更多种(例如，多种)相同或不同的抗原。本文所公开的免疫原性组合物可用于同时引发针对多种抗原的体液免疫力和细胞免疫力这两种免疫力。

[0146] 因此，本文的实施方式提供了对引发受试者中的免疫应答有用的免疫原性组合物和方法，所述免疫原性组合物和方法可使用其自身或与基本上任意已存在的疫苗方法结合或混合使用。

[0147] 所述MAPS是灵活且通用的组合物，其可被设计并制造用于引发特定、广谱、或多种抗原性靶标。表1提供了用于设想MAPS实施方式的灵活性的简单示例指南：

[0148] 表1.MAPS平台的通用性

[0149]



[0150] 聚合物

[0151] MAP的一个组分由“骨架”(通常为聚合物)组成。所述聚合物可以是抗原性的或非抗原性的。如本文所述，它可由各种各样的物质形成，但需要注意的是，所述聚合物在免疫原性模式(immunogenic fashion)中用作向免疫系统提呈所缔合抗原的手段。在一些实施方式中，所述聚合 物为合成聚合物。在一些实施方式中，所述聚合物为天然存在的聚合物，

例如，来源于或纯化自细菌细胞的多糖。在一些实施方式中，所述多糖来源于或纯化自真核细胞(例如，真菌细胞、昆虫细胞或植物细胞)。在其它实施方式中，所述聚合物来源于哺乳动物细胞(例如病毒感染的细胞或癌细胞)。通常情况下，此类聚合物为本领域所公知的，并被包含用于本文所公开的方法和组合物中。

[0152] 在一些实施方式中，聚合物为选自于以下多糖中的任意多糖：葡聚糖、伤寒沙门氏菌的Vi多糖、肺炎球菌荚膜多糖、肺炎球菌细胞壁多糖(CWPS)、脑膜炎球菌多糖、b型流感嗜血杆菌多糖，或者病毒、原核或真核来源的任何其它多糖。

[0153] 在一些实施方式中，所述多糖由抗原性糖部分组成，或者包含抗原性糖部分。例如，在一些实施方式中，用于本文所公开的方法和免疫原性组合物中的多糖为伤寒沙门氏菌Vi多糖。已将Vi荚膜多糖开发用于针对细菌性肠道感染(如伤寒)。Robbins等，150J.Infect.Dis.436(1984年)；Levine等，7Baillieres Clin.Gastroenterol.501(1993年)。Vi为α-1→4-半乳糖醛酸的聚合物，其在C-2位具有N乙酰基，在C-3位具有可变的O-乙酰化。伤寒沙门氏菌的毒力(virulence)与该分子的表达有关。Sharma等，101PNAS 17492(2004年)。伤寒沙门氏菌的Vi多糖疫苗具有若干优点：副作用很少发生并且温和、单剂量产生一致的免疫原性和效力。Vi多糖可通过其它多糖疫苗证实的物理化学方法来可靠地标准化，Vi在室温下稳定，而且它可与其它疫苗同时给予，而不影响免疫原性和耐受性。Azze等，21Vaccine 2758(2003年)。

[0154] 因此，可将伤寒沙门氏菌的Vi多糖交联至本文所公开的第一亲和分子，以将至少一种抗原连接至所述多糖。在一些实施方式中，所述抗原可来自相同生物体或不同生物体，以使所得到的免疫原性组合物赋予了针对一种病原体或两种不同病原体的至少一定程度的免疫力：如果所述抗原赋予了针对肺炎球菌的保护，则聚合物支架为Vi多糖的免疫原性组合物可引起针对伤寒沙门氏菌和肺炎球菌二者的免疫原性应答。其它实例包括将来自于有荚膜的细菌(如脑膜炎球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎球菌、Hib等)的糖和结核抗原联合，以提供引起针对两种不同病原体的 免疫应答的免疫原性组合物。

[0155] 可在本发明中用于替代葡聚糖、细菌细胞壁多糖(CWPS)等的其它多糖(PS)部分包括癌症的碳水化合物抗原。

[0156] 进一步就肺炎球菌多糖而言，所述多糖可来源于目前已经鉴定的超过93种肺炎球菌血清型中的任意一种，例如，包括但不限于血清型1、2、3、4、5、6A、6B、6C、6D、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F和33F。其它血清型可被鉴定并包含于本文所述的免疫原性组合物中。一种以上的肺炎球菌多糖可包含于所述免疫原性组合物中作为聚合物骨架，或者包含于含有所述MAPS组合物的疫苗中。

[0157] 所述多糖还可来源于本发明，所述免疫原性组合物包含来自A、C、W、W135或Y血清群(serogroup)的至少一种、两种、三种或四种中的脑膜炎奈瑟氏菌(N.meningitidis)荚膜多糖。

[0158] 进一步的实施方式包含金黄色葡萄球菌5型、8型或任何一种的多糖或寡糖。

[0159] 在一些实施方式中，所述聚合物是包含一种类型以上聚合物的嵌合聚合物。例如，本文所公开的免疫原性组合物的聚合物可包含一部分的聚合物A，其余部分为聚合物B。对可用于单个MAPS骨架实体的不同种类的聚合物的量没有限制。在一些实施方式中，当所述聚合物为支链聚合物时，所述链聚合物(chain polymer)可以是聚合物A，支链可以是至少1

种、或至少2种、或至少3种或更多种不同的聚合物。

[0160] 在一些实施方式中，所述聚合物是支链聚合物。在一些实施方式中，所述聚合物是单链聚合物。

[0161] 在一些实施方式中，所述聚合物是含有至少10个碳水化合物重复单元的多糖，或含有至少20个、或至少50个、或至少75个、或至少100个、或至少150个、或至少200个、或至少250个、或至少300个、或至少350个、或至少400个、或至少450个、或至少500个、或大于500个重复单元(包括端值)。

[0162] 在本发明的一方面，所述多糖(PS)可具有＜500kDa或＞500kDa的 分子质量。在本发明的另一方面，所述PS具有＜70kDa的分子质量。

[0163] 在一些实施方式中，聚合物是大分子量聚合物，例如，聚合物可具有约425-500kDa的平均分子量(包括端值)，例如，至少300kDa、或至少350kDa、或至少400kDa、或至少425kDa、或至少450kDa、或至少500kDa、或大于500kDa(包括端值)，但通常小于500kDa。

[0164] 在一些实施方式中，聚合物可以是小分子量聚合物，例如，聚合物可具有约60kDa至约90kDa的平均分子量，例如，至少50kDa、或至少60kDa、或至少70kDa、或至少80kDa、或至少90kDa、或至少100kDa、或大于100kDa(包括端值)，但通常小于约120kDa。

[0165] 在一些实施方式中，所述聚合物是由天然来源获得和纯化而来；在其它实施方式中，所述聚合物是合成的。制备合成聚合物(包括合成多糖)的方法是本领域普通技术人员所熟知的，并将其包含于本文所公开的组合物和方法中。

[0166] 在表2中示例性列举出可用作一个以上抗原或一种以上抗原的骨架的多糖聚合物中的几种：

[0167] 表2示例多糖聚合物MAPS骨架和相关的示例抗原

[0168]

多糖		蛋白抗原	
		抗原数量	抗原来源
葡聚糖	D90 (60-90KD)	2	肺炎球菌
	D150 (150 KD)	3	肺炎球菌
	D270 (270 KD)	3	肺炎球菌
	D500 (425-575 KD)	2；3；6	肺炎球菌
肺炎球菌荚膜多糖	血清型 1	1；2；3；5	肺炎球菌，肺结核，葡萄球菌
	血清型 3	5	肺炎球菌，肺结核
	血清型 5	1；2；3；5	肺炎球菌，肺结核
	血清型 6B	2	肺炎球菌
	血清型 7	3	肺炎球菌
	血清型 14	1；2；3；5	肺炎球菌，肺结核
	血清型 19	3	肺炎球菌
肺炎球菌细胞壁多糖		5	肺炎球菌
伤寒沙门氏菌 Vi 多糖		5	肺炎球菌

[0169] 可用于本文所述的免疫原性MAPS组合物中的其它聚合物包括：基 于聚乙二醇的

聚合物、聚(原酸酯)聚合物、聚丙烯酸载体、PLGA、聚乙烯基亚胺(PEI)、聚酰胺-胺(PAMAM)树形聚合物(dendrimers)、β-氨基酯聚合物、聚磷酸酯(PPE)、脂质体、聚合物囊泡(polymerosomes)、核酸、硫代磷酸寡核苷酸(phosphorothioated oligonucleotides)、壳聚糖、丝、聚合物胶束(micelles)、蛋白聚合物、病毒颗粒、病毒样颗粒(VLP)或其它微颗粒。参见例如El-Sayed等,Smart Polymer Carriers for Enhanced Intracellular Delivery of Therapeutic Molecules,5Exp.Op.Biol.Therapy,23(2005)。开发用于核酸递送的生物相容性聚合物可适于用作本文的骨架。参见例如BIOCOMPATIBLE POL.NUCL.ACID.DELIV.(Domb等著,John Wiley&Sons,Inc.Hoboken,NJ,2011)。

[0170] 例如,VLP类似于病毒,但由于其不含有任何病毒遗传物质,因此不具感染性。病毒结构蛋白(例如包膜或衣壳组分)的表达(包括重组表达)可引起VLP的自组装。VLP可由多种病毒科的组分制备,所述病毒科包括细小病毒科(如腺相关病毒)、逆转录病毒科(如HIV)和黄病毒科(如乙型肝炎病毒或丙型肝炎病毒)。VLP可在多种细胞培养系统中进行制备,所述细胞培养系统包括哺乳动物细胞系、昆虫细胞系、酵母和植物细胞。由于病毒组分可融合至本文所述的重组抗原,重组VLP特别有利。

[0171] 抗原

[0172] 本文公开的融合蛋白和免疫原性组合物可包含任何在受试者中引发免疫应答的抗原。在一些实施方式中,至少一种或多种抗原与组合物中的聚合物缔合。在一些实施方式中,可将至少2种、或至少3种、或至少5种、或至少10种、或至少15种、或至少20种、或至少50种、或至少100种、或多于100种抗原与本文公开的聚合物缔合。在一些实施方式中,当免疫原性组合物包含多于一种抗原时,所述抗原可以是与聚合物缔合的同种抗原或者多种不同抗原。在一些实施方式中,当免疫原性组合物包含多于一种抗原时,所述抗原可以是源自相同病原体或源自不同病原体的抗原,或者可以为源自相同病原体的不同抗原、或源自病原体的不同血清型的相似抗原。

[0173] 用于本文所述的融合蛋白和免疫原性复合物以及方法的抗原可以是 任何抗原,包括但不限于:病原性肽、毒素、类毒素,及上述抗原的亚单位,或上述抗原的组合(例如霍乱毒素、破伤风类毒素)。

[0174] 在一些实施方式中,可与互补亲和分子融合的抗原可以是与感染性疾病、癌症或免疫疾病相关的任何抗原。在一些实施方式中,抗原可以是由任何种类的感染原(infectious agent)(包括病毒、细菌、真菌或寄生虫)所表达的抗原。

[0175] 在一些实施方式中,抗原衍生自(如获得自)病原性生物体。在一些实施方式中,抗原为癌抗原或肿瘤抗原,例如,源自肿瘤或癌细胞的抗原。

[0176] 在一些实施方式中,衍生自病原性生物体的抗原是与感染性疾病相关的抗原;该抗原可衍生自任何种类的感染原,包括病毒、细菌、真菌或寄生虫。

[0177] 在一些实施方式中,靶抗原是与病理(例如,感染性疾病或感染性病原体、或者癌症或免疫疾病(例如自身免疫疾病))相关的任何抗原。在一些实施方式中,抗原可由多种传染原(包括病毒、细菌、真菌或寄生虫)表达。用于本文公开的方法和组合物的靶抗原还可包括:例如,病原性肽、毒素、类毒素及上述抗原的亚单位,或上述抗原的组合(例如霍乱毒素、破伤风类毒素)。

[0178] 感染性病毒的非限制性实例包括:逆转录病毒科、小核糖核酸病毒科

(Picornaviridae)(例如,脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、肠道病毒、人柯萨奇病毒(coxsackie viruses)、鼻病毒(rhinoviruses)、艾柯病毒(echoviruses));杯状病毒科(Calciviridae)(如导致胃肠炎的毒株);披膜病毒科(Togaviridae)(例如,马脑炎病毒、风疹病毒);黄病毒科(Flaviridae)(例如,登革热病毒、脑炎病毒、黄热病病毒);冠状病毒科(Coronaviridae)(例如冠状病毒);弹状病毒科(Rhabdoviridae)(例如,水疱性口炎病毒、狂犬病毒);丝状病毒科(Filoviridae)(例如埃博拉病毒);副粘病毒科(Paramyxoviridae)(例如,副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、呼吸道合胞病毒);正粘病毒科(Orthomyxoviridae)(例如流感病毒);布尼亚病毒科(Bungaviridae)(例如汉坦(Hantaan)病 毒、bunga病毒、白蛉病毒(phleboviruses)和内罗病毒(Nairo viruses));沙状病毒科(Arena viridae)(出血热病毒);呼肠孤病毒科(Reoviridae)(呼肠孤病毒、环状病毒(orbiviruses)和轮状病毒);双RNA病毒科(Birnaviridae);嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)(乙型肝炎病毒);细小病毒科(细小病毒);乳多空病毒科(Papovaviridae)(乳头状瘤病毒、多瘤病毒(polyoma viruses));腺病毒科(Adenoviridae)(大多数腺病毒);疱疹病毒科(Herpesviridae)(单纯性疱疹病毒(HSV)-1和HSV-2、水痘带状疱疹病毒、巨细胞病毒(CMV)、马立克氏病病毒、疱疹病毒);痘病毒科(Poxviridae)(天花(variola)病毒、牛痘病毒、痘(pox)病毒);以及虹彩病毒科(Iridoviridae)(例如非洲猪瘟病毒);以及未分类的病毒(例如,海绵状脑病的病原体、丁型肝炎的病原体(认为是乙型肝炎病毒的缺陷卫星型(defective satellite))、非甲型/非乙型肝炎的病原体(1类=内部传播的;2类=非肠道传播的(即,丙型肝炎));诺瓦克病毒(Norwalk)及相关病毒,以及星状病毒)。设想将本文所述的方法和组合物用于治疗这些病毒的感染。

[0179] 通过纳入本实施方式中的抗原可解决的真菌感染的实例包括曲霉病(aspergillosis);鹅口疮(thrush)(由白色念珠菌(Candida albicans)导致);隐球菌病(由隐球菌(Cryptococcus)导致)和组织胞浆菌病(histoplasmosis)。因此,感染性真菌的实例包括但不限于:新型隐球菌(Cryptococcus neoformans)、荚膜组织胞浆菌(Histoplasma capsulatum)、粗球孢子菌(Coccidioides immitis)、皮炎芽生菌(Blastomyces dermatitidis)、沙眼衣原体和白色念珠菌。这些生物体的组分可作为抗原纳入本文所述的MAPS中。

[0180] 在本发明的一方面,抗原衍生自感染性细菌,例如百日咳博德特氏菌(Bordatella pertussis)、布鲁氏菌属(Brucella)、肠球菌属(Enterococci sp.)、脑膜炎奈瑟氏菌(Neisseria meningitidis)、淋病奈瑟氏菌(Neisseria gonorrheae)、莫拉氏菌属(Moraxella)、可分型或不可分型的嗜血杆菌属(Haemophilus)、假单胞菌属(Pseudomonas)、沙门氏菌属(Salmonella)、志贺氏菌属(Shigella)、肠杆菌属(Enterobacter)、柠檬酸杆菌属(Citrobacter)、克雷伯氏菌属(Klebsiella)、大肠杆菌、幽门螺旋杆菌 (Helicobacter pylori)、梭菌属(Clostridia)、拟杆菌属(Bacteroides)、衣原体科(Chlamydiaceae)、霍乱弧菌(Vibrio cholera)、支原体属(Mycoplasma)、密螺旋体(Treponemes)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、嗜肺军团菌(Legionella pneumophilia)、分枝杆菌属(Mycobacteria sps)(例如,结核分枝杆菌(M.tuberculosis)、鸟分支杆菌(M.avium)、胞内分枝杆菌(M.intracellulare)、堪萨斯分枝杆菌(M.kansaii)、

戈登分枝杆菌(M.gordonae)、麻风分支杆菌(M.leprae))、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌(Listeria monocytogenes)、酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)(A群链球菌)、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)(B群链球菌)、链球菌(草绿色群(viridans group))、粪链球菌(Streptococcus faecalis)、牛链球菌(Streptococcus bovis)、链球菌(厌氧种)、肺炎链球菌(Streptococcuspneumoniae)、病原性弯曲杆菌属(Campylobacter sp.)、肠球菌属(Enterococcus sp.)、流感嗜血杆菌、炭疽杆菌(Bacillus anthracis)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheriae)、棒状杆菌属(Corynebacterium sp.)、红斑丹毒丝菌(Erysipelothrix rhusiopathiae)、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)、破伤风梭菌(Clostrididium tetani)、产气肠杆菌(Enterobacter aerogenes)、肺炎克雷伯氏菌(Klebsiella pneumoniae)、钩端螺旋体属(Leptospira sps)、多杀巴斯德氏菌(Pasturella multocida)、拟杆菌属(Bacteroides sp.)、具核梭杆菌(Fusobacterium nucleatum)、念珠状链杆菌(Streptobacillus moniliformls)、梅毒密螺旋体(Treponema pallidium)、细弱密螺旋体(Treponemapertenue)和衣氏放线菌(Actinomyces israelli)。设想将本文所述的方法和组合物用于针对这些细菌感染的治疗或预防。

[0181] 其它可衍生抗原的寄生虫病原体包括:例如,溶组织内阿米巴(Entamoeba histolytica)、恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)、利什曼原虫属(Leishmania sp.)、刚地弓形虫(Toxoplasma gondii)、立克次体(Rickettsia)和寄生蠕虫(Helminths)。

[0182] 在本发明的另一个方面,抗原为:截短型(truncated)肺炎球菌PsaA蛋白;肺炎球菌溶血素类毒素;肺炎球菌丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(StkP);肺炎球菌丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶重复单元(StkPR);肺炎球菌PcsB蛋 白;葡萄球菌α-溶血素;结核分枝杆菌mtb蛋白ESAT-6;结核分枝杆菌细胞壁核心抗原;衣原体CT144、CT242或CT812多肽或它们的片段;衣原体DNA促旋酶(gyrase)B亚基;衣原体亚硫酸盐合成/磷酸氢盐磷酸酶(sulfite synthesis/biphosphate phosphatase);衣原体细胞分裂蛋白FtsY;衣原体甲硫氨酰-tRNA合成酶;衣原体DNA解旋酶(helicase)(uvrD);衣原体ATP合酶I亚基(atpI);或衣原体金属依赖性水解酶。

[0183] 本发明的实施方式提供了靶向结核分枝杆菌(TB)病原体(胞内寄生菌)的免疫原性组合物。TB抗原的一个实例是TbH9(也称为Mtb 39A)。其它TB抗原包括但不限于:DPV(也称为Mtb8.4)、381、Mtb41、Mtb40、Mtb32A、Mtb64、Mtb83、Mtb9.9A、Mtb9.8、Mtb16、Mtb72f、Mtb59f、Mtb88f、Mtb71f、Mtb46f和Mtb31f,其中“f”表明其为融合蛋白或两种以上蛋白。

[0184] 如上所述,抗原可衍生自衣原体属中的种,以用于本发明的免疫原性组合物中。衣原体科(Chlamydiaceae)由衣原体属和嗜性衣原体属(Chlamydophila)组成,为专性(obligate)胞内革兰氏阴性细菌。沙眼衣原体感染是最流行的性传播细菌感染之一,生殖系统衣原体感染每年可能出现8900万例新发病例。本发明的衣原体属还包括例如:沙眼衣原体、肺炎嗜性衣原体(Chlamydophila pneumoniae)、鼠衣原体(C.muridarum)、猪衣原体(C.suis)、流产嗜性衣原体(Chlamydophila abortus)、鹦鹉热嗜性衣原体(Chlamydophila psittaci)、豚鼠嗜性衣原体(Chlamydophila caviae)、猫嗜性衣原体(Chlamydophila felis)、兽类嗜性衣原体(Chlamydophila pecorum)、和肺炎衣原体(C.pneumoniae)。已经建立了衣原体感染的动物模型,在清除易感宿主的初发感染和防止其再次感染中,T细胞均起着关键作用。因此,本文公开的免疫原性组合物可用于通过引发针对衣原体感染的细胞

免疫应答而提供特别价值。

[0185] 更具体而言，本发明中有用的衣原体抗原包括DNA促旋酶B亚基、亚硫酸盐合成/磷酸氢盐磷酸酶、细胞分裂蛋白FtsY、甲硫氨酰-tRNA合成酶、DNA解旋酶(uvrD)；ATP合酶I亚基(atpI)或者金属依赖性水解酶(美国专利申请公开号20090028891)。其它沙眼衣原体抗原包括CT144多肽、具有CT144第67-86位氨基酸残基的肽、具有CT144第77-96 位氨基酸残基的肽、CT242蛋白、具有CT242第109-117位氨基酸的肽、具有CT242多肽第112-120位氨基酸的肽、CT812蛋白(源自pmpD基因)、具有CT812蛋白第103-111位氨基酸残基的肽；以及一些其它源自沙眼衣原体的抗原性肽：

[0186] NVTQDLTSSTAKLECTQDLI(SEQ ID NO:29)，AKLECTQDLIAQGKLIVTNP(SEQ ID NO:30)，SNLKRMQKI(SEQ ID NO:31)，AALYSTEDL(SEQ ID NO:32)，FQEKDADTL(SEQ ID NO:33)，QSVNELVYV(SEQ ID NO:34)，LEFASCSSL(SEQ ID NO:35)，SQAEGQYRL(SEQ ID NO:36)，GQSVNELVY(SEQ ID NO:37)，和QAVLLLDQI(SEQ ID NO:38)。

[0187] 参见WO 2009/020553。此外，可将包括前述多肽的同源物的肺炎衣原体抗原(参见美国专利号6,919,187)用作本文公开的免疫原性组合物和方法中的抗原。

[0188] 真菌抗原可衍生自念珠菌属中的种和其它酵母；或者其它真菌(曲霉、其它环境真菌)。关于其它寄生虫，疟疾以及蠕虫(worm)、阿米巴可提供用于本文公开的免疫原性组合物和方法中的抗原性抗原。

[0189] 在一些实施方式中，当抗原产生抗流感免疫原时，所选择的抗原通常为表面糖蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)。核蛋白(NP)多肽和基质蛋白(M)均为内在病毒蛋白，因此在基于抗体免疫的疫苗设计中通常不予考虑。流感疫苗常用于人类，包括衍生自灭活全流感病毒的疫苗、衍生自活减毒流感病毒的疫苗、或衍生自来自病毒毒株的纯化灭活材料的疫苗。例如，传统流感疫苗可使用三种具有潜在威胁的流感病毒毒株制备。这些毒株通常在鸡受精卵中培育，需要进行大量处理，包括卵的接种和孵育、卵的收集、病毒纯化和灭活、对病毒或病毒组分进行处理和集中(pool)至最终的疫苗制剂、并无菌填充入合适的容器。通常，这一基于卵的生产周期需要超过70周的时间。在大型流感流行事件中，有效、安全的疫苗的可得性是主要的考虑方面。另外，还有与卵中杂质(例如抗生素和污染物)相关的风险，所述杂质对疫苗的无菌性具有不利影响。此外，衍生自卵的流感疫苗禁忌用于患有卵蛋白严重过敏或有Guillain-Barré综合征病史的人群。本发明提供了基于卵的流感疫苗的替代选择，不仅避免了与卵相关的后遗症，而且为在高度受控平台上使用多种流感抗原提供了平台。

[0190] 在一些实施方式中，用于本文公开的免疫原性组合物中的抗原还可以包括用于生物战争中的抗原，例如引起CMI应答的蓖麻毒素。

[0191] 此外，本发明还提供了包含抗原的免疫原性组合物，所述抗原引发针对癌症的免疫应答。在这些缀合物中，抗原是由癌或肿瘤表达的抗原、或者衍生自肿瘤的抗原。在一些实施方式中，此类抗原在本文中称为“癌抗原”，并且通常为主要在癌细胞上表达的蛋白，从而使得所述缀合物既能引发针对所述蛋白的潜在的体液免疫、又能引发针对所述蛋白的潜在的细胞免疫。已识别了大量与癌症相关的抗原，其中数种正被用于制备实验性癌症治疗疫苗，因此也适用于本发明的实施方式。与多于一种类型的癌症相关的抗原包括癌胚抗原(CEA)；癌症/睾丸抗原，例如NY-ESO-1；粘蛋白-1(MUC1)，例如唾液酸化Tn(STn)；神经节苷

