



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1674934 B

(45) 授权公告日 2013.01.02

(21) 申请号 03819734.0

(22) 申请日 2003.07.18

(30) 优先权数据

60/396,639 2002.07.19 US

60/470,432 2003.05.15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.02.21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2003/007864 2003.07.18

(87) PCT申请的公布数据

W02004/016282 EN 2004.02.26

(73) 专利权人 希托斯生物技术股份公司

地址 瑞士苏黎世

专利权人 诺瓦提斯医药股份公司

(72) 发明人 M·F·巴赫曼 A·蒂索 R·奥特曼

R·隆得 M·施陶芬比尔 P·弗赖

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

A61K 39/385 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 0032227 A2, 2000.06.08, 全文, 特别是第 82-93 页.

审查员 田甜

权利要求书 4 页 说明书 54 页

序列表 48 页 附图 23 页

(54) 发明名称

含有淀粉样 β 1-6 抗原阵列的疫苗组合物

(57) 摘要

本发明涉及分子生物学、病毒学、免疫学和医学领域。本发明提供了包含有序和重复的抗原或抗原决定簇阵列的组合物,特别是 A β 1-6 肽-VLP 组合物。更具体地,本发明提供了包含病毒样颗粒和与其结合的至少一个 A β 1-6 肽的组合物。本发明也提供了用于产生此缀合物或有序重复阵列的方法。本发明组合物可以用于生产治疗阿尔茨海默氏病的疫苗,和用作预防或治愈阿尔茨海默氏病及有效地诱导免疫应答,特别是抗体应答的药物。而且,在所述上下文中,本发明组合物特别可以用于有效地诱导自身特异性免疫应答。

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 噬菌体的病毒样颗粒;和

(b) 至少一个具有至少一个第二附着位点的 A β 1-6 肽,并且其中所述第二附着位点选自:

(i) 非天然存在于所述 A β 1-6 肽上的附着位点;和

(ii) 所述 A β 1-6 肽上天然存在的附着位点,

其中所述第二附着位点能与所述第一附着位点缔合;并且其中所述 A β 1-6 肽和所述核心颗粒通过所述缔合相互作用以形成有序和重复的抗原阵列。

2. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述病毒样颗粒包含重组 RNA 噬菌体蛋白质。

3. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述病毒样颗粒由重组 RNA 噬菌体蛋白质组成。

4. 如权利要求 2 所述的组合物,其中所述 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;

(j) 噬菌体 f2;

(k) 噬菌体 PP7;和

(l) 噬菌体 AP205。

5. 如权利要求 3 所述的组合物,其中所述 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;

(j) 噬菌体 f2;

(k) 噬菌体 PP7;和

(l) 噬菌体 AP205。

6. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述病毒样颗粒包含重组 RNA 噬菌体 Q β 蛋白质。

7. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述病毒样颗粒由重组 RNA 噬菌体 Q β 蛋白质组

成。

8. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述病毒样颗粒包含重组 RNA 噬菌体 fr 蛋白质。

9. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述病毒样颗粒由重组 RNA 噬菌体 fr 蛋白质组成。

10. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述病毒样颗粒包含重组 RNA 噬菌体 AP205 蛋白质。

11. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述病毒样颗粒由重组 RNA 噬菌体 AP205 蛋白质组成。

12. 如权利要求 2 所述的组合物,其中所述重组蛋白质包含 RNA 噬菌体外壳蛋白。

13. 如权利要求 2 所述的组合物,其中所述重组蛋白质由 RNA 噬菌体外壳蛋白组成。

14. 如权利要求 12 或 13 所述的组合物,其中所述 RNA 噬菌体外壳蛋白的氨基酸序列为选自下面的氨基酸序列:

- (a) SEQ ID NO:4;
- (b) SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 的混合物;
- (c) SEQ ID NO:6;
- (d) SEQ ID NO:7;
- (e) SEQ ID NO:8;
- (f) SEQ ID NO:9;
- (g) SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 的混合物;
- (h) SEQ ID NO:11;
- (i) SEQ ID NO:12;
- (j) SEQ ID NO:13;
- (k) SEQ ID NO:14;
- (l) SEQ ID NO:15;
- (m) SEQ ID NO:16;或
- (n) SEQ ID NO:28。

15. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述第二附着位点能通过至少一个共价键缔合所述第一附着位点。

16. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述第二附着位点能通过至少一个非肽键缔合所述第一附着位点。

17. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述 A β 1-6 肽与所述核心颗粒融合。

18. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述 A β 1-6 肽选自:

- (a) 氨基酸序列为 SEQ ID NO:75 的人 A β 1-6 肽;
- (b) 氨基酸序列为 SEQ ID NO:76 的小鼠 A β 1-6 肽;
- (c) 氨基酸序列为 SEQ ID NO:84 的灵长类 A β 1-6 肽;
- (d) 氨基酸序列为 SEQ ID NO:85 的兔 A β 1-6 肽;
- (e) 氨基酸序列为 SEQ ID NO:86 的光滑爪蟾 A β 1-6 肽;
- (f) 氨基酸序列为 SEQ ID NO:87 的大鼠 A β 1-6 肽;或
- (g) 氨基酸序列为 SEQ ID NO:88 的豚鼠 A β 1-6 肽。

19. 如权利要求 1 所述的组合物,其中所述 A β 1-6 肽的氨基酸序列为 SEQ ID NO:75。
20. 如权利要求 1 所述的组合物,其还包含氨基酸接头,其中所述氨基酸接头包含所述第二附着位点。
21. 如权利要求 1 所述的组合物,其还包含氨基酸接头,其中所述氨基酸接头由所述第二附着位点组成。
22. 如权利要求 20 或 21 所述的组合物,其中所述第二附着位点或具有所述第二附着位点的所述氨基酸接头与所述 A β 1-6 肽在其 C 末端结合。
23. 如权利要求 20 或 21 所述的组合物,其中所述第二附着位点或具有所述第二附着位点的所述氨基酸接头选自:
- (a) GGC;
 - (b) GGC-CONH₂;
 - (c) GC;
 - (d) GC-CONH₂;
 - (e) C;和
 - (f) C-CONH₂。
24. 如权利要求 1 所述的组合物,其中具有所述第二附着位点的所述 A β 1-6 肽是 NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂。
25. 如权利要求 24 所述的组合物,其中所述病毒样颗粒是 RNA 噬菌体 Q β 外壳蛋白的病毒样颗粒。
26. 一种药物组合物,其包含:
- (a) 如权利要求 1-25 中任一项所述的组合物;和
 - (b) 可接受的药物学载体。
27. 如权利要求 26 所述的药物组合物,其还包含佐剂。
28. 如权利要求 26 所述的药物组合物,其中所述药物组合物无佐剂。
29. 一种疫苗组合物,其包含权利要求 1-25 中任一项所述的组合物。
30. 如权利要求 29 所述的疫苗组合物,其还包含佐剂。
31. 如权利要求 29 所述的疫苗组合物,其中所述疫苗组合物无佐剂。
32. 一种疫苗组合物,其包含权利要求 26-28 中任一项所述的药物组合物。
33. 一种制备权利要求 1-25 中任一项所述的组合物的方法,该方法包括:
- (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 噬菌体的病毒样颗粒;
 - (b) 提供至少一个具有至少一个第二附着位点的 A β 1-6 肽;并且其中所述第二附着位点选自:
 - (i) 非天然存在于所述 A β 1-6 肽上的附着位点;和
 - (ii) 所述 A β 1-6 肽上天然存在的附着位点;且其中所述第二附着位点能缔合所述第一附着位点;和
 - (c) 混合所述核心颗粒和所述至少一个 A β 1-6 肽,其中所述 A β 1-6 肽和所述核心颗粒通过所述缔合相互作用以形成有序和重复的抗原阵列。
34. 权利要求 1-25 中任一项所述的组合物在制备用于治疗阿尔茨海默氏病的药物中

的用途。

35. 权利要求 26-28 中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗阿尔茨海默氏病的药物中的用途。

36. 权利要求 29-32 中任一项所述的疫苗组合物在制备用于治疗阿尔茨海默氏病的药物中的用途。

含有淀粉样 β 1-6 抗原阵列的疫苗组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学、病毒学、免疫学和医学领域。本发明提供了包含有序重复抗原或抗原决定簇阵列的组合物,特别是 A β 1-6 肽-VLP 组合物。更具体地,本发明提供了包含病毒样颗粒和与其结合的至少一个 A β 1-6 肽的组合物。本发明也提供了用于产生此缀合物或有序重复阵列的方法。本发明组合物可用于阿尔茨海默氏病的治疗性疫苗的生产 and 用作预防或治愈阿尔茨海默氏病及有效地诱导免疫应答,特别是抗体免疫应答的药物。而且,本发明组合物特别可用于有效地诱导自身特异性免疫应答。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默氏病 (AD) 是 (65 岁和更年长) 老年人中痴呆的最常见原因,并且对于公众健康是一个严重负担。例如,在美国,报道有 4 百万人患有这种疾病。预期该疾病的发病率将随着人口老龄化而增加。

[0003] 阿尔茨海默氏病的主要病理学征兆是与年龄有关的行为改变、 β 淀粉状蛋白沉积为不溶斑块 (称为神经炎斑块或 AD 斑块)、神经元内由 τ 蛋白质组成的神经原纤维缠结和整个前脑的神经元损失。除了在 (65 岁或更年长) 老年发生的晚发性 AD 外,还有 35 和 60 岁之间发生的早发性 AD,家族性 AD (FAD)。AD 病理学异常在 FAD 中比在晚发或散发性 AD 中更普遍、严重和早发生。APP 基因、早老素 (presenilin) 1 和早老素 2 基因中的突变与 FAD 相关。

[0004] 如所述,阿尔茨海默氏病 (AD) 中的一个关键性事件是淀粉样蛋白沉积为不溶性纤维块 (淀粉样病变, amyloidogenesis), 产生了细胞外神经炎斑块和脑血管壁周围的沉积物 (综述参见 Selkoe, D. J. (1999) Nature. 399, A23-31)。尽管神经炎斑块和嗜刚果红血管病含有其它蛋白质诸如糖胺聚糖和载脂蛋白,但是这些沉积物的主要组分是淀粉样 β 肽 (A β)。A β 从称为淀粉样前体蛋白质 (APP) 的大得多糖蛋白蛋白酶解切下, APP 包括具有单疏水跨膜区和 695-770 个氨基酸的多种同种型。A β 形成了长度不超过 43 个氨基酸的一组肽,其显示了相当大的氨基和羧基末端异质性 (截短) 及修饰 (Roher, A. E., Palmer, K. C., Chau, V., & Ball, M. J. (1988) J. Cell Biol. 107, 2703-2716. Roher, A. E., Palmer, K. C., Yurewicz, E. C., Ball, M. J., & Greenberg, B. D. (1993) J. Neurochem. 61, 1916-1926)。主要的同种型是 A β 1-40 和 1-42。它具有形成 β 片层的高度倾向,而后者可聚集为原纤维,这最终导致淀粉样蛋白质。

[0005] A β 肽在阿尔茨海默氏病神经病理学中具有重要作用。A β 肽的区域特异性细胞外积累伴随着小神经胶质细胞增生 (microgliosis)、细胞骨架改变、营养不良性神经炎和突触损失。这些病理学改变被认为与定义该疾病的认知下降有关。

[0006] 在 EP 526' 511 中描述了在没有任何佐剂且淀粉样 β 蛋白质或 A β 1-28 与载体没有任何连接的情况下,以多达 10^{-2} mg/剂量的量施用淀粉样 β 蛋白质,或者具体地是 A β 1-28,用于治疗阿尔茨海默氏病。

[0007] 其他人也已经通过 A β 肽联合佐剂进行给药的方式诱导了抗 A β 1-42 的细胞或体

液免疫应答。在阿尔茨海默氏病的转基因小鼠模型中,动物超量表达含有突变APP(717)V-F的人类淀粉样前体蛋白质(PDAPP-小鼠;Johnson-Wood, K. 等, Proc. Natl. Acad. USA 94:1550-1555, Games, D. 等, Nature 373:523-527(1995a)),引起了 $A\beta_{1-42}$ 超量产生并出现了斑块、营养不良性神经炎、突触前末端损失、星形胶质细胞增生和小神经胶质细胞增生。在最近研究中,据 Schenk, D. 等(Nature 400:173-77(1999)和 W099/27944)的报道,在最初4次免疫中向6周龄PDAPP小鼠给药混合有人类中不能使用的强佐剂(CFA/IFA)的聚集 $A\beta_{1-42}$,接着在随后免疫中,给药PBS中聚集的 $A\beta_{1-42}$,基本上防止了斑块形成和有关的营养不良性神经炎。相同作者还报道了利用相同策略免疫年长小鼠(11月龄)也显著地降低了阿尔茨海默氏病(AD)样神经病学的程度和进展。在W099/27944的实施例III(抗确立的AD的治疗效力的筛选)中报道了从利用上述策略免疫的小鼠获得的脾细胞的增殖,表明通过接种方法诱导了 $A\beta_{1-42}$ 特异性T细胞。W099/27944中报道了 $A\beta$ 片段与山羊抗小鼠IgG的偶联,以及在佐剂CFA/IFA存在的情况下用所述偶联片段进行的免疫。W099/27944中也公开了包含与多肽诸如白喉毒素连接的 $A\beta$ 片段的组合物在促进抗 $A\beta$ 免疫应答中的用途。然而,没有提供免疫数据。

[0008] 已经证明识别 $A\beta$ N末端(1-16)内表位的单克隆抗体(抗体6C6)保护PC12细胞免受纤维性 β 淀粉样蛋白的神经毒性损害,并且体外使 β 淀粉样蛋白解聚(Solomon B. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1997))。也已证明抗 $A\beta_{1-28}$ 形成的单克隆抗体可以体外抑制 β 淀粉样蛋白聚集(Solomon B. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1996))。Frenkel 等(J. Neuroimmunol. 88:85-90(1998))后来鉴定了两个抗聚集抗体10D5和6C6的表位,即表位“EFRH”,也即 $A\beta_{3-6}$ 。相反,对 $A\beta_{1-7}$ 特异的抗体不能防止 β 淀粉样蛋白聚集(Frenkel D. 等, J. Neuroimmunol. 95:136-142(1999))。

[0009] $A\beta_{1-42}$ 具有形成原纤维的性质,并且实际上W099/27944中所述的疫苗组合物利用的是经处理能形成聚集体的 $A\beta_{1-42}$ 。已经证明这些原纤维对神经元细胞培养物是毒性的(Yankner 等., Science 245:417-420(1989)),并且当将其注射到动物大脑中也观察到了毒性作用(Sigurdson 等, Neurobiol. Aging 17:893-901(1996); Sigurdson 等, Neurobiol. Aging 18:591-608(1997))。Walsh 等, (Nature 416:535-539(2002))报道了在细胞内小泡中形成 $A\beta$ 天然寡聚体。这些寡聚体在大鼠体内抑制了长期的强化作用(potentiation),并且当以在人类大脑和脑脊髓液中发现的浓度存在时破坏了突触可塑性。

[0010] 在另一个研究中, Bard, F. 等. (Nature Medicine 6:916-19(2000))报道了尽管相对适度的血清水平,但是抗 $A\beta_{1-42}$ 抗体的外周给药能降低淀粉样蛋白负担。该研究利用了抗 $A\beta_{1-42}$ 多克隆抗体,或抗来源于 $A\beta$ 不同区域的合成片段的单克隆抗体。因此,抗 $A\beta$ 肽抗体的诱导具有作为阿尔茨海默氏病潜在治疗法的希望。

[0011] W099/27949中描述了与 β 淀粉样斑块有关的抗原(诸如 β 淀粉样肽和 $A\beta_{1-40}$)的粘膜给药。据说粘膜给药可以抑制与阿尔茨海默氏病有关的一些细胞因子应答,并且增强与炎性应答抑制有关的另一些细胞因子应答,其中该炎性应答与该疾病有关。据认为通过“激发以抗炎性细胞因子模式为特征的T细胞”可以抑制炎性应答。如W099/27949中所述适宜的抗原包括对AD特异并被人类或动物宿主的免疫T细胞识别的抗原。

[0012] W001/18169中描述了单克隆抗体所识别的 $A\beta$ 表位与丝状噬菌体外壳蛋白的融

合。用在外壳蛋白 VIII 上显示 15mer 表位 VHEPHEFRHVALNPV (SEQ ID NO :89) 的丝状噬菌体免疫小鼠,产生了识别 A β 1-16 和 A β 1-40 的抗体。利用 A β 肽在抑制性 ELISA 中证明了这点,并且发现用 A β 1-40 抑制血清与 A β 1-16 的结合具有 1 μ M 的 IC₅₀。然而,Solomon (WO 01/18169) 没有提示由带有表位 VHEPHEFRHVALNPV (SEQ ID NO :89) 的丝状噬菌体引起的抗血清能结合 AD 淀粉样斑块或神经炎斑块。

[0013] 利用不同于待激发的免疫应答所要针对的抗原的序列进行免疫有大量的缺点。首先,可以诱导针对抗原或抗原决定簇以外的序列部分的抗体。其次,在外源侧翼序列元件背景中的抗原构象可能不同于全长抗原背景中的抗原构象。因此,尽管可以激发与抗原交叉反应的抗体,但是它们对抗原的结合可能是次最佳的。这样激发的抗体的精确特异性也可能不对应于抗抗原本身引起的抗体的特异性,因为表位中存在不同于全长 A β 上残基的另外侧链。最后,15mer 氨基酸序列可以含有 T 细胞表位。WO 01/18169 中也公开了丝状噬菌体外壳蛋白质 III 上表位 YYEFRH (SEQ ID NO :90) 的展示,其中每个噬菌体上通常只存在 3-5 个拷贝。当使用感染性噬菌体作为用于免疫的载体时出现了几个问题。首先,对于大的免疫运动,大规模和足够量生产感染剂是有问题的。其次,疫苗中含有抗生素抗性基因的噬菌体 DNA 的存在也是有问题的,并且是安全性问题。最后,在使用非感染性噬菌体作为疫苗的情况下,大量噬菌体辐射的可行性和效力尚未解决。

[0014] WO 01/62284 已经描述了 A β 类似物,其中修饰 A β 以包括 T 辅助细胞表位。用 A β 类似物免疫具有人类 APP 转基因的 TgRND8+ 小鼠比在没有佐剂情况下用 A β 1-42 免疫产生了高 4 到 7.5 倍的抗体效价。

[0015] 最近的研究证明通过免疫接种诱导大脑淀粉样蛋白沉积物减少有改进认知功能的潜力 (Schenk, D., 等 Nature 400 :173-177 (1999) ;Janus, C. 等, Nature 408 :979-982 (2000) ;Morgan, D. 等, Nature 408 :982-985 (2000))。

[0016] 用佐剂 QS21 中聚集的 A β 1-42 免疫的患者的尸体解剖表明,存在 T 淋巴细胞脑膜脑炎和巨噬细胞对脑白质的浸润 (Nicoll, J. A. 等, Nature Med. 9 :448-452 (2003))。

[0017] 最近,出版物已经报道了在用聚集的 A β 1-42 和 QS-21 佐剂组成的疫苗 AN1792 免疫的患者中的 18 例脑膜脑炎 (Orgogozo J.-M. 等, Neurology 61 :46-54 (2003))。据报道 T 细胞活化是对该疾病负责的潜在机制,但在疾病和血清抗 A β 1-42 效价之间没有明显的关系。

[0018] 公认单独给药纯化的蛋白质通常不足以激发强免疫应答;分离的抗原一般必需与称为佐剂的辅助物质一起施用。在这些佐剂中,施用的抗原可以免于被快速降解,并且佐剂可以造成抗原的低水平延长释放。在本发明中,A β 肽通过结合 VLP 而具有免疫原性,并且不需要佐剂。

[0019] 因此,改进接种效率的一种方法是增加所施用抗原的重复程度。不同于分离的蛋白质,在有和无 T 细胞辅助及不存在任何佐剂的情况下,病毒都可以诱导快速和有效的免疫应答 (Bachmann&Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol :15 :235-270 (1991))。尽管病毒常常由少数蛋白质组成,但是它们能触发比它们的分离成分强得多的免疫应答。对于 B 细胞应答,已知病毒免疫原性的一个至关重要的因素是表面表位的重复性和有序性。许多病毒显示了准晶体表面,该表面展示出一个有规则的表位阵列,这些表位可以有效地与 B 细胞上的表位特异性免疫球蛋白交联 (Bachmann&Zinkernagel, Immunol. Today 17 :553-558 (1996))。

与 B 细胞上表面免疫球蛋白的这种交联是直接诱导细胞周期进程和 IgM 抗体产生的强活化信号。而且,这种触发的 B 细胞能活化 T 辅助细胞,接着在 B 细胞中诱导从 IgM 到 IgG 抗体产生的转换和长寿记忆 B 细胞的产生——任何接种的目的 (Bachmann&Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol :15 :235-270(1997))。病毒结构甚至可以与自身免疫病中抗 - 抗体的产生相联系,作为针对病原体的天然应答的一部分 (参见, Fehr, T. 等, J Exp. Med. 185 : 1785-1792(1997))。因此,通过高度有组织的病毒表面呈递的抗体能诱导强抗 - 抗体应答。

[0020] 然而,如所述的,免疫系统通常不能产生抗来源于自身的结构的抗体。对于低浓度存在的可溶抗原而言,这是由 Th 细胞水平上的耐受性所致。在这些条件下,将自身抗原与可以递送 T 辅助的载体偶联可以打破耐受性。对于高浓度存在的可溶蛋白质或低浓度的膜蛋白质, B 和 Th 细胞可以是耐受性的。然而, B 细胞的耐受性可能是可逆的 (无反应性), 并且可以通过施用偶联外源载体的高度有组织形式的抗原来破坏 (Bachmann&Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol :15 :235-270(1997))。如 2002 年 1 月 18 日提交的,正在审查的美国申请号 10/050,902 中所表明的,用包含与 VLP 结合的 A β 肽 (A β 1-15, A β 1-27 和 A β 33-42, 其是小鼠的自身抗原) 的组合物可以诱导强免疫应答。具体地,结合 RNA 噬菌体 Q β VLP 的上述人类 A β 肽在人类 APP 转基因小鼠中诱导了高 A β 特异性效价 (实施例中所述), 这证明用结合 VLP 的 A β 肽免疫可以克服对自身抗原 A β 的耐受性。

[0021] 因此,为了治疗阿尔茨海默氏病,需要高免疫原性的安全组合物和疫苗,特别是,利用无可以激发副反应的 T 细胞表位和佐剂但仍能诱导结合淀粉样斑块的高抗体效价的免疫原。

[0022] 发明概述

[0023] 我们发现 A β 1-6 肽与具有固有重复组织结构的核心颗粒,特别是病毒样颗粒 (VLP) 或 VLP 亚单位结合形成的高度有序和重复的缀合物,是用于诱导 A β 1-6 特异性抗体的有效免疫原。因此,本发明提供了用于阿尔茨海默氏病治疗的预防和治疗手段,该手段基于有序和重复的 A β 1-6- 核心颗粒阵列,特别是基于 VLP-A β 1-6 肽缀合物或阵列。这种预防和治疗剂能诱导高效价抗 A β 1-6 肽抗体,该抗体与可溶 A β 交叉反应,并且能结合人类 APP 转基因小鼠模型中的人类淀粉样斑块以及结合 AD 淀粉样斑块。而且,此激发的抗体不与大脑切片上的 APP 结合。

[0024] 此外,本发明提供了用于 AD 治疗的新的组合物、疫苗和方法。包含 A β 1-6 肽的此组合物和疫苗无 T 细胞表位,并且能诱导结合 AD 斑块和可溶 A β 的抗体。通过使 A β 1-6 肽结合核心颗粒,优选地结合 VLP,甚至更优选地结合 RNA 噬菌体的 VLP, A β 1-6 肽以高度重复和有序的方式被呈递给患者的免疫系统。

[0025] 在优选的实施方式中,抗原或抗原决定簇是人类淀粉样 β 肽 A β 1-6 (DAEFRH ;SEQ ID NO :75), 其是 A β (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (SEQ ID NO :91) 的片段,其中人类淀粉样 β 肽 A β 1-6 与核心颗粒或 VLP 结合。SEQ ID NO :92 中提供了淀粉样 β 蛋白质。SEQ ID NO :93 中提供了淀粉样 β 前体蛋白。

[0026] 因此,本发明提供了组合物,该组合物包含 : (a) 具有至少一个第一附着位点的核心颗粒 ; 和 (b) 至少一个具有至少一个第二附着位点的抗原或抗原决定簇,其中所述抗原或抗原决定簇是 A β 1-6 肽,并且其中所述第二附着位点选自 : (i) 非天然存在于所述抗原或抗原决定簇中的附着位点 ; 和 (ii) 所述抗原或抗原决定簇中天然存在的附着位点,其中

所述第二附着位点能与所述第一附着位点缔合 (association); 并且其中所述抗原或抗原决定簇和所述核心颗粒通过所述缔合相互作用以形成有序和重复的抗原阵列。适于本发明中使用的核心颗粒的优选实施方式是病毒、病毒样颗粒、噬菌体、RNA 噬菌体的病毒样颗粒, 细菌菌毛或鞭毛或具有能形成本发明的有序和重复抗原阵列的固有重复结构的任何其它核心颗粒。

[0027] 本发明的 A β 片段是可溶的, 并且一般地不形成团聚体。而且, 它们与核心颗粒或 VLP 结合, 并且优选地共价结合。因此, 本发明组合物不具有诱导有毒作用, 诸如作为淀粉样沉积物的种子的危险。

[0028] 用包含结合核心颗粒或 VLP 的 A β 1-6 肽的组合物可以获得与可溶 A β 和 AD 淀粉样斑块交叉反应的高效价抗体, 这是本发明的意外发现。特别地, 已经证明 VLP 可以介导抗自身抗原的抗体诱导, 由此破坏自身耐受性 (WO 02/056905, 这里整体将该文献的公开内容并入为参考文献)。而且, 该表位的小尺寸也排除了 T 细胞表位的存在, 因此提供了不诱导 A β 特异性 T 细胞应答的新组合物。此外, 所激发的抗体不结合大脑切片上的 APP。因此, 本发明提供了用于 AD 预防和治疗的安全疫苗组合物。

[0029] 更具体地, 本发明提供了包含有序重复抗原或抗原决定簇阵列, 特别是 A β 1-6 肽-VLP 缀合物的组合物。更具体地, 本发明提供了包含病毒样颗粒和与其结合的至少一个 A β 1-6 肽的组合物。本发明也提供了用于产生此缀合物或有序重复阵列的方法。本发明组合物可以用于生产治疗阿尔茨海默氏病的疫苗, 和用做药物以预防或治愈阿尔茨海默氏病和有效地诱导免疫应答, 特别是抗体应答。而且, 在本上下文中, 本发明组合物尤其可用于有效地诱导自身特异性免疫应答。

[0030] 在本发明中, A β 1-6 肽典型地以定向方式结合核心颗粒或 VLP, 从而产生有序和重复的 A β 1-6 肽抗原阵列。而且, 核心颗粒或 VLP 的高度重复有组织结构可以介导 A β 肽以高度有序的重复方式进行展示, 产生高度有组织的重复抗原阵列。而且, 因为核心颗粒和 VLP 对用核心颗粒-A β 1-6 肽阵列或 VLP-A β 1-6 肽阵列免疫的宿主是外源的, 所以 A β 1-6 肽与核心颗粒或 VLP 的结合也提供了 T 辅助细胞表位。这些阵列尤其在它们高度有组织的结构、维度和阵列表面抗原的重复性方面不同于现有技术的缀合物。

[0031] 在本发明的一个方面, 化学合成 A β 1-6 肽, 而从适于核心颗粒或 VLP 折叠和装配的表达宿主中表达和纯化核心颗粒或 VLP。然后, 通过 A β 1-6 肽与核心颗粒或 VLP 的结合, 装配 A β 1-6 肽阵列。

[0032] 在另一个方面, 本发明提供了组合物, 该组合物包含 (a) 病毒样颗粒, 和 (b) 至少一个抗原或抗原决定簇, 其中所述抗原或抗原决定簇是 A β 1-6 肽, 并且其中所述至少一个抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒结合。

[0033] 在另一个方面, 本发明提供了药物组合物, 该药物组合物包含 (a) 本发明组合物, 和 (b) 可接受的药物学载体。

[0034] 在另一个方面, 本发明提供了包含如下组合物的疫苗组合物, 其中所述组合物包含 (a) 病毒样颗粒; 和 (b) 至少一个抗原或抗原决定簇, 其中所述抗原或抗原决定簇是 A β 1-6 肽; 并且其中所述至少一个抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒结合。

[0035] 在另一个方面, 本发明提供了免疫方法, 该方法包括向动物施用本发明组合物、本发明药物组合物或本发明疫苗。

[0036] 在再一方面,本发明提供了制备本发明组合物的方法,该方法包括 (a) 提供病毒样颗粒;和 (b) 提供至少一个抗原或抗原决定簇,其中所述抗原或抗原决定簇是 A β 1-6 肽; (c) 混合所述病毒样颗粒和所述至少一个抗原或抗原决定簇,使得所述至少一个抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒结合。

[0037] 相似地,本发明提供了制备权利要求 1 的组合物的方法,该方法包括 (a) 提供具有至少一个第一附着位点的核心颗粒;(b) 提供至少一个具有至少一个第二附着位点的抗原或抗原决定簇,其中所述抗原或抗原决定簇是 A β 1-6 肽;并且其中所述第二附着位点选自:(i) 非天然存在于所述抗原或抗原决定簇中的附着位点;和 (ii) 所述抗原或抗原决定簇中天然存在的附着位点;并且其中所述第二附着位点能缔合所述第一附着位点;和 (c) 混合所述核心颗粒和所述至少一个抗原或抗原决定簇,其中所述抗原或抗原决定簇和所述核心颗粒通过所述缔合相互作用以形成有序和重复的抗原阵列。

[0038] 在另一方面,本发明提供了权利要求 1 的组合物用于制备治疗阿尔茨海默氏病药物的用途。

[0039] 在另一方面,本发明提供了权利要求 1 的组合物用于制备预防或治疗阿尔茨海默氏病的药物的用途。而且,在另一方面,本发明提供了权利要求 1 的组合物单独或联合其它药剂或者以明确缺少特殊物质诸如佐剂的形式用于制备治疗或预防阿尔茨海默氏病和/或刺激哺乳动物免疫系统的组合物、药物组合物、疫苗、药剂或药物的用途。

[0040] 因此,特别地,本发明提供了适于预防和/或减轻阿尔茨海默氏病或其相关病症的疫苗组合物。本发明还提供了用于预防和/或减轻人类的阿尔茨海默氏病或其相关病症的免疫或接种方法。可以预防地或治疗地施用本发明组合物。

[0041] 在具体实施方式中,本发明提供了预防和/或减弱由“自身”基因产物,即这里所用的“自身抗原”引起或加重的阿尔茨海默氏病或其相关病症的方法。在相关实施方式中,本发明提供了在动物或个体中诱导免疫学应答的方法,该方法导致可以预防和/或减弱由“自身”基因产物引起或加重的阿尔茨海默氏病或其相关病症的抗体产生。

[0042] 如本领域普通技术人员所理解的,当向动物或人类给药本发明组合物时,它们可以是含有盐、缓冲液、佐剂或期望用于改进组合物效力的其它物质的组合物。大量的文献包括 Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A, 编辑, Mack Publishing Co. (1990)) 中提供了适于在药物组合物制备中使用的物质的例子。

[0043] 如果受体个体可以耐受本发明组合物的施用,那么称本发明组合物是“药理学可接受的”。而且,将以“治疗有效量”(即,产生期望的生理学作用的量)施用本发明组合物。

[0044] 可以用本领域已知的各种方法给药本发明组合物,但是正常地,通过注射、输注、吸入、口服或其它适合的物理方法给药。做为可替代方案,可以肌内地、静脉内地、或皮下地给药该组合物。用于给药的组合物成分包括无菌水性(例如,生理盐水)或非水性溶液和悬浮液。非水溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油诸如橄榄油和可注射的有机酯诸如油酸乙酯。载体或封闭敷料可以用于增加皮肤渗透性和增强抗原吸收。

[0045] 基于本领域已知的现有技术、下面的附图、本发明说明书和权利要求,本发明的其它实施方式对本领域普通技术人员将显而易见。

附图说明

[0046] 图 1 描述了还原条件下电泳的 SDS-PAGE 凝胶, 表明 A β 1-6 肽 (NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO:77) 与 Q β 外壳蛋白的 VLP 偶联的结果。

[0047] 图 2 表示在用偶联 Q β 外壳蛋白的 VLP 的 A β 1-6 肽免疫的小鼠血清中, 对 A β 1-6 特异性抗体的 ELISA 分析。

[0048] 图 3 表示在用偶联 Q β 外壳蛋白的 VLP 的 A β 1-6 肽免疫的小鼠血清中, 对 A β 1-40 特异性抗体的 ELISA 分析。

[0049] 图 4A-B 表示用偶联 Q β 外壳蛋白的 VLP 的 A β 1-6 肽免疫的小鼠的血清染色的 APP23 小鼠大脑切片 (A) 和 AD 患者 entorhinalcortex 切片 (B)。

[0050] 图 5A-E 表示用偶联 Q β 外壳蛋白 VLP 的 A β 1-6 肽免疫的小鼠的血清或者用对人或小鼠 APP 之 C 末端特异的多克隆兔抗血清染色的 APP23 小鼠大脑切片。

[0051] 图 6 表示用 ELISA 试验测得的、用偶联 Q β VLP 的人类 A β 1-6 肽免疫恒河猴的结果。

[0052] 图 7 表示通过组织学在人类 AD 和转基因小鼠斑块上测定到的、斑块与血清的结合结果, 其中所述血清来源于用偶联 Q β VLP 的人类 A β 1-6 肽免疫的猴子。

[0053] 图 8 描述了对鼠 A β 1-6 与 AP205VLP 偶联的 SDS-PAGE 分析。

[0054] 图 9 表示 ELISA 中测定到的、用偶联 AP205 的鼠 A β 1-6 免疫小鼠的结果。

[0055] 图 10 表示在用 Q β hA β 1-6 免疫的 9.5 至 19 个月龄的“Swedish/London”转基因小鼠的血清中, 抗 A β 40 和抗 A β 42 效价的 ELISA 分析。

[0056] 图 11 表示用 Q β hA β 1-6 或 PBS 免疫的“Swedish/London”转基因小鼠的大脑切片的免疫组织化学染色。

[0057] 图 12 表示在用 Q β hA β 1-6、Q β 或 PBS 免疫的 9.5 至 19 个月龄“Swedish/London”转基因小鼠中对斑块沉积物的定量。

[0058] 图 13 表示在用 Q β hA β 1-6 或 PBS 免疫的 13.5 至 19 个月龄“Swedish/London”转基因小鼠中对斑块沉积物的定量。

[0059] 图 14 表示在用 Q β hA β 1-6 免疫的“Swedish”转基因小鼠血清中, 针对抗 A β 40 和抗 A β 42 效价的 ELISA 分析。

[0060] 图 15 表示用 Q β hA β 1-6 或 PBS 免疫的“Swedish”转基因小鼠的大脑切片的免疫组织化学染色。

[0061] 图 16 表示在用 Q β hA β 1-6 或 PBS 免疫的“Swedish”转基因小鼠中对斑块沉积物的定量。

[0062] 发明详述

[0063] 除非另外定义, 这里所用的所有科技术语具有和本发明所属技术领域普通技术人员所通常理解的意思相同的意思。尽管在本发明实践或试验中可以使用与这里所述相似或等同的任何方法和材料, 但是, 此后描述的是优选的方法和材料。

[0064] 1 定义:

[0065] A β 1-6 肽: 这里所用的 A β 1-6 肽指具有与人类 A β 1-6 序列相应的序列或与人类 A β 1-6 序列同源的序列的肽。与人类 A β 1-6 序列同源的序列包括, 但不限于其它物种的 A β 1-6 序列, 因此包括但不限于灵长类、兔子、豚鼠、光滑爪蟾 (*xenopus laevis*)、青蛙、小鼠和大鼠 A β 1-6 序列。尽管来源于爪蟾或青蛙的 A β 1-6 序列在两个位置不同于

人类 A β 1-6,但是它们具有保守性突变 (Ala-Ser, Phe-Tyr),因此根据该定义认为它们与 A β 1-6 同源。然而,根据本发明,通常修饰 A β 1-6 肽使得第二附着位点附着于其上。优选地,用包含第二附着位点的接头或氨基酸接头修饰第二附着位点,以便结合核心颗粒或 VLP。当这里提到 A β 1-6 肽时,应该包括上述修饰的 A β 1-6 肽,即具有附着于其上的第二附着位点的 A β 1-6 肽。然而,通常地,本申请文件中明确地指出这种修饰。而且,随着本说明书的进行,作为本发明抗原或抗原决定簇的 A β 1-6 肽的其它优选实施方式将变得显而易见。

[0066] 佐剂:这里所用术语“佐剂”指免疫应答的非特异性刺激物或允许在宿主中产生贮库 (depot) 的物质,当其与本发明疫苗或药物组合物联合时可以提供更强的免疫应答。可以使用各种佐剂。例子包括完全和不完全弗氏佐剂,氢氧化铝和修饰的胞壁酰二肽。其它佐剂是矿物凝胶诸如氢氧化铝、表面活性物质诸如溶血卵磷脂、pluronic polyol、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔械血蓝蛋白、二硝基苯酚和潜在有用的人类佐剂诸如 BCG (卡介菌) 和短小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。这些佐剂也是本领域已知的。可以与本发明组合物一起给药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 (Alum), MF-59, OM-174, OM-197, OM-294 和病毒体佐剂技术。佐剂也可以包含这些物质的混合物。

[0067] 来源于南美洲树 *Quillaja Saponaria Molina* 树皮的具有佐剂活性的免疫学活性皂苷级分是本领域已知的。例如 QS21,也称为 QA21,是来源于 *Quillaja Saponaria Molina* 树的 Hplc 纯化级分,并且在美国专利号 5,057,540 中公开了它的生产方法 (做为 QA21)。Scott 等, *Int. Archs. Allergy Appl. Immun.*, 1985, 77, 409 也公开了 *Quillaja* 皂苷作为一种佐剂。单磷酸脂质 A 和其衍生物是本领域已知的。优选的衍生物是 3-脱氧-酰化单磷酸脂质 A,见英国专利号 2220211。W000/00462 中描述了其它优选的佐剂,这里将这篇文献的公开内容并入为参考文献。

[0068] 然而,本发明有利的特征是本发明组合物高度的免疫原性。如这里已概述的或者随着本说明书的进行将变得显而易见的,本发明在备选的或优选的实施方案中提供了无佐剂的疫苗和药物组合物,从而产生了用于治疗 AD 的疫苗和药物组合物,该疫苗和药物组合物无佐剂并且因此具有优良的安全性质,因为佐剂可能引起副作用。在涉及用于治疗 AD 的疫苗和药物组合物时,这里所用的术语“无”指所使用的疫苗和药物组合物没有佐剂。

