



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101141979 B

(45) 授权公告日 2013.05.08

(21) 申请号 200680008872.6

(22) 申请日 2006.03.17

(30) 优先权数据

60/662,918 2005.03.18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.09.18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2006/060845 2006.03.17

(87) PCT申请的公布数据

W02006/097530 EN 2006.09.21

(73) 专利权人 赛托斯生物技术公司

地址 瑞士施利伦

(72) 发明人 M·巴克曼 M·鲍尔 K·迪特迈尔

N·施米茨 S·尤特津格尔

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

A61K 39/35 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 03/040164 A2, 2003.05.15, 摘要, 第

145-157 段, 权利要求 1-6, 实施例 1、7-11.

Lisa D.Vailes et al..High-level expression of immunoreactiverecombinant cat allergen (Fel d 1):Targeting to antigen-presenting cells.J ALLERGY CLIN IMMUNOL.2002,110(5), 摘要、第 758、761 页.

Liselotte Kaiser et al..The Crystal Structure of the Major Cat Allergen Fel d1,a Member of the Secretoglobulin Family.THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.2003,(39), 摘要、第 37734 页右栏第 2 段.

Hans Gronlund et al..Formation of Disulfide Bonds and Homodimers of the Major Cat Allergen Fel d1 Equivalent to the Natural Allergen by Expression in Escherichia coli.THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.2003,(41), 摘要、第 40145 页左栏第 2-3 段,图 1.

刘春国等.病毒样颗粒技术应用的研究进展.中国预防兽医学报.2005,27(2),第 159 页 2.3 节.

审查员 李娟娟

权利要求书2页 说明书29页

序列表28页 附图4页

(54) 发明名称

猫变应原融合蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明属于医学、公共卫生、免疫学、分子生物学和病毒学领域。本发明提供包含病毒样颗粒(VLP)或病毒颗粒和至少一种抗原的组合物,所述抗原特别是至少一种猫抗原,更特别地是至少一种为人变应原的猫抗原。在特定实施方案中,抗原是与VLP共价连接的Fel d1抗原或其片段。本发明也提供制备所述组合物的方法。本发明的组合物在哺乳动物,特别是在人中诱导有效的免疫应答,特别是抗体应答。本发明的组合物和方法可以用于制备疫苗,该疫苗特别用于治疗 and / 或预防对猫毛皮屑和其他猫抗原和变应原的变态反应。

1. 一种组合物,其包含:

(a) 具有至少一个第一附着位点的核心颗粒,其中所述核心颗粒是 RNA 噬菌体病毒样颗粒,

(b) 具有至少一个第二附着位点的至少一种抗原,

其中所述至少一种抗原是 Fe1 d1 蛋白,其中所述 Fe1 d1 蛋白是包含 Fe1 d1 的链 1 和 Fe1 d1 的链 2 的融合蛋白,其中所述 Fe1 d1 蛋白的链 2 通过其 C 末端与所述 Fe1 d1 蛋白的链 1 的 N 末端通过间隔区融合,其中所述间隔区由 10-20 个氨基酸残基的氨基酸序列组成,

并且其中 (a) 和 (b) 通过所述至少一个第一附着位点和所述至少一个第二附着位点共价连接。

2. 权利要求 1 的组合物,其中所述间隔区由 15 个氨基酸残基的氨基酸序列组成。

3. 权利要求 2 的组合物,其中所述间隔区是 (GGGGS)₃。

4. 权利要求 1 的组合物,其中所述融合蛋白由选自下组的氨基酸序列组成:

(a) SEQ ID NO :54 ;和

(b) SEQ ID NO :55。

5. 权利要求 1 的组合物,其中所述 Fe1 d1 蛋白是 SEQ ID NO :55。

6. 权利要求 1 的组合物,其中所述 Fe1 d1 的链 1 由 SEQ ID NO :22 的氨基酸序列组成。

7. 权利要求 1 的组合物,其中所述 Fe1 d1 蛋白的链 2 由 SEQ ID NO :23、SEQ ID NO :25 或 SEQ ID NO :26 的序列组成。

8. 权利要求 1 的组合物,其中所述 Fe1 d1 的链 2 由 SEQ ID NO :23 的氨基酸序列组成。

9. 权利要求 1 的组合物,其中所述 RNA 噬菌体选自 Q β 、fr、GA 和 AP205。

10. 权利要求 1 的组合物,其中所述 RNA 噬菌体是噬菌体 Q β 。

11. 权利要求 1 的组合物,其中所述 RNA 噬菌体的病毒样颗粒包含 SEQ ID NO :1 的外壳蛋白。

12. 权利要求 1 的组合物,其中所述第一附着位点包含氨基。

13. 权利要求 12 的组合物,其中所述氨基是赖氨酸的氨基。

14. 权利要求 1 的组合物,其中所述第一附着位点是氨基。

15. 权利要求 14 的组合物,其中所述氨基是赖氨酸的氨基。

16. 权利要求 1 的组合物,其中所述第二附着位点包含巯基。

17. 权利要求 16 的组合物,其中所述巯基是半胱氨酸的巯基。

18. 权利要求 1 的组合物,其中所述第二附着位点是巯基。

19. 权利要求 18 的组合物,其中所述巯基是半胱氨酸的巯基。

20. 权利要求 1 的组合物,其中所述第一附着位点包含氨基,并且所述第二附着位点包含巯基。

21. 权利要求 20 的组合物,其中所述氨基是赖氨酸的氨基,并且所述巯基是半胱氨酸的巯基。

22. 权利要求 1 的组合物,其中所述第一附着位点是氨基,并且所述第二附着位点是巯基。

23. 权利要求 22 的组合物,其中所述氨基是赖氨酸的氨基,并且所述巯基是半胱氨酸

的巯基。

24. 权利要求 1 的组合物,其还包含连接体,其中所述连接体与所述 Fe1 d1 蛋白的 C 末端融合。

25. 一种疫苗,其包含权利要求 1-24 中任一项的组合物。

26. 权利要求 25 的疫苗,其还包含至少一种佐剂。

27. 一种药物组合物,其包含:

(a) 权利要求 1-24 中任一项的组合物;和

(b) 可接受的药物载体。

28. 一种制备权利要求 1-24 中任一项的组合物的方法,包括:

(a) 提供具有至少一个第一附着位点的核心颗粒,其中所述核心颗粒是 RNA 噬菌体病毒样颗粒;

(b) 提供具有至少一个第二附着位点的至少一种抗原,其中所述抗原是 Fe1 d1 蛋白,其中所述 Fe1 d1 蛋白是包含 Fe1 d1 的链 1 和 Fe1 d1 的链 2 的融合蛋白,其中所述 Fe1 d1 蛋白的链 2 通过其 C 末端与所述 Fe1 d1 蛋白的链 1 的 N 末端通过间隔区融合,其中所述间隔区由 10-20 个氨基酸残基的氨基酸序列组成;和

(c) 将所述核心颗粒与所述至少一种抗原共价连接,产生所述组合物,其中所述至少一种抗原和所述核心颗粒通过所述至少一个第一附着位点和所述至少一个第二附着位点共价连接。

29. 权利要求 1-24 中任一项的组合物在制备治疗猫变态反应的药物中的用途。

猫变应原融合蛋白及其用途

[0001] 发明背景

技术领域

[0002] 本发明属于医学、公共卫生、免疫学、分子生物学和病毒学领域。本发明提供包含病毒样颗粒 (VLP) 或病毒颗粒和至少一种抗原的组合物,所述抗原特别是至少一种猫抗原,更特别地是至少一种为人变应原的猫抗原。在特定实施方案中,所述抗原是与 VLP 共价连接的 Fel d1 抗原或其片段。本发明也提供制备所述组合物的方法。本发明的组合物在哺乳动物中,特别是在人中诱导有效的免疫应答,特别是抗体应答。本发明的组合物和方法可以用于制备疫苗,该疫苗特别用于治疗 and / 或预防对猫毛皮屑和其他猫抗原和变应原的变态反应。

背景技术

[0003] 家猫 (*Felis domesticus*) 是室内变应原的一种重要的来源 (Lau, S. 等人. (2000) *Lancet* 356, 1392-1397)。实际上,在西方国家中有大约 25% 的家庭养猫,并且在一大部分群体中发现针对猫的变态反应。症状的严重程度从相对较轻的鼻炎和结膜炎到潜在危及生命的哮喘加重不等。

[0004] 尽管患者偶然对猫毛皮屑和毛皮中的几种不同的分子敏感,但是主要的变应原是 Fel d1 (即家猫变应原 1; 以前称为 Cat1, 即猫变应原 1)。这种变应原的重要性已经在大量研究中被强调。事实上超过 80% 的猫过敏患者显示出针对该强变应原的 IgE 抗体 (van Ree, R. 等人 (1999) *J. Allergy Clin Immunol* 104, 1223-1230)。

[0005] Fel d1 是 35-39 kDa 的酸性糖蛋白,含有 10-20% 的 N- 连接的碳水化合物,存在于猫的毛皮、唾液和泪腺中。它是由两个非共价连接的异二聚体形成的。每一个异二聚体由一个 70 个残基的肽 (称为“链 1”) 和一个 78、85、90 或 92 个残基的肽 (称为“链 2”) 组成,这两个肽由单独的基因编码 (参见, Duffort, O. A. 等 (1991) *Mol Immunol* 28, 301-309; Morgenstern, J. P. 等 (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9690-9694 和 Griffith, I. J. 等 (1992) *Gene* 113, 263-268)。

[0006] 当前对猫过敏患者的治疗是通过脱敏疗法,包括重复注射剂量逐渐提高的猫毛皮屑粗提物或由 Fel d1 衍生的短肽。Lilja 等人 and Hedlin 等人公开了一种脱敏程序,在此过程中给予猫过敏患者猫毛皮屑粗提物 (Lilja, Q, 等 (1989) *J Allergy Clin Immunol* 83, 37-44 和 Hedlin 等 (1991) *J Allergy Clin Immunol* 87, 955-964)。该程序至少需要两到三年,而患者在三年治疗后仍然具有全身症状。使用由 Fel d1 衍生的短肽进行脱敏在肽治疗组和安慰剂组之间没有获得显著性差异 (Oldfield, W. L. 等 (2002) *Lancet* 360, 47-53)。只在给予患者大量 (750 μ g) 短肽时才观察到效力 (Norman, P. S. 等 (1996) *Am J Respir Crit Care Med* 154, 1623-1628)。

[0007] 在猫毛皮屑粗提物治疗和短肽治疗中都曾经报道了变应性副作用,如延迟哮喘反应。因此,由于注射变应原引起的过敏性休克对于任何脱敏程序都是重要的安全性问题。然

而,通过减少变应原的注射量来避免这种效应也降低了治疗的效力或延长了治疗。因此,在猫变态反应治疗领域非常需要替代的脱敏方案,特别是能够减少变应性症状而不引发变应性副反应的脱敏方案。

发明内容

[0008] 现在,我们惊奇地发现,分别包含至少一种本发明的 Fe1 d1 抗原或其片段的本发明的组合物和疫苗不仅能够诱导针对 Fe1 d1 的免疫应答,特别是抗体应答,而且能够使患有猫变态反应的患者脱敏,从而特别是在短期内分别指示本发明的组合物和疫苗的高效力。另外,我们惊奇地发现,本发明的 Fe1 d1 当与本发明的 VLP 共价连接时,与未与 VLP 共价连接的本发明的 Fe1 d1 相比,具有显著降低的过敏活性,同时保持高度的抗原性和免疫原性。与现有技术的猫变态反应治疗相比,这是非常有利的,因为本发明的组合物和疫苗分别显著减少了在被免疫的动物和人中引起过敏性休克的风险。此外,本发明的组合物和疫苗分别允许给予抗原的剂量大大高于现有技术的猫变态反应治疗,这又可以提高效率 and / 或缩短整个脱敏程序。因此,本发明的组合物和疫苗分别诱导强抗 -Fe1 d1 免疫应答,但是不引发变态反应。

[0009] 因此,在第一方面,本发明提供一种组合物,其包含:(a) 具有至少一个第一附着位点的核心颗粒,其中所述核心颗粒是病毒样颗粒(VLP)或病毒颗粒;和(b) 具有至少一个第二附着位点的至少一种抗原,其中所述至少一种抗原是 Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1 片段,并且其中(a)和(b)通过所述至少一个第一附着位点和所述至少一个第二附着位点共价连接,优选形成有序且重复的抗原阵列。

[0010] 在另一个方面,本发明提供一种疫苗组合物。而且,本发明提供一种给对猫、优选对猫 Fe1 d1 过敏的人或非人哺乳动物如狗施用该疫苗组合物的方法。在一个优选实施方案中,疫苗组合物还含有至少一种佐剂。然而,本发明的疫苗组合物在不存在至少一种佐剂的情况下能够诱导强免疫应答,特别是抗体应答。因此,在一个优选实施方案中,该疫苗不含佐剂。避免使用佐剂可以减少可能发生的与使用佐剂有关的副作用。

[0011] 在一个优选实施方案中,组合物和疫苗组合物中包含的 VLP 分别在宿主中重组产生,并且该 VLP 基本不含宿主 RNA,优选不含宿主核酸。有利的是减少或者优选消除宿主的量,优选不含宿主核酸,以避免不希望的 T 细胞应答以及其它不希望的副作用,如发热。

[0012] 在一个优选实施方案中,本发明的组合物还含有至少一种免疫刺激物,优选至少一种免疫刺激性核酸。在一个进一步优选的实施方案中,免疫刺激性核酸包装在本发明的 VLP 内。使免疫刺激物、优选免疫刺激性核酸包含在本发明的组合物内可以使免疫应答转向 Th1 应答,由此抑制 Th2 应答,从而抑制 IgE 的产生。

[0013] 一方面,本发明提供一种治疗猫变态反应的方法,该方法包括给猫过敏者,优选人,分别施用本发明的组合物或疫苗。

[0014] 在另一方面,本发明提供包含本发明的组合物和可接受的药物载体的药物组合物。

[0015] 再另一方面,本发明提供一种制备本发明的组合物的方法,包括:(a) 提供具有至少一个第一附着位点的核心颗粒,其中所述核心颗粒是病毒样颗粒(VLP)或病毒颗粒;(b) 提供具有至少一个第二附着位点的至少一种抗原,其中所述抗原是 Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1

片段 ;和 (c) 将所述核心颗粒与所述至少一种抗原相组合,产生所述组合物,其中所述至少一种抗原和所述核心颗粒通过所述至少一个第一附着位点和所述至少一个第二附着位点连接。

[0016] 在一个方面,本发明提供一种 Fe1 d1 融合蛋白,其包含通过氨基酸间隔区融合的 Fe1 d1 的链 1 和 Fe1 d1 的链 2,所述间隔区连接一条链的 N 末端和另一条链的 C 末端,其中所述氨基酸间隔区由具有 10-30 个氨基酸残基的氨基酸序列组成,并且其中所述融合蛋白是在大肠杆菌中产生的,或者其中所述融合蛋白是未被糖基化的。

附图说明

[0017] 图 1 显示在 SDS-PAGE 非还原凝胶上考马斯蓝染色的纯化的和复性的 Fe1 d1 融合蛋白。泳道 1 中的样品含有 DTT 作为还原剂。泳道 2 中的样品不含 DTT。

[0018] 图 2 显示了单独的 Fe1 d1 融合蛋白或与 Q β 偶联的 Fe1 d1 融合蛋白引起的嗜碱性粒细胞的脱粒。X 轴代表相应的 Fe1 d1 蛋白的浓度。Y 轴代表已经脱粒的嗜碱性粒细胞的百分比。

[0019] 图 3 显示在第 0、7、14 天接受 Q β -FELD1 的猫过敏志愿者的皮肤穿刺试验结果,该试验也在第 0、14、21 天进行。

[0020] 图 4A 显示在第 0、7、14 天接受 Q β -FELD1 的猫过敏志愿者的鼻剂量增加得分和鼻总得分 (图 4B),该试验也在第 0、14、21 天进行。

[0021] 发明详述

[0022] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科技术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的含义。

[0023] 佐剂:本文使用的术语“佐剂”是指免疫应答的非特异性刺激物,或可以在宿主中产生储库 (depot) 的物质,当分别与本发明的疫苗和药物组合物组合时可以产生更强的免疫应答。有多种佐剂可以使用。例子包括弗氏完全和不完全佐剂、氢氧化铝和修饰的胞壁酰二肽。其它佐剂包括无机矿物凝胶如氢氧化铝,表面活性物质如溶血卵磷脂、复合多元醇、聚阴离子、肽、油状乳剂、匙孔蛾血蓝蛋白、二硝基酚,以及潜在的可用于人的佐剂如 BCG (卡介苗) 和短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。这些佐剂在本领域中公知。能够与本发明的组合物一起施用的其它佐剂包括但不限于:单磷酸脂质免疫调节剂、AdjuVax 100a、QS-21、QS-18、CRL1005、铝盐 (明矾)、MF-59、OM-174、OM-197、OM-294 和病毒体佐剂技术。佐剂也可包括这些物质的混合物。VLP 通常被描述为佐剂。然而,在本申请中使用的术语“佐剂”是指这样一种佐剂,它不是用于本发明组合物的 VLP,而是除所述 VLP 以外的佐剂。

[0024] 抗原:本文所用的术语“抗原”指如果被 MHC 分子呈递,则能够被抗体或 T 细胞受体 (TCR) 结合的分子。本文所用的术语“抗原”也包括 T 细胞表位。抗原还能够被免疫系统识别,以及 / 或者能够诱导体液免疫应答和 / 或细胞免疫应答,导致 B 和 / 或 T 淋巴细胞的活化。然而,至少在某些情况下,这可能需要抗原含有 Th 细胞表位或者连接于 Th 细胞表位上,并且包含于佐剂中。一个抗原可能包含一个或多个表位 (B 和 T 表位)。上面提到的特异性反应表示抗原优选地一般以高选择性方式与其相应的抗体或 TCR 反应,而不与可能由其它抗原诱导的其它许多抗体或 TCR 反应。本文所用的抗原也可以是几种不同抗原的

混合物。

[0025] 抗原性位点：术语“抗原性位点”和术语“抗原性表位”在本文中可以互换使用，是指多肽的连续或不连续的部分，它可以被抗体或在 MHC 分子环境内被 T 细胞受体免疫特异性地结合。免疫特异性结合不包括非特异性结合，但是不一定排除交叉反应性。抗原性位点在对于该抗原性位点而言独特的空间构象中一般包含 5-10 个氨基酸。

[0026] 联接的 (associated)：本文所用的术语“联接的”（或其名词：联接）是指所有可能的方式，优选化学相互作用，通过这种方式，两个分子联接在一起。化学相互作用包括共价和非共价的相互作用。非共价相互作用的典型例子是离子相互作用、疏水相互作用或氢键，而共价相互作用例如基于共价键如酯、醚、磷酸、酰胺、肽、碳-磷键、碳-硫键如硫醚或酰亚胺键。