脂(Gangliosides)，例如GM3和GD2；p53蛋白；以及HER2/neu蛋白(也称为ERBB2)。对于特定类型癌症独特的抗原包括上皮生长因子受体的突变体(称为EGFRvIII)；黑素细胞/黑素瘤分化抗原，例如酪氨酸酶、MART1、gp100、谱系相关的癌症-睾丸组(MAGE)和酪氨酸酶相关抗原；前列腺特异性抗原；白血病相关抗原(LAA)，如BCR-ABL融合蛋白、Wilms肿瘤蛋白和蛋白酶3；以及独特型(Idiotype，Id)抗体。参见例如：Mitchell，3Curr.Opin.Investig.Drugs 150(2002)；Dao和Scheinberg，21Best Pract.Res.Clin.Haematol.391(2008)。

[0192] 产生针对癌症的免疫应答的另一方法使用了来自微生物的抗原，所述微生物引起或导致癌症发展。使用这类疫苗所针对的癌症包括：肝细胞癌(乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、泰国肝吸虫(Opisthorchis viverrin)、淋巴瘤和鼻咽癌(Epstein-Barr病毒)、结直肠癌、胃癌(幽门螺旋杆菌)、膀胱癌(埃及血吸虫(Schisosoma hematobium))。T细胞白血病(人嗜T细胞淋巴细胞病毒)、宫颈癌(人乳头状瘤病毒)等。目前为止，对于靶向膀胱癌、脑肿瘤、乳腺癌、宫颈癌、肾癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、白血病、肺癌、胰腺癌、前列腺癌和实体瘤的疫苗，已有临床试验。参见Pardoll等，ABELOFF'S CLIN.ONCOL.(第四版，Churchill Livingstone，Philadelphia 2008)；Sioud，360Methods Mol.Bio.277(2007)；Pazdur等，30J.Infusion Nursing 30(3)：173(2007)；Parmiani等，178J.Immunol. 1975(2007)；Lollini等，24Trends Immunol.62(2003)；Schlom等，13 Clin.Cancer Res.3776(2007)；Banchereau等，392Nature 245(1998)；Finn 358New Engl.J.Med.2704(2008)；Curigliano等，7Exp.Rev.Anticancer Ther.1225(2007)。马立克氏病病毒(一种在家禽中引起肿瘤的疱疹病毒)早已通过疫苗得以控制。由此，本实施方式中同时涵盖了预防性或防治性的抗癌症免疫原性组合物及治疗性(treatment/therapeutic)癌症疫苗。

[0193] 可预期的增生性疾病(proliferative diseases)和癌症包括AIDS相关的癌症、听神经瘤(acoustic neuroma)、急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、腺样囊性癌(adenocystic carcinoma)、肾上腺皮质癌、原因不明的髓样化生(agnogenic myeloid metaplasia)、脱发(alopecia)、腺泡状软组织肉瘤(alveolar soft-part sarcoma)、肛门癌、血管肉瘤、星形细胞瘤、共济失调毛细血管扩张症(ataxia-telangiectasia)、基底细胞癌(皮肤)、膀胱癌、骨癌、肠癌、脑和CNS肿瘤、乳腺癌、类癌肿瘤(carcinoid tumor)、宫颈癌、儿童脑肿瘤、儿童癌症、儿童白血病、儿童软组织肉瘤、软骨肉瘤、绒毛膜癌(choriocarcinoma)、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、结直肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤(cutaneous t-cell lymphoma)、隆突性皮肤纤维肉瘤(dermatofibrosarcoma-protuberans)、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤(desmoplastic-small-round-cell-tumour)、导管癌(ductal carcinoma)、内分泌癌(endocrine cancers)、子宫内膜癌、室管膜瘤(ependymoma)、食道癌、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、肝外胆管癌(extra-hepatic bile duct cancer)、眼癌(包括例如眼黑素瘤和视网膜母细胞瘤)、输卵管癌、范可尼贫血(fanconi anemia)、纤维肉瘤、胆囊癌、胃癌、胃肠癌、胃肠类癌肿瘤(Gastrointestinal Carcinoid Tumor)、泌尿生殖系癌、生殖细胞肿瘤、妊娠滋养细胞疾病(gestational-trophoblastic disease)、神经胶质瘤、妇科癌症、血液系统恶性肿瘤(hematological malignancies)、毛细胞白血病(hairy cell leukemia)、头颈部癌、肝细胞癌、遗传性乳腺癌、霍奇金病(Hodgkin's disease)、人乳头状瘤病毒相关的宫颈癌、葡萄胎(hydatidiform mole)、下咽癌(hypopharynx cancer)、胰岛细胞癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、肾

癌、喉癌(laryngeal cancer)、平滑肌肉瘤、白血病、Li-Fraumeni综合 征、唇癌、脂肪肉瘤(liposarcoma)、肺癌、淋巴水肿、淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、男性乳腺癌、肾恶性横纹肌样瘤(malignant-rhabdoid-tumour-of-kidney)、髓母细胞瘤、黑素瘤、Merkel细胞癌、间皮瘤(mesothelioma)、转移性癌(metastatic cancer)、口癌(mouth cancer)、多发性内分泌瘤病(multiple endocrine neoplasia)、蕈样真菌病(mycosis fungoides)、骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome)、骨髓瘤、骨髓增殖性疾病(myeloproliferative disorders)、鼻癌、鼻咽癌、肾母细胞瘤(nephroblastoma)、神经母细胞瘤、神经纤维瘤病、Nijmegen断裂综合征、非黑素瘤皮肤癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、造瘘术卵巢癌(ostomy ovarian cancer)、胰腺癌、鼻旁癌(paranasal cancer)、甲状旁腺癌、腮腺癌(parotid gland cancer)、阴茎癌、外周神经外胚层肿瘤(peripheral-neuroectodermal-tumours)、垂体癌、真性红细胞增多症(polycythemia vera)、前列腺癌、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、Rothmund-Thomson综合征、唾液腺癌、肉瘤、神经鞘瘤(Schwannoma)、Sezary综合征、皮肤癌、小细胞肺癌(SCLC)、小肠癌、软组织肉瘤、脊髓肿瘤、(皮肤)鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤(synovial sarcoma)、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、(膀胱)移行细胞癌、(肾-肾盂/输尿管)移行细胞癌、滋养细胞癌、尿道癌、泌尿系统癌、子宫肉瘤、子宫癌、阴道癌、外阴癌、Waldenstrom巨球蛋白血症(Waldenstrom's-macroglobulinemia)和Wilm氏肿瘤。

[0194] 在一些实施方式中,用于本文公开的免疫原性组合物中的抗原可包括自身免疫疾病的抗原,例如,所述抗原可以是"自身抗原(self-antigen)"。根据本文所述的测定法进行诊断的可预期的自身免疫疾病包括但不限于:斑秃(alopecia areata)、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis)、抗磷脂综合征、Addison氏病、再生障碍性贫血、多发性硬化症、肾上腺自身免疫性疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫卵巢炎和睾丸炎、Behcet氏病、大疱性类天疱疮(bullous pemphigoid)、心肌病(cardiomyopathy)、口炎性腹泻皮肤炎(celiac sprue-dermatitis)、慢性疲劳综合征、慢性炎症性脱髓鞘综合征(chronic inflammatory demyelinating syndrome,CFIDS)、慢性炎症性多发性神经病、Churg-Strauss综合征、瘢痕性类天疱疮(cicatricial pemphigoid)、 CREST综合征、冷凝集素病、Crohn氏病、疱疹样皮炎、盘状狼疮(discoid lupus)、原发性混合型冷球蛋白血症(essential mixed cryoglobulinemia)、纤维肌痛(fibromyalgia)、肾小球肾炎、Grave氏病、Guillain-Barre症、Hashimoto氏甲状腺炎、特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis)、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、IgA肾病、胰岛素依赖型糖尿病(I型)、扁平苔藓(Lichen Planus)、狼疮、Meniere氏病、混合性结缔组织病、重症肌无力、心肌炎、寻常天疱疮(pemphigus vulgaris)、恶性贫血(pernicious anemia)、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺体综合征、风湿性多肌痛(polymyalgia rheumatica)、多发性肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症(primary agammaglobulinemia)、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、Raynaud氏现象、Reiter氏综合征、风湿热、类风湿关节炎、结节病(sarcoidosis)、硬皮病、Sjogren氏综合征、僵人综合征(stiff-man syndrome)、Takayasu动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、Wegener氏综合征、血管炎和白癜风(vitiligo)。通常而言,对患有或可能患有、或易患自身免疫疾病的受试者的潜在或实际的CMI应答性进行评估是非常重要的。

[0195] 在一些实施方式中，用于本文公开的免疫原性组合物的抗原可以是与炎性疾病或病症相关的抗原。其中抗原可能有用的炎性疾病病症的实例包括但不限于：痤疮、咽峡炎(angina)、关节炎、吸入性肺炎、积脓(empyema)、胃肠炎、坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis)、骨盆炎性疾病、咽炎、胸膜炎(pleurisy)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经根神经病(chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy)和慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病等。

[0196] 在一些实施方式中，抗原可以是完整的(即整个或全部的)抗原，或包含一个以上表位的抗原的功能部分。在一些实施方式中，抗原为抗原的肽功能部分。在该上下文中，“完整(intact)”是指抗原为天然存在的抗原多肽的全长抗原。这直接相对于仅递送抗原肽的一小部分。向细胞递送完整抗原能使得或促进引发对完整抗原全部范围的表位的免疫应答，而非仅对单个肽表位或选择的少数肽表位产生免疫应答。因此，本 文所述的方法和免疫原性组合物涵盖了与聚合物缔合的完整抗原，从而与使用基于单表位肽的抗原相比，具有更高敏感性和更高特异性的免疫应答。

[0197] 或者，在一些实施方式中，可依初始抗原的大小将完整抗原分割为多个部分。通常而言，当全抗原为多聚体多肽时，可将所述全蛋白分为亚单位和/或结构域，其中抗原的每一亚单位或结构域可与根据本文公开的方法的聚合物缔合。或者，在一些实施方式中，可将完整抗原分割成整个抗原的功能片段或部分，例如，至少2个、或至少3个、或至少4个、或至少5个、或至少6个、或至少7个、或至少8个、或至少9个、或至少10个、或至少11个，或至少12个、或至少13个、或至少15个、或至少20个、或至少25个、或超过25个的部分(例如碎片(pieces)或片段)，包括端值，其中，抗原的每一功能片段均可与根据本文公开的方法的聚合物缔合。

[0198] 对全长抗原多肽的片段化或分割可以是对全长抗原多肽的均等分割；或者，在一些实施方式中，片段化是不对称或不均等的。作为非限制性实例，当将抗原分割成两个重叠的片段时，可将抗原分割为几乎相同(相等)的大小；或者，一个片段为全抗原的约45％，且另一片段为约65％。作为进一步的非限制性实例，可将全抗原分割为不同大小片段的组合，例如，当抗原被分割为两个片段时，所述片段可被分割为全抗原的约40％和约70％；或约45％和约65％；或约35％和约75％；或约25％和约85％，包括端值。将全长的全抗原的重叠片段的任意组合涵盖用于产生抗原的重叠多肽组(panel)。仅作为说明性实例，当将抗原分割为5部分时，这些部分可均等分割(即，每一重叠片段为抗原整个全长的约21％至25％)或非均等分割(即，可将抗原分割为下列5个重叠片段：相对于全长抗原的大小而言，片段1为约25％、片段2为约5％、片段3为约35％、片段4为约10％、片段5为约25％，每一片段与至少一个其它片段重叠)。

[0199] 通常而言，抗原部分组可基本上覆盖全抗原多肽(或完整抗原多肽)的整个长度。因此，在一些实施方式中，免疫原性组合物包含聚合物和同一完整抗原的多种不同和/或重叠片段。与单独使用肽抗原相比，抗原 的重叠蛋白质片段的生产更迅速更廉价，并具有更优的稳定性。进一步地，在一些实施方式中，由于构象对于表位识别是重要的，比简单肽更大的多肽抗原是优选的，并且该较大的抗原多肽或片段相比于肽片段而言将提供优点。

[0200] 本领域普通技术人员能够将全抗原分割成抗原的重叠蛋白质，以制备抗原的多肽

组。仅通过说明性实例的方式，可将TB特异性抗原TB1(CFP也称培养滤液-10或CFP-10)分割为例如至少17部分，以生成17种不同多肽的组，每一多肽包含不同但重叠的TB特异性抗原TB1(CFP)片段。培养滤液蛋白(CFP-10)(Genbank AAC83445)是来自结核分枝杆菌的10kDa、100个氨基酸残基的蛋白质片段。它也称为L45抗原同源性蛋白(LHP)。

[0201] 本文所述的方法和组合物中使用的靶抗原可通过重组手段得以表达，并可任选地包括促进纯化的亲和标签或表位标签，这一方法是本领域公知的。本发明的抗原可使用寡肽(游离或与载体蛋白缀合)的化学合成获得。寡肽被认为是一种多肽。抗原可表达为与互补亲和分子融合的形式，所述互补亲和分子例如但不限于rhizavidin或其衍生物或功能片段。此外，还可以制备靶抗原，然后将其与互补亲和分子相缀合，所述互补亲和分子例如但不限于rhizavidin或其衍生物或功能片段。

[0202] 还可通过如美国专利号5,229,490和5,390,111中公开的内容将多肽合成为分支结构。抗原性多肽包括例如，合成或重组的B细胞表位和T细胞表位、通用型T细胞表位、以及来自一种生物体或疾病的T细胞表位和来自另一生物体或疾病的B细胞表位的混合。

[0203] 可由重组手段或化学多肽合成获得的抗原以及来自天然资源或提取物的抗原可通过抗原的物理和化学特性进行纯化，如通过分级分离(fractionation)或色谱进行纯化。这些技术是本领域公知的。

[0204] 在一些实施方式中，抗原可溶于水、溶剂(例如甲醇)或缓冲液中。合适的缓冲液包括但不限于：不含Ca^{2+}/Mg^{2+}的磷酸盐缓冲盐水(PBS)、生理盐水(150mM NaCl溶于水中)以及Tris缓冲液。可将不能溶于中性缓冲液中的抗原溶解在10mM乙酸中，随后用中性缓冲液(如PBS)稀释至所需体积。在抗原仅在酸性pH下溶解的情况下，在溶解于稀释的乙酸中后，可使用酸性pH下的乙酸盐-PBS作为稀释剂。本文所述的组合物、方法和试剂盒可使用甘油作为合适的非水溶剂。

[0205] 典型地，当对针对病原体设计蛋白质疫苗时，病毒的胞外蛋白或暴露于环境中的蛋白通常是疫苗抗原成分的理想候选物。针对该胞外蛋白而产生的抗体成为在感染期间对抗病原体的第一道防线。抗体结合至病原体上的蛋白，从而促进抗体的调理作用并将病原体进行标记，以使吞噬细胞(如巨噬细胞)摄取和破坏病原体。抗体的调理作用还能通过抗体依赖性细胞毒性杀灭病原体。抗体触发细胞(如单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和自然杀伤细胞)释放裂解产物。

[0206] 在本文所述的本发明的一个实施方式中，用于本文公开的组合物中的抗原可全部为野生型蛋白，这是因为氨基酸残基具有在天然存在的病毒中发现、且并未被选择性生长条件或分子生物学方法所改变的序列。

[0207] 在一个实施方式中，本文所述的免疫原性组合物可包含为糖基化蛋白的抗体。换言之，感兴趣的抗原可各自为糖基化蛋白。在本文所述的免疫原性组合物的一个实施方式中，抗原或抗原融合多肽是O-连接糖基化的。在本文所述的免疫原性组合物的另一实施方式中，抗原或抗原融合多肽是N-连接糖基化的。在本文所述的免疫原性组合物的又一实施方式中，抗原或抗原融合多肽同时是O-连接和N-连接糖基化的。在其它实施方式中，其它类型的糖基化是可能的，例如C-甘露糖基化。蛋白质的糖基化主要出现在真核细胞中。N-糖基化对于一些真核生物蛋白质的折叠是重要的，其提供共翻译和翻译后修饰机制以对膜蛋白和分泌蛋白的结构和功能进行调节。糖基化是连接多糖以生成聚糖、并将其附着至蛋白质

和脂质的酶过程。在N-糖基化中，在蛋白翻译期间，聚糖附着至天冬酰胺侧链的酰胺氮上。形成聚糖的三类主要多糖为葡萄糖、甘露糖和N-乙酰葡糖胺分子。N-糖基化的共有结构为Asn-Xaa-Ser/Thr，其中Xaa可以是任何已知的氨基酸。O-连接糖基化在蛋白加工过程后期出现，可能是在高尔基体中发生。在O-连接糖基化中，N-乙酰半乳糖胺、O-岩藻糖、O-葡萄糖和/或N-乙酰葡糖胺被添加至丝氨酸或苏氨酸残基。本领域技术人员可使用生物信息学软件(如来自Technical University of Denmark 的NetNGlyc 1.0和NetOGlyc Prediction软件)寻找本发明中的多肽中的N-糖基化和O-糖基化位点。NetNglyc服务器使用人工神经网络检验Asn-Xaa-Ser/Thr序列的序列上下文(sequence context)，预测蛋白质的N-糖基化位点。NetNGlyc 1.0和NetOGlyc 3.1Prediction软件可通过EXPASY网站访问。在一个实施方式中，N-糖基化发生于本文所述的融合多肽的靶抗原多肽中。

[0208] 亲和分子对

[0209] 如本文公开的，在一些实施方式中，抗原通过互补亲和对连接至聚合物。这种将抗原连接至聚合物是通过如下方式介导的：将聚合物连接至第一亲和分子，所述第一亲和分子与第二(例如互补)亲和分子缔合，所述第二亲和分子连接至所述抗原。互补亲和对的实例为生物素/生物素结合蛋白。

[0210] 亲和互补亲和对的示例性实例包括但不限于生物素结合蛋白或结合至生物素的亲和素样蛋白。例如，当第一亲和结合分子为生物素(与聚合物缔合)时，所述互补亲和分子可以是生物素结合蛋白或亲和素样蛋白或其衍生物，例如但不限于：亲和素、rhizavidin或链霉亲和素，或它们的变体、衍生物或功能部分。

[0211] 在一些实施方式中，第一亲和结合分子为生物素、生物素衍生物或生物素模拟物，例如但不限于胺-PEG3-生物素((+)生物素酰-3,6,9-三氧代十一烷二胺)或其衍生物或功能片段。特定的生物素模拟物具有特定的肽基序，所述基序含有序列$DX_aAX_bPX_c$(SEQ ID NO:39)或$CDX_aAX_bPX_cCG$(SEQ ID NO:40)，其中，X_a为R或L，X_b为S或T，X_c为Y或W。这些基序可结合亲和素和中性亲和素(neutravidin)，但不能结合链霉亲和素，参见例如Gaj等，56Prot.Express.Purif.54(2006)。

[0212] 第一亲和分子与聚合物的连接、以及互补亲和分子与抗原的连接可以是非共价连接、或化学机制(例如共价结合、亲和结合、嵌插(intercalation)、配位结合和络合(complexation))。共价结合提供了非常稳定的结合，特别适用于本文的实施方式。共价结合可通过已有侧链的直接缩合或通过并入外部桥接分子(bridging molecules)而实现。

[0213] 例如，在一些实施方式中，可将抗原非共价键合至互补结合对(affixing pair)中的一者。在另一些实施方式中，可将抗原共价键合或融合至互补结合对中的一者。产生融合蛋白的方法是本领域公知的，并在本文中有论述。

[0214] 在其它实施方式中，第一亲和结合分子通过非共价键或通过共价键连接至聚合物。在一些实施方式中，使用交联剂将第一亲和结合分子共价键合至本文公开的聚合物。

[0215] 在一些实施方式中，第一亲和结合分子通过本领域已知的非共价键缔合作用与互补亲和分子缔合，所述本领域已知的非共价键缔合作用包括但不限于：静电相互作用、氢键、疏水相互作用(即范德华力)、亲水相互作用及其它非共价相互作用。还预期了与中间体部分的其它高阶(higher order)相互作用。

[0216] 在一些实施方式中，互补亲和分子为亲和素相关的多肽。在具体实施方式中，所述

互补亲和分子为rhizavidin，例如重组rhizavidin。具体而言，所述重组rhizavidin为能够在大肠杆菌中以高产量表达的修饰rhizavidin。通常的产量为＞30mg每升大肠杆菌培养液。与其它亲和素样蛋白相比，Rhizavidin与卵亲和素具有较低的序列同源性(22.4％的序列一致性和35.0％的相似度)。使用修饰的rhizavidin减少了MAPS诱发受试者中卵相关过敏反应的风险。此外，针对重组修饰的rhizavidin的抗体对于卵亲和素没有明显的交叉反应性(反之亦然)。

[0217] 更具体而言，一些实施方式包含设计用于在大肠杆菌中重组表达的修饰rhizavidin。使用大肠杆菌表达密码子对rhizavidin基因的编码序列进行优化，以避免由于原始基因中存在的稀有密码子而在大肠杆菌中表达期间产生的任何困难。为简化构建体，在基于生物信息学和结构的分析后，由于发现其对于核心结构和功能而言是非必须的，因此移除了全长rhizavidin的前44个残基。通过在截短型rhizavidin(45-179)的N端添加大肠杆菌分泌信号序列，提升了重组蛋白的正确折叠，以促进重组蛋白转位(translocate)进入大肠杆菌细胞的周质空间，在周质空间中对于rhizavidin而言功能重要的二硫键能够正确形成。修饰重组的rhizavidin形成二聚体，与已知的形成四聚体的亲和素样蛋白相比，进一步增强了 重组rhizavidin-抗原融合体在大肠杆菌中作为可溶蛋白的表达。

[0218] 此外，根据本文其它部分的进一步详细讨论，为改善融合抗原在大肠杆菌中的表达和溶解性，在rhizavidin和抗原蛋白之间添加柔性接头区域。此外，基于生物信息学和结构分析，对不同抗原构建体进行了克隆和表达：全长抗原、或重要的功能域、或包含两种不同抗原的嵌合蛋白。

[0219] 其它可用于本文所述的方法和组合物中的亲和对包括抗原-抗体、金属/离子-金属/离子结合蛋白、脂质/脂质结合蛋白、糖/糖结合蛋白、氨基酸/肽-氨基酸/肽结合蛋白、酶-底物或酶-抑制剂、配体/激动剂-受体或生物素模拟物。当使用其它亲和对时，还可使用其它连接相应聚合物与抗原的手段，如体外酶反应而非基因融合。更具体而言，抗原-抗体亲和对提供了非常强且特异性的相互作用。抗原可以是任何表位，包括蛋白质、肽、核酸、脂质、多糖/寡糖、离子等。抗体可以是任何类型的免疫球蛋白或免疫球蛋白的Ag结合部分，如Fab片段。关于金属/离子-金属/离子结合蛋白，实例包括Ni NTA与组氨酸标记蛋白、或Zn与Zn结合蛋白。关于脂质/脂质结合蛋白，实例包括胆固醇与胆固醇结合蛋白。关于糖/糖结合蛋白，实例包括麦芽糖与麦芽糖结合蛋白、甘露糖/葡萄糖/寡糖与凝集素。酶-底物/抑制剂包括来自广泛物质中的底物，包括蛋白质、肽、氨基酸、脂质、糖或离子。抑制剂可以是实际底物的类似物，通常与酶的结合更紧密，甚至是不可逆的。例如，胰蛋白酶与大豆胰蛋白酶抑制剂。抑制剂可以是天然分子或合成分子。关于其它配体/激动剂-受体，配体可来自广泛的物质，包括蛋白质、肽、氨基酸、脂质、糖或离子，激动剂可以是实际配体的类似物。实例包括LPS与TLR4相互作用。

[0220] 交联剂

[0221] 许多二价或多价连接剂可用于将蛋白分子偶联至其它分子。例如，代表性的偶联剂可包括有机化合物，如硫酯(thioesters)、碳二亚胺、琥珀酰亚胺酯、二异氰酸酯、戊二醛、重氮苯和己二胺(hexamethylene diamine)。该列表并非旨在对本领域已知的各类偶联剂进行穷举，而是示例性地给出最常见的偶联剂。参见Killen&Lindstrom，133J.Immunol.1335(1984)；Jansen等，62Imm.Rev.185(1982)；Vitetta等。

[0222] 在一些实施方式中，涵盖了文献中所描述的交联剂以用于本文公开的方法、免疫原性组合物和试剂盒中。参见例如：Ramakrishnan等，44Cancer Res.201(1984)(描述了MBS(M-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯)的使用)；Umemoto等，美国专利号5,030,719(描述了通过寡肽接头将卤代乙酰肼衍生物偶联至抗体的使用)。特别的接头包括：(a)EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)；(b)SMPT(4-琥珀酰亚胺氧羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫代)-甲苯(Pierce Chem.Co.,Cat.(21558G))；(c)SPDP(琥珀酰亚胺-6[3-(2-吡啶基二硫代)丙酰胺基]己酸酯(Pierce Chem.Co.,Cat.#2 165 1G))；(d)硫代-LC-SPDP(硫代琥珀酰亚胺6[3-(2-吡啶基二硫代)-丙酰胺基]己酸酯(Pierce Chem.Co.,Cat.#2165-G))；以及(f)缀合至EDC的硫代-NHS(N-羟基硫代琥珀酰亚胺(Pierce Chem.Co.,Cat.#245 10))。