[0069] 氨基酸接头:如这里所使用的,本说明书中“氨基酸接头”,或也称为“接头”在于连接第二附着位点与抗原或抗原决定簇,或者更优选地,其已经包含或含有第二附着位点,典型地,但不是必需地,所述第二附着位点为一个氨基酸残基,优选地为半胱氨酸残基。然而,即使由氨基酸残基组成的氨基酸接头是本发明优选的实施方式,但是这里使用的术语“氨基酸接头”并没有意指这种氨基酸接头专门地由氨基酸残基组成。氨基酸接头的氨基酸残基优选地由本领域已知的天然氨基酸或非天然氨基酸,全 L 或全 D 或其混合物组成。然而,包含具有巯基或半胱氨酸残基的分子的氨基酸接头也包括在本发明中。这种分子优选地包含 C1-C6 烷基-、环烷基 (C5, C6)、芳基或杂芳基组成部分。然而,除了氨基酸接头外,优选地包含 C1-C6 烷基-、环烷基 (C5, C6)、芳基或杂芳基组成部分并且无任何氨基酸的接头也包括在本发明范围内。抗原或抗原决定簇或可选地第二附着位点和氨基酸接头之间的连接优选地通过至少一个共价键,更优选地通过至少一个肽键进行。

[0070] 动物 :这里使用的术语“动物”意在包括例如人类、绵羊、麋鹿、鹿、黑尾鹿、貂、哺乳动物、猴子、马、牛、猪、山羊、狗、猫、大鼠、小鼠、鸟、鸡、爬行动物、鱼、昆虫和蛛形纲动物。

[0071] 抗体 :这里所用术语“抗体”指能结合表位或抗原决定簇的分子。该术语意在包括整个抗体和其抗原结合片段,包括单链抗体。最优选地,抗体是人抗原结合抗体片段,并且包括,但不限于 Fab, Fab' 和 F(ab')₂, Fd, 单链 Fvs(scFv), 单链抗体, 二硫键连接的 Fvs(sdFV) 及含有 V_L 或 V_H 结构域的片段。抗体可以来源于任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,抗体是人、鼠、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡抗体。这里所用术语“人”抗体包括具有人类免疫球蛋白氨基酸序列的抗体,并包括从人类免疫球蛋白文库分离的抗体或者从具有一种或多种人类免疫球蛋白转基因并且不表达内源免疫球蛋白的动物分离的抗体,例如,参见 Kucherlapati 等的美国专利号 5,939,598。

[0072] 抗原 :这里所用术语“抗原”指能被抗体结合或者在被 MHC 分子呈递后能被 T 细胞受体 (TCR) 结合的分子。这里所用术语“抗原”也包括 T- 细胞表位。抗原还能被免疫系统识别和 / 或能诱导体液免疫应答和 / 或细胞免疫应答,从而激活 B- 和 / 或 T- 淋巴细胞。然而,这可能要求,至少在一些情况下,抗原含有或连接有 Th 细胞表位,并且在佐剂中给出。抗原可以有一个或多个表位 (B- 和 T- 表位)。上述特异性反应意思是指抗原典型地以高度选择性方式优先地与其相应抗体或 TCR 反应,而不与可能由其它抗原激发的大量其它抗体或 TCR 反应。这里所用抗原也可以是几种单独抗原的混合物。

[0073] 抗原决定簇 :这里所用术语“抗原决定簇”意指 B 或 T 淋巴细胞特异地识别的抗原部分。B- 淋巴细胞应答抗原决定簇产生抗体,而 T 淋巴细胞通过增殖和建立对细胞和 / 或体液免疫的介导起决定作用的效应子功能来应答抗原决定簇。

[0074] 缔合 (association) :这里所用术语“缔合”当用于第一和第二附着位点时,指第一和第二附着位点的结合,优选地通过至少一个非肽键结合。缔合的性质可以是共价的、离子的、疏水的、极性的或它们的任何组合,优选地缔合的性质是共价的。

[0075] 第一附着位点 :这里所用短语“第一附着位点”指非天然或天然来源的元件,位于抗原或抗原决定簇上的第二附着位点可以与其缔合。第一附着位点可以是蛋白质、多肽、氨基酸、肽、糖、多核苷酸、天然或合成聚合物,次生代谢物或化合物 (生物素、荧光素、视黄醇、地高辛配基、金属离子、苯甲基磺酰氟化合物),或它们的联合或者它们的化学反应基团。通常地和优选地,第一附着位点位于核心颗粒诸如,优选地病毒样颗粒的表面。多个第一附着位点通常以重复构型存在于核心或病毒样颗粒的表面。

[0076] 第二附着位点 :这里所用短语“第二附着位点”指与抗原或抗原决定簇连接的元件,位于核心颗粒或病毒样颗粒表面上的第一附着位点可以与其缔合。抗原或抗原决定簇的第二附着位点可以是蛋白质、多肽、肽、糖、多核苷酸、天然或合成聚合物、次生代谢物或化合物 (生物素、荧光素、视黄醇、地高辛配基、金属离子、苯甲基磺酰氟化合物),或它们的联合或者它们的化学反应基团。至少一个第二附着位点存在于抗原或抗原决定簇上。因此,术语“具有至少一个第二附着位点的抗原或抗原决定簇”指包含至少该抗原或抗原决定簇和该第二附着位点的抗原或抗原性构建体。然而,特别是对于非天然来源,即,不天然出现在抗原或抗原决定簇中的第二附着位点,这些抗原或抗原性构建体包含“氨基酸接头”。

[0077] 结合 :这里所用术语“结合”指可以是共价的 (例如通过化学偶联) 或非共价的 (例如离子相互作用、疏水相互作用、氢键等) 结合或附着。共价键可以是例如酯、醚、磷酸

酯、酰胺、肽、二酰亚胺、碳-硫键、碳-磷键等等。术语“结合”更广义，并且包括术语诸如“偶联”、“融合”和“附着”。

[0078] 外壳蛋白：这里所用术语“外壳蛋白”指能掺入噬菌体或 RNA 噬菌体的衣壳装配物中的噬菌体或 RNA 噬菌体蛋白质。然而，当指 RNA 噬菌体外壳蛋白基因的具体基因产物时，使用术语“CP”。例如，RNA 噬菌体 Q β 外壳蛋白基因的具体基因产物称为“Q β CP”，而噬菌体 Q β 的“外壳蛋白”包括“Q β CP”及 A1 蛋白质。噬菌体 Q β 的衣壳主要由 Q β CP 组成，具有少量的 A1 蛋白质。同样地，VLP Q β 外壳蛋白主要包含 Q β CP，具有少量的 A1 蛋白质。

[0079] 核心颗粒：这里所用术语“核心颗粒”指具有固有重复组织的刚性结构。这里所用核心颗粒可以是合成过程的产物或者是生物学过程的产物。

[0080] 偶联的：这里所用术语“偶联的”指通过共价键或通过强的非共价相互作用的附着，通常和优选地指通过共价键的附着。本发明中可以使用本领域技术人员通常用于生物活性材料偶联的任何方法。

[0081] 有效量：这里所用术语“有效量”指实现期望的生物学作用所必需的量或足以实现期望的生物学作用的量。组合物的有效量将是达到选定结果的量，并且该量可以由本领域技术人员常规地确定。例如，治疗免疫系统缺陷的有效量可以是引起免疫系统活化所必需的量，一旦暴露于抗原，这种量将引起抗原特异性免疫应答形成。该术语也与“足够量”同义。

[0082] 表位：这里所用术语“表位”指在动物，优选哺乳动物，最优选人中，具有抗原或免疫原活性的多肽的连续或不连续部分。在 MHC 分子背景中表位可以被 T 细胞通过其 T 细胞受体识别，或者表位可以被抗体识别。这里所用术语“免疫原性表位”定义为通过本领域已知的任何方法进行测定，可以在动物中激发抗体应答或诱导 T 细胞应答的多肽部分（参见，例如，Geysen 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :3998-4002 (1983)）。如这里所用术语“抗原性表位”定义为通过本领域已知的任何方法进行测定，抗原蛋白质中可以与抗体免疫特异性结合的部分。免疫特异性结合排除了非特异性结合，但是不一定排除与其它抗原的交叉反应性。抗原性表位不必一定是免疫原性的。抗原性表位也可以是 T 细胞表位，在这种情况下，它们可以在 MHC 背景下，免疫特异性地结合 T 细胞受体。

[0083] 表位可以在表位独特的空间构象中包含 3 个氨基酸。一般地，表位由至少约 5 个这种氨基酸组成，更一般地，由至少约 8-10 个这种氨基酸组成。如果表位是有机分子，那么它可以如硝基苯基一样小。

[0084] 融合：这里所用术语“融合”指不同来源的氨基酸序列通过它们的编码核苷酸序列的读框内组合而在一个多肽链中组合。术语“融合”明确地包含内部融合，即，不同来源的序列除了融合在多肽链一个末端外，还可以插入到多肽链中。

[0085] 免疫应答：这里所用术语“免疫应答”指引起 B 和 / 或 T- 淋巴细胞和 / 或抗原呈递细胞激活或增殖的体液免疫应答和 / 或细胞免疫应答。然而，在一些情况下，免疫应答可能具有低的强度，并且只有当使用至少一种本发明物质时才可检测。“免疫原性”指用于刺激生物体免疫系统的试剂，由此免疫系统的一种或多种功能将被增强并且定向于此免疫原性剂。“免疫原性多肽”是在佐剂存在或不存在的条件下，单独地或是以连接载体的形式激发细胞和 / 或体液免疫应答的多肽。优选地，可以活化抗原呈递细胞。

[0086] “增强”免疫应答的物质是这样的一种物质，即当与没有添加该物质时测定的相同

免疫应答比较,添加该物质时观察到免疫应答被增强或强化或发生偏离。例如,可以在免疫期间利用或不利用该物质并获取样品,然后可以在样品中利用⁵¹Cr 释放试验测定细胞毒性 T 细胞的裂解活性。与没有该物质时的 CTL 裂解活性比较,该物质增强 CTL 裂解活性时的量称为足以增强动物对抗原的免疫应答的量。在优选的实施方式中,免疫应答增强至少 2 倍,更优选地增强至少约 3 倍或更多。也可以改变所分泌的细胞因子的量和类型。做为可以替代的方案,可以改变诱导的抗体或其亚型的量。

[0087] 免疫:这里所用术语“免疫”或相关术语指赋予产生抗靶抗原或表位的实质性免疫应答(包括抗体和/或细胞免疫诸如效应 CTL)的能力。这些术语不要求产生完全的免疫,而是要求产生实质上比基线大的免疫应答。例如,如果本发明方法应用后,出现了对抗靶抗原的细胞和/或体液免疫应答,那么就认为哺乳动物被免疫了。

[0088] 天然来源:这里所用术语“天然来源”意指物质的整体或其部分不是合成的,而是自然界中存在或产生的。

[0089] 非天然的:这里所用术语“非天然的”一般意指不是来源于自然界的,更具体地,该术语意指来源于人工的。

[0090] 非天然来源:这里所用术语“非天然来源”一般意指合成的或者不是来源于自然界的;更具体地,该术语意指来源于人工的。

[0091] 有序和重复的抗原或抗原决定簇阵列:这里所用术语“有序重复的抗原或抗原决定簇阵列”一般地指抗原或抗原决定簇的重复模式,其特征在于抗原或抗原决定簇相对于核心颗粒或病毒样颗粒为一种典型地且优选地一致的空间排列。在本发明一个实施方式中,重复模式可以是几何学模式。适宜的有序重复抗原或抗原决定簇阵列的典型和优选例子是具有严格重复的抗原或抗原决定簇次晶晶序的阵列,优选地具有 0.5 到 30 纳米晶面间距(spacing),优选地 5 到 15 纳米晶面间距。

[0092] 菌毛:这里所用术语“菌毛”指细菌细胞的细胞外结构,其由组织成有序重复模式的蛋白质单体(例如菌毛蛋白单体)组成。而且,菌毛是参与诸如细菌细胞附着宿主细胞表面受体、细胞间遗传交换和细胞-细胞识别等过程的结构。菌毛的例子包括类型 1 菌毛、P 菌毛、F1C 菌毛、S 菌毛和 987P 菌毛。下面列出了菌毛的其它例子。

[0093] 菌毛样结构:这里所用短语“菌毛样结构”指与菌毛具有相似特征并由蛋白质单体组成的结构。“菌毛样结构”的一个例子是表达修饰的菌毛蛋白的细菌细胞形成的结构,该修饰的菌毛蛋白不形成与天然菌毛相同的有序重复阵列。

[0094] 多肽:这里所用术语“多肽”指由通过酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)组成的分子。它指氨基酸的分子链,并且不指产物的特定长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽和蛋白质都包括在多肽定义中。该术语也意指多肽的表达后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。重组或衍生多肽不一定从指定核酸序列翻译而成。其也可以通过任何方法,包括化学合成来产生。

[0095] 残基:这里所用术语“残基”意指多肽主链或侧链中具体的氨基酸。

[0096] 自身抗原:这里所用术语“自身抗原”指宿主 DNA 编码的蛋白质,并且通过宿主 DNA 编码的蛋白质或 RNA 产生的产物也定义为自身的。此外,由 2 种或几种自身分子联合产生的蛋白质,或者是作为自身分子一部分的蛋白质,及与上述两种自身分子具有高度同源性(> 95%,优选地> 97%,更优选地> 99%)的蛋白质也可以认为是自身的。

[0097] 治疗:这里所用术语“治疗”或“治疗的”指预防和/或治疗。例如,当在感染性疾病方面使用该术语时,该术语指预防性治疗(该预防性治疗增加个体对病原体感染的抗性,或者换而言之,减少个体被病原体感染或个体显示出由感染引起的病征的可能性),以及个体感染后的治疗(以战胜感染,例如减少或消除感染或者防止其变得更严重)。

[0098] 疫苗:这里所用术语“疫苗”指含有本发明组合物并具有能向动物给药的形式制剂。通常地,疫苗包含常规盐水或缓冲水性溶液介质,而本发明组合物悬浮或溶解于其中。以这种形式,可以方便地使用本发明组合物以预防、改善或治疗病症。一旦将该疫苗引入到宿主中,该疫苗就能激发免疫应答,包括但不限于抗体和/或细胞因子的产生和/或细胞毒性 T 细胞、抗原呈递细胞、辅助 T 细胞、树突细胞的活化和/或其它细胞应答。

[0099] 可选地,本发明的疫苗还包含佐剂,该佐剂可以相对于本发明化合物以次要或主要比例存在。

[0100] 病毒样颗粒(VLP):这里所用术语“病毒样颗粒”指类似病毒颗粒的结构。而且,本发明病毒样颗粒由于缺少所有或部分病毒基因组,特别是病毒基因组中的复制和感染元件,所以它是非复制和非感染性的。本发明病毒样颗粒可以含有不同于其基因组的核酸。本发明病毒样颗粒的典型和优选的实施方式是病毒衣壳,诸如病毒,噬菌体或 RNA 噬菌体的病毒衣壳。这里可交换地使用的术语“病毒衣壳”和“衣壳”指由病毒蛋白质亚单位组成的大分子装配物。典型并优选地,病毒蛋白质亚单位装配成病毒衣壳或衣壳,所述衣壳的结构具有固有的重复组织,其中所述结构通常是球形或管状。例如, RNA 噬菌体或 HBcAg 的衣壳具有二十面对称的球形。这里所用术语“衣壳样结构”指由病毒蛋白质亚单位组成的大分子装配物,其形态类似上述意义的衣壳,但是偏离典型的对称装配,而是维持了足够程度的有序和重复性。

[0101] 噬菌体的病毒样颗粒:这里所用术语“噬菌体的病毒样颗粒”指类似噬菌体结构的病毒样颗粒,其是非复制和非感染性的,并且缺少至少一种或多种编码噬菌体复制机器的基因,并且典型地也缺少一种或多种编码负责病毒附着或进入到宿主中的蛋白质的基因。然而,该定义也应该包括这样的噬菌体病毒样颗粒,其中前述一种或多种基因仍旧存在但是已失活,因此也导致非复制和非感染性的噬菌体病毒样颗粒。

[0102] RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP:从 RNA 噬菌体外壳蛋白的 180 个亚单位自装配形成的、可选地含有宿主 RNA 的衣壳结构称为“RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP”。一个具体例子是 Q β 外壳蛋白的 VLP。在这种特定情况下, Q β 外壳蛋白的 VLP 可以仅由 Q β CP 亚单位装配(Q β CP 亚单位通过 Q β CP 基因表达产生,该基因含有例如 TAA 终止密码子,从而通过阻抑作用排除了更长 A1 蛋白质的任何表达,参见 Kozlovskaya, T. M., 等, Intervirology 39: 9-15(1996)),或者还可以在衣壳装配物中含有 A1 蛋白质亚单位。

[0103] 病毒颗粒:这里所用术语“病毒颗粒”指病毒的形态学形式。在一些病毒类型中,它包括蛋白质衣壳环绕的基因组;其它病毒还具有另外的结构(例如,包膜,尾等)。

[0104] 一个/一种:除非另有说明,当在本公开中使用术语“一个/一种”时,它们意指“至少一个/一种”或者“一个/种或多个/种”。

[0105] 如本领域技术人员所清楚的,本发明一些实施方式涉及到使用重组核酸技术诸如克隆、聚合酶链式反应、DNA 和 RNA 的纯化、原核生物和真核生物细胞中重组蛋白质的表达等。这些方法是本领域技术人员公知的,并且在出版的实验室方法手册中可以方便地找到

(例如, Sambrook, J. 等, 编辑, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Ausubel, F. 等, 编辑, Current Protocols in Molecular Biology, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997))。在文献中也充分描述了与组织培养细胞系有关的基本实验技术 (Celis, J., 编辑, Cell Biology, Academic Press, 第二版, (1998)) 和抗体技术 (Harlow, E. 和 Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988); Deutscher, M. P., " Guide to Protein Purification, " Meth. Enzymol. 128, Academic Press San Diego (1990); Scopes, R. K., Protein Purification Principles and Practice, 第三版, Springer-Verlag, New York (1994)), 这里将这些文献并入为参考文献。

[0106] 2. 增强免疫应答的组合物和方法

[0107] 本公开的发明提供了用于在动物中诱导抗 A β 1-6 肽免疫应答, 诱导能结合 A β 淀粉样斑块和可溶 A β 的抗体的组合物和方法。本发明组合物包含, 或者可替代地其组成为: (a) 具有至少一个第一附着位点的核心颗粒; 和 (b) 至少一个具有至少一个第二附着位点的抗原或抗原决定簇, 其中所述抗原或抗原决定簇是 A β 1-6 肽, 并且其中所述第二附着位点选自: (i) 非天然存在于所述抗原或抗原决定簇中的附着位点; 和 (ii) 所述抗原或抗原决定簇中天然存在的附着位点, 其中所述第二附着位点能与所述第一附着位点缔合; 并且其中所述抗原或抗原决定簇和所述核心颗粒通过所述缔合相互作用以形成有序和重复的抗原阵列。更具体地, 本发明组合物包含或者可替代地其组成为病毒样颗粒和至少一个抗原或抗原决定簇, 其中所述抗原或抗原决定簇是 A β 1-6 肽, 并且其中所述至少一个抗原或抗原决定簇与病毒样颗粒结合以形成有序和重复的抗原-VLP 阵列。而且, 本发明能使实施者方便地构建这种组合物, 特别是用于阿尔茨海默氏病治疗和 / 或预防。本申请范围中的病毒样颗粒指类似于病毒颗粒但是没有致病性的结构。一般地, 病毒样颗粒缺少病毒基因组, 因此是非感染性的。而且, 通过异源表达可以大量产生病毒样颗粒, 并且可以容易地进行纯化。

[0108] 在一个实施方式中, 核心颗粒包含或者选自病毒、细菌菌毛、从菌毛蛋白形成的结构、噬菌体、病毒样颗粒、RNA 噬菌体病毒样颗粒、病毒衣壳颗粒或其重组形式。本领域已知的具有有序和重复外壳和 / 或核心蛋白质结构的任何病毒都可以选作本发明的核心颗粒; 适宜病毒的例子包括新培斯病毒和其它甲病毒, 弹状病毒 (例如, 水泡性口膜炎病毒), 细小核糖核酸病毒 (例如人鼻病毒, Aichi 病毒), 披膜病毒 (例如, 风疹病毒), 正粘病毒 (例如, Thogoto 病毒, Batken 病毒, 家禽瘟疫病毒), 多瘤病毒 (例如, 多瘤病毒 BK, 多瘤病毒 JC, 禽多瘤病毒 BFDV), 细小病毒, 轮状病毒, 诺沃克病毒, 口蹄疫病毒、逆转录病毒, 乙型肝炎病毒, 烟草花叶病毒, Flock House Virus, 和人乳头瘤病毒, 并且优选 RNA 噬菌体, 噬菌体 Q β , 噬菌体 R17, 噬菌体 M11, 噬菌体 MX1, 噬菌体 NL95, 噬菌体 fr, 噬菌体 GA, 噬菌体 SP, 噬菌体 MS2, 噬菌体 f2, 噬菌体 PP7 (例如, 参见 Bachmann, M. F. 和 Zinkernagel, R. M., Immunol. Today 17:553-558 (1996) 中的表 1)。

[0109] 在另一实施方式中, 本发明利用病毒基因工程, 在有序和重复的病毒包膜蛋白和第一附着位点之间产生融合, 所述第一附着位点包含或者可替代地或优选地其是选定的异源蛋白质、肽、抗原决定簇或反应性氨基酸残基。本发明组合物的构建还可能使用本领域已知的其它基因操作; 例如, 可能期望通过基因突变限制重组病毒的复制能力。而且, 由于化

学或物理失活作用,或者如所述,由于缺少能复制的基因组,本发明所用病毒不能复制。选定用于和第一附着位点融合的病毒蛋白质应该具有有组织的重复结构。这种有组织的重复结构包括病毒表面上的准晶体组织,具有 5-30nm,优选地 5-15nm 晶面间距。这种类型融合蛋白质的产生将在病毒表面上导致许多有序重复的第一附着位点,并且反映天然病毒蛋白质的正常组织。如本领域技术人员所理解的,第一附着位点可以是任何适宜的蛋白质、多肽、糖、多核苷酸、肽(氨基酸)、天然或合成聚合物、次级代谢物或它们的联合,或者它们的一部分,它们可以用来特异性附着抗原或抗原决定簇,从而形成有序和重复抗原阵列。

[0110] 在本发明另一个实施方式中,核心颗粒是重组甲病毒,并且更具体地,是重组新培斯病毒。甲病毒是正链 RNA 病毒,它们在感染细胞的胞质中完整地复制它们的基因组 RNA,并且没有 DNA 中间体 (Strauss, J. 和 Strauss, E., Microbiol. Rev. 58 :491-562(1994))。甲病毒科的几个成员,新培斯病毒 (Xiong, C. 等, Science 243 :1188-1191(1989); Schlesinger, S., Trends Biotechnol. 11 :18-22(1993)), 塞姆利基森林病毒 (Semliki forestvirus, SFV) (**Liljeström**, P. & Garoff, H., Bio/Technology 9 :1356-1361(1991)) 和其它病毒 (Davis, N.L. 等, Virology 171 :189-204(1989)) 已经接受了相当多的关注,其被用做各种不同蛋白质的病毒基表达载体 (Lundstrom, K., Curr. Opin. Biotechnol. 8 :578-582(1997); **Liljeström**, P., Curr. Opin. Biotechnol. 5 :495-500(1994)) 和用做疫苗研制的候选者。最近,已经授予了涉及甲病毒在异源蛋白质表达和疫苗研制中的用途的大量专利(参见美国专利号 5,766,602 ;5,792,462 ;5,739,026 ;5,789,245 和 5,814,482)。如这里并入为参考文献的前述文献所述,通过重组 DNA 技术领域一般已知的方法,可以构建本发明的甲病毒核心颗粒。

[0111] 可以使用各种不同的重组宿主细胞来产生用于抗原或抗原决定簇附着的基于病毒的核心颗粒。例如,已知甲病毒具有广泛的宿主范围;新培斯病毒感染培养的哺乳动物、爬行动物和两栖动物细胞及一些昆虫细胞 (Clark, H., J. Natl. Cancer Inst. 51 :645(1973); Leake, C., J. Gen. Virol. 35 :335(1977); Stollar, V. in THE TOGAVIRUSES, R. W. Schlesinger, 编辑, Academic Press, (1980), 583-621 页)。因此,在本发明实践中可以使用多种重组宿主细胞。BHK, COS, Vero, HeLa 和 CHO 细胞特别适于异源蛋白质的产生,因为它们有潜能以与人类细胞相似的方式糖基化异源蛋白质 (Watson, E. 等, Glycobiology 4 :227, (1994)), 并且可以经选择 (Zang, M. 等, Bio/Technology 13 :389(1995)) 或者基因工程改造 (Renner W. 等, Biotech. Bioeng. 4 :476(1995); Lee K. 等, Biotech. Bioeng. 50 :336(1996)) 在无血清培养基中及悬浮液中生长。

[0112] 通过标准实验室手册(参见,例如 Sambrook, J. 等, 编辑, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989), 9 章; Ausubel, F. 等, 编辑, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997), 16 章) 中所述方法, 包括诸如电穿孔、DEAE 葡聚糖介导的转染、转染、显微注射、阳离子脂质介导的转染、转导、scrape loading、生物弹道引入和感染, 可以实现将多核苷酸载体引入到宿主细胞中。在 Felgner, P. 等, 美国专利号 5,580,859 中讨论了将外源 DNA 序列引入到宿主细胞中的方法。

[0113] 包装的 RNA 序列也可以用于感染宿主细胞。可以通过将这些包装的 RNA 序列添加

到培养基中,以便将其引入宿主细胞中。例如,在大量文献,包括“新培斯病毒表达系统”,C 版本 (Invitrogen 目录号 .K750-1) 中描述了非感染性甲病毒颗粒的制备。

[0114] 当哺乳动物细胞用作产生基于病毒的核心颗粒的重组宿主细胞时,一般地,将在组织培养基上培养这些细胞。在培养基中培养细胞的方法是本领域已知的(参见,例如 Celis, J., 编辑, *C_{ELL} B_{IOLOGY}*, Academic Press, 第二版, (1998); Sambrook, J. 等, 编辑, *M_{OLECULAR} C_{LONING}, A_{LABORATORY} M_{ANUAL}*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989); Ausubel, F. 等, 编辑, *C_{URRENT} P_{ROTOCOLS} IN M_{OLECULAR} B_{IOLOGY}*, John H. Wiley & Sons, Inc. (1997); Freshney, R., *C_{ULTURE} OF A_{NIMAL} C_{ELLS}*, Alan R. Liss, Inc. (1983))。

[0115] 适于用做本发明核心颗粒的其它 RNA 病毒例子包括,但不限于下面的病毒: 呼肠病毒科成员,包括正呼肠病毒属(哺乳动物和禽逆转录病毒的多种血清型),环状病毒属(蓝舌病病毒, Eupanga 病毒, Kemerovo 病毒, 非洲马瘟病毒和科罗拉多蜱传热病毒), 轮状病毒属(人类轮状病毒, 内布拉斯加小牛腹泻病毒, 鼠轮状病毒, 猿猴轮状病毒, 牛或绵羊轮状病毒, 禽轮状病毒); 小 RNA 病毒科, 包括肠道病毒属(脊髓灰质炎病毒, 柯萨奇病毒 A 和 B, 埃可病毒 (ECHO), 甲、丙、丁、戊和己型肝炎病毒, 猿猴肠道病毒, 鼠科脑脊髓炎 (ME) 病毒, Poliovirus muris, 牛肠道病毒, 猪肠道病毒), 心病毒属(脑心肌炎病毒 (EMC), Mengovirus), 鼻病毒属(人类鼻病毒, 包含至少 113 种亚型; 其它鼻病毒), Aphovirus 属(口蹄疫病毒 (FMDV); Calciviridae 科, 包括猪水疱疹病毒, San Miguel 海狮病毒, 猫小 RNA 病毒和诺沃克病毒; 披膜病毒科, 包括甲病毒属(东方马脑炎病毒, Semliki forest 病毒, 新培斯病毒, 屈曲病毒, 0' Nyong-Nyong 病毒, 罗斯河病毒, 委内瑞拉马脑炎病毒, 西部马脑炎病毒), 黄病毒属(蚊传播的黄热病毒, 登革病毒, 日本脑炎病毒, St. Louis 脑炎病毒, Murray 河谷脑炎病毒, 西尼罗病毒, Kunjin 病毒, 中欧蜱传病毒, 远东蜱传病毒, Kyasanur 森林病毒, 羊跳跃病 III 病毒, Powassan 病毒, Omsk 出血热病毒), 风疹病毒属(风疹病毒), 瘟病毒属(粘膜病病毒, 猪霍乱病毒, Border disease 病毒); 布尼亚病毒科, 包括布尼亚病毒属(Bunyamwera 病毒和相关病毒, 加利福尼亚脑炎病毒组), 白蛉病毒属(白蛉热 Sicilian 病毒, 山谷热病毒), 纳伊罗病毒属(克里米亚-刚果出血热病毒, 内罗毕绵羊病毒), 和乌库病毒属(Uukuniemi 和相关病毒); 正粘病毒科, 包括流感病毒属(甲型流感病毒, 许多人类亚型), 猪流感病毒, 禽和马流感病毒, 乙型流感病毒(许多人类亚型), 和丙型流感病毒(可能单独的属); 副粘病毒科, 包括副粘病毒属(1 型副流感病毒, 仙台病毒, 血细胞吸附病毒, 副流感病毒 2 到 5 型, 新城疫病毒, 腮腺炎病毒), 麻疹病毒属(麻疹病毒, 亚急性硬化全脑炎病毒, 犬瘟病毒, 牛瘟病毒), 肺病毒属(呼吸道合胞病毒 (RSV), 牛呼吸道合胞病毒和小鼠肺炎病毒); 森林病毒, 新培斯病毒, 屈曲病毒, 0' Nyong-Nyong 病毒, 罗斯河病毒, 委内瑞拉马脑炎病毒, 西部马脑炎病毒), 黄病毒属(蚊传播的黄热病毒, 登革病毒, 日本脑炎病毒, St. Louis 脑炎病毒, Murray 河谷脑炎病毒, 西尼罗病毒, Kunjin 病毒, 中欧蜱传病毒, 远东蜱传病毒, Kyasanur 森林病毒, 羊跳跃病 III 病毒, Powassan 病毒, Omsk 出血热病毒), 风疹病毒属(风疹病毒), 瘟病毒属(粘膜病病毒, 猪霍乱病毒, Boder disease 病毒); 布尼亚病毒科, 包括布尼亚病毒属(Bunyamwera 和相关病毒, 加利福尼亚脑炎病毒组), 白蛉病毒属(白蛉热 Sicilian 病毒, 山谷热病毒), 纳伊罗病毒属(克里米亚-刚果出血热病毒, 内罗毕绵羊病病毒), 和乌库病毒属(Uukuniemi 和相关病毒); 正粘病毒科, 包括流感病毒属(甲型流感病毒, 许多人类亚型); 猪流感病毒, 禽和马流感病毒; 乙型流感

病毒(许多人类亚型),和丙型流感病毒(可能单独的属);副粘病毒科,包括副粘病毒属(副流感病毒1型,仙台病毒,血细胞吸附病毒,副流感病毒2到5型,新城疫病毒,腮腺炎病毒),麻疹病毒属(麻疹病毒,亚急性硬化全脑炎病毒,犬瘟病毒,牛瘟病毒),肺病毒属(呼吸道合胞病毒(RSV),牛呼吸道合胞病毒和小鼠肺炎病毒);弹状病毒科,包括水泡性病毒(VSV)属,Chandipura病毒,Flanders-Hart Park病毒),狂犬病毒属(狂犬病病毒),鱼类弹状病毒和线状病毒(马尔堡病毒和埃博拉病毒);沙粒病毒科,包括淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCM),Tacaribe病毒复合物和拉沙病毒;冠状病毒科,包括传染性支气管炎病毒(IBV),小鼠肝炎病毒,人类肠冠状病毒和猫传染性腹膜炎(猫冠状病毒)。

[0116] 可以用做核心颗粒的示例性DNA病毒包括,但不限于:痘病毒科,包括正痘病毒属(大天花,类天花,猴痘痘苗,牛痘, Buffalopox,野兔痘, Ectromelia),野兔痘病毒属(粘液瘤,纤维瘤),禽痘病毒属(禽痘病毒,其它禽类痘病毒),山羊痘病毒属(绵羊痘,山羊痘),猪痘病毒属(猪痘),副痘病毒属(传染性小脓疱皮炎病毒,假牛痘,牛丘疹性口炎病毒);虹彩病毒科(非洲猪热病毒,蛙病毒2和3,鱼淋巴囊肿病毒);疱疹病毒科,包括 α -疱疹病毒(单纯疱疹1和2型,水痘-带状疱疹病毒,马流产病毒,马疱疹病毒2和3,假狂犬病毒,传染性牛角膜结膜炎病毒,传染性牛鼻气管炎病毒,猫鼻气管炎病毒,传染性喉气管炎病毒); β -疱疹病毒(人巨细胞病毒和猪、猴和啮齿动物的巨细胞病毒); γ -疱疹病毒(EB病毒(EBV),马立克氏病病毒,松鼠猴疱疹病毒, Herpesvirus ateles, Herpesvirussylvilagus,豚鼠疱疹病毒, Lucke 肿瘤病毒);腺病毒科,包括 Mastadenovirus 属(人类亚组A, B, C, D和E及未分组的;猿猴腺病毒(至少23种血清型),犬传染性肝炎,和牛、猪、绵羊、青蛙和许多其它物种的腺病毒,禽腺病毒属(禽类腺病毒);和不可培养的腺病毒;乳多空病毒科,包括乳头瘤病毒属(人乳头瘤病毒,牛乳头瘤病毒,兔乳头瘤病毒和其它物种的各种致病性乳头瘤病毒),多瘤病毒属(多瘤病毒,猿猴空泡病毒(SV-40),野兔空泡病毒(RKV), K病毒, BK病毒, JC病毒,和其它灵长类多瘤病毒诸如嗜淋巴细胞乳头瘤病毒);细小病毒科,包括腺相关病毒属,细小病毒属(猫泛白细胞减少病毒,牛细小病毒,犬细小病毒,阿留申貂病病毒等)。最后, DNA病毒可以包括诸如慢性传染性神经病病毒(CHINA病毒)之类的病毒。

[0117] 在其它实施方式中,细菌菌毛蛋白、细菌菌毛蛋白的亚部分,或者含有细菌菌毛蛋白或其亚部分的融合蛋白质被用于制备本发明组合物或疫苗组合物。菌毛蛋白的例子包括由大肠杆菌(*Escherichia coli*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseriameningitidis*)、淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)产生的菌毛蛋白。适于本发明使用的菌毛蛋白氨基酸序列包含 GenBank 报道 AJ000636, AJ132364, AF229646, AF051814, AF051815 和 X00981 中所述氨基酸序列,这里将这些文献所有公开的内容并入为参考文献。

[0118] 在将细菌菌毛蛋白输出到细菌外周质以前,通常加工该蛋白质以移除N末端前导序列。而且,如本领域技术人员将认识到的,用于制备本发明组合物或疫苗组合物的细菌菌毛蛋白通常将没有天然存在的前导序列。

[0119] 适于本发明使用的菌毛蛋白的一个具体例子是大肠杆菌(*E. coli*)P菌毛蛋白(GenBank报道AF237482(SEQ ID NO:1))。适于本发明使用的类型1大肠杆菌菌毛蛋白的一

个例子是具有 GenBank 报道 P04128 (SEQ ID NO :2) 中所述氨基酸序列的菌毛蛋白,其由具有 GenBank 报道 M27603 (SEQ ID NO :3) 中所述核苷酸序列的核酸编码。这里将这些 GenBank 报道所有公开的内容并入为参考文献。而且,一般地,上述蛋白质的成熟形式将被用于制备本发明的组合物或疫苗组合物。

[0120] 适于本发明实践中使用的细菌菌毛蛋白或菌毛蛋白亚部分一般将能缔合以形成有序和重复的抗原阵列。

[0121] 体外制备菌毛和菌毛样结构的方法是本领域已知的。例如, Bullitt 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :12890-12895 (1996) 描述了大肠杆菌 (E. coli) P 菌毛亚单位的体外重建。而且, Eshdat 等, J. Bacteriol. 148 :308-314 (1981) 描述了适于解离大肠杆菌类型 1 菌毛和重建菌毛的方法。简而言之,这些方法如下:在饱和盐酸胍中 37°C 温育以解离菌毛。然后,通过层析纯化菌毛蛋白,随后通过用 5mM 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸 (pH 8.0) 透析形成菌毛蛋白二聚体。Eshdat 等也发现一旦用含有 5mM $MgCl_2$ 的 5mM 三(羟甲基)氨基甲烷 (pH 8.0) 透析后菌毛蛋白二聚体将重新装配形成菌毛。

[0122] 而且,利用,例如常规的基因工程和蛋白质修饰方法,可以修饰菌毛蛋白以含有第一附着位点,其中抗原或抗原决定簇通过第二附着位点连接此第一附着位点。可替代地,抗原或抗原决定簇可以通过第二附着位点直接连接这些蛋白质中天然存在的氨基酸残基。然后,这些修饰的菌毛蛋白可以用在本发明疫苗组合物中。

[0123] 可以用这里所述用于 HBcAg 的相似方法修饰用于制备本发明组合物或疫苗组合物的细菌菌毛蛋白。例如,可以缺失或用其它氨基酸残基置换半胱氨酸和赖氨酸残基,并且可以向这些蛋白质添加第一附着位点。而且,可以以修饰形式表达菌毛蛋白或者可以在表达后化学修饰菌毛蛋白。相似地,可以从细菌收集完整的菌毛,然后化学修饰之。

[0124] 在另一个实施方式中,从细菌(例如大肠杆菌)收集菌毛或菌毛样结构,并且用于形成本发明的组合物或疫苗组合物。适于制备组合物或疫苗组合物的菌毛的一个例子是大肠杆菌类型 1 菌毛,其是从具有 SEQ ID NO :2 中所示氨基酸序列的菌毛蛋白单体形成的。

[0125] 本领域已知多种方法可用于收集细菌菌毛。例如, Bullitt 和 Makowski (Biophys. J. 74 :623-632 (1998)) 描述了用于从大肠杆菌收集 P 菌毛的菌毛纯化方法。根据该方法,从含有 P 菌毛质粒的超菌毛化大肠杆菌剪切菌毛,并且通过溶解和 $MgCl_2$ (1.0M) 沉淀循环纯化。

[0126] 一旦收获后,菌毛或菌毛样结构就可以用各种方法修饰。例如,可以向菌毛添加第一附着位点,其中抗原或抗原决定簇可以通过第二附着位点附着第一附着位点。换言之,可以收集和修饰细菌菌毛蛋白或菌毛样结构以产生有序和重复的抗原阵列。

[0127] 抗原或抗原决定簇可以与菌毛或菌毛样结构中存在的天然半胱氨酸残基或赖氨酸残基连接。在这种情况下,天然氨基酸残基的高度有序和重复性将引导抗原或抗原决定簇与菌毛或菌毛样结构偶联。例如,可以利用异双官能交联剂使菌毛或菌毛样结构与抗原或抗原决定簇的第二附着位点连接。