[0027] 第一附着位点：本文所用的短语“第一附着位点”是指 VLP 中天然存在的或者人工添加到 VLP 中的一种元件，第二附着位点可与之连接。第一附着位点可以是蛋白质、多肽、氨基酸、肽、糖、多核苷酸、天然或合成的聚合物、次级代谢物或化合物（生物素、荧光素、视黄醇、洋地黄毒苷、金属离子、苯甲基磺酰氟）、或化学反应基如氨基、羧基、巯基、羟基、胍基、组氨酰基或其组合。作为第一附着位点的化学反应基的一个优选的实施方案是氨基酸如赖氨酸的氨基。第一附着位点一般位于 VLP 的表面上，优选位于 VLP 的外表面上。多个第一附着位点一般以重复构型存在于病毒样颗粒的表面上，优选外表面上。在一个优选的实施方案中，第一附着位点与 VLP 通过至少一个共价键，优选通过至少一个肽键联接。在一个进一步优选的实施方案中，第一附着位点自然存在于 VLP 中。可替代地，在一个优选的实施方案中，第一附着位点被人工添加到 VLP 上。

[0028] 第二附着位点：本文使用的短语“第二附着位点”是指天然存在于或者人工添加到本发明的 Fe1 d1 上的一种元件，第一附着位点 可以与之连接。本发明的 Fe1 d1 的第二附着位点可以是蛋白质、多肽、肽、氨基酸、糖、多核苷酸、天然或合成的聚合物、次级代谢物或化合物（生物素、荧光素、视黄醇、洋地黄毒苷、金属离子、苯甲基磺酰氟）、或化学反应基例如氨基、羧基、巯基、羟基、胍基、组氨酰基、或其组合。作为第二附着位点的化学反应基的一个优选的实施方案是巯基，优选氨基酸半胱氨酸的巯基。因此术语“具有至少一个第二附着位点的本发明的 Fe1 d1”是指包含本发明的 Fe1 d1 和至少一个第二附着位点的构建体。但是，特别是对于非天然存在于本发明的 Fe1 d1 内的第二附着位点来说，这种构建体典型且优选地还含有“连接体”。在另一个优选的实施方案，第二附着位点与本发明的 Fe1 d1 通过至少一个共价键，优选通过至少一个肽键联接。在另一个实施方案中，第二附着位点自然存在于本发明的 Fe1d1 内。在另外一个优选的实施方案中，通过连接体将第二附着位点人工添加到本发明的 Fe1 d1 上，其中该连接体包含半胱氨酸或者由半胱氨酸组成。优选地，连接体与本发明的 Fe1 d1 通过肽键融合。

[0029] 外壳蛋白：本申请中的术语“外壳蛋白”和可互换使用的术语“衣壳蛋白”是指能够掺入病毒衣壳或 VLP 内的病毒蛋白质，优选病毒（优选 RNA 噬菌体）的天然衣壳的亚单位。

[0030] 本发明的 Fe1 d1：本文使用的术语“本发明的 Fe1 d1”是指至少一种 Fe1 d1 蛋白或至少一种 Fe1 d1 片段。

[0031] Fe1 d1 的链 1：本文使用的术语“Fe1 d1 的链 1”是指包含 SEQ IDNO:22 的氨基酸

序列或其同源序列或由该序列组成的多肽。本文使用的术语“SEQ ID NO:22 的同源序列”是指与 SEQ ID NO:22 具有大于 70%，优选大于 80%，更优选大于 90%，更优选大于 95% 的同一性的多肽。本文所用的术语“Fe1 d1 的链 1”应当还包括含有至少一个翻译后修饰的多肽，这种修饰包括但不限于本文定义的 Fe1 d1 的链 1 的至少一个糖基化。优选地，本文定义的 Fe1 d1 的链 1 由总共最多 130 个、更优选最多 100 个氨基酸组成。

[0032] Fe1 d1 的链 2：本文使用的术语“Fe1 d1 的链 2”是指包含 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列或其同源序列或由该序列组成的多肽。本文使用的术语“SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:26 的同源序列”是指与 SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:26 具有大于 70%，优选大于 80%，更优选大于 90%，更优选大于 95% 的同一性的多肽。本文所用的术语“Fe1 d1 的链 2”应当还包括含有至少一个翻译后修饰的多肽，这种修饰包括但不限于本文定义的 Fe1 d1 的链 2 的至少一个糖基化。优选地，本文定义的 Fe1 d1 的链 2 由总共最多 150 个、更优选最多 130 个、更优选最多 100 个氨基酸组成。

[0033] Fe1 d1 蛋白：本文使用的术语“Fe1 d1 蛋白”是指包含 Fe1 d1 的链 1 和 Fe1 d1 的链 2 或者由其组成的蛋白质。优选地，Fe1 d1 的链 1 和 Fe1 d1 的链 2 共价连接。在一个优选实施方案中，Fe1 d1 的链 1 和 Fe1 d1 的链 2 通过至少一个二硫键连接。在另一个优选实施方案中，链 1 和链 2 直接融合或者通过间隔区融合，在后一种情况下，所述 Fe1 d1 蛋白还包含或者由间隔区组成。优选地，本文定义的 Fe1 d1 蛋白由总共最多 300 个、更优选最多 200 个氨基酸组成。典型且优选地，本发明的 Fe1 d1 蛋白能够在体内诱导产生与天然存在的 Fe1 d1 或与按照本发明实施例 5 制备的重组 Fe1 d1 特异性结合的抗体。

[0034] Fe1 d1 片段：本文使用的术语“Fe1 d1 片段”是指包含或者由 Fe1 d1 的至少一个抗原性位点组成的多肽。典型且优选地，本文使用的术语“Fe1 d1 片段”是指包含或者由 Fe1 d1 的至少两个抗原性位点组成的多肽。优选地，这些抗原性位点共价连接，进一步优选地，这些抗原性位点通过至少一个肽键连接，在这种情况下，在抗原性位点之间可能需要间隔区。优选地，该至少两个抗原性位点来源于 Fe1 d1 的链 1 和 Fe1 d1 的链 2 两者。优选地，本文定义的 Fe1 d1 片段由总共最多 130 个、更优选最多 100 个、再更优选 60 个氨基酸组成。典型且优选地，Fe1 d1 片段能够在体内诱导产生与天然存在的 Fe1 d1 或与按照本发明实施例 5 制备的重组 Fe1 d1 特异性结合的抗体。

[0035] 连接的：本文所用的术语“连接的”（或其名词：连接）是指所有可能的方式，优选化学相互作用，通过这种方式，至少一个第一附着位点和至少一个第二附着位点连接在一起。化学相互作用包括共价和非共价的相互作用。非共价相互作用的典型例子是离子相互作用、疏水相互作用或氢键，而共价相互作用例如基于共价键如酯、醚、磷酸酯、酰胺、肽、碳-磷键、碳-硫键如硫醚或酰亚胺键。在某些优选实施方案中，第一附着位点和第二附着位点通过至少一个共价键连接，优选通过至少一个非肽键连接，更优选只通过非肽键连接。然而，本文所用的术语“连接”应当不仅包括至少一个第一附着位点和至少一个第二附着位点的直接连接，而且可替代地并且优选地，包括至少一个第一附着位点和至少一个第二附着位点通过中间分子的间接连接，典型且优选地通过使用至少一个，优选一个异双功能交联剂连接。

[0036] 连接体：本文所用的“连接体”将第二附着位点与本发明的 Fe1 d1 联接，或者已经

包含第二附着位点、基本由、或者由第二附着位点组成。优选地,本文所用的“连接体”已经包含第二附着位点,典型且优选地 – 但不是必需地 – 为一个氨基酸残基,优选半胱氨酸残基。本文所用的“连接体”也被称为“氨基酸连接体”,特别是当本发明的连接体含有至少一个氨基酸残基时。因此,术语“连接体”和“氨基酸连接体”在本文中可以交换使用。然而,这并不意味着这种连接体仅由氨基酸残基组成,即使由氨基酸残基组成的连接体是本发明的优选的实施方案。连接体的氨基酸残基优选由本领域已知的天然氨基酸或非天然氨基酸、其全 L 型或全 D 型或混合物组成。本发明的连接体的进一步优选的实施方案是包含巯基或半胱氨酸残基的分子,这些分子因此也包括在本发明中。可用于本发明的其他连接体有包含 C1-C6 烷基 –、环烷基如环戊基或环己基、环烯基、芳基或杂芳基部分的分子。而且,优选包含 C1-C6 烷基 –、环烷基 – (C5, C6)、芳基 – 或杂芳基 – 部分和另外的氨基酸的连接体也可以用作本发明的连接体,并且包括在本发明的范围内。连接体与本发明的 Fe1 d1 优选通过至少一个共价键,更优选通过至少一个肽键联接。

[0037] 有序且重复的抗原阵列:本文所用的术语“有序且重复的抗原阵列”通常是指抗原的重复模式,或者其特征在于抗原相对于病毒样颗粒的空间排列具有典型且优选地高度的均一性。在本发明的一个实施方案中,这种重复模式可以是几何模式。本发明的某些实施方案,例如与 RNA 噬菌体的 VLP 偶联的抗原,是合适的有序且重复的抗原阵列的典型且优选的实例,其具有严格重复的类晶体抗原排列,优选间隔 1-30 纳米,优选 2-15 纳米,更优选 2-10 纳米,更优选 2-8 纳米,进一步更优选 1.6-7 纳米。

[0038] 包装的:本文所用的术语“包装的”是指聚阴离子大分子或免疫刺激物相对于 VLP 的状态。本文所用的术语“包装”包括结合,该结合可以是共价的,例如化学偶联,也可以是非共价的,例如离子相互作用、疏水相互作用、氢键等。该术语也包括聚阴离子大分子的包封或部分包封。因此,聚阴离子大分子或免疫刺激物可以被 VLP 包封,而不需存在实际上的结合,特别是共价结合。在优选的实施方案中,至少一个聚阴离子大分子或免疫刺激物被包装在 VLP 内,最优选地以非共价的方式包装。

[0039] 间隔区:术语“间隔区”以及其等同使用的术语“氨基酸间隔区”是指一段氨基酸序列,它不超过 30 个氨基酸,并且连接 Fe1 d1 的一条链的 N 末端与另一条链的 C 末端。

[0040] 病毒颗粒:本文使用的术语“病毒颗粒”是指病毒的形态学形式。在某些病毒类型中,它包含由蛋白质衣壳围绕的基因组;另外一些具有另外的结构(例如被膜、尾等)。

[0041] 本文使用的病毒样颗粒(VLP)是指非复制性或非传染性的,优选非复制性且非传染性的病毒颗粒,或者是指非复制性或非传染性的,优选非复制性且非传染性的类似于病毒颗粒优选病毒衣壳的结构。本文使用的术语“非复制性”是指不能复制 VLP 所含的基因组。本文使用的术语“非传染性”是指不能进入宿主细胞。优选地,本发明的病毒样颗粒是非复制性和/或非传染性的,因为它缺乏全部或部分的病毒基因组或基因组功能。在一个实施方案中,病毒样颗粒是其中病毒基因组已经被物理或化学灭活的病毒颗粒。典型且更优选地,病毒样颗粒缺少病毒基因组的全部或部分复制性和传染性部分。本发明的病毒样颗粒可能含有与其基因组不同的核酸。本发明的病毒样颗粒的一个典型且优选的实施方案是病毒衣壳,如相应病毒、噬菌体,优选 RNA 噬菌体的病毒衣壳。术语“病毒衣壳”或“衣壳”是指由病毒蛋白质亚单位组成的大分子装配体。典型地,有 60、120、180、240、300、360 个和 360 个以上的病毒蛋白亚单位。典型且优选地,这些亚单位的相互作用导致形成具有固有的

重复组织的病毒衣壳或病毒衣壳样结构,其中所述结构一般是球形或管状。例如,RNA-噬菌体或 HBcAg 的衣壳具有二十面体对称的球形结构。本文使用的术语“衣壳样结构”是指类似于以上定义的衣壳形态、但是不同于典型的对称装配体、而同时保持充分的有序性和重复性程度的由病毒蛋白质亚单位组成的大分子装配体。

[0042] 病毒颗粒和病毒样颗粒的一个共同特征是其高度有序且重复的亚单位排列。

[0043] RNA 噬菌体的病毒样颗粒:本文使用的术语“RNA 噬菌体的病毒样颗粒”是指包含 RNA 噬菌体的外壳蛋白、其突变体或片段或者优选基本由其组成或者由其组成的病毒样颗粒。另外,RNA 噬菌体的病毒样颗粒类似于 RNA 噬菌体的结构,并且是非复制性或非传染性的,并且至少缺少编码 RNA 噬菌体的复制机制的基因,一般也缺少编码负责病毒附着或进入宿主的蛋白质的基因。然而,该定义应当也包括上述基因仍然存在但是无活性的 RNA 噬菌体的病毒样颗粒,这样也可产生非复制性和/或非传染性的 RNA 噬菌体的病毒样颗粒。来源于 RNA-噬菌体的优选的 VLP 显示二十面体对称,并且由 180 个亚单位组成。在本申请的公开内容中,术语“亚单位”和“单体”在上下文中可互换并且等同地使用。使 RNA 噬菌体的病毒样颗粒成为非复制性和/或非传染性的优选方法是通过物理、化学灭活,如紫外线照射、甲醛处理,典型且优选地通过遗传操作。

[0044] 一种或一个:术语“一种”或“一个”在本申请中使用,除非另外说明,是指“至少一种(个)”或“一种(个)或一种(个)以上”。

[0045] 多肽的氨基酸序列同一性可以使用诸如 Bestfit 程序等已知计算机程序常规确定。当使用 Bestfit 或其它任何序列比对程序,优选使用 Bestfit 来确定一种特定序列与参照氨基酸序列是否例如 95%相同时,将参数设置为使得在参照氨基酸序列的全长上计算同一性百分比,并且允许最多占参照序列中氨基酸残基总数的 5%的同源性缺口。上述测定多肽之间百分同一性的方法适用于本发明公开的所有蛋白质、多肽或其片段。

[0046] 在本申请中,如果抗体与抗原结合的结合亲和力(K_a)为 $10^6 M^{-1}$ 或更高,优选 $10^7 M^{-1}$ 或更高,更优选 $10^8 M^{-1}$ 或更高,最优选 $10^9 M^{-1}$ 或更高,则该抗体被定义为特异性结合。本领域技术人员可以容易地测定抗体的亲和力(例如通过 Scatchard 分析)。

[0047] 本发明提供本发明的组合物,其包含:(a)具有至少一个第一附着位点的核心颗粒,其中所述核心颗粒是病毒样颗粒(VLP)或病毒颗粒;和(b)具有至少一个第二附着位点的至少一种抗原,其中所述至少一种抗原是 Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1 片段,并且其中(a)和(b)通过所述至少一个第一附着位点和所述至少一个第二附着位点共价连接。优选地,Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1 片段与核心颗粒连接,从而形成有序且重复的抗原-VLP 阵列。在本发明的优选实施方案中,至少 20 个,优选至少 30 个,更优选至少 60 个,更优选至少 120 个,进一步更优选至少 180 个 Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1 片段与核心颗粒连接。

[0048] 可以选择本领域公知的任何具有有序且重复的结构病毒作为本发明的 VLP 或病毒颗粒。其外壳或衣壳蛋白能够用于制备 VLP 的示例性的 DNA 或 RNA 病毒已经在 WO 2004/009124 的第 25 页第 10-21 行,第 26 页第 11-28 行,和第 28 页第 4 行到第 31 页第 4 行公开。这些公开的内容在此引入作为参考。

[0049] 病毒或病毒样颗粒可以从病毒感染的细胞培养物中产生和纯化。获得的用于疫苗目的的病毒或病毒样颗粒优选地应当是无复制性或非感染性的,更优选无复制性且无感染性的。紫外线照射、化学处理,例如用甲醛或氯仿处理,是本领域技术人员已知用来灭活病

毒的常用方法。

[0050] 在一个优选实施方案中,核心颗粒是病毒颗粒,并且其中优选地所述病毒颗粒是噬菌体的病毒颗粒,并且其中进一步优选地所述噬菌体是 RNA 噬菌体,其中更进一步优选地所述 RNA 噬菌体是选自 Q β 、fr、GA 或 AP205 的 RNA 噬菌体。

[0051] 在一个优选实施方案中,核心颗粒是 VLP。在一个进一步优选的实施方案中,VLP 是一种重组 VLP。几乎所有公知的病毒都已经被测序,并且可以容易被公众获得。本领域技术人员可以容易地确定编码外壳蛋白的基因。通过在宿主中重组表达外壳蛋白来制备 VLP 是本领域技术人员公知的常识。

[0052] 在一个优选实施方案中,病毒样颗粒包含或者由选自下组的病毒的重组蛋白、其突变体或片段组成:a)RNA 噬菌体;b)噬菌体(bacteriophages);c)乙型肝炎病毒,优选其衣壳蛋白(Ulrich 等人,Virus Res. 50:141-182(1998))或其表面蛋白(WO 92/11291);d)麻疹病毒(Warnes 等人,Gene 160:173-178(1995));e)辛德毕斯病毒;f)轮状病毒(US 5,071,651 和 US 5,374,426);g)口蹄疫病毒(Twomey 等人,Vaccine 13:1603-1610,(1995));h)诺沃克病毒(Jiang,X. 等人,Science 250:1580-1583(1990);Matsui,S.M. 等人,J. Clin. Invest. 87:1456-1461(1991));i)甲病毒;j)逆转录病毒,优选其 GAG 蛋白(WO 96/30523);k)逆转录转座子 Ty,优选蛋白 p1;l)人乳头瘤病毒(WO 98/15631);m)多瘤病毒;n)烟草花叶病毒;和 o)禽兽棚病毒。

[0053] 在一个优选实施方案中,VLP 包含或者由重组蛋白、其突变体或片段的一种以上的氨基酸序列,优选两种氨基酸序列组成。包含或者由一种以上的氨基酸序列组成的 VLP 在本申请中被称为嵌合 VLP。

[0054] 本文使用的术语“重组蛋白的片段”或术语“外壳蛋白的片段”被定义为分别为野生型重组蛋白或外壳蛋白长度的至少 70%,优选至少 80%,更优选至少 90%,更优选至少 95%,并且优选保留形成 VLP 的能力的多肽。优选地,该片段通过至少一个内部缺失、至少一个截短或至少一个它们的组合而获得。术语“重组蛋白的片段”或术语“外壳蛋白的片段”还包括与以上定义的“重组蛋白的片段”或“外壳蛋白的片段”分别具有至少 80%,优选 90%,更优选 95%的氨基酸序列同一性并且优选能够装配为病毒样颗粒的多肽。