[0223] 上述连接或连接剂含有具有不同作用的成分，因此使缀合物具有不同的生理化学性质。例如，烷基羧酸酯的硫代-NHS酯比芳香族羧酸酯的硫代-NHS酯稳定。含有接头的NHS-酯比硫代-NHS酯难溶。此外，SMPT接头含有空间受阻的二硫键，因此能形成稳定性更高的缀合物。由于二硫键连接在体外可被切割，因此二硫键连接通常比其它连接不稳定，导致可用的缀合物较少。特别而言，硫代-NHS能够增强碳二亚胺偶联的稳定性。与仅使用碳二亚胺偶联反应的情况相比，当与硫代-NHS联合使用时，碳二亚胺偶联(例如EDC)形成的酯对于水解的耐受性更强。

[0224] 用于本文公开的免疫原性组合物和方法中的示例性的交联分子包括但不限于列于表3和表4中的分子。

[0225] 表3：示例性的同双功能交联剂*

[0226]

交联目标	交联剂反应基团，特征	示例产品
胺-与-胺	NHS 酯	DSG；DSS；BS3；TSAT（三功能）；生物缀合工具盒试剂对
	NHS 酯，PEG 间隔	BS(PEG)5；BS(PEG)9
	NHS 酯，巯基可被剪切	DSP；DTSSP
	NHS 酯，多种剪切方式（misc-cleavable）	DST；BSOCOES；EGS；硫代-EGS
	酰亚胺酯（imidoesters）	DMA；DMP；DMS
	酰亚胺酯，巯基可被剪切	DTBP
	其它	DFDNB；THPP（三功能）；乙醛活化葡聚糖试剂盒
巯基-与-巯基	马来酰亚胺	BMOE；BMB；BMH；TMEA（三功能）
	马来酰亚胺，PEG 间隔	BM(PEG)2；BM(PEG)3
	马来酰亚胺，可被剪切	BMDB；DTME
	吡啶二硫醇，可被剪切	DPDPB
	其它	HBVS（乙烯基砜）
非选择性	芳基叠氮化物	BASED（巯基可被剪切）
*在两端具有相同类型反应基团的交联剂。通过所述交联剂对何种化学基团进行交联（左栏）、以及所述交联剂的化学组成（中栏）对试剂进行分类。产品按照在每一单元格中长度增加的顺序列出。		

[0227] 表4：示例性的异双功能交联剂*

[0228]

交联目标	交联剂反应基团，特征	示例产品
胺-与-巯基	NHS 酯/马来酰亚胺	AMAS；BMPS；GMBS 和硫代-GMBS；MBS 和硫代-MBS；SMCC 和硫代-SMCC；EMCS 和硫代-EMCS；SMPB 和硫代-SMPB；SMPH；LC-SMCC；硫代-KMUS
	NHS 酯/马来酰亚胺，PEG 间隔	SM(PEG)2；SM(PEG)4；SM(PEG)6；SM(PEG)8；SM(PEG)12；SM(PEG)24
	NHS 酯/吡啶二硫醇，可被剪切	SPDP；LC-SPDP 和硫代-LC-SPDP；SMPT；硫代-LC-SMPT
	NHS 酯/卤代乙酰基	SIA；SBAP；SIAB；硫代-SIAB
胺-与-非选择性	NHS 酯/芳基叠氮化物	NHS-ASA ANB-NOS 硫代-HSAB 硫代-NHS-LC-ASA SANPAH 和硫代-SANPAH
	NHS 酯/芳基叠氮化物，可被剪切	硫代-SFAD；硫代-SAND；硫代-SAED
	NHS 酯/双吖丙啶（diazirine）	SDA 和硫代-SDA；LC-SDA 和硫代-LC-SDA
	NHS 酯/双吖丙啶，可被剪切	SDAD 和硫代-SDAD
胺-与-羧基	碳二亚胺	DCC；EDC
巯基-与-非选择性	吡啶二硫醇/芳基叠氮化物	APDP
巯基-与-碳水化合物	马来酰亚胺/酰肼	BMPH；EMCH；MPBH；KMUH
	吡啶二硫醇/酰肼	BMPH；EMCH；MPBH；KMUH
碳水化合物-与-非选择性	酰肼/芳基叠氮化物	ABH
羟基-与-巯基	异氰酸酯/马来酰亚胺	PMPI
胺-与-DNA	NHS 酯/补骨脂素	SPB
*在两端具有不同反应基团的交联剂。通过所述交联剂对何种化学基团进行交联（左栏）、以及所述交联剂的化学组成（中栏）对试剂进行分类。产品按照在每一单元格中长度增加的顺序列出。		

[0229] 共刺激因子

[0230] 在一些实施方式中，本文公开的免疫原性组合物包含至少一种共刺激分子。在一些实施方式中，共刺激因子交联至聚合物。在一些实施方式中，共刺激因子通过互补亲和对与聚合物缔合，其类似于抗原与聚合物的缔合。在一些实施方式中，将共刺激因子连接至聚合物的互补亲和对与将抗原连接至聚合物的互补亲和对相同或不同。

[0231] 在一些实施方式中，可将至少1种、或至少2种、或至少3种、或至少5种、或至少10种、或至少15种、或至少20种、或至少50种、或至少100种、或超过约100种(包括端值)共刺激因子与本文公开的聚合物缔合。在一些实施方式中，所述共刺激因子可以是相同的共刺激因子，或所述共刺激因子可以是与聚合物缔合的多种不同共刺激因子。

[0232] 在一些实施方式中，共刺激因子为Toll样受体的配体/激动剂，例如但不限于：TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11等。在一些实施方式中，共刺激因子为NOD配体/激动剂、或炎性小体的激活剂/激动剂。不希望为理论所限，炎性小体为下列物质所组成的多蛋白寡聚体：半胱天冬酶1、PYCARD、NALP，有时为半胱天冬酶5或半胱天冬酶11；并且，炎性小体促进炎性细胞因子白介素1-β和白介素18的成熟。

[0233] 在一些实施方式中，共刺激因子为细胞因子。在一些实施方式中，细胞因子选自于由下列细胞因子所组成的组：GM-CSF；IL-1α；IL-1β；IL-2；IL-3；IL-4；IL-5；IL-6；IL-7；IL-8；IL-10；IL-12；IL-23；IFN-α；IFN-β；IFN-β；IFN-γ；MIP-1α；MIP-1β；TGF-β；TNFα；和TNFβ。在一些实施方式中，共刺激因子为佐剂，所述佐剂可如先前所讨论地与聚合物缔合，或可在对受试者给药之前或在给药同时添加至MAPS组合物。佐剂在本文的其它部分有进一步描述。

[0234] 重组蛋白的制备

[0235] 重组蛋白可由本领域技术人员或通过使用商购试剂盒方便地进行表达和纯化，所述商购试剂盒例如PROBOND™ Purification System (Invitrogen Corp.,Carlsbad,CA)。在一些实施方式中，重组抗原可使 用本领域普通技术人员所知的细菌表达系统、酵母表达系统、杆状病毒(baculovirus)/昆虫细胞表达系统、哺乳动物细胞表达系统、或转基因植物或动物系统通过蛋白纯化方法来进行合成和纯化。

[0236] 本文所述的蛋白、多肽以及融合多肽皆可通过本领域技术人员所熟知的蛋白和分子方法进行合成和纯化。使用分子生物学方法和重组异源蛋白表达系统。例如，重组蛋白可在细菌、哺乳动物、昆虫、酵母或植物细胞中，或者在转基因植物或动物宿主中表达。

[0237] 在一个实施方式中，本文提供了分离的多核苷酸，所述多核苷酸编码本文所述的融合多肽或非融合多肽。可将常规聚合酶链式反应(PCR)克隆技术用于构建编码本文所述的融合多肽的嵌合编码序列或融合编码序列。可将编码序列克隆进通用克隆载体中，例如pUC19、pBR322、 pBLUESCRIPT®载体(Stratagene，Inc.)或pCR TOPO® (Invitrogen)。然后，可将生成的重组载体(携带有编码本文所述的多肽的核酸)用于进一步的分子生物学操作(例如，定点突变)，以生成本文所述的变体融合多肽，或者可将其亚克隆进蛋白表达载体或病毒载体，以使用选自于由下列宿主细胞所组成的组中的宿主细胞在多种蛋白表达系统中进行蛋白合成：哺乳动物细胞系、昆虫细胞系、酵母、细菌和植物细胞。

[0238] 每个PCR引物应具有在待扩增区域与其相应模板重叠的至少15个核苷酸。PCR扩增中使用的聚合酶应具有高保真性(例如*Pfu*ULTRA®聚合酶(Stratagene))，以减少PCR扩

增过程中的序列错误。为了例如在构建融合多肽以及在随后将其插入克隆载体时易于将几条独立的PCR片段连接在一起，PCR引物还应在其旁侧末端具有独特且唯一的限制性消化位点，所述限制性消化位点在PCR扩增期间不与DNA模板发生退火。每对具体引物的限制性消化位点的选择应使得融合多肽的编码DNA序列在读码框中(in-frame)，并能从头到尾编码所述融合多肽，而不含终止密码子。同时，在融合多肽的编码DNA序列中不应存在所选的限制性消化位点。可将目的多肽的编码DNA序列连接至克隆载体pBR322或其衍生物之一中，以进行扩增、对嵌合编码序列的保真度和真实性(authenticity)进行验证、针对多肽中的特定氨基酸突变和替换进行替换和/或特定定点突变。

[0239] 或者，可使用例如包含拓扑异构酶辅助的TA载体(如pCR®-TOPO、pCR®-Blunt II-TOPO、pENTR/D-TOPO®和pENTR/SD/D-TOPO®(Invitrogen，Inc.，Carlsbad，CA))的TOPO®克隆方法将多肽的编码DNA序列PCR克隆入载体。pENTR/D-TOPO®和pENTR/SD/D-TOPO®均为定向TOPO入门载体(entry vector)，所述定向TOPO入门载体能够允许将DNA序列以5'→3'方向克隆入GATEWAY®表达载体。5'→3'方向的定向克隆便于将DNA序列单向插入蛋白表达载体中，以使得启动子位于融合多肽的编码DNA序列的5'ATG起始密码子的上游，这使得启动子能够驱动蛋白表达。可将携带有融合多肽的编码DNA序列的重组载体转染至常用的克隆大肠杆菌(如XL1Blue、SURE®(STRATAGENE®)和TOP-10细胞(Invitrogen))中并在其中进行增殖。

[0240] 本领域技术人员能够使用特别设计的寡核苷酸探针和本领域所熟知的聚合酶链式反应(PCR)方法学，对感兴趣的抗原的编码区域与互补亲和分子的编码区域进行克隆和连接，以构建融合多肽的嵌合编码序列，所述融合多肽包含抗原或其片段以及互补亲和分子或其衍生物。本领域技术人员还能够将融合蛋白的嵌合编码序列克隆并连接入所选的载体中，例如细菌表达载体、昆虫表达载体或杆状病毒表达载体。抗原和靶抗原多肽或其片段的编码序列应以在读码框中的方式连接，并且所述嵌合编码序列应连接在启动子的下游、启动子和转录终止子之间。随后，将所述重组载体转染入常规的克隆大肠杆菌(例如XL1Blue)中。然后，通过抗生素抗性对怀有转化载体DNA的重组大肠杆菌进行筛选，以除去任何怀有非重组质粒DNA的大肠杆菌。使筛选出的转化子大肠杆菌进行生长，随后对重组载体DNA进行纯化，用于转染至草地贪夜蛾(S.frugiperda)细胞中。

[0241] 在一些实施方式中，本文所公开的抗原可包含用于转位至细菌周质空间的信号肽。所述信号肽也被称作N端前导肽，所述信号肽在转位过膜后可能被切除或可能不被切除。信号肽的一个实例为本文所公开的MKKIWLALAGLVLAFSASA(SEQ ID NO:2)。另一信号肽为MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRA(SEQ ID NO:7)。信号肽的其它实例可以在SPdb(信号肽数据库，Signal Peptide Database)中找到，所述数据库可在万维网网址“proline.bic.nus.edu.sg/spdb/”找到。

[0242] 在一些实施方式中，当将所述抗原融合至生物素结合蛋白时，信号序列可位于所述生物素结合蛋白的N端。在一些实施方式中，在转位入大肠杆菌周质空间后，将所述信号序列从所述生物素结合蛋白上切除。

[0243] 在一些实施方式中，当将所述抗原融合至互补亲和蛋白时，信号序列可位于所述互补亲和蛋白的N端。例如，如果将抗原融合至亲和素样蛋白，所述信号序列可位于所述互

补亲和蛋白的N端。在一些实施方式中，在互补亲和蛋白与第一亲和分子缔合前，将所述信号序列从所述互补亲和蛋白上切除。

[0244] 在一些实施方式中，本文所述的抗原和/或互补亲和蛋白缺少信号序列。

[0245] 本文所述的多肽可在多种表达宿主细胞中进行表达，所述宿主细胞例如细菌、酵母、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、藻类细胞(如衣藻(Chlamadomonas))，或可在无细胞表达系统中进行表达。在一些实施方式中，可将核酸从克隆载体中亚克隆至重组表达载体，所述重组表达载体适于在细菌、哺乳动物、昆虫、酵母、或植物细胞、或无细胞表达系统(如兔网织红细胞(rabbit reticulocyte)表达系统)中表达融合多肽。一些载体被设计用于转移编码核酸以用于在单个重组反应(one single recombination reaction)中在哺乳动物细胞、昆虫细胞和酵母中进行表达。例如，一些GATEWAY® (Invitrogen)目的载体(destination vector)被设计用于构建杆状病毒、腺病毒、腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒和慢病毒(lentiviruses)，当所述病毒感染其各自的宿主细胞时，允许融合多肽在合适的宿主细胞中进行异源表达。根据制造商的说明书，将基因转移入目的载体只需两步即可实现。已有用于在昆虫细胞、哺乳动物细胞和酵母中进行蛋白表达的GATEWAY®表达载体。在大肠杆菌中进行转化和筛选之后，表达载体已准备好用于在合适的宿主中表达。

[0246] 其它表达载体和宿主细胞的实例有：用于在哺乳动物细胞系(如CHO、COS、HEK-293、Jurkat和MCF-7)中进行表达的基于强CMV启动子的pcDNA3.1载体(Invitrogen)和pCINEO载体(Promega)；用于 在哺乳动物细胞中进行腺病毒介导的基因转移和表达的复制缺陷腺病毒载体pADENO-X™、pAd5F35、pLP-ADENO™-X-CMV(CLONTECH®)、pAd/CMV/V5-DEST、pAd-DEST载体(Invitrogen)；用于在哺乳动物细胞中进行逆转录病毒介导的基因转移和表达的用于与来自Clontech的RETRO-X™系统一起使用的pLNCX2、pLXSN和pLAPSN逆转录病毒载体；用于在哺乳动物细胞中进行慢病毒介导的基因转移和表达的pLenti4/V5-DEST™、pLenti6/V5-DEST™和pLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen)；用于在哺乳动物细胞中进行腺相关病毒介导的基因转移和表达的腺病毒相关病毒表达载体，例如pAAV-MCS、pAAV-IRES-hrGFP和pAAV-RC载体(Stratagene)；用于在草地贪夜蛾9(Sf9)、Sf11、Tn-368和BTI-TN-5B4-1昆虫细胞系中进行表达的BACpak6杆状病毒(Clontech)和pFASTBAC™ HT(Invitrogen)；用于在果蝇(Drosophila Schneider)S2细胞中进行表达的pMT/BiP/V5-His(Invitrogen)；用于在巴斯德毕赤酵母(P.pastoris)中进行表达的毕赤酵母(Pichia)表达载体pPICZα、pPICZ、pFLDα和pFLD(Invitrogen)，和用于在甲醇毕赤酵母(P.methanolica)中进行表达的载体pMETa和pMET；用于在酵母酿酒酵母(S.cerevisiae)中进行表达的载体pYES2/GS和pYD1(Invitrogen)。

[0247] 描述了在莱茵衣藻(Chlamydomonas reinhardtii)中大规模表达异源蛋白的最新进展(Griesbeck.,34 Mol.Biotechnol.213(2006)；Fuhrmann,94 Methods Mol Med.191(2006))。将外源异源编码序列通过同源重组插入细胞核、叶绿体和线粒体的基因组中。可将携带有最通用的叶绿体筛选标记氨基糖苷类腺苷转移酶(aminoglycoside adenyl transferase,aadA)(赋予对大观霉素(spectinomycin)或链霉素的抗性)的叶绿体表达载体p64用于在叶绿体中表达外源蛋白。可将基因枪方法(biolistic gene gun method)用于将载体引入藻类。在所述载体进入叶绿体中后，外源DNA从基因枪颗粒释放，并通过同源重

组整合入叶绿体基因组中。

[0248] 本发明还包括融合至抗原的互补亲和分子。在一些实施方式中，融合构建体还可任选包含纯化标签和/或分泌信号肽。这些融合蛋白可通过任何标准方法进行生产。例如，就生产表达抗原-互补亲和分子融合蛋白的稳定细胞系而言，可将PCR扩增的抗原核酸克隆至哺乳动物表达载体 的衍生物的限制性位点中。例如，KA(pcDNA3(Invitrogen)的衍生物)含有编码流感病毒血凝素标签(HA)的DNA片段。或者，还可使用编码其它标签(如c-myc标签或聚组氨酸标签)的载体衍生物。可依据制造商的说明书使用例如LIPOFECTAMINE™(Gibco-BRL，Gaithersburg，MD)或使用本领域已知的其它合适的转染技术，将抗原-互补亲和分子融合表达构建体与标记物质粒共转染入合适的哺乳动物细胞系(例如COS、HEK293T、或NIH 3T3细胞)。合适的转染标记物包括例如，β-半乳糖苷酶或绿色荧光蛋白(GFP)表达质粒、或并不含有与抗原-互补亲和分子融合蛋白相同的可检测标记物的任何质粒。可对融合蛋白表达细胞进行分选和进一步培养，或可对具有标签的抗原-互补亲和分子融合蛋白进行纯化。在一些实施方式中，可对具有信号肽的抗原-互补亲和分子融合蛋白进行扩增。在替代实施方式中，可对不带有信号肽的编码抗原-互补亲和分子融合蛋白的cDNA进行扩增，并将其亚克隆至具有强分泌信号肽的载体(pSecTagHis)。在另一实施方式中，抗原-互补亲和分子融合蛋白可具有用于纯化的碱性磷酸酶(AP)标签或组氨酸(His)标签。将本领域普通技术人员已知的用于对抗原和/或抗原-互补亲和分子融合蛋白进行蛋白纯化的任何方法涵盖用于本发明的方法中。

[0249] 在一些实施方式中，本文所述的任何多肽通过由重组杆状病毒载体进行表达而生成。在另一实施方式中，本文所述的任何多肽通过昆虫细胞进行表达。在另一实施方式中，本文所述的任何多肽从昆虫细胞中分离而来。在昆虫细胞中用杆状病毒进行蛋白表达具有多重优势，其中包括高表达水平、易于放大、生产的蛋白具有翻译后修饰以及简化的细胞生长。昆虫细胞在生长中不需要CO_2，可容易地适应用于大规模表达的高密度悬浮培养。昆虫细胞中还使用了在哺乳动物系统中存在的多种翻译后修饰途径，这允许生产在抗原性、免疫原性和功能性上类似于天然哺乳动物蛋白的重组蛋白。

[0250] 杆状病毒为杆状病毒科(Baculoviridae)中的DNA病毒。已知这些病毒具有窄的宿主范围，所述宿主范围主要限于昆虫的鳞翅目(Lepidopteran)物种(蝴蝶和蛾)。杆状病毒苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus，AcNPV)(已成 为原型杆状病毒)在易感的培养昆虫细胞中有效地进行复制。AcNPV具有约130,000个碱基对的双链闭合环状DNA基因组，并在宿主范围、分子生物学和遗传学方面对其进行了很好的表征。杆状病毒表达载体系统(BEVS)是在昆虫细胞和昆虫中大量生产重组蛋白的安全且快速的方法。杆状病毒表达载体系统是在昆虫细胞中用于高水平重组蛋白表达的强大且通用的系统。已报道使用杆状病毒表达系统的表达水平高达500mg/L，这使其成为高水平表达的理想系统。通过在杆状病毒DNA和嵌合质粒(含有感兴趣的基因序列)间进行同源重组的方式对表达外源基因的重组杆状病毒进行构建。可通过其独特的噬菌斑形态和纯化至均质的空斑(plaque-purified to homogeneity)对重组病毒进行检测。

[0251] 本文所述的重组融合蛋白可在昆虫细胞中进行生产，所述昆虫细胞包括但不限于，来源于鳞翅目物种草地贪夜蛾的细胞。也可将能够被杆状病毒感染的其它昆虫细胞(例如来自物种家蚕(Bombyx mori)、大蜡螟(Galleria mellanoma)、粉纹夜蛾(Trichplusia

ni)或舞毒蛾(Lamanthria dispar)的昆虫细胞)用作合适的物质来生产本文所述的重组蛋白。重组蛋白的杆状病毒表达为本领域所熟知。参见美国专利No.4,745,051、No.4,879,236、No.5,179,007、No.5,516,657、No.5,571,709和No.5,759,809。本领域技术人员能够理解的是,所述表达系统不限于杆状病毒表达系统。重要的是所述表达系统指导所表达的重组蛋白进行N-糖基化。本文所述的重组蛋白也可在其它表达系统中进行表达,所述表达系统如Entomopox病毒(昆虫痘病毒)、细胞质型多角体病毒(CPV),并可转化昆虫细胞以进行重组基因的组成型表达。很多杆状病毒转移载体和相应的合适的修饰宿主细胞可商购获得,例如来自BD Biosciences的pAcGP67、pAcSECG2TA、pVL1392、pVL1393、pAcGHLT和pAcAB4;来自NOVAGEN®的pBAC-3、pBAC-6、pBACgus-6和pBACsurf-1;以及来自SIGMA ALDRICH®的pPolh-FLAG和pPolh-MAT。

[0252] 位于启动子和转录终止子之间的区域可具有多个限制性酶切消化位点以便于对外源编码序列进行克隆,在此情况下,所述外源编码序列为抗原多肽和互补亲和分子的编码DNA序列。可包含其它序列,例如信号肽编码序列和/或标签编码序列(如MCS上游的His标签、MAT标签、FLAG标签、肠激酶识别序列、蜜蜂蜂毒肽分泌信号、β-半乳糖苷酶、谷胱甘肽S转移酶(GST)标签),以便于分泌、识别、适当插入、重组病毒的阳性筛选和/或重组蛋白的纯化。

[0253] 在一些实施方式中,融合蛋白可包含本文所公开的N端信号序列。在一些实施方式中,所述信号序列连接至本文所公开的互补亲和分子的N端。

[0254] 在一些实施方式中,本文所述的融合多肽具有间隔肽(例如,14-残基间隔(GSPGISGGGGGILE)(SEQ ID NO:41)),所述间隔肽将抗原与互补亲和分子隔开。此类短间隔的编码序列可通过对引物的互补对进行退火来构建。本领域技术人员能够设计并合成将用来编码所选间隔的寡核苷酸。间隔肽通常应具有非极性氨基酸残基,例如甘氨酸和脯氨酸。

[0255] 可将本领域技术人员所知的标准技术用于引入突变,以在本文所述的融合多肽的抗原多肽序列中(例如在本文所述的核苷酸序列编码的融合多肽中的抗原中)造成氨基酸的替换,所述技术包括例如定点突变和PCR介导的突变。相对于本文所述的融合多肽,变体融合多肽优选具有少于50个氨基酸替换、少于40个氨基酸替换、少于30个氨基酸替换、少于25个氨基酸替换、少于20个氨基酸替换、少于15个氨基酸替换、少于10个氨基酸替换、少于5个氨基酸替换、少于4个氨基酸替换、少于3个氨基酸替换、或少于2个氨基酸替换,包括端值。

[0256] 也可在DNA编码序列中制造某些沉默突变或中性错义突变,所述突变不改变编码的氨基酸序列或促进跨膜传递的能力。这些类型的突变对如下方面有用:优化密码子使用、或改善重组蛋白的表达和生产。

[0257] 在载体中融合多肽编码序列的特定定点突变可以用来制造特定的氨基酸突变和替换。可以根据制造商的说明书使用例如来自Stratagene的 QUICKCHANGE®定点突变试剂盒,来进行定点突变。