[0128] 当使用生物体天然合成的结构(例如,菌毛蛋白)制备本发明组合物和疫苗组合物时,基因工程改造这些生物体以使它们产生具有期望特征的结构常常是有利的。例如,当使用大肠杆菌类型 1 菌毛时,可以修饰这些菌毛的来源大肠杆菌使之产生具有特定特征的结构。可能的菌毛蛋白修饰的例子包括一个或多个赖氨酸残基的插入,一个或多个天然存

在的赖氨酸残基的缺失或置换,和一个或多个天然存在的半胱氨酸残基(例如,SEQ IDNO:2 中位置 44 和 84 的半胱氨酸残基)的缺失或置换。

[0129] 而且,可以对菌毛蛋白基因进行其它修饰,以产生含有第一附着位点(例如,FOS 或 JUN 结构域)而不是赖氨酸残基的表达产物。当然,适宜的第一附着位点一般将限于那些不会阻止菌毛蛋白形成适于用在本发明疫苗组合物中的菌毛或菌毛样结构的第一附着位点。

[0130] 可以体内(例如,通过同源重组)修饰细菌细胞中天然存在的菌毛蛋白基因,或者可以将具有特定特征的菌毛蛋白基因插入到这些细胞中。例如,菌毛蛋白基因可以作为可复制克隆载体或插入到细菌染色体中的载体的一个成分被引入到细菌细胞中。插入的菌毛蛋白基因也可以连接表达调节控制序列(例如 lac 操纵基因)。

[0131] 在大多数情况下,本发明组合物或疫苗组合物中使用的菌毛或菌毛样结构将由单一类型的菌毛蛋白亚单位组成。一般地将使用由相同亚单位组成的菌毛或菌毛样结构,因为预期它们将形成可以呈递高度有序和重复抗原阵列的结构。

[0132] 然而,本发明组合物也包括这样的组合物和疫苗,该组合物和疫苗包含由异质菌毛蛋白亚单位形成的菌毛或菌毛样结构。可以从细菌细胞中天然存在的基因表达能形成这些菌毛或菌毛样结构的菌毛亚单位,或者可以将形成这些菌毛或菌毛样结构的菌毛蛋白亚单位引入到细胞中。当在形成菌毛或菌毛样结构的细胞中表达天然存在的菌毛蛋白基因和引入的基因时,结果一般是从这些菌毛蛋白混合物形成的结构。而且,当在细菌细胞中表达两种或多种菌毛蛋白基因时,每种菌毛蛋白基因的相对表达量典型地将是决定菌毛或菌毛样结构中不同菌毛蛋白亚单位比率的因素。

[0133] 当期望菌毛或菌毛样结构具有特定的混合菌毛蛋白亚单位组成时,可以通过异源诱导型启动子调节至少一种菌毛蛋白基因的表达。这种启动子及其它遗传元件可以用于调节细菌细胞中产生的不同菌毛蛋白亚单位的相对量,并由此调节菌毛或菌毛样结构的组成。

[0134] 此外,抗原或抗原决定簇可以通过非肽键的键连接细菌菌毛或菌毛样结构,可以基因工程改造产生本发明组合物中使用的菌毛或菌毛样结构的细菌细胞以产生融合抗原或抗原决定簇的菌毛蛋白。形成菌毛或菌毛样结构的这种融合蛋白质适于本发明疫苗组合物中使用。

[0135] 在优选的实施方式中,核心颗粒是病毒样颗粒,其中病毒样颗粒是重组病毒样颗粒。利用重组 DNA 技术和公众容易得到的病毒编码序列,本领域技术人员可以制备 VLP。例如,利用商购杆状病毒载体,同时对序列进行适当修饰以允许编码序列和调节序列功能性连接,可以基因工程改造病毒包膜或核心蛋白的编码序列使之在杆状病毒表达载体中于病毒启动子调节控制下表达。也可以基因工程改造病毒包膜或核心蛋白的编码序列使之在例如细菌表达载体中表达。

[0136] VLP 的例子包括但不限于:乙型肝炎病毒衣壳蛋白(Ulrich,等,VirusRes. 50:141-182(1998)),麻疹病毒(Warnes,等,Gene 160:173-178(1995)),新培斯病毒,轮状病毒(US 5,071,651 和 US 5,374,426),口蹄疫病毒(Twomey,等,Vaccine 13:1603-1610,(1995)),诺沃克病毒(Jiang, X., 等,Science 250:1580-1583(1990)Matsui, S. M., 等,J. Clin. Invest. 87:1456-1461(1991)),逆转录病毒 GAG 蛋白质(WO 96/30523),逆

转录转座子 Ty 蛋白质 p1, 乙型肝炎病毒表面蛋白质 (WO 92/11291), 人类乳头瘤病毒 (W098/15631), RNA 噬菌体, Ty, fr- 噬菌体, GA- 噬菌体, AP205- 噬菌体和 Q β - 噬菌体。

[0137] 对本领域技术人员显而易见, 本发明 VLP 不限于任何特定的形式。可以化学地或通过生物学方法合成该颗粒, 该颗粒可以是天然或非天然的。例如, 这种类型的实施方式包括病毒样颗粒或其重组形式。

[0138] 在一个更具体的实施方式中, VLP 可以包含重组多肽或其片段, 或者可替代地基本上由, 或者可替代地由重组多肽或其片段组成, 所述重组多肽可以选自轮状病毒重组多肽, 诺沃克病毒重组多肽, 甲病毒重组多肽, 口蹄疫病毒重组多肽, 麻疹病毒重组多肽, 新培斯病毒重组多肽, 多瘤病毒重组多肽, 逆转录病毒重组多肽, 乙型肝炎病毒重组多肽 (例如, HBcAg), 烟草花叶病毒重组多肽, 兽棚病毒 (Flock House Virus) 重组多肽, 人乳头瘤病毒重组多肽, 噬菌体重组多肽, RNA 噬菌体重组多肽, Ty 重组多肽, fr 噬菌体重组多肽, GA 噬菌体重组多肽和 Q β 噬菌体重组多肽。病毒样颗粒还可以包含这些多肽的一个或多个片段及这些多肽的变体, 或者可替代地基本上由或可替代地由这些多肽的一个或多个片段及这些多肽的变体组成。多肽变体与它们的野生型对应物在氨基酸水平上可以共有例如至少 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 或 99% 的同一性。

[0139] 在优选的实施方式中, 病毒样颗粒包含重组 RNA 噬菌体蛋白质或其片段, 或者可替代地基本由或可替代地由重组 RNA 噬菌体蛋白质或其片段组成。优选地, 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。

[0140] 在本发明另一个优选实施方式中, 病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 Q β 或 RNA 噬菌体 fr 或 RNA 噬菌体 AP205 的重组蛋白质或其片段, 或者可替代地基本由或可替代地由 RNA 噬菌体 Q β 或 RNA 噬菌体 fr 或 RNA 噬菌体 AP205 的重组蛋白质或其片段组成。

[0141] 在本发明进一步优选的实施方式中, 重组蛋白质包含 RNA 噬菌体外壳蛋白, 或者可替代地基本由或可替代地由 RNA 噬菌体外壳蛋白组成。

[0142] 因此, 形成衣壳或 VLP 的 RNA 噬菌体外壳蛋白, 或与自装配为衣壳或 VLP 相容的噬菌体外壳蛋白片段是本发明的其它优选实施方式。例如, 可以在大肠杆菌 (*E. coli*) 中重组表达噬菌体 Q β 外壳蛋白。而且, 一旦进行这种表达后, 这些蛋白质将自发地形成衣壳。此外, 这些衣壳将形成具有固有重复组织的结构。

[0143] 可以用于制备本发明组合物的噬菌体外壳蛋白的具体优选例子包括 RNA 噬菌体的外壳蛋白诸如噬菌体 Q β 的外壳蛋白 (SEQ ID NO: 4; PIR 数据库, 记录号 VCBPQ β , 称为 Q β CP 和 SEQ ID NO: 5; 记录号 AAA16663, 称为 Q β A1 蛋白质), 噬菌体 R17 的外壳蛋白 (SEQ ID NO: 6; PIR 记录号 VCBPR7), 噬菌体 fr 外壳蛋白 (SEQ ID NO: 7; PIR 记录号 VCBPFR), 噬菌体 GA 外壳蛋白 (SEQ ID NO: 8; GenBank 记录号 NP-040754), 噬菌体 SP 外壳蛋白 (SEQ ID NO: 9; GenBank 记录号 CAA30374, 称为 SP CP 和 SEQ ID NO: 10; 记录号 NP 695026, 称为 SPA1 蛋白质), 噬菌体 MS2 外壳蛋白 (SEQ ID NO: 11; PIR 记录号 VCBPM2), 噬菌体 M11 外壳蛋白 (SEQ ID NO: 12; GenBank 记录号 AAC06250), 噬菌体 MX1 外壳蛋白 (SEQ ID NO: 13; GenBank 记录号 AAC14699), 噬菌体 NL95 外壳蛋白 (SEQ ID NO: 14; GenBank 记录号 AAC14704), 噬菌体 f2 外壳蛋白 (SEQ ID NO: 15; GenBank 记录号 P03611), 噬菌体 PP7 外壳蛋白 (SEQ ID

NO:16),和噬菌体 AP205 外壳蛋白 (SEQ ID NO:28)。而且,在 Q β 外壳蛋白的衣壳装配物中可以掺入噬菌体 Q β 的 A1 蛋白质 (SEQ IDNO:5) 或从其 C 末端缺失多达 100,150 或 180 个氨基酸的 C 末端截短形式。一般地,将限制衣壳装配中 Q β A1 蛋白质相对于 Q β CP 的百分比以确保衣壳形成。

[0144] 此外,已发现当在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达 Q β 外壳蛋白时,其自装配为衣壳 (Kozlovskaya TM. 等, GENE 137:133-137(1993))。所获得的衣壳或病毒样颗粒显示了具有 25nm 直径和 T = 3 准对称的二十面噬菌体样衣壳结构。而且,噬菌体 Q β 的晶体结构已经解析。衣壳含有 180 个拷贝的外壳蛋白,它们通过二硫键以共价五聚体和六聚体形式连接 (Golmohammadi, R. 等, Structure 4:543-5554(1996)),使 Q β 外壳蛋白形成的衣壳具有显著稳定性。然而,从重组 Q β 外壳蛋白制备的衣壳或 VLP 可以含有不通过或不完全通过二硫键连接衣壳中其它亚单位的亚单位。然而,VLP 中,通常约 80% 以上亚单位通过二硫键互相连接。因此,一旦将重组 Q β 衣壳加样到非还原性 SDS-PAGE 上,就可以观察到对应于单体 Q β 外壳蛋白的条带及对应于 Q β 外壳蛋白六聚体或五聚体的条带。在非还原性 SDS-PAGE 中,不完全二硫键连接的亚单位可以表现为二聚体、三聚体或甚至四聚体条带。Q β 衣壳蛋白对有机溶剂和变性剂还显示了异常的抗性。意外地,我们观察到 DMSO 和乙腈浓度高达 30% 和胍盐浓度高达 1M 不影响衣壳稳定性。Q β 外壳蛋白形成的衣壳的高度稳定性特别有利于它们在本发明的哺乳动物和人类免疫和接种中的使用。

[0145] 如我们通过 Stoll, E. 等. J. Biol. Chem. 252:990-993(1977) 中所述的 N 末端 Edman 测序所观察到的,一旦在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达后,通常 Q β 外壳蛋白的 N 末端甲硫氨酸将被移除。由没有移除 N 末端甲硫氨酸的 Q β 外壳蛋白组成的 VLP,或者含有存在或不存在 N 末端甲硫氨酸的 Q β 外壳蛋白的混合物的 VLP 也在本发明范围内。

[0146] WO 02/056905 中公开了本发明的其它优选的 RNA 噬菌体 (特别是 Q β) 的病毒样颗粒,这里将该公开内容整体并入为参考文献。

[0147] 也已经证明了其它 RNA 噬菌体外壳蛋白一旦在细菌宿主中表达就可以自装配 (Kastelein, RA. 等, Gene 23:245-254(1983), Kozlovskaya, TM. 等, Dokl. Akad. Nauk SSSR 287:452-455(1986), Adhin, MR. 等, Virology 170:238-242(1989), Ni, CZ., 等, Protein Sci. 5:2485-2493(1996), Priano, C. 等, J. Mol. Biol. 249:283-297(1995))。Q β 噬菌体衣壳除了包含外壳蛋白外,还包含通常所说的通读蛋白质 A1 和成熟蛋白质 A2。A1 通过在 UGA 终止密码子处的抑制而产生,并且其具有 329 个氨基酸的长度。本发明中所用的噬菌体 Q β 重组外壳蛋白的衣壳无 A2 裂解蛋白,并且含有来源于宿主的 RNA。RNA 噬菌体外壳蛋白是 RNA 结合蛋白,其与复制酶基因的核糖体结合位点的茎环相互作用,在病毒生命周期中充当翻译阻遏物。相互作用的序列和结构元件是已知的 (Witherell, GW. & Uhlenbeck, OC. Biochemistry 28:71-76(1989); Lim F. 等, J. Biol. Chem. 271:31839-31845(1996))。一般地,已知茎环和 RNA 参与病毒装配 (Golmohammadi, R. 等, Structure 4:543-5554(1996))。

[0148] 在本发明进一步优选的实施方式中,病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体重组蛋白质或其片段,或者可替代地基本由或可替代地由 RNA 噬菌体重组蛋白质或其片段组成,其中重组蛋白质包含 RNA 噬菌体突变外壳蛋白,优选地上述 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白,或者可替代地基本由或可替代地由 RNA 噬菌体突变外壳蛋白,优选地上述 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白

组成。在另一个优选的实施方式中,通过置换的方法移除至少一个,或者可替代地至少两个赖氨酸残基,或者通过置换的方法添加至少一个赖氨酸残基,修饰了 RNA 噬菌体突变外壳蛋白;做为可替代的方案,通过至少一个赖氨酸残基,或者可替代地至少两个赖氨酸残基的缺失,或者通过插入的方法添加至少一个赖氨酸残基,修饰了 RNA 噬菌体突变外壳蛋白。至少一个赖氨酸残基的缺失、置换或添加允许改变偶联的程度,即,每个 RNA 噬菌体 VLP 的每个亚单位上偶联的 A β 1-6 肽量,特别地以便满足和适应疫苗的要求。

[0149] 在另一个优选的实施方式中,病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 Q β 重组蛋白质或其片段,或者可替代地基本由或可替代地由 RNA 噬菌体 Q β 重组蛋白质或其片段组成,其中重组蛋白质包含具有 SEQ ID NO:4 氨基酸序列的外壳蛋白,或者具有 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:5 突变体的氨基酸序列的外壳蛋白混合物,或者可替代地基本由或可替代地由具有 SEQ ID NO:4 氨基酸序列的外壳蛋白,或者具有 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:5 突变体的氨基酸序列的外壳蛋白混合物组成,并且其中优选地切割了 N 末端甲硫氨酸。

[0150] 在本发明进一步优选的实施方式中,病毒样颗粒包含 Q β 重组蛋白质或其片段,或者可替代地基本由或可替代地由 Q β 重组蛋白质或其片段组成,其中重组蛋白质包含突变 Q β 外壳蛋白,或者可替代地基本由或可替代地由突变 Q β 外壳蛋白组成。在另一个优选的实施方式中,通过置换的方法移除至少一个赖氨酸残基,或者通过置换的方法添加至少一个赖氨酸残基,修饰了这些突变外壳蛋白质。可替代地,通过至少一个赖氨酸残基的缺失,或者通过插入的方法添加至少一个赖氨酸残基,修饰了这些突变外壳蛋白。

[0151] 4 个赖氨酸残基暴露于 Q β 外壳蛋白衣壳的表面上。用精氨酸置换了暴露的赖氨酸残基的 Q β 突变体也可以用于本发明。因此,下面的 Q β 外壳蛋白突变体和突变 Q β VLP 可以用在本发明实践中:“Q β -240”(Lys13-Arg;SEQ ID NO:17),“Q β -243”(Asn 10-Lys;SEQ ID NO:18),“Q β -250”(Lys2-Arg,Lys13-Arg;SEQ ID NO:19),“Q β -251”(SEQ ID NO:20) 和“Q β -259”(Lys 2-Arg,Lys16-Arg;SEQ ID NO:21)。因此,在本发明进一步优选的实施方式中,病毒样颗粒包含突变 Q β 外壳蛋白的重组蛋白质,或者基本由或可替代地由突变 Q β 外壳蛋白的重组蛋白质组成,该突变 Q β 外壳蛋白的重组蛋白质包含具有选自下面的氨基酸序列的蛋白质:a)SEQ ID NO:17 氨基酸序列;b)SEQ ID NO:18 氨基酸序列;c)SEQ ID NO:19 氨基酸序列;d)SEQ ID NO:20 氨基酸序列;和 e)SEQ ID NO:21 氨基酸序列。在 WO 02/056905 中描述了上述 Q β 外壳蛋白、突变 Q β 外壳蛋白 VLP 和衣壳的构建、表达和纯化。在此,特别提及上述申请的实施例 18。

[0152] 在本发明另一优选的实施方式中,病毒样颗粒包含 Q β 重组蛋白质或其片段,或者可替代地基本由或可替代地由 Q β 重组蛋白质或其片段组成,其中该重组蛋白质包含任何一个前述 Q β 突变体和相应 A1 蛋白质的混合物,或者可替代地基本由或可替代地由任何一个前述 Q β 突变体和相应 A1 蛋白质的混合物组成。

[0153] 在本发明进一步优选的实施方式中,病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 AP205 的重组蛋白质或其片段,或者可替代地基本由或可替代地由 RNA 噬菌体 AP205 重组蛋白质或其片段组成。

[0154] AP205 基因组由成熟蛋白质、外壳蛋白、复制酶和相关噬菌体中不存在的 2 个开放读框组成;所述两个开放读框是在成熟蛋白基因的翻译中起作用的一个开放读框和裂

解基因 (Klovins, J., 等, J. Gen. Virol. 83 :1523-33 (2002))。可以从质粒 pAP283-58 (SEQ ID NO :27) 表达 AP205 外壳蛋白, 所述质粒是 pQb10 (Kozlovskaya, T.M. 等, Gene 137 :133-37 (1993)) 的衍生物, 并且其含有 AP205 核糖体结合位点。AP205 外壳蛋白也可以克隆到 pQb185 中, 位于载体中存在的核糖体结合位点下游。如 2002 年 7 月 17 日提交, 名称为“分子抗原阵列” (Atty. Docket No. 1700. 0310000) 的同时待审美国临时专利申请中所述, 两种方法都导致蛋白质表达和衣壳形成, 特此将这篇专利申请的整体并入为参考文献。载体 pQb10 和 pQb185 是来源于 pGEM 载体的载体, 并且通过 trp 启动子控制这些载体中克隆基因的表达 (Kozlovskaya, T.M. 等, Gene 137 :133-37 (1993))。质粒 pAP283-58 (SEQ ID NO :27) 包含下面序列的推定的 AP205 核糖体结合位点, 该核糖体结合位点位于 XbaI 位点下游及 AP205 外壳蛋白 ATG 起始密码子紧上游: tctagaATTTTCTGCGCACCCATCCCGGTGGCGCCCAAA GTGAGGAAAATCAGatg (SEQ ID NO :57)。载体 pQb185 包含位于 XbaI 位点下游和起始密码子上游的 SD 序列 (tctagaTTAACCCAACGCGTAGGAGTCAGGCCatg (SEQ ID NO :58), 下划线的是 SD 序列)。

[0155] 在本发明另一个优选的实施方式中, 病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 AP205 的重组外壳蛋白或其片段, 或者可替代地基本由或可替代地由 RNA 噬菌体 AP205 的重组外壳蛋白或其片段组成。

[0156] 因此, 本发明的该优选实施方式包含形成衣壳的 AP205 外壳蛋白。这种蛋白质可以从天然来源制备或重组表达。如电子显微镜术 (EM) 和免疫扩散所证明的, 细菌中产生的 AP205 外壳蛋白自发形成衣壳。当在 EM 下观察时, AP205 外壳蛋白 (SEQ ID NO :28) 形成的衣壳的结构特征和 AP205 RNA 噬菌体外壳蛋白形成的衣壳的结构特征几乎不能区分。AP205 VLP 是高度免疫原性的, 并且可以连接抗原和 / 或抗原决定簇以产生疫苗构建体, 该疫苗构建体展示了以重复方式定向的抗原和 / 或抗原决定簇。激发的抗所展示抗原的高效价表明, 结合的抗原和 / 或抗原决定簇易于接近以和抗体分子发生相互作用, 并且具有免疫原性。

[0157] 在本发明另一优选的实施方式中, 病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 AP205 的重组突变外壳蛋白或其片段, 或者可替代地基本由或可替代地由 RNA 噬菌体 AP205 的重组突变外壳蛋白或其片段组成。

[0158] AP205 VLP 的能装配的突变体形式, 包括在氨基酸位置 5 具有脯氨酸到苏氨酸置换的 AP205 外壳蛋白 (SEQ ID NO :29) 也可以用在本发明实施中, 并且产生了本发明另一优选的实施方式。这些 VLP、来源于天然来源的 VLP 或 AP205 病毒颗粒可以结合抗原以产生本发明的有序重复抗原阵列。

[0159] 可以从质粒 pAP281-32 (SEQ ID No. 30) 表达 AP205 P5-T 突变外壳蛋白, 该质粒直接来源于 pQb185, 并含有代替 Q β 外壳蛋白基因的突变 AP205 外壳蛋白基因。将用于 AP205 外壳蛋白表达的载体转染到大肠杆菌 (E. coli) 中用于 AP205 外壳蛋白的表达。

[0160] 实施例 1 中描述了自装配为 VLP 的外壳蛋白和突变外壳蛋白的表达方法。适合的大肠杆菌 (E. coli) 株系包括但不限于大肠杆菌 K802, JM 109, RR1。通过用 SDS-PAGE 检测外壳蛋白和突变外壳蛋白的表达, 并且通过可选地首先用凝胶过滤纯化衣壳并随后在免疫扩散试验 (Ouchterlony 试验) 中或电子显微镜下 (Kozlovskaya, T.M. 等, Gene 137 :133-37 (1993) 检测衣壳的形成和装配, 可以鉴定适宜的载体及株系和它们的联合。

[0161] 从载体 pAP283-58 和 pAP281-32 表达的 AP205 外壳蛋白可以由于大肠杆菌 (*E. coli*) 胞质中的加工而无最初的甲硫氨酸氨基酸。切割的、未切割形式的 AP205VLP 或其混合物是本发明另外优选的实施方式。

[0162] 在本发明另一优选的实施方式中,病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 AP205 的重组外壳蛋白或其片段和 RNA 噬菌体 AP205 重组突变外壳蛋白或其片段的混合物,或者可替代地基本由或可替代地由 RNA 噬菌体 AP205 重组外壳蛋白或其片段和 RNA 噬菌体 AP205 重组突变外壳蛋白或其片段的混合物组成。

[0163] 在本发明另一优选的实施方式中,病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 AP205 重组外壳蛋白或重组突变外壳蛋白的片段,或者可替代地基本由或可替代地由 RNA 噬菌体 AP205 重组外壳蛋白或重组突变外壳蛋白的片段组成。

[0164] 能装配为 VLP 或衣壳的重组 AP205 外壳蛋白片段也可以用于本发明实践中。可以通过在外壳蛋白或突变外壳蛋白内部或末端缺失,产生这些片段。在外壳蛋白和突变外壳蛋白序列中的插入,或者抗原序列与外壳蛋白或突变外壳蛋白序列的融合,只要与装配为 VLP 相容,均是本发明的实施方式,它们将导致嵌合 AP205 外壳蛋白或颗粒。通过电子显微镜术可以检测插入、缺失及与外壳蛋白序列融合的结果,以及其是否与装配为 VLP 相容。

[0165] 通过利用沉淀的分级步骤和利用凝胶过滤(利用例如 SepharoseCL-4B, Sepharose CL-2B, Sepharose CL-6B 柱子或它们的联合)的纯化步骤,可以分离纯化形式的由上述 AP205 外壳蛋白、外壳蛋白片段和嵌合外壳蛋白形成的颗粒。分离病毒样颗粒的其它方法是本领域已知的,并且可以用于分离噬菌体 AP205 病毒样颗粒(VLP)。例如,美国专利号 4,918,166 中描述了超离心用于分离酵母逆转录转座子 Ty VLP 的用途,这里将这篇文献整体并入为参考文献。

[0166] 已经测定了几种 RNA 噬菌体的晶体结构(Golmohammadi, R. 等, Structure 4: 543-554(1996))。利用这些信息,可以鉴定表面暴露的残基,由此可以修饰 RNA 噬菌体外壳蛋白,以便可以通过插入或置换的方法插入一个或多个反应性氨基酸残基。结果,这些修饰形式的噬菌体外壳蛋白也可以用于本发明。因此,形成衣壳或衣壳样结构的蛋白质(例如,噬菌体 Q β , 噬菌体 R17, 噬菌体 fr, 噬菌体 GA, 噬菌体 SP, 噬菌体 AP205 和噬菌体 MS2 的外壳蛋白)的变体也可以用于制备本发明组合物。

[0167] 尽管上述变体蛋白质的序列不同于它们的野生型对应物,但是这些变体蛋白质一般地将保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。因此,本发明还包括组合物或疫苗组合物,该组合物或疫苗组合物还包含形成衣壳或衣壳样结构的蛋白质的变体;本发明还包括用于制备这种组合物或疫苗组合物的方法、用于制备这种组合物的单个蛋白质亚单位,和编码这些蛋白质亚单位的核酸分子。因此,本发明范围内包括可以形成衣壳或衣壳样结构并且保留了缔合和形成衣壳或衣壳样结构的能力的野生型蛋白质的变体形式。

[0168] 由此,本发明还包括包含如下蛋白质的组合物或疫苗组合物,该蛋白质包含与野生型蛋白质至少 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 或 99% 相同的氨基酸序列,或者可替代地基本由或可替代地由与野生型蛋白质至少 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 或 99% 相同的氨基酸序列组成,该蛋白质形成有序阵列并具有固有的重复结构。

[0169] 本发明范围中还包括核酸分子,该核酸分子编码用于制备本发明组合物的蛋白质。

[0170] 在其它实施方式中,本发明还包括包含如下蛋白质的组合物,该蛋白质包含与 SEQ ID Nos :4-21 中所示任一氨基酸序列具有至少 80%,85%,90%,95%,97%,或 99%相同性的氨基酸序列,或者可替代地基本由或可替代地由与 SEQ ID Nos :4-21 中所示任一氨基酸序列具有至少 80%,85%,90%,95%,97%,或 99%相同性的氨基酸序列组成。

[0171] 适于本发明中使用的蛋白质也包括可以形成衣壳或衣壳样结构或 VLP 的蛋白质 C 末端截短突变体。这种截短突变体的具体例子包括具有 SEQ IDNos :4-21 之任一中所示的氨基酸序列的蛋白质,其中已经从 C 末端移除了 1,2,5,7,9,10,12,14,15 或 17 个氨基酸。通常地,这些 C 末端截短突变体将保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。

[0172] 适于本发明中使用的其它蛋白质也包括可以形成衣壳或衣壳样结构的蛋白质 N 末端截短突变体。这种截短突变体的具体例子包括具有 SEQ IDNos :4-21 任何一个中所示氨基酸序列的蛋白质,其中已经从 N 末端移除了 1,2,5,7,9,10,12,14,15 或 17 个氨基酸。通常地,这些 N 末端截短突变体将保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。

[0173] 适于本发明中使用的其它蛋白质包括可以形成衣壳或衣壳样结构的 N 和 C 末端截短突变体。适合的截短突变体包括具有 SEQ ID Nos :4-21 任何一个中所示氨基酸序列的蛋白质,其中已经从 N 末端移除了 1,2,5,7,9,10,12,14,15 或 17 个氨基酸,并且已经从 C 末端移除了 1,2,5,7,9,10,12,14,15 或 17 个氨基酸。通常地,这些 N 末端和 C 末端截短突变体将保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。

[0174] 本发明还包括包含如下蛋白质的组合物,该蛋白质包含与上述截短突变体具有至少 80%,85%,90%,95%,97%或 99%相同性的氨基酸序列,或者可替代地基本由或可替代地由与上述截短突变体具有至少 80%,85%,90%,95%,97%或 99%相同性的氨基酸序列组成。

[0175] 因此,本发明包括从可以形成衣壳或 VLP 的蛋白质制备的组合物和疫苗组合物,从单个蛋白质亚单位和 VLP 或衣壳制备这些组合物的方法,制备这些单个的蛋白质亚单位的方法,编码这些亚单位的核酸分子,和利用本发明组合物接种个体和 / 或在个体中激发免疫应答的方法。

[0176] 如前所述,本发明包括病毒样颗粒或其重组形式。在一个另外优选的实施方式中,本发明组合物中所使用的颗粒由乙型肝炎病毒核心蛋白质 (HBcAg) 或 HBcAg 片段组成。在另一实施方式中,本发明组合物中所使用的颗粒由经修饰去除了或减少了自由半胱氨酸残基数量的乙型肝炎病毒核心蛋白质 (HBcAg) 或 HBcAg 蛋白质片段组成。Zhou 等. (J. Virol. 66 :5393-5398(1992)) 证明了经修饰移除了天然存在的半胱氨酸残基的 HBcAg 可以保留缔合并形成衣壳的能力。因此,适于本发明组合物中使用的 VLP 包括含有修饰的 HBcAg 或其片段的 VLP,其中已经缺失或用另一种氨基酸残基(例如,丝氨酸残基)置换了一个或多个天然存在的半胱氨酸残基。

[0177] HBcAg 是通过乙型肝炎核心抗原前体蛋白质加工产生的蛋白质。已经鉴定了多种 HBcAg 同种型,并且本领域技术人员容易获得它们的氨基酸序列。在大多数情况下,将利用加工形式的 HBcAg(即,其中已经移除了乙型肝炎核心抗原前体蛋白质的 N 末端前导序列的 HBcAg) 制备本发明的组合物或疫苗组合物。

[0178] 而且,当在不会发生加工的条件下产生 HBcAg 时,一般地以“加工的”形式表达 HBcAg。例如,当将指导蛋白质胞质表达的大肠杆菌表达系统用于产生本发明 HBcAg 时,一

般地将以乙型肝炎核心抗原前体蛋白质的 N 末端前导序列不存在的方式表达这些蛋白质。

[0179] 例如,WO 00/32227 中,特别是实施例 17 到 19 和 21 到 24 中,及 WO 01/85208 中,特别是实施例 17 到 19,21 到 24,31 和 41 中以及 W002/056905 中公开了可以用于本发明的乙型肝炎病毒样颗粒的制备。对于后面的申请,特别地参考实施例 23,24,31 和 51。这里明确地将所有这 3 篇文献并入为参考文献。

[0180] 本发明也包括经修饰缺失或置换了一个或多个额外的半胱氨酸残基的 HBcAg 变体。自由半胱氨酸残基可以参与多种化学侧链反应,这是本领域已知的。这些侧链反应包括二硫化物交换,与化学物质或代谢物(注射的或在和其它物质的联合治疗中形成的)反应,或者直接氧化和与核苷酸在暴露于 UV 光后反应。特别是考虑到 HBcAg 具有结合核酸的强烈倾向这一事实,由此可能产生毒性加成物。这些毒性加成物将以多种形成分布,每种毒性加成物可能单独地以低浓度存在,但是当每种毒性加成物集合在一起时就达到毒性水平。

[0181] 鉴于上述,疫苗组合物中应用移除了天然半胱氨酸残基的修饰 HBcAg 的一个优点是,当与抗原或抗原决定簇结合后,将在数量上减少或完全地消除有毒物可以结合的位点。

[0182] 已经鉴定了适于本发明实践中使用的大量天然 HBcAg 变体。例如,Yuan 等,(J.Virol. 73 :10122-10128(1999)) 描述了其中用亮氨酸残基或苯丙氨酸残基置换了位于与 SEQ ID NO :22 中位置 97 对应的位置的异亮氨酸残基的变体。在 GenBank 报道 AAF121240,AF121239,X85297,X02496,X85305,X85303,AF151735,X85259,X85286,X85260,X85317,X85298,AF043593,M20706,X85295,X80925,X85284,X85275,X72702,X85291,X65258,X85302,M32138,X85293,X85315,U95551,X85256,X85316,X85296,AB033559,X59795,X85299,X85307,X65257,X85311,X85301(SEQ ID NO :23),X85314,X85287,X85272,X85319,AB010289,X85285,AB010289,AF121242,M90520(SEQ ID NO :24),P03153,AF110999,和 M95589 中公开了大量 HBcAg 变体及几种乙型肝炎核心抗原前体变体的氨基酸序列,这里将每个 GenBank 报道公开的内容并入为参考文献。W001/85208 中 SEQ ID NOs :89-138 中进一步公开了上述乙型肝炎核心抗原前体变体的序列。这些 HBcAg 变体在氨基酸序列的多个位置存在差异,包括对应于 SEQ ID NO :25 中 12,13,21,22,24,29,32,33,35,38,40,42,44,45,49,51,57,58,59,64,66,67,69,74,77,80,81,87,92,93,97,98,100,103,105,106,109,113,116,121,126,130,133,135,141,147,149,157,176,178,182 和 183 位置氨基酸残基的氨基酸残基。WO 00/198333,WO 00/177158 和 WO 00/214478 中描述了适于本发明组合物中使用并且可以根据本申请公开内容进行进一步修饰的其它 HBcAg 变体。

[0183] 如上所述,本发明组合物或疫苗组合物中将使用通常加工的 HBcAg(即,缺少前导序列的 HBcAg)。本发明包括利用上述变体 HBcAg 的疫苗组合物及使用这些组合物的方法。

[0184] 利用已知的计算机程序诸如 Bestfit 程序可以常规地确定是否多肽的氨基酸序列有与一种上述野生型氨基酸序列或其亚部分至少 80%,85%,90%,95%,97%或 99%相同的氨基酸序列。当使用 Bestfit 或任何其它序列比对程序以检测是否特定序列与参照氨基酸序列具有例如 95%相同性时,设定参数,以便计算和全长参照氨基酸序列相比的同一性百分数,并且允许达到参照序列中氨基酸残基总数 5%的同源性空位。

[0185] 上述 HBcAg 变体和前体的氨基酸序列相互相对地相似。因此,提到位于对应于 SEQ ID NO :25 中特定位置的位置的 HBcAg 变体氨基酸残基时,指在 SEQ ID NO :25 所示氨基酸序列中在该位置存在此氨基酸残基。在感染哺乳动物的乙型肝炎病毒中这些 HBcAg 变体

之间大部分存在足够高的同源性,这样本领域技术人员几乎毫无困难即可检阅 SEQ ID NO:25 中所示氨基酸序列和特定 HBcAg 变体的氨基酸序列,并鉴定出“相应的”氨基酸残基。而且,SEQ ID NO:24 中所示 HBcAg 氨基酸序列(显示来源于感染旱獭的病毒的 HBcAg 氨基酸序列)与具有 SEQ ID NO:25 中所示氨基酸序列的 HBcAg 有足够的同源性,因此显而易见在 SEQ ID NO:25 中,在 SEQ ID NO:25 的氨基酸残基 155 和 156 之间存在 3 个氨基酸残基插入。

[0186] 本发明也包括包含感染鸟类的乙型肝炎病毒 HBcAg 变体的疫苗组合物,及包含这些 HBcAg 变体的片段的疫苗组合物。对于这些 HBcAg 变体,在将它们包含在本发明疫苗组合物中之前,可以缺失或用另外氨基酸残基置换这些多肽中天然存在的 1 个、2 个、3 个或更多个半胱氨酸残基。

[0187] 如上所述,自由半胱氨酸残基的去除可以减少可能导致有毒成分与 HBcAg 结合的位点的数量,并且也消除可能导致相同或邻近 HBcAg 分子的赖氨酸和半胱氨酸残基发生交联的位点。因此,在本发明另一个实施方式中,已缺失或用另外的氨基酸残基置换了乙型肝炎病毒衣壳蛋白质的一个或多个半胱氨酸残基。

[0188] 在其它实施方式中,本发明组合物或疫苗组合物将包含其中移除了 C 末端区域(即,SEQ ID NO:25 的氨基酸残基 145-185 或 150-185)的 HBcAg。因此,适于本发明实践中使用的其它修饰的 HBcAg 包括 C 末端截短突变体。适宜的截短突变体包括其中已经从 C 末端移除了 1,5,10,15,20,25,30,34,35 个氨基酸的 HBcAg。

[0189] 适于本发明实践中使用的 HBcAg 也包括 N 末端截短突变体。适宜的截短突变体包括其中已从 N 末端移除了 1,2,5,7,9,10,12,14,15 或 17 个氨基酸的修饰的 HBcAg。

[0190] 适于本发明实践中使用的其它 HBcAg 包括 N 和 C 末端截短突变体。适宜的截短突变体包括已从 N 末端移除了 1,2,5,7,9,10,12,14,15 和 17 个氨基酸及从 C 末端移除了 1,5,10,15,20,25,30,34,35 个氨基酸的 HBcAg。

[0191] 本发明还包括包含 HBcAg 多肽的组合物或疫苗组合物,该 HBcAg 多肽包含与上述截短突变体具有至少 80%,85%,90%,95%,97%或 99%相同性的氨基酸序列,或者可替代地基本由或可替代地由与上述截短突变体具有至少 80%,85%,90%,95%,97%或 99%相同性的氨基酸序列组成。

[0192] 在本发明一些实施方式中,将赖氨酸残基引入 HBcAg 多肽中以介导 A β 1-6 肽与 HBcAg 的 VLP 的结合。在优选的实施方式中,利用包含 SEQ ID NO:25 氨基酸 1-144 或 1-149,1-185,或者可替代地由 SEQ ID NO:25 氨基酸 1-144 或 1-149,1-185 组成的 HBcAg 制备本发明组合物,其中所述 HBcAg 被修饰,以致对应于位置 79 和 80 的氨基酸由具有 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly(SEQ ID NO:33)氨基酸序列的肽置换,产生了具有 SEQ ID NO:26 中所示序列的 HBcAg 多肽。这些组合物对于抗原决定簇偶联 HBcAg VLP 的实施方式特别有用。在另外优选的实施方式,将 SEQ ID NO:25 位置 48 和 107 的半胱氨酸残基突变为丝氨酸。本发明还包括包含如下相应多肽的组合物,该多肽具有任何一个上述乙型肝炎核心抗原前体变体中所示的氨基酸序列并具有上述氨基酸改变。进一步包括在本发明范围中的是能缔合形成衣壳或 VLP 并且具有上述氨基酸改变的其它 HBcAg 变体。因此,本发明还包括包含 HBcAg 多肽或这些蛋白质的适当时被加工以移除 N 末端前导序列并用上述改变进行修饰的形式的组合物或疫苗组合物,其中所述 HBcAg 多肽包含与任何一种野生型氨基酸序列

具有至少 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 或 99% 相同性的氨基酸序列, 或者可替代地由与任何一种野生型氨基酸序列具有至少 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 或 99% 相同性的氨基酸序列组成。

[0193] 本发明组合物或疫苗组合物可以包含不同 HBcAg 的混合物。因此, 这些疫苗组合物可以由氨基酸序列不同的 HBcAg 组成。例如, 可以制备包含“野生型”HBcAg 和修饰的 HBcAg 的疫苗组合物, 在修饰的 HBcAg 中已改变 (例如, 缺失、插入或置换) 了一个或多个氨基酸残基。而且, 本发明优选的疫苗组合物是呈现高度有序和重复抗原阵列的疫苗组合物, 其中抗原是 A β 1-6 肽。