[0055] 在本发明中可以交换使用的术语“突变重组蛋白”或术语“重组蛋白突变体”,或者在本发明中可以交换使用的术语“突变外壳蛋白”或术语“外壳蛋白突变体”,分别是指具有来源于野生型重组蛋白或外壳蛋白的氨基酸序列的多肽,其中该氨基酸序列与野生型序列至少 80%,优选至少 85%、90%、95%、97%或 99%相同,并且优选地保留装配为 VLP 的能力。

[0056] 在一个优选实施方案中,本发明的病毒样颗粒是乙型肝炎病毒的病毒样颗粒。乙型肝炎病毒样颗粒的制备已经在 WO 00/32227、WO 01/85208 和 WO 02/056905 中公开,所有这三篇文献在这里都引用以作参考。适合在本发明的实施中使用的 HBcAg 的其他变体在 WO02/056905 的第 34-39 页已经公开。

[0057] 在本发明的一个进一步优选的实施方案中,将赖氨酸残基导入 HBcAg 多肽中,来介导本发明的 Fe1 d1 与 HBcAg 的 VLP 的连接。在优选的实施方案中,利用包含 SEQ ID NO:20 的氨基酸 1-144、或 1-149、1-185 或者由该序列组成的 HBcAg 制备本发明的 VLP 和组合物,其中该氨基酸序列被修饰使得第 79 和 80 位的氨基酸被替代为具有 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly

氨基酸序列的肽。这个修饰将 SEQ ID NO:20 改变为 SEQ ID NO:21。在进一步优选的实施方案中,SEQ ID NO:21 或其相应片段(优选 1-144 或 1-149)的第 48 和 110 位的半胱氨酸残基被突变为丝氨酸。本发明进一步包括包含具有上述相应氨基酸改变的乙型肝炎核心蛋白突变体的组合物。本发明进一步包括分别包含 HBcAg 多肽的组合物和疫苗,该 HBcAg 多肽包含与 SEQ ID NO:21 至少 80%、85%、90%、95%、97% 或 99% 相同的氨基酸序列或者由该序列组成。

[0058] 在本发明的一个优选实施方案中,本发明的病毒样颗粒包含、或者基本由、或者由 RNA 噬菌体的重组外壳蛋白、其突变体或片段组成。优选地,该 RNA 噬菌体选自:a) 噬菌体 Q β ;b) 噬菌体 R17;c) 噬菌体 fr;d) 噬菌体 GA;e) 噬菌体 SP;f) 噬菌体 MS2;g) 噬菌体 M11;h) 噬菌体 MX1;i) 噬菌体 NL95;k) 噬菌体 f2;l) 噬菌体 PP7 和 m) 噬菌体 AP205。

[0059] 在本发明的一个优选实施方案中,所述组合物包含 RNA 噬菌体的外壳蛋白、其突变体或片段,其中该外壳蛋白具有选自以下序列的氨基酸序列:(a) SEQ ID NO:1;涉及 Q β CP;(b) SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的混合物(涉及 Q β A1 蛋白);(c) SEQ ID NO:3;(d) SEQ ID NO:4;(e) SEQ ID NO:5;(f) SEQ ID NO:6;(g) SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的混合物;(h) SEQ ID NO:8;(i) SEQ ID NO:9;(j) SEQ ID NO:10;(k) SEQ ID NO:11;(l) SEQ ID NO:12;(m) SEQ ID NO:13;和(n) SEQ ID NO:14。

[0060] 在本发明的一个优选实施方案中,VLP 是嵌合 VLP,包含 RNA 噬菌体的外壳蛋白、其突变体或片段的一种以上的氨基酸序列,优选两种氨基酸序列,或者由该氨基酸序列组成。

[0061] 在一个非常优选的实施方案中,VLP 包含或者由 RNA 噬菌体的两种不同的外壳蛋白组成,所述两种外壳蛋白具有 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2,或 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列。

[0062] 在本发明的优选实施方案中,本发明的病毒样颗粒包含或者基本由或者由 RNA 噬菌体 Q β 、fr、AP205 或 GA 的重组外壳蛋白、其突变体或片段组成。在一个优选的实施方案中,VLP 是 RNA 噬菌体的 VLP,优选 RNA 噬菌体 Q β 、fr、AP205 或 GA 的 VLP。

[0063] 在一个优选实施方案中,本发明的 VLP 是 RNA 噬菌体 Q β 的 VLP。Q β 的衣壳或病毒样颗粒显示为二十面体噬菌体样衣壳结构,直径为 25nm,T = 3 半对称。该衣壳含有 180 个拷贝的外壳蛋白,它们通过二硫键连接为共价五聚体和六聚体(GolmohammadiR. 等人,Structure4:543-555(1996)),使 Q β 衣壳具有显著的稳定性。然而,由重组 Q β 外壳蛋白构成的衣壳或 VLP 可能含有不通过二硫键与衣壳内的其它亚单位连接的或不完全连接的亚单位。我们惊奇地发现,高达 30% 的 DMSO 和乙腈浓度和高达 1M 的胍盐浓度不影响衣壳的稳定性。Q β 的衣壳或 VLP 的高稳定性是一个有利的特征,特别是对于根据本发明免疫和接种哺乳动物和人的用途而言。

[0064] 根据本发明进一步优选的 RNA 噬菌体、特别是 Q β 和 fr 的病毒样颗粒,已经在 WO 02/056905 中公开,其公开内容在此引用作为参考。特别地,WO 02/056905 的实施例 18 给出了由 Q β 制备 VLP 颗粒的详细描述。

[0065] 在另一个优选实施方案中,本发明的 VLP 是 RNA 噬菌体 AP205 的 VLP。在本发明的实践中也可以使用 AP205 VLP 的能够装配的突变形式,包括氨基酸 5 位的脯氨酸被置换为苏氨酸的 AP205 外壳蛋白,导致本发明的其他优选的实施方案。WO 2004/007538,特别是在实施例 1 和实施例 2 中,描述了如何获得包含 AP205 外壳蛋白的 VLP,以及特别是其表达

和纯化。WO2004/007538 在此引入作为参考。AP205VLP 具有高度免疫原性,可以与本发明的 Fe1 d1 连接,典型且优选地产生展示以重复方式定向的本发明的 Fe1 d1 的疫苗构建体。产生了针对这样展示的本发明的 Fe1 d1 的高抗体效价,这表明连接的本发明的 Fe1 d1 容易与抗体分子相互作用,并且具有免疫原性。

[0066] 在本发明的一个优选的实施方案中,本发明的 VLP 包含或者由病毒、优选 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白组成,其中通过置换和 / 或通过删除而除去至少一个赖氨酸残基,从而修饰了该突变外壳蛋白。在另一个优选实施方案中,本发明的 VLP 包含或者由病毒、优选 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白组成,其中通过置换和 / 或通过插入而添加至少一个赖氨酸残基,从而修饰了该突变外壳蛋白。至少一个赖氨酸残基的删除、置换或添加可以改变偶联程度,即病毒、优选 RNA 噬菌体的每个 VLP 亚单位上本发明的 Fe1 d1 的量,特别是,用来满足和适应疫苗的要求。

[0067] 在一个优选的实施方案中,本发明的组合物和疫苗具有 0.5 到 4.0 的抗原密度。本文所用的术语“抗原密度”是指 VLP、优选 RNA 噬菌体的 VLP 的每个亚单位上、优选每个外壳蛋白上连接的本发明的 Fe1 d1 的平均数。因此,该值可以计算为在本发明的组合物或疫苗中 VLP、优选 RNA 噬菌体的 VLP 的所有亚单位或单体上的平均数。

[0068] Q β 外壳蛋白的 VLP 或衣壳在其表面上展示数量确定的赖氨酸残基,具有 3 个赖氨酸残基指向衣壳内部并与 RNA 相互作用,而另外 4 个赖氨酸残基暴露于衣壳外部的确定的拓扑学。优选地,至少一个第一附着位点是指向或位于 VLP 外部的赖氨酸残基。

[0069] 其中暴露的赖氨酸残基被置换为精氨酸的 Q β 突变体可以用于本发明。因此,在本发明的另一个优选实施方案中,病毒样颗粒包含突变 Q β 外壳蛋白、基本由或由突变 Q β 外壳蛋白组成。优选地,这些突变外壳蛋白包含或者由选自下组的氨基酸序列组成:a) Q β -240(SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:1 的 Lys 13-Arg);b) Q β -243(SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:1 的 Asn10-Lys);c) Q β -250(SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:1 的 Lys 2-Arg);d) Q β -251(SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:1 的 Lys 16-Arg);和 e) Q β -259(SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:1 的 Lys 2-Arg, Lys 16-Arg)。上述 Q β 突变外壳蛋白、突变 Q β 外壳蛋白 VLP 和衣壳的构建、表达和纯化分别在 WO 02/056905 中描述。特别参考上述申请的实施例 18。

[0070] 在本发明的另一个优选实施方案中,病毒样颗粒包含或者基本由或者由 Q β 的突变外壳蛋白、或其突变体或片段和相应的 A1 蛋白组成。在一个进一步优选的实施方案中,病毒样颗粒包含或者基本由或者由具有氨基酸序列 SEQ ID NO:15、16、17、18 或 19 的突变外壳蛋白和相应的 A1 蛋白组成。

[0071] 其它一些 RNA 噬菌体外壳蛋白在细菌宿主中表达时也显示自装配 (Kastelein, RA. 等人, Gene 23:245-254(1983), Kozlovskaya, TM. 等人, Dokl. Akad. Nauk SSSR 287:452-455(1986), Adhin, MR. 等人, Virology 170:238-242(1989), Priano, C. 等人, J. Mol. Biol. 249:283-297(1995))。特别是已经公开了 GA(Ni, CZ, 等人, ProteinSci. 5:2485-2493(1996), Tars, K 等人, J. Mol. Biol. 271:759-773(1997)) 和 fr(Pushko P. 等人, Prot. Eng. 6:883-891(1993), Liljas, L 等人, J. Mol. Biol. 244:279-290, (1994)) 的生物学和生化性质。几种 RNA 噬菌体的晶体结构已经确定 (Golmohammadi, R. 等人, Structure 4:543-554(1996))。利用这些信息,能够确定表面暴露的残基,从而能够修饰 RNA 噬菌体的外壳蛋白,以便可以通过插入或置换方式插入一个或多个反应性氨基酸残基。来源于 RNA

噬菌体的 VLP 的另一个优点是它们在细菌中的高表达产率,这允许以可承受的成本产生大量的物质。

[0072] 在一个优选实施方案中,本发明的组合物包含至少一种抗原,其中所述至少一种抗原是 Fel d1 蛋白。

[0073] 在一个优选实施方案中,Fel d1 蛋白包含或者由天然存在的 Fel d1 组成。链 1 的一级结构是 SEQ ID NO 22 的序列。报道的链 1 的变体是 Lys 29-Arg 或 Asn、Val 33-Ser、Val 60-Leu。链 2 的一级结构是 SEQ ID NO 23、25 或 26 的序列。报道的链 2 的变体是 SEQ ID NO :23、25 或 26 的 Cys 7-Phe、Phe 15-Thr、Asn 19-Ser、Gly 20-Leu、Ile 55-Val、Arg 57-Lys、Val 58-Phe。链 2 的其他变体有 SEQ ID NO :25 的 Glu 69-Val、Tyr 70-Asp、Met 72-Thr、Gln-77-Glu 和 Asn 86-Lys;SEQ ID NO :23 的 Met 74-Thr、Gln79-Glu 和 Asn88-Lys(Griffith I. J. 等人, Gene113 :263-268(1992);Morgenstern J. P. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 :9690-9694(1991). Duffort O. A., 等人 Mol. Immunol. 28 :301-309(1991);Leitermann K., 等人, J. Allergy Clin. Immunol. 74 :147-153(1984);Kristensen, A. K, 等人. (1997) Biol Chem 378, 899-908)。天然存在的 Fel d1 通过从(例如)猫唾液、猫毛皮屑、猫所生活的房间的屋尘等中纯化获得。

[0074] 在一个优选实施方案中,本发明的 Fel d1 是重组 Fel d1 蛋白或重组 Fel d1 片段。本文使用的重组 Fel d1 蛋白或重组 Fel d1 片段是指通过包括重组 DNA 技术的至少一个步骤的方法获得的 Fel d1 蛋白或 Fel d1 片段。术语“重组 Fel d1 蛋白或重组 Fel d1 片段”和“重组产生的 Fel d1 蛋白或重组产生的 Fel d1 片段”在本文中可以互换使用,应当具有相同的含意。重组 Fel d1 蛋白或片段可以在原核表达系统例如大肠杆菌 (WO 2004/094639) 或真核表达系统如杆状病毒 (WO 00/20032) 中产生。Sepp 1 等人公开了在杆状病毒中通过双顺反子启动子同时表达 Fel d1 的链 1 和链 2 (J. Biol. Chem. Nov, 2004)。重组产生的 Fel d1 蛋白或片段可以是糖基化或非糖基化的,这取决于用来产生重组蛋白的宿主细胞。

[0075] 在一个实施方案中,重组 Fel d1 蛋白包含或者由 Fel d1 蛋白的链 1 和 Fel d1 蛋白的链 2 组成,其中所述 Fel d1 的链 1 和 Fel d1 的链 2 仅通过非共价键如疏水相互作用联接。

[0076] 在一个优选实施方案中,重组 Fel d1 蛋白包含或者由 Fel d1 的链 1 和 Fel d1 的链 2 组成,其中所述 Fel d1 的链 1 与 Fel d1 的链 2 通过至少一个共价键联接。在一个优选实施方案中,至少一个共价键是非肽键,其中所述非肽键是二硫键,或者其中优选地所述非肽键是二硫键。例如,Fel d1 的链 1 和 Fel d1 的链 2 可以分开表达,然后在允许正确形成二硫键的条件下组合在一起,例如通过改组 (reshuffling) 法。可替代地,Fel d1 的链 1 和 Fel d1 的链 2 可以在一个宿主中同时表达,例如通过将编码 Fel d1 的链 1 和 Fel d1 的链 2 的基因分别克隆到一个质粒中处于两个启动子之下。在真核表达系统中,Fel d1 的链 1 和 Fel d1 的链 2 可以转录为一个 mRNA,并且由内部核糖体进入位点 (IRES) 分开翻译。

[0077] 在一个优选实施方案中,Fel d1 蛋白包含或者由融合蛋白组成,其中所述融合蛋白包含 Fel d1 的链 1 和 Fel d1 的链 2。在一个优选实施方案中,所述 Fel d1 的链 1 和所述 Fel d1 的链 2 直接融合或者通过一个肽键融合,该肽键连接一条链的 N 末端和另一链的 C 末端。在另一个优选实施方案中,所述 Fel d1 的链 1 和所述 Fel d1 的链 2 通过间隔区融

合,该间隔区连接一条链的N末端和另一链的C末端。优选地所述间隔区具有1-30个、优选1-25个、优选1-20个、优选1-15个、优选1-9个、优选1-5个、优选1-3个氨基酸。可替代地,所述间隔区具有10-30个、优选10-25个、更优选10-20个、更优选13-20个、更优选15-20个、更优选13-17个、更优选15-17个氨基酸。优选地,所述间隔区由具有10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸残基的氨基酸序列组成。在一个优选实施方案中,所述间隔区具有15个氨基酸。在一个进一步优选的实施方案中,所述间隔区是(GGGGS)₃。

[0078] 在一个优选实施方案中,融合蛋白包含选自下组的氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:24;(b)SEQ ID NO:54;(c)SEQ ID NO:55;(d)SEQ ID NO:56;和(e)SEQ ID NO:57。

[0079] 在一个优选实施方案中,所述Fe1 d1的链2通过其C末端与所述Fe1 d1的链1的N末端直接融合或者通过间隔区融合。在一个进一步优选的实施方案中,所述Fe1 d1蛋白包含或者由SEQ ID NO:24的氨基酸序列组成。

[0080] WO 2004/094639公开了分子和生物学性质类似于天然对应物的重组折叠的Fe1 d1,并且具体公开了编码Fe1 d1链2的N末端与链1直接融合的融合体的合成基因。大肠杆菌表达产生非共价联接的同型二聚体,其表观分子量根据大小排阻层析确定为30kDa,每个19177Da的亚单位显示与在天然Fe1 d1中发现的相同的二硫键模式,并且天然和重组Fe1 d1具有相同的折叠。重组Fe1 d1与天然Fe1 d1类似地与来自猫过敏患者的血清的IgE反应。因此,该Fe1 d1融合蛋白模拟天然Fe1 d1的抗原性。

[0081] 在一个优选实施方案中,Fe1 d1的链1通过其C末端与Fe1 d1的链2的N末端直接融合或者通过间隔区融合。

[0082] 在一个优选实施方案中,Fe1 d1的链1包含SEQ ID NO:22的序列或其同源序列,或由该序列组成,其中所述同源序列与SEQ ID NO:22具有大于80%,优选大于90%,或更优选大于95%的同源性。

[0083] 在一个优选实施方案中,所述Fe1 d1的链2包含SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26的序列或其同源序列,或由该序列组成,其中所述同源序列与SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26具有大于80%,优选大于90%,更优选大于95%的同源性。

[0084] 在一个优选实施方案中,Fe1 d1蛋白是重组Fe1 d1蛋白,其中至少一个二硫键被破坏,优选通过突变、更优选通过保守性置换例如Cys置换为Ser而被破坏。在天然Fe1 d1中已经鉴定了连接两个肽的三个链间二硫键,即Cys 3(1)-Cys 73(2)、Cys 44(1)-Cys 70(2)和Cys 70(1)-Cys 7(2),提示Fe1 d1肽为反平行方向。(Kristensen, A.K., 等人.(1997)Biol Chem 378,899-908)。在一个优选实施方案中,Fe1 d1蛋白的一个这样的二硫键被破坏。在一个进一步优选的实施方案中,Fe1 d1蛋白的两个这样的二硫键被破坏。在一个进一步优选的实施方案中,Fe1 d1蛋白的所有三个这样的二硫键都被破坏。在一个优选实施方案中,链1的Cys 70被删除或突变。在另一个优选实施方案中,该链的Cys 73被删除或突变。在一个优选实施方案中,所述Fe1 d1蛋白是包含直接融合或通过间隔区融合的Fe1 d1蛋白的链1和Fe1 d1蛋白的链2的融合蛋白,其中所有三个这样的二硫键都被破坏。在一个进一步优选的实施方案中,所述Fe1 d1蛋白包含或者由SEQ ID NO:24、55或57的氨基酸序列组成,其中至少一个、优选至少三个、更优选至少五个半胱氨酸通过置换或删除而被除去。