[0258] 在一个实施方式中,本文描述了含有本文所述多肽的编码DNA序列的表达载体,以表达和纯化所述重组多肽,所述重组多肽由使用选自如下宿主细胞的蛋白表达系统生成:例如,细菌、哺乳动物、昆虫、酵母或植物细胞。所述表达载体应具有必需的5′上游调控元件

和3′下游调控 元件，例如，启动子序列、核糖体识别和TATA盒、以及3′UTR AAUAAA转录终止序列，以使其在各自的宿主细胞中得以进行高效的基因转录和翻译。所述表达载体优选为具有转录启动子和转录终止子的载体，所述转录启动子选自于由以下启动子所组成的组：CMV(巨细胞病毒)启动子、RSV(劳斯肉瘤病毒)启动子、β-肌动蛋白启动子、SV40(猴病毒40)启动子和肌肉肌酸激酶启动子，所述转录终止子选自于由SV40聚(A)终止子和BGH终止子所组成的组；更优选如下表达载体：具有巨细胞病毒早期启动子/增强序列以及腺病毒三联前导序列/内含子序列，以及含有SV40的复制起点和聚(A)序列的表达载体。所述表达载体可具有额外的编码区域，如编码如下的区域：例如，6X-组氨酸、V5、硫氧还蛋白、谷胱甘肽S-转移酶、c-Myc、VSV-G、HSV、FLAG、麦芽糖结合肽、金属结合肽、HA和“分泌”信号(蜜蜂蜂毒肽、α-因子、PHO、Bip)，所述区域可并入表达的融合多肽。此外，在这些编码区域之后还可并入酶消化位点，以在如果不需要所述编码区域时，将其酶法去除。这些额外的核酸可对如下方面有用：对融合多肽表达的检测、通过亲和层析进行的蛋白纯化、重组蛋白在宿主细胞质中增强的溶解度、和/或将表达的融合多肽分泌至培养基或分泌出酵母细胞的原生质体。融合多肽的表达在宿主细胞中可为组成型，或其可通过例如，用硫酸铜、如半乳糖的糖类、甲醇、甲胺、硫胺素、四环素、以杆状病毒进行的感染和(异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷)IPTG(乳糖的稳定合成类似物)进行诱导。

[0259] 在另一实施方式中，含有本文所述的多核苷酸的表达载体为病毒载体，如腺病毒、腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒和慢病毒载体等。重组病毒为基因表达研究和治疗应用提供了通用系统。

[0260] 在一些实施方式中，本文所述的融合多肽由哺乳动物细胞的病毒感染进行表达。所述病毒载体可以是，例如，腺病毒、腺相关病毒(AAV)、逆转录病毒和慢病毒。用于生成重组腺病毒的简化系统由He等，95PNAS2509(1998年)提出。首先将感兴趣的基因克隆入穿梭载体，例如，pAdTrack-CMV。所生成的质粒通过用限制性内切酶PmeI消化来进行线性化，随后将其与腺病毒骨架质粒(例如，Stratagene的ADEASY™腺病 毒载体系统的pADEASY-1)共转化进入大肠杆菌BJ5183细胞中。选择卡那霉素抗性的重组腺病毒载体，并通过限制性内切酶分析对重组进行确证。最后，将线性化的重组质粒转染入腺病毒包装细胞系，例如HEK293细胞(E1转化的人类胚胎肾细胞)或911(E1转化的人类胚胎视网膜细胞)。Fallaux等，7 Human Gene Ther.215(1996年)。重组腺病毒在HEK293细胞中生成。

[0261] 重组慢病毒在分裂的哺乳动物细胞和未分裂的哺乳动物细胞中具有融合多肽递送和表达的优势。与基于莫洛尼白血病病毒(Moloney Leukemia Virus，MoMLV)的逆转录病毒系统相比，基于HIV-1的慢病毒能有效地转导较宽的宿主范围。重组慢病毒的制备可使用例如，pLenti4/V5-DEST™、pLenti6/V5-DEST™或pLenti载体与来自Invitrogen，Inc.的VIRAPOWER™慢病毒表达系统一起来实现。

[0262] 重组腺相关病毒(rAAV)载体适用于范围广泛的宿主细胞，包括许多不同的人细胞系或组织和非人细胞系或组织。rAAV能够转导宽范围的细胞类型，并且所述转导不依赖于活跃宿主细胞分裂。在上清液中容易获得＞10^8病毒颗粒/ml的高效价以及由进一步浓缩得到10^{11}-10^{12}病毒颗粒/ml。转入的基因被整合进入宿主基因组中，因此表达是长期且稳定的。

[0263] AAV载体的大规模制备通过对包装细胞系的三质粒共转染：将携带编码核酸的AAV

载体、含有AAV rep和cap基因的AAV RC载体、以及腺病毒辅助质粒pDF6共转染入亚汇合的293细胞的50×150mm平板。转染三天后收获细胞，病毒通过三个冷冻-解冻循环或超声处理而释放。

[0264] AAV载体可通过两种不同方法进行纯化，这取决于载体的血清型。基于AAV2载体对肝素的亲和性，通过一步重力流柱(single-step gravity-flow column)法对AAV2载体进行纯化。Auricchio等，12 Human Gene Ther.71(2001年)；Summerford和Samulski，72J.Virol.1438(1998年)；Summerford和Samulski，5 Nat.Med.587(1999年)。目前通过三个相继的CsCl梯度对AAV2/1和AAV2/5载体进行纯化。

[0265] 不期望受理论束缚，当蛋白被细胞(包括细菌细胞)表达时，将蛋白导向(targeted to)细胞中的特定部分或从细胞中分泌出。因此，蛋白 导向或蛋白分选是一种机制，细胞通过该机制将细胞转运至细胞中的合适位置或细胞外。分选的目标可以是细胞器的内部空间、若干内膜的任何之一、细胞的外膜或经由分泌到达它的外部。这一递送过程基于蛋白本身所含的信息进行。正确的分选对细胞至关重要；错误可能导致疾病。

[0266] 有一些例外，细菌缺乏真核生物中存在的膜结合细胞器，但它们可将蛋白组装到各种类型的内含物(例如气囊(gas vesicles)和储存颗粒)上。同时，根据细菌的种类，细菌可能具有单个质膜(革兰氏阳性细菌)、或具有内(质)膜和外细胞壁膜二者，并在这二者之间具有称为周质的含水空间(革兰氏阴性细菌)。根据是否存在外膜，可将蛋白分泌至环境中。质膜处的基本机制与真核细胞类似。此外，细菌可导向蛋白进入或穿过外膜。分泌蛋白穿过细菌外膜的系统可能相当复杂，并在发病机制中发挥关键作用。这些系统可被描述为I型分泌、II型分泌等。

[0267] 在大多数革兰氏阳性细菌中，某些蛋白被导向穿出质膜，随后共价连接至细菌细胞壁。专门的酶分选酶(sortase)在蛋白C端附近的特征识别位点处(例如LPXTG基序(SEQ ID NO:42)(其中X可以是任何氨基酸))对靶蛋白进行切割，然后将所述蛋白转移至细胞壁上。类似于分选酶/LPXTG、具有PEP-CTERM基序(SEQ ID NO:43)、被称为外分选酶(exosortase)/PEP-CTERM的系统已被提出存在于广泛的革兰氏阴性菌中。

[0268] 具有合适的N端靶向信号的蛋白在细胞质中合成，然后定向至特定的蛋白转运途径。在所述蛋白转位穿过细胞质膜期间或之后不久，将所述蛋白加工并折叠成其活性形式。然后，使转位的蛋白保留在细胞的周质侧，或释放进入环境中。由于将蛋白导向膜的信号肽是转运途径特异性的关键决定因素，因此，按照其将蛋白所定向的转运途径对这些信号肽进行分类。信号肽的分类基于信号肽酶(SPase)的类型，所述信号肽酶负责信号肽的移除。大多数输出的蛋白通过一般的“分泌(Sec)途径”从细胞质中运输出。大多数众所周知的由革兰氏阳性病原体分泌的毒力因子(如金黄色葡萄球菌的外毒素、炭疽杆菌的保护性抗原、单核细胞增生李斯特氏菌的李斯特菌素(lysteriolysin)O)具有典型的N端信号肽，所述N端信号肽会将它们导向Sec途径。经由这一途径分泌的蛋白 以未折叠的状态转位穿过细胞质膜。这些蛋白的后续加工和折叠在膜另一侧的细胞壁环境中进行。除Sec系统外，一些革兰氏阳性细菌还含有Tat系统，所述Tat系统能够将折叠的蛋白转位穿过膜。病原性细菌可能含有某些特殊目标输出系统，所述系统具体涉及少数几个蛋白的转运。例如，已在分枝杆菌中鉴定出几个基因簇，所述基因簇编码经由特定途径(ESAT-6)分泌到环境中的蛋白，所述蛋白对分枝杆菌发病机制很重要。特异的ATP结合盒(ABC)转运蛋白指导被称作细菌素

(bacteriocins)的小抗菌肽的输出及加工。负责细菌裂解启动的内溶素(endolysins)的基因通常位于编码类穴蛋白(holin-like)的基因附近,这表明这些穴蛋白负责将内溶素输出至细胞壁。Wooldridge,BACT.SECRETED PROTS:SECRETORY MECHS.&ROLE IN PATHOGEN (Caister Academic Press,2009)。

[0269] 在一些实施方式中,在本发明中有用的信号序列为OmpA信号序列,然而,涵盖本领域普通技术人员通常所知的允许将抗菌剂转运和分泌至噬菌体感染细胞外的任何信号序列,以用于本发明。

[0270] 指导蛋白从细菌细胞中分泌的信号序列为本领域所众所周知,例如在国际申请WO 2005/071088中所公开的信号序列。例如,可使用表5所示的信号肽非限制性实例中的一些,所述信号肽可连接至抗菌肽(Amp)或抗菌多肽的氨基端或羧基端,以通过抗菌剂工程化的噬菌体(例如,AMP工程化噬菌体)进行表达。连接可经由与所选的抗原或抗原-互补亲和分子融合蛋白进行融合或嵌合构成,以使其从感染有抗菌剂工程化的噬菌体(例如AMP工程化噬菌体)的细菌中分泌。

[0271] 表5指导细菌细胞的蛋白或肽抗原或抗原-互补亲和分子融合蛋白分泌的示例信号肽

[0272]

分泌途径	信号肽氨基酸序列（NH_2-CO_2）	基因	属/种
secA1	MKKIMLVITLILVSPIAQQTEAKD (SEQ ID NO: 44)	*Hly* (LLO)	单核细胞增生李斯特氏菌
	MKKKIISAILMSTVILSAAAPLSG VYADT (SEQ ID NO: 45)	*Usp45*	乳酸乳球菌（*Lactococcus lactis*）
	MKKRKVLIPLMALSTILVSSTGN LEVIQAEV (SEQ ID NO: 46)	*Pag*（保护性抗原）	炭疽杆菌
secA2	MNMKKATIAATAGIAVTAFAAPT IASAST (SEQ ID NO: 47)	Iap（侵袭相关蛋白 p60）	单核细胞增生李斯特氏菌
	MQKTRKERILEALQEEKKNKKS KKFKTGATIAGVTAIATSITVPGIE VIVSADE (SEQ ID NO: 48)	NamA Imo2691（自溶素）	单核细胞增生李斯特氏菌
	MKKLKMASCALVAGLMFSGLTP NAFAED (SEQ ID NO: 49)	*BA_0281（NLP/P60 族）	炭疽杆菌
	MAKKFNYKLPSMVALTLVGSAV TAHQVQAAE (SEQ ID NO: 50)	* atl（自溶素）	金黄色葡萄球菌
Tat	MTDKKSENQTEKTETKENKGMT RREMLKLSAVAGTGIAVGATGLG TILNVVDQVDKALT (SEQ ID NO: 51)	Imo0367	单核细胞增生李斯特氏菌
	MAYDSRFDEWVQKLKEESFQNN TFDRRKFIQGAGKIAGLGLGLTIA QSVGAFG (SEQ ID NO: 52)	PhoD（碱性磷酸酶）	枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtillis*）

[0273] 本文所述的多肽,如抗原或抗原-互补亲和分子融合蛋白可通过本领域技术人员已知的各种方法进行表达和纯化,例如,本文所述的融合多肽可由任何合适的表达系统纯化而得。通过标准技术可将融合多肽纯化至基本上纯,所述技术包括使用如硫酸铵的物质进行选择性沉淀、柱色谱、免疫纯化法以及其它技术;这些技术在本领域中是公知的。参见

例如Scopes,PROTEIN PURIFICATION:PRINCIPLES&PRACTICE(1982);美国专利号4,673,641。

[0274] 纯化重组蛋白时可使用多种工序。例如,可将具有确定的分子粘附性质的蛋白质可逆地融合至所选择的蛋白。使用合适的配体,可将所述蛋白选择性地吸附至纯化柱,然后以相对纯的形式由所述柱释放。然后通过酶活性移除融合的蛋白。最后,可以使用亲和或免疫亲和柱对所选择的蛋白进行纯化。

[0275] 蛋白在宿主细胞中表达之后,可裂解所述宿主细胞以释放出所表达 的蛋白来用于纯化。裂解多种宿主细胞方法记载于"Sample Preparation-Tools for Protein Research"EMD Bioscience和Current Protocols in Protein Sciences(CPPS)中。纯化方法的实例为亲和色谱,如使用镍、钴、或锌亲和树脂(用于组氨酸标记的融合多肽)的金属-离子亲和色谱。由Clontech使用其TALON®钴树脂、以及NOVAGEN®在其pET系统手册,第10版中对纯化组氨酸标记的重组蛋白的方法进行了描述。另一优选的纯化策略为免疫亲和色谱,例如,可将抗-myc抗体缀合的树脂用于亲和纯化myc-标记的融合多肽。当存在合适的蛋白酶识别序列时,可将融合多肽由组氨酸或myc标记处切断,由亲和树脂释放所述融合多肽,而将组氨酸标记和myc标记残留附着至所述亲和树脂。

[0276] 纯化重组蛋白和天然存在的蛋白的标准蛋白分离技术在本领域中是公知的,例如溶解度分级分离(solubility fractionation)、尺寸排阻凝胶过滤以及各种柱色谱。

[0277] 溶解度分级分离:经常作为起始步骤,特别是当蛋白质混合物复杂时更是如此,初始的分级盐析可将许多不需要的宿主细胞蛋白(或者源自细胞培养基的蛋白)与感兴趣的蛋白分离。优选的盐为硫酸铵。硫酸铵通过有效地减少蛋白质混合物中水的量来使蛋白质沉淀。然后蛋白质基于其溶解度而沉淀。疏水性越强的蛋白越有可能在较低的硫酸铵浓度下沉淀。通常的流程包括将饱和硫酸铵添加至蛋白质溶液,使得所得的硫酸铵浓度为20%-30%。这一浓度将使最具疏水性的蛋白质沉淀。然后弃去沉淀(除非感兴趣的蛋白质是疏水性蛋白质),并将硫酸铵加入至上清液,直至已知使感兴趣的蛋白质沉淀的浓度。然后将沉淀在缓冲液中溶解(solubilized),如果有必要,通过透析或渗滤移除过量的盐。依赖于蛋白质溶解度的其它方法(如冷乙醇沉淀)是本领域技术人员公知的,并且可用于分级分离复杂的蛋白质混合物。

[0278] 尺寸排阻过滤:使用通过不同孔径膜(例如AMICON®或Millipore®膜)的超滤,可利用所选择的蛋白质的分子量以将其与更大或更小的蛋白质分离。首先,通过膜对蛋白质混合物进行超滤,所述膜具有截留分子量低于感兴趣蛋白质的分子量的孔径。随后将超滤的滞留物(retentate)通过具有截留分子量高于感兴趣蛋白质的分子量的孔径的膜进行超滤。重组蛋白将通过膜进入滤液。随后可如下述对滤液进行色谱分离。

[0279] 柱色谱:还可根据所选择的蛋白质的大小、净表面电荷、疏水性和配体亲和性将所选择的蛋白质与其它蛋白质分离。另外,可将针对重组蛋白或天然存在的蛋白产生的抗体缀合至柱基质并免疫纯化蛋白。全部这些方法在本领域中都是公知的。对本领域技术人员而言显而易见的是,色谱技术可在任何规模上实施,并可使用来自众多不同制造商(例如,Pharmacia Biotech)的设备。例如,可使用PA63七聚物亲和柱对抗原多肽进行纯化。Singh等,269,J.Biol.Chem.29039(1994)。

[0280] 在一些实施方式中，可将包含例如：(a)离子交换色谱、(b)羟基磷灰石色谱、(c)疏水相互作用色谱和(d)尺寸排阻色谱的纯化步骤的组合用于对本文所述的融合多肽进行纯化。

[0281] 还设想了无细胞表达系统。无细胞表达系统提供了若干优于传统的基于细胞的表达方法的优点，包括易于对反应条件进行修改以利于蛋白质折叠、降低对产品毒性的敏感度、以及由于降低了反应体积和处理时间而对高通量策略的适用性(例如快速表达筛选或大量蛋白质生产)。无细胞表达系统可以使用质粒DNA或线性DNA。此外，翻译效率的改善已使得每毫升反应混合物的蛋白质产量高于1毫克。市售的无细胞表达系统包括TNT偶联网织红细胞裂解物系统(Promega)(使用基于兔网织红细胞的体外系统)。

[0282] 免疫组合物的制剂及使用方法

[0283] 本发明的具体实施方式提供了本文所公开的免疫原性组合物在动物中引发免疫应答的用途。更具体而言，所述组合物既引发体液免疫又引发细胞免疫，并在许多情况下引发粘膜免疫。本发明的实施方式对于感染，特别是肺炎球菌感染提供了至少部分保护或在感染后提供了至少部分改善。肺炎球菌导致多种疾病，如脑膜炎、肺炎、菌血症(bacteremia)和中耳炎。全球每年都有近100万儿童死于肺炎球菌疾病。已对肺炎链球菌进行了广泛研究，并且基因组中的至少一些得以测序。参见例如美国专利号7,141,418。尽管针对定义了已知血清型的荚膜多糖的抗体赋予了血清型特异性的保护，然而其它免疫保护机制也已得以描述。参见 Malley等，88J.Mol.Med.135(2010)。这些其它保护机制包括但不限于针对非荚膜抗原的抗体和针对肺炎球菌成分的T细胞应答。蛋白-多糖缀合疫苗PCV7的应用已显著减少了疾病。Black等，24(S2)Vaccine 79(2006)；Hansen等，25Pediatr.Infect.Dis.J.779(2006)。然而，最近的研究表明在PCV7中缺乏其它血清型导致了产生肺炎球菌血清型替换。Pichichero&Casey，26(S10)Pediatr.Infect.Dis.J.S12(2007)。

[0284] 对于物种全部血清型而言的某些通用肺炎球菌抗原已显出具有潜在的免疫保护作用，而不论如何封装，例如表面蛋白PspA、PspC、PsaA和细胞毒素肺炎球菌溶血素或肺炎球菌溶血类毒素(pneumolysoid)突变体(Basset等，75Infect.Immun.5460(2007)；Briles等，18Vaccine 1707(2000))；基因组和突变文库的使用已识别了数十种额外的物种通用蛋白(Hava&Camilli，45Mol.Microbiol.1389(2002)；Wizemann等，60Infect.Immun.1593(2001))。在动物模型中已由个别抗原诱发免疫(Alexander等，62Infect.Immun.5683(1994)；Balachandran等，70Infect.Immun.2526(2002)；Chung等，170J.Immunol.1958(2003)；Glover等，76Infect.Immun.2767(2008)；Wu等，175J.Infect.Dis.839(1997))，但目前还没有用于人的基于通用抗原的疫苗获得批准。

[0285] 在一个实施方式中，本文提供了对哺乳动物进行接种的方法，所述方法包括给予免疫原性组合物，所述免疫原性组合物含有连接至至少一种类型的聚合物支架(例如多糖或碳水化合物聚合物)的至少一种或多种抗原，以用于在给予受试者时引发针对连接至所述聚合物的所述一种或多种抗原的免疫应答。在一些实施方式中，所述免疫应答为体液免疫应答和/或细胞免疫应答。

[0286] 因此，本发明的一方面涉及在受试者中引发免疫应答的方法，所述方法包括向受试者给予免疫原性组合物，所述免疫原性组合物包含至少一种类型的聚合物(例如多糖)、

至少一种抗原和至少一种互补亲和分子对，所述互补亲和分子对包含(i)与所述聚合物(例如多糖)缔合的第一亲和分子；以及(ii)与所述抗原缔合的互补亲和分子，从而将所述抗原连接至所述聚合物(例如多糖)(例如，所述第一亲和分子与所述互补亲和分子缔合，从而将所述抗原连接至所述聚合物(例如多糖))。

[0287] 因此，本发明的一方面涉及同时引发针对多种抗原的体液免疫和/或细胞免疫的方法，例如，给予受试者的免疫原性组合物包含含有至少1种、或至少2种或更多种，例如多种相同或不同抗原的聚合物。

[0288] 本发明的一方面涉及针对病原体对受试者(例如鸟类或哺乳动物(例如人类))进行免疫(immunization)或接种的方法，所述方法包括给予本文所公开的免疫组合物，所述组合物包含至少一种衍生自一种或多种病原体的抗原。在一些实施方式中，受试者可同时针对至少1种、或至少2种、或至少2种、或至少3种、或至少5种、或至少10种、或至少15种、或至少约20种、或至少50种、或至少约100种、或超过100种不同病原体进行免疫，其中免疫原性组合物的聚合物连接有相应的不同抗原。

[0289] 在一些实施方式中，可向受试者给予本文所公开的若干种不同的免疫原性组合物，例如，可向受试者给予包含具有抗原或多种抗原(例如抗原A、B、C和D等)的聚合物的组合物，并向受试者给予包含具有不同抗原或不同抗原组(例如抗原W、X、Y和Z等)的聚合物的组合物。或者，可向受试者给予包含具有抗原或多种抗原(例如，抗原A、B、C和D等)的聚合物A的组合物，并向受试者给予包含含有相同抗原组(例如抗原A、B、C和D等)或不同抗原组的聚合物B的组合物。设想本发明提供了以所期望的尽可能多的抗原对受试者进行免疫的方法，例如，使用本文所述的各种不同免疫原性复合物，使得以多达100种或更多的抗原进行免疫。

[0290] 在一个实施方式中，本文所述的免疫原性组合物包含药学上可接受的载体。在另一个实施方式中，将本文所述的免疫原性组合物配制为疫苗或配制在疫苗中，用于给予鸟类、哺乳动物或人类。例如，可在Remingtons Pharmaceutical Sciences(2006)，或Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms(第4版，Lea&Febiger，Philadelphia，1985)中找到合适的制剂。

[0291] 在一个实施方式中，本文所述的免疫原性组合物包含本身无毒且不具有治疗作用的药学上可接受的载体。所述载体的实例包括离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白如人血清白蛋白、缓冲物质如磷 酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐、或电解质如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾(potassium hydrogen phosphate)、氯化钠、锌盐、硅溶胶(colloidal silica)、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、以及聚乙二醇。对于全部给予而言，适于使用常规储库(depot)形式。此类形式包括例如：微胶囊、纳米胶囊、脂质体、膏药、吸入形式、鼻喷雾剂、舌下片和缓释制品。对于缓释组合物的实例而言，参见美国专利号3,773,919、3,887,699、EP 58,481A、EP 158,277A、加拿大专利号1176565；Sidman等，22Biopolymers547(1983)；Langer等，12Chem.Tech.98(1982)。通常以每患者每次给予约0.1mg/ml至100mg/ml的浓度配制蛋白质。

[0292] 在一个实施方式中，可将其它成分添加至疫苗制剂，所述其它成分包括抗氧化剂(例如抗坏血酸)；低分子量(少于约十个残基)多肽(例如聚精氨酸或三肽)；蛋白质(例如血

清白蛋白、明胶或免疫球蛋白)；亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮)；氨基酸(如甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸或精氨酸)；单糖、二糖及其它碳水化合物(包括纤维素或其衍生物、葡萄糖、甘露糖或糊精)；螯合剂(例如EDTA)；以及糖醇(例如甘露糖醇或山梨糖醇)。

[0293] 在一些实施方式中，本发明的MAPS免疫原组合物与至少一种佐剂共同给予。佐剂是加强针对抗原(同时给予的抗原)的免疫应答的非均相物质组(a heterogeneous group of substances)。在一些情况下，佐剂提高免疫应答，从而需要较少的疫苗。佐剂有助于使抗原(刺激特定的保护性免疫应答的物质)与免疫系统相接触，并影响所产生的免疫的类型和免疫应答的质量(强度(magnitude)或持续时间)。佐剂还可降低某些抗原的毒性；并向一些疫苗成分提供溶解性。目前适用的增强针对抗原的免疫应答的几乎所有佐剂都是颗粒、或与抗原共同形成颗粒。在VACCINE DESIGN-SUBUNIT&ADJUVANT APPROACH(Powell&Newman主编，Plenum出版社，1995)一书中，描述了许多已知佐剂的免疫活性以及化学特性。不形成颗粒的佐剂的类型，是作为免疫信号物质发挥作用的物质的组和在正常条件下由免疫系统形成的物质(作为在给予微粒佐剂系统之后免疫激活的结果)构成的组。