[0194] 在本发明另一优选的实施方式中, 至少一个 A β 1-6 肽通过至少一个共价键与所述病毒样颗粒或核心颗粒结合。优选地, 至少一个 A β 1-6 肽通过至少一个非肽键的共价键与所述病毒样颗粒或核心颗粒结合, 从而产生 A β 1-6 肽阵列或 A β 1-6 肽-VLP 缀合物。该 A β 1-6 肽阵列或缀合物通常并优选地具有重复和有序的结构, 因为至少一个 A β 1-6 肽以定向方式与 VLP 或核心颗粒结合。至少一个 A β 1-6 肽与 VLP 或核心颗粒以定向有控制的确定方式结合和附着, 确保了重复和有序的 A β 1-6 肽-VLP 阵列或缀合物的形成, 这在下文所述中将显而易见。而且, VLP 或和核心颗粒的典型固有高度重复和有组织的结构也有利于促进 A β 1-6 肽以高度有序和重复方式展示, 形成高度有组织和重复的 A β 1-6 肽-VLP 阵列或缀合物。

[0195] 因此, 优选的本发明缀合物或阵列在它们高度有组织的结构、维度方面, 和阵列表面上抗原的重复性方面不同于现有缀合物。而且, 本发明优选的实施方式允许在表达宿主中表达颗粒, 从而保证了 VLP 正确的折叠和装配, 然后, 抗原, 即 A β 1-6 肽进一步偶联该 VLP。

[0196] 本发明公开了 A β 1-6 肽结合 VLP 的方法。如所述, 在本发明的一个方面, 通过化学交联方法, 通常和优选地通过利用异双官能交联剂, 使 A β 1-6 肽结合 VLP。几种异双官能交联剂是本领域已知的。在优选的实施方式中, 异双官能交联剂含有可以与优选的第一附着位点 (即 VLP 或至少一个 VLP 亚单位的赖氨酸残基的侧链氨基) 反应的官能团, 和可以与优选的第二附着位点 (即与 A β 1-6 肽融合的和可选地通过还原反应获得的半胱氨酸残基) 反应的另一个官能团。该方法的第一步, 通常称为衍生, 是 VLP 和交联剂反应。该反应的产物是活化的 VLP, 也称为活化的载体。在第二步中, 利用通常的方法诸如凝胶过滤或透析移除未反应的交联剂。在第三步中, A β 1-6 肽与活化的 VLP 反应, 并且该步骤通常称为偶联步骤。可选地可以在第四步中, 例如通过透析, 移除未反应的 A β 1-6 肽。几种异双官能交联剂是本领域已知的。这些交联剂包括优选的交联剂 SMPH (Pierce), 磺基 -MBS, 磺基 -EMCS, 磺基 -GMBS, 磺基 -SIAB, 磺基 -SMPB, 磺基 -SMCC, SVSB, SIA 和可从例如 Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA) 获得的其它交联剂 (这些交联剂具有对氨基有活性的一个官能团和对半胱氨酸残基有活性的一个官能团)。所有上述交联剂引起了硫醚键的形成。适于本发明实践的另一类交联剂的特征在于: 一旦偶联, 就在 A β 1-6 肽和 VLP 之间引入二硫键。属于该类的优选交联剂包括例如 SPDP 和磺基 -LC-SPDP (Pierce)。可以通过改变试验条件诸如每种反应组分的浓度, 一种试剂相对于另一种试剂的过量、pH、温度和离子强度来影响交联剂对 VLP 的衍生程度。可以通过改变上述试验条件调整偶联程度, 即每个 VLP 亚单位的 A β 1-6 肽数量, 以满足疫苗要求。

[0197] A β 1-6 肽结合 VLP 的一个特别有利的方法是 VLP 表面上的赖氨酸残基和 A β 1-6 肽上的半胱氨酸残基的连接。在一些实施方式中,可能需要将含有半胱氨酸残基的氨基酸接头(半胱氨酸残基作为第二附着位点或作为接头的一部分)融合到 A β 1-6 上以便偶联 VLP。

[0198] 一般地,柔性氨基酸接头是有利的。氨基酸接头的例子选自 (a)CGG;(b)N-末端 γ 1 接头;(c)N-末端 γ 3 接头;(d)Ig 铰链区;(e)N-末端甘氨酸接头;(f)(G)_kC(G)_n, n = 0-12 且 k = 0-5 (SEQ ID NO:34);(g)N-末端甘氨酸-丝氨酸接头;(h)(G)_kC(G)_m(S)_l(GGGGS)_n, n = 0-3, k = 0-5, m = 0-10, l = 0-2 (SEQ ID NO:35);(i)GGC;(k)GGC-NH₂;(l)C-末端 γ 1 接头;(m)C-末端 γ 3 接头;(n)C-末端甘氨酸接头;(o)(G)_nC(G)_k, n = 0-12 且 k = 0-5 (SEQ ID NO:36);(p)C-末端甘氨酸-丝氨酸接头;(q)(G)_m(S)_l(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k, n = 0-3, k = 0-5, m = 0-10, l = 0-2, 且 o = 0-8 (SEQ ID NO:37)。

[0199] 氨基酸接头的其它例子是免疫球蛋白铰链区,甘氨酸丝氨酸接头 (GGGGS)_n (SEQ ID NO:38),和甘氨酸接头 (G)_n,所有这些接头还都包含做为第二附着位点的半胱氨酸残基和可选地甘氨酸残基。所述氨基酸接头的典型优选例子是 N-末端 γ 1:CGDKTHTSPP (SEQ ID NO:39);C-末端 γ 1:DKTHTSPPCG (SEQ ID NO:40);N-末端 γ 3:CGGPKPSTPPGSSGGAP (SEQ ID NO:41);C-末端 γ 3:PKPSTPPGSSGGAPGGCG (SEQ ID NO:42);N-末端甘氨酸接头:GCGGGG (SEQ ID NO:43) 和 C-末端甘氨酸接头:GGGGCG (SEQ ID NO:44)。

[0200] 当疏水性 A β 肽结合 VLP 时,特别适于本发明实践中的其它氨基酸接头是 N 末端接头 CGKKGG (SEQ ID NO:46) 或 CGDEGG (SEQ ID NO:31),或 C 末端接头 GGKKGC (SEQ ID NO:45) 和 GGEDGC (SEQ ID NO:32)。对于 C 末端接头,可选地在 C 末端酰胺化末端半胱氨酸。

[0201] 在本发明优选的实施方式中,优选在肽 C 末端以 GGCG (SEQ ID NO:47)、GGC 或 GGC-NH₂ ("NH₂" 代表酰胺化) 接头作为氨基酸接头,或在 N 末端以 CGG 作为氨基酸接头。一般地,将甘氨酸残基插入到大的氨基酸和将要用做第二附着位点的半胱氨酸之间,以避免在偶联反应中较大氨基酸可能的空间位阻。在本发明最优选的实施方式中,氨基酸接头 GGC-NH₂ 与 A β 1-6 的 C 末端融合。

[0202] A β 1-6 肽上存在的半胱氨酸残基必须是还原状态以便与活化的 VLP 上的异双官能交联剂反应,也就是说必须有可用的自由半胱氨酸或具有自由巯基的半胱氨酸残基。在起结合位点作用的半胱氨酸残基是氧化形式,例如如果它形成二硫键时,需要用例如 DTT, TCEP 或 β -巯基乙醇还原该二硫键。WO 02/056905 中描述了低浓度还原试剂与偶联相容,而如本领域技术人员所知道的,高浓度将抑制偶联反应,在这种情况下,在偶联前,必须例如通过透析、凝胶过滤或反相 HPLC 移除还原剂或降低它的浓度。

[0203] 根据上述优选的方法,通过利用异双官能交联剂使 A β 1-6 肽与 VLP 结合,将允许 A β 1-6 肽以定向方式偶联 VLP。A β 1-6 肽偶联 VLP 的其它方法包括利用碳二亚胺 EDC 和 NHS 使 A β 1-6 肽交联 VLP 的方法。在另一些方法中,利用同双官能交联剂诸如戊二醛、DSG、BM[PEO]₄、BS³ (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA) 或者具有对 VLP 的氨基或羧基有反应性的官能团的其它已知同双官能交联剂,使 A β 1-6 肽附着 VLP。

[0204] VLP 结合 A β 1-6 肽的其它方法包括生物素酰化 VLP 并且将 A β 1-6 肽作为链霉抗生物素蛋白-融合蛋白表达的方法,或者例如 WO 00/23955 中所述,生物素酰化 A β 1-6 肽和 VLP 的方法。在这种情况下,A β 1-6 肽可以首先结合链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋

白,通过调整 A β 1-6 肽与链霉抗生物素蛋白的比率,使自由结合位点仍旧可获得用于与下一步添加的 VLP 结合。做为可替代的方案,可以在“一个容器”反应中混合所有成分。其它配体-受体对也可以用做结合试剂用于结合 A β 1-6 肽和 VIP,条件是可获得该受体和配体的可溶形式,并且它们能与 VLP 或 A β 1-6 肽交联。做为可替代的方案,配体或受体可以与 A β 1-6 肽融合,并由此介导与化学结合或融合了受体或配体的 VLP 结合。通过插入或置换也可以实现融合。

[0205] 如所述,在本发明有利的实施方式中,VLP 是 RNA 噬菌体 VLP,并且在更优选的实施方式中,VLP 是 RNA 噬菌体 Q β 外壳蛋白的 VLP。

[0206] 如果空间上允许,优选地通过 RNA 噬菌体 VLP 上暴露的赖氨酸残基,一个或几个抗原分子,即 A β 1-6 肽可以与 RNA 噬菌体外壳蛋白的衣壳或 VLP 的一个亚单位结合。因此, RNA 噬菌体外壳蛋白,特别是 Q β 外壳蛋白的 VLP 的特定特征是每个亚单位可以偶联几个抗原。这样可以产生密集的抗原阵列。

[0207] 在本发明优选的实施方式中,至少一个 A β 1-6 肽与病毒样颗粒通过病毒样颗粒的至少一个第一附着位点和抗原或抗原决定簇的至少一个第二附着位点之间的相互作用或缔合而实现结合或附着。

[0208] Q β 外壳蛋白的 VLP 或衣壳在它们的表面展示了确定数量的赖氨酸残基,具有确定的拓扑结构,该拓扑结构具有指向衣壳内部并且与 RNA 相互作用的 3 个赖氨酸残基,和暴露于衣壳外部的另外 4 个赖氨酸残基。这些确定的特性有利于抗原附着到颗粒外部,而不是附着到赖氨酸残基与 RNA 相互作用的颗粒内部。其它 RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP 在它们表面也具有确定数量的赖氨酸残基,且这些赖氨酸残基具有确定的拓扑结构。

[0209] 在本发明其它优选的实施方式中,第一附着位点是赖氨酸残基和 / 或第二附着位点包含巯基或半胱氨酸残基。在本发明非常优选的实施方式中,第一附着位点是赖氨酸残基,并且第二附着位点是半胱氨酸残基。

[0210] 在本发明非常优选的实施方式中,A β 1-6 肽通过半胱氨酸残基结合 RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP (特别是 Q β 外壳蛋白的 VLP) 的赖氨酸残基。

[0211] 来源于 RNA 噬菌体的 VLP 的另一个优点是它们在细菌中高的表达产率,该高的表达产率使得可以以可担负得起的花费生产大量物质。

[0212] 如所述,本发明缀合物或阵列在它们高度有组织的结构、维度方面,和阵列表面上抗原的重复性方面不同于现有缀合物。而且将 VLP 用作载体使得可以形成具有可变抗原密度的稳固抗原阵列或缀合物。具体地, RNA 噬菌体 VLP 的应用,特别是 RNA 噬菌体 Q β 外壳蛋白 VLP 的应用允许获得非常高的表位密度。特别地,通过偶联人类 A β 1-6 肽和 Q β 外壳蛋白 VLP 可以达到每个亚单位 1.5 个以上表位的密度。利用本申请的教导可以实现具有高表位密度的 RNA 噬菌体外壳蛋白 VLP 组合物的制备。在本发明优选的实施方式中,当 A β 1-6 肽偶联 Q β 外壳蛋白 VLP 时,优选每个亚单位具有 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 或更高的平均 A β 1-6 肽数量。

[0213] 这里所定义的第二附着位点可以天然或非天然存在于抗原或抗原决定簇上。在抗原或抗原决定簇上不存在适宜的天然第二附着位点的情况下,必须进行抗原改造使其具有非天然第二附着位点。

[0214] 如上所述,4个赖氨酸残基暴露在Q β 外壳蛋白VLP表面上。通常地,这些残基通过与交联剂分子反应而衍生化。在不是所有暴露的赖氨酸残基都偶联抗原的情况下,衍生作用步骤后,留下了与交联剂反应的赖氨酸残基,其中交联剂分子附着 ϵ 氨基。这引起了对VLP溶解度和稳定性可能有害的一个或几个正电荷的消失。如在以下公开的Q β 外壳蛋白突变体中,通过用精氨酸置换一些赖氨酸残基,可以阻止正电荷过量的消失,因为精氨酸残基不与交联剂反应。而且,用精氨酸置换赖氨酸残基可以产生更确定的抗原阵列,因为较少的位点可用于和抗原反应。

[0215] 因此,在本申请中下面公开的Q β 外壳蛋白突变体和突变Q β VLP中,用精氨酸置换了暴露的赖氨酸残基:Q β -240(Lys13-Arg;SEQ ID NO:17),Q β -250(Lys 2-Arg,Lys13-Arg;SEQ ID NO:19)和Q β -259(Lys 2-Arg,Lys16-Arg;SEQ ID NO:21)。克隆构建体,表达蛋白质,纯化VLP并且用于偶联肽和蛋白质抗原。也构建了Q β -251(SEQ ID NO:20),并且在本申请中可以找到如何表达、纯化和偶联Q β -251外壳蛋白VLP的指导。

[0216] 在另一实施方式中,我们公开了具有一个额外赖氨酸残基的Q β 突变体外壳蛋白,其适用于获得甚至更高密度的抗原阵列。克隆该突变体Q β 外壳蛋白,Q β -243(Asn10-Lys;SEQ ID NO:18),表达蛋白质,并且分离和纯化了衣壳或VLP,表明额外赖氨酸残基的引入与亚单位自装配为衣壳或VLP相容。因此,利用Q β 外壳蛋白突变体的VLP可以制备A β 1-6肽阵列或缀合物。使抗原附着VLP,特别是附着RNA噬菌体外壳蛋白的VLP的一个特别有利方法是RNA噬菌体外壳蛋白VLP表面上存在的赖氨酸残基与添加在抗原(即,A β 1-6肽)上的半胱氨酸残基连接。为了半胱氨酸残基有效地做为第二附着位点,必须有用用于偶联的巯基。因此,半胱氨酸残基必须是还原状态,即,必须有可用的具有自由巯基的半胱氨酸残基或自由半胱氨酸。在起第二附着位点作用的半胱氨酸残基是氧化形式,例如如果它形成二硫键时,需要用例如DTT,TCEP或 β -巯基乙醇还原该二硫键。必须针对每种抗原调整还原剂浓度和还原剂相对抗原的摩尔过量。如果需要,检测从10 μ M或更低浓度开始直到10-20mM或更高浓度的还原剂滴定范围,并评价抗原与载体的偶联。尽管如WO 02/056905中所述低浓度还原剂与偶联反应相容,但是高浓度将抑制偶联反应,这是本领域技术人员所知道的,在这种情况下,必须例如通过透析、凝胶过滤或反相HPLC移除还原剂或降低它的浓度。有利地,透析或平衡缓冲液的pH低于7,优选地6。必须检测低pH缓冲液与抗原活性或稳定性的相容性。

[0217] 通过交联剂和其它反应条件的选择可以调节RNA噬菌体外壳蛋白VLP上的表位密度。例如,交联剂碘基-GMBS和SMPH通常允许达到高表位密度。高浓度反应剂正面影响衍生作用,并且反应条件的操纵可以用于控制偶联RNA噬菌体外壳蛋白VLP,特别是Q β 外壳蛋白VLP的抗原数量。

[0218] 在设计非天然第二附着位点之前,必须选择它应该融合、插入或一般地进行基因工程改造的位置。例如,可以根据抗原晶体结构选择第二附着位点的位置。这种抗原晶体结构可以提供关于分子C或N末端可用性(例如,从它们与溶剂的可接近性来确定)的信息,或者关于适于用做第二附着位点的残基,诸如半胱氨酸残基暴露于溶剂的信息。如Fab片段情况下,暴露的二硫键也可以是第二附着位点的来源,因为一般地通过用例如2-巯基乙醇、TCEP、 β -巯基乙醇或DTT温和还原,它们可以转化为单个的半胱氨酸残基。选择不影响抗原免疫原性的温和还原条件。一般地,在用自身抗原免疫旨在抑制该自身抗原和它

的天然配体相互作用的情况下,第二附着位点的添加方式将允许抗与天然配体相互作用的位点的抗体产生。因此,将要选择第二附着位点的位置以避免来源于第二附着位点或含有它的任何氨基酸接头的空间位阻。在其它实施方式中,期望定向于不同于自身抗原与其天然配体的相互作用位点的位点的抗体应答。在这种实施方式中,可以选择第二附着位点以使它能够阻止抗自身抗原与其天然配体的相互作用位点的抗体产生。

[0219] 选定第二附着位点位置的其它标准包括抗原的寡聚化状态,寡聚化位点,辅因子的存在,和是否可以获得抗原结构和序列中如下位点的公开试验证据,其中在所述位点的抗原修饰与自身抗原的功能相容,或者与识别自身抗原的抗体的产生相容。

[0220] 在最优选的实施方式中,A β 1-6 肽包含能与核心颗粒和 VLP 或 VLP 亚单位上第一附着位点缔合的单一第二附着位点或单一活性附着位点。这确保了至少一个,但是通常是一个以上,优选地 10, 20, 40, 80, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360, 400, 450 个以上抗原与核心颗粒或 VLP 进行确定的一致结合和缔合。因此,在抗原上提供单一第二附着位点或单一活性附着位点将确保可以导致非常高度有序和重复阵列的单一和一致类型的结合或缔合。例如,如果通过赖氨酸(做为第一附着位点)和半胱氨酸(做为第二附着位点)相互作用实现结合或缔合,根据本发明该优选实施方式,不管该半胱氨酸残基是天然的或是非天然存在于抗原上的,都将确保每个抗原仅仅一个半胱氨酸残基能结合或缔合 VLP 或核心颗粒的第一附着位点。

[0221] 在一些实施方式中,抗原上第二附着位点的改造需要融合氨基酸接头,该氨基酸接头含有适于做为根据本发明的第二附着位点的氨基酸。因此,在本发明优选的实施方式中,氨基酸接头通过至少一个共价键结合抗原或抗原决定簇。优选地,氨基酸接头包含第二附着位点,或者可替代地基本由第二附着位点组成。在进一步优选的实施方式中,氨基酸接头包含巯基或半胱氨酸残基。在另一个优选的实施方式中,氨基酸接头是半胱氨酸。上面已经提到了本发明氨基酸接头的一些选择标准及氨基酸接头的其它优选实施方式。

[0222] 在本发明另一优选的实施方式中,至少一个抗原或抗原决定簇,即 A β 1-6 肽与病毒样颗粒融合。如上所述,VLP 典型地由至少一种装配为 VLP 的亚单位组成。因此,在本发明另一个优选的实施方式中,抗原或抗原决定簇,优选地至少一个 A β 1-6 肽与病毒样颗粒的至少一种亚单位或能掺入 VLP 的蛋白质融合,产生嵌合 VLP-亚单位-A β 1-6 肽蛋白质融合物。

[0223] 通过插入到 VLP 亚单位序列中,或者通过融合到 VLP 亚单位或能掺入 VLP 的蛋白质的 N 或 C 末端可以实现 A β 1-6 肽的融合。此后,当提到肽与 VLP 亚单位的融合蛋白时,包括与亚单位序列任一末端的融合或亚单位序列中肽的内部插入。

[0224] 通过将 A β 1-6 肽序列插入到 VLP 亚单位变体中也可以实现融合,该 VLP 亚单位变体中已经缺失了部分亚单位序列,也称为截短突变体。截短突变体可以具有 VLP 亚单位序列的部分 N 或 C 末端或内部缺失。例如,具有氨基酸残基 79 到 81 缺失的具体 VLP HBcAg 是具有内部缺失的截短突变体。A β 1-6 肽与截短突变体 VLP 亚单位 N 或 C 末端的融合也产生了本发明的实施方式。同样,通过置换也可以在 VLP 亚单位序列中实现表位的融合,其中例如对于具体的 VLP HBcAg,用外源表位置换氨基酸 79-81。因此,通过将 A β 1-6 肽序列插入到 VLP 亚单位序列中,通过用 A β 1-6 肽置换 VLP 亚单位的部分序列,或者通过缺失、置换或插入的联合可以实现此后所称的融合。

[0225] 嵌合的 A β 1-6 肽-VLP 亚单位一般能自装配为 VLP。这里也将展示出与其亚单位融合的表位的 VLP 称作嵌合 VLP。如所述,病毒样颗粒包含至少一种 VLP 亚单位,或者可替代地由至少一种 VLP 亚单位组成。在本发明另一实施方式中,病毒样颗粒包含嵌合 VLP 亚单位和非嵌合 VLP 亚单位的混合物,或者可替代地由嵌合 VLP 亚单位和非嵌合 VLP 亚单位的混合物组成,从而产生了所谓的镶嵌颗粒,其中该非嵌合 VLP 亚单位为没有与抗原融合的 VLP 亚单位。这对于确保 VLP 形成和装配可能是有利的。在这些实施方式中,嵌合 VLP 亚单位的比例可以是 1,2,5,10,20,30,40,50,60,70,80,90,95%或更高。

[0226] 可以向肽或表位序列任一末端添加侧翼氨基酸残基,其中该肽或表位序列将融合到 VLP 亚单位序列任一末端,或者插入到 VLP 亚单位序列内部。甘氨酸和丝氨酸残基是在侧翼序列中使用的特别有利的氨基酸,其中向待要融合的肽添加该侧翼序列。甘氨酸残基赋予了额外的柔性,其可以减小外源序列融合到 VLP 亚单位序列中引起的潜在去稳定作用。

[0227] 在本发明具体实施方式中,VLP 是乙型肝炎核心抗原 VLP。已经描述了在 HBcAg N 末端(Neyrinck, S. 等, Nature Med. 5 :1157-1163(1999))或在所谓的主要免疫优势区(MIR)中插入 A β 1-6 肽的融合蛋白(Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44 :98-114(2001)), WO 01/98333,并且它们是本发明优选的实施方式。也已经描述了 MIR 中有缺失的天然 HBcAg 变体(Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44 :98-114(2001),明确地将这篇文献整体并入为参考文献),与 N 或 C 末端的融合,及与野生型 HBcAg 比较在对应于缺失位点的 MIR 位置的插入是本发明另外的实施方式。也已经描述了与 C 末端的融合(Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44 :98-114(2001))。本领域技术人员很容易发现关于如何利用经典分子生物学技术构建融合蛋白的指导(Sambrook, J 等, 编辑, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Ho 等, Gene 77 :51(1989))。已经描述了编码 HBcAg 和 HBcAg 融合蛋白并且可用于 HBcAg 和 HBcAg 融合蛋白表达的载体和质粒(Pumpens, P. & Grens, E. Intervirology 44 :98-114(2001), Neyrinck, S. 等, Nature Med. 5 :1157-1163(1999)),这些载体和质粒可以用于本发明实践中。我们也通过实施例的方式(实施例 6)描述了在 HBcAg MIR 中插入表位,产生嵌合的自装配 HBcAg。对自装配效率和待要插入到 HBcAg MIR 中的表位的展示进行优化的一个重要因素是插入位点的选择,及一旦插入,将要从 HBcAg 的 MIR 序列中缺失的氨基酸数目(Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44 :98-114(2001);EP 0421635;U.S. 专利号. 6, 231, 864),或者换而言之,HBcAg 中哪些氨基酸将用新表位置换。例如,已经描述了用外源表位置换 HBcAg 氨基酸 76-80,79-81,79-80,75-85 或 80-81(Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44 :98-114(2001);EP0421635;US 6' 231' 864)。HBcAg 含有长精氨酸尾部(Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44 :98-114(2001)),其不是衣壳装配所必需的,并且能结合核酸(Pumpens, P. 和 Grens, E., Intervirology 44 :98-114(2001))。包含或缺少该精氨酸尾部的 HBcAg 都是本发明的实施方式。

[0228] 在本发明另一优选的实施方式中,VLP 是 RNA 噬菌体 VLP。一旦在细菌中,特别是在大肠杆菌(E. coli)中表达 RNA 噬菌体主要外壳蛋白,其就自发装配为 VLP。可以用于制备本发明组合物的噬菌体外壳蛋白的具体例子包括 RNA 噬菌体诸如噬菌体 Q β (SEQ ID NO : 4;PIR 数据库,记录号 VCBPQ β ,称为 Q β CP 和 SEQ ID NO :5;记录号 AAA16663,称为 Q β A1

蛋白质)和噬菌体 fr(SEQ ID NO:7;PIR 记录号 VCBPFR)的外壳蛋白。

[0229] 在更优选的实施方式中,至少一个 A β 1-6 肽与 Q β 外壳蛋白融合。已经描述了将表位融合到截短形式的 Q β A1 蛋白质 C 端,或者插入到 A1 蛋白质中的融合蛋白构建体(Kozlovskaya, T. M., 等, Intervirology, 39:9-15(1996))。A1 蛋白质通过在 UGA 终止密码子处的抑制产生,并且其有 329 个氨基酸或 328 个(如果考虑 N 末端甲硫氨酸的切割)氨基酸的长度。通常在大肠杆菌(E. coli)中发生丙氨酸(Q β CP 基因编码的第二个氨基酸)之前的 N 末端甲硫氨酸的切割,并且这与 Q β 外壳蛋白 N 末端的情况相同。UGA 琥珀密码子 3' 的 A1 基因部分编码 195 个氨基酸长度的 CP 延伸物。(在此 CP 延伸物的位置 72 和 73 之间插入至少一个 A β 1-6 肽产生了本发明另一实施方式(Kozlovskaya, T. M., 等., Intervirology 39:9-15(1996))。在 C 末端截短的 Q β A1 蛋白质 C 末端融合 A β 1-6 肽产生了本发明另外的优选实施方式。例如, Kozlovskaya 等, (Intervirology, 39:9-15(1996)) 描述了 Q β A1 蛋白质融合物,其中在位置 19 截短的 Q β CP 延伸物的 C 末端融合表位。

[0230] 如 Kozlovskaya 等(Intervirology, 39:9-15(1996))所述,展示融合表位的颗粒的装配通常需要 A1 蛋白质-A β 1-6 肽融合物和野生型 CP 同时存在以形成镶嵌颗粒。然而,包含仅由融合了至少一个 A β 1-6 肽的 VLP 亚单位组成的病毒样颗粒,特别是 RNA 噬菌体 Q β 外壳蛋白的 VLP 的实施方式也包括在本发明范围内。

[0231] 可以通过多种方法实现镶嵌颗粒的产生。Kozlovskaya 等, Intervirology, 39:9-15(1996) 描述了 3 种方法,这 3 种方法都可以用在本发明实践中。在第一种方法中,在含有编码克隆的 UGA 抑制型 tRNA 的质粒(pISM3001 质粒(Smiley B. K., 等., Gene 134:33-40(1993)))的大肠杆菌(E. coli)株系中,表达编码 Q β A1 蛋白质融合物的质粒以介导融合表位在 VLP 上的有效展示,其中所述 Q β A1 蛋白质融合物在 CP 和 CP 延伸之间具有 UGA 终止密码子,而所述克隆的 UGA 抑制型 tRNA 将导致 UGA 密码子翻译为 Trp。在另一个方法中,将 CP 基因终止密码子修饰为 UAA,并且共转化表达 A1 蛋白质-A β 1-6 肽融合物的第二质粒。此第二质粒编码不同的抗生素抗性,并且复制起点与第一质粒相容(Kozlovskaya, T. M., 等, Intervirology 39:9-15(1996))。在第三种方法中,以双顺反子方式编码 CP 和 A1 蛋白质-A β 1-6 肽融合物,其可操作地连接启动子诸如 Trp 启动子,参见 Kozlovskaya 等, Intervirology, 39:9-15(1996) 的图 1 中所述。

[0232] 在另一实施方式中, A β 1-6 肽插入到 fr CP 的氨基酸 2 和 3(切割后的 CP,即切除了 N 末端甲硫氨酸的 CP 的编号)之间,由此产生了 A β 1-6 肽-fr CP 融合蛋白。已经描述了可用于本发明实践中自装配为 VLP 的 fr CP 融合蛋白质的构建和表达用载体和表达系统(Pushko P. 等., Prot. Eng. 6:883-891(1993))。在一个具体实施方式中, A β 1-6 肽序列插入到 frCP 缺失突变体中位于氨基酸 2 后,在所述突变体中已经缺失了 fr CP 的残基 3 和 4(Pushko P. 等, Prot. Eng. 6:883-891(1993))。

[0233] 也已描述了在 RNA 噬菌体 MS-2 外壳蛋白 N 末端突出的 β 发夹中融合表位和之后融合表位在 RNA 噬菌体 MS-2 自装配的 VLP 上的呈递(W092/13081),并且通过插入或置换将 A β 1-6 肽融合到 MS-2RNA 噬菌体的外壳蛋白中也落入本发明的范围内。

[0234] 在本发明另一个实施方式中, A β 1-6 肽融合到乳头瘤病毒衣壳蛋白上。在一个更具体的实施方式中, A β 1-6 肽融合到牛乳头瘤病毒 1 型(BPV-1)的主要衣壳蛋白 L1 上。已经描述了杆状病毒/昆虫细胞系统中用于 BPV-1 融合蛋白构建和表达的载体和表达系统

(Chackerian, B. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 :2373-2378(1999), WO 00/23955)。用 A β 1-6 肽置换 BPV-1L1 氨基酸 130-136 产生了 BPV-1L1-A β 1-6 肽融合蛋白,其是本发明优选的实施方式。已经描述了在杆状病毒载体中的克隆和在杆状病毒感染的 Sf9 细胞中的表达,并且它们可以用在本发明实践中(Chackerian, B. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 :2373-2378(1999), WO 00/23955)。可以用多种方法诸如,凝胶过滤或蔗糖梯度超离心进行展示融合 A β 1-6 肽的装配颗粒的纯化(Chackerian, B. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 :2373-2378(1999), W000/23955)。

[0235] 在本发明另一实施方式中, A β 1-6 肽与能掺入到 Ty VLP 中的 Ty 蛋白质融合。在一个更具体的实施方式中, A β 1-6 肽与 TYA 基因编码的 p1 或衣壳蛋白(Roth, J. F., Yeast 16 :785-795(2000)) 融合。已经从酿酒酵母(*Saccharomyces Serevisiae*) 分离了酵母逆转录转座子 Ty1, 2, 3 和 4, 而且已经从粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces Pombae*) 分离了逆转录转座子 Tf1(Boeke, J. D. 和 Sandmeyer, S. B., “Yeast Transposable elements,”《The molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces* :Genome dynamics, Protein Synthesis, and Energetics》, 193 页, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1991))。逆转录转座子 Ty1 和 2 与 copia 类植物和动物元件有关, 而 Ty3 属于 gypsy 逆转录转座子家族, 其与植物和动物逆转录病毒有关。在 Ty1 逆转录转座子中, p1 蛋白质也称为 Gag 或衣壳蛋白, 具有 440 个氨基酸的长度。在 VLP 成熟期间, 在位置 408 切割 p1 产生 p2 蛋白质, 其是 VLP 的必需成分。

[0236] 已经描述了 p1 融合蛋白和用于酵母中所述融合蛋白表达的载体(Adams, S. E., 等, Nature 329 :68-70(1987))。因此, 例如通过将编码 A β 1-6 肽的序列插入到 pMA5620 质粒的 BamHI 位点中, A β 1-6 肽可以与 p1 融合(Adams, S. E., 等, Nature 329 :68-70(1987))。编码外源表位的序列克隆到 pMA5620 载体中导致融合蛋白表达, 该融合蛋白包含以 C 末端融合在外源表位 N 末端的 Ty1-15p1 的氨基酸 1-381。同样, 用 A β 1-6 肽进行 N 末端融合, 或者内部插入到 p1 序列中, 或者置换部分 p1 序列也落入本发明范围中。特别地, A β 1-6 肽插入到 Ty 蛋白质 p1 氨基酸 30-31, 67-68, 113-114 和 132-133 之间的 Ty 序列中(EP0677111) 产生了本发明优选的实施方式。

[0237] 适于 A β 1-6 肽融合的其它 VLP 是例如逆转录病毒样颗粒(W09630523), HIV2Gag(Kang, Y. C., 等, Biol. Chem. 380 :353-364(1999)), 豇豆花叶病毒(Taylor, K. M. 等., Biol. Chem. 380 :387-392(1999)), 细小病毒 VP2VLP(Rueda, P. 等, Virology 263 :89-99(1999)), HBsAg(US4, 722, 840, EP0020416B1)。

[0238] 适于本发明实践的嵌合 VLP 例子还有在 Intervirology 39 :1(1996) 中描述的嵌合 VLP。本发明中可以考虑使用的其它 VLP 例子是: HPV-1, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18, HPV-33, HPV-45, CRPV, COPV, HIV GAG, 烟草花叶病毒。已经制备了 SV-40, 多瘤病毒, 腺病毒, 单纯疱疹病毒, 轮状病毒和诺沃克病毒的病毒样颗粒, 并且包含 A β 1-6 肽的这些 VLP 的嵌合 VLP 也在本发明范围中。

[0239] 在本发明优选的实施方式中, 用氨基酸接头修饰适于产生本发明疫苗的 A β 1-6 肽以便与 VLP 结合。这些 A β 1-6 肽包括但不限于在 C 末端融合到接头 GGC 上的 A β 1-6 肽。适于融合到 A β 1-6 片段 N 末端的氨基酸接头包括但不限于序列 CGG 和 CGHGNKS。适于融合到 A β 1-6 的 C 末端的接头包括但不限于序列 GGC。在优选的实施方式中, 当接头融合到

A β 或 A β 片段 C 末端时,酰胺化 C 末端半胱氨酸。在优选的实施方式中,A β 1-6 与氨基酸接头融合,并且具有序列: NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂,其中酰胺化 C 末端半胱氨酸(这用 C 末端的“-CONH₂”标明),并且肽 N 末端是游离的(进一步用“NH₂-”标明)。优选地,该氨基酸接头是短的,以避免诱导抗所述接头氨基酸的免疫应答,但是其应该允许诱导与可溶 A β 和 AD 斑块交叉反应的抗体,并且可以有利于抗体和 A β 1-6 肽相互作用。氨基酸接头的其它适宜特性是柔性,优选地缺少大氨基酸,大氨基酸可能干扰偶联和/或引起抗接头本身的免疫应答。在更优选的实施方式中,含有做为第二附着位点的半胱氨酸残基的氨基酸接头融合到 A β 1-6 肽的 C 末端。

[0240] 本发明实践中适宜的其它 A β 片段包括来源于其它动物物种、经上述修饰的对应于前述片段的 A β 片段,其中该 A β 片段激发与人淀粉样斑块和可溶性人 A β 交叉反应的抗体。这种片段的例子是来源于灵长类(DAEFRH;SEQ ID NO:84),野兔(DAEFRH;SEQ ID NO:85),豚鼠(DAEFRH;SEQ ID NO:88),小鼠(DAEFGH;SEQ ID NO:76),大鼠(DAEFGH;SEQ ID NO:87)和 *xaenopus laevis*(DSEYRH;SEQ ID NO:86) 的 A β 1-6。

[0241] 已经报道了基于超表达人类 APP 突变形式的转基因小鼠的大量 AD 动物模型(Games, D. 等, Nature 373:523-527(1995a);Sturchler-Pierrat 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:13287-13292(1997);Hsiao, K., 等, Science 274:99-102(1996);Chen, G. 等, Nature 408:975-979(2000);Janus, C. 等., Nature 408:979-982(2000);Morgan, D. 等, Nature 408:982-985(2000))。这些小鼠模型在转基因超表达水平、转基因上存在的 AD 突变和指导转基因超表达的启动子方面互相不同。这些动物模型不能显示 AD 所有的病理征兆,特别是与年龄相关的行为改变、 β 淀粉状蛋白沉积为不溶斑块、神经元内的神经原纤维缠结和整个前脑的神经元损失(Chapman, P. F. Nature 408:915-916(2000))。然而,记忆缺陷和鉴定它们的方法可以在这些模型中进行确定,并且它们可以在动物模型中用于检测本发明组合物的作用(Chen, G. 等, Nature 408:975-979(2000);Janus, C. 等, Nature 408:979-982(2000);Morgan, D. 等, Nature 408:982-985(2000))。而且,可以在还出现星形胶质细胞增生和小神经胶质细胞增生的那些模型中研究与年龄相关的 A β 沉积为淀粉样斑块。

[0242] 相关领域技术人员将理解,对这里所述方法和应用的其它适应性更改和修改是显而易见的,并且能够进行这样的更改和修改而不背离本发明的范围或其任何实施方式。现在已经详细地描述了本发明,通过参考下面的实施例将更清楚地理解本发明,这里所包括的实施例仅仅是示例的目的,不意在限制本发明。

[0243] 实施例

[0244] 实施例 1

[0245] 优选的 RNA 噬菌体 VLP 或核心颗粒的克隆、构建、表达和纯化

[0246] A. 突变 Q β 外壳蛋白的构建和表达,及突变 Q β 外壳蛋白 VLP 或衣壳的纯化

[0247] 突变外壳蛋白的质粒构建和克隆

[0248] pQ β -240 的构建:

[0249] 质粒 pQ β 10(Kozlovska, TM, 等, Gene 137:133-137) 用做 pQ β -240 构建的起始质粒。通过反向 PCR 产生突变 Lys13 $\rightarrow$ Arg。以倒转尾对尾方向设计反转引物:

[0250] 5' -GGTAACATCGGTCGAGATGGAAAACAACTCTGGTCC-3' (SEQ ID NO:48) 和

- [0251] 5' -GGACCAGAGTTTGTTCATCTCGACCGATGTTACC-3' (SEQ ID NO :49)。
- [0252] 第一次 PCR 的产物用做第二次 PCR 反应的模板,其中使用上游引物:
- [0253] 5' -AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3' (SEQ ID NO :50),和下游引物
- [0254] 5' -CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3' (SEQ ID NO :51)。用 XbaI 和 Mph1103I 消化第二次 PCR 的产物,并且克隆到用相同限制酶切割的 pQ β 10 表达载体中。利用 PCR 试剂盒试剂,根据生产者的方案进行这些 PCR 反应 (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)。
- [0255] 利用定向标记掺入方法进行测序,证实期望的突变。包含 pQ β -240 的大肠杆菌 (E. coli) 细胞支持 14kD 蛋白质的有效合成,该蛋白质与从 Q β 噬菌体颗粒分离的对照 Q β 外壳蛋白在 SDS-PAGE 上共迁移。
- [0256] 所得到氨基酸序列:(SEQ ID NO :17)
- [0257] AKLETVTLGNIGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
- [0258] ALEKRVTVSVSQPSRNRKQVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
- [0259] KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY
- [0260] pQ β -243 的构建
- [0261] 质粒 pQ β 10 用做 pQ β -243 构建的起始质粒。通过反向 PCR 产生突变 Asn10 $\rightarrow$ Lys。以反转尾对尾方向设计反转引物:
- [0262] 5' -GGCAAATTAGAGACTGTTACTTTAGGTAAGATCGG-3' (SEQ ID NO :52)
- [0263] 和
- [0264] 5' -CCGATCTTACCTAAAGTAACAGTCTCTAATTTGCC-3' (SEQ ID NO :53)。
- [0265] 第一次 PCR 产物用做第二次 PCR 反应的模板,其中使用上游引物:
- [0266] 5' -AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3' (SEQ ID NO :50),和下游引物
- [0267] 5' -CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTTCAG-3' (SEQ ID NO :51)。
- [0268] 用 XbaI 和 Mph1103I 消化第二次 PCR 产物,并且克隆到用相同限制酶切割的 pQ β 10 表达载体中。利用 PCR 试剂盒试剂,根据生产者的方案进行这些 PCR 反应 (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)。
- [0269] 利用定向标记掺入方法测序,证实期望的突变。包含 pQ β -243 的大肠杆菌 (E. coli) 细胞支持 14kD 蛋白质的有效合成,该蛋白质与从 Q β 噬菌体颗粒分离的对照 Q β 外壳蛋白在 SDS-PAGE 上共迁移。
- [0270] 所得到氨基酸序列:(SEQ ID NO :18)
- [0271] AKLETVTLGKIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
- [0272] ALEKRVTVSVSQPSRNRKQVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
- [0273] KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY
- [0274] pQ β -250 的构建
- [0275] 质粒 pQ β -240 用做 pQ β -250 构建的起始质粒。通过定点诱变产生突变 Lys2 $\rightarrow$ Arg。上游引物:
- [0276] 5' -GGCCATGGCAGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3' (SEQ ID NO :54)
- [0277] 和下游引物
- [0278] 5' -GATTTAGGTGACACTATAG-3' (SEQ ID NO :55)

[0279] 用于突变 PCR 片段的合成, 在 pQ β -185 表达载体中在唯一限制位点 NcoI 和 HindIII 引入该突变 PCR 片段。利用 PCR 试剂盒试剂, 根据生产者的程序进行这些 PCR 反应 (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)。

[0280] 利用定向标记掺入方法测序, 证实期望的突变。包含 pQ β -250 的大肠杆菌 (E. coli) 细胞支持 14kD 蛋白质的有效合成, 该蛋白质与从 Q β 噬菌体颗粒分离的对照 Q β 外壳蛋白在 PAGE 上共迁移。

[0281] 所得到的氨基酸序列: (SEQ ID NO:19)

[0282] ARLETVTLGNI GRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP

[0283] ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ

[0284] KYADVTFSFTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

[0285] pQ β -251 的构建:

[0286] 质粒 pQ β 10 用做 pQ β -251 构建的起始质粒。通过反向 PCR 产生突变 Lys16 $\rightarrow$ Arg。以反转尾对尾方向设计反转引物:

[0287] 5' -GATGGACGTCAA ACTCTGGTCCTCAATCCGCGTGGGG-3' (SEQ ID NO:56)

[0288] 和

[0289] 5' -CCCCACGCGGATTGAGGACCAGAGTTTGACGTCCATC-3' (SEQ ID NO:57)。

[0290] 第一次 PCR 产物用做第二次 PCR 反应的模板, 其中使用上游引物:

[0291] 5' -AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3' (SEQ ID NO:50), 和下游引物

[0292] 5' -CGATGCATTTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTCAG-3' (SEQ-ID NO:51)。用 XbaI 和 Mph1103I 消化第二次 PCR 产物, 并且克隆到用相同限制酶切割的 pQ β 10 表达载体中。利用 PCR 试剂盒试剂, 根据生产者的程序进行这些 PCR 反应 (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)。

[0293] 利用定向标记掺入方法测序, 证实期望的突变。包含 pQ β -251 的大肠杆菌 (E. coli) 细胞支持 14kD 蛋白质的有效合成, 该蛋白质与从 Q β 噬菌体颗粒分离的对照 Q β 外壳蛋白在 SDS-PAGE 上共迁移。SEQ ID NO:20 中示出了该构建体编码所得的氨基酸序列。

[0294] pQ β -259 的构建:

[0295] 质粒 pQ β -251 用做 pQ β -259 构建的起始质粒。通过定点诱变产生突变 Lys2 $\rightarrow$ Arg。使用上游引物:

[0296] 5' -GGCCATGGCAGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3' (SEQ ID NO:54)

[0297] 和下游引物

[0298] 5' -GATTTAGGTGACACTATAG-3' (SEQ ID NO:55)

[0299] 用于突变 PCR 片段的合成, 在 pQ β -185 表达载体中在唯一限制位点 NcoI 和 HindIII 引入该突变 PCR 片段。利用 PCR 试剂盒试剂, 根据生产者的程序进行这些 PCR 反应 (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)。

[0300] 利用定向标记掺入方法测序, 证实期望的突变。包含 pQ β -259 的大肠杆菌 (E. coli) 细胞支持 14kD 蛋白质的有效合成, 该蛋白质与从 Q β 噬菌体颗粒分离的对照 Q β 外壳蛋白在 SDS-PAGE 上共迁移。

[0301] 所得到的氨基酸序列: (SEQ ID NO:21)

[0302] AKLETVTLGNI KGDKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP

[0303] ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ

[0304] KYADVTFSTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

[0305] 用于 Q β 和 Q β 突变体表达和纯化的一般方法

[0306] 表达

[0307] 用 Q β 外壳蛋白表达质粒转化大肠杆菌 (*E. coli*) JM109。使用以 Q β 外壳蛋白表达质粒转化的克隆接种含有 20 μ g/ml 氨苄青霉素的 5ml LB 液体培养基。在 37℃ 温育该接种培养物 16 到 24 小时, 不要振荡。随后在含有 20 μ g/ml 氨苄青霉素的 100-300ml 新鲜 LB 培养基中以 1 : 100 稀释制备的接种物, 并且不要振荡, 在 37℃ 过夜温育。在烧瓶中, 在含有 1% 酪蛋白氨基酸和 0.2% 葡萄糖的 M9 培养基中, 以 1 : 50 稀释由此得到的第二次接种物, 并且在振荡条件下, 在 37℃ 过夜温育。

[0308] 纯化

[0309] 用于纯化方法的溶液和缓冲液

[0310] 1. 裂解缓冲液 LB

[0311] 50mM Tris-HCl pH8.0, 5mM EDTA, 0.1% tritonX100 和 5 微克 /ml 浓度新制备的 PMSF。没有溶菌酶和 DNase。

[0312] 2. SAS

[0313] 水中饱和的硫酸铵。

[0314] 3. 缓冲液 NET。

[0315] 20mM Tris-HCl, pH 7.8 和 5mM EDTA 和 150mM NaCl。

[0316] 4. PEG

[0317] NET 中 40% (w/v) 聚乙二醇 6000。

[0318] 破碎和裂解

[0319] 以 2ml/g 细胞, 在 LB 中重悬浮冷冻的细胞。用 22kHz 超声处理混合物 5 次, 15 秒, 各次间有 1 分钟间隔以在冰上冷却溶液。然后利用 Janekki K60 转子, 以 14000rpm 离心裂解液 1 小时。除非有另外说明, 利用相同转子进行所有下述离心步骤。在 4℃ 贮藏上清液, 用 LB 冲洗细胞残渣 2 次。离心后, 合并裂解液的上清液和洗涤级分。

[0320] 分级分离

[0321] 在对上述合并的裂解液搅拌的条件下, 逐滴地添加饱和的硫酸铵溶液。将 SAS 体积调整到 1/5 总体积, 以获得 20% 的饱和度。放置溶液过夜, 并且第二天以 14000rpm 离心该溶液 20 分钟。用少量 20% 硫酸铵洗沉淀, 并且再次离心。合并所获得的上清液, 逐滴地添加 SAS 以获得 40% 饱和度。放置溶液过夜, 并且第二天以 14000rpm 离心该溶液 20 分钟。在 NET 缓冲液中溶解所获得的沉淀。

[0322] 层析

[0323] 在 Sepharose CL-4B 柱子上加样 NET 缓冲液中重溶解的衣壳或 VLP 蛋白质。层析期间洗脱了 3 个峰。第一个峰主要含有膜和膜片段, 没有收集该峰。衣壳包含在第二个峰中, 而第三个峰含有其它大肠杆菌 (*E. coli*) 蛋白质。

[0324] 合并峰级分, 并且调整 NaCl 浓度到 0.65M 的终浓度。在搅拌条件下逐滴地添加体积相应于二分之一合并的峰级分的 PEG 溶液。不要搅拌, 放置溶液过夜。通过以 14000rpm 离心 20 分钟沉降衣壳蛋白。然后, 在最小体积 NET 中溶解它, 并且将它再一次加样到

Sepharose CL-4B 柱子上。合并峰级分,并且用 60% (w/v) 饱和度的硫酸铵沉淀。在 NET 缓冲液中离心和重溶解后,在 Sepharose CL-6B 柱子上加样衣壳蛋白以再次层析。

[0325] 透析和干燥

[0326] 合并上述获得的峰级分,利用大量无菌水进行透析,并且冷干贮藏。

[0327] Q β -240 的表达和纯化

[0328] 在 LB 中重悬浮细胞(用质粒 pQ β -240 转化的大肠杆菌(E. coli) JM109),超声处理 5 次,15 秒(水冰夹套),并且以 13000rpm 离心 1 小时。在进一步处理前,在 4℃ 贮藏上清液,而用 9ml LB 洗残渣 2 次,最后用 9ml LB 中的 0.7M 尿素洗残渣。合并所有上清液,并且加样到 Sepharose CL-4B 柱子上。用硫酸铵沉淀合并的峰级分,并且离心。然后,在 Sepharose 2B 柱子上进一步纯化重溶解的蛋白质,并且最后在 Sepharose 6B 柱子上纯化重溶解的蛋白质。如上所述,最后用大量水透析衣壳峰,并且冻干。通过电子显微镜术证实衣壳蛋白装配为衣壳。

[0329] Q β -243 的表达和纯化

[0330] 在 LB 中重悬浮细胞(大肠杆菌 RR1)和如一般方法所述处理该细胞。通过在 Sepharose CL-4B 柱子上和最后在 Sepharose CL-2B 柱子上的两步连续凝胶过滤纯化蛋白质。如上所述,合并峰级分并冻干。通过电子显微镜术证实衣壳蛋白装配为衣壳。

[0331] Q β -250 的表达和纯化

[0332] 在 LB 中重悬浮细胞(用 pQ β -250 转化的大肠杆菌 JM 109)和如上所述处理该细胞。通过在 Sepharose CL-4B 柱子上和最后在 Sepharose CL-2B 柱子上凝胶过滤纯化蛋白质,并如上所述冻干该蛋白质。通过电子显微镜术证实衣壳蛋白装配为衣壳。

[0333] Q β -259 的表达和纯化

[0334] 在 LB 中重悬浮细胞(用 pQ β -259 转化的大肠杆菌 JM 109)并超声处理。用 10ml LB 洗残渣 1 次,并且用 10ml LB 中的 0.7M 尿素再次洗残渣。通过在 Sepharose CL-4B 柱子上的 2 个凝胶过滤层析步骤纯化该蛋白质。如上所述,透析和冻干该蛋白质。通过电子显微镜术证实衣壳蛋白装配为衣壳。

[0335] B. 重组 AP205VLP 的克隆,表达和纯化

[0336] AP205 外壳蛋白基因的克隆

[0337] 通过利用逆转录 PCR 技术和在用于测序的商购质粒 pCR 4-TOP0 中克隆,从产生自噬菌体 AP205RNA 的两个 cDNA 片段装配 AP205 外壳蛋白(CP)的 cDNA(SEQ ID NO:28)。逆转录技术是相关领域普通技术人员熟知的。质粒 p205-246 中含有的第一片段包含 CP 序列上游 269 个核苷酸和编码 CP 最开始 24 个 N 末端氨基酸的 74 个核苷酸。质粒 p205-262 中含有的第二片段包含编码 CP 氨基酸 12-131 的 364 个核苷酸和 CP 序列下游另外 162 个核苷酸。p205-246 和 p205-262 都来源于 J. Klovins 的惠赠。

[0338] 通过两步 PCR 设计质粒 283. -58 以在一个全长 CP 序列中融合来源于质粒 p205-246 和 p205-262 的两个 CP 片段。

[0339] 使用含有用于克隆到质粒 pQb185 中的 NcoI 位点的上游引物 p1. 44,或含有用于克隆到质粒 pQb10 中的 XbaI 位点的上游引物 p1. 45,和含有 HindIII 限制位点的下游引物 p1. 46(下划线是限制酶的识别序列):

[0340] p1. 445' -AACC ATG GCA AAT AAG CCA ATG CAA CCG-3' (SEQ ID NO:79)

[0341] p1. 455' -AATCTAGAATTTTCTGCGCACCCATCCCGG-3' (SEQ ID NO :80)

[0342] p1. 465' -AAAAGC TTA AGC AGT AGT ATC AGA CGA TAC G-3' (SEQ ID NO :81)。

[0343] 两个另外引物, 在 p205-262 中所含片段的 5' 末端退火的引物 p1. 47, 和在质粒 p205-246 中所含片段的 3' 末端退火的引物 p1. 48 用于扩增第一次 PCR 中的片段。引物 p1. 47 和 p1. 48 相互互补。

[0344] p1. 47 :5' -GAGTGATCCAACCTCGTTTATCAACTACATTT-TCAGCAAGTCTG-3' (SEQ ID NO :82)

[0345] p1. 48 :5' -CAGACTTGCTGAAAATGTAGTTGATAAACGA-GTTGGATCACTC-3' (SEQ ID NO :83)。

[0346] 在开始的两个 PCR 反应中, 产生两个片段。用引物 p1. 45 和 p1. 48 和模板 p205-246 产生第一片段。用引物 p1. 47 和 p1. 46 和模板 p205-262 产生第二片段。这两个片段都用做第二次 PCR 反应的模板, 其中用引物联合 p1. 45 和 p1. 46 或 p1. 44 和 p1. 46 进行拼接重叠延伸。用 XbaI 或 NcoI 和 HindIII 消化两个第二步 PCR 反应的产物, 并且用相同限制位点分别克隆到源于 pGEM 的表达载体 pQb10 或 pQb185 中, 位于大肠杆菌色氨酸操纵子启动子控制下。

[0347] 获得了两个质粒, pAP283-58 (SEQ ID NO :27)——其在 pQb10 中含有编码野生型 AP205CP (SEQ ID NO :28) 的基因, 和 pAP281-32 (SEQ ID NO :30)——其在 pQb185 中具有突变 Pro5 → Thr (SEQ ID NO :29)。通过 DNA 测序证实外壳蛋白序列。PAP283-58 含有位于 CP 的 ATG 密码子上游及 XbaI 位点下游的 49 个核苷酸, 并且含有该外壳蛋白 mRNA 推定的原始核糖体结合位点。

[0348] 重组 AP205VLP 的表达和纯化

[0349] A. 重组 AP205VLP 的表达

[0350] 用质粒 pAP283-58 转化大肠杆菌 JM109。用单菌落接种具有 20 μ /ml 氨苄青霉素的 5ml LB 液体培养基, 并且不要振荡, 在 37℃ 温育 16-24 小时。

[0351] 在含有 20 μ g/ml 氨苄青霉素的 100-300ml LB 培养基中以 1 : 100 稀释制备的接种物, 并且不要振荡, 在 37℃ 温育过夜。在含有用于缓冲的 0.2% 葡萄糖和磷酸盐的 2TY 培养基中以 1 : 50 稀释所得到的第二次接种物, 并且在 37℃, 在振荡器上温育过夜。通过离心收集细胞, 并且在 -80℃ 冷冻。B. 重组 AP205VLP 的纯化

[0352] 溶液和缓冲液 :

[0353] 裂解缓冲液

[0354] 50mM Tris-HCl pH8.0, 5mM EDTA, 0.1% tritonX100 和 5 微克 /ml PMSF。

[0355] SAS

[0356] 水中饱和的硫酸铵。

[0357] 缓冲液 NET

[0358] 20mM Tris-HCl, pH 7.8 和 5mM EDTA 和 150mM NaCl。

[0359] PEG

[0360] NET 中 40% (w/v) 聚乙二醇 6000。

[0361] 裂解 :

[0362] 以 2ml/g 细胞, 在裂解缓冲液中重悬浮冷冻的细胞。用 22kHz 超声处理混合物 5

次,15 秒,各次间有 1 分钟间隔以在冰上冷却溶液。然后利用 F34-6-38 (Ependorf) 转子,以 12000rpm 离心裂解液 20 分钟。除非有另外说明,利用相同转子进行所有下述离心步骤。在 4℃ 贮藏上清液,用裂解缓冲液洗细胞残渣 2 次。离心后,合并裂解液的上清液和洗涤级分。

[0363] 硫酸铵沉淀可以进一步用于纯化 AP205VLP。在第一步中,选择 AP205VLP 不沉淀的硫酸铵浓度。弃去所得到的沉淀。在下一步中,选择定量沉淀 AP205VLP 的硫酸铵浓度,通过离心 (14000rpm, 20 分钟),从该沉淀步骤的沉淀物分离 AP205VLP。在 NET 缓冲液中溶解所得到的沉淀。

[0364] 层析:

[0365] 将来源于合并的上清液的衣壳蛋白加样到 Sepharose 4B 柱子上 (2.8×70cm),并且以 4ml/小时/级分,用 NET 缓冲液洗脱。收集级分 28-40,并且用 60% 饱和度的硫酸铵沉淀。在沉淀前,通过 SDS-PAGE 和 Western 印迹 (用对 AP205 特异的抗血清进行) 分析级分。在 NET 缓冲液中重溶解通过离心分离的沉淀,并且将其加样到 Sepharose 2B 柱子上 (2.3X 65cm),以 3ml/小时/级分洗脱。通过 SDS-PAGE 分析级分,之后收集级分 44-50,合并,并且用 60% 饱和度的硫酸铵沉淀。在 NET 缓冲液中重溶解通过离心分离的沉淀,并且在 Sepharose 6B 柱子上 (2.5×47cm) 纯化,以 3ml/小时/级分洗脱。通过 SDS-PAGE 分析该级分。收集级分 23-27,调整盐浓度到 0.5M,并且用 PEG6000 (其中从水中 40% 母液添加 PEG6000,并且添加到 13.3% 的终浓度) 沉淀。在 NET 缓冲液中重溶解通过离心分离的沉淀,并且如上所述加样到相同 Sepharose 2B 柱子上,以相同方式洗脱。收集级分 43-53,并且用 60% 饱和度的硫酸铵沉淀。在水中重溶解通过离心分离的沉淀,并且利用大量水透析所获得的蛋白质溶液。每克细胞可以分离约 10mg 纯化的蛋白质。

[0366] 利用电子显微镜术对病毒样颗粒检查,表明它们与噬菌体颗粒相同。

[0367] 实施例 2

[0368] 含有赖氨酸残基的肽插入到 HBcAg (1-149) 的 c/e1 表位中

[0369] HBcAg 的 c/e1 表位 (残基 72 到 88) 位于乙型肝炎病毒衣壳 (HBcAg) 表面的顶部区域。用肽 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO:33) 遗传地置换该区域的一部分 (脯氨酸 79 和丙氨酸 80),产生了 HBcAg-Lys 构建体 (SEQ ID NO:26)。所引入的赖氨酸残基在其侧链含有反应性的氨基,该反应性氨基可以用于 HBcAg 颗粒与含有自由半胱氨酸基团的任何抗原的分子间化学交联。

[0370] 通过 PCRs 产生具有 SEQ ID NO:78 中所示氨基酸序列的 HBcAg-LysDNA:通过 PCR 分别地扩增编码 HBcAg 片段的两个片段 (氨基酸残基 1 到 78 和 81 到 149)。用于这些 PCRs 的引物也引入了编码 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly 肽 (SEQ ID NO:33) 的 DNA 序列。利用引物 EcoRIHBcAg(s) 和 Lys-HBcAg(as),从 pEco63 扩增 HBcAg (1 到 78) 片段。利用引物 Lys-HBcAg(s) 和 HBcAg (1-149)Hind(as),从 pEco63 扩增 HBcAg (81 到 149) 片段。引物 Lys-HBcAg(as) 和 Lys-HBcAg(s) 在两个 PCR 产物末端引入互补 DNA 序列,从而允许在随后 PCR 装配中两个 PCR 产物的融合。利用引物 EcoRIHBcAg(s) 和 HBcAg (1-149)Hind(as),通过 PCR 扩增装配的片段。

[0371] 对于 PCRs,在具有 2 单位 Pwo 聚合酶、0.1mM dNTPs 和 2mM MgSO₄ 的 50ml 反应混合物中使用每种寡聚物各 100pmol 及 50ng 模板 DNAs。对于两个反应,实施温度循环如下:

94℃, 2 分钟; 94℃ (1 分钟), 50℃ (1 分钟), 72℃ (2 分钟), 30 个循环。

[0372] 引物序列:

[0373] EcoRIHBcAg(s):

[0374] (5' -CCGGAATTCATGGACATTGACCCTTATAAAG-3') (SEQ ID NO:58);

[0375] Lys-HBcAg(as):

[0376] (5' -CCTAGAGCCACCTTTGCCACCATCTTCTAAATTAG-TACCCACCCAGGTAGC-3') (SEQ ID NO:59);

[0377] Lys-HBcAg(s):

[0378] (5' -GAAGATGGTGGCAAAGGTGGCTCTAGGGACC-TAGTAGTCAGTTATGTC-3') (SEQ ID NO:60);

[0379] HBcAg(1-149)Hind(as):

[0380] (5' -CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG-3') (SEQ ID NO:61)。

[0381] 为了通过 PCR 融合两个 PCR 片段, 在含有 2 单位 Pwo 聚合酶、0.1mM dNTPs 和 2mM MgSO₄ 的 50ml 反应混合物中使用 100pmol 引物 EcoRIHBcAg(s) 和 HBcAg(1-149)Hind(as) 和 100ng 两种纯化的 PCR 片段。PCR 循环条件是: 94℃, 2 分钟; 94℃ (1 分钟), 50℃ (1 分钟), 72℃ (2 分钟), 30 个循环。通过琼脂糖凝胶电泳分析及纯化装配的 PCR 产物, 并且用 EcoRI 和 HindIII 限制酶, 在适合的缓冲液中消化 19 小时。消化的 DNA 片段连接到 EcoRI/HindIII 消化的 pKK 载体中以产生 pKK-HBcAg-Lys 表达载体。通过 EcoRI/HindIII 限制分析和插入片段的 DNA 测序, 分析 PCR 产物是否插入到载体中。

[0382] 实施例 3: HBcAg-Lys 的表达和纯化

[0383] 用 pKK-HBcAg-Lys 转化大肠杆菌株系 K802 或 JM109。1ml 细菌过夜培养物用于接种含有 100 μg/ml 氨苄青霉素的 100ml LB 培养基。在 37℃, 培养该培养物 4 小时直到在 600nm 时, OD 值达到约 0.8。通过添加 IPTG 达到终浓度 1mM 进行 HBcAg-Lys 合成的诱导。诱导后, 在 37℃, 进一步振荡细菌 4 小时。通过以 5000x g 离心 15 分钟收集细菌。在 -80℃ 冷冻沉淀。融解沉淀, 并且在补加有 200 μg/ml 溶菌酶和 10 μl Benzonase (Merck) 的细菌裂解缓冲液 (10mM Na₂HPO₄, pH 7.0, 30mM NaCl, 0.25% Tween-20, 10mM EDTA) 中重悬浮。在室温下温育细胞 30 分钟, 并且通过超声处理破碎。利用含有 pKK-HBcAg-Lys 表达质粒或对照质粒的大肠杆菌细胞, 以 IPTG 诱导 HBcAg-Lys 表达。在添加 IPTG 前, 从带有 pKK-HBcAg-Lys 质粒的细菌培养物和从带有对照质粒的培养物取样品。IPTG 添加后 4 小时, 再一次从含有 pKK-HBcAg-Lys 的培养物和从对照培养物取样品。通过 SDS-PAGE 接着用考马斯亮蓝染色监测蛋白质表达。

[0384] 然后以 12,000x g 离心裂解物 30 分钟以移除不溶细胞残渣。利用抗 HBcAg 的单克隆抗体 (YVS1841, 购自 Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, NY, USA), 通过 Western 印迹分析上清液和沉淀, 表明显著数量的 HBcAg-Lys 蛋白质是可溶的。简而言之, 以 14,000x g 离心来源于表达 HBcAg-Lys 的大肠杆菌细胞和来源于对照细胞的裂解物 30 分钟。分离上清液 (=可溶级分) 和沉淀 (=不溶级分), 并且用 SDS 样品缓冲液稀释到相同体积。通过 SDS-PAGE 分析样品, 接着用抗 HBcAg 单克隆抗体 YVS1841 以 Western 印迹分析样品。

[0385] 利用由 4ml 65% 蔗糖溶液, 其上覆盖有 3ml 15% 蔗糖溶液, 之后为 4ml 细菌裂解

物组成的蔗糖分级梯度,分级梯度离心澄清细胞裂解物。在 4℃,以 100,000x g 离心样品 3 小时。离心后,自梯度顶部收集 1ml 级分,并且通过 SDS-PAGE 和随后的考马斯亮蓝染色分析。通过考马斯亮蓝染色检测 HBcAg-Lys 蛋白质。

[0386] HBcAg-Lys 蛋白质在 15%和 65%蔗糖界面富集,表明该蛋白质已经形成了衣壳颗粒。大多数细菌蛋白质保留在没有蔗糖的梯度上层,因此,HBcAg-Lys 颗粒的分级梯度离心导致了颗粒的富集和部分纯化。

[0387] 如下所述大规模进行 HBcAg-Lys 的表达和纯化。通过在含有 100 μg/ml 氨苄青霉素的 100ml LB 中接种单菌落,在 37℃过夜培养该培养物,制备过夜培养物。第二天,在 800ml LB 氨苄青霉素培养基中稀释 25ml 预培养物,并且培养培养物到 0.6-0.80D⁶⁰⁰ 的光密度。然后,用 1mM IPTG 诱导培养物,并且使其生长另外 4 小时。基本如上所述,收集细胞并且裂解。

[0388] 然后,通过用硫酸铵(30%饱和度)首先从澄清的细胞裂解物沉淀蛋白质,然后在凝胶过滤柱子(Sephacryl S-400, Pharmacia)上加样重溶解的沉淀,纯化 HBcAg-Lys。用硫酸铵再一次沉淀合并的级分,第二次重溶解沉淀并在相同凝胶过滤柱子上加样。最后合并和浓缩级分,并且用 Bradford 试验(BioRad)估测浓度。

[0389] 实施例 4:

[0390] 无自由半胱氨酸残基但含有插入的赖氨酸残基的 HBcAg 的构建

[0391] 利用下面方法,构建这里称为 HBcAg-lys-2cys-Mut 的肝炎核心抗原(HBcAg),其在对应于 SEQ ID NO:25 中 48 和 107 的位置没有半胱氨酸残基,但含有插入的赖氨酸残基。

[0392] 通过用下面的 PCR 引物联合,首先分别扩增如上述实施例 2 中所述制备的 HBcAg-Lys 基因的 3 个片段,以引入两个突变。利用 PCR 方法和常规克隆技术制备 HBcAg-lys-2cys-Mut 基因。简言之,下列引物用于制备片段 1:

[0393] 引物 1:EcoRIHBcAg(s)

[0394] CCGGAATTCATGGACATTGACCCTTATAAAG(SEQ ID NO:58)

[0395] 引物 2:48as

[0396] GTGCAGTATGGTGAGGTGAGGAATGCTCAGGAGACTC(SEQ ID NO:62)

[0397] 下面引物用于制备片段 2:

[0398] 引物 3:48s

[0399] GSGTCTCCTGAGCATTCTCACCTCACCATACTGCAC(SEQ ID NO:63)

[0400] 引物 4:107as

[0401] CTTCCAAAAGTGAGGGAAGAAATGTGAAACCAC(SEQ ID NO:64)

[0402] 下面引物用于制备片段 3:

[0403] 引物 5:HBcAg149hind-as

[0404] CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGAAGC-GTTGATAG(SEQ ID NO:65)

[0405] 引物 6:107s

[0406] GTGGTTTCACATTTCTTCCCTCACTTTTGAAG(SEQ ID NO:66)。

[0407] 然后,用 PCR 引物 EcoRIHBcAg(s) 和 107as 联合片段 1 和 2 以产生片段 4。然后用引物 EcoRIHBcAg(s) 和 HBcAg149hind-as 联合片段 4 和片段 3 以产生全长基因。然后,用 EcoRI (GAATTC) 和 HindIII (AAGCTT) 酶消化全长基因,并且克隆到在相同限制位点切割

的 pKK 载体 (Pharmacia) 中。如实施例 3 中所述进行 HBcAg-lys-2cys-Mut 的表达和纯化。

[0408] 实施例 5

[0409] HBcAg1-185-Lys 的构建

[0410] 如实施例 2 中所述修饰肝炎核心抗原 (HBcAg)1-185。用肽 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO:33) 通过遗传方式置换 c/e1 表位 (残基 72 到 88) 区域的一部分 (脯氨酸 79 和丙氨酸 80), 产生 HBcAg-Lys 构建体 (SEQ ID NO:26)。所引入的赖氨酸残基在其侧链含有反应性氨基, 该氨基可以用于 HBcAg 颗粒与含有自由半胱氨酸基团的任何抗原的分子间化学交联。PCR 方法和常规克隆技术用于制备 HBcAg1-185-Lys 基因。

[0411] 如上述实施例 2 中所述, 从 pEco63 扩增 HBcAg 基因的两个单独的片段, 并且随后通过 PCR 融合两个片段以装配全长基因, 从而插入 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly 序列 (SEQ ID NO:33)。使用下面 PCR 引物联合:

[0412] 片段 1:

[0413] 引物 1:EcoRIHBcAg(s) (SEQ ID NO:58) (参见实施例 2)

[0414] 引物 2:Lys-HBcAg(as) (SEQ ID NO:59) (参见实施例 2)

[0415] 片段 2:

[0416] 引物 3:Lys-HBcAg(s) (SEQ ID NO:60) (参见实施例 2)

[0417] 引物 4:HBcAgwtHind III

[0418] CGCGTCCCAAGCTTCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG (SEQ ID NO:67)

[0419] 装配:

[0420] 引物 1:EcoRIHBcAg(s) (SEQ ID NO:58) (参见实施例 2)

[0421] 引物 2:HBcAgwtHind III (SEQ ID NO:67)。

[0422] 然后, 用 EcoRI (GAATTC) 和 Hind III (AAGCTT) 酶消化装配的全长基因, 并且克隆到相同限制位点切割的 pKK 载体 (Pharmacia) 中。

[0423] 实施例 6

[0424] HBcAg MIR 区域中肽表位的融合

[0425] 用具有序列 VNLTWSRASG (SEQ ID NO:68) 的表位 C ϵ H3 置换 HBcAg1-185 残基 79 和 80。C ϵ H3 序列来源于人 IgE 重链第三恒定区的序列。利用装配 PCR 方法, 将表位插入到 HBcAg1-185 序列中。在第一 PCR 步骤中, 来源于 ATCC 克隆 pEco63, 并且用引物 HBcAg-wt EcoRI fwd 和引物 HBcAg-wt Hind III rev 扩增的 HBcAg1-185 基因用做两个单独反应中的模板, 以扩增含有编码 C ϵ H3 序列的序列元件的两个片段。然后在第二 PCR 步骤中, 在装配 PCR 反应中装配这两个片段。

[0426] 第一 PCR 步骤中的引物联合:C ϵ H3 fwd 和 HBcAg-wt Hind III rev, 及 HBcAg-wt EcoRI fwd 和 C ϵ H3rev。在装配 PCR 反应中, 在没有外部引物的 3 轮 PCR 循环中, 首先装配第一 PCR 步骤中分离的两个片段, 之后将外部引物添加到反应混合物中进行下面 25 轮循环。外部引物:HBcAg-wt EcoRI fwd 和 HBcAg-wt Hind III rev。

[0427] 利用 EcoRI 和 Hind III 位点, 将 PCR 产物克隆到 pKK223.3 中, 以在大肠杆菌 (E. coli) 中表达 (参见实施例 2)。如实施例 2 中所述, 在大肠杆菌 (E. coli) 中表达嵌合 VLP 和纯化该嵌合 VLP。从凝胶过滤洗脱 HBcAg1-185-C ϵ H3 的洗脱体积表明融合蛋白和嵌合 VLP 实现装配。

- [0428] 引物序列：
- [0429] C ϵ H3fwd：
- [0430] 5' GTT AAC TTG ACC TGG TCT CGT GCT TCT GGT GCA TCC AGG GAT CTA GTA GTC 3'
- [0431] (SEQ ID NO:69)
- [0432] V N L T W S R A S G A80 S R D L V V86
- [0433] (SEQ ID NO:70)
- [0434] C ϵ H3rev：
- [0435] 5' ACC AGA AGC ACG AGA CCA GGT CAA GTT AAC ATC TTC CAA ATT ATT ACC CAC 3'
- [0436] (SEQ ID NO:71)
- [0437] D78 E L N N G V72
- [0438] (SEQ ID NO:72)
- [0439] HBcAg-wt EcoRI fwd：
- [0440] 5' CCGgaattcATGGACATTGACCCTTATAAAG (SEQ ID NO:73)
- [0441] HBcAg-wt Hind III rev：
- [0442] 5' CGCGTCCCaaagcttCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG (SEQ ID NO:74)
- [0443] 实施例 7
- [0444] HBcAg MIR 区域中 A β 1-6 肽的融合
- [0445] 用 A β 1-6 肽序列 DAEFRH (SEQ ID NO:75) 或 DAEFGH (SEQ ID NO:76) 置换 HBcAg1-185 的残基 79 和 80。利用实施例 6 中所述相同的策略设计两个重叠引物，并且通过装配 PCR 构建融合蛋白质。将 PCR 产物克隆到 pKK223.3 载体中，并且在大肠杆菌 (*E. coli*) K802 中表达。如实施例 3 中所述表达嵌合 VLP，并且纯化该嵌合 VLP。
- [0446] 实施例 8：
- [0447] A β 1-6 肽与在 CP 延伸的位置 19 截短的 Q β A1 蛋白质的 C 末端融合
- [0448] 在使用 pQ β 10 做为模板的 PCR 反应中，使用在 Q β A1 基因 5' 末端退火的引物和 A1 基因 3' 末端退火的引物，并且该引物还包含编码具有序列 DAEFRH (SEQ ID NO:75) 或 DAEFGH (SEQ ID NO:76) 的 A β 1-6 肽的序列元件。PCR 产物克隆到 pQ β 10 (Kozlovskaya T. M. 等, *Gene* 137:133-37 (1993)) 中，并且如实施例 1 中所述表达和纯化嵌合 VLP。
- [0449] 实施例 9
- [0450] 在 fr 外壳蛋白的位置 2 和 3 之间插入 A β 1-6 肽
- [0451] 通过标准分子生物学技术，在 pFrd8 载体 (Pushko, P. et al., *Prot. Eng.* 6:883-91 (1993)) 的 Bsp119I 位点中插入互补引物，所述互补引物编码具有 DAEFRH (SEQ ID NO:75) 或 DAEFGH (SEQ ID NO:76) 的 A β 1-6 肽序列，并且含有 Bsp119I 匹配末端及能引起读框内插入的另外核苷酸。做为可替代方案，用 Bsp119I 消化后，用 Klenow 补平 pFrd8 载体的突出端，并且在 Klenow 处理后，在 pFrd8 中连接编码 A β 1-6 肽序列的寡核苷酸和用于符合读框克隆的另外核苷酸。通过测序分析具有正确方向插入片段的克隆。如 Pushko, P. 等, *Prot. Eng.* 6:883-91 (1993) 中所述进行大肠杆菌 JM109 或大肠杆菌 K802 中嵌合融合蛋白的表达和纯化，但是用 SepharoseCL-4B 或 Sephacryl S-400 (Pharmacia) 柱子进行层析步骤。与实施例 1 中所述用于 Q β 的方法相似，用硫酸铵沉淀细胞裂解物，并且通过两个连续的凝胶过滤纯化步骤纯化。

[0452] 实施例 10

[0453] 在载体 pOGS8111 中于 Ty1 蛋白质 p1 的位置 67 和 68 之间插入 A β 1-6 肽

[0454] 合成编码序列 DAEFRH(SEQ ID NO:75) 或 DAEFGH(SEQ ID NO:76) 的 A β 1-6 肽的两个互补寡核苷酸,该寡核苷酸末端与 pOGS8111 的 NheI 位点匹配。根据 EP 677'111 的描述,添加另外核苷酸以允许编码 A β 1-6 肽的序列以符合读框的方式插入。由 pOGS8111 的 TyA(d) 基因中寡核苷酸插入造成的改变的 NheI 位点编码位于插入表位侧翼的氨基酸 AS 和 SS。

[0455] 如 EP0677111 和其中参考文献中所述,将 pOGS8111 转化到酿酒酵母 (*S.cervisiae*) 株系 MC2 中用于嵌合 Ty VLP 的表达。如 EP 677'111 中所述,通过蔗糖梯度超离心纯化嵌合 Ty VLP。

[0456] 实施例 11

[0457] A β 1-6 肽插入到乳头瘤病毒 1 型 (BPV-1) 的主要衣壳蛋白 L1 中

[0458] 如所述 (Chackerian, B. 等, Proc. Natl. Acad. USA 96:2373-2378(1999)), 用编码具有序列 DAEFRH(SEQ ID NO:75) 或 DAEFGH(SEQ ID NO:76) 的 A β 1-6 肽的序列置换 pFastBac1 (GIBCO/BRL) 载体中克隆的 BPV-1L1 基因氨基酸 130-136 的编码序列。通过核苷酸序列分析证实构建体序列。如制造商所述,利用 GIBCO/BRL 杆状病毒系统产生重组杆状病毒。如 Kirnbauer, R. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 89:12180-84(1992) 和 Greenstone, H. L., 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 95:1800-05(1998) 所述,从杆状病毒感染的 Sf9 细胞纯化嵌合 VLP。

[0459] 实施例 12

[0460] 用融合 VLP 的 A β 1-6 肽免疫小鼠

[0461] 如实施例 13 和 14 中所述,使用实施例 7-11 中产生的展示序列 DAEFRH(SEQ ID NO:75) 或 DAEFGH(SEQ ID NO:76) 的 A β 1-6 肽的嵌合 VLP,免疫人转基因 APP 小鼠或 C57/BL6 小鼠。如实施例 13 中所述,在 A β 1-6 肽或 A β 1-40 肽或 A β 1-42 肽特异的 ELISA 中分析从免疫小鼠获得的血清。