[0085] 在一个优选实施方案中,本发明的抗原包含或者由 Fe1 d1 片段组成。众所周知,具有免疫原性通常不需要全长蛋白质,一个蛋白质通常含有一个以上的抗原性表位,即抗原性位点。一个片段或短肽可能足以含有至少一个可被抗体或 MHC 分子环境内的 T 细胞受体免疫特异性结合的抗原性位点。抗原性位点可以通过本领域技术人员公知的大量技术来确定。可以通过序列比对和结构预测来进行。例如,人们可以使用诸如 Rasmo1 的程序预测可能的 α -螺旋、转角、链间和链内二硫键等。人们可以进一步预测埋藏在分子内的序列或暴露于分子表面的序列。暴露于分子表面的序列更可能含有天然抗原性位点,因此在诱导治疗性抗体中 useful。在确定表面肽序列后,例如,通过饱和诱变法(如丙氨酸扫描诱变, Cunningham BC, Wells JA. Science 1989 Jun 2 ;244(4908) :1081-5),可以进一步确定该序列内的抗原性位点。简要地说,将该序列内的氨基酸一个一个地突变为丙氨酸,其丙氨酸突变分别显示与抗体(抗野生型序列)的结合降低或总体丧失结合的氨基酸可能是抗原性位点的成分。测定抗原性位点的另一种方法是产生覆盖 Fe1 d1 全长序列的重叠的肽(Geysen, PNAS Vol 81 :3998-4002, (1984) 和 Sliotstra, J. W. 等人, (1996) Mol. Divers. 1, 87-96)。

[0086] 在一个优选实施方案中,本发明的抗原包含或者由至少一个、优选至少两个 Fe1 d1 表位、进一步优选至少一个来源于 Fe1 d1 的链 1 的表位和至少一个来源于 Fe1 d1 的链 2 的表位组成。

[0087] Fe1 d1 的 T 细胞反应性表位已经在整个 Fe1 d1 蛋白上作图,并且已经在现有技术中公开,如 US 6120769, 第 14 栏第 4 段, US6025162 的第 130 和 131 栏,这些公开内容引入本文作为参考。在一个优选实施方案中,Fe1 d1 的 T 细胞表位选自 SEQ ID NO :27-32。

[0088] 本发明提供一种制备本发明组合物的方法,包括:(a) 提供具有至少一个附着位点的 VLP ;(b) 提供具有至少一个第二附着位点的至少一种抗原,其中所述抗原是 Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1 片段 ;和 (c) 将所述 VLP 和所述至少一种抗原相组合,产生所述组合物,其中所述至少一种抗原和所述 VLP 通过所述第一附着位点和所述第二附着位点连接。在一个优选的实施方案中,提供具有至少一个第二附着位点的至少一种抗原,即 Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1 片段,是通过表达而实现的,优选通过在细菌系统、优选在大肠杆菌中表达。为了有利于纯化过程,通常添加标签,如 His 标签、Myc 标签。在另一种方法中,特别可以化学合成具有不长于 50 个氨基酸的 Fe1 d1 片段。

[0089] 在本发明的一个优选实施方案中,具有至少一个第一附着位点的 VLP 与具有至少一个第二附着位点的本发明的 Fe1 d1 通过至少一个肽键连接。编码本发明的 Fe1 d1、优选 Fe1 d1 片段、更优选不长于 50 个氨基酸,更优选不到 30 个氨基酸的片段的基因,符合读框地连接到编码 VLP 外壳蛋白的基因的内部或优选 N 末端或 C 末端。本发明的抗原用于病毒的外壳蛋白、其突变体或片段的实施方案已经在 W02004/009124 的第 62 页第 20 行至第 68 页第 17 行公开,在此引入作为参考。

[0090] 在一个优选实施方案中,Fe1 d1 片段与 RNA 噬菌体 AP205 的外壳蛋白、其突变体或片段的 N 末端或 C 末端融合。在一个进一步优选的实施方案中,所述融合蛋白还包括间隔区,其中所述间隔区与 AP205 的外壳蛋白、其片段或突变体和本发明的 Fe1 d1 融合。

[0091] 在本发明的一个优选实施方案中,组合物包含或基本由通过至少一个共价键连接的具有至少一个第一附着位点的病毒样颗粒和具有至少一个第二附着位点的至少一个本

发明的 Fe1 d1 组成,优选地该共价键是非肽键。在本发明的一个优选实施方案中,第一附着位点包含或优选地是氨基,优选赖氨酸残基的氨基。在本发明的另一个优选的实施方案中,第二附着位点包含或优选地是巯基,优选半胱氨酸的巯基。

[0092] 在本发明的一个非常优选的实施方案中,至少一个第一附着位点是氨基,优选赖氨酸的氨基,并且至少一个第二附着位点是巯基,优选半胱氨酸的巯基。

[0093] 在本发明的一个优选实施方案中,通过化学交联,典型且优选地通过使用异双功能交联剂,将本发明的 Fe1 d1 与 VLP 连接。在优选的实施方案中,所述异双功能交联剂含有能够与 VLP 的优选的第一附着位点、优选氨基、更优选赖氨酸残基的氨基反应的一个官能团,和能够与本发明的 Fe1 d1 上固有的或人工添加的优选的第二附着位点、即巯基、优选半胱氨酸残基的巯基反应的另一个官能团,任选地该另一个官能团也可通过还原用于反应。有几种异双功能交联剂在本领域公知。包括优选的交联剂 SMPH(Pierce)、Sulfo-MBS、Sulfo-EMCS、Sulfo-GMBS、Sulfo-SIAB、Sulfo-SMPB、Sulfo-SMCC、SVSB、SIA 和例如可从 Pierce Chemical Company 获得的、具有一个氨基反应性官能团和一个巯基反应性官能团的其它交联剂。上述交联剂均导致在与氨基反应后形成酰胺键和与巯基反应后形成硫醚键。适用于实施本发明的另一类交联剂的特征在于偶联时在本发明的 Fe1 d1 与 VLP 之间引入二硫键。属于这一类的优选交联剂包括,例如 SPDP 和 Sulfo-LC-SPDP(Pierce)。

[0094] 在一个优选实施方案中,本发明的组合物还包含连接体。根据本发明的公开内容,通过连接优选包含至少一个适合作为第二附着位点的氨基酸的连接体,实现向本发明的 Fe1 d1 上构建第二附着位点。因此,在本发明的一个优选实施方案中,连接体通过至少一个共价键、优选通过至少一个、通常一个肽键与本发明的 Fe1 d1 连接。优选地,连接体包含或者由第二附着位点组成。在一个进一步优选的实施方案中,连接体包含巯基,优选半胱氨酸残基的巯基。在另一个优选的实施方案中,氨基酸连接体是半胱氨酸残基。

[0095] 连接体的选择取决于本发明的 Fe1 d1 的性质,取决于其生化性质,如 pI、电荷分布和糖基化。柔性的氨基酸连接体通常是有利的。在本发明的一个进一步优选的实施方案中,连接体由氨基酸组成,其中进一步优选地,连接体由最多 25 个,优选最多 20 个,更优选最多 15 个氨基酸组成。在本发明的另一优选实施方案中,氨基酸连接体含有不超过 10 个氨基酸。连接体的优选实施方案选自:(a)CGG;(b)N-端 γ 1 连接体(例如 CGDKTHTSP, SEQ ID NO:58);(c)N-端 γ 3 连接体(例如 CGGPKPSTPPGSSGGAP, SEQ ID NO:69);(d)Ig 铰链区;(e)N-端甘氨酸连接体(例如 GCGGG, SEQ ID NO:59);(f)(G)kC(G)n,其中 n=0-12, k=0-5;(g)N-端甘氨酸-丝氨酸连接体((GGGS)n, n=1-3,具有另外一个半胱氨酸(例如 SEQ ID NO:60,它相当于其中 n=1 的实施方案));(h)(G)kC(G)m(S)l(GGGGS)n,其中 n=0-3, k=0-5, m=0-10, l=0-2(例如 SEQ ID NO:61,它相当于其中 n=1、k=1、l=1 且 m=1 的实施方案);(i)GGC;(k)GGC-NH₂;(1)C-端 γ 1 连接体(例如 DKTHTSP, SEQ ID NO:62);(m)C-端 γ 3 连接体(例如 PKPSTPPGSSGGAPGGCG, SEQ ID NO:63);(n)C-端甘氨酸连接体(GGGGCG, SEQ ID NO:64);(o)(G)nC(G)k,其中 n=0-12, k=0-5;(p)C-端甘氨酸-丝氨酸连接体((SGGG)n, n=1-3,具有另外一个半胱氨酸(例如 SEQ ID NO:65,它相当于其中 n=1 的实施方案));(q)(G)m(S)l(GGGGS)n(G)oC(G)k,其中 n=0-3, k=0-5, m=0-10, l=0-2, o=0-8(例如 SEQ ID NO:66,它相当于其中 n=1、k=1、l=1、o=1 且 m=1 的实施方案)。在一个进一步优选的实施方案中,连接体被添加到本发明的

Fe1 d1 的 N 末端。在本发明的另一个优选实施方案中, 连接体被添加到本发明的 Fe1 d1 的 C 末端。

[0096] 本发明优选的连接体是进一步含有半胱氨酸残基作为第二附着位点的甘氨酸连接体 (G)_n, 如 N- 末端甘氨酸连接体 (GCGGGG) 和 C- 末端甘氨酸连接体 (GGGGCG)。进一步优选的实施方案是 C- 末端甘氨酸- 赖氨酸连接体 (GGKKGC, SEQ ID NO:67) 和 N- 末端甘氨酸- 赖氨酸连接体 (CGKKGG, SEQ ID NO:68), 位于肽的 C- 末端的 GGCG、GGC 或 GGC-NH₂ ("NH₂" 代表酰胺化) 连接体、或位于其 N- 末端的 CGG。甘氨酸残基通常插入大氨基酸与作为第二附着位点的半胱氨酸之间, 以避免偶联反应中较大氨基酸的潜在的空间位阻。

[0097] 在一个优选实施方案中, 连接体与 Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1 片段的 N 末端融合。在一个进一步优选的实施方案中, 连接体是 GCGG。在另一个优选实施方案中, 连接体与 Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1 片段的 C 末端融合。在一个进一步优选的实施方案中, 连接体是 GGC。在由两个多肽链组成的 Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1 片段的情况中, 这些 Fe1 d1 蛋白或 Fe1 d1 片段具有两个 N 末端或两个 C 末端。连接体可以与两个 N 末端或与两个 C 末端都融合。优选地, 连接体只与两个 N 末端之一或只与两个 C 末端之一融合。

[0098] 根据上述优选方法利用异双功能交联剂连接本发明的 Fe1 d1 与 VLP, 使得本发明的 Fe1 d1 以定向方式与 VLP 偶联。连接本发明的 Fe1 d1 和 VLP 的其它方法包括使用碳二亚胺 EDC 和 NHS 交联本发明的 Fe1 d1 和 VLP 的方法。本发明的 Fe1 d1 也可以首先通过反应, 例如与 SATA、SATP 或亚氨基硫醇 (iminothioline) 反应而硫醇化。必要时, 在脱保护之后, 本发明的 Fe1 d1 可以和 VLP 如下所述偶联。在分离过量的硫醇化试剂之后, 本发明的 Fe1 d1 与预先用含有半胱氨酸反应性部分的异双功能交联剂活化的 VLP 反应, 该活化的 VLP 展示至少一个或几个对半胱氨酸残基具有反应性的官能团, 如上所述的硫醇化的本发明的 Fe1 d1 能够与该官能团反应。任选地, 在反应混合物中含有少量的还原剂。另外一些方法使用同型双功能交联剂, 如戊二醛、DSG、BM[PEO]₄、BS3 (Pierce) 或含有对 VLP 的胺基或羧基有反应性的官能团的其它已知同型双功能交联剂, 将本发明的 Fe1 d1 与 VLP 连接。

[0099] 在本发明的其他实施方案中, 所述组合物包含或者基本由通过化学相互作用连接到本发明的 Fe1 d1 上的病毒样颗粒组成, 其中这些化学相互作用中的至少一个不是共价键。例如, VLP 与本发明的 Fe1 d1 的连接可以通过将 VLP 生物素化并将本发明的 Fe1 d1 表达为链霉抗生物素- 融合蛋白而实现。

[0100] 一种或几种抗原分子, 即本发明的 Fe1 d1, 如果空间允许, 可以优选通过 RNA 噬菌体 VLP 外壳蛋白上暴露的赖氨酸残基附着到 VLP、优选 RNA 噬菌体外壳蛋白的一个亚单元上。因此, RNA 噬菌体的 VLP, 特别是 Q β 外壳蛋白 VLP 的一个具体特征是每个亚单元有偶联数个抗原的可能性。这样就允许产生密集的抗原阵列。

[0101] 在本发明非常优选的实施方案中, 本发明的 Fe1 d1 通过已添加到本发明的 Fe1 d1 的 N 末端或 C 末端上的半胱氨酸残基, 或本发明的 Fe1 d1 内的自然半胱氨酸残基, 与 RNA 噬菌体 VLP 的外壳蛋白的赖氨酸残基连接, 特别是与 Q β 的外壳蛋白连接。

[0102] 如上所述, 4 个赖氨酸残基暴露于 Q β 外壳蛋白的 VLP 的表面。典型且优选地, 这些残基在与交联剂分子反应时被衍生化。当不是所有的暴露赖氨酸残基都能与抗原偶联时, 已与交联剂反应的赖氨酸残基使得交联剂分子在衍生化步骤后附着到 ϵ - 氨基上。这

就使可能对 VLP 的溶解性和稳定性不利的一个或几个正电荷消失。通过例如公开的 Q β 外壳蛋白突变体中那样用精氨酸取代某些赖氨酸残基,我们防止了正电荷的过度消失,因为精氨酸残基并不能与优选的交联剂反应。此外,用精氨酸残基取代赖氨酸残基会产生更确定的抗原阵列,因为只有较少的位点可与抗原反应。

[0103] 因此,在下列的 Q β 外壳蛋白突变体中,用精氨酸取代暴露的赖氨酸残基: Q β -240(Lys 13-Arg;SEQ ID NO:15), Q β -250(Lys 2-Arg, Lys 13-Arg;SEQ ID NO:17), Q β -259(Lys 2-Arg, Lys 16-Arg;SEQ ID NO:19) 和 Q β -251;(Lys 16-Arg, SEQ ID NO:18)。在另一实施方案中,我们公开了具有另一个赖氨酸残基的 Q β 突变外壳蛋白 Q β -243(Asn 10-Lys;SEQ ID NO:16),其适合于获得更高密度的抗原阵列。

[0104] 在本发明的一个优选实施方案中,本发明的 VLP 由宿主重组产生,并且其中所述 VLP 基本不含宿主 RNA,优选宿主核酸。在一个进一步优选的实施方案中,所述组合物还包含至少一种与 VLP 结合、优选包装或包封于 VLP 内部的聚阴离子大分子。在一个进一步优选的实施方案中,聚阴离子大分子是聚谷氨酸和 / 或聚天冬氨酸。

[0105] 基本不含宿主 RNA、优选宿主核酸:本文所用的术语“基本不含宿主 RNA,优选宿主核酸”是指 VLP 所含的宿主 RNA、优选宿主核酸的量,该量典型且优选地为每 mg VLP 不到 30 μ g,优选不到 20 μ g,更优选不到 10 μ g,甚至更优选不到 8 μ g,甚至更优选不到 6 μ g,甚至更优选不到 4 μ g,最优选不到 2 μ g。在上述内容中使用的宿主是指在其中重组产生 VLP 的宿主。测定 RNA、优选核酸的量的常规方法是本领域技术人员公知的。根据本发明测定 RNA、优选核酸的量的典型且优选的方法在同一受让人于 2005 年 10 月 5 日提交的 PCT/EP2005/055009 的实施例 17 中描述。对于含有 Q β 以外的 VLP 的本发明的组合物,测定 RNA、优选核酸的量典型且优选地使用相同、相似或类似的条件。最终需要的条件的改变是本领域技术人员的常识。确定的量的数值应当典型且优选地被理解为包括指定数值 $\pm 10\%$ 、优选 $\pm 5\%$ 偏差的数值。

[0106] 聚阴离子大分子:本文所用的术语“聚阴离子大分子”是指包含重复负电荷基团的高相对分子量的分子,其结构基本包括实际上或概念上来源于低相对分子量的分子的多个重复单位。聚阴离子大分子的分子量应当为至少 2000 道尔顿,更优选至少 3000 道尔顿,甚至更优选至少 5000 道尔顿。本文所用的术语“聚阴离子大分子”典型且优选地指不能活化 toll-样受体的分子。因此术语“聚阴离子大分子”典型且优选地不包括 Toll-样受体配体,甚至更优选地不包括免疫刺激物,如 Toll-样受体配体、免疫刺激性核酸和脂多糖(LPS)。更优选地,本文所用的术语“聚阴离子大分子”是指不能诱导细胞因子产生的分子。甚至更优选地,术语“聚阴离子大分子”不包括免疫刺激物。本文所用的术语“免疫刺激物”是指能够诱导和 / 或增强特别针对本发明中包括的抗原的免疫应答的分子。

[0107] 宿主 RNA、优选宿主核酸:本文使用的术语“宿主 RNA、优选宿主核酸”或术语“具有二级结构的宿主 RNA、优选宿主核酸”是指最初由宿主合成的 RNA 或优选核酸。然而, RNA、优选核酸在典型且优选地通过本发明的方法减少或去除 RNA、优选核酸的量的过程中可能经受化学和 / 或物理学改变,例如, RNA、优选核酸的大小可能被缩短,或者其二级结构可能改变。但是,甚至这种得到的 RNA 或核酸仍然被认为是宿主 RNA,或宿主核酸。

[0108] 2005 年 10 月 5 日同一受让人提交的 PCT/EP2005/055009 公开了确定 VLP 包含的 RNA 的量以及减少 VLP 包含的 RNA 的量的方法,因此整个申请引入本文作为参考。减少或消

除宿主 RNA、优选宿主核酸的量,最小化或者减少了不希望的 T 细胞应答,如炎症 T 细胞应答和细胞毒性 T 细胞应答,和其他不希望的副作用,如发热,而同时保持特异性针对 Fe1 d1 的强抗体应答。