[0294] 用于免疫原性组合物和疫苗的佐剂在本领域中是公知的。实例包括但不限于：单甘酯和脂肪酸(例如油酸单甘油酯、油酸和大豆油的混合物)；矿物盐，如氢氧化铝和磷酸铝或磷酸钙凝胶；基于表面活性剂和油乳液的制剂，例如MF59(微流化洗涤剂稳定化的水包油乳液)、QS21(纯化的皂苷(saponin))、AS02[SBAS2](水包油乳液+MPL+QS-21)、MPL-SE、Montanide ISA-51和ISA-720(稳定化的油包水乳液)；微粒佐剂，例如，病毒颗粒(virosome)(纳入流感血凝素的单层脂质体囊泡)、AS04(具有MPL的[SBAS4]铝盐)、ISCOMS(皂苷类和脂质的结构化复合物)、聚丙交酯-共-乙交酯(PLG)；微生物衍生物(天然的和合成的)，例如，单磷酰脂A(MPL)、Detox(MPL+草分枝杆菌(M.Phlei)细胞壁骨架)、AGP[RC-529](合成酰化单糖)、Detox-PC、DC_Chol(能够自我组织为脂质体的脂样(lipoidal)免疫刺激物)、OM-174(脂质A衍生物)、CpG基序(含有免疫刺激性CpG基序的合成寡核苷酸)或其它DNA结构、修饰的LT和CT(提供无毒佐剂作用的基因修饰细菌毒素)；内源性人免疫调节剂，例如hGM-CSF或hIL-12(可作为蛋白质或编码质粒给予的细胞因子)、Immudaptin(C3d串联阵列)、MoGM-CSF、TiterMax-G、CRL-1005、GERBU、TERamide、PSC97B、Adjumer、PG-026、GSK-I、GcMAF、B-alethine、MPC-026、Adjuvax、CpG ODN、Betafectin、明矾和MF59；以及惰性载体(例如金颗粒)。其它佐剂在本领域是已知的，参见例如美国专利号6,890,540；美国专利公开号2005,0244420；PCT/SE97/01003。

[0295] 在一些实施方式中，佐剂为微粒，并可具有能缓慢生物降解的特征。必须注意确保佐剂不形成有毒代谢产物。优选地，在一些实施方式中，所述佐剂可做基质(matrices)使用，且主要为来源于机体的物质。这些物质包括低毒性的生物相容性聚合物、乳酸聚合物、聚氨基酸(蛋白质)、碳水化合物、和脂质。也可使用来自机体的这些物质组的组合或来自机体的物质和生物相容性聚合物的组合。由于脂质呈现出使其可生物降解的结构以及脂质在所有生物膜中均为关键元素这一事实，因此脂质是优选的物质。

[0296] 在一个实施方式中，必须将用于给药的本文所述的免疫原性组合物 无菌地给予受试者。无菌性可通过无菌过滤膜(例如0.2微米膜)过滤或通过伽玛辐射而容易地完成。

[0297] 在一些实施方式中，本文所述的免疫原性组合物进一步包含药物赋形剂，所述赋形剂包括但不限于：生物相容的油、生理盐水溶液、防腐剂、碳水化合物、蛋白质、氨基酸、渗

透压控制剂、载气、pH控制剂、有机溶剂、疏水剂、酶抑制剂、吸水性聚合物、表面活性剂、吸收促进剂和抗氧化剂。碳水化合物的代表性实例包括溶解性糖，如羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、羧基纤维素钠、透明质酸、壳聚糖、海藻酸盐/酯、葡萄糖、木糖、半乳糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、葡聚糖、硫酸软骨素等。蛋白质的代表性实例包括白蛋白、明胶等。氨基酸的代表性实例包括甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸和它们的盐。此类药物赋形剂在本领域中是已知的。

[0298] 在一些实施方式中，免疫原性MAPS组合物与其它治疗成分联合给药，所述其它治疗成分包括例如：γ-干扰素、细胞因子、化疗剂或抗炎剂、或抗病毒剂。在一些实施方式中，本文所公开的免疫原性组合物可以与一种或多种本文所公开的共刺激分子和/或佐剂共同给药。

[0299] 在一些实施方式中，以纯的形式、或基本上纯的形式给予免疫原性组合物，但是也可以作为药物组合物、制剂或制品给予。此类制剂包含本文所述的MAPS和一种或多种药学上可接受的载体，以及任选的其它治疗成分。其它治疗成分包括增强抗原提呈的化合物，例如γ-干扰素、细胞因子、化疗剂或抗炎剂。所述制剂可方便地以单位剂型呈现，并可由制药领域中公知的方法制备。例如，Plotkin和Mortimer在Vaccines(第二版，W.B.Saunders Co.，1994)中描述了向动物或人类接种，以诱导对于特定病原体具有特异性的免疫应答，以及制备抗原、确定抗原合适剂量和分析免疫应答的诱导的方法。

[0300] 适合于静脉内、肌内、鼻内、口腔、舌下、阴道、直肠、皮下或腹腔内给药的制剂便利地包含活性成分的无菌水溶液，优选使用与接受者血液等渗的溶液。此类制剂可便利地通过下列方法制备：将固体活性成分溶解在含有生理相容物质(如氯化钠(例如0.1M-2.0M)、甘氨酸等)、并具有与生理条件相容的缓冲pH值的水中，产生水溶液，并对所述溶液 进行除菌。这些制剂可存在于单位剂量或多剂量的容器(例如密封的安瓿或小瓶)中。

[0301] 还可将脂质体悬浮液用作药学上可接受的载体。可根据本领域技术人员已知的方法(例如美国专利号4,522,811中所述的方法)制备所述脂质体悬浮液。

[0302] 在美国专利号5,427,782;5,843,451;6,398,774中描述了用于鼻内递送的制剂。

[0303] 免疫原性组合物的制剂中可引入稳定剂。说明性的稳定剂为聚乙二醇、蛋白质、糖类、氨基酸、无机酸和有机酸，所述稳定剂可单独使用或以混合物使用。可将两种以上稳定剂以适当浓度和/或pH值用于水溶液中。该水溶液中特定的渗透压一般在0.1-3.0渗透单位(osmoses)的范围内，优选在0.80-1.2渗透单位的范围内。将水溶液的pH值调解至pH5.0-9.0的范围内，优选为pH6-8的范围内。

[0304] 当期望口服制品时，可将免疫原性组合物与常规载体相结合，如乳糖、蔗糖、淀粉、滑石粉、硬脂酸镁、结晶纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素、甘油、海藻酸钠或阿拉伯胶等。

[0305] 在一些实施方式中，可以静脉内、鼻内、肌内、皮下、腹腔内、舌下、阴道、直肠或口服给予本文所述的免疫原性组合物。在一些实施方式中，给药途径为口腔、鼻内、皮下或肌内给药。在一些实施方式中，给药途径为鼻内给药。

[0306] 可通过常规方法进行接种。例如，可以在合适的稀释剂(如盐水或水，或完全的或不完全的佐剂)中使用免疫原性组合物。可以通过任何适于引发免疫应答的途径给予免疫原性组合物。可一次给予免疫原性组合物，或以定期间隔给予直至引发免疫应答。可通过本领域技术人员已知的各种方法对免疫应答进行检测，包括但不限于：抗体产生、细胞毒性分

析、增殖分析和细胞因子释放分析。例如，可以由免疫的哺乳动物抽取血样，并通过ELISA对针对免疫原性组合物的抗原的抗体的存在进行分析(参见de Boer等，115Arch Virol.147(1990))，并通过本领域已知的方法对这些抗体的效价进行测定。

[0307] 制剂中所使用的精确剂量还依赖于给药途径，并应根据执业医生的判断和每一患者的情况而决定。例如，可每月给予25μg-900μg总蛋白，给药三个月。

[0308] 最终，主诊医师将决定向特定个体给予免疫原性组合物或疫苗组合物的量。对于所有免疫原性组合物或疫苗而言，免疫原的免疫有效量必须根据经验确定。需要考虑的因素包括：免疫原性、免疫原是否与佐剂或载体蛋白或其它载体相复合或共价连接至佐剂或载体蛋白或其它载体、给药途径和待给予的免疫剂量的量。此类因素在疫苗领域中是已知的，并且免疫学家有充足能力作出此类决定而无需过度实验。

[0309] 在一个实施方式中，当将本文所述的免疫原性组合物或疫苗组合物给予小鼠时，可在由5LD_{50}免疫原性组合物激发(challenged)的动物的至少20％中引起防止疾病症状的免疫应答，所述免疫原性组合物包含所防止的疾病症状所针对的抗原。接种和激发免疫动物的方法在本领域中是已知的。例如，可在100μl的PBS和/或添加的不完全弗氏佐剂中制备10μg等份的本文所公开的免疫原性组合物或疫苗组合物，并且对于每一小鼠的每一接种通过肌内注射进行。或者，可以使用胃肠外、腹腔内和足垫(footpad)注射。足垫注射的量减少至50μl。小鼠可由本文所公开的免疫原性组合物或疫苗组合物进行免疫，间隔若干天(例如间隔14天)分别进行三次。

[0310] 可通过病原体激发对接种效力进行测试。在最后一次免疫原性组合物给药七天后，用衍生抗原的病原性生物体通过鼻内对免疫的小鼠进行激发。可用50μl含有5LD_{50}病原性生物体的PBS稀释尿囊液通过鼻内给药感染乙醚麻醉的小鼠(10g至12g)。可通过监测动物存活和体重对保护作用进行测量，在21天的观察期中对所述保护作用进行评估。将严重受影响的小鼠执行安乐死。一个LD_{50}A/Mallard/Pennsylvania/10218/84等价于100-1000组织培养感染剂量50(TCID50)试验。

[0311] 在其它实施方式中，可使用各种不同的病原性生物体对免疫的小鼠进行激发，所述病原性生物体例如为衍生出连接至聚合物的各抗原的不同的病原性生物体。例如，对于含有连接至聚合物(例如，多糖)的5种不同抗原的免疫原性组合物，其中每一抗原衍生自5种不同的病原性 生物体，可使用5种不同病原性生物体的每一种顺序地(以任何顺序)或同时地对免疫小鼠进行激发。本领域技术人员能够通过本领域已知的方法确定用于激发免疫小鼠的各病原性生物体的LD_{50}。参见例如LaBarre&Lowy，96J.Virol.Meths.107(2001)：Golub，59J.Immunol.7(1948)。

[0312] 试剂盒

[0313] 本发明还提供用于产生本文所公开的免疫原性组合物的试剂盒，所述试剂盒对于研究员定制具有其优选的抗原的免疫原性组合物(例如为了研究目的而对抗原或抗原组合对免疫应答的影响进行评估)是有用的。此类试剂盒可以由容易获得的材料和试剂制备。例如，此类试剂盒可包含下列材料中的任何一种或多种：包含聚合物(例如多糖)的容器，所述聚合物与多个第一亲和分子交联；包含与所述第一亲和分子缔合的互补亲和分子的容器，其中，所述互补亲和分子与抗原缔合。

[0314] 在另一个实施方式中，所述试剂盒可包含：包含聚合物(例如多糖)的容器、包含多

个第一亲和分子的容器、以及包含用于将所述第一亲和分子交联至所述聚合物的交联剂的容器。

[0315] 在一些实施方式中，所述试剂盒进一步包含将所述互补亲和分子连接至所述抗原的手段，其中所述手段可为通过交联剂或通过一些中间融合蛋白。在一些实施方式中，所述试剂盒可包含至少一种共刺激因子，可将所述共刺激因子添加至所述聚合物。在一些实施方式中，所述试剂盒包含用于将所述共刺激因子连接至所述聚合物的交联剂，所述交联剂例如但不限于：CDAP(1-氰基-4-二甲基氨基吡啶四氟硼酸盐)、EDC(1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐)、氰基硼氢化钠；溴化氰；碳酸氢铵/碘乙酸。

[0316] 根据试剂盒的预期用途、特定的靶抗原以及使用者的需要，可以制备各种试剂盒和组分以用于本文所述的方法中。

[0317] 可通过下述编号段落中的任何实施方式对本发明进行进一步描述。

[0318] 1.包含氨基酸序列

[0319]

FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(SEQ ID NO:1)

[0320] 及其任意功能衍生物的可溶性生物素结合蛋白。

[0321] 2.如段1所述的生物素结合蛋白，其中，所述生物素结合蛋白在大肠杆菌中以至少10mg/L培养基的水平以可溶形式生产。

[0322] 3.如段1或2所述的生物素结合蛋白，其中，所述生物素结合蛋白为二聚体。

[0323] 4.如段1-3中任一项所述的生物素结合蛋白，其中，所述生物素结合蛋白在N端包含细菌信号序列。

[0324] 5.如段4所述的生物素结合蛋白，其中，所述细菌信号序列为MKKIWLALAGLVLAFSASA(SEQ ID No:2)。

[0325] 6.如段4或5所述的生物素结合蛋白，其中，通过肽接头将所述信号序列连接至所述生物素蛋白。

[0326] 7.如段6所述的生物素结合蛋白，其中，所述肽接头包含氨基酸序列AQDP(SEQ ID NO:8)或VSDP(SEQ ID NO:9)。

[0327] 8.如段1-7中任一项所述的生物素结合蛋白，其中，所述生物素结合蛋白在C端包含纯化标签。

[0328] 9.如段8所述的生物素结合蛋白，其中，所述纯化标签选自于由下列纯化标签所组成的组：组氨酸标签、c-my标签、Halo标签、Flag标签，以及以上标签的任意组合。

[0329] 10.如段9所述的生物素结合蛋白，其中，所述组氨酸标签包含氨基酸序列HHHHHH(SEQ ID NO:10)。

[0330] 11.如段8-10中任一项所述的生物素结合蛋白，其中，通过肽接头将所述纯化标签连接至所述生物素结合蛋白。

[0331] 12.如段11所述的生物素结合蛋白，其中，所述肽接头包含氨基酸序列VDKLAAALE(SEQ ID NO:11)或GGGGSSSVDKLAAALE(SEQ ID NO:12)。

[0332] 13.如段1-12中任一项所述的生物素结合蛋白，其中，所述生物素 结合蛋白包含氨基酸序列

[0333]

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSP YPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKS LLKDGGGGSSSVDKLAAALEHHHHHH(SEQ ID NO:15).

[0334] 14.包含如段1-13中任一项所述的生物素结合蛋白的组合物。

[0335] 15.包含生物素结合蛋白以及蛋白质或肽的融合蛋白。

[0336] 16.如段15所述的融合蛋白,其中,通过肽接头将所述蛋白质或肽融合至所述生物素结合蛋白。

[0337] 17.如段15所述的融合蛋白,其中,所述肽接头包含氨基酸序列GGGGSSS(SEQ ID NO:22)。

[0338] 18.如段15-17中任一项所述的融合蛋白,其中,所述蛋白质或肽为选自于由下列抗原所组成的组中的抗原:肺炎球菌抗原、结核抗原、炭疽抗原、HIV抗原、季节性流感抗原或流行性流感抗原、流感抗原、百日咳抗原、金黄色葡萄球菌抗原、脑膜炎球菌抗原、嗜血杆菌抗原、HPV抗原,或以上抗原的组合。

[0339] 19.如段15-18中任一项所述的融合蛋白,其中,所述抗原为金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体。

[0340] 20.如段19所述的融合蛋白,其中,所述金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体包含位于野生型金黄色葡萄球菌α-溶血素第205位、213位或209-211位氨基酸残基处的突变。

[0341] 21.如段19所述的融合蛋白,其中,所述金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体包含野生型金黄色葡萄球菌α-溶血素中的下列突变中的一种:(i)第205位残基由W变为A;(ii)第213位残基由W变为A;或者(iii)第209-211位残基由DRD变为AAA。

[0342] 22.如段19所述的融合蛋白,其中,所述金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体包含选自于由下列氨基酸序列所组成的组中的氨基酸序列:

[0343] (i)W205A

[0344]

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSG LAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(SEQ ID NO:23);

[0345] (ii)W213A

[0346]

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSG LAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(SEQ ID NO:24);

[0347] (iii)DRD209-211AAA

[0348]

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSG

LAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(SEQ ID NO:25)；

[0349] 以及上述氨基酸序列的功能变体、部分和衍生物。

[0350] 23.如段15-22中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白在N端包含细菌信号序列。

[0351] 24.如段23所述的融合蛋白，其中，所述细菌信号序列为MKKIWLALAGLVLAFSASA(SEQ ID No:2)。

[0352] 25.如段23或24所述的融合蛋白，其中，通过肽接头将所述信号序列连接至所述生物素蛋白。

[0353] 26.如段25所述的融合蛋白，其中，所述肽接头包含氨基酸序列AQDP(SEQ ID NO:8)或VSDP(SEQ ID NO:9)。

[0354] 27.如段15-26中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白在C端包含纯化标签。

[0355] 28.如段27所述的融合蛋白，其中，所述纯化标签选自于由下列纯化标签所组成的组：组氨酸标签、c-my标签、Halo标签、Flag标签，以及以上标签的任意组合。

[0356] 29.如段27所述的融合蛋白，其中，所述组氨酸标签包含氨基酸序列HHHHHH(SEQ ID NO:10)。

[0357] 30.如段27-29中任一项所述的融合蛋白，其中，通过肽接头将所述纯化标签连接至所述生物素结合蛋白。

[0358] 31.如段30所述的融合蛋白，其中，所述肽接头包含氨基酸序列VDKLAAALE(SEQ ID NO:11)。

[0359] 32.如段15-31中任一项所述的融合蛋白，其中，所述生物素结合蛋白为如段1-13中任一项所述的生物素结合蛋白。

[0360] 33.如段15-32中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白包含选自于由下列氨基酸序列所组成的组中的氨基酸序列：

[0361] (i)W205A

[0362]

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSP YPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKS LLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYR VYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIG HTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDSWNPVYGN QLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNT KDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHHHHHH(SEQ ID NO:26)；

[0363] (ii)W213A

[0364]

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSP YPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKS

LLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYR
VYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIG
HTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLL
SSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKL
AAALEHHHHHH(SEQ ID NO:27)；

[0365] (iii)DRD209-211AA

[0366]

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSP
YPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKS
LLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYR
VYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIG
HTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLL
SSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKL
AAALEHHHHHH(SEQ ID NO:28)

[0367] 34.包含如段15-33中任一项所述的融合蛋白的组合物。

[0368] 35.一种突变型α-溶血素(mHla)蛋白，所述蛋白包含位于野生型金黄色葡萄球菌α-溶血素第205位、213位或209-211位氨基酸残基处的突变，其中，与等同效价的野生型α-溶血素(Hla)相比，所述突变型α-溶血素具有较低的溶血活性。

[0369] 36.如段35所述的突变型α-溶血素，其中，所述突变型α-溶血素的溶血活性比等同效价的野生型Hla低至少25％。

[0370] 37.如段35或36所述的突变型α-溶血素，其中，所述突变型α-溶血素包含野生型金黄色葡萄球菌α-溶血素中的下列突变中的一种：(i) 第205位残基由W变为A；(ii)第213位残基由W变为A；或者(iii)第209-211位残基由DRD变为AAA。

[0371] 38.如段13-15中任一项所述的突变型α-溶血素，其中，所述突变型α-溶血素包含选自于由下列氨基酸序列所组成的组中的氨基酸序列：

[0372] (i)W205A

[0373]

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTLAGQYRVYSEEGANKSG
LAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK
TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV
ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(SEQ ID NO:23)；

[0374] (ii)W213A

[0375]

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSG
LAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK
TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV
ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(SEQ ID NO:24)；

[0376] (iii)DRD209-211AAA

[0377]

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSG LAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(SEQ ID NO:25)；

[0378] 以及上述氨基酸序列的功能变体、部分和衍生物。

[0379] 39.包含如段35-38中任一项所述的突变型α-溶血素的组合物。

[0380] 40.一种包含α-溶血素和生物素结合域的融合蛋白，其中，与等同效价的野生型α-溶血素(Hla)相比，所述融合蛋白具有较低的溶血活性。

[0381] 41.如段18所述的融合蛋白，其中，所述α-溶血素为如权利要求35-38中任一项所述的突变型溶血素；或者所述α-溶血素由金黄色葡萄球菌野生型α-溶血素第27-319位氨基酸的氨基酸序列组成。

[0382] 42.如段19所述的融合蛋白，其中，所述生物素结合域由氨基酸序 列SEQ ID NO:1组成。

[0383] 43.如段40-42中任一项所述的融合蛋白，其中，通过肽接头连接所述生物素结合域与所述突变型α-溶血素。

[0384] 44.如段43所述的融合蛋白，其中，所述肽接头包含氨基酸序列GGGGSSS(SEQ ID NO:22)。

[0385] 45.如段40-44中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白在N端包含细菌信号序列。

[0386] 46.如段45所述的融合蛋白，其中，所述细菌信号序列为MKKIWLALAGLVLAFSASA(SEQ ID No:2)。

[0387] 47.如段45或46所述的融合蛋白，其中，通过肽接头将所述信号序列连接至所述生物素蛋白。

[0388] 48.如段47所述的融合蛋白，其中，所述肽接头包含氨基酸序列AQDP(SEQ ID NO:8)或VSDP(SEQ ID NO:9)。

[0389] 49.如段40-48中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白在C端包含纯化标签。

[0390] 50.如段49所述的融合蛋白，其中，所述纯化标签选自于由下列纯化标签所组成的组：组氨酸标签、c-my标签、Halo标签、Flag标签，以及以上标签的任意组合。

[0391] 51.如段50所述的融合蛋白，其中，所述组氨酸标签包含氨基酸序列HHHHHH(SEQ ID NO:10)。

[0392] 52.如段49-51中任一项所述的融合蛋白，其中，通过肽接头将所述纯化标签连接至所述生物素结合蛋白。

[0393] 53.如段52所述的融合蛋白，其中，所述肽接头包含氨基酸序列VDKLAAALE(SEQ ID NO:11)。

[0394] 54.如段40-53中任一项所述的融合蛋白，其中，所述生物素结合域为如段1-13中任一项所述的生物素结合蛋白。

[0395] 55.如段40-54中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白包含 选自于由下列

氨基酸序列所组成的组中的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28。

[0396] 56.如段40-55中任一项所述的融合蛋白,其中,所述融合蛋白的溶血活性比等同效价的野生型Hla低至少25%。

[0397] 57.包含如段40-56中任一项所述的融合蛋白的组合物。

[0398] 58.一种在受试者中诱发免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予如段14、34、39或57所述的组合物。

[0399] 59.一种针对至少一种携带抗原的病原体对哺乳动物进行接种的方法,所述方法包括给予如段14、34、39或57所述的组合物。

[0400] 60.如段58或59所述的方法,其中,所述受试者为人。

[0401] 61.如段58或59所述的方法,其中,所述受试者为农业动物或非驯养动物。

[0402] 62.如段58或59所述的方法,其中,所述受试者为驯养动物。

[0403] 63.如段58或59所述的方法,其中,通过皮下注射、鼻内注射、皮内注射或肌内注射给药。

[0404] 64.如段58所述的方法,其中,所述免疫应答为抗体应答/B细胞应答。

[0405] 65.如段58所述的方法,其中,所述免疫应答为$CD4^+$T细胞应答,所述$CD4^+$T细胞应答包括Th1应答、Th2应答或Th17应答。

[0406] 66.如段58所述的方法,其中,所述免疫应答为$CD8^+$T细胞应答。

[0407] 67.如段14、34、39或57中任一项所述的组合物在对暴露于病原体或免疫威胁进行诊断中的用途。

[0408] 68.包含氨基酸序列

[0409]

FDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(SEQ ID NO:1)

[0410] 及其任何功能衍生物的脂化生物素结合蛋白。

[0411] 69.如段68所述的脂化生物素结合蛋白,其中,所述生物素结合蛋 白在大肠杆菌中以至少10mg/L培养基的水平以可溶形式生产。

[0412] 70.如段68或69所述的脂化生物素结合蛋白,其中,所述生物素结合蛋白为二聚体。

[0413] 71.如段68-70中任一项所述的脂化生物素结合蛋白,其中,所述生物素结合蛋白在N端包含脂化序列。

[0414] 72.如段71所述的脂化生物素结合蛋白,其中,所述脂化序列为MKKVAAFVALSLLMAGC(SEQ ID No:3)。

[0415] 73.如段71或72所述的脂化生物素结合蛋白,其中,通过肽接头将所述脂化序列连接至所述生物素蛋白。

[0416] 74.如段73所述的脂化生物素结合蛋白,其中,所述肽接头包含氨基酸序列AQDP(SEQ ID NO:8)或VSDP(SEQ ID NO:9)。

[0417] 75.如段68-74中任一项所述的脂化生物素结合蛋白,其中,所述生物素结合蛋白在C端包含纯化标签。

[0418] 76.如段75所述的脂化生物素结合蛋白,其中,所述纯化标签选自于由下列纯化标

签所组成的组:组氨酸标签、c-my标签、Halo标签、Flag标签,以及以上标签的任意组合。

[0419] 77.如段76所述的脂化生物素结合蛋白,其中,所述组氨酸标签包含氨基酸序列HHHHHH(SEQ ID NO:10)。

[0420] 78.如段75-77中任一项所述的脂化生物素结合蛋白,其中,通过肽接头将所述纯化标签连接至所述生物素结合蛋白。

[0421] 79.如段78所述的脂化生物素结合蛋白,其中,所述肽接头包含氨基酸序列VDKLAAALE(SEQ ID NO:11)或GGGGSSSVDKLAAALE(SEQ ID NO:12)。

[0422] 80.如段68-79中任一项所述的脂化生物素结合蛋白,其中,所述生物素结合蛋白包含氨基酸序列

[0423]

MKKVAAFVALSLLMAGCVSDPFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYPLTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKD(SEQ ID NO:20).