[0462] 如实施例 14 中所述,通过免疫一大组人 APP 转基因小鼠检查疫苗的保护作用。

[0463] 实施例 13

[0464] A β 1-6 肽和 Q β VLP 的偶联 (Q β A β 1-6), 及用 Q β A β 1-6 免疫小鼠

[0465] A. A β 1-6 肽和 Q β VLP 的偶联

[0466] 化学合成 A β 1-6 肽 (序列: NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO:77); 开始的 NH₂ 基团表示该肽具有自由 N 末端, 并且末端 NH₂ 基团表示该肽具有酰胺化的羧基末端。如实施例 1 中所述, 表达和纯化 Q β VLP。在室温 (RT) 下, 在 20mM Hepes, 150mM NaCl, pH 8.2 (HBS, pH 8.2) 中使 Q β VLP 以 2mg/ml 浓度 (Bradford 测定法中测定的) 与 1.43mMSMPH (Pierce, Rockford IL) (自 DMSO 中的母液稀释) 反应 30 分钟。然后, 在 4°C, 用 HBS, pH 8.2 缓冲液透析该反应混合物, 并且与反应混合物中稀释的 0.36mM A β 1-6 肽 (来自 DMSO 中的 50mM 母液) 反应。在 15°C, 使偶联反应进行 2 小时, 并且用 pH 8.2 的 1000 倍体积 HBS 透析反应混合物 2 $\times$ 2 小时, 并且在液氮中等份急骤冷冻, 在使用前在 -80°C 贮藏。

[0467] 融解等份试样, 并且通过 SDS-PAGE 估测 A β 1-6 肽与 Q β VLP 亚单位的偶联, 并且在 Bradford 测定法中测定蛋白质浓度。图 1 中示出了偶联反应的结果。

[0468] 图 1 表示 A β 1-6 肽与 Q β VLP 偶联反应的 SDS-PAGE 分析。在 16% Tris 甘氨酸凝胶上,在还原条件下,对样品进行电泳,用考马斯亮蓝染色。泳道 1 是蛋白质标记,在凝胶左侧边界标出了相应的分子量;泳道 2,衍生的 Q β VLP 蛋白质;泳道 3, Q β VLP 蛋白质与 A β 1-6 肽偶联反应的上清液;泳道 4, Q β VLP 蛋白质与 A β 1-6 肽偶联反应的沉淀;在图中,用箭头指示对应于每个单体偶联 1, 2 和 3 个肽的偶联产物。平均每个亚单位偶联 1.5 以上的个肽;几乎没有亚单位没有被偶联。

[0469] B. 用偶联 Q β VLP 的 A β 1-6 肽免疫小鼠和免疫应答分析

[0470] 在第 0 和 14 天,在 3 只小鼠中皮下注射偶联 A β 1-6 肽的 Q β VLP (这里命名为 Qb-Ab-1-6)。如上所述,使 A β 1-6 肽偶联 Q β VLP 蛋白质。用在 PBS 中稀释到 200 μ l 的 10 μ g 疫苗免疫每只小鼠 (C57BL/6)。在 21 天,从小鼠眼眶后取血,并且在抗 A β 1-6 肽的 ELISA 中测定对 A β 1-6 肽特异的抗体效价。利用化学交联剂磺基 -SPDP, A β 1-6 肽偶联牛 RNAase A。用偶联的 RNAase 制备物,以 10 μ g/ml 浓度包被 ELISA 板。封闭该板,然后与系列稀释的小鼠血清温育。用酶促标记的抗小鼠 IgG 抗体检测结合的抗体。做为对照,也检测了相同小鼠的免疫前血清。结果如图 2 中所示。

[0471] 图 2 表示在用偶联 Q β VLP 的 A β 1-6 肽免疫的小鼠的血清中,针对 A β 1-6 肽特异性 IgG 抗体的 ELISA 分析。结果表示免疫的 3 只小鼠 (A1-A3),在图中免疫前血清表示为“Pre”;示出了一个免疫前血清的结果。免疫前血清和用“Qb-Ab-1-6”免疫的小鼠血清的比较表明,在没有佐剂情况下,可以获得抗 A β 1-6 肽的强特异性抗体应答。

[0472] C. 抗 A β 1-40 肽的 ELISA

[0473] 在 DMSO 中制备人 A β 1-40 或 A β 1-42 肽母液,并且使用前,在包被缓冲液中稀释该母液。用 0.1 μ g/孔 A β 1-40 肽包被 ELISA 板。封闭该板,然后与上述获得小鼠血清的系列稀释物温育。用酶学标记的抗小鼠 IgG 抗体检测结合的抗体。做为对照,也包括接种前获得的血清。计算表现出高于基线平均 3 个标准偏差的血清稀释度,并且定义为“ELISA 效价”。在免疫前血清中没有检测到特异性抗体。针对 3 只小鼠获得的效价是 1 : 100000,表明抗 A β 1-40 的强特异性免疫应答。因此,用偶联 Q β VLP 的 A β 1-6 肽免疫可以激发与 A β 1-40 交叉反应的强抗体效价。

[0474] 图 3 表示 ELISA 结果。针对用如上所述偶联 Q β VLP 的 A β 1-6 肽免疫的 3 只小鼠 (A1-A3) 的血清,获得以 405nm 光密度表示的 ELISA 信号,针对 X 轴上表示的每个稀释度对该信号绘图。示出了于 21 天取血时,来自 3 只小鼠的结果。也包括免疫前的血清。如上所述检测血清中抗体的效价,所有 3 只小鼠的效价均是 1 : 100000。

[0475] 实施例 14

[0476] 人 APP 转基因小鼠的免疫

[0477] 带有人 APP 转基因的 8 月龄雌性 APP23 小鼠 (Sturchler-Pierrat 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 :13287-13292 (1997)) 用于接种。用在无菌 PBS 中稀释的 25 μ g 疫苗皮下注射小鼠,并且 14 天后,用相同量的疫苗加强免疫。在开始免疫前和加强免疫注射后 7 天,从小鼠尾静脉取血。如实施例 13 中所述,通过 ELISA,分析血清中对 A β 1-6、A β 1-40 和 A β 1-42 特异的抗体的存在。

[0478] 实施例 15

[0479] 鼠 A β 1-6 肽与 Q β VLP 的偶联,小鼠中疫苗的注射,和免疫应答的分析

[0480] 化学合成鼠 A β 1-6 肽 (序列 NH₂-DAEFGHGGC-CONH₂) (SEQ IDNO:78), 并且用于如实施例 13 中所述偶联 Q β VLP。在 C57BL/6 小鼠中注射疫苗, 测定激发的抗鼠 A β 1-6、鼠 A β 1-40 和鼠 A β 1-42 的抗体的效价。如实施例 13 中所述进行免疫和 ELISA 测定。

[0481] 实施例 16

[0482] 激发的抗 A β 1-6 的血清与人 APP 转基因小鼠斑块和 AD 斑块的结合大脑切片中的免疫组织化学

[0483] 18 月龄杂合 APP23 小鼠的连续石蜡大脑切片和来源于 Braak III 期 AD 患者的 entorhinalcortex 切片 (Institute of Pathology, University Basel) 用于染色。通过用浓甲酸处理人大脑切片 5 分钟, 和在 90°C 用微波加热小鼠大脑切片 3 分钟, 以增强抗原性。在具有 3% 山羊血清的 PBS 中以 1 : 1000 稀释抗人 A β 1-6 激发的小鼠血清 (如实施例 13 中所述获得), 并且温育过夜。漂洗后, 用在 PBS 中以 1 : 200 稀释的生物素酰化抗小鼠第二抗体温育切片 1 小时。漂洗后, 用抗生物素蛋白 - 生物素 - 过氧化物酶技术 (ABC-Elite Kit PK6100; Vector Laboratories) 进一步处理切片。最后, 切片与二氨基联苯胺 (DAB) 金属加强的底物 (Boehringer, Code 1718096) 反应, 用苏木精明矾对染, 脱水, 在二甲苯中透明并盖上盖玻片。

[0484] 在图 4A 和 B 中示出了组织学染色的结果。用经偶联 Q β VLP 的人类 A β 1-6 免疫的 3 只小鼠的血清染色切片。每种血清都阳性染色来源于转基因小鼠和 AD 的淀粉样斑块。示出了 3 种血清之一的结果。抗人类 A β 1-6 激发的血清明显地染色了转基因人 APP23 小鼠的淀粉样斑块, 及来源于 AD 患者的淀粉样斑块。免疫前的血清是阴性的。抗体染色细胞外淀粉样斑块和分离的血管。

[0485] 实施例 17

[0486] 通过小鼠斑块组织学评价抗人类 A β 1-6 激发的血清的特异性

[0487] 脑切片的免疫组织化学

[0488] 用如实施例 13 中所述抗人类 A β 1-6 激发的代表性小鼠血清, 或者用对鼠或人 APP 的最后 20 个氨基酸具特异性并且因此不识别 A β 的兔多克隆抗体, 如实施例 16 中所述染色超表达人类 APP 的 3 月龄和 18 月龄杂合 APP23 小鼠的连续石蜡脑切片。除了使用生物素酰化的抗兔第二抗体 (BA1000, Vector Laboratories) 外, 如实施例 16 中所述, 处理与兔多克隆抗体温育的切片。

[0489] 在图 5A, B, C, D 和 E 上示出了组织学染色的结果。标记在切片左下部的 A β 1-6 表示抗 A β 1-6 激发的血清已经被用于染色, 而“Pab”表示切片已经用对鼠或人类 APP 最后 20 个氨基酸 (对应于 APP₆₉₅ 中位置 676-695) 特异的多克隆抗体染色。

[0490] 对来源于 18 月龄小鼠的切片的染色比较 (图 5A 和 C), 表明抗 A β 1-6 激发的血清不与大脑中表达的 APP 交叉反应, 但是 APP 被对照多克隆抗体染色。图 5B 表示来源于 3 月龄小鼠 (在没有观察到淀粉状蛋白沉积的时间点) 的大脑切片被对 APP 特异的多克隆抗体染色。图 5D 和 5E 分别表示图 5A 和图 5B 中的海马 CA1 锥体层的放大图。

[0491] 实施例 18

[0492] A. A β 1-6 肽和 fr 衣壳蛋白的偶联

[0493] 在 25°C, 在摇摆振荡器上, 20mM Hepes, 150mM NaCl pH 7.2 中的 120 μ M fr 衣壳蛋白溶液与从 DMSO 中母液稀释的 10 倍摩尔过量的 SMPH (Pierce) 反应 30 分钟。随后, 在 4°C,

利用 1L 20mM Hepes, 150mM NaCl, pH 7.2 透析反应溶液 2 次 2 小时。然后, 在 16℃, 在摇摆振荡器上, 透析的 fr 反应混合物与 5 倍摩尔过量的 A β 1-6 肽 (序列 :NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO :77) 反应 2 小时。通过 SDS-PAGE 分析偶联产物。

[0494] B. A β 1-6 肽和 HBcAg-Lys-2cys-Mut 的偶联

[0495] 在 25℃, 在摇摆振荡器上, 20mM Hepes, 150mM NaCl pH 7.2 中的 1ml 120 μ M HBcAg-Lys-2cys-Mut 溶液与从 DMSO 中母液稀释的 10 倍摩尔过量的 SMPH(Pierce) 反应 30 分钟。随后, 在 4℃, 利用 1L 20mM Hepes, 150mM NaCl, pH 7.2 透析反应溶液 2 次 2 小时。然后, 在 16℃, 在摇摆振荡器上, 透析的 HBcAg-Lys-2cys-Mut 反应混合物与 5 倍摩尔过量的 A β 1-6 肽 (序列 :NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO :77) 反应 2 小时。通过 SDS-PAGE 分析偶联产物。

[0496] C. A β 1-6 肽和菌毛的偶联

[0497] 在室温, 在摇摆振荡器上, 20mM Hepes, pH 7.4 中的 125 μ M 1 型大肠杆菌菌毛溶液与 50 倍摩尔过量的交联剂 SMPH(Pierce) (从 DMSO 中的母液稀释) 反应 60 分钟。在 PD-10 柱子 (Amersham-Pharmacia Biotech) 上使反应混合物脱盐。合并从柱子上洗脱的含有蛋白质的级分, 并且在 16℃, 在摇摆振荡器上, 使脱盐并衍生化的菌毛蛋白质与 5 倍摩尔过量的 A β 1-6 肽 (序列 :NH₂-DAEFRHGGC-CONH₂) (SEQ ID NO :77) 反应 2 小时。通过 SDS-PAGE 分析偶联产物。

[0498] D. 用偶联 fr 衣壳蛋白、HBcAg-Lys-2cys-Mut 或菌毛的 A β 1-6 肽免疫小鼠

[0499] 在第 0 和 14 天, 在 小鼠 (3 只小鼠) 中皮下注射上述偶联 fr 衣壳蛋白、HBcAg-Lys-2cys-Mut 或菌毛的 A β 1-6 肽。用在 PBS 中稀释到 200 μ l 的 10 μ g 疫苗免疫每只小鼠 (C57BL/6)。在第 21 天从小鼠眼眶后取血, 并且如实施例 13 中所述通过 ELISA 测定对 A β 1-6 肽或 A β 1-40 或 A β 1-42 特异的抗体的效价。

[0500] 实施例 19

[0501] 用 Q β hA β 1-6 免疫恒河猴

[0502] 因为人类和恒河猴之间 A β 序列相同, 所以为了检测在 A β 1-6 是自身抗原的情况下基于人类 A β 1-6 肽的疫苗对于抗人类 A β 抗体的诱导, 用 Q β hA β 1-6 免疫恒河猴。如实施例 13 中所述制备 Q β hA β 1-6 疫苗。在 0 天, 用 50 μ g 疫苗免疫 10 至 15 岁龄的 4 只恒河猴, 并且在 28 和 56 天, 用 25 μ g 疫苗加强免疫 2 次。背部皮下免疫猴子。在 0 天 (取血前)、42 天和 70 天从动物取血。从头前臂静脉 (V. cephalica antebrachii) 收集 4ml 血液。通过基本如实施例 13 中所述的 ELISA, 利用对猴子 IgG 特异的第二抗体, 测定对 A β 1-40 特异的抗体的效价。

[0503] 因为人类和恒河猴共有相同的 A β 序列, 所以恒河猴中对 A β 1-40 特异的高效价抗体的产生表明用偶联 Q β 的 hA β 1-6 免疫打破了对自身抗原 A β 的耐受性。而且, 在灵长类中, 用偶联的 A β 1-6 片段可以产生识别全长 A β 的抗体。

[0504] 图 6 中示出了 ELISA 结果。图中所示的是在用 Q β hA β 1-6 免疫的 4 只猴子 (1-4) 血清中测定的 A β 1-40 特异性抗体的效价和该 4 只猴子的平均效价。效价表示为 OD₅₀ 效价。OD₅₀ 是信号达到最大信号值一半时的抗体稀释度。从来源于用 Q β hA β 1-27 免疫的猴子并识别 A β 1-40 的参照血清获得最大值 (OD 最大值), 并且该最大值是在相同 ELISA 平板上测定的。

[0505] 在第 97, 110, 117, 124, 138, 143, 152, 159, 166 天, 从两只猴子 (上述) 取血, 并且在 110 天, 用 25 μ g 疫苗进行第三次加强免疫。合并血清 (99ml), 并且用于 A β 1-6 特异性抗体的亲和纯化。这些抗体以 1.5 μ g/ml 浓度用于免疫组织化学染色, 并且生物素酰化的第二抗猴子抗体用于检测。18 月龄杂合 APP23 小鼠和 Braak III 期 AD 患者的石蜡脑切片用于染色。在 APP23 小鼠脑切片中和 AD 患者脑切片中均观察到斑块特异性染色 (图 7)。

[0506] 图 7A 和 B 中示出了组织学分析的结果。图 7A 中所示的是用上述对 A β 1-6 特异的亲和纯化抗血清染色人 APP 转基因小鼠斑块 (APP23 株系)。图 7B 表示用相同的纯化抗血清染色人类 AD 斑块。在两种情况下, 都使用 1.5 μ g/ml 浓度的纯化抗血清。两图上均以箭头指示典型斑块。

[0507] 实施例 20

[0508] 鼠 A β 1-6 与 AP205VLP 的偶联, 小鼠的免疫和免疫应答的分析

[0509] A. 鼠 A β 1-6 肽与 AP205VLP 的偶联

[0510] 化学合成鼠 A β 1-6 肽 (mA β 1-6, 序列: NH₂-DAEFGHGGC-CONH₂ (SEQ ID NO: 78); 开始的 NH₂ 基团表示该肽具有自由 N 末端, 并且末端 NH₂ 基团表示该肽具有酰胺化的羧基末端)。在室温下, 20mM Hepes, 150mM NaCl, pH 8.0 (HBS, pH 8.0) 中 (如实施例 1 中表达和纯化的) AP205VLP 以 (在 Bradford 测定法中测定的) 2mg/ml 浓度与从 DMSO 中 100mM 母液稀释的 2.86mM SMPH (Pierce, Rockford IL) 反应 30 分钟。然后, 在 4 $^{\circ}$ C, 用 pH 7.4 的 1000 倍体积 HBS 透析反应混合物 2 次 2 小时; 在液氮中急骤冷冻所得到的经透析和衍生化的 AP205VLP, 并且在 -20 $^{\circ}$ C 过夜贮藏。用 1 体积 pH 7.4, 20mM HBS 稀释衍生的 AP205VLP, 并且在 15 $^{\circ}$ C, 在振荡条件下与反应混合物中稀释的 719 μ M mA β 1-6 肽 (来源于 DMSO 中的 50mM 母液) 反应 2 小时。用 pH 7.4, 1000 倍体积 HBS 透析偶联反应物 2 次 2 小时, 并且过夜。在液氮中急骤冷冻等分的透析的反应混合物, 在使用前, 在 -80 $^{\circ}$ C 贮藏。

[0511] 融解等份试样, 并且通过 SDS-PAGE 估测 mA β 1-6 肽与 AP205VLP 亚单位的偶联, 并且在 Bradford 测定法中测定蛋白质浓度。图 8 中示出了偶联反应的结果。

[0512] 图 8 表示 mA β 1-6 肽与 AP205VLP 偶联反应的 SDS-PAGE 分析。在 16% Tris 甘氨酸凝胶上, 在还原条件下, 对样品进行电泳, 并且用考马斯亮蓝染色。泳道 1 是蛋白质标记, 在凝胶左侧边界标出了相应的分子量; 泳道 2, AP205VLP 蛋白质; 泳道 3, 衍生的 AP205VLP; 泳道 4, AP205VLP 与 mA β 1-6 肽偶联反应的上清液; 泳道 5, AP205VLP 与 mA β 1-6 肽偶联反应的沉淀。在凝胶上没有检测到未偶联的 AP205VLP 亚单位, 而观察到了对应于每个亚单位几个肽的条带, 证明了非常高的偶联效率。特别地, 每个 AP205VLP 亚单位具有远多于一个的 A β 1-6 肽。

[0513] B. 用偶联 AP205VLP 的 mA β 1-6 肽免疫小鼠和免疫应答分析

[0514] 在 0 和 14 天, 在小鼠 (3 只小鼠) 中皮下注射偶联 mA β 1-6 肽的 AP205VLP。如上所述, mA β 1-6 肽偶联 AP205VLP。用在 PBS 中稀释到 200 μ l 的 25 μ g 疫苗免疫每只小鼠 (C57BL/6)。在 21 天, 从小鼠眼眶后取血, 并且在抗 mA β 1-6 肽的 ELISA 中测定对 mA β 1-6 肽特异的抗体的效价。利用化学交联剂磺基 -SPDP, mA β 1-6 肽偶联牛 RNase A。用 RNase-mA β 1-6 制备物, 以 10 μ g/ml 浓度包被 ELISA 板。封闭该板, 然后与系列稀释的小鼠血清温育。用酶学标记的抗小鼠 IgG 抗体检测结合的抗体。做为对照, 也检测了相同小鼠的免疫前血清。结果如图 9 中所示。

[0515] 图 9 表示在用偶联 AP205VLP 的 mA β 1-6 肽免疫的小鼠的血清中,针对 mA β 1-6 肽特异性 IgG 抗体的 ELISA 分析。结果表示在第 21 天 (A1d21-A3d21) 收集的 3 只免疫小鼠的血清,在图中免疫前血清表示为“Pre imm”;示出了一个免疫前血清的结果。免疫前血清和用偶联 AP205VLP 的 mA β 1-6 免疫的小鼠血清比较,表明在没有佐剂情况下,抗自身抗原肽 mA β 1-6 可以获得强特异性抗体应答。而且,自身肽与 AP205VLP 偶联可以破坏对该肽的耐受性,并且引起非常高的特异性免疫应答。因此,AP205VLP 适于在没有佐剂的情况下产生抗 A β 肽的高抗体效价。

[0516] 实施例 21:

[0517] 用 Q β hA β 1-6 免疫减少了超表达“Swedish/London”突变淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠中的淀粉样斑块

[0518] 该实施例证明在发展有阿尔茨海默氏病样弥散性(刚果红阴性)淀粉样斑块的小鼠模型中,用 Q β hA β 1-6 免疫在新皮层和皮层下大脑区域中引起了斑块密度的大幅度减少。弥散性淀粉样斑块的组织学出现是 AD 大脑病理学的显著特征 (Selkoe, 1994, Annu. Rev. Neurosci. 17:489-517),因此,该实施例证明了用 Q β hA β 1-6 免疫提供了阿尔茨海默氏病治疗的有效方法。

[0519] 为了评估用 Q β -A β 1-6 免疫的治疗效果,使用在小鼠 Thy-1 启动子控制下超表达“Swedish/London”突变淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠 (APP24 ;K670N/M671L ;V717I, 专利号 .W0980-36-4423)。该小鼠株系的特征在于:在 18 月龄时,在新皮质、海马、尾状核及壳核和丘脑中有大量淀粉样斑块。在 9 月龄时可以首先观察到斑块。组织学上,APP24 小鼠中淀粉样斑块主要是弥散型的,即,它们为刚果红染色阴性的。较少地,也可以发现紧密的淀粉样斑块(刚果红阳性)。

[0520] 如实施例 13 中所述,制备偶联 Q β VLP 的人 A β 1-6 肽 (Q β hA β 1-6)。根据下面实验方法(这些方法对于描述和实现本发明不是必须的),在 0 天,用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中的 25 μ g Q β hA β 1-6 (每只小鼠给药 $2 \times 100 \mu$ l) (n = 16),或者做为阴性对照用 PBS (每只小鼠给药 $2 \times 100 \mu$ l) (n = 9),或者用无偶联抗原的 Q β 病毒样颗粒 (n = 11),皮下注射 9.5 月龄 APP24 转基因小鼠。随后,在第 15, 49, 76, 106, 140, 169, 200, 230, 259 和 291 天,给小鼠注射 25 μ g Q β hA β 1-6 疫苗、Q β 或 PBS。在第一次免疫前 (0 天) 1-2 天和在第 56, 90, 118, 188, 214, 246 和 272 天,通过尾静脉从动物取血。在 305 天也收集血清,在这时也收集大脑用于组织病理学检查(在该时间点,小鼠年龄:19.5 个月)。

[0521] 基本如实施例 13 中所述,通过 ELISA 测定对 A β 1-40 特异的抗体效价。在图 10 中示出了 ELISA 的结果。图中所示的是在用 Q β hA β 1-6 免疫的小鼠血清中测定的 A β 1-40 或 A β 1-42 特异性抗体的效价。该效价表示为 OD50% 效价。OD50% 是信号达到其最大值一半时的抗体稀释度。从在相同 ELISA 平板上测定的识别 A β 1-40 和 A β 1-42 的参照抗体获得最大值 (OD 最大值)。所有 Q β hA β 1-6 免疫的小鼠都有 1 : 8000 以上的 OD50% 效价 (免疫前血清效价低于 1 : 100),证明了甚至在老龄 APP24 小鼠中也出现对 Q β hA β 1-6 一致的抗体应答 (图 10)。在整个免疫期间,免疫组中,中值 OD50% 效价是 1 : 20'000 到 1 : 50'000。

[0522] 为了定量淀粉样斑块,在 4°C,在 0.1M PBS 中的 4% 甲醛中浸没来固定大脑。用乙醇脱水后,大脑被包埋在石蜡中,并且用切片机径向切成 4 μ m 厚度的切片。将切片置于超

冷冻的载玻片上,并且在 37℃干燥。在 PBS 中洗切片,并且通过在 90℃,0.1M 柠檬酸缓冲液中微波加热 3 分钟加强抗原性。在 PBS 中,用 3% 山羊血清以 1 : 1000 稀释 NT11 抗血清 (抗 A β 1-40, Sturchler-Pierrat 等,1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94 :13287-13292), 并且在 4℃温育过夜。漂洗后,用在 PBS 中以 1 : 200 稀释的生物素酰化抗兔 IgG 第二抗体 (BA1000, Vector Laboratories) 温育切片 1 小时。漂洗后,用抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶技术 (ABC-Elite KitPK6100 ;Vector Laboratories) 进一步处理切片。最后,切片与二氨基联苯胺 (DAB) 金属加强的底物 (Boehringer, Code 1718096) 反应,用苏木精明矾复染,脱水,在二甲苯中透明和盖上盖玻片。每个动物 3 个不同解剖平面的系统-随机系列大脑切片用于分析。利用 MCID 图像分析仪 (ImagingResearch, Brock University, Ontario-Canada, Program Version M5elite) 定量淀粉样斑块。通过利用 Xillix 黑白 CCD TV 照相机数字化该显微图像,并且以 256 灰度,以 640×480 像素分辨率存储。利用物镜测微计 (LeicaNeoplan Objective),以 5x 放大倍数校准该像素大小。利用用于邻近物场精确定位的电动机驱动的显微镜载物台,分析每个切片的整个新皮层和嗅核。对于每个物场,用人工轮廓限定解剖面积。对于每个单独的切片,用免疫阳性淀粉样斑块和组织背景之间的人工阈值设定 (灰度水平) 限定样品面积。通过人工轮廓排除分离的组织假象。原始数据测定为单独的计数 (淀粉样沉积物) 和成比例的面积值 (免疫阳性淀粉样斑 / 皮层或嗅核)。

[0523] 每只小鼠的数据被标准化为每 mm² 的沉积物 (斑块) 数量,和按整个新皮层的百分数计的总斑块面积。与 PBS 或 Q β 注射的对照组比较,Q β hA β 1-6 免疫的小鼠显示了在皮层和皮层下区域中显著减少的淀粉样沉积物 (图 11)。在皮层、尾状核及壳核、海马和丘脑中,与 PBS 组比较,沉积物的中值数量和总斑块面积均高度显著地减少了 80% -98% ($p < 0.001$, 与 PBS 组比较, Mann-Whitney 检测 ;图 12)。

[0524] 在第二项研究中,在 0 天,用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 中的 25 μ g Q β hA β 1-6 (每只小鼠给药 2×100 μ l) ($n = 15$),或者做为阴性对照用 PBS (每只小鼠给药 2×100 μ l) ($n = 15$) 皮下注射 13.5 月龄 APP24 转基因小鼠。随后,在 16, 46, 76, 109, 140 和 170 天,给小鼠注射 25 μ g Q β hA β 1-6 疫苗或 PBS。在第一次免疫 (0 天) 前 1-2 天,和在 31, 59, 128 和 154 天,通过尾静脉从动物取血。在 184 天,也收集血清,在该时间点也收集大脑用于组织病理学检查 (该时间点小鼠的年龄 :19.5 个月)。如上所述测定和表示对 A β 1-40 特异的抗体效价,并且再一次发现所有免疫的小鼠对 Q β hA β 1-6 免疫产生应答,具有至少 1 : 2000 以上的 OD50% 效价 (未示出)。整个免疫期间,中值 OD50% 效价是 1 : 10'000 到 1 : 50'000。如上所述进行淀粉样沉积物的定量。与较早 (即,在 9.5 月龄) 起始免疫的实验比较,新皮层中斑块沉积物数量 (-55%) 和面积 (-32%) 的减少不太剧烈,但是仍旧非常明显 (图 13) 并且有高度的显著性 ($p > 0.001$, 与 PBS 比较, Mann-Whitney 检测)。在 Q β hA β 1-6 免疫组中,在皮层下的区域中,斑块沉积物数量和面积减少了 60-90%。与皮层比较,这些区域中更显著的效果可能与这些区域中更长的斑块形成时间有关。

[0525] 总之,这两个实验证明了在超表达“Swedish/London”突变淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠中,Q β hA β 1-6 免疫急剧地减少了这些小鼠中淀粉样沉积物的出现。

[0526] 图 10 :超表达“Swedish/London”突变淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠中血清抗 A β 40/42 抗体效价 (OD50%)。用 Q β hA β 1-6 免疫 9.5 和 19 个月龄之间的小鼠。所示的

是个体值（黑点）和框图，其中框的两端定义第 25 个和第 75 个百分点，并示出中值处的线条和定义第 10 个和第 90 个百分点的误差线（框外值以点表示）。

[0527] 图 11：在径向大脑切片中淀粉样斑块的免疫组织化学染色。图中所示是用 Q β (A) 或 Q β hA β 1-6 (B) 疫苗免疫的超表达“Swedish/London”突变淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠的径向大脑切片。

[0528] 图 12：在 9.5 至 19 月龄免疫后，超表达“Swedish/London”突变淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠中斑块沉积的定量。(A) 皮层斑块密度。(B) 皮层斑块面积。(C) 尾状核壳核中斑块密度。(D) 尾状核壳核中斑块面积。(E) 海马中斑块密度。(F) 海马中斑块面积。(G) 丘脑中斑块密度。(H) 丘脑中斑块面积。斑块密度表示为斑块/mm²，斑块面积表示为 β 淀粉样蛋白覆盖的组织面积的百分比。数据以个体值（黑点）及框图表示。框两端定义第 25 个和第 75 个百分点，并示出中值处的线条和定义第 10 个和第 90 个百分点的误差线。^{*} $p < 0.001$ (Mann Whitney Rank Sum 检测)。PBS, $n = 9$, Q β , $n = 11$, Q β hA β 1-6, $n = 16$ 。

[0529] 实施例 22

[0530] 用 Q β hA β 1-6 免疫减少了超表达“Swedish”突变体淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠中的淀粉样斑块

[0531] 该实施例证明了甚至在非常晚的淀粉样斑块病理学阶段起始免疫，用 Q β hA β 1-6 免疫也提供了阿尔茨海默氏病治疗的有效方法。在该实施例中使用的 AD 小鼠模型中淀粉样斑块沉积过程在大约 6 个月龄就已经开始了 (Sturchler-Pierrat 等, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94 :13287-13292)。在这里所述研究中，在 18 个月龄开始用 Q β hA β 1-6 免疫，这时在皮层中已经形成了高数量的紧密斑块。该实施例也证明了在非常年老的动物中，Q β hA β 1-6 也可以诱导 A β 40/42 抗体（在 19 只免疫小鼠中没有未应答者）。

[0532] 为了评估 Q β hA β 1-6 免疫的治疗效果，使用超表达“Swedish”突变淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠 (APP23 ;K670N/M671L, Sturchler-Pierrat 等, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94 :13287-13292)。在这些小鼠中已充分地表征了阿尔茨海默氏病样病理学 (Calhoun 等, 1998, Nature 395 :755-756 ;Phinney 等, 1999, J. Neurosci. 19 :8552-8559 ;Bondolfi 等, 2002, J. Neurosci. 22 :515-522)。

[0533] 如实施例 13 中所述制备偶联 Q β VLP 的人 A β 1-6 肽 (Q β hA β 1-6)。根据下面实验方法（这些方法对描述和实施本发明不是必须的），在 0 天，用磷酸缓冲盐水中溶解的 25 μ g Q β hA β 1-6（每只小鼠给药 $2 \times 100 \mu$ l）($n = 19$)，或者做为阴性对照用磷酸缓冲盐水 ($n = 17$)，皮下注射 18 个月龄 APP23 转基因小鼠，并且在 13, 27-34, 61-63, 90-96 和 123-130 天，用 25 μ g 疫苗加强免疫。在第一次免疫 (0 天) 前 1-2 天和在第 41-45 天和 68 天，通过尾静脉从动物取血。也在 152-154 天收集血清，在该时间点也收集大脑用于组织病理学检查（该时间点的小鼠年龄：23 个月）。

[0534] 基本如实施例 13 中所述，通过 ELISA 测定对 A β 1-40 特异的抗体效价，并且如实施例 21 中所述表示结果。在图 14 中示出了 ELISA 结果。所有 Q β hA β 1-6 免疫的小鼠都有 1 : 2000 以上 OD50% 效价（免疫前血清效价低于 1 : 100），证明了即使在非常年老的小鼠中对 Q β -A β 1-6 仍有一致的抗体应答（图 14）。整个免疫期间，中值 OD50% 效价是 1 : 9'000 到 1 : 20'000。

[0535] 如实施例 21 中所述进行淀粉样斑块的定量。每只小鼠的数据被标准化为每 mm^2 沉积物（斑块）的数量和以整个新皮层的 % 表示的总斑块面积。Q β hA β 1-6 免疫的小鼠在皮层中显示了更少数量的沉积物（图 15, 图 16），这主要由于小体积的斑块的减少所致。与未免疫组比较，Q β hA β 1-6 免疫组中中值等斑块数量减少 33% ($p < 0.001$, 与 PBS 组比较, Mann-Whitney 检测)。因为主要是小体积的斑块受影响, 所以总斑块面积的减少是中等的, 达到 10% ($p < 0.01$, 与 PBS 组比较, Mann-Whitney 检测)。

[0536] 图 14: 超表达“Swedish”突变淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠中血清抗 A β 40/42 抗体效价 (OD50%)。用 Q β hA β 1-6 免疫 18 至 23 月龄的小鼠。所示的是个体值（黑点）和框图, 其中框两端定义了第 25 个和 75 个百分点, 并示出中值处的线条和定义第 10 个和第 90 个百分点的误差线（框外以点表示）。

[0537] 图 15: 径向大脑切片中淀粉样斑块的免疫组织化学染色。箭头指向小体积的沉积物。图中所示的是来源于用 PBS (A) Q β -A β 1-6 (B) 免疫的超表达“Swedish”突变淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠的径向大脑切片。

[0538] 图 16: 在 18 至 23 个月龄免疫后, 超表达“Swedish”突变淀粉样前体蛋白质的转基因小鼠中斑块沉积的定量。(A) 皮层斑块密度。(B) 皮层斑块面积。斑块密度表示为斑块 / mm^2 , 斑块面积表示为 β 淀粉状蛋白覆盖的组织面积的百分比。数据表示为个体值（黑点）和框图。框两端定义了第 25 个和 75 个百分点, 并示出中值处的线条和定义第 10 个和第 90 个百分点的误差线。 ** $p < 0.001$ (Mann Whitney Rank Sum 检测)。PBS, $n = 17$, Q β hA β 1-6, $n = 19$ 。

[0539] 为了清楚地理解本发明的目的, 现在已经通过示例和实施例的方式完整地以一定的详细程度描述了本发明, 本领域普通技术人员显而易见可以通过在广泛等同的条件、制剂和其它参数范围内修改或改变本发明而实施本发明, 而不影响本发明的范围和其任何具体实施方式, 并且所附权利要求的范围意欲包括这些修改或改变。

[0540] 本说明书中提到的所有公开出版物、专利和专利申请指示了本发明所属领域的技术人员的水平, 并且在这里将它们并入为参考文献, 就如同具体和单独地指明每篇单独的公开出版物, 专利或专利申请并入为参考文献一样。

[0001]

序列表

<110> 希托斯生物技术股份公司 (Cytos Biotechnology AG)
诺瓦提斯医药股份公司 (Novartis Pharma AG)

<120> 含有淀粉样 β 1-6抗原阵列的疫苗组合物

<130> PA041WO

<150> US 60/396,639

<151> 2002-07-19

<150> US 60/470,432

<151> 2003-05-15

<160> 93

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 1

Met Ala Val Val Ser Phe Gly Val Asn Ala Ala Pro Thr Thr Pro Gln
1 5 10 15

Gly Gln Gly Arg Val Thr Phe Asn Gly Thr Val Val Asp Ala Pro Cys
20 25 30

Ser Ile Ser Gln Lys Ser Ala Asp Gln Ser Ile Asp Phe Gly Gln Leu
35 40 45

Ser Lys Ser Phe Leu Ala Asn Asp Gly Gln Ser Lys Pro Met Asn Leu
50 55 60

Asp Ile Glu Leu Val Asn Cys Asp Ile Thr Ala Phe Lys Asn Gly Asn
65 70 75 80

Ala Lys Thr Gly Ser Val Lys Leu Ala Phe Thr Gly Pro Thr Val Ser
85 90 95

Gly His Pro Ser Glu Leu Ala Thr Asn Gly Gly Pro Gly Thr Ala Ile
100 105 110

Met Ile Gln Ala Ala Gly Lys Asn Val Pro Phe Asp Gly Thr Glu Gly
115 120 125

[0002]

Asp Pro Asn Leu Leu Lys Asp Gly Asp Asn Val Leu His Tyr Thr Thr
130 135 140

Val Gly Lys Lys Ser Ser Asp Gly Asn Ala Gln Ile Thr Glu Gly Ala
145 150 155 160

Phe Ser Gly Val Ala Thr Phe Asn Leu Ser Tyr Gln
165 170

<210> 2
<211> 182
<212> PRT
<213> 大肠杆菌

<400> 2

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

Ser Ser Thr Ala Ala Leu Ala Ala Ala Thr Thr Val Asn Gly Gly Thr
20 25 30

Val His Phe Lys Gly Glu Val Val Asn Ala Ala Cys Ala Val Asp Ala
35 40 45

Gly Ser Val Asp Gln Thr Val Gln Leu Gly Gln Val Arg Thr Ala Ser
50 55 60

Leu Ala Gln Glu Gly Ala Thr Ser Ser Ala Val Gly Phe Asn Ile Gln
65 70 75 80

Leu Asn Asp Cys Asp Thr Asn Val Ala Ser Lys Ala Ala Val Ala Phe
85 90 95

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

Ser Ser Ala Ala Gly Ser Ala Thr Asn Val Gly Val Gln Ile Leu Asp
115 120 125

Arg Thr Gly Ala Ala Leu Thr Leu Asp Gly Ala Thr Phe Ser Ser Glu
130 135 140

Thr Thr Leu Asn Asn Gly Thr Asn Thr Ile Pro Phe Gln Ala Arg Tyr
145 150 155 160

[0003]

62

```

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> 5
<211> 329
<212> PRT
<213> 噬菌体 Q-beta

<400> 5

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

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

```

[0005]

```

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

```

[0006]

<210> 6
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 噬菌体 R17

<400> 6

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> 7
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> 噬菌体 fr

<400> 7

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

[0007]

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

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> 8

<211> 130

<212> PRT

<213> 噬菌体 GA

<400> 8

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

[0008]

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> 9
<211> 132
<212> PRT
<213> 噬菌体 SP

<400> 9

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

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> 10
<211> 329
<212> PRT

[0009]

<213> 噬菌体 SP

<400> 10

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

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

[0010]

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> 11
<211> 130
<212> PRT
<213> 噬菌体 MS2

<400> 11

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

[0011]

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

Ile Tyr
130

<210> 12
<211> 133
<212> PRT
<213> 噬菌体 M11

<400> 12

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> 13
<211> 133
<212> PRT

[0012]