[0109] 在一个优选实施方案中,本发明提供一种制备本发明的组合物和本发明的 RNA 噬菌体 VLP-Fe1 d1 的方法,其中所述 VLP 由宿主重组产生,并且其中所述 VLP 基本不含宿主 RNA、优选宿主核酸,该方法包括以下步骤:a) 由宿主重组产生具有至少一个第一附着位点的病毒样颗粒 (VLP),其中所述 VLP 包含 RNA-噬菌体的外壳蛋白、其变体或片段;b) 将所述病毒样颗粒解装配为所述 RNA 噬菌体的所述外壳蛋白、其变体或片段;c) 纯化所述外壳蛋白、其变体或片段;d) 将所述纯化的所述 RNA 噬菌体的外壳蛋白、其变体或片段重装配为病毒样颗粒,其中所述病毒样颗粒基本不含宿主 RNA、优选宿主核酸;和 e) 将具有至少一个第一附着位点的至少一个本发明的抗原与步骤 (d) 获得的所述 VLP 连接。在一个进一步优选的实施方案中,所述纯化的外壳蛋白、其变体或片段的重装配在至少一种聚阴离子大分子的存在下实现。

[0110] 在一个优选实施方案中,本发明的组合物还包含至少一种能够诱导和 / 或增强免疫应答的免疫刺激物。优选地,免疫刺激物是 Toll- 样受体配体,优选选自:(a) 免疫刺激性核酸;(b) 肽聚糖;(c) 脂多糖;(d) 脂磷壁酸;(e) 咪唑并喹啉化合物;(f) 鞭毛蛋白;(g) 脂蛋白;(h) 免疫刺激性有机分子;(i) 含非甲基化 CpG 的寡核苷酸;和 (j) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h) 和 (i) 的物质的任意混合物。

[0111] 在一个进一步优选的实施方案中,免疫刺激性核酸选自:(a) 细菌来源的核酸;(b) 病毒来源的核酸;(c) 包含非甲基化 CpG 基序的核酸;(d) 双链 RNA;(e) 单链 RNA;和 (g) 不含 CpG 基序的核酸。不含非甲基化 CpG 基序的免疫刺激性核酸已经在现有技术中公开,例如 W001/22972。本文使用的术语“核酸”是指由线性共价连接的单体(核苷酸)组成的分子。它是指核苷酸分子链,不是指特定长度的产物。因此,寡核苷酸包括在核酸的定义内。核苷酸之间的键典型且优选地是磷酸二酯键。包含键的修饰例如硫代磷酸键的核酸也包括在本发明中。

[0112] 在一个优选的实施方案中,免疫刺激物与重组 VLP 混合。在另一个优选的实施方案中,免疫刺激物与本发明的 VLP 结合,优选包装在本发明的 VLP 内。

[0113] 免疫刺激物,特别是免疫刺激性核酸,更特别是包含非甲基化 CpG 的寡核苷酸的详细描述已经在 W0 03/024480、03/024481 和 PCT/EP/04/003165 中公开。混合免疫刺激物和 VLP- 抗原的方法已经在 W0 03/024480 中公开。将免疫刺激物包装在 VLP 内的方法已经在 W0 03/024481 中公开。W0 03/024480、03/024481 和 PCT/EP/04/003165 的完整申请因此引入本文作为参考。VLP 通常可以诱导和 / 或增强免疫系统。然而,在本申请中使用的术语“免疫刺激物”是指不是用于本发明组合物的 VLP 的免疫刺激物,而是除所述 VLP 以外的免疫刺激物。

[0114] 本发明的组合物内包含免疫刺激物,优选免疫刺激性核酸,可以使免疫应答转为 Th1 应答,由此抑制 Th2 应答。

[0115] 在一个方面,本发明提供一种含有本发明的组合物的疫苗。在一个方面,本发明提供一种含有本发明的组合物和适当的缓冲液的疫苗。在一个优选实施方案中,该疫苗组合物还包含至少一种佐剂。所述至少一种佐剂的施用可以在施用本发明的组合物之前、同时

或之后进行。本文使用的术语“佐剂”是指免疫应答的非特异性刺激物,或可以在宿主中产生储库 (depot) 的物质,当分别与本发明的疫苗和药物组合物且合时可以产生更强的免疫应答。

[0116] 在另一个优选实施方案中,所述疫苗组合物不含佐剂。本发明的一个有利的特征是组合物的高免疫原性,甚至在不含佐剂时依然如此。不使用佐剂可以减少与使用佐剂有关的副作用的可能的发生。因此,优选地给患者施用本发明的疫苗组合物而不需在施用该疫苗之前、同时或之后给同一患者施用至少一种佐剂。

[0117] 本发明进一步公开了一种免疫方法,包括给人或非人哺乳动物如狗或猫施用本发明的疫苗。并非意在用理论限制本发明,给猫注射本发明的疫苗组合物可以中和 Fe1 d1,因而减少猫唾液中 Fe1 d1 的量。

[0118] 疫苗可以用本领域所知的各种方法施用,但是通常通过注射、输注、吸入、口服或其他适当的物理方法来施用。或者,偶联物可以肌肉内、静脉内、经粘膜、经皮、鼻内、腹膜内或皮下施用。用于施用的偶联物的组分包括无菌水溶液(例如生理盐水)或非水溶液和悬液。非水溶剂的例子有丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、和注射用有机酯如油酸乙酯。可以利用载体或封闭敷料提高皮肤通透性并促进抗原吸收。

[0119] 如果接受个体能够耐受本发明的疫苗的施用,则认为该疫苗是“药学可接受的”。进而,本发明的疫苗将以“治疗有效量”(即产生希望的生理学效果的量)施用。免疫应答的性质或类型不是本申请公开内容的限制因素。并非意在通过以下机制的解释来限制本发明,本发明的疫苗可以诱导可与 Fe1 d1 结合的抗体,推测为 IgG 亚型,因而阻止了与肥大细胞和嗜碱性粒细胞结合的 IgE 发现 Fe1 d1。可替代地或者同时,本发明的组合物使免疫应答转为 Th1 应答,由此抑制了 Th2 应答的发展和 IgE 抗体的产生,IgE 抗体是变态反应中的一种主要成分。

[0120] 在一个方面,本发明提供一种包含本发明所述组合物和可接受的药物载体的药物组合物。当给个体施用本发明的疫苗时,它可以是含有盐、缓冲液、佐剂或其他改善偶联物效果所需的物质的形式。适合在制备药物组合物中使用的材料的例子在许多资料中提供,包括 REMINGTON' S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Osol, A, ed, Mack Publishing Co, (1990))。

[0121] 本发明教导了一种制备本发明的组合物的方法,该方法包括以下步骤:(a) 提供具有至少一个附着位点的核心颗粒,其中所述核心颗粒是病毒样颗粒 (VLP) 或病毒颗粒;(b) 提供具有至少一个第二附着位点的至少一种抗原,其中所述至少一种抗原是 Fe1 d1 蛋白或 Fe1d1 片段;和 (c) 将所述核心颗粒和所述至少一种抗原组合,产生组合物,其中所述至少一种抗原和所述核心颗粒通过所述第一附着位点和第二附着位点连接。

[0122] 在一个进一步优选的实施方案中,提供具有至少一个附着位点的核心颗粒的步骤包括以下另外的步骤:(a) 将所述核心颗粒解装配为所述核心颗粒的外壳蛋白、其突变体或片段;(b) 纯化所述外壳蛋白、其突变体或片段;(c) 重装配所述纯化的所述核心颗粒的外壳蛋白、其突变体或片段,其中所述核心颗粒基本不含宿主 RNA、优选宿主核酸。在一个进一步优选的实施方案中,所述纯化的外壳蛋白的重装配在至少一种聚阴离子大分子或至少一种免疫刺激性核酸的存在下实现。

[0123] 在一个方面,本发明提供一种使用本发明的组合物预防和/或治疗哺乳动物中的猫变态反应的方法,其中优选地所述哺乳动物是人或狗。

[0124] 在一个方面,本发明教导了本发明的组合物作为药物的用途。在另一方面,本发明提供了本发明的组合物在制备治疗哺乳动物中的猫变态反应的药物中的用途,其中优选地所述哺乳动物是人或狗。

[0125] 在另一方面,本发明提供了一种 Fe1 d1 融合蛋白,该融合蛋白包含通过氨基酸间隔区融合的 Fe1 d1 的链 1 和 Fe1 d1 的链 2,所述间隔区连接一条链的 N 末端和另一条链的 C 末端,其中所述氨基酸间隔区由具有 10-30 个、优选 10-25 个、优选 10-20 个、优选 13-20 个、优选 15-20 个、优选 13-17 个、优选 15-17 个氨基酸残基的氨基酸序列组成,并且其中所述融合蛋白不是这样的融合蛋白:其包含的 SEQ ID NO:22 的链 1 通过 (GGGS)₃ 与 SEQ ID NO:23、25 或 26 的链 2 的 N 末端融合,并且其中所述排除的融合蛋白在杆状病毒表达系统中表达。

[0126] WO2004094639 公开了通过用连接体连接链 1 和链 2 形成的 Fe1 d1 融合蛋白,该连接体选自碳-氮键和短肽,即具有 1-9 个、优选 1-5 个、特别优选 1-3 个氨基酸。它进一步指出键或短肽不诱导显著的约束或解折叠。然而,WO 2004094639 没有公开比 9 个氨基酸长的连接体。

[0127] WO 00/20032 公开了杆状病毒表达的重组 Fe1 d1,其含有连续表达并且通过甘氨酸/丝氨酸连接体 (GGGS)₃ 连接在一起的链 1 和链 2。WO 00/20032 也报道了与在大肠杆菌中表达的变应原相比,在杆状病毒中表达变应原显著改善了 rFe1 d1 对于 IgG 和 IgE 抗体的免疫反应性。

[0128] 本发明的 Fe1 d1 融合蛋白可以在原核表达系统中产生,也可以在真核表达系统如杆状病毒系统中产生。在一个优选实施方案中,所述本发明的 Fe1 d1 融合蛋白从大肠杆菌中产生。

[0129] 在一个优选实施方案中,本发明的 Fe1 d1 融合蛋白包含的间隔区由具有 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个氨基酸残基的氨基酸序列组成。

[0130] 在一个优选实施方案中,Fe1 d1 融合蛋白包含的间隔区由具有 2、3 或 4 次 GGGS 重复的氨基酸序列组成。

[0131] 在一个优选实施方案中,Fe1 d1 的链 2 位于本发明的融合蛋白的 N 末端。

[0132] 在另一个优选实施方案中,Fe1 d1 的链 1 位于本发明的融合蛋白的 N 末端。在一个进一步优选的实施方案中,融合蛋白从大肠杆菌中产生。

[0133] 在一个非常优选的实施方案中,本发明的 Fe1 d1 融合蛋白包含选自下组的氨基酸序列:(a)SEQ ID NO:54;(b)SEQ ID NO:55;和(c)SEQ ID NO:57。本发明进一步提供编码本发明的 Fe1 d1 融合蛋白的核苷酸序列。在一个优选的实施方案中,本发明提供编码本发明的融合蛋白的核苷酸序列,该融合蛋白的氨基酸序列选自:(a)SEQ ID NO:54;(b)SEQ ID NO:55;和(c)SEQ ID NO:57。在一个进一步优选的实施方案中,本发明的 Fe1 d1 融合蛋白在大肠杆菌中产生。在一个进一步优选的实施方案中,本发明的 Fe1 d1 融合蛋白包含或者由 SEQ ID NO:57 的氨基酸序列组成,其中所述本发明的融合蛋白在大肠杆菌中产生。

[0134] 在一个方面,本发明提供本发明的 Fe1 d1 融合蛋白在诊断和治疗猫变态反应中的用途。

[0135] 实施例

[0136] 实施例 1

[0137] 在不同聚阴离子大分子的存在下,通过解装配/重装配制备本发明的 Q β VLP,产生重装配的 Q β VLP

[0138] (A) 现有技术 Q β VLP 的解装配

[0139] 从大肠杆菌裂解液中纯化的溶于 PBS (20mM 磷酸盐, 150mM NaCl, pH 7.5) 中的 45mg 现有技术 Q β VLP (2.5mg/ml, 通过 Bradford 分析测定) 在搅拌条件下于室温用 10mM DTT 还原 15 分钟。然后加入氯化镁至 0.7M 的终浓度, 继续在搅拌条件下于室温温育 15 分钟, 导致包裹的宿主细胞 RNA 被沉淀。溶液于 4℃ 下以 4000rpm 离心 10 分钟 (Eppendorf 5810R, 固定角转头 A-4-62, 在下列所有步骤中均使用), 以从溶液中除去沉淀的 RNA。用含有释放的二聚 Q β 外壳蛋白的上清液进行层析纯化步骤。

[0140] (B) 通过阳离子交换层析和大小排阻层析纯化 Q β 外壳蛋白

[0141] 含有二聚体外壳蛋白、宿主细胞蛋白质和残留的宿主细胞 RNA 的解装配反应上清液用水 1:15 稀释, 以调节电导率低于 10mS/cm, 并加样到 SP-Sephacrose FF 柱 (xk 16/20, 6ml, Amersham Bioscience) 上。该柱预先用 20mM 磷酸钠缓冲液 pH7 平衡。用达到 20mM 磷酸钠/500mM 氯化钠的分步梯度来完成对结合的外壳蛋白的洗脱, 以大约 25ml 的级分体积收集蛋白质。以 5ml/min 的流速在室温下进行层析, 在 260nm 和 280nm 处测量吸光度。

[0142] 在第二步中, 将分离的 Q β 外壳蛋白 (从阳离子交换柱上洗脱的级分) 加样到 (分两次进行) 用 20mM 磷酸钠/250mM 氯化钠 pH 6.5 平衡的 Sephacryl S-100 HR 柱 (xk26/60, 320ml, Amersham Bioscience) 上。以 2.5ml/min 的流速在室温下进行层析, 在 260nm 和 280nm 处测量吸光度。收集 5ml 的级分。

[0143] (C1) 通过透析重装配 Q β VLP

[0144] 将纯化的 Q β 外壳蛋白 (2.2mg/ml, 在 20mM 磷酸钠 pH 6.5 中)、一种聚阴离子大分子 (2mg/ml 水溶液)、尿素 (7.2M 水溶液) 和 DTT (0.5M 水溶液) 混合至终浓度为 1.4mg/ml 外壳蛋白、0.14mg/ml 各自的聚阴离子大分子、1M 尿素和 2.5mM DTT。使用 3.5kDa 阻断值的膜将混合物 (各 1ml) 于 5℃ 下在 20mM TrisHCl, 150mM NaCl pH8 中透析 2 天。聚阴离子大分子是: 聚半乳糖醛酸 (25000-50000, Fluka)、硫酸葡聚糖 (MW 5000 和 10000, Sigma)、聚-L-天冬氨酸 (MW 11000 和 33400, Sigma)、聚-L-谷氨酸 (MW 3000、13600 和 84600, Sigma) 和来自面包酵母和小麦胚的 tRNA。

[0145] (C2) 通过渗滤重装配 Q β VLP

[0146] 将 33ml 纯化的 Q β 外壳蛋白 (1.5mg/ml, 在 20mM 磷酸钠 pH6.5, 250mM NaCl 中) 与水和尿素 (7.2M 水溶液)、NaCl (5M 水溶液) 和聚-L-谷氨酸 (2mg/ml 水溶液, MW: 84600) 混合。混合物的体积为 50ml, 各成分的终浓度为 1mg/ml 外壳蛋白、300mM NaCl、1.0M 尿素和 0.2mg/ml 聚-L-谷氨酸。然后在使用 Pellicon XL 膜柱 (Biomax 5K, Millipore) 的正切流动过滤装置中, 应用 10ml/min 的横流速和 2.5ml/min 的渗透流速, 用 500ml 的 20mM TrisHCl pH8, 50mM NaCl 在室温下渗滤该混合物。

[0147] 实施例 2

[0148] AP205 VLP 的体外装

[0149] (A) AP205 外壳蛋白的纯化

[0150] 解装配: 20ml 的 AP205 VLP 溶液 (1.6mg/ml, 在 PBS 中, 从大肠杆菌提取物中纯化) 与 0.2ml 的 0.5M DTT 混合, 于室温温育 30 分钟。加入 5ml 的 5M NaCl, 然后将该混合物于

60℃下温育 15 分钟,使 DTT- 还原的外壳蛋白沉淀。将浑浊的混合物离心(转头 Sorvall SS34,10000g,10min,20℃),弃去上清液,将沉淀物分散到 20ml 的 1M 尿素 /20mM 柠檬酸钠 pH3.2 中。于室温下搅拌 30 分钟后,加入 1.5M Na_2HPO_4 将分散液调节至 pH6.5,然后离心(转头 Sorvall SS34,10000g,10min,20℃),获得含有二聚体外壳蛋白的上清液。

[0151] 阳离子交换层析:用 20ml 水稀释上清液(见上),以调节电导率约为 5mS/cm。将得到的溶液加至预先用 20mM 磷酸钠 pH 6.5 缓冲液平衡的 6ml SP Sepharose FF 柱(Amersham Bioscience)上。加样后,用 48ml 20mM 磷酸钠 pH 6.5 缓冲液洗柱,然后以 20 倍柱体积用达到 1M NaCl 的线性梯度洗脱结合的外壳蛋白。合并主峰级分,通过 SDS-PAGE 和 UV 光谱法进行分析。根据 SDS-PAGE,分离的外壳蛋白是基本纯化的,基本不含其他蛋白质杂质。根据 UV 光谱法,蛋白质浓度为 0.6mg/ml(总量 12mg),1 个 A280 单位反映 1.01mg/ml AP205 外壳蛋白。此外,A280 值(0.5999)与 A260 值(0.291)之比为 2,表明该制品基本不含核酸。

[0152] (B)AP205 VLP 的装配

[0153] 在不含任何聚阴离子大分子的条件下的装配:将上述洗脱的蛋白质级分渗滤并且通过 TFF 浓缩,至在 20mM 磷酸钠 pH 6.5 中的蛋白质浓度为 1mg/ml。将 500 μl 该溶液与 50 μl 的 5M NaCl 溶液混合,于室温下温育 48 小时。混合物中重装配的 VLP 的形成通过非还原 SDS-PAGE 和大小排阻 HPLC 显示。使用用 20mM 磷酸钠,150mMNaCl pH 7.2 平衡的 TSKgel G5000 PWXL 柱(Tosoh Bioscience)进行 HPLC 分析。

[0154] 在聚谷氨酸存在下的装配:将 375 μl 纯化的 AP205 外壳蛋白(1mg/ml,在 20mM 磷酸钠 pH 6.5 中)与 50 μl 的 NaCl 贮存溶液(5M 水溶液)、50 μl 聚谷氨酸贮存溶液(2mg/ml 水溶液,MW:86400,Sigma)和 25 μl 水混合。混合物在室温下温育 48 小时。混合物中重装配的 VLP 的形成通过非还原 SDS-PAGE 和大小排阻 HPLC 显示。混合物中的外壳蛋白几乎完全掺入到 VLP 中,表明装配效率高于在不含任何聚阴离子大分子情况下装配的 AP205 外壳蛋白。