[0424] 81.包含如段68-80中任一项所述的脂化生物素结合蛋白的组合物。

[0425] 82.包含脂化生物素结合蛋白以及蛋白质或肽的融合蛋白。

[0426] 83.如段82所述的融合蛋白,其中,通过肽接头将所述蛋白质或肽融合至所述脂化生物素结合蛋白。

[0427] 84.如段83所述的融合蛋白,其中,所述肽接头包含氨基酸序列GGGGSSS(SEQ ID NO:22)。

[0428] 85.如段82-84中任一项所述的融合蛋白,其中,所述蛋白质或肽为选自于由下列抗原所组成的组中的抗原:肺炎球菌抗原、结核抗原、炭疽抗原、HIV抗原、季节性流感抗原或流行性流感抗原、流感抗原、百日咳抗原、金黄色葡萄球菌抗原、脑膜炎球菌抗原、嗜血杆菌抗原、HPV抗原,或以上抗原的组合。

[0429] 86.如段85所述的融合蛋白,其中,所述抗原为金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体。

[0430] 87.如段86所述的融合蛋白,其中,所述金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体包含位于野生型金黄色葡萄球菌α-溶血素第205位、213位或209-211位氨基酸残基处的突变。

[0431] 88.如段86所述的融合蛋白,其中,所述金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体包含野生型金黄色葡萄球菌α-溶血素中的下列突变中的一种:(i)第205位残基由W变为A;(ii)第213位残基由W变为A;或者(iii)第209-211位残基由DRD变为AAA。

[0432] 89.如段86所述的融合蛋白,其中,所述金黄色葡萄球菌α-溶血素的非溶血性变体包含选自于由下列氨基酸序列所组成的组中的氨基酸序列:

[0433] (iv)W205A

[0434]

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(SEQ ID NO:23);

[0435] (v)W213A

[0436]

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSG
LAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK
TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV
ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(SEQ ID NO:24)；

[0437] (vi)DRD209-211AAA

[0438]

ADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVYSEEGANKSG
LAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFK
TILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATV
ITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTN(SEQ ID NO:25)；

[0439] 以及上述氨基酸序列的功能变体、部分和衍生物。

[0440] 90.如段82-89中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白在N端包含脂化序列。

[0441] 91.如段90所述的融合蛋白，其中，所述脂化序列为MKKVAAFVALSLLMAGC(SEQ ID No:3)。

[0442] 92.如段90或91所述的融合蛋白，其中，通过肽接头将所述脂化序列连接至所述生物素蛋白。

[0443] 93.如段92所述的融合蛋白，其中，所述肽接头包含氨基酸序列AQDP(SEQ ID NO:8)或VSDP(SEQ ID NO:9)。

[0444] 94.如段82-93中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白在C端包含纯化标签。

[0445] 95.如段94所述的融合蛋白，其中，所述纯化标签选自于由下列纯 化标签所组成的组：组氨酸标签、c-my标签、Halo标签、Flag标签，以及以上标签的任意组合。

[0446] 96.如段95所述的融合蛋白，其中，所述组氨酸标签包含氨基酸序列HHHHHH(SEQ ID NO:10)。

[0447] 97.如段93-96中任一项所述的融合蛋白，其中，通过肽接头将所述纯化标签连接至所述生物素结合蛋白。

[0448] 98.如段97所述的融合蛋白，其中，所述肽接头包含氨基酸序列VDKLAAALE(SEQ ID NO:11)。

[0449] 99.如段82-98中任一项所述的融合蛋白，其中，所述脂化生物素结合蛋白为如段68-80中任一项所述的生物素结合蛋白。

[0450] 100.如段82-99中任一项所述的融合蛋白，其中，所述融合蛋白包含选自于由下列氨基酸序列所组成的组中的氨基酸序列：

[0451] (i)SEQ ID NO:53

[0452]

MKKVAAFVALSLLMAGCVSPDFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYP
LTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLL

KDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVVY
SEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHT
LKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNAGPYDRDSWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSS
GFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAA
ALEHHHHHH;

[0453] (ii)SEQ ID NO:54

[0454]

MKKVAAFVALSLLMAGCVSPDFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYP
L T G R V N G T F I A F S V G W N N S T E N C N S A T G W T G
YAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLLKDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKT
GDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVVYSEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQIS
DYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHTLKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVN
QNWGPYDRDSANPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSSGFSPDFATVTTMDRKASKQQTNIDVIYERVR
DDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAAALEHHHHHH;以及

[0455] (iii)SEQ ID NO:55

[0456]

MKKVAAFVALSLLMAGCVSPDFDASNFKDFSSIASASSSWQNQSGSTMIIQVDSFGNVSGQYVNRAQGTGCQNSPYP
LTGRVNGTFIAFSVGWNNSTENCNSATGWTGYAQVNGNNTEIVTSWNLAYEGGSGPAIEQGQDTFQYVPTTENKSLL
KDGGGGSSSADSDINIKTGTTDIGSNTTVKTGDLVTYDKENGMHKKVFYSFIDDKNHNKKLLVIRTKGTIAGQYRVVY
SEEGANKSGLAWPSAFKVQLQLPDNEVAQISDYYPRNSIDTKEYMSTLTYGFNGNVTGDDTGKIGGLIGANVSIGHT
LKYVQPDFKTILESPTDKKVGWKVIFNNMVNQNWGPYAAASWNPVYGNQLFMKTRNGSMKAADNFLDPNKASSLLSS
GFSPDFATVITMDRKASKQQTNIDVIYERVRDDYQLHWTSTNWKGTNTKDKWIDRSSERYKIDWEKEEMTNVDKLAA
ALEHHHHHH(SEQ ID NO:55).

[0457] 101.包含如段82-100中任一项所述的脂化生物素结合蛋白的组合物。

[0458] 102.一种在受试者中诱发免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予如段81或101所述的组合物。

[0459] 103.一种针对至少一种携带抗原的病原体对哺乳动物进行接种的方法,所述方法包括给予如段81或101所述的组合物。

[0460] 104.如段102或103所述的方法,其中,所述受试者为人。

[0461] 105.如段102或103所述的方法,其中,所述受试者为农业动物或非驯养动物。

[0462] 106.如段102或103所述的方法,其中,所述受试者为驯养动物。

[0463] 107.如段102或103所述的方法,其中,通过皮下注射、鼻内注射、皮内注射或肌内注射给药。

[0464] 108.如段102所述的方法,其中,所述免疫应答为抗体应答/B细胞应答。

[0465] 109.如段102所述的方法,其中,所述免疫应答为$CD4^+$T细胞应答,所述$CD4^+$T细胞应答包括Th1应答、Th2应答或Th17应答。

[0466] 110.如段102所述的方法,其中,所述免疫应答为$CD8^+$T细胞应答。

[0467] 111.如段81或101所述的组合物在对暴露于病原体或免疫威胁进行诊断中的用途。

[0468] 一些选定的定义

[0469] 为了方便起见，这里收集了在整个申请(包括说明书、实施例以及所附的权利要求书)中所使用到的某些术语。除非另有定义，本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。

[0470] 除非上下文中清楚地另有说明，本文和权利要求中所使用的单数形式包括复数的情况，反之亦然。除非通过例如“任一(either)”进行修饰，术语“或(or)”具有包含的意味。除了在操作实施例中或另有说明的情况下，本文所使用的表示成分的量或反应条件的所有数字均应被理解为在所有情况下由术语“约(about)”修饰。

[0471] 本文所使用的术语“免疫原性组合物”被定义为当给予受试者时，能够引发免疫应答(例如抗体免疫应答或细胞免疫应答)的组合物。本发明的免疫原性组合物可具有免疫保护性或治疗性，或可不具有免疫保护性或治疗性。当本发明的免疫原性组合物预防、转佳(ameliorate)、缓和(palliate)或消除(eliminate)受试者的疾病时，所述免疫原性组合物即可任选地被称为疫苗。然而，本文使用的术语免疫原性组合物并不意味着局限于疫苗。

[0472] 本文使用的术语“抗原”是指促进针对该物质的免疫应答的任何物质。在一些实施方式中，抗原为肽或多肽；在其它实施方式中，它可为引发针对该物质的免疫应答的任何化学品或部分，例如，碳水化合物。

[0473] 本文使用的术语“缔合(associates)”是指两个以上分子通过非共价键或共价键的连接。在一些实施方式中，当两个以上分子的连接通过共价键发生时，所述两个以上分子可融合在一起、或交联在一起。在一些 实施方式中，当两个以上分子的连接通过非共价键发生时，所述两个以上分子可形成复合物。

[0474] 本文使用的术语“复合物”是指两个以上分子的集合(collection)，所述分子通过除共价相互作用以外的手段进行空间连接；例如它们可通过静电相互作用、氢键或通过疏水相互作用(即，范德华力)连接。

[0475] 本文使用的术语“融合”意思是至少一个蛋白或肽与第二个蛋白或肽物理缔合。在一些实施方式中，融合通常为共价连接，但是，其它类型的连接也包含于术语“融合”之内，所述其它类型的连接包括例如经由静电相互作用、或疏水相互作用等的连接。共价连接可包括如融合蛋白的连接、或化学偶联的连接(例如，通过在两个半胱氨酸残基之间形成的二硫键)。

[0476] 本文使用的术语“融合多肽”或“融合蛋白”是指通过将两个以上多肽序列接合(joining)在一起而制造的蛋白。本发明所涵盖的融合多肽包括嵌合基因构建体的翻译产物，所述嵌合基因构建体将编码一种或多种抗原或其部分或突变体的DNA序列与编码第二多肽的DNA序列接合以形成单个开放读码框。换句话说，“融合多肽”或“融合蛋白”为通过肽键接合的两个以上蛋白的重组蛋白。在一些实施方式中，抗原融合的第二蛋白为能够与互补亲和对的第一亲和分子相互作用的互补亲和分子。

[0477] 术语“多肽”和“蛋白”可交换使用，是指通过肽键连接的氨基酸残基的聚合物，出于所请求保护的本发明的目的，通常具有至少25个氨基酸的最小长度。术语“多肽”和“蛋白”可包括多体蛋白(multimeric protein)，例如，包含一个以上结构域或亚基的蛋白。本文使用的术语“肽”是指肽键连接的氨基酸的序列，含有小于25个氨基酸，例如，长度为约4个氨基酸至25个氨基酸。蛋白和肽可由通过肽键连接的线性排列的氨基酸组成，无论是生

物生产的、重组生产的、或是合成生产的，以及无论是由天然存在的氨基酸组成的还是由非天然存在的氨基酸组成的，均包含在这一定义内。大于25个氨基酸的全长蛋白及其片段均涵盖在蛋白这一定义中。该术语还包括具有多肽的共翻译修饰(例如，信号肽切割)和翻译后修饰的多肽，例如，二硫键形成、糖基化、乙酰化、磷酸化、脂化、蛋白水解切割(例如，金属蛋白酶的切割)等。此外，本文使用的“多肽”是指包含对天然序列的修饰(例如删除、添加和替换(如本领域技术人员所知在自然界通常是保守的))的蛋白，只要该蛋白保持所需的活性。这些修饰可以是仔细考虑过的，例如通过定点突变，或者可为偶然的，例如通过产生所述蛋白的宿主的突变，或由于PCR扩增或其它重组DNA方法所产生的错误。

[0478] “信号序列”是指这样的核酸序列：当将其可操作地连接至核酸分子时，促进由所述核酸分子编码的产物(例如，蛋白或肽)的分泌。在一些实施方式中，所述信号序列优选位于所述核酸分子的5’端。

[0479] 本文使用的术语“N-糖基化的(glycosylated)”或“N-糖基化(glycosylation)”是指糖部分与多肽中的天冬酰胺残基的共价连接。糖部分可包括但不限于葡萄糖、甘露糖和N-乙酰葡糖胺。聚糖的修饰还包括，例如，唾液酸化。

[0480] “抗原提呈细胞”或“APC”是表达主要组织相容性复合物(MHC)分子，并可将与MHC复合的外源抗原呈现在其表面的细胞。抗原提呈细胞的实例为树突状细胞、巨噬细胞、B细胞、成纤维细胞(皮肤)、胸腺上皮细胞、甲状腺上皮细胞、胶质细胞(脑)、胰腺β细胞和血管内皮细胞。

[0481] 在“抗原功能部分”的背景下使用的术语“功能部分”或“功能片段”是指抗原或抗原多肽的一部分，所述部分介导与全抗原部分相同的作用(例如，在受试者中引发免疫应答)或介导与其它分子的缔合(例如，包含至少一个表位)。

[0482] 本文所使用的术语靶抗原的“部分”为至少3个氨基酸的长度，并且可以为例如，至少6个、至少8个、至少10个、至少14个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个或至少25个氨基酸或更多个氨基酸，包括端值。

[0483] 术语“细胞毒性T淋巴细胞”或“CTL”是指在靶细胞中诱导凋亡的淋巴细胞。CTL与靶细胞通过TCR与靶细胞表面的经处理的抗原(Ag)的相互作用而形成抗原特异性缀合物，从而导致所靶向的细胞凋亡。凋 亡小体被巨噬细胞清除。术语“CTL应答”用于指CTL细胞介导的初次免疫应答。

[0484] 本文使用的术语“细胞介导的免疫”或“CMI”是指如下免疫应答：所述免疫应答不涉及抗体或补体，而是涉及例如巨噬细胞、自然杀伤细胞(NK)、抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(T细胞)的活化，以及在针对靶抗原的应答中各种细胞因子的释放。换种说法，CMI涉及免疫细胞(如T细胞和其它淋巴细胞)，所述免疫细胞结合至呈现靶抗原的其它细胞(如抗原提呈细胞(APC))的表面并触发应答。所述应答可能涉及其它淋巴细胞和/或任何其它白血细胞(白细胞)以及细胞因子的释放。细胞免疫通过以下机制保护机体：(1)活化抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)，所述CTL能够破坏将外源抗原的表位呈现在其表面的机体细胞，例如，病毒感染的细胞和携带胞内细菌的细胞；(2)活化巨噬细胞和NK细胞，使它们能够破坏胞内病原体；以及(3)刺激细胞分泌各种细胞因子，所述细胞因子影响涉及适应性免疫应答和固有免疫应答的其它细胞的功能。

[0485] 本文使用的术语“免疫细胞”是指在针对直接或间接抗原刺激的应答中能够释放

细胞因子的任何细胞。本文中的“免疫细胞”涵盖淋巴细胞，包括天然杀伤(NK)细胞、T细胞(CD4+和/或CD8+细胞)、B细胞、巨噬细胞和单核细胞，Th细胞；Th1细胞；Th2细胞；白细胞；树突状细胞；巨噬细胞；肥大细胞；和单核细胞；以及能够在针对直接或间接抗原刺激的应答中生产细胞因子分子的任何其它细胞。通常，免疫细胞为淋巴细胞，例如，T细胞淋巴细胞。

[0486] 本文使用的术语“细胞因子”是指在用抗原刺激的应答中由免疫细胞所释放的分子。此类细胞因子的实例包括但不限于：GM-CSF、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-17A、IL-17F或IL-17家族的其它成员、IL-22、IL-23、IFN-α、IFN-β、IFN-γ、MIP-1α、MIP-1β、TGF-β、TNFα或TNFβ。术语“细胞因子”不包括抗体。

[0487] 本文使用的术语“受试者”是指对引发免疫应答有用的任何动物。所述受试者可以是野生动物、驯养动物、商业动物或伴侣动物，例如，鸟类或哺乳动物。所述受试者可为人。尽管在本发明的一个实施方式中，设想本文所公开的免疫原性组合物可适于对人进行治疗性处理或预防性处理，但其也适用于温血脊椎动物，例如，哺乳动物，如非人灵长类动物(特别是高等灵长类动物)、绵羊(sheep)、狗、啮齿类动物(例如，小鼠或大鼠)、豚鼠、山羊、猪、猫、兔、牛(cow)；以及非哺乳动物，如鸡、鸭或火鸡。在另一实施方式中，所述受试者为野生动物，例如，用于对例如禽流感进行诊断的鸟。在一些实施方式中，所述受试者为作为疾病模型的实验动物或动物替代品。所述受试者可为需要兽医处理的受试者，在其中，引发针对抗原的免疫应答对预防疾病和/或控制疾病的传播有用，例如，SIV、STL1、SFV，或就畜禽(live-stock)而言为口蹄疫，或就鸟类而言为马立克氏病(Mareks disease)或禽流感，以及其它此类疾病。

[0488] 本文使用的术语“病原体”是指在受试者中引发疾病或紊乱的生物体或分子。例如，病原体包括但不限于病毒、真菌、细菌、寄生虫以及其它感染性生物体或从中而来的分子，以及在藻类、真菌、酵母、原生动物等分类中的分类学相关宏观生物体(taxonomically related macroscopic organisms)。

[0489] “癌细胞”是指在体内、离体，或者在组织培养中的癌细胞、癌前细胞(pre-cancerous cell)或转化细胞，其具有自发的或诱发的表型变化，所述表型变化无需涉及对新遗传物质的吸收。尽管转化可由转化病毒的感染和新基因组核酸的并入而引起、或由对外源核酸的吸收而引起，它也可自发引起或在暴露于致癌物质(carcinogen)后使得内源性基因发生突变而引起。转化/癌症与如下状况有关：例如，在适合的动物宿主(如裸鼠)中的形态学变化、细胞永生化、异常生长控制、病灶形成、锚着非依赖性(anchorage independence)、恶性肿瘤(malignancy)、接触抑制和生长密度限制的缺失、生长因子或血清非依赖性、肿瘤特异性标志物、侵袭或转移、以及肿瘤生长。参见例如Freshney，CULTURE ANIMAL CELLS:MANUAL BASIC TECH.(第三版，1994年)。

[0490] 术语“野生型”分别指通常与其在体内存在时相同的、天然存在的编码蛋白的正常多核苷酸序列或其部分，或蛋白序列或其部分。

[0491] 术语“突变体”是指如下生物体或细胞：在其遗传物质方面具有任何变化、特别是相对于野生型多核苷酸序列的变化(即，删除、替换、添加或改变)的生物体或细胞；或相对于野生型蛋白序列具有任何变化的生物体或细胞。可将术语“变体(variant)”与“突变体(mutant)”互换使用。尽管通常假定遗传物质的变化导致蛋白功能改变，但术语“突变体”和“变体”是指野生型蛋白序列的改变，而不管所述改变是否使所述蛋白的功能发生变化(如，

增加、减少、赋予新的功能)，或者所述改变是否对蛋白的功能不产生影响(例如，突变或变异是沉默的)。术语“药学上可接受的”是指可给予哺乳动物而不产生过度毒性的化合物和组合物。术语“药学上可接受的载体”不包括组织培养基。示例性的药学上可接受的盐包括但不限于无机酸盐(mineral acid)，例如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐和硫酸盐等；以及有机酸盐，例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。药学上可接受的载体在本领域是公知的。

[0492] 应当认识到，蛋白或多肽通常含有除通常被称为20种天然存在的氨基酸的20种氨基酸外的氨基酸，还应当认识到，可通过天然过程(如糖基化和其它翻译后修饰)或通过本领域已知的化学修饰技术，对给定多肽中的多种氨基酸(包括末端氨基酸)进行修饰。可在本发明的多肽中存在的已知修饰包括但不限于，乙酰化、酰化、ADP核糖基化、酰胺化、黄素(flavin)的共价连接、血红素(heme)部分的共价连接、多核苷酸或多核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰基醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、制剂、γ-羧化、糖化(glycation)、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解处理、磷酸化、异戊烯化(prenylation)、外消旋化、硒化(selenoylation)、硫酸化(sulfation)、转运RNA介导的向蛋白添加氨基酸(例如精氨酰化(arginylation))、以及泛素化(ubiquitination)。

[0493] 本文使用的术语“同源(homologous)”或“同源物(homologues)”可互换使用，并且在用于描述多核苷酸或多肽时，表示当进行最佳比对(optimally aligned)和比较(例如使用就比对具有默认参数的BLAST，2.2.14版本)时，两个多核苷酸或多肽、或其指定序列(具有适当的核 苷酸插入或删除或氨基酸插入或删除)在其核苷酸中的至少70％的核苷酸、通常从约75％-99％(例如至少约98％-99％)的核苷酸是相同的。对于多肽，在多肽中应该有至少50％的氨基酸一致性。本文使用的术语“同系物(homolog)”或“同源”还指在结构方面的同源性。对基因或多肽同源性的测定可由本领域技术人员容易地确定。在定义的百分比的情况下，所定义的百分比同源性意味着至少该百分比的氨基酸相似度(similarity)。例如，85％的同源性是指至少85％的氨基酸相似度。

[0494] 本文使用的关于核酸序列、蛋白或多肽的术语“异源(heterologous)”意味着在该细胞中这些分子并不是天然存在的。例如，插入细胞中的编码本文所述的融合抗原多肽的核酸序列(例如在蛋白表达载体的情况下)即为异源核酸序列。

[0495] 对于序列比较，通常一个序列作为参比序列，将测试序列与所述序列进行比较。当使用序列比较算法时，将测试序列和参比序列输入计算机，指定子序列坐标(subsequence coordinates)(如果需要的话)，并且指定序列算法程序参数。然后，序列比较算法基于指定的程序参数，计算测试序列相对于参比序列的百分比序列一致性。在必要或需要的情况下，用于序列比较的最佳比对可通过本领域所公知的各种方法中的任何方法来进行。

[0496] 本文使用的术语“变体”可以指如下多肽或核酸：通过一个或多个氨基酸或核酸的删除、添加、替换或侧链修饰而不同于天然存在的多肽或核酸，但还保留了天然存在分子的一种或多种特定功能或生物活性。氨基酸替换包括将氨基酸替换为不同的天然存在的氨基酸残基或非常规的氨基酸残基的改变。此类替换可被分类为“保守的”，在这种情况下，将多肽中含有的氨基酸残基替换为另一种在极性、或侧链功能或大小上具有类似特性的天然存

在的氨基酸。本文所述的变体所涵盖的替换也可为“非保守的”，其中，将存在于多肽中的氨基酸残基替换为具有不同性质的氨基酸(例如，用丙氨酸替换带电氨基酸或疏水性氨基酸)，或者其中，将天然存在的氨基酸替换为非常规氨基酸。当针对多核苷酸或多肽而使用时，术语“变体”内还涵盖了分别相比于参比多核苷酸或多肽(例如，相对于野生型多核苷酸或多肽)而言，在一级结构、二级结构或三 级结构方面的变化。

[0497] 当针对相比于原始抗原而言抗原的变体或抗原的功能衍生物而使用时，术语“基本上相似”意味着特定的主题序列与抗原多肽序列因存在一个或多个替换、删除或添加而不同，但保留了至少50％或更高(例如，至少60％、70％、80％、90％以上(包括端值))的抗原在受试者中引发免疫应答的功能。在对多核苷酸序列进行测定中，能够编码基本上相似的氨基酸序列的所有主题多核苷酸序列均被认为是与参比多核苷酸序列基本上相似，而不考虑密码子序列的差别。如果满足以下条件，则核苷酸序列“基本上类似”于给定抗原核酸序列：(a)所述核苷酸序列杂交至天然抗原序列的编码区域；或(b)所述核苷酸序列能够在适度严格条件(moderately stringent conditions)下杂交至天然抗原的核苷酸序列，并且具有类似于天然抗原蛋白的生物活性；或者(c)所述核苷酸序列相对于(a)或(b)中定义的核苷酸序列为遗传密码子简并的结果。基本上相似的蛋白与相应天然蛋白序列通常具有高于约80％的相似度。