<213> 噬菌体 MX1

<400> 13

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

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> 14

<211> 330

<212> PRT

<213> 噬菌体 NL95

<400> 14

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

[0013]

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	
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	

[0014]

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> 15

<211> 129

<212> PRT

<213> 噬菌体 f2

<400> 15

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> 16

<211> 128

<212> PRT

[0015]

<213> 噬菌体 PP7

<400> 16

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> 17

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 噬菌体 Qbeta 240突变体

<400> 17

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

[0016]

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 243突变体		
<400> 18		
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
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

[0017]

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 250突变体

<400> 19

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> 20
 <211> 132
 <212> PRT

[0018]

<213> 人工序列

<220>

<223> 噬菌体 Q-beta 251突变体

<400> 20

Ala Lys 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

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 21

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 噬菌体 Q-beta 259突变体

<400> 21

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

[0019]

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> 22
<211> 185
<212> PRT
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 22

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

[0020]

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> 23

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 23

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile
20 25 30

Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu
35 40 45

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser
50 55 60

Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His
65 70 75 80

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Asn
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Val Ser Arg Asp
100 105 110

[0021]

Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Thr Thr Val Gly Leu Lys Phe Arg Gln
115 120 125

Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val
130 135 140

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg
195 200 205

Glu Ser Gln Cys
210

<210> 24

<211> 188

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 24

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
35 40 45

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

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Glu Gln
65 70 75 80

Val Arg Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys
85 90 95

[0022]

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> 26

<211> 152

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 26

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

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

[0024]

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
145 150

<210> 27
<211> 3635
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒 pAP283-58

<400> 27
cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga 60
gctcgcccg ggatcctcta gaattttctg cgcacccatc ccgggtggcg cccaaagtga 120
ggaaaatcac atggcaaata agccaatgca accgatcaca tctacagcaa ataaaattgt 180
gtggtcggat ccaactcggt tatcaactac attttcagca agtctgttac gccaacgtgt 240
taaagttggt atagccgaac tgaataatgt ttcagggtcaa tatgtatctg ttataagcg 300
tcctgcacct aaaccggaag gttgtgcaga tgctgtgtc attatgccga atgaaaacca 360
atccattcgc acagtgattt cagggtcagc cgaaaacttg gctaccttaa aagcagaatg 420
ggaaactcac aaacgtaacg ttgacacact cttcgcgagc ggcaacgccg gtttgggttt 480
ccttgaccct actgcggcta tcgtatcgtc tgatactact gcttaagctt gtattctata 540
gtgtcaccta aatcgtatgt gtatgataca taaggttatg tattaattgt agccgcgttc 600
taacgacaat atgtacaagc ctaattgtgt agcatctggc ttactgaagc agaccctatc 660
atctctctcg taaactgccg tcagagtcgg tttggttgga cgaaccttct gagtttctgg 720
taacgccgtt ccgcaccccg gaaatgggtc ccgaaccaat cagcagggtc atcgctagcc 780
agatcctcta cgccggacgc atcgtggccg gcatcacccg cgcacacagt gcggttgctg 840
gcgcctatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga 900
gcgcttggtt cggcgtgggt atggtggcag gcccgtggc cgggggactg ttgggcgcca 960
tctccttgca tgcaccattc cttgcggcgg cgggtgcttca acggcctcaa cctactactg 1020
ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gatatggtgc actctcagta 1080
caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc aactccgcta tcgctacgtg actgggtcat 1140
ggctgcgccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc 1200

[0025]

ggcatccgct	tacagacaag	ctgtgaccgt	ctccgggagc	tgcattgtgtc	agagggttttc	1260
accgtcatca	ccgaaacgcg	cgaggcagct	tgaagacgaa	agggcctcgt	gatacgccta	1320
tttttatagg	ttaatgtcat	gataataatg	gtttcttaga	cgtcagggtgg	cacttttcgg	1380
ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	1440
ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	1500
attcaacatt	tccgtgtcgc	ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	tcctgttttt	1560
gctcaccag	aaacgctggg	gaaagtaaaa	gatgctgaag	atcagttggg	tgacagagt	1620
ggttacatcg	aactggatct	caacagcggg	aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	1680
cgtttttcaa	tgatgagcac	ttttaaagtt	ctgctatgtg	gcgcggtatt	atcccgtatt	1740
gacgcggggc	aagagcaact	cggtcgccc	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	1800
tactcaccag	tcacagaaaa	gcatcttacg	gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	1860
gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	gccaaacttac	ttctgacaac	gatcggagga	1920
ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgacaaac	atgggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	1980
tgggaaccgg	agctgaatga	agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgta	2040
gcaatggcaa	caacgttgcg	caaaactatta	actggcgaaac	tacttactct	agcttcccgg	2100
caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	2160
cttcgggctg	gctggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggg	2220
atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	ccctcccgtg	tcgtagttat	ctacacgacg	2280
gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgccctactg	2340
attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	2400
cttcattttt	aattttaaag	gatctagggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgacccaa	2460
atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	2520
tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaacaaa	aaaaccaccg	2580
ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	2640
ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	gttaggccac	2700
cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	tgctaatacct	gttaccagt	2760
gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	2820
gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	cttgagcgga	2880
acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgcgagcatt	gagaaagcgc	cacgcttccc	2940
gaagggagaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	3000

[0026]

```

agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcggggtt tcgccacctc 3060
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3120
agcaacgcgg ccttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt 3180
cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc 3240
gctcgccgca gccgaacgac gagcgcagcg agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgcc 3300
caatacgcaa accgcctctc cccgcgcggt ggccgattca ttaatgcagc tgtgggtgtca 3360
tggtcgggtga tcgccagggg gccgacgcgc atctcgactg catggtgcac caatgcttct 3420
ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta tggccgtgca ggtcgtaa at cactgcataa 3480
ttcgtgtcgc tcaaggcgca ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac 3540
ggttctggca aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcgaact agttaactag 3600
tacgcaagtt cacgtaaaaa gggatcgcg gaatt 3635

```

<210> 28
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 噬菌体 AP205

<400> 28

```

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

```

[0027]

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

Thr Thr Ala
 130

<210> 29
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> AP205外壳蛋白

<400> 29

Met Ala Asn Lys Thr 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

<210> 30
 <211> 3607
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0028]

<220>

<223> 质粒 pAP281-32

<400> 30

```

cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga      60

gctcgcccg ggatcctcta gattaaccca acgcgtagga gtcaggccat ggcaaataag      120

acaatgcaac cgatcacatc tacagcaaataaaaattgtgt ggtcggatcc aactcgttta      180

tcaactacat tttcagcaag tctgttacgc caacgtgtta aagttggtat agccgaactg      240

aataatgttt caggtcaata tgtatctgtt tataagcgto ctgcacctaa accgaaggtc      300

agatgcctgt gtcattatgc cgaatgaaaa ccaatccatt cgcacagtga tttcagggtc      360

agccgaaaac ttggctacct taaaagcaga atgggaaact cacaaacgta acgttgacac      420

actcttcgcy agcggcaacg ccggtttggg tttccttgac cctactgcyg ctatcgtatc      480

gtctgatact actgcttaag cttgtattct atagtgtcac ctaaatcgta tgtgtatgat      540

acataagggt atgtattaat ggtagccgcy ttctaacgac aatatgtaca agcctaattg      600

tgtagcatct ggcttactga agcagaccct atcatctctc tcgtaaactg ccgtcagagt      660

cggttggggt ggacagacct ctgagtttct ggtaacgcyg ttccgcaccc cggaaatggt      720

caccgaacca ttcagcaggg tcacgctag ccagatcctc tacgccggac gcatcgtggc      780

ccgcatcacc ggccccacag gtgcggtgct ggccctata tcgccgacat caccgatggg      840

gaagatcggy ctgcgcactt cgggctcatg atcgctggtt tccgcctggg tatggtggca      900

ggccccggtg cccgggggac tgttgggcyg catctccttg catgcaccat tccttgcygc      960

ggcgggtgct aacggcctca acctactact gggctgcttc ctaatgcagg agtcgcataa     1020

gggagagcgt cgatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccg atagttaagc     1080

caactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcyg ccgacacccg ccaacacccg     1140

ctgacgcgcy ctgacgggct tgtctgcttc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg     1200

tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgaggcagc     1260

ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat     1320

ggtttcttag acgtcagggt gcaacttttcg gggaaatgtg cgcggacccc ctattggttt     1380

atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct     1440

tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc     1500

cttttttgcy gcattttgcy ttctgtttt tgcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa     1560

agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgy     1620

taagatcctt gagagttttc gcccgaaga acgtttttca atgatgagca cttttaaagt     1680

```

[0029]

tctgctatgt	gtcgcggtat	tatcccgtat	tgacgcgagg	caagagcaac	tccgtcgccg	1740
catacactat	tctcagaatg	acttggtggt	acctaccagt	cacagaaaag	catcttacgg	1800
atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	catgagtgat	aacactgcgg	1860
ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	aaccgctttt	ttgcacaaca	1920
tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	gctgaatgaa	gccataccaa	1980
acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtac	gaacggcaac	aacgttgcg	aaactattaa	2040
ctggcgaaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	agactggatg	gaggcgata	2100
aagttgcagg	accacttctg	cgctcggccc	ttccggctgg	ctggtttatt	gctgataaat	2160
ctggagccgg	tgagcgtggg	tctcgcggta	tcattgcagc	actggggcca	gatggtaagc	2220
cctcccgtat	cgtagttatc	tacacgacgg	ggagtcaggc	aactatggat	gaacgaaata	2280
gacagatcgc	tgagataggt	gcctcactga	ttaagcattg	gtaactgtca	gaccaagttt	2340
actcatatat	acttttagatt	gatttaaaac	ttcattttta	atttaaaagg	atctaggtga	2400
agatcctttt	tgataatctc	atgacaaaaa	tcctttaacg	tgagttttcg	ttccactgag	2460
cggtcagacc	ccgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccttttttt	ctgcgcgtaa	2520
tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcggg	ggtttgtttg	ccggatcaag	2580
agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	agcgcagata	ccaaatactg	2640
tccttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	2700
acctcgctct	gctaatcctg	ttaccagtgg	ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	2760
ccgggttgga	ctcaagacga	taggtaccgg	ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	2820
gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	2880
gcgagcattg	agaaagcgcc	acgcttcccg	aaggagagaa	ggcggacagg	tatccggtaa	2940
gcggcagggg	cggaacaaga	gagcgcacga	gggagcttcc	agggggaaac	gcctggtatc	3000
tttatagtcc	tgtcgggttt	cgccacctct	gacttgagcg	tcgatttttg	tgatgctcgt	3060
cagggggggc	gagcctatgg	aaaaacgcca	gcaacgcggc	cttttttacg	ttcctggcct	3120
ttggctggcc	ttttgctcac	atgttctttc	ctgcgttata	ccctgattct	gtggataacc	3180
gtattaccgc	ctttgagtga	gctgataccg	ctcgccgcag	ccgaacgacc	gacggcgag	3240
cgagtcagtg	agcgaggaag	cggaagagcg	cccaatacgc	aaaccgcctc	tccccgcg	3300
ttggccgatt	cattaatgca	gctgtggtgt	catggtcggg	gatcgccagg	gtgccgagc	3360
gcatctcgac	tgcatggtgc	accaatgctt	ctggcgtcag	gcagccatcg	gaagctgtgg	3420

[0030]

tatggccgtg caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt 3480
ctggataatg ttttttgctg cgacatcata acggttcttg caaatattct gaaatgagct 3540
ggtgacaatt aatcatcgaa ctagttaact agtacgcaag ttcacgtaaa aagggtatcg 3600
cggaatt 3607

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N-端接头

<400> 31

Cys Gly Asp Glu Gly Gly
1 5

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-端接头

<400> 32

Gly Gly Glu Asp Gly Cys
1 5

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 33

Gly Gly Lys Gly Gly
1 5

<210> 34
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N-端甘氨酸接头

[0031]

<220>
<221> REPEAT
<222> (1) .. (1)
<223> 甘氨酸可以重复0至5次

<220>
<221> REPEAT
<222> (3) .. (3)
<223> 甘氨酸可以重复0至12次

<400> 34

Gly Cys Gly
1

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N 端 甘氨酸丝氨酸接头

<220>
<221> REPEAT
<222> (1) .. (1)
<223> 甘氨酸可以重复0至5次

<220>
<221> REPEAT
<222> (3) .. (3)
<223> 甘氨酸可以重复0至10次

<220>
<221> REPEAT
<222> (4) .. (4)
<223> 丝氨酸可以重复0至2次

<220>
<221> REPEAT
<222> (5) .. (9)
<223> 这些残基作为一组可以重复0至3次

<400> 35

Gly Cys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 36
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-端甘氨酸接头

[0032]

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (1)..(1)
 <223> 甘氨酸可以重复0至12次

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (3)..(3)
 <223> 甘氨酸可以重复0至5次

<400> 36

Gly Cys Gly
 1

<210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> c 端甘氨酸丝氨酸接头

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (1)..(1)
 <223> 甘氨酸可以重复0至10次

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (2)..(2)
 <223> 丝氨酸可以重复0至2次

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (3)..(7)
 <223> 这些残基作为一组可以重复0至3次

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (8)..(8)
 <223> 甘氨酸可以重复0至8次

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (10)..(10)
 <223> 甘氨酸可以重复0至5次

<400> 37

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

<210> 38

[0033]

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 甘氨酸丝氨酸接头

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (1)..(5)
 <223> 这些残基作为一组可以重复任意次

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> N-端γ1

<400> 39

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

<210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> C-端γ1

<400> 40

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

<210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> N-端γ3

<400> 41

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

[0034]

Pro

<210> 42
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-端γ3

<400> 42

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

Cys Gly

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N-端甘氨酸接头

<400> 43

Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-端甘氨酸接头

<400> 44

Gly Gly Gly Gly Cys Gly
1 5

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C-端 甘氨酸-赖氨酸接头

[0035]

<400> 45

Gly Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> N-端 甘氨酸-赖氨酸接头

<400> 46

Cys Gly Lys Lys Gly Gly
1 5

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> C.端接头

<400> 47

Gly Gly Cys Gly
1

<210> 48

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 48

ggtaacatcg gtcgagatgg aaaacaaact ctggtcc

37

<210> 49

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸引物

<400> 49

ggaccagagt ttgttttcca tctcgaccga tgttacc

37

[0036]

<210>	50	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	50	
	agctcgcccg gggatcctct ag	22
<210>	51	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	51	
	cgatgcattt catccttagt tatcaatag ctgggttcag	40
<210>	52	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	52	
	ggcaaaatta gagactgtta ctttaggtaa gatcgg	36
<210>	53	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	53	
	ccgatcttac ctaaagtaac agtctctaatt tttgcc	36
<210>	54	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	54	
	ggccatggca cgactcgaga ctgttacttt agg	33

[0037]

<210>	55	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	55	
	gatttaggtg acactatag	19
<210>	56	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	56	
	gatggacgtc aaactctggt cctcaatccg cgtgggg	37
<210>	57	
<211>	37	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	57	
	ccccacgcg attgaggacc agagtttgac gtccatc	37
<210>	58	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	EcoRIHBCAg(s) 引物	
<400>	58	
	ccggaattca tggacattga cccttataaa g	31
<210>	59	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Lys-HBCAg(as) 引物	
<400>	59	
	cctagagcca cctttgccac catcttctaa attagtaccc acccaggtag c	51

[0038]

<210> 60
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Lys-HBcAg(s) 引物

<400> 60
 gaagatggtg gcaaagggtg ctctagggac ctagtagtca gttatgtc 48

<210> 61
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> HBcAg(1-149)Hind(as) 引物

<400> 61
 cgcggtcccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaag 38

<210> 62
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 48as 引物

<400> 62
 gtgcagtatg gtgaggtgag gaatgctcag gagactc 37

<210> 63
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 48s 引物

<400> 63
 gagtctcctg agcattcctc acctcaccat actgcac 37

<210> 64
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 107as 引物

<400> 64

[0039]

cttccaaaag tgagggaaga aatgtgaaac cac 33

<210> 65
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HBcAg149hind-as

<400> 65
cgcggtcccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaagcg ttgatag 47

<210> 66
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 107s 引物

<400> 66
gtgggtttcac atttcttccc tcacttttgg aag 33

<210> 67
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HBcAgwtHindIIII 引物

<400> 67
cgcggtcccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg 38

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 表位 CeH3

<400> 68

Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly
1 5 10

<210> 69
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0040]

<223> CeH3fwd 引物

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(51)

<400> 69

ggt aac ttg acc tgg tct cgt gct tct ggt gca tcc agg gat cta gta 48
Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Ala Ser Arg Asp Leu Val
1 5 10 15

gtc 51
Val

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CeH3fwd 引物

<400> 70

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

Val

<210> 71

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CeH3rev 引物

<400> 71

accagaagca cgagaccagg tcaagttaac atcttccaaa ttattaccca c 51

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CeH3rev 引物肽

<400> 72

Asp Glu Leu Asn Asn Gly Val
1 5

[0041]

<210> 73
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HBcAg-wt EcoRI fwd 引物

<400> 73
ccggaattca tggacattga cccttataaa g 31

<210> 74
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HBcAg-wt Hind III rev 引物

<400> 74
cgcggtcccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg 38

<210> 75
<211> 6
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 75

Asp Ala Glu Phe Arg His
1 5

<210> 76
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 76

Asp Ala Glu Phe Gly His
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Aβ 1-6 GGC

<400> 77

Asp Ala Glu Phe Arg His Gly Gly Cys

[0042]

1

5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 A β 1-6 GGC

<400> 78

Asp Ala Glu Phe Gly His Gly Gly Cys
1 5

<210> 79
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 p1.44

<400> 79
aaccatggca aataagccaa tgcaaccg

28

<210> 80
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 p1.45

<400> 80
aatctagaat tttctgcgca cccatcccgg

30

<210> 81
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 p1.46

<400> 81
aaaagcttaa gcagtagtat cagacgatac

30

<210> 82
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0043]

<223> 引物 p1.47

<400> 82

gagtgatcca actcgtttat caactacatt ttcagcaagt ctg

43

<210> 83

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 p1.48

<400> 83

cagacttgct gaaaatgtag ttgataaacg agttggatca ctc

43

<210> 84

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 84

Asp Ala Glu Phe Arg His

1 5

<210> 85

<211> 6

<212> PRT

<213> 兔 (*Oryctolagus cuniculus*)

<400> 85

Asp Ala Glu Phe Arg His

1 5

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> 光滑爪蟾 (*Xenopus laevis*)

<400> 86

Asp Ser Glu Tyr Arg His

1 5

<210> 87

<211> 6

<212> PRT

<213> 大鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400> 87

Asp Ala Glu Phe Gly His

[0044]

```

1                5

<210> 88
<211> 6
<212> PRT
<213> 豚鼠 (Cavia porcellus)

<400> 88

Asp Ala Glu Phe Arg His
1                5

<210> 89
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 89

Val His Glu Pro His Glu Phe Arg His Val Ala Leu Asn Pro Val
1                5                10                15

<210> 90
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 90

Tyr Tyr Glu Phe Arg His
1                5

<210> 91
<211> 42
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 91

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1                5                10                15

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

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
                35                40

<210> 92
<211> 770
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

```

[0045]

<400> 92

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
180 185 190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
210 215 220

[0046]

Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	
225					230					235					240	
Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu	
				245					250					255		
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	Ile	
			260					265					270			
Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Val	Arg	
		275					280					285				
Glu	Val	Cys	Ser	Glu	Gln	Ala	Glu	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala	Met	Ile	
	290					295					300					
Ser	Arg	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Thr	Glu	Gly	Lys	Cys	Ala	Pro	Phe	Phe	
305					310					315					320	
Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Arg	Asn	Asn	Phe	Asp	Thr	Glu	Glu	Tyr	
				325					330					335		
Cys	Met	Ala	Val	Cys	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	
			340					345					350			
Thr	Gln	Glu	Pro	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Val	Lys	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	
		355					360					365				
Ala	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Asp	
		370				375					380					
Glu	Asn	Glu	His	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	
385					390					395					400	
Lys	His	Arg	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Val	Met	Arg	Glu	Trp	Glu	Glu	Ala	
				405					410					415		
Glu	Arg	Gln	Ala	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Lys	Lys	Ala	Val	Ile	
			420					425					430			
Gln	His	Phe	Gln	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala	Asn	
		435					440					445				
Glu	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	His	Met	Ala	Arg	Val	Glu	Ala	Met	
		450				455					460					

[0047]

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

[0048]

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705 710 715 720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
725 730 735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
740 745 750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
755 760 765

Gln Asn
770

<210> 93
<211> 82
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 93

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

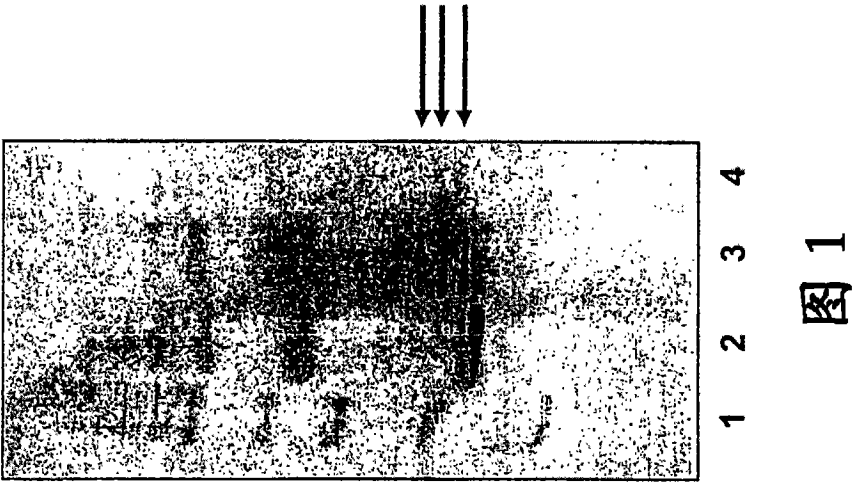
Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
20 25 30

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile
35 40 45

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

Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Asn His His Gly Val
65 70 75 80

Val Glu



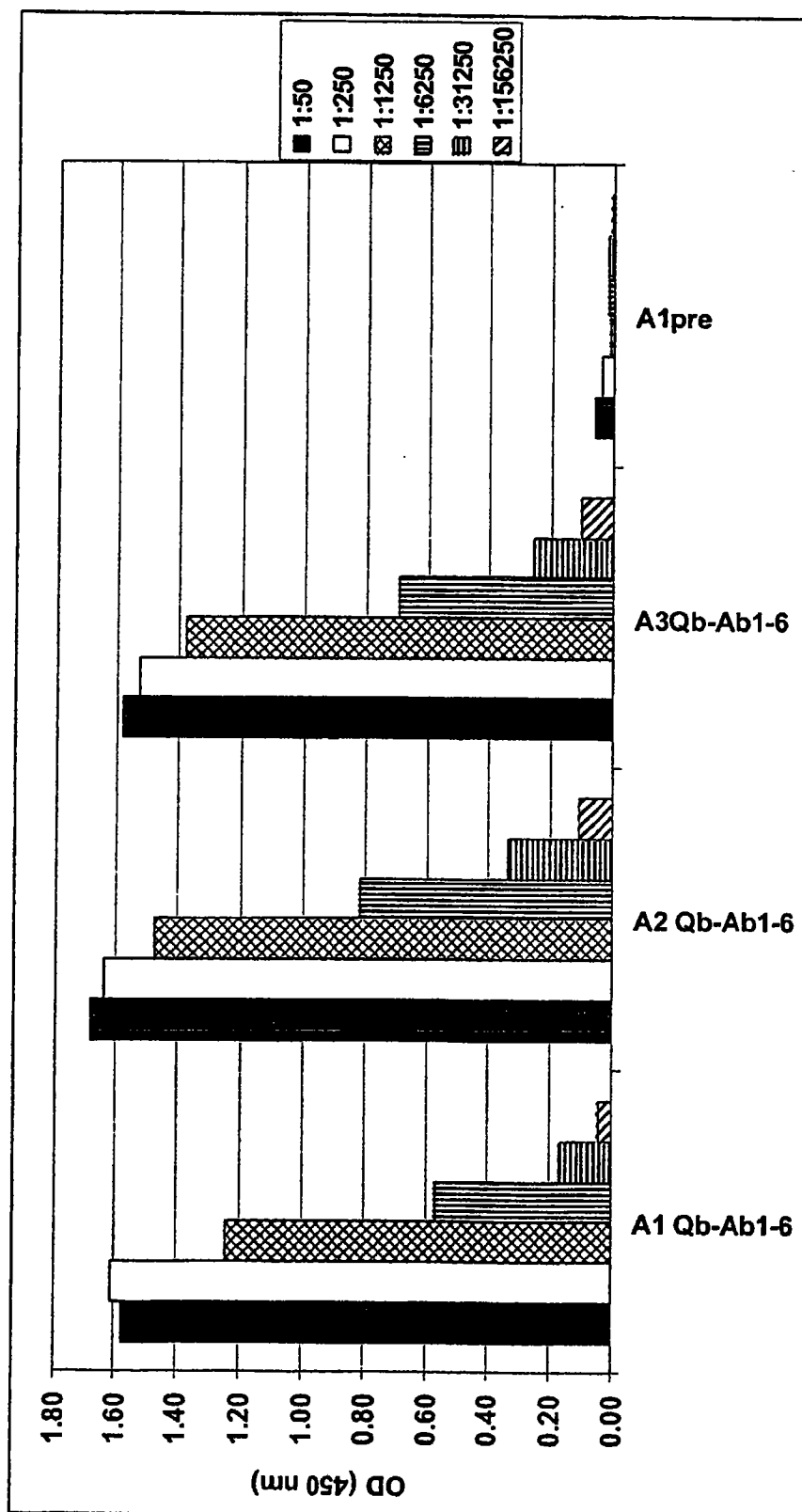


图 2

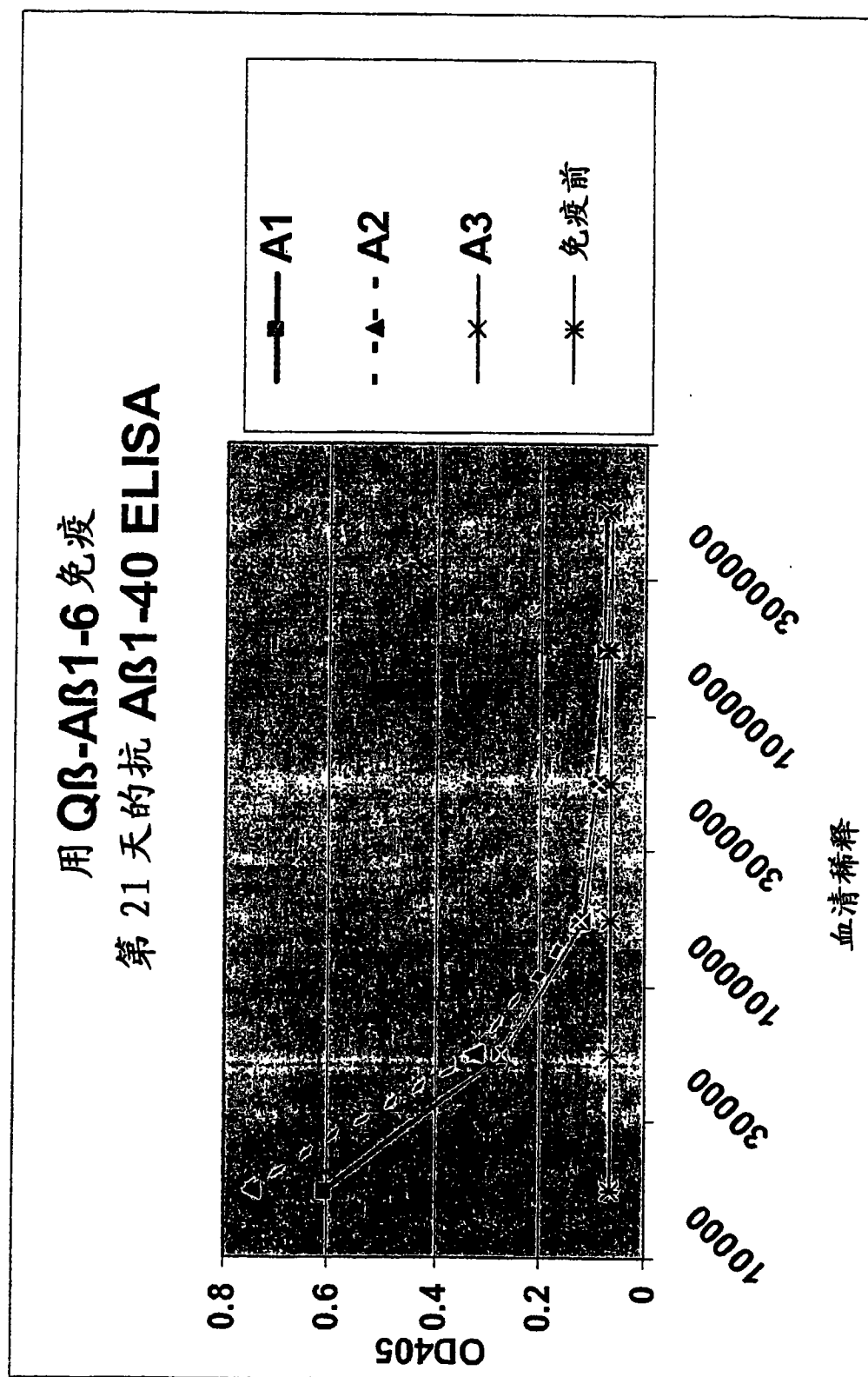


图 3

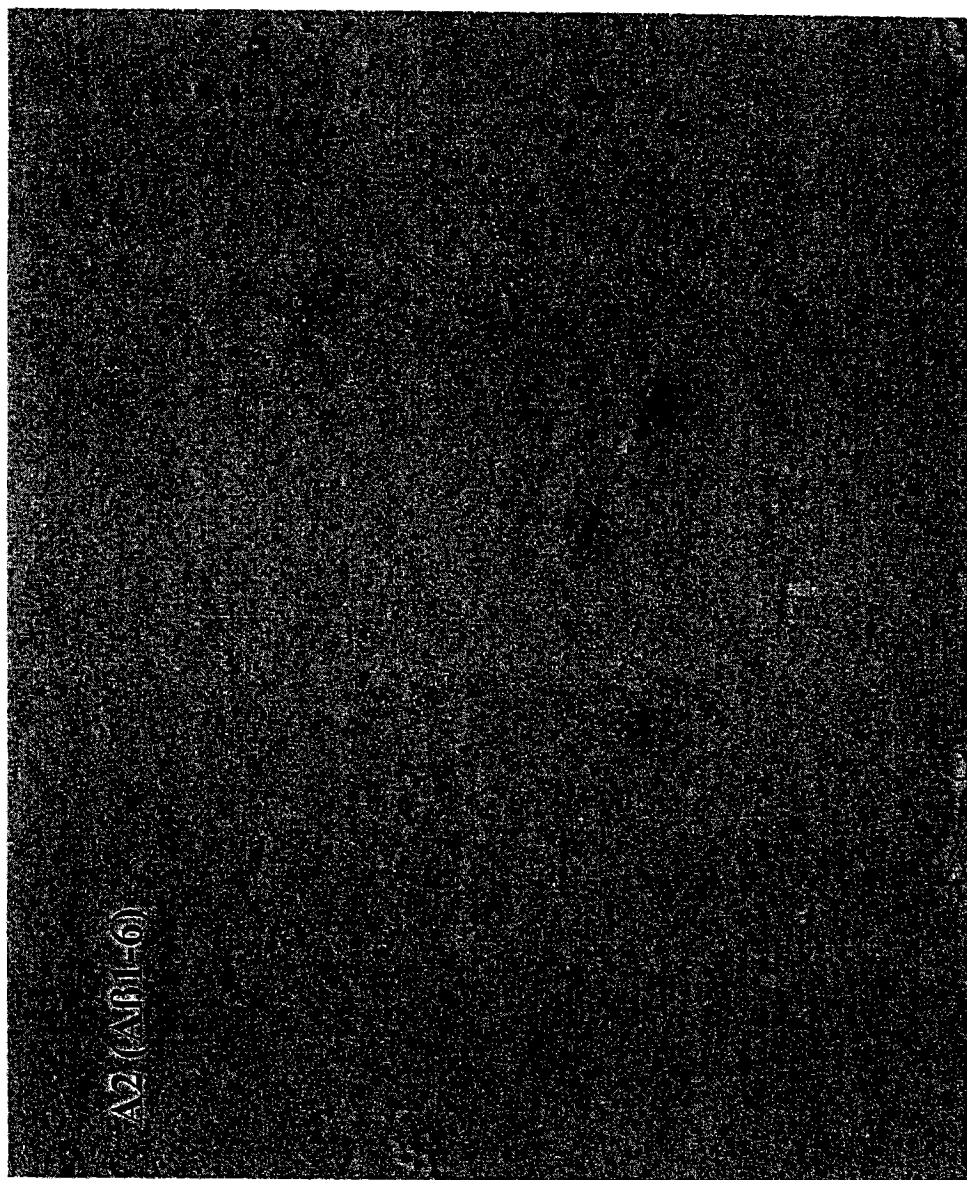


图 4A

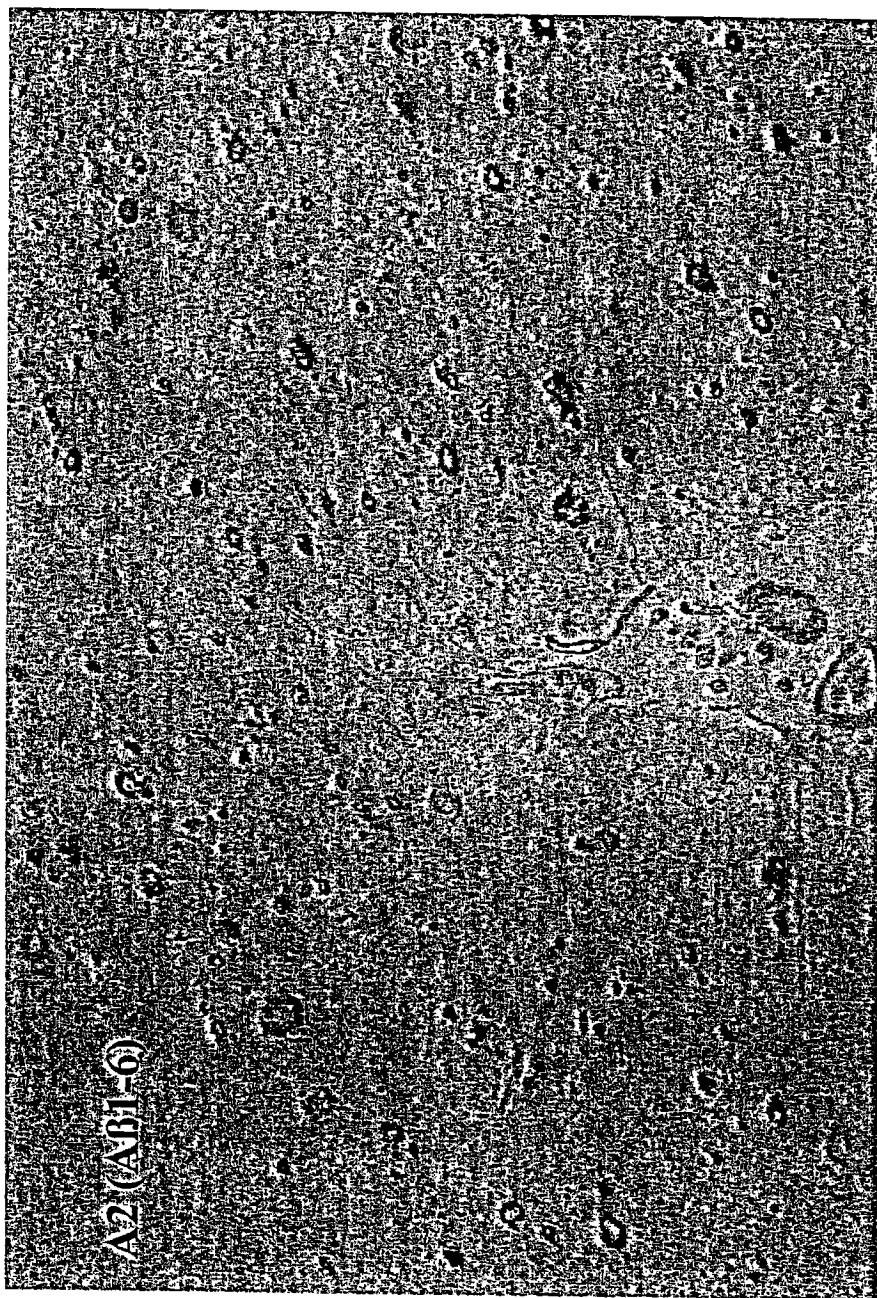


图 4B

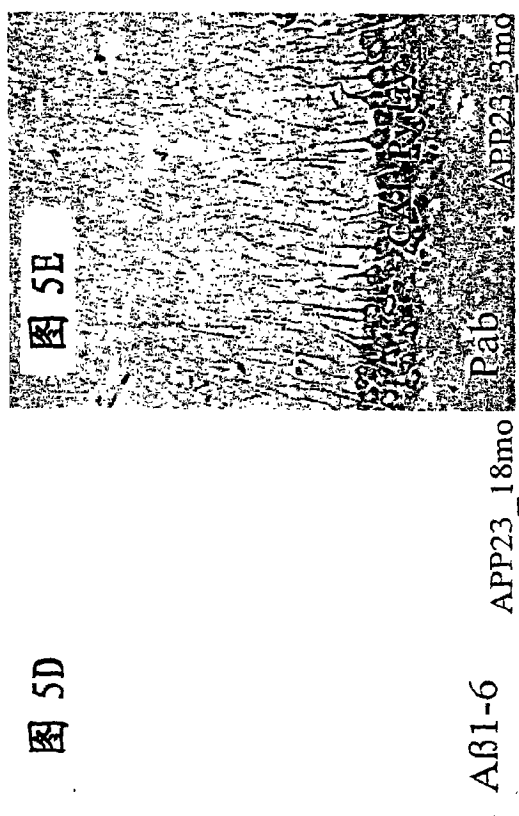
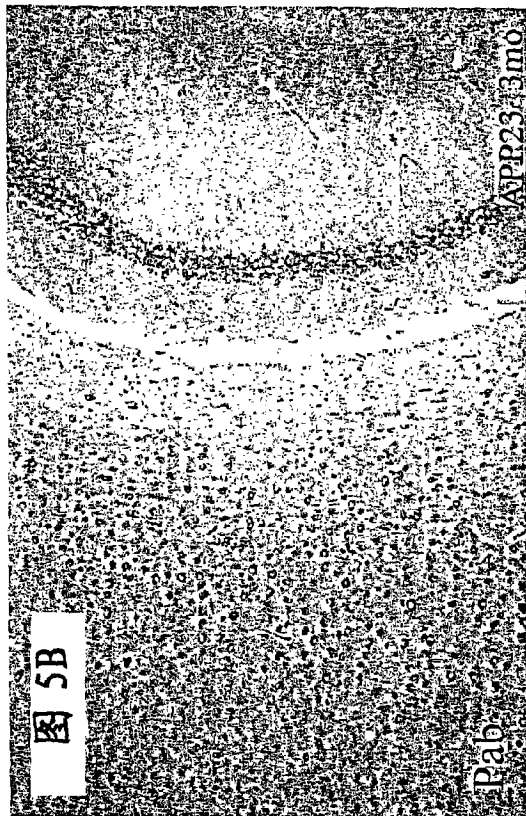
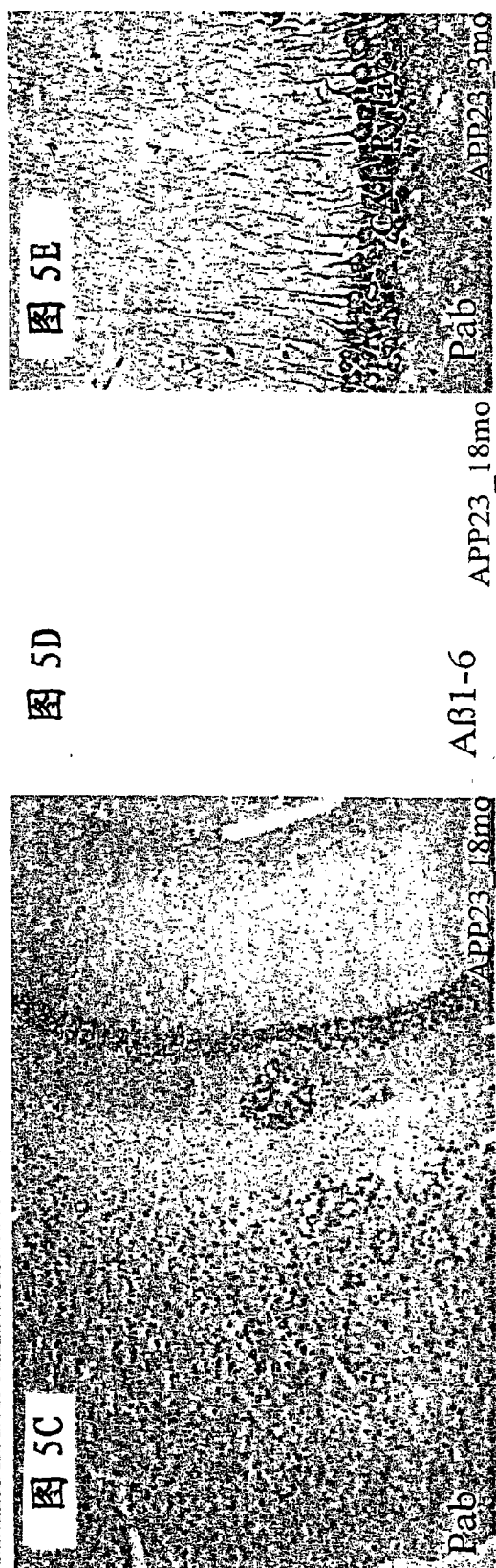
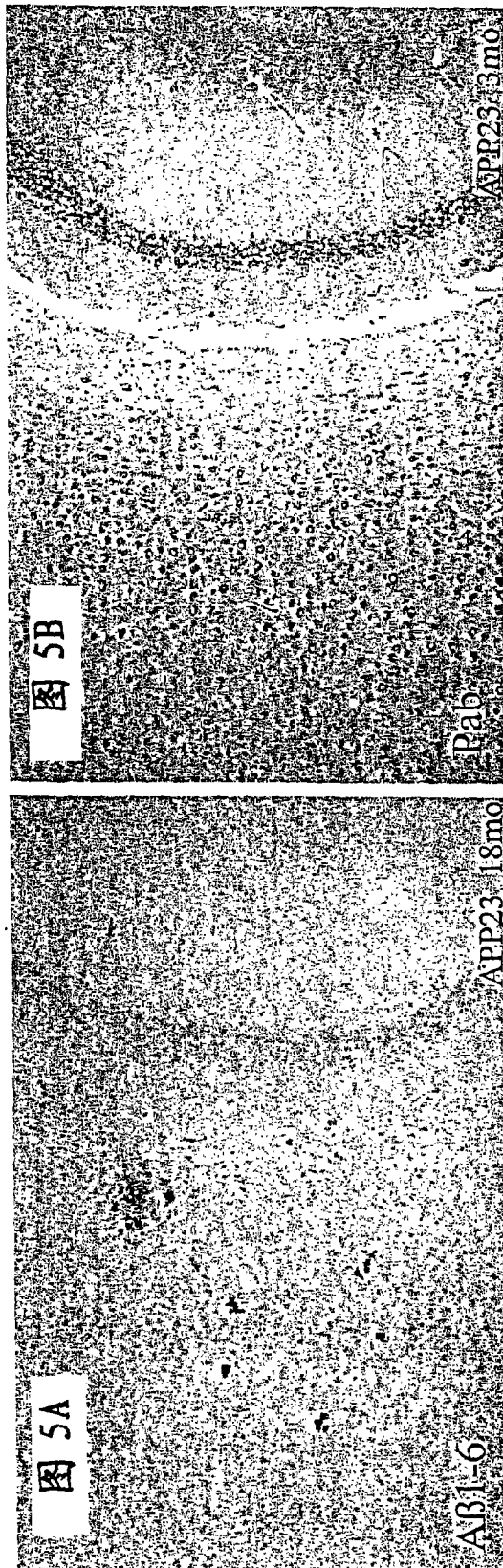