[0155] 实施例 3

[0156] Fe1 d1 融合蛋白的克隆

[0157] 使用如下所示的重叠 DNA 引物,通过 PCR 扩增制备分别编码 Fe1d1 链 1 和链 2 的基因。示出了正向(F)和反向(R)引物。将片段连接到 pCRII-TOP0 载体(Invitrogen)内,并转化 XL1-Blue。通过测序证实 Fe1 d1 链 1 和链 2 的插入。

[0158] 引物序列 1F:SEQ ID NO:34;

[0159] 引物序列 2R:SEQ ID NO:35

[0160] 引物序列 3F:SEQ ID NO:36

[0161] 引物序列 4R:SEQ ID NO:37

[0162] 引物序列 5F:SEQ ID NO:38

[0163] 引物序列 6R:SEQ ID NO:39

[0164] 引物序列 7F:SEQ ID NO:40

[0165] 引物序列 8R:SEQ ID NO:41

[0166] 引物序列 9F:SEQ ID NO:42

[0167] 引物序列 10R:SEQ ID NO:43

[0168] Fe1 d1 融合构建体:

[0169] FELD1 是指在 N 末端的链 2 与链 1 直接融合的蛋白质。使用引物 11 连接体 (SEQ ID NO :44) 通过剪接重叠延伸 (SOE)PCR 产生编码 FELD1 的核苷酸序列。

[0170] FD12 是指在 N 末端的链 1 与链 2 直接融合的蛋白质。使用引物 12-1 (SEQ ID NO : 45)、12-3 (SEQ ID NO :46) 和 12-2-1 (SEQ ID NO :47) 通过剪接重叠延伸 (SOE)PCR 产生编码 FD12 的核苷酸序列。

[0171] FELD1-10aa 和 FELD1-15aa 是指在 N 末端的链 2 分别通过 10 (GGGS)₂ 或 15 (GGGS)₃ 氨基酸间隔区与在 C 末端的链 1 融合的蛋白质。使用含有编码 FELD1 的核苷酸序列的质粒作为模板,通过反向 PCR 诱变 (IPCRM) 产生 10 个氨基酸或 15 个氨基酸的间隔区。对于 1-15 间隔区,使用两个引物 (引物 1-10aa, SEQ ID NO :48 和引物 2-5aa, SEQ ID NO :49)。对于 1-10 间隔区,使用两个引物 (引物 1-5aa, SEQ ID NO :50 和引物 2-5aa)。得到的 PCR 片段通过连接环化。它耐受 Dpn I 消化,因为 Dpn I 只识别含有甲基化腺嘌呤的序列,而质粒模板被 DpnI 消化。

[0172] FD12-10aa 和 FD12-15aa 是指在 N 末端的链 1 分别通过 10 (GGGS)₂ 或 15 (GGGS)₃ 氨基酸间隔区与在 C 末端的链 2 融合的蛋白质。融合 FD12-10aa 和 FD12-15aa 如上所述类似地产生。对于 15 个氨基酸的间隔区使用引物 FD2-10aa (SEQ ID NO :51) 和引物 FD1-5aa (SEQ ID NO :52)。对于 10 个氨基酸的间隔区,使用引物 FD1-5aa 和 FD2-5aa (SEQ ID NO :53)。

[0173] 实施例 4

[0174] His 标记的 Fel d1 融合蛋白的细菌表达和纯化

[0175] 将如实施例 3 所述的编码各种 Fel d1 融合构建体的核苷酸序列亚克隆到由质粒 pET-42a(+) (Novagen) 修饰而来的基于 T7 的表达系统 pET-42T(+) 中。该融合构建体的 C 末端与 His- 标记序列融合,之后是 GGC,含有半胱氨酸作为第二附着位点的氨基酸连接体。得到的构建体根据在末端添加“-HC”而相应地命名。

[0176] FELD1-HC、FELD1-10aa-HC 和 FELD1-15aa-HC 和 FD12-15aa-HC 如下表达并纯化:用质粒转化 BL21 (DE3)。通过向 OD600 约为 1 的培养物中加入 1mM IPTG 诱导表达。培养物在 20℃ 下再生长 20 小时,收获,并通过在非变性裂解缓冲液 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM 咪唑, pH 8.0) 中超声处理而裂解。

[0177] 澄清后的细菌裂解液添加非变性裂解缓冲液至 50ml。加入 5ml 镍-次氨基三乙酸 (Ni-NTA) 琼脂糖 (Qiagen),裂解液在 4℃ 下倒置培养 1 小时。通过用非变性裂解缓冲液洗涤 4 次除去非特异性结合的蛋白质。通过将 Ni-NTA 琼脂糖重悬浮在 2ml 洗脱缓冲液 (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM 咪唑, pH 8.0) 中洗脱结合的蛋白质。

[0178] 实施例 5

[0179] 在纯化的 Fel d1 融合蛋白中氧化折叠二硫键

[0180] Ni²⁺- 亲和纯化的 FELD1-HC 由 15kD 至 20kD 的多种混合二硫键桥接的物质组成。FELD1-HC 的天然折叠通过用摩尔比为 1 : 1 的氧化型谷胱甘肽 (GSSG, Applichem) 和还原型谷胱甘肽 (GSH, Applichem) 分子内改组二硫键而实现。在用洗脱缓冲液洗脱 FELD1 后立即加入 2.5mM GSSG 和 2.5mM GSH 在室温下反应 24 小时。重折叠的 FELD1-HC 在非还原条件下显示分子量为 15kD 的一条带 (图 1, 第一张图, 第 2 泳道)。使用碘乙酰胺 (Sigma) 将 FELD1-HC 的潜在的游离巯基烷基化。在室温下用 5mM 碘乙酰胺在 20mM 碳酸氢铵 pH 8.0 中处理探针 15 分钟。

[0181] 通过用 PBS 平衡的大小排阻层析 (SEC) (Superdex 75pg, Amersham Pharmacia Biosciences) 将重折叠的 FELD1-HC 进一步纯化为均质的。

[0182] FELD1-10aa-HC 和 FELD1-15aa-HC 通过与以上所述基本相同的方法复性 (图 1, 中间两张图)。

[0183] FD12-15aa-HC 的天然折叠类似地通过用摩尔比为 10 : 1 的氧化型谷胱苷肽和还原型谷胱苷肽改组二硫键而实现。在洗脱后, FD12-15aa 用 FD12-15aa 重折叠缓冲液 (50mM Tris-Cl pH 8.5, 240mM NaCl, 10mM KCl, 1mM EDTA, 0.05 % PEG 3,550, 1mM GSH, 0.1mM GSSH) 稀释 20 倍, 并在 4℃ 下温育 24 小时。重折叠的 FD12-15aa 显示分子量为 20kD 的一条带, 与之相比, 还原型在 23kD 处 (图 1, 最后一张图)。

[0184] 实施例 6

[0185] 表位特异性单克隆抗体识别 Fel d1 融合蛋白

[0186] 与天然 Fel d1 (nFel d1) 相比较的 Fel d1 融合蛋白与表位特异性单克隆抗体 (mAB) 的结合使用来自 Indoor biotechnologies (Cardiff, UK) 的 Fel d1 ELISA 试剂盒 (6F9/3E4) 通过夹心 ELISA 检测。

[0187] 简要地说, 作为 2mg/ml 贮存液提供的抗 -Fel d1 mAB 6F9 用 50mM 碳酸盐 - 碳酸氢盐缓冲液 pH 9.6 以 1 : 1000 稀释。微量滴定孔用每孔 100 μ l 稀释的 mAB 6F9 在 4℃ 下包被过夜。用 PBS-0.05% Tween20 (PBS-T) 洗板三次, 然后用 100 μ l 封闭缓冲液 (1% BSA (Sigma), 在 PBS-T 中) 封闭。然后微量滴定孔与 100 μ l Fel d1 融合蛋白或 nFel d1 标准 (Indoors technologies ;UK) 温育 1 小时, 使用从 80ng/ml 到 0.16ng/ml 的倍比稀释。nFel d1 参照由含有 13.47U/ml Fel d1 (1 单位 = 4mg 蛋白质) 的 CBER 猫毛皮屑参照 E10 亚标准化。

[0188] 然后洗板, 加入 100 μ l 稀释的 (1 : 1000, 用 1% BSA/PBS-T) 生物素化的抗 -Fel d1 mAB 3E4 抗体, 在室温下温育 1 小时。用 PBS-T 洗板三次, 使用 100 μ l 稀释的 (1 : 1000, 用 1% BSA/PBS-T) 链霉抗生物素 - 过氧化物酶 (Sigma S5512, 0.25mg, 在 1ml 蒸馏水中重建)。在室温下温育 30 分钟后, 用 PBS-T 洗孔三次。用 OPD 底物溶液和作为终止溶液的 5% H_2SO_4 进行检测。使用 ELISA 读板器 (BioRad) 在 450nm 处测量吸光度, 使用 EXCEL 软件 (MS Office ;Microsoft) 计算算术平均值和平均值的标准差 (SEM)。结果显示在表 1 中。因此, 表位特异性 mAB 对 Fel d1 融合蛋白和 nFel d1 的识别反映了两种蛋白质的抗原性的高度相似性。

[0189] 表 1

[0190]

检测的蛋白质	FELD1-HC	FELD1-10aa-HC	FELD1-15aa-HC	天然 Fel d1
Fel d1 (ng/ml), OD50%	8.4	6.7	7.9	7.2

[0191] 实施例 7

[0192] Fel d1 融合蛋白与来源于 Q β 的 VLP 的偶联

[0193] 143 μ M Q β VLP 在 HEPES 缓冲液 (20mM Hepes, 150mM NaCl, pH 7.2) 中的溶液与 5

倍摩尔过量 (715 μ M) 的 SMPH(Pierce) 在 25°C 和振摇下反应 30 分钟。SMPH 来自溶解在二甲亚砜中的 50mM 贮存液。使用具有 10,000Da 分子量阻断值的透析单位 (Slide-A-Lyzer, Pierce) 用 PBS 透析反应产物, 期间更换两次 PBS。在 4°C 室温下在相对于反应混合物 > 1000 倍过量的缓冲液中进行透析。

[0194] 在 Fe1 d1 融合蛋白与 SMPH- 衍生的 Q β VLP 偶联之前, 实施例 5 获得的 FELD1、FELD1-10aa、FELD1-15aa 和 FD12-15aa 分别与等摩尔量的 TCEP(Pierce, Perbio Science) 在室温下温育 30 分钟。

[0195] Fe1 d1 融合蛋白以 5 倍摩尔过量加入到 143 μ M 的 SMPH- 衍生化的 Q β VLP 溶液中。反应体积为 650 μ l, 平行进行多个反应。反应液在室温振荡下温育 4 小时。偶联后, 将等份以 16,000xg 在 4°C 下离心 3 分钟, 以沉淀不可溶的材料。将上清液合并到新的试管中。通过还原 SDS-PAGE 评价 Fe1 d1 融合蛋白与 Q β VLP 的偶联。

[0196] Fe1 d1 融合蛋白与重装配的 Q β VLP(由实施例 1 获得) 的偶联与以上所述基本相同。

[0197] 实施例 8

[0198] FELD1、FELD1-15aa 和 FD12-15aa 与 HBcAg1-185-Lys 偶联

[0199] HBcAg1-185-Lys 的构建、表达和纯化基本在 W0 03/040164 的实施例 2-5 中描述。120 μ M HBcAg1-185-Lys VLP 在 20mM Hepes, 150mM NaCl pH 7.2 中的溶液与从 DMSO 中的贮存液稀释得到的 25 倍摩尔过量的 SMPH(Pierce) 在 25°C 摇动振荡器上反应 30 分钟。反应溶液然后用 1L 20mM Hepes, 150mM NaCl, pH 7.2 在 4°C 下透析两次, 2 小时。透析后的 HBcAg1-185-Lys 反应混合物然后与实施例 5 获得的重组 Fe1 d1 反应。在偶联反应中, FELD1、FELD1-15aa 和 FD12-15aa 分别相对于衍生化的 HBcAg1-185-Lys VLP 为两倍摩尔过量。偶联反应在 25°C 摇动振荡器上继续 4 小时。

[0200] 实施例 9

[0201] FELD1、FELD1-15aa 和 FD12-15aa 与来源于 AP205 的 VLP 的偶联

[0202] AP205 VLP 的制备在 W0 2004/007538 的实施例 1 和 2 中描述。AP205 VLP 的衍生化基本与实施例 7 对于 Q β VLP 所述相同。在 Fe1 d1 融合蛋白与 SMPH- 衍生化的 AP205 VLP 偶联之前, 从实施例 5 获得的 FELD1, FELD1-15aa 和 FD12-15aa 分别与等摩尔量的 TCEP(Pierce, Perbio Science) 在室温下温育 30 分钟。

[0203] Fe1 d1 融合蛋白以 5 倍摩尔过量加入到 143 μ M 的 SMPH- 衍生化的 AP205 VLP 溶液中。反应液在室温振荡下温育 4 小时。

[0204] Fe1 d1 融合蛋白与重装配的 AP205 VLP(由实施例 2 获得) 的偶联与以上所述基本相同。

[0205] 实施例 10

[0206] 基于噬菌体 Q β 的本发明的组合物的产生

[0207] 601 大肠杆菌 AB259 培养物 (5×10^7 细胞 /ml) 在强烈通气 (1 空气体积 / 培养物体积 · 分钟) 下在 37°C 下生长 2-3 小时, 获得大约 $2-4 \times 10^9$ 细胞 /ml 的培养物。澄清后的 Q β 噬菌体裂解液以 5 的感染复数接种, 并加入 CaCl_2 至终浓度为 2.2mM。在 5 分钟的吸附阶段后, 加强通气 (1.5 空气体积 / 培养物体积 · 分钟)。细胞进一步培养 3 小时, 直到 $\text{OD}_{650\text{nm}}$ 达到稳定值, 在培养物中产生 $4-6 \times 10^{12}$ 噬菌体颗粒。如下纯化。加入 10ml CHCl_3 /1

培养物、0.1mg 溶菌酶 /1 培养物和 EDTA 至终浓度为 20mM,裂解大肠杆菌。在冷却的极限沉降离心机中离心使裂解液澄清,通过硫酸铵沉淀 (500g/l, 获得大约 66% 饱和) 从裂解液中沉淀噬菌体颗粒。首先倾析悬浮液,通过使用 Janetzki K 26 离心机和 W.R. 转头 6×500ml 以 6000rpm 离心 30 分钟,或者在 BeckmanJ21C 离心机中使用 JA-10 转头离心 30 分钟,分离沉淀物。将沉淀物再溶解在 NT 缓冲液 (0.15M NaCl, 0.1% Trypton) 中,通过离心进行澄清化。用硫酸铵 (加入 500g/l, 大约 66% 饱和) 沉淀上清液。离心分离沉淀物,再溶解在 NT 缓冲液中,再次通过离心进行澄清化。使用 Beckman 35 型转头以 32000rpm 超速离心 3.5 小时从得到的上清液中分离噬菌体颗粒。将沉淀的噬菌体重悬浮在 NT 缓冲液中,通过在常规连续 CsCl 梯度上超速离心而纯化。使用 Beckman Ti-70 (8×38.5) 转头以 55000rpm 离心 20 小时。随后噬菌体颗粒用 20mM Hepes, 150mM NaCl, pH 7.4 缓冲液透析,以在如实施例 7 所述的化学交联步骤中使用。

[0208] 实施例 11

[0209] 基于 GA 噬菌体的本发明的组合物的制备

[0210] 大肠杆菌 Q 13 Hfr RNASse I- 培养物在含有 2% 酪蛋白水解物、0.5% 酵母提取物、0.2% 葡萄糖的 M9 培养基中的 121 培养物生长至 OD_{540nm} 为 0.6-0.7, 相当于 2×10^8 细胞 /ml, 以 10-20 的感染复数用 GA 噬菌体感染。培养物在 37℃ 下再生长 2.5-3 小时, 在总培养物中产生大约 10^{11} 个噬菌体颗粒。加入 1-2% v/v 的 CHCl₃ 并将培养物温育 15 分钟, 从而裂解细胞。使用 Janetzki K26 转头以 5000rpm 离心 30 分钟使裂解液澄清。在 4℃ 下和数天期间, 用硫酸铵 (60% 饱和) 从培养基中沉淀噬菌体颗粒。首先倾析悬浮液, 使用 Janetzki K26 转头以 6000rpm 离心 30 分钟, 分离沉淀物。将沉淀物重悬浮在 NET (20mM Tris pH 7.8, 150mM NaCl, 5mM EDTA) 缓冲液中, 在小部分 NET 缓冲液中通过几个离心和重悬浮的循环提取颗粒。合并含有衣壳的部分, 用 60% 硫酸铵沉淀。重悬浮在 NET 缓冲液中的颗粒过 Sepharose 4B 柱, 然后经两个蔗糖梯度纯化三次。简要地说, 在离心管中用 7ml 50%、7ml 43%、7ml 36%、7ml 29% 和 7ml 22% w/w 蔗糖在 NET 缓冲液中制备梯度。噬菌体溶液 (在 NET 缓冲液中) 在梯度上分层, 用 BeckmanSW 28 转头以 25000rpm 离心 17 小时。合并含有衣壳的部分, 通过在 Sepharose 4B 柱上凝胶过滤与蔗糖分离。噬菌体颗粒然后用水透析, 冻干供进一步使用。

[0211] Fe1 d1 融合蛋白与噬菌体 Qβ 或 GA 偶联的条件与实施例 7 中公开的与 Qβ VLP 偶联的条件基本相同。

[0212] 实施例 12

[0213] Qβ -Fe1 d1 融合蛋白在小鼠中具有高度免疫原性

[0214] BALB/c 小鼠在第 0、14、21 天用实施例 7 获得的 50 μg Qβ -FELD1 或 50 μg 与重组 Fe1 d1 (从实施例 5 获得) 混合的 Qβ 皮下免疫, 在第 0、21、28 天采血。使用 FELD1 进行包被 (10 μg/ml), 通过 ELISA 测定 Fe1 d1 特异性抗体。简要地说, 使用在 4℃ 下用 10 μg/ml 在 0.1M NaHCO₃ pH 9.6 中的 FELD1 预包被过夜的 96 孔 F96。用 PBS-Tween20 洗板四次, 通过将平板在 37℃ 下在封闭缓冲液 (2% BSA, (Sigma), 在 PBS-Tween20 中) 中温育 2 小时减少背景。血清用血清稀释缓冲液 (2% BSA, 1% FCS, 在 PBS-Tween20 中) 稀释。进行两倍稀释步骤, 在 ELISA 平板振荡器上在室温下温育 2 小时。洗板五次, 与 1 : 1000 稀释的检测抗体 (与 HRP0 偶联的抗小鼠 IgG (Sigma)) 在室温下温育 1 小时。用 PBS-Tween20 洗板五次,