[0498] 如下所述，变体可包含保守的氨基酸变化或非保守的氨基酸变化。多核苷酸的改变可导致在由参比序列编码的多肽中发生氨基酸替换、添加、删除、融合和截短。变体还可包含氨基酸的插入、删除或替换，包括通常不会发生在作为变体的基础的多肽序列中的氨基酸和其它分子的插入和替换，例如但不限于通常不会在人蛋白中发生的鸟氨酸插入。“保守的氨基酸替换”由将一个氨基酸替换为另一种具有类似结构性质和/或化学性质的氨基酸造成。提供了功能相似氨基酸的保守替换表是本领域所公知的。例如，以下六组各自包含彼此为保守替换的氨基酸：(1)丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；(2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；(3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；(4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)；(5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；以及(6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。参见例如Creighton,PROTEINS(W.H.Freeman&Co.,1984年)。

[0499] 保守氨基酸的选择可基于肽中待被替换的氨基酸的位置进行选择，例如，所述氨基酸是否在肽的外部并暴露于溶剂，或者是否在肽的内部而不会暴露于溶剂。此类对保守氨基酸替换的选择在本领域普通技术人 员的技能之内。因此，能够选择适于蛋白或肽外部氨基酸(即暴露于溶剂的氨基酸)的保守氨基酸替换。这些替换包括但不限于以下替换：将Y替换为F，将T替换为S或K，将P替换为A，将E替换为D或Q，将N替换为D或G，将R替换为K，将G替换为N或A，将T替换为S或K，将D替换为N或E，将I替换为L或V，将F替换为Y，将S替换为T或A，将R替换为K，将G替换为N或A，将K替换为R，将A替换为S、K或P。

[0500] 或者，还能够选择适于蛋白或肽内部氨基酸(即，不会暴露于溶剂的氨基酸)的保守氨基酸替换。例如，能够使用如下保守替换：其中，将Y替换为F，将T替换为A或S，将I替换为L或V，将W替换为Y，将M替换为L，将N替换为D，将G替换为A，将T替换为A或S，将D替换为N，将I替换为L或V，将F替换为Y或L，将S替换为A或T以及将A替换为S、G、T或V。在一些实施方式中，包含非保守氨基酸替换的LF多肽也涵盖在术语“变体”内。本文使用的术语“非保守”替换是指将氨基酸残基替换为具有不同化学性质的不同氨基酸残基。非保守替换的非限制性

实例包括将天冬氨酸(D)用甘氨酸(G)替代;将天冬酰胺(N)用赖氨酸(K)替代;以及将丙氨酸(A)用精氨酸(R)替代。

[0501] 本文使用的术语“衍生物”是指经化学修饰的肽,例如,通过泛素化、标记、聚乙二醇化(用聚乙二醇进行的衍生化)或其它分子的添加进行。当分子包含通常不是该分子的一部分的附加化学部分时,该分子也是另一分子的“衍生物”。此类部分可改善分子的溶解度、吸收、生物半衰期等。或者,所述部分可降低分子的毒性、或者消除或减弱该分子的不希望的副作用等。能够介导此类效果的部分公开于REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(第21版,Tory著,Lippincott Williams &Wilkins,Baltimore,MD,2006年)。

[0502] 当与“衍生物”或“变体”结合使用时,术语“功能性”是指具有与实体或分子的生物活性基本上相似的生物活性的蛋白分子,所述蛋白分子为所述实体或分子的衍生物或变体。在这样的上下文中,“基本上相似”意味着生物活性(例如,多肽的抗原性)为参比(例如,相应的野 生型多肽)活性的至少50%,例如,至少60%、70%、80%、90%、95%、100%或甚至更高(即,相比于野生型,变体或衍生物具有更高的活性),例如,110%、120%以上,包括端值。

[0503] 当用于描述核酸分子时,术语“重组体”意味着基因组、cDNA、病毒、半合成和/或合成来源的多核苷酸,所述多核苷酸借助于其来源或操作与其在自然界中是相关的多核苷酸序列的全部或部分不相关。关于肽、多肽、蛋白或重组融合蛋白所使用的术语重组体是指由重组多核苷酸表达而产生的多肽。关于宿主细胞所使用的术语重组体意味着其中引入有重组多核苷酸的宿主细胞。就材料(例如,细胞、核酸、蛋白质、或载体)而言,重组体在本文中还用于指所述材料已通过引入异源材料(例如,细胞、核酸、蛋白质、或载体)进行修饰。

[0504] 术语“载体”是指能够将异源核酸运送至宿主细胞或在宿主细胞中介导异源核酸表达的核酸分子,所述异源核酸已连接至所述核酸分子;质粒为术语“载体”所涵盖的种类中的一种形式。术语“载体”通常是指含有在宿主细胞中进行复制和/或维持所必需的复制起点和其它实体的核酸序列。在本文中,能够指导与其可操作地连接的基因和/或核酸序列的表达的载体被称为“表达载体”。通常情况下,实用的表达载体往往处于“质粒”的形式(指环状双链DNA分子(所述环状双链DNA分子在其载体形式中并不结合至染色体)),并且通常包含用于稳定表达或瞬时表达的实体或编码DNA。可用于本文公开的方法中的其它表达载体包括但不限于,质粒、附加体(episomes)、细菌人工染色体、酵母人工染色体、噬菌体或病毒载体,并且此类载体可整合进宿主的基因组或在特定细胞中自主复制。载体可以是DNA载体或RNA载体。也可使用本领域技术人员所公知的具有等同功能的其它形式的表达载体,例如自我复制的染色体外载体或整合至宿主基因组的载体。优选的载体为能够自主复制和/或表达与它们相连的核酸的载体。

[0505] 本文使用的术语“减少/降低(reduced/reduce/decrease)”通常意味着相对于参比而言降低了统计学显著的量。为避免疑问,如本文所定义的术语,“减少”意味着相对于参比水平而言至少10%的统计学显著性降低,例如,降低至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、或至少60%、 或至少70%、或至少80%、至少90%以上、上至并包括降低100%(即,相对于参比样品为缺失水平(absent level)),或者相对于参比水平而言降低在10%-100%之间的任意量。

[0506] 本文使用的术语“低”通常意味着低了统计学显著的量;为避免疑问,“低”意味着

相比参比水平而言低了至少10％的统计学显著值，例如低于参比水平至少20％、低于参比水平至少30％、低于参比水平至少40％、低于参比水平至少50％、低于参比水平至少60％、低于参比水平至少70％、低于参比水平至少80％、低于参比水平至少90％、上至并包括低于参比水平100％的值(即，相对于参比样品为缺失水平)。

[0507] 本文使用的术语“增加/提高(increased/increase)”通常意味着增加了统计学显著的量；例如，如在本文中所定义的术语，相对于参比水平而言至少10％的统计学显著性增加，包括增加至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少100％或以上，包括端值；包括例如相对于参比水平增加至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍或更多。

[0508] 本文使用的术语“高”通常意味着相对于参比而言高了统计学显著的量；例如，相比于参比水平而言高了至少10％的统计学显著值，例如，与参比水平相比高至少20％、高至少30％、高至少40％、高至少50％、高至少60％、高至少70％、高至少80％、高至少90％、高至少100％，包括端值；例如，与参比水平相比高至少2倍、高至少3倍、高至少4倍、高至少5倍、高至少10倍或更高。

[0509] 本文使用的术语“包含/包括(comprising)”表示除已存在的确定要素外，还可存在其它要素。“包含/包括”的使用表示含有而非限制。

[0510] 术语“由…组成”是指本文所述的组合物、方法以及它们各自的组分，排除未在实施方式描述中详述的任何要素。

[0511] 本文使用的术语“基本上由…组成”是指对于给定的实施方式而言所需的那些要素。该术语允许存在实质上不影响本发明该实施方式的基础和新颖性或功能性特征的要素。

[0512] 应当进一步理解的是，对于核酸或多肽而言，所给出的全部碱基大 小或氨基酸大小、以及所有的分子量或分子质量的值均为近似值，并且提供用于说明。尽管可将与本文所述的方法和材料相似或等同的方法和材料用于本公开的实践和测试中，本文仍描述了适合的方法和材料。

[0513] 本文所使用的术语“生物素”是指化合物生物素本身及其类似物、衍生物或变体。因此，术语“生物素”包括生物素(顺-六氢化-2-氧代-1H-噻吩并[3,4]咪唑-4-戊酸)及其任何衍生物和类似物，包括生物素样化合物。此类化合物包括例如：生物素-e-N-赖氨酸、生物胞素酰肼(biocytin hydrazide)、磺基琥珀酰亚胺亚氨基生物素(sulfosuccinimideiminobiotin)、生物素溴乙酰基酰肼(biotinbromoacetylhydrazide)、对重氮苯甲酰基生物胞素(p-diazobenzoyl biocytin)、3-(N-马来酰亚胺基丙酰基)生物胞素、脱硫生物素、生物素酰-E-氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯及2-亚氨基生物素的氨基或巯基衍生物等。术语“生物素”还包括能够特异性地结合至Rhizavidin、亲和素、链霉亲和素、tamavidin部分、或其它亲和素样肽中的一种以上的生物素变体。

[0514] 尽管为了清楚理解的目的以说明和举例的方式对前面的发明进行了相当详细的描述，对本领域普通技术人员而言显而易见的是，可在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下，根据本发明的教导对其作出某些改变和修饰。下面是为了说明本发明，然而，本发明的实践不以任何方式受实施例的限定或限制。

[0515] 实施例

[0516] 实施例1:在大肠杆菌中高产量地表达可溶性重组生物素结合蛋白及其融合蛋白

[0517] 在这些研究中使用的重组Rhizavidin(rRhavi)是N端修饰变体,所述N端修饰变体仅包含野生型蛋白第45-179位的残基。为了优化rRhavi在大肠杆菌中的表达水平,使用大肠杆菌偏好表达密码子对编码Rhizavidin多肽(45-179)的基因序列进行了重新设计,然后合成并克隆进PET21b载体中。为了有助于正确折叠和获得高产量的溶解性重组蛋白,将编码大肠杆菌周质定位信号序列(19个氨基酸,MKKIWLALAGLVLAFSASA,SEQ ID NO:2)的DNA序列引入合成的 rRhavi基因的5′端。在表达过程中,预计这一信号序列在重组蛋白导向至大肠杆菌周质后被自动从所述重组蛋白中删除。

[0518] 将编码柔性接头区域和His标签(GGGGSSSVDKLAAALE HHHHHH,SEQ ID NO:14)的DNA序列直接插入到合成的rRhavi基因的3’末端。这有助于重组生物素结合蛋白的纯化。此外,可将抗原插入接头中(两端均具有柔性接头),例如可将抗原插入接头的氨基酸S和V之间。由此,使抗原通过肽接头(GGGGSSS,SEQ ID NO:22)与生物素结合蛋白分离,并通过肽接头(VDKLAAALE,SEQ ID NO:11)与His标签分离,这可稳定融合蛋白。

[0519] 为了构建Rhizavidin-抗原融合蛋白,可将编码柔性接头区域(由七个氨基酸(GGGGSSS,SEQ ID NO:22)组成)的DNA序列直接插入到合成的rRhavi基因的3’末端,以帮助稳定所述融合蛋白。通过常规PCR程序,将编码候选抗原(全长或所需片段)的基因从感兴趣的病原体的基因组DNA中扩增出来,并仅越过接头区域插入至rRhavi表达载体中。

[0520] 关于蛋白表达,使用标准热休克程序将含有目标构建体的质粒转染到大肠杆菌菌株BL21(DE3)中。从平板中(或之后使用甘油储液)中挑取新鲜的单菌落,并将其接种至30ml含有氨苄青霉素(Amp+)的Luria-Bertani(LB)培养基中,在37℃过夜培养。第二天,将5ml初始培养液接种至1升的LB培养基/Amp+中,在37℃生长直至达到OD600=1。将培养基冷却至16℃后,将终浓度为0.2 mM的IPTG添加至培养液中过夜诱导。

[0521] 使用改进的渗透冲击(osmotic shock)方案将蛋白从周质部分中纯化出来。简单地说,收集来自6升培养液中的细菌细胞并将其重悬于120ml含有30mM Tris(pH 8.0)、20%蔗糖和1mM EDTA的缓冲液中。在室温下搅拌20分钟后,通过在10,000 rpm下离心10分钟,使所述细胞重新沉淀。收集上清液作为部分1,并将所述细胞重悬于80ml含有5mMMgCl2、蛋白酶抑制剂和DNase的冰冷溶液中。在4℃搅拌20分钟后,使所述混合物在13,000rpm下离心20分钟,并收集上清液作为部分2。加入终浓度为150mM NaCl、10mM MgCl2和10mM咪唑之后,将混合了部分1和部分2的上清液施加于Ni-NTA柱上。使用在AKTA纯化器 上运行的superdex 200柱,通过凝胶过滤对从Ni-NTA柱上洗脱下来的蛋白进行进一步纯化。将含有目标蛋白的峰部分合并并浓缩。使用来自Bio-Rad的BCA蛋白测定试剂盒对蛋白浓度进行测量。将纯化的蛋白质分为小份,在液氮中速冻并在-80℃保存以供将来使用。

[0522] 生物素结合蛋白的构建体在图1中示意性示出;纯化的生物素结合蛋白的SDS-PAGE在图2中示出。

[0523] 包含生物素结合蛋白的融合蛋白的构建体在图3中示意性示出;示例性的纯化融合蛋白的SDS-PAGE在图4中示出。

[0524] 实施例2:生物素结合蛋白的脂化衍生物

[0525] 使用类似于实施例1所述方法的方法制备了重组生物素结合蛋白的脂化衍生物。本研究中使用的脂化衍生物是仅含有野生型蛋白第45-179位残基的野生型Rhizavidin的N

端修饰变体。为优化大肠杆菌中rRhavi的表达水平，使用大肠杆菌优选的表达密码子对编码Rhizavidin多肽(45-179)的基因序列进行了重新设计，随后合成并克隆入PET21b载体。为了促进脂化、正确折叠并获得可溶性重组蛋白的高产量，在所合成的rRhavi基因的5’末端引入了编码脂化序列(19个氨基酸，MKKVAAFVALSLLMAGC，SEQ ID NO:3)的DNA序列。在表达过程中，所述脂化将通过细菌(例如大肠杆菌)在Cys残基上添加脂化序列。

[0526] 关于蛋白表达，使用标准热休克程序将含有目标构建体的质粒转染到大肠杆菌菌株BL21(DE3)中。从平板(或之后使用甘油储液)中挑取新鲜的单菌落，并将其接种至30ml含有氨苄青霉素(Amp+)的Luria-Bertani(LB)培养基中，在37℃过夜培养。第二天，将5ml初始培养液接种至1升的LB培养基/Amp+中，在37℃生长直至达到OD600＝1。将培养基冷却至16℃后，将终浓度为0.2 mM的IPTG添加至培养液中过夜诱导。

[0527] 由大肠杆菌的膜碎片纯化脂化rhizavidin。收集大肠杆菌细胞并在含有蛋白酶抑制剂、Dnase、10mM Mg^{2+}和溶菌酶的裂解缓冲液(20 mM Tris，500 mM NaCl，pH 8.0)中重悬。通过一个冷冻-解冻循环将细胞破碎，在13,000rpm下离心45min后移除上清液。随后在含有0.5％SDOC的裂 解缓冲液中重悬细胞沉淀(pellet)，并通过珠磨器(beads beater)均质化。随后在13,000rpm下将裂解物离心45min，收集上清液用于亲和纯化。用含有0.5％SDOC和300mM Im的裂解缓冲液对脂化rhavi进行洗脱。

[0528] 使用在AKTA纯化系统上运行的superdex 200柱，通过凝胶过滤对Ni-NTA柱洗脱的蛋白进行进一步纯化。对含有目标蛋白的峰部分进行合并与浓缩。使用BCA蛋白检测试剂盒(Bio-Rad)对蛋白浓度进行测量。分装纯化的蛋白，在液氮中速冻并在-80℃下保存以备将来使用。

[0529] 所生产的脂化生物素结合蛋白在图5中示意性示出；纯化的脂化生物素结合蛋白的SDS-PAGE在图6中示出。

[0530] 实施例3：脂化生物素结合蛋白的TLR2活性

[0531] 在HEK TLR2细胞中对脂化生物素结合蛋白的TLR2活性进行了测试。将HEK TLR2细胞以5×10^5细胞/孔(体积为500μl)铺于24孔板中。以不同浓度添加脂化生物素结合蛋白以在37℃刺激过夜。在第二天收集上清液，用于通过ELISA进行IL-8测定。作为对照，在相同条件下使用HEK 293细胞来进行刺激。

[0532] 对脂化生物素结合蛋白的TLR2活性进行了测定。结果显示，在HEKTLR2细胞中脂化生物素结合蛋白诱导IL-8的生成，但在HEK 293细胞中则未诱导(图7)。

[0533] 实施例4：Hla的非溶血性突变体及融合蛋白

[0534] 由金黄色葡萄球菌基因组克隆编码野生型Hla成熟多肽(第27-319位氨基酸)的DNA序列。Hla的所有非溶血性突变体均通过使用quickchange进行定点突变(site-directed mutagenesis)产生。为制成Hla-生物素结合融合蛋白，将编码野生型Hla或突变型Hla的DNA序列越过接头区域在生物素结合蛋白基因之后插入。如上所述，将全部构建体克隆入PET21b并转化至大肠杆菌中表达。

[0535] 制备了Hla的非溶血性突变体。示例性的非溶血性Hla变体在图8中示意性示出。纯化的野生型Hla或非溶血性Hla变体和融合蛋白的SDS-PAGE在图9和图10中示出。

[0536] 实施例5：野生型Hla、突变型Hla和融合蛋白的溶血活性

[0537] 使用兔血细胞对野生型Hla、突变型Hla及它们与生物素结合蛋白形成的融合蛋白

的溶血活性进行分析。对来自250μl兔血的红细胞进行沉淀(pelleted)，以PBS洗涤两次，然后在10ml PBS中重悬。使用PBS将野生型Hla、突变型Hla和融合蛋白稀释至指定浓度，并以100μl每孔加入96孔板。向每孔含有25μl Hla或融合蛋白的96孔板中添加血细胞，然后在37℃培养30min。在2000rpm下离心5min后收集上清液，并通过ELISA读数仪在OD450处进行分析。

[0538] 对野生型Hla、突变型Hla及它们的融合蛋白的溶血活性进行测定。结果显示，相对于野生型Hla而言，突变型Hla具有显著降低的溶血活性(图11)。此外，相对于非融合的突变型Hla蛋白而言，包含生物素结合蛋白的Hla融合蛋白具有还要更低的溶血活性(图12)。

[0539] 实施例6：突变型Hla融合蛋白的刺激活性

[0540] 使用非溶血性Hla突变体融合蛋白对C57 WT巨噬细胞进行刺激。以5×10^5细胞每孔将细胞接种于24孔板中。使用生长培养基(growth medium)稀释突变型Hla融合蛋白，并在指明的浓度下加至孔中以在37℃刺激过夜。第二天在2000rpm下离心5min后，收集上清液，然后通过ELISA对细胞因子分泌进行分析。

[0541] 分析了突变型Hla融合蛋白的刺激活性。结果显示，突变型Hla融合蛋白(rhavi-Hla209)诱导产生多种促炎性细胞因子，包括TNF-α、IL-6、IL-23、IL-1β和IL-17(图13)。

[0542] 实施例7：脂化生物素结合蛋白和突变型Hla融合蛋白促进针对其它抗原的免疫应答

[0543] 基于MAPS的疫苗构建体由生物素化的血清型-1肺炎球菌荚膜多糖、融合rhizavidin的TB抗原、以及非脂化rhizavidin、脂化rhizavidin或rhavi-Hla209三者之一制得。使用不同的MAPS构建体对小鼠进行免疫，并在3次免疫后对不同免疫组中针对TB抗原的T细胞应答进行分析和比较。简要说来，使用纯化的TB蛋白对不同小鼠组的全血在37℃体外刺激6天，并通过ELISA对上清液中的细胞因子浓度进行检测。

[0544] 结果显示，接受含有脂化rhizavidin或含有rhavi-Hla209的MAPS复合物的小鼠组产生更好的针对TB抗原的Th17(IL-17A)和Th1细胞(IFN-γ)应答(图14)。这表明脂化rhizavidin和rhavi-Hla209可在MAPS疫苗制剂中作为共刺激因子/佐剂。

[0545] 可以理解的是，上述细节描述和实施例仅为示范目的，而不能作为对本发明范围的限定。在不脱离本发明的精神和范围的情况下，可对所公开的实施方式进行多种改变和修饰，这对本领域技术人员来说将是显而易见的。另外，出于描述和公开的目的，在此以引用的方式将在本文中标明的所有专利与其它出版物明确地并入本文，例如在此类出版物中描述的可用于本发明的方法学。这些出版物仅仅由于它们的公开早于本申请的申请日而提供。在这一方面不应当视作承认本发明人没有权利借助于先前的发明或因为任何其它原因而将公开的内容提前。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请人可得的信息，并且不构成关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的任何承认。

[0546] 为了所有目的，在此以引用的方式将在说明书和实施例中标明的所有专利与其它出版物明确地并入本文。这些出版物仅仅由于它们的公开早于本申请的申请日而提供。在这一方面不应当视作承认本发明人没有权利借助于先前的发明或因为任何其它原因而将公开的内容提前。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请人可得的信息，并且不构成关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的任何承认。

[0547] 尽管本文已详细地描述和记载了优选的实施方式，但是相关领域的技术人员显然可以进行各种修改、添加和替换等而不背离本发明的精神，因此认为这些方案落入随后的权利要求书中所定义的本发明的范围。

[0548] 此外，对于那些没有指明的内容，本领域普通技术人员将会理解的是，可对本文所描述和说明的多种实施方式中的任一个进行进一步修改，以纳入在本文公开的任何其它实施方式中示出的特征。

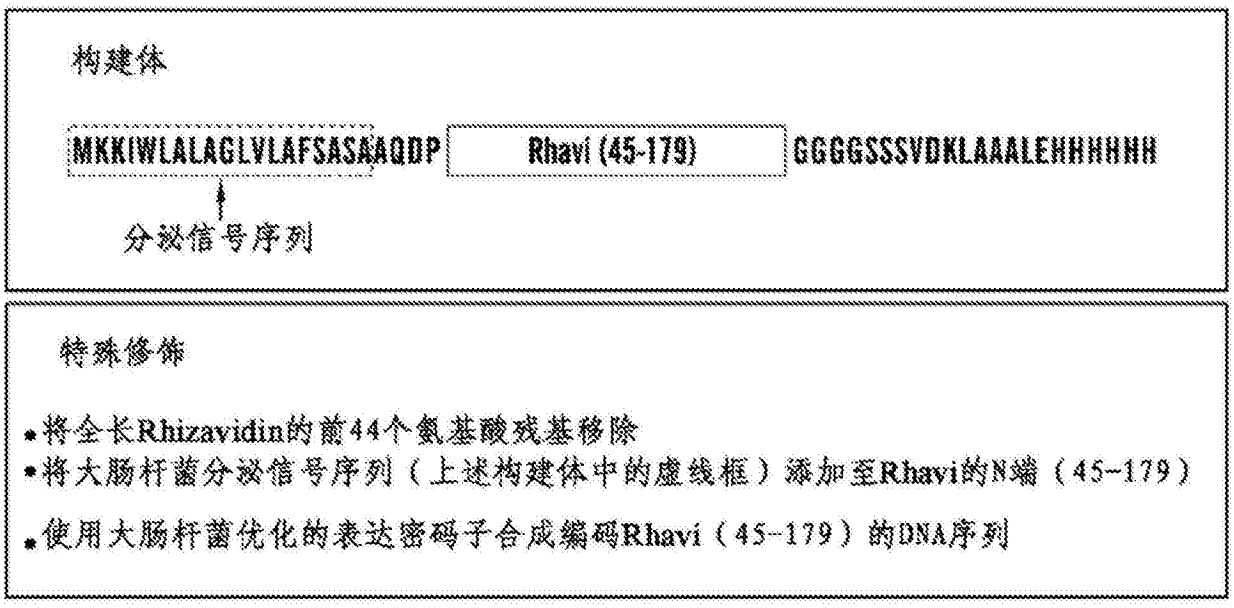
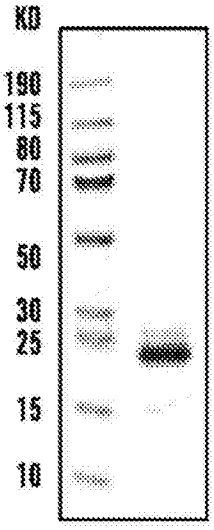