使用 OPD 底物溶液 (0.066M Na_2HPO_4 , 0.035M 柠檬酸, pH5.0, 每 25ml 含有 10mg OPD (Fluka) 和 8 μl 30% H_2O_2 (Fluka)), 并使用 5% H_2SO_4 水溶液作为终止溶液, 进行检测。使用 ELISA 读板器在 450nm 处测量吸光度, 使用 EXCEL 软件 (Microsoft) 计算算术平均值和平均值的标准差 (SEM)。

[0215] Q β -FELD1 免疫的小鼠在第 21 天和第 28 天分别显示 120,000 和 75,000 的半数最大吸光度。相反, 用未交联的 Q β /FELD1 混合物免疫的小鼠在第 21 天和第 28 天分别具有 7000 和 6000 的低滴度。

[0216] 实施例 13

[0217] 用明矾作为佐剂免疫小鼠

[0218] 7-8 周大的雌性 Balb/c 小鼠用 50 μg 现有技术 Q β VLP-FELD1-HC 接种三次 (第 0、14、28 天)。疫苗分别用 200 μl 无菌 PBS 或 100 μl PBS 和 100 μl AluGel-S (Serva) 稀释, 皮下注射到左和右腹股沟区。

[0219] 在第 14、21、28、42、56、84 和 112 天采集血清。通过 ELISA 测定天然 Fe1 d1、FELD-HC 和 Q β VLP 的特异性抗体。

[0220] 微量滴定板分别用 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 天然 Fe1 d1 (nFe1 d1, Indoorsbiotechnologies)、10mg/ml FELD1-HC 和 10mg/ml Q β VLP 包被过夜。在洗涤 (0.05% Tween 20/PBS) 和用在 PBS 中的 2% BSA 封闭后, 以在 2% BSA/1% FCS/PBS 中的不同稀释度添加血清。

[0221] 之后通过标准方法进行 ELISA。Q β VLP-FELD1-HC 疫苗诱导持久的针对天然 FELD1 的高 Fe1 d1 特异性抗体应答。在明矾存在下的抗体效价高于不含明矾时 (表 2)。

[0222] 表 2

[0223]

日期	含有明矾		不含明矾	
	nFe1 d1	FELD1-HC	nFe1 d1	FELD1-HC
第 13 天	15984	53939	3394	7871
第 20 天	100311	203636	38980	77323
第 27 天	173190	368716	38177	56836
第 42 天	240173	419072	88953	170377
第 56 天	228500	492520	65370	163093
第 84 天	157009	219834	59603	115049
第 112 天	127745	203719	62290	116132

[0224] 实施例 14

[0225] 与 Q β 偶联的 FELD1 在体外具有大大降低的变应性潜力

[0226] 为了在体外检测 Q β -FELD1-HC 引发变态反应的能力, 从三名对猫过敏的供体的血液中分离嗜碱性粒细胞。在一名对猫过敏的个体中, 这些嗜碱性粒细胞用 Fe1 d1 特异性 IgE 包被, 并且以 CD63 上调响应变应原刺激。因此, 过敏个体的嗜碱性粒细胞用分级

的量的 Q β -FELD1-HC 或单独的 FELD1-HC 刺激,并且通过流式细胞术评价 CD63 的上调。FELD1-HC(由实施例 5 获得)在检测的最低稀释度(约 0.2ng/ml)时引发 CD63 的强烈上调,Q β -FELD1-HC(由实施例 7 获得)显示大大降低的变应性潜力,嗜碱性粒细胞产生响应需要比 FELD1-HC 高 100-1000 倍的量(约 70ng/ml)。

[0227] 类似地,对单独或与 Q β 偶联的融合蛋白 FELD-15aa-HC 和 FD12-15aa-HC 重复该试验。结果显示在图 2 中。这些 Fe1 d1 融合蛋白当与 Q β 偶联时全都显示大大降低的变应性潜力。

[0228] 实施例 15

[0229] 与 Q β 偶联的 FELD1 不能在过敏个体中引发皮肤-穿刺反应

[0230] 如果通过穿刺过敏个体的皮肤引入变应原,则由于激活皮肤中存在的肥大细胞而在大约 20 分钟内产生局部水肿。在此,使用皮肤试验来确定 Q β -FELD1-HC(由实施例 7 获得)的变应性潜力。将分级的量的 Q β -FELD1-HC 或相应量的 FELD1-HC(由实施例 5 获得)引入对猫过敏的个体的皮肤内,20 分钟后评价皮肤反应。Q β -FELD1-HC 不能引发皮肤反应,而 FELD1-HC 在 100 倍的较低浓度以上时具有活性(表 3)。

[0231] 表 3:在两种制剂中存在相应量的 FELD1-HC

[0232]	稀释度	FELD1-HC	Q β -FELD1-HC
	未稀释	+++	-
	1:10	++	-
	1:100	+	-
	1:1000	-	-

[0233] 实施例 16

[0234] 用 Q β -FELD1-HC 免疫过敏个体降低皮肤穿刺试验反应性

[0235] 为了检测 Q β -FELD-HC 改善临床症状的能力,一名患有猫变态反应的患者在第 0 天接种 17 μ g Q β -FELD1-HC(由实施例 7 获得)(以 2、5、10 μ g 注射三次),在第 7 天注射 40 μ g(以 10、10、20 μ g 注射三次),在第 14 天注射 50 μ g(以 10、40 μ g 注射 2 次)。

[0236] 在第 0、14、21 天用标准化的猫提取物进行皮肤穿刺试验,对中心肿胀反应的直径进行定量(图 3)。在 3 周内,在皮肤穿刺试验中诱导临床症状所需的变应原浓度比在穿刺试验中足以诱导症状的初始量高 1000 倍。

[0237] 实施例 17

[0238] 用 Q β -FELD1-HC 免疫过敏个体减少鼻激发试验中的变应性症状

[0239] 为了检测 Q β -FELD1-HC 改善临床症状的能力,一名患有猫变态反应的患者在第 0 天接种 17 μ g Q β -FELD1-HC(从实施例 7 获得)(以 2、5、10 μ g 注射三次),在第 7 天注射 40 μ g(以 10、10、20 μ g 注射三次),在第 14 天注射 50 μ g(以 10、40 μ g 注射 2 次)。在第 0、14、21 天用标准化的猫提取物进行鼻激发试验,评价每一剂量增加水平时的临床症状(图 4A),相应地进行总变应性分级(图 4B)。在 3 周内,诱导临床症状需要高 100-1000 倍

的变应原浓度,并且总变应性分级强烈降低。

[0240] 实施例 18

[0241] 向 Q β VLP 内包装免疫刺激性核酸

[0242] 解装配并且纯化的 Q β 的外壳蛋白如实施例 1(A) 和 (B) 所述获得。重装配:向 10ml 二聚体部分中加入 β -巯基乙醇至终浓度为 10%,加入 300 μ l 含有 12.3nmol 寡核苷酸的 (CpG)₂₀OpA 寡脱氧核苷酸溶液。重装配混合物首先用 30ml 含有 10% β -巯基乙醇的 NET 缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH 7.8, 含有 5mM EDTA 和 150mM NaCl) 在 4℃ 下透析 2 小时,然后以 8ml/h 的 NET 缓冲液流速,在 4℃ 下以连续模式透析 4 天。重装配混合物然后通过用水透析脱盐,期间更换 6 次缓冲液 (4 $\times$ 100ml, 2 $\times$ 1 升)。

[0243] Fe1 d1 融合蛋白与内部包装有 CpG 的 Q β VLP 的偶联基本与实施例 7 所述相同地进行。

[0244] 实施例 19

[0245] Fe1 d1 特异性血清在体外抑制 Fe1 d1 融合蛋白诱导的嗜碱性粒细胞脱粒

[0246] 为了检测抗 -Fe1 d1 特异性 IgG 抑制脱粒的能力,将确定量的 FELD1-HC 或 FELD1-15aa-HC 与系列稀释的、含量逐渐降低的、从 Q β -FELD1-HC 免疫的兔中分离的 IgG 一起预温育,用其刺激过敏个体的嗜碱性粒细胞。通过流式细胞术评价 CD63 的上调。抗 -Fe1 d1 IgG 在所有检测浓度下都阻断了 Fe1 d1- 诱导的脱粒,而对照 IgG 不显示任何作用 (表 4)。

[0247] 表 4

[0248]

样品	FELD1-HC 脱粒百分比	FELD1-15aa-HC 脱粒百分比
无 IgG	33	33
Fe1 d1 特异性 IgG (200ng/ml)	1.9	1.6
Fe1 d1 特异性 IgG (100ng/ml)	5.2	2.1
Fe1 d1 特异性 IgG (50ng/ml)	8.2	2.3
Fe1 d1 特异性 IgG (25ng/ml)	10.6	4.2
非特异性 IgG	35	29
无 Fe1 d1 刺激	1.2	1.2

[0249] 实施例 20

[0250] 用 Q β -FELD1-HC 免疫 Fe1 d1 变应性小鼠

[0251] 使用小鼠变应性气管炎症实验哮喘模型评价针对天然变应原 Fe1d1 接种对 BALB/c 小鼠的血清和 BAL (支气管肺泡灌洗液) 中 IgE 抗体应答的影响。每组 5 只小鼠在第 0 天用在 AlumGel-S 中的 1 μ g 天然 Fe1 d1 腹膜致敏。小鼠在第 35、49 天皮下接种 50 μ g 单独

的 Q β 或 50 μ g Q β -FELD1-HC,之后在第 63 天和第 70 天进行两次鼻内激发。最后一次鼻内激发 5 天后,将小鼠处死,收集血清和 BALF(支气管肺泡灌洗液),通过 ELISA 进行体液免疫应答的分析(IgE 亚类滴度)。

[0252] ELISA 板用在碳酸盐(Carbonat)缓冲液中稀释的大鼠抗-IgE mAb(2 μ g/ml)于 4℃包被过夜。将板用 PBS/5% BSA 封闭 2 小时后,将板与致敏的、接种的和抗原激发的小鼠的血清(第一个孔预先 1 : 100 稀释,然后经 8 步 1 : 3 稀释)或 BAL(第一个孔为纯 BAL,然后经 8 步 1 : 3 稀释)再温育 2 小时。在样品温育 2 小时后,用大鼠抗小鼠 IgE-HRP 标记的抗体、然后用底物 OPD 检测血清和 BAL-IgE。

[0253] 表 5

[0254]

组	血清 (d75)		BAL (d75)	
	OD50 的滴度	%降低	OD50 的滴度	%降低
Q β 接种	1036	—	15	—
Q β -Fel d1 接种	49	95	0	100

[0001]

序列表

<110> 赛托斯生物技术公司
M. 巴克曼
M. 鲍尔
K. 迪特迈尔
N. 施米茨
S. 尤特津格尔

<120> 猫变应原融合蛋白及其用途

<130> P1048PC00

<150> 60/662, 918
<151> 2005-03-18

<160> 69

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 132
<212> PRT
<213> 噬菌体Q-beta

<400> 1

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 2
<211> 329
<212> PRT
<213> 噬菌体Q-beta

<400> 2

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly
1 5 10 15

Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

[0002]

Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45
 Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
 50 55 60
 Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser
 65 70 75 80
 Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
 85 90 95
 Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu
 100 105 110
 Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln
 115 120 125
 Leu Asn Pro Ala Tyr Trp Thr Leu Leu Ile Ala Gly Gly Gly Ser Gly
 130 135 140
 Ser Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu
 165 170 175
 Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala
 180 185 190
 Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu
 195 200 205
 Gly Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr
 210 215 220
 Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr
 225 230 235 240
 Leu Ala Thr Asp Gln Ala Met Arg Asp Gln Lys Tyr Asp Ile Arg Glu
 245 250 255
 Gly Lys Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu
 260 265 270
 Lys Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala Ala Tyr His
 275 280 285
 Ala Asp Gly Val Ile Val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly
 290 295 300
 Ala Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile
 305 310 315 320
 Gln Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala
 325

[0003]

<210> 3
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 噬菌体R17

<400> 3

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15

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

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
 35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
 50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
 65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
 85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
 100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
 115 120 125

Tyr

<210> 4
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> 噬菌体fr

<400> 4

Met Ala Ser Asn Phe Glu Glu Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
 1 5 10 15

Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
 20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
 35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu
 50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
 65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe
 85 90 95

[0004]

Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr
 100 105 110

Phe Lys Thr Gly Asn Pro Ile Ala Thr Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
 115 120 125

Ile Tyr
 130

<210> 5
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> 噬菌体GA

<400> 5

Met Ala Thr Leu Arg Ser Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15

Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
 20 25 30

Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr
 35 40 45

Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val
 50 55 60

Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser
 65 70 75 80

Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
 85 90 95

Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe
 100 105 110

Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe
 115 120 125

Tyr Ala
 130

<210> 6
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 噬菌体SP

<400> 6

Met Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys
 50 55 60

[0005]

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys
 65 70 75 80
 Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe
 85 90 95
 Thr Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ala Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
 115 120 125
 Asn Pro Ala Tyr
 130
 <210> 7
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 噬菌体SP
 <400> 7
 Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly Asp
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30
 Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45
 Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys Val
 50 55 60
 Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys Asp
 65 70 75 80
 Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe Thr
 85 90 95
 Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala
 100 105 110
 Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn
 115 120 125
 Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp
 130 135 140
 Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro
 145 150 155 160
 Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly
 165 170 175
 Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg
 180 185 190

[0006]

Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
 195 200 205
 Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp
 210 215 220
 Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp
 225 230 235 240
 Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly
 245 250 255
 Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu
 260 265 270
 Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala
 275 280 285
 Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
 290 295 300
 Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro
 305 310 315 320
 Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser
 325
 <210> 8
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> 噬菌体MS2
 <400> 8
 Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
 20 25 30
 Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
 35 40 45
 Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu
 50 55 60
 Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
 65 70 75 80
 Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe
 85 90 95
 Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu
 100 105 110
 Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
 115 120 125

[0007]

Ile Tyr
130

<210> 9
<211> 133
<212> PRT
<213> 噬菌体M11

<400> 9

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Lys Gly
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asp Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ser Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Val Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
100 105 110

Leu Gln Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Val Asn Ala Ile Asp Asn
115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 10
<211> 133
<212> PRT
<213> 噬菌体MX1

<400> 10

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95

[0008]

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
 100 105 110
 Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn
 115 120 125
 Leu Asn Pro Ala Tyr
 130
 <210> 11
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 噬菌体NL95
 <400> 11
 Met Ala Lys Leu Asn Lys Val Thr Leu Thr Gly Ile Gly Lys Ala Gly
 1 5 10 15
 Asn Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
 20 25 30
 Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
 35 40 45
 Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
 50 55 60
 Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Lys Asp Ala Cys
 65 70 75 80
 Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Gly Ser Arg Asp Val Thr Leu Ser Phe
 85 90 95
 Thr Ser Tyr Ser Thr Glu Arg Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ala Ala Leu Leu Lys Asp Asp Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
 115 120 125
 Asn Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Gly
 130 135 140
 Asn Asn Pro Tyr Pro Gly Val Pro Asp Ser Pro Asn Val Lys Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Arg Gly
 165 170 175
 Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys
 180 185 190
 Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
 195 200 205
 Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp
 210 215 220

[0009]

Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp
 225 230 235 240
 Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp
 245 250 255
 Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr
 260 265 270
 Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala
 275 280 285
 Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
 290 295 300
 Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro
 305 310 315 320
 Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu
 325 330
 <210> 12
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 噬菌体f2
 <400> 12
 Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
 1 5 10 15
 Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
 20 25 30
 Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
 35 40 45
 Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
 50 55 60
 Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
 65 70 75 80
 Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Leu Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
 85 90 95
 Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
 100 105 110
 Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
 115 120 125
 Tyr

<210> 13
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> 噬菌体PP7

[0010]

<400> 13

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu
1 5 10 15

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val
20 25 30

Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn
35 40 45

Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp
50 55 60

Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg
65 70 75 80

Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr
85 90 95

Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala
100 105 110

Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
115 120 125

<210> 14

<211> 131

<212> PRT

<213> 噬菌体AP205

<400> 14

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile
1 5 10 15

Val Trp Ser Asp Pro Thr Arg Leu Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ser Leu
20 25 30

Leu Arg Gln Arg Val Lys Val Gly Ile Ala Glu Leu Asn Asn Val Ser
35 40 45

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp
115 120 125

Thr Thr Ala
130

[0011]

<210> 15
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 噬菌体Qbeta 240突变体

<400> 15
Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys
1 5 10 15
Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30
Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45
Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60
Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80
Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95
Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110
Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125
Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 16
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 噬菌体Q-beta 243突变体

<400> 16
Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Lys Ile Gly Lys Asp Gly Lys
1 5 10 15
Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30
Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45
Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60
Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

[0012]

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 17
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 噬菌体Q-beta 250突变体

<400> 17

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 18
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 噬菌体Q-beta 251突变体

<400> 18

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg
1 5 10 15

[0013]

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30
 Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45
 Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60
 Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80
 Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95
 Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
 115 120 125
 Asn Pro Ala Tyr
 130
 <210> 19
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 噬菌体Q-beta 259突变体
 <400> 19
 Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
 20 25 30
 Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
 35 40 45
 Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
 50 55 60
 Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
 65 70 75 80
 Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
 85 90 95
 Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
 100 105 110
 Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
 115 120 125

[0014]

Asn Pro Ala Tyr
 130

<210> 20
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> 乙型肝炎病毒

<400> 20

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
 50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala
 65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
 85 90 95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
 100 105 110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg
 145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
 165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 180 185

<210> 21
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> 乙型肝炎病毒

<400> 21

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
 20 25 30

Thr Ala Ala Ala Leu Tyr Arg Asp Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
 35 40 45

[0015]

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp
 50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Lys Gly Gly Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Val
 85 90 95

Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr
 100 105 110

Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp
 115 120 125

Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser
 130 135 140

Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser
 145 150 155 160

Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro
 165 170 175

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 180 185

<210> 22
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> 家猫

<400> 22

Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly
 1 5 10 15

Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro
 20 25 30

Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys
 35 40 45

Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile
 50 55 60

Tyr Thr Ser Pro Leu Cys
 65 70

<210> 23
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> 家猫

<400> 23

Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15

[0016]

Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30
 Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
 35 40 45
 Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
 50 55 60
 Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn
 65 70 75 80
 Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
 85 90
 <210> 24
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 链2+ 链1融合蛋白
 <400> 24
 Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30
 Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
 35 40 45
 Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
 50 55 60
 Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn
 65 70 75 80
 Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Glu Ile Cys Pro
 85 90 95
 Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu
 100 105 110
 Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu
 115 120 125
 Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu
 130 135 140
 Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro
 145 150 155 160
 Leu Cys

<210> 25
 <211> 90

[0017]

<212> PRT
 <213> 家猫
 <400> 25
 Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30
 Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
 35 40 45
 Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
 50 55 60
 Ile Ala Ile Asn Glu Tyr Cys Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg
 85 90
 <210> 26
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> 家猫
 <400> 26
 Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val
 20 25 30
 Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys
 35 40 45
 Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val Met
 50 55 60
 Pro Ser Thr Asn Ile Ala Trp Val Lys Gln Phe Arg Thr Pro
 65 70 75
 <210> 27
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 家猫
 <400> 27
 Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val
 1 5 10 15
 Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val
 20 25
 <210> 28
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 家猫

[0018]

<400> 28

Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys
1 5 10 15

Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu
20 25

<210> 29

<211> 26

<212> PRT

<213> 家猫

<400> 29

Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu
1 5 10 15

Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg
20 25

<210> 30

<211> 19

<212> PRT

<213> 家猫

<400> 30

Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr
1 5 10 15

Ser Pro Leu

<210> 31

<211> 19

<212> PRT

<213> 家猫

<400> 31

Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr
1 5 10 15

Leu Gly Arg

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> 家猫

<400> 32

Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr
1 5 10 15

<210> 33

<211> 174

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 与his标记和GGC的融合

<400> 33

[0019]

Met Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe
1 5 10 15

Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys
20 25 30

Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp
35 40 45

Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val
50 55 60

Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln
65 70 75 80

Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Glu Ile Cys
85 90 95

Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp
100 105 110

Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu
115 120 125

Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu
130 135 140

Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser
145 150 155 160

Pro Leu Cys Leu Glu His His His His His His Gly Gly Cys
165 170

<210> 34
<211> 85
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物1F

<400> 34
gtacataatgg aaatctgccc ggctgttaaa cgtgacgttg acctgttcct gaccggtacc 60
ccggacgaat acgttgaaca ggttg 85

<210> 35
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物2R

<400> 35
ggcagagctt tgtactgagc aacctgttca acgtattc 38

<210> 36
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0020]

<223> 引物3F	
<400> 36	
gctcagtaca aagctctgcc ggttggtctg gaaaacgctc gtatcctgaa aaactgcgtt	60
gacgctaaaa tgacc	75
<210> 37	
<211> 89	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物4R	
<400> 37	
cctctcgagg cacagcgggg aggtgtagat ttgtccagc agggacagag cgttttcttt	60
gtcttcttcg gtcatttttag cgtcaacgc	89
<210> 38	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物5F	
<400> 38	
gtacatatgg ttaaaatggc tgaaccctgc ccgatcttct acgacgtttt ctctgctgtt	60
gctaacggta acgaac	76
<210> 39	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物6R	
<400> 39	
ggtacgttcc ggttcggtag cgtaacttt ggtcaggac aggtccagca gcagttcgtt	60
accgttagca acagc	75
<210> 40	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物7F	
<400> 40	
ctaccgaacc ggaacgtacc gctatgaaaa aaatccagga ctgctacgtt gaaaacggtc	60
tgatctcccg tgttctggac	80
<210> 41	
<211> 71	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物8R	
<400> 41	
gcttcacca tgcagtcttt ggaggaggag atggtggtca taaccagacc gtccagaaca	60
cgggagatca g	71

[0021]

<210>	42	
<211>	75	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物9F	
<400>	42	60
	caaagactgc atgggtgaag ctgttcagaa caccgttgaa gacctgaaac tgaacaccct	
	gggtcgctcg agagg	75
<210>	43	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物10R	
<400>	43	21
	cctctcgagc gacccagggt g	
<210>	44	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物连接体	
<400>	44	45
	cgtttaacag ccgggcagat ttcacgaccc agggtgttca gtttc	
<210>	45	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物12-1	
<400>	45	28
	gtacatatgg aaatctgccc ggtgttta	
<210>	46	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物12-3	
<400>	46	48
	gcaggtttca gccattttaa cgcacagcgg ggaggtgtag attttgtc	
<210>	47	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物12-2-1	
<400>	47	39
	cctctcgaga cgaccagggt igtgcagttt caggtcttc	

[0022]

<210>	48	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物1-10aa	
<400>	48	
	ggtggaggag gtagcggtagg aggaggtagc gaaatctgcc cggctgttaa acgtgacg	58
<210>	49	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物2-5aa	
<400>	49	
	gctacctcct ccaccacgac ccagggtgtt cagtttcagg t	41
<210>	50	
<211>	43	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物1-5aa	
<400>	50	
	ggtggaggag gtagcgaaat ctgccccggt gttaaacttg acg	43
<210>	51	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物2-10aa	
<400>	51	
	ggtggaggag gtagcggtagg aggaggtagc gttaaatgg ctgaacctg cccgatctt	59
<210>	52	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物1-5aa	
<400>	52	
	gctacctcct ccaccgcaca gcggggaggt gtagattttg tc	42
<210>	53	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物2-5aa	
<400>	53	
	ggtggaggag gtagcgtaa aatggctgaa acctgcccga tctt	44
<210>	54	
<211>	175	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	

[0023]

<220>
<223> FELD1-10aa

<400> 54
Met Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe
1 5 10 15
Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys
20 25 30
Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp
35 40 45
Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val
50 55 60
Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln
65 70 75 80
Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Gly Gly Gly
85 90 95
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp
100 105 110
Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val
115 120 125
Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu
130 135 140
Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala
145 150 155 160
Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Leu Glu
165 170 175

<210> 55
<211> 180
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FELD1-15aa

<400> 55
Met Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe Tyr Asp Val Phe Phe
1 5 10 15
Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp Leu Ser Leu Thr Lys
20 25 30
Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met Lys Lys Ile Gln Asp
35 40 45
Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val Leu Asp Gly Leu Val
50 55 60

[0024]

Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met Gly Glu Ala Val Gln
 65 70 75 80
 Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu Gly Arg Gly Gly Gly
 85 90 95
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Cys Pro
 100 105 110
 Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr Gly Thr Pro Asp Glu
 115 120 125
 Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu Pro Val Val Leu Glu
 130 135 140
 Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala Lys Met Thr Glu Glu
 145 150 155 160
 Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Thr Ser Pro
 165 170 175
 Leu Cys Leu Glu
 180
 <210> 56
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> FD12
 <400> 56
 Met Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu
 20 25 30
 Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala
 35 40 45
 Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys
 50 55 60
 Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile
 65 70 75 80
 Phe Tyr Asp Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu
 85 90 95
 Asp Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala
 100 105 110
 Met Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg
 115 120 125
 Val Leu Asp Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys
 130 135 140

[0025]

Met Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr
145 150 155 160

Leu Gly Arg Leu Glu
165

<210> 57
<211> 180
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FD12-15aa

<400> 57

Met Glu Ile Cys Pro Ala Val Lys Arg Asp Val Asp Leu Phe Leu Thr
1 5 10 15

Gly Thr Pro Asp Glu Tyr Val Glu Gln Val Ala Gln Tyr Lys Ala Leu
20 25 30

Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn Cys Val Asp Ala
35 40 45

Lys Met Thr Glu Glu Asp Lys Glu Asn Ala Leu Ser Leu Leu Asp Lys
50 55 60

Ile Tyr Thr Ser Pro Leu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
65 70 75 80

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Lys Met Ala Glu Thr Cys Pro Ile Phe
85 90 95

Tyr Asp Val Phe Phe Ala Val Ala Asn Gly Asn Glu Leu Leu Leu Asp
100 105 110

Leu Ser Leu Thr Lys Val Asn Ala Thr Glu Pro Glu Arg Thr Ala Met
115 120 125

Lys Lys Ile Gln Asp Cys Tyr Val Glu Asn Gly Leu Ile Ser Arg Val
130 135 140

Leu Asp Gly Leu Val Met Thr Thr Ile Ser Ser Ser Lys Asp Cys Met
145 150 155 160

Gly Glu Ala Val Gln Asn Thr Val Glu Asp Leu Lys Leu Asn Thr Leu
165 170 175

Gly Arg Leu Glu
180

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> gamma连接体1

[0026]

<400> 58

Cys Gly Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro
1 5 10

<210> 59

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N末端甘氨酸连接体

<400> 59

Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N-末端甘氨酸丝氨酸连接体

<400> 60

Cys Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GCGSGGGGS 连接体

<400> 61

Gly Cys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C-末端gamma 1 连接体

<400> 62

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Gly
1 5 10

<210> 63

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C 末端gamma连接体3

<400> 63

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0027]

Cys Gly

<210> 64
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 末端甘氨酸连接体

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Cys Gly
1 5

<210> 65
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 末端甘氨酸丝氨酸连接体

<400> 65

Ser Gly Gly Gly Gly Cys
1 5

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GSGGGSGGCG 连接体

<400> 66

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Cys Gly
1 5 10

<210> 67
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 甘氨酸赖氨酸连接体

<400> 67

Gly Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 68
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 甘氨酸赖氨酸连接体2

<400> 68

Cys Gly Lys Lys Gly Gly
1 5

<210> 69
<211> 17

[0028]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CGGPKPSTPPGSSGGAP

<400> 69

Cys	Gly	Gly	Pro	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala
1				5					10					15	

Pro

P1048PC00

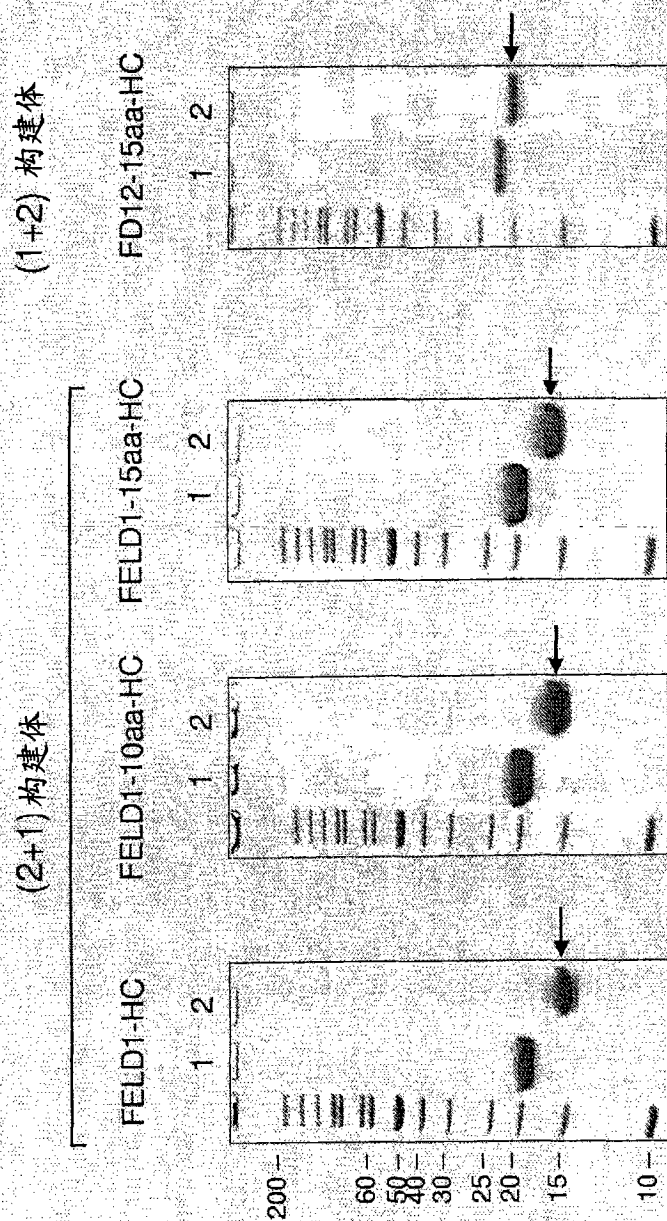


图1

P1048PC00

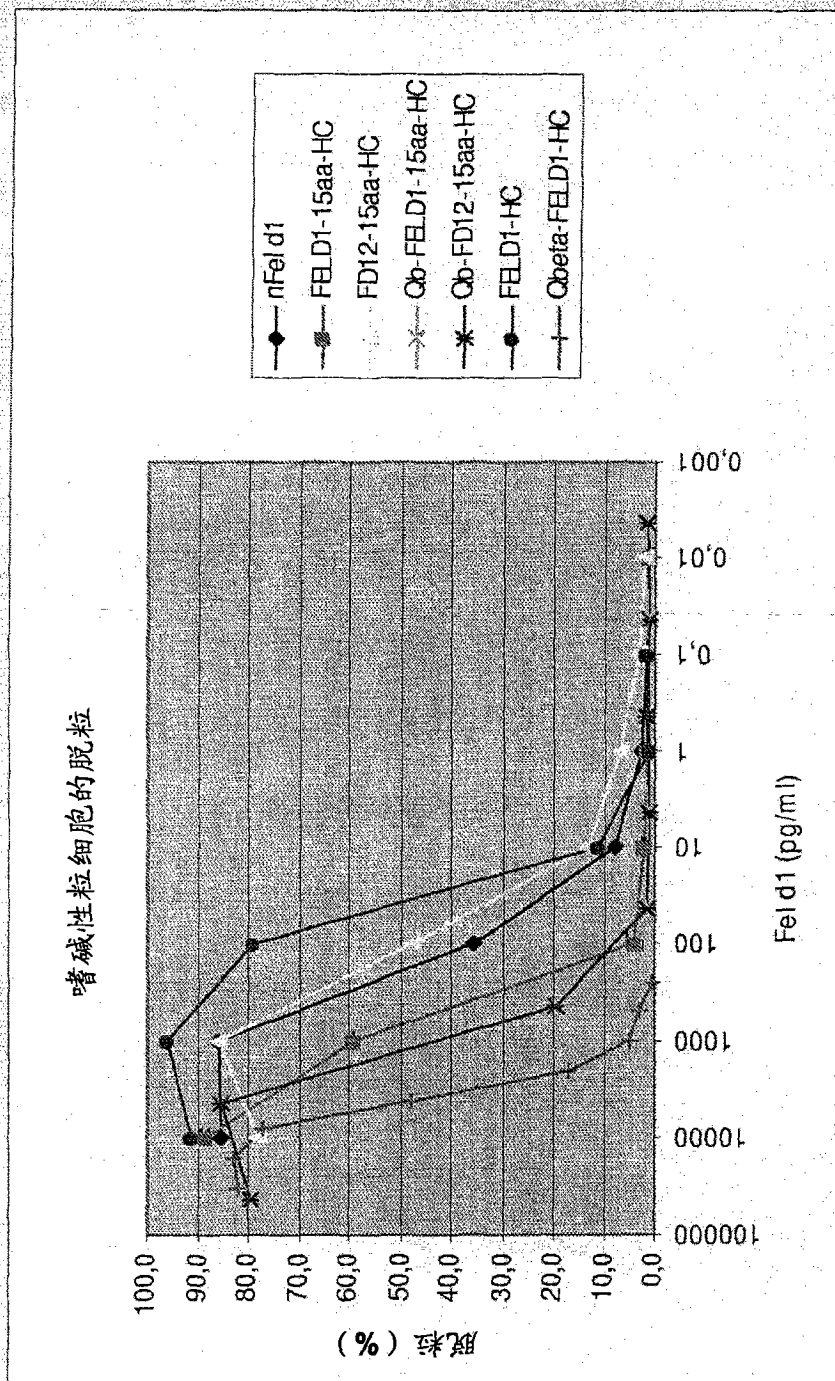


图 2

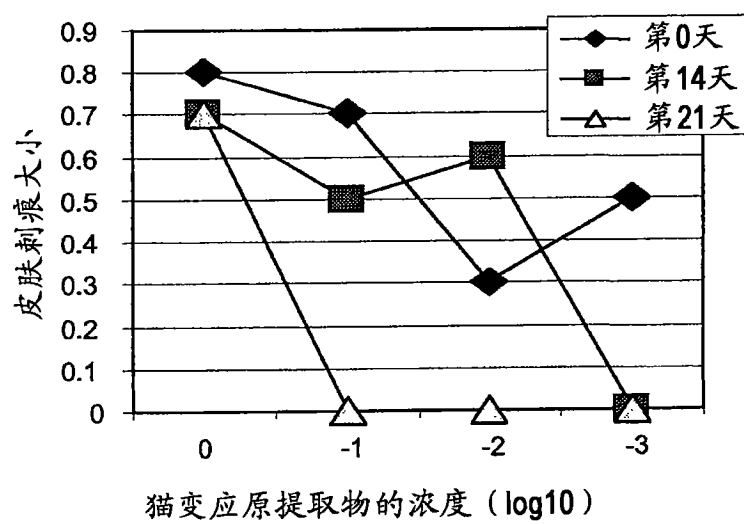


图3

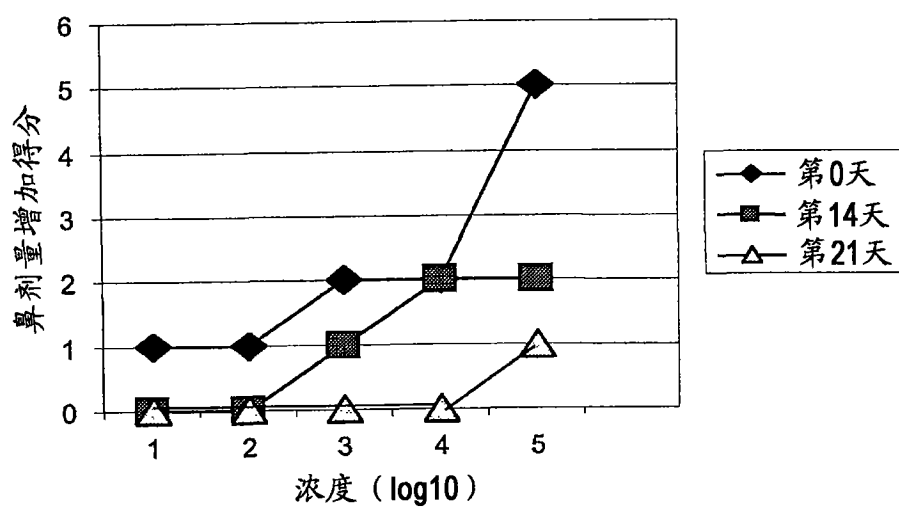


图4A

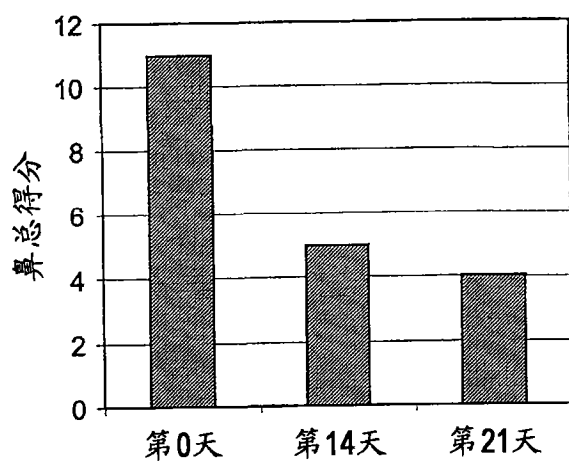


图4B