图1

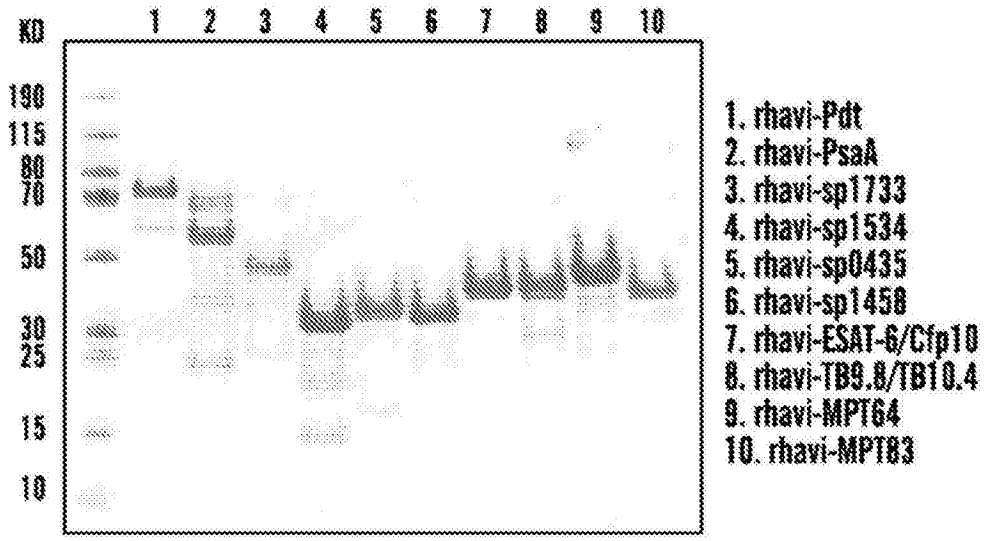


纯化的重组Rhizavidin（45-179）的SDS-PAGE

图2



图3



纯化的Rhizavidin融合蛋白的SDS-PAGE

图4

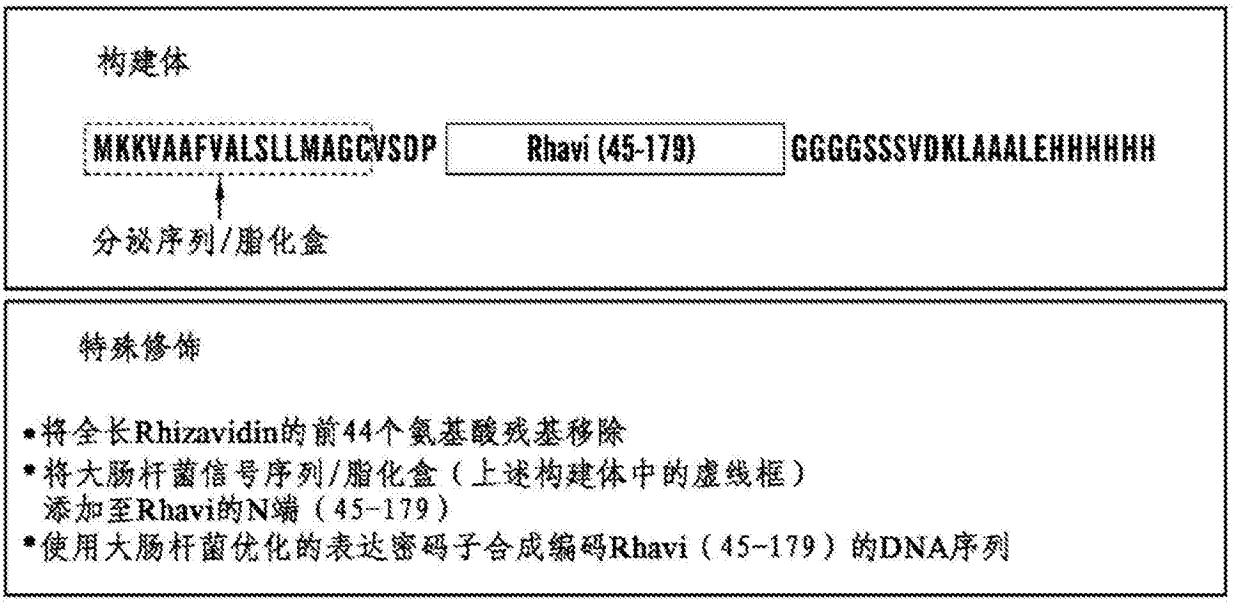
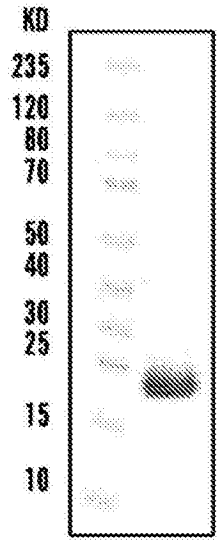


图5



纯化的脂化Rhizavidin的SDS-PAGE

图6

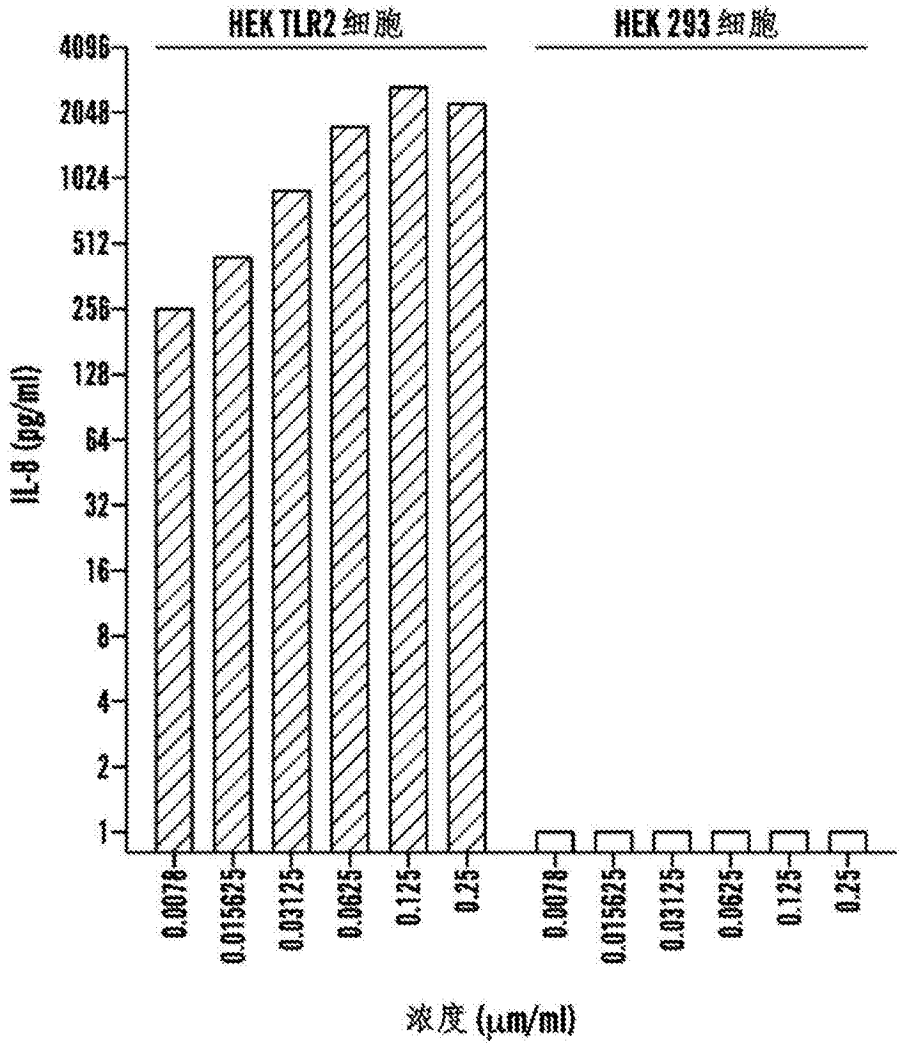

HEK TLR2细胞
HEK 293细胞
4096
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
1
IL-8 (pg/ml)
0.0078
0.015625
0.03125
0.0625
0.125
0.25
0.0078
0.015625
0.03125
0.0625
0.125
0.25
浓度 (μm/ml)
脂化Rhizavidin的TLR2活性

图7

构建体

1) Hla (WT/突变体)

M | Hla (27-319) | LEHHHHHH

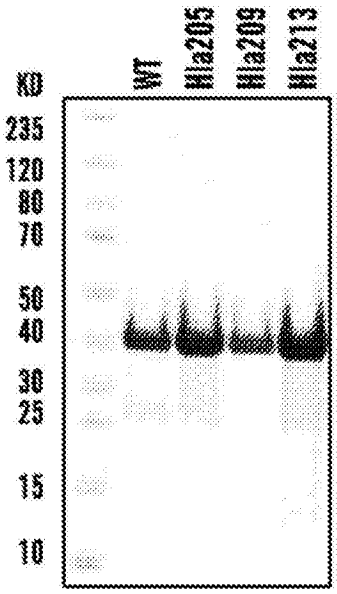
2) Rhizavidin-Hla (WT/突变体)融合蛋白

MKKIWLALAGLVLAFSASAAQDP | rhizavidin (45-179) | GGGGSSS | Hla (27-319) | LEHHHHHH

在Hla上制造的点突变

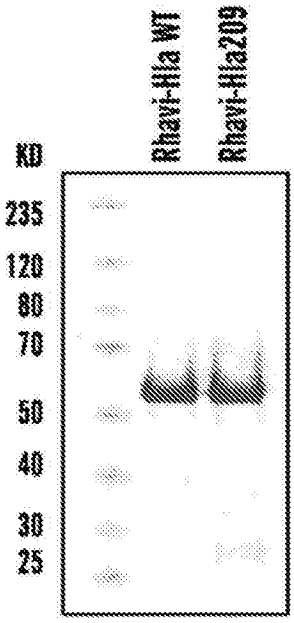
- 残基205由W变为A
- 残基209-211由DRD变为AAA
- 残基213由W变为A

图8



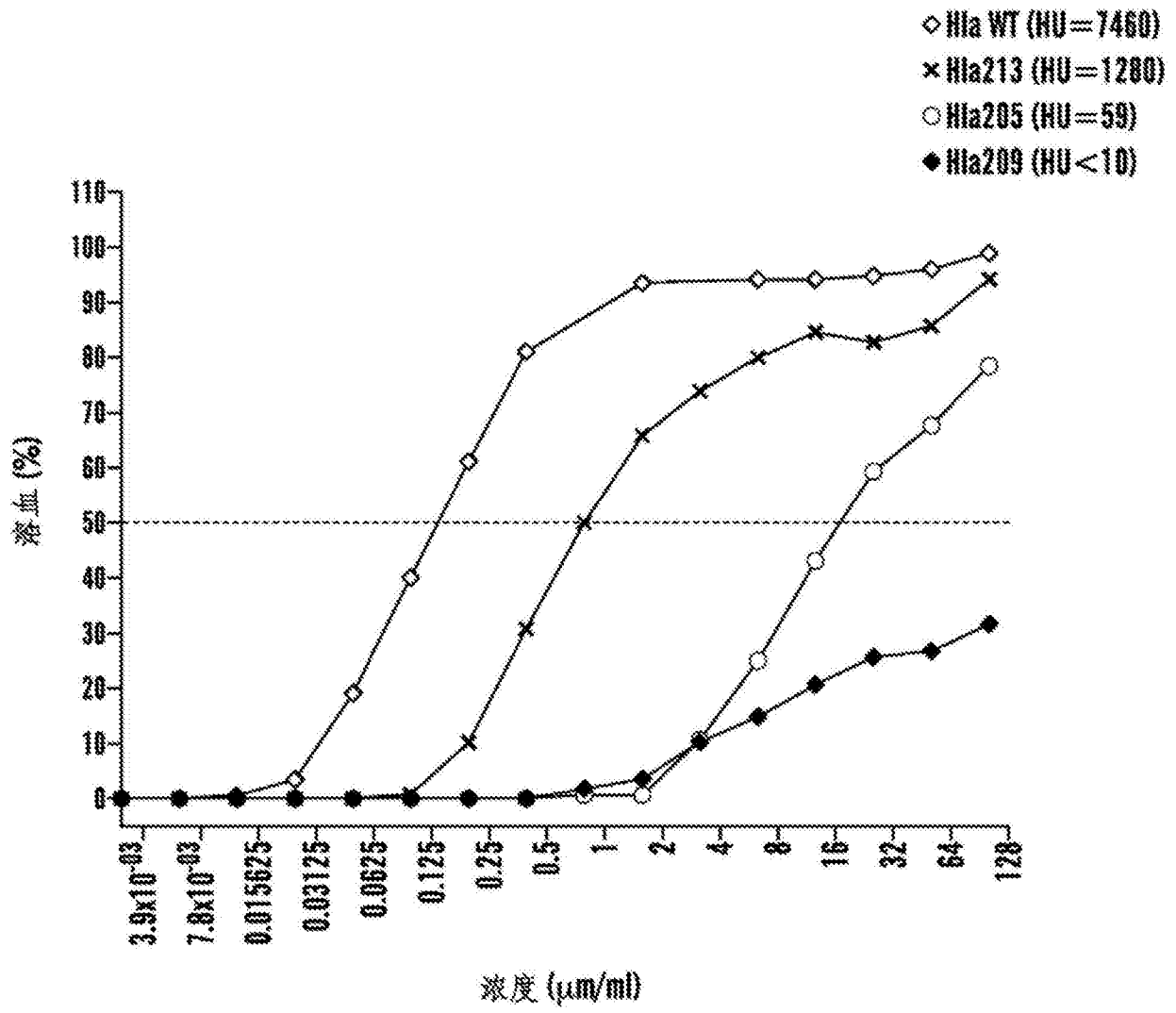
纯化的WT Hla或突变体的SDDS-PAGE

图9



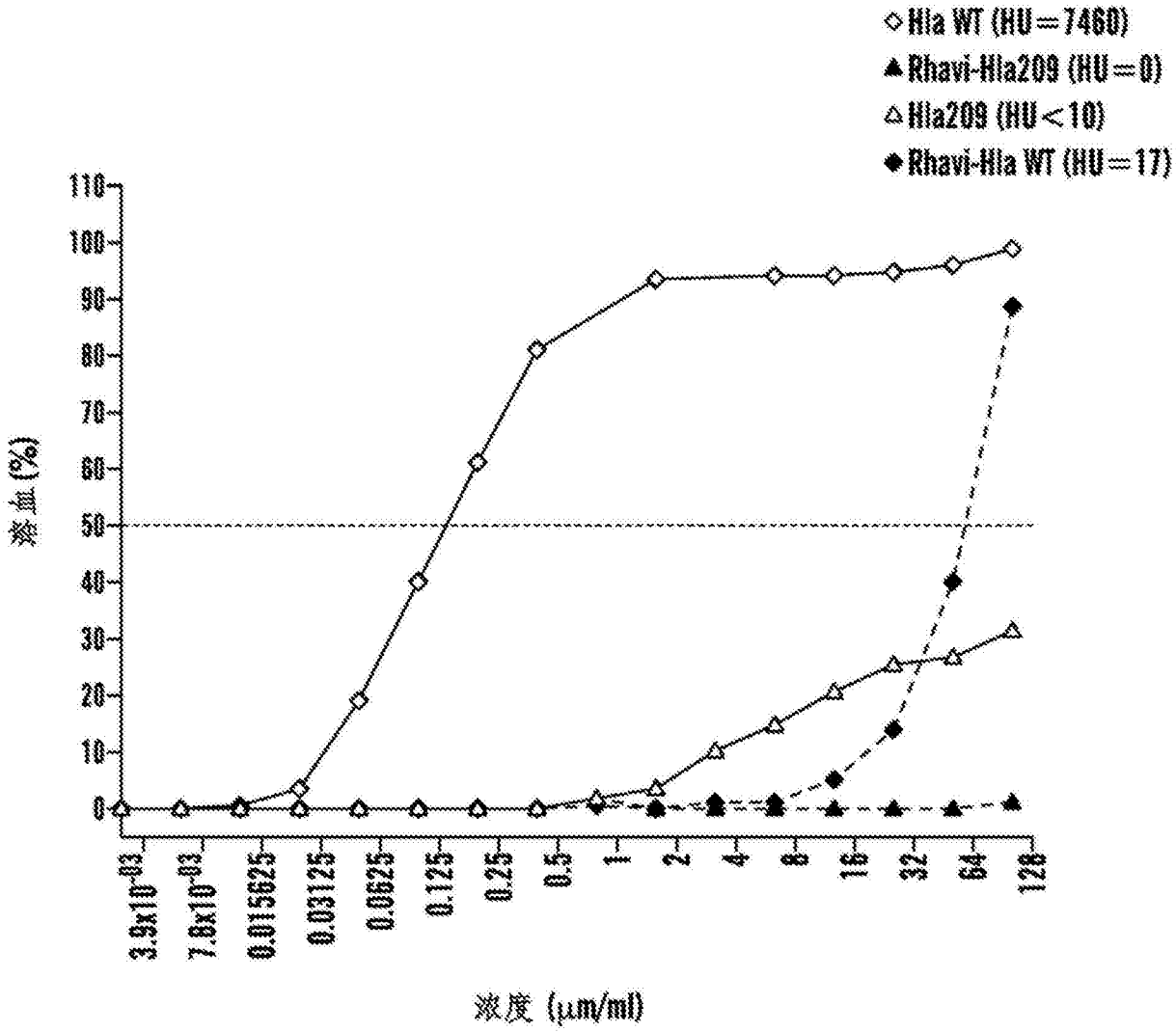
纯化的WT或突变型Hla的
Rhizavidin融合蛋白的SADS-PAGE

图10



WT或突变型Hla的溶血活性

图11



WT或突变型Hla及它们的Rhizavidin融合蛋白的溶血活性

图12

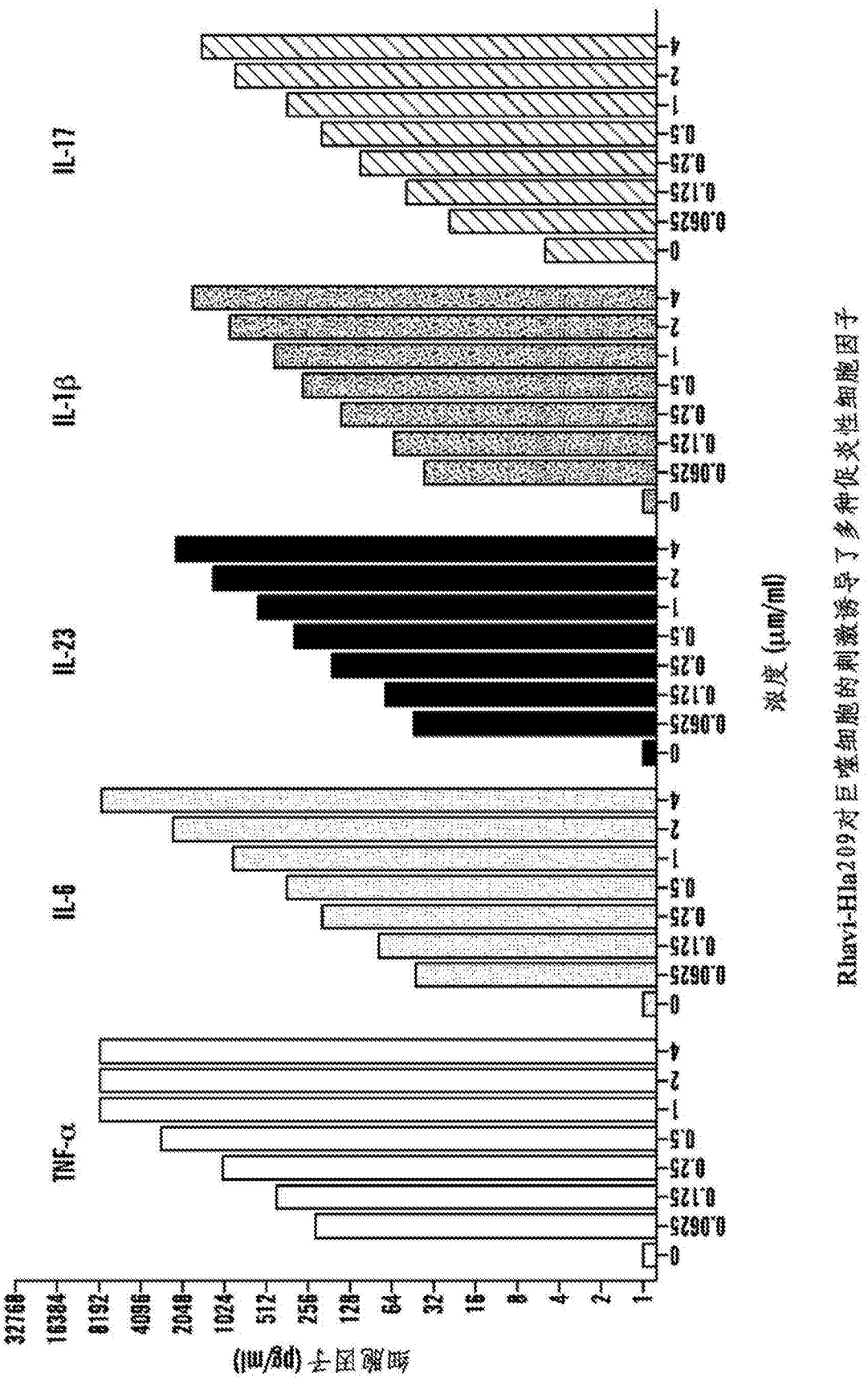

Rhavi-Hla209对巨噬细胞的刺激诱导了多种促炎性细胞因子
浓度 (μm/ml)
细胞因子 (pg/ml)
32768
16384
8192
4096
2048
1024
512
256
128
64
32
16
8
4
2
1
TNF-α
IL-6
IL-23
IL-1β
IL-17
4
2
1
0.5
0.25
0.125
0.0625
0

图13

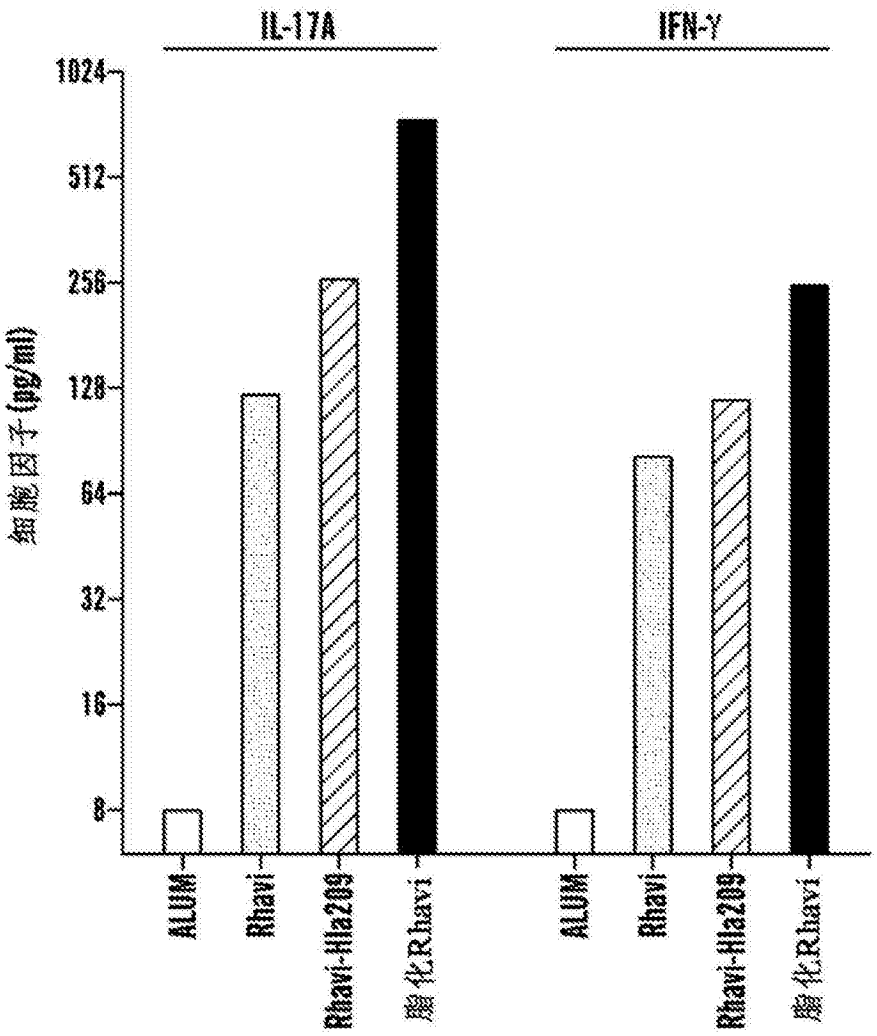

IL-17A
IFN-γ
1024
512
256
128
64
32
16
8
细胞因子(pg/ml)
ALUM
Rhavi
Rhavi-Hla209
脂化Rhavi
ALUM
Rhavi
Rhavi-Hla209
脂化Rhavi
将脂化Rhizavidin或Rhavi-Hla209并入
MAPS复合物增强了针对其它抗原的T细胞应答

图14