图 5



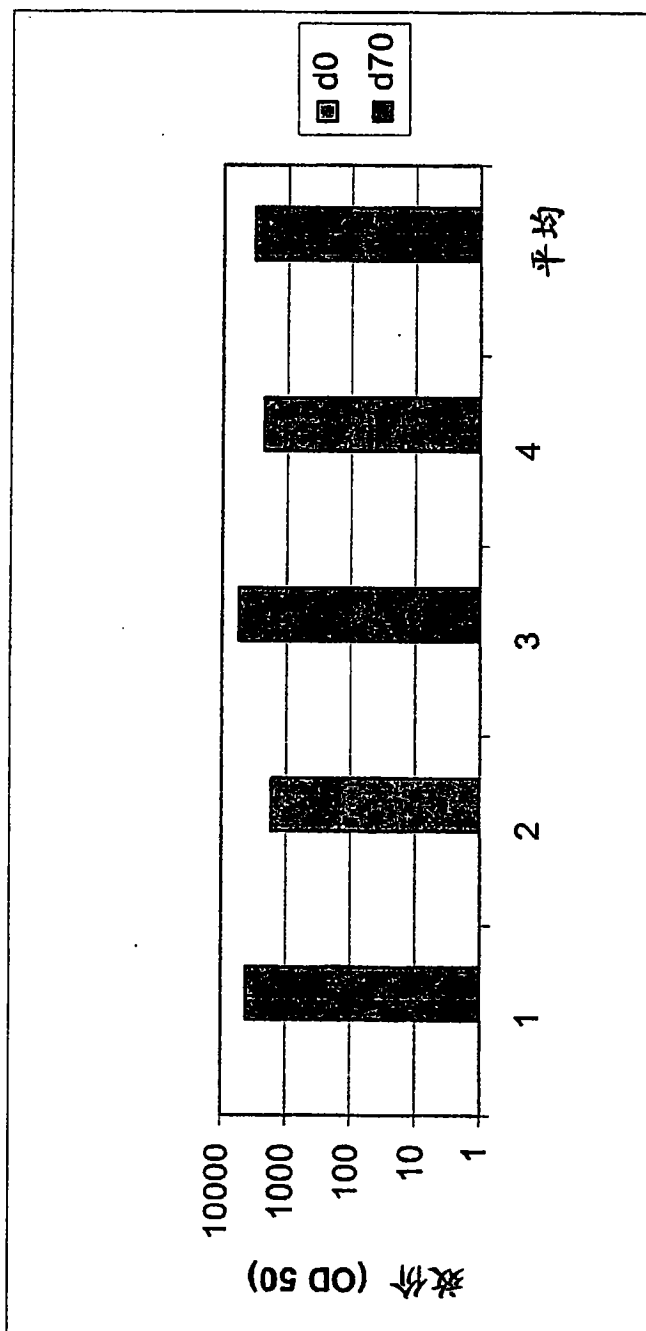


图 6

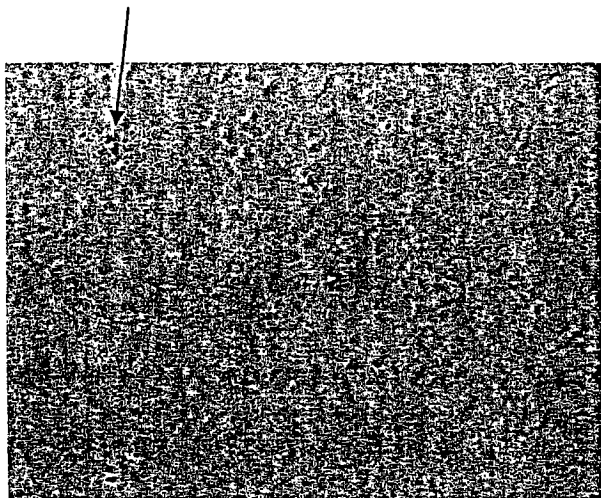


图 7B

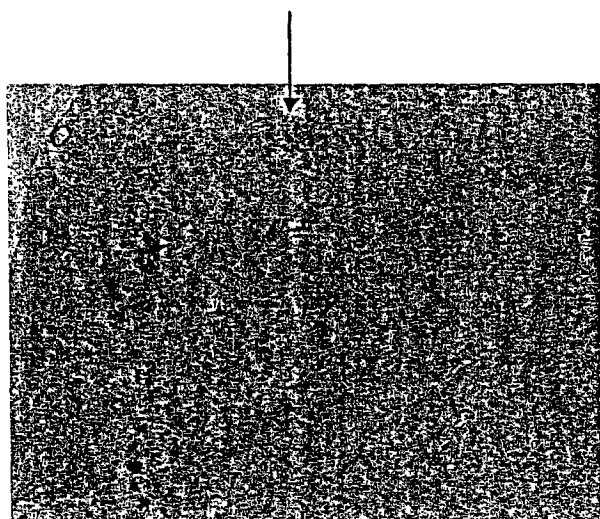


图 7A

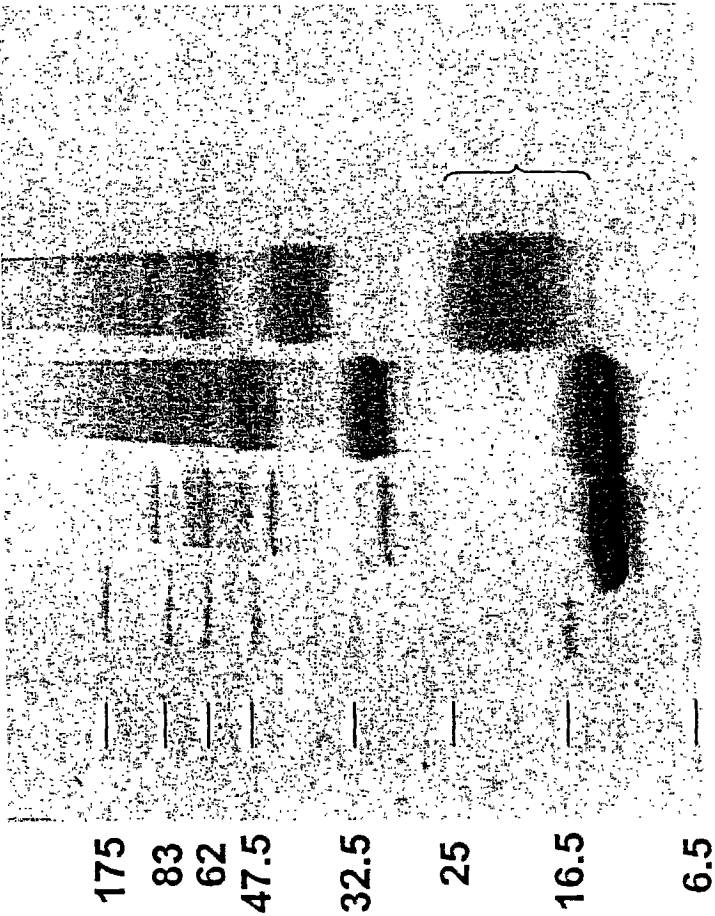


图 8

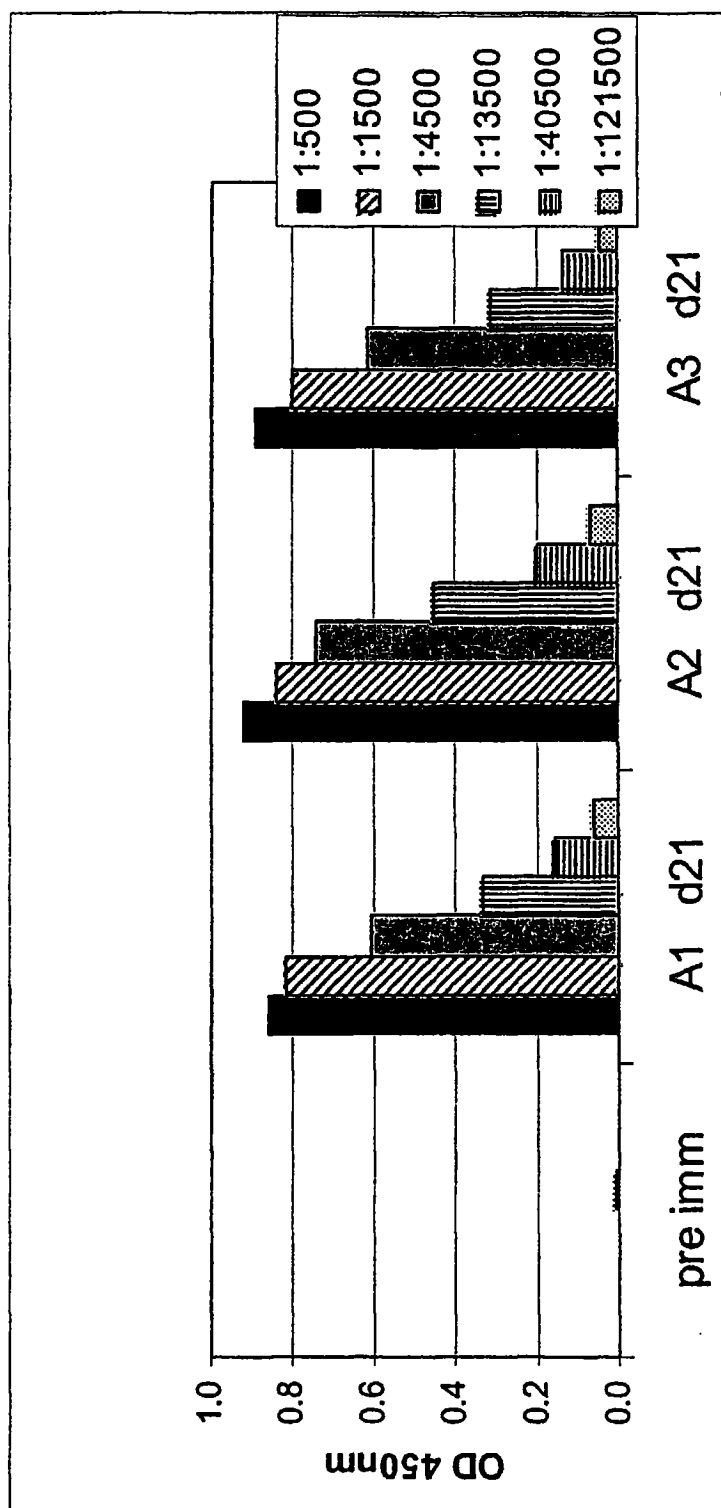


图 9



图 10

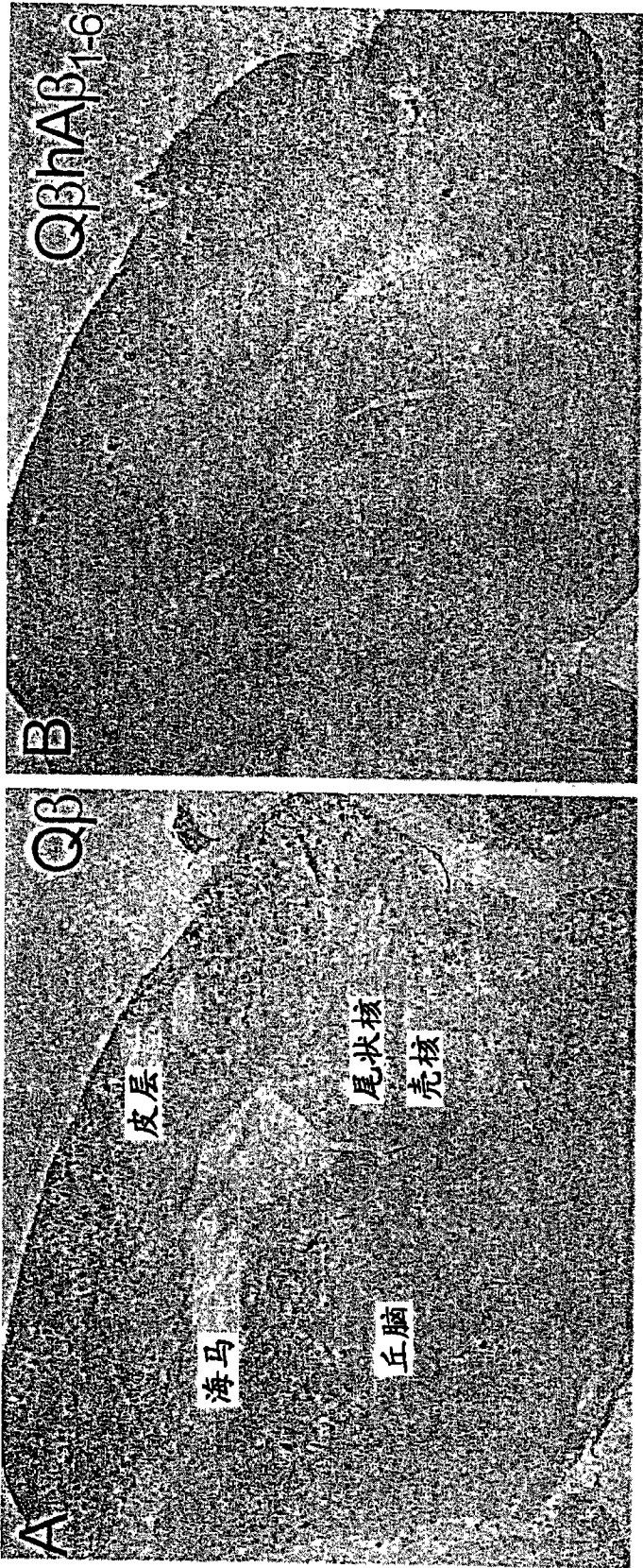


图 11B

图 11A

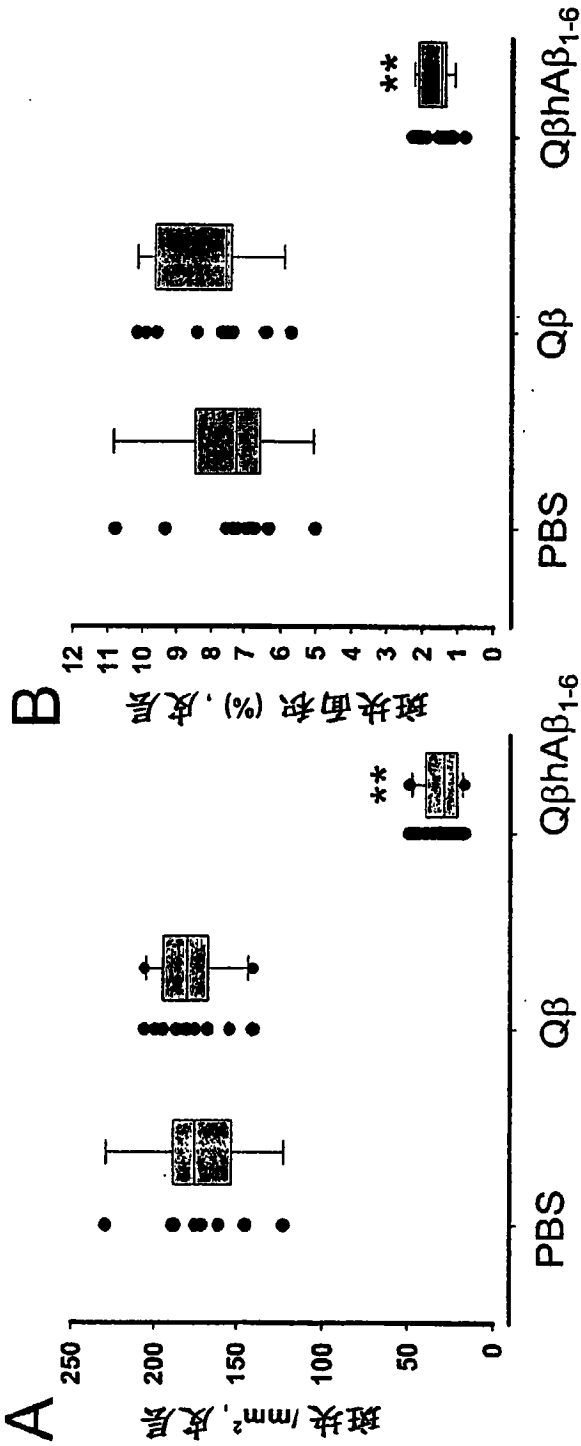


图 12A

图 12B

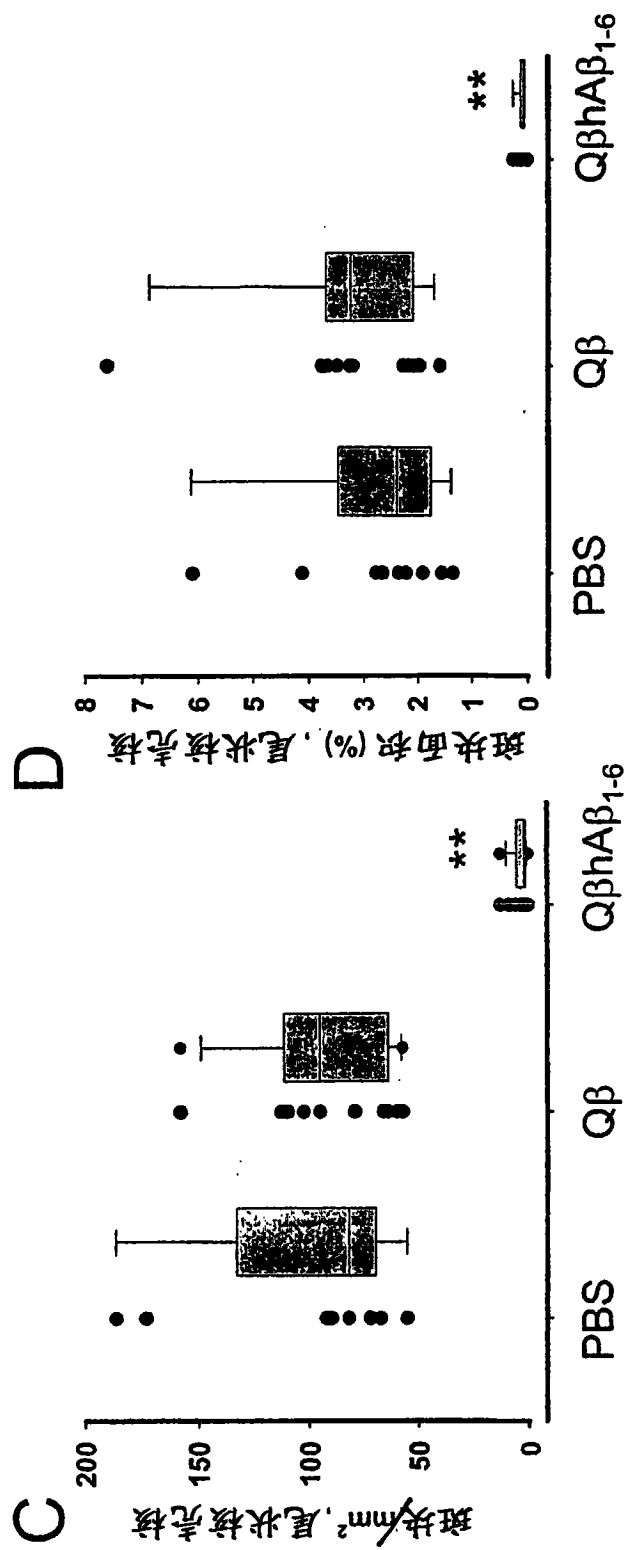


图 12D

图 12C

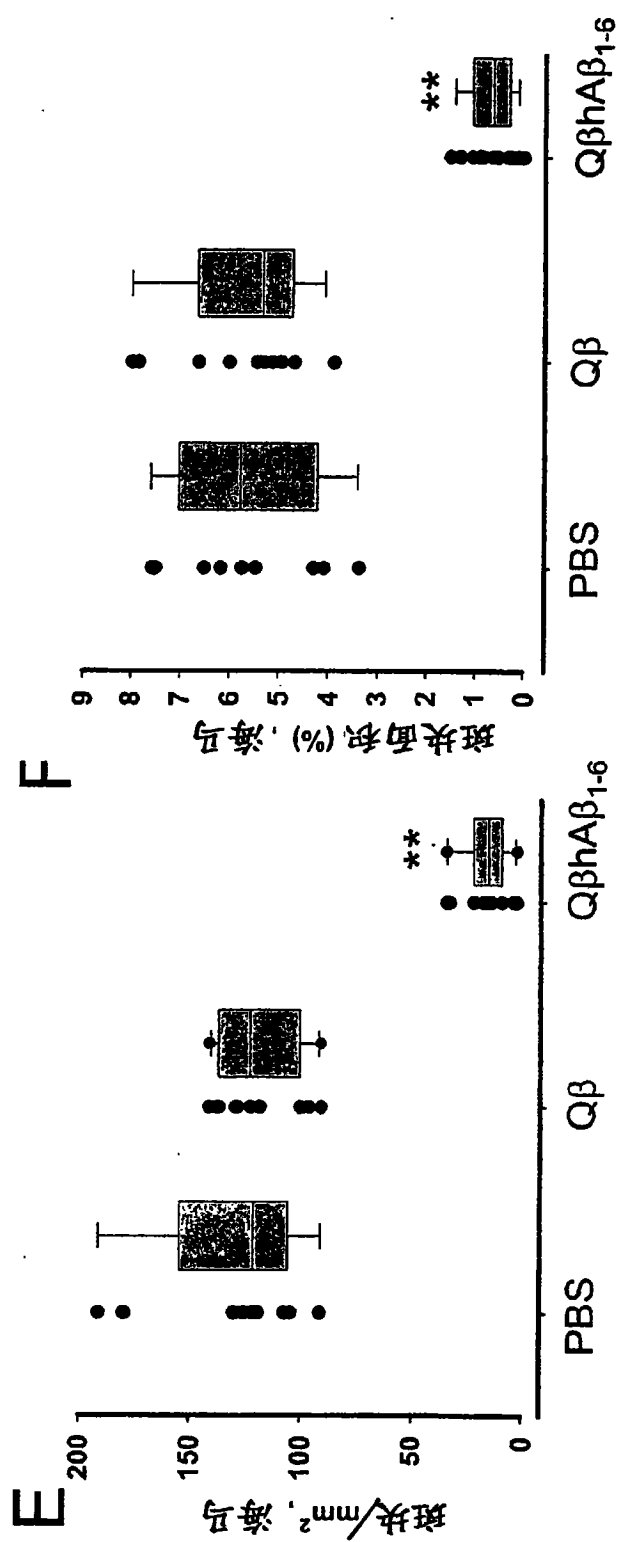


图 12F

图 12E

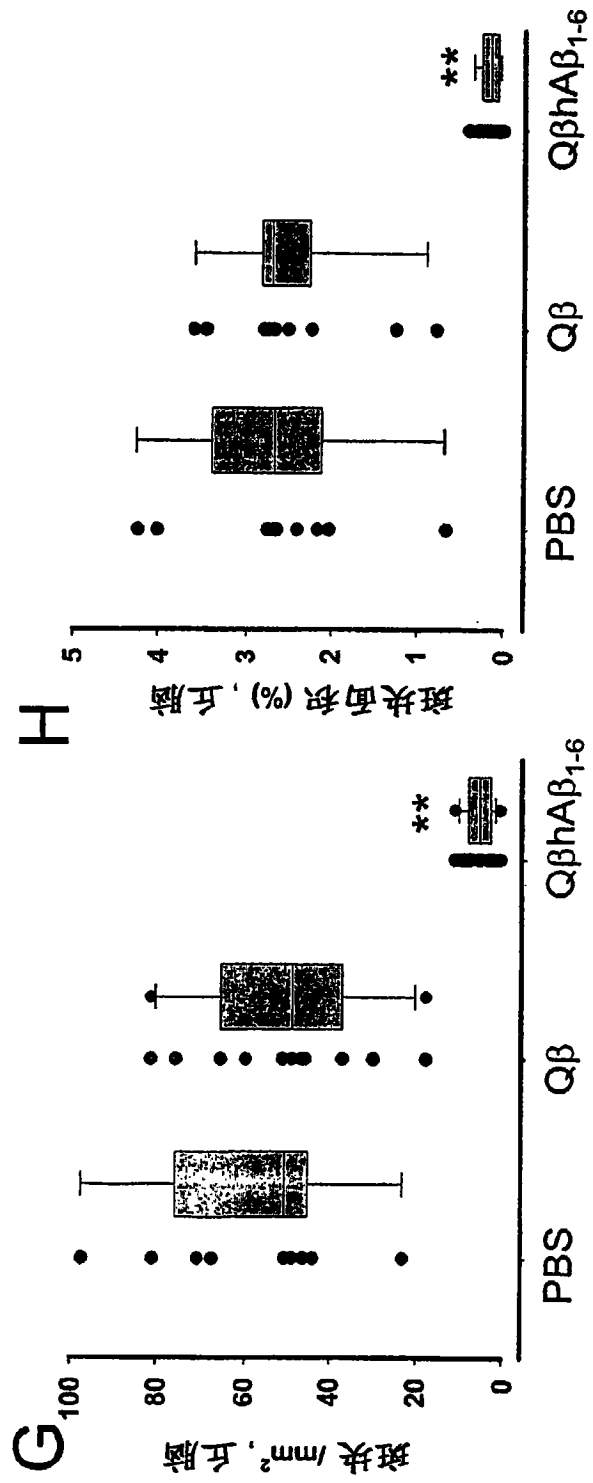


图 12G

图 12H

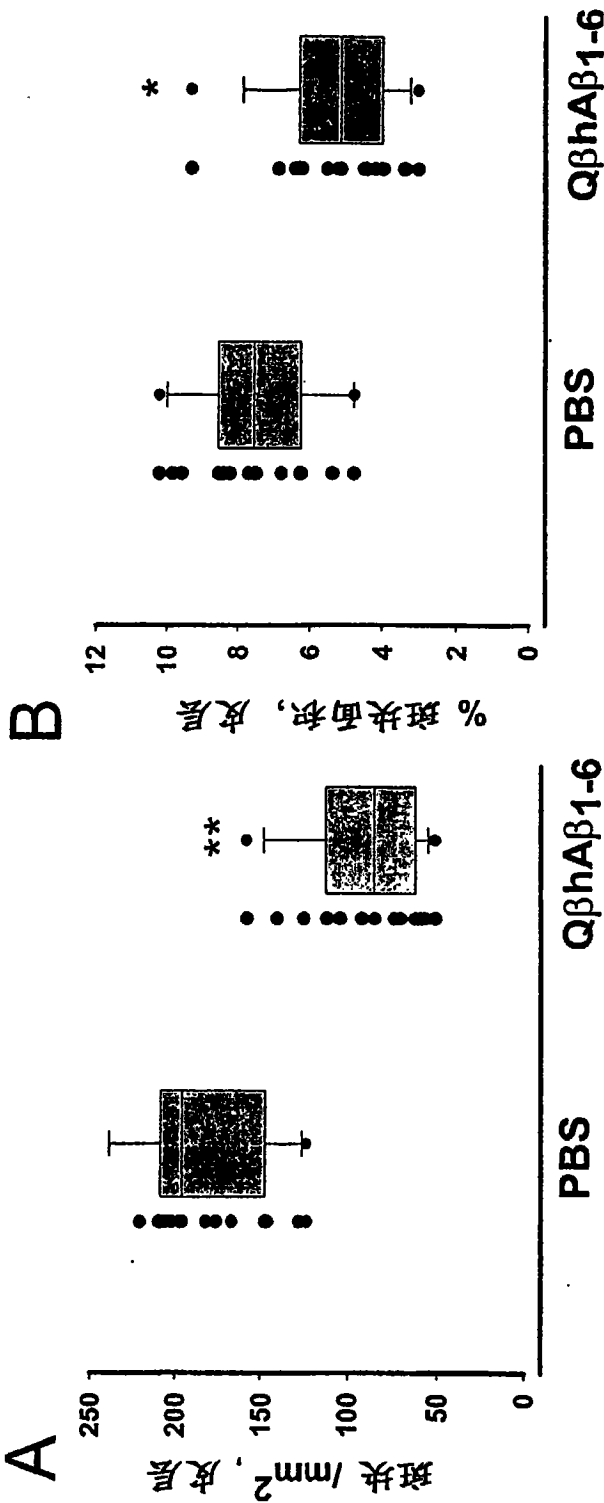


图 13B

图 13A

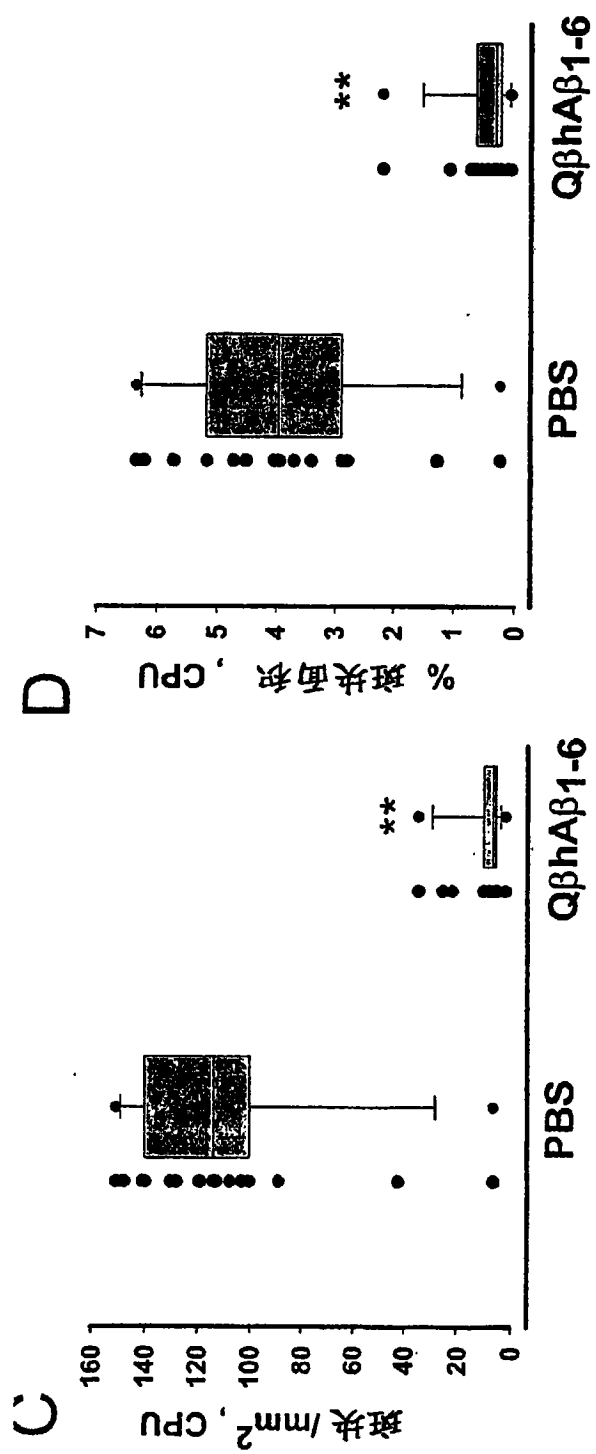


图 13D

图 13C

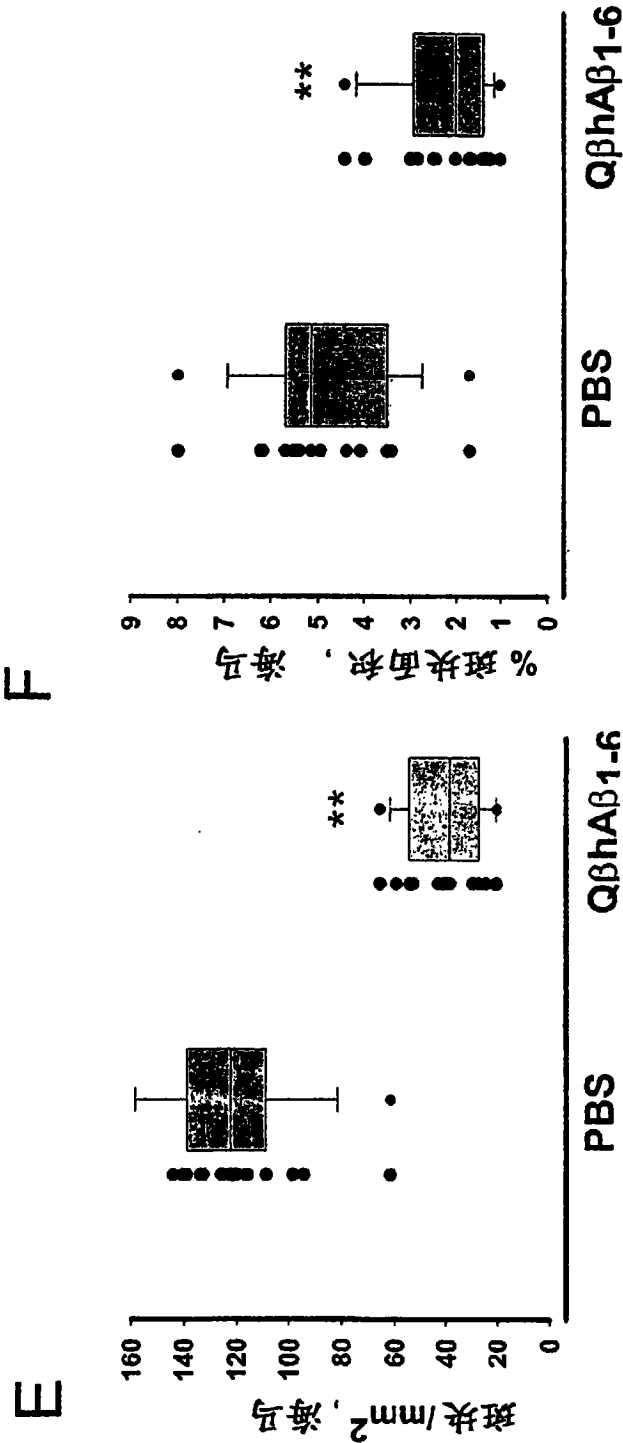


图 13E

图 13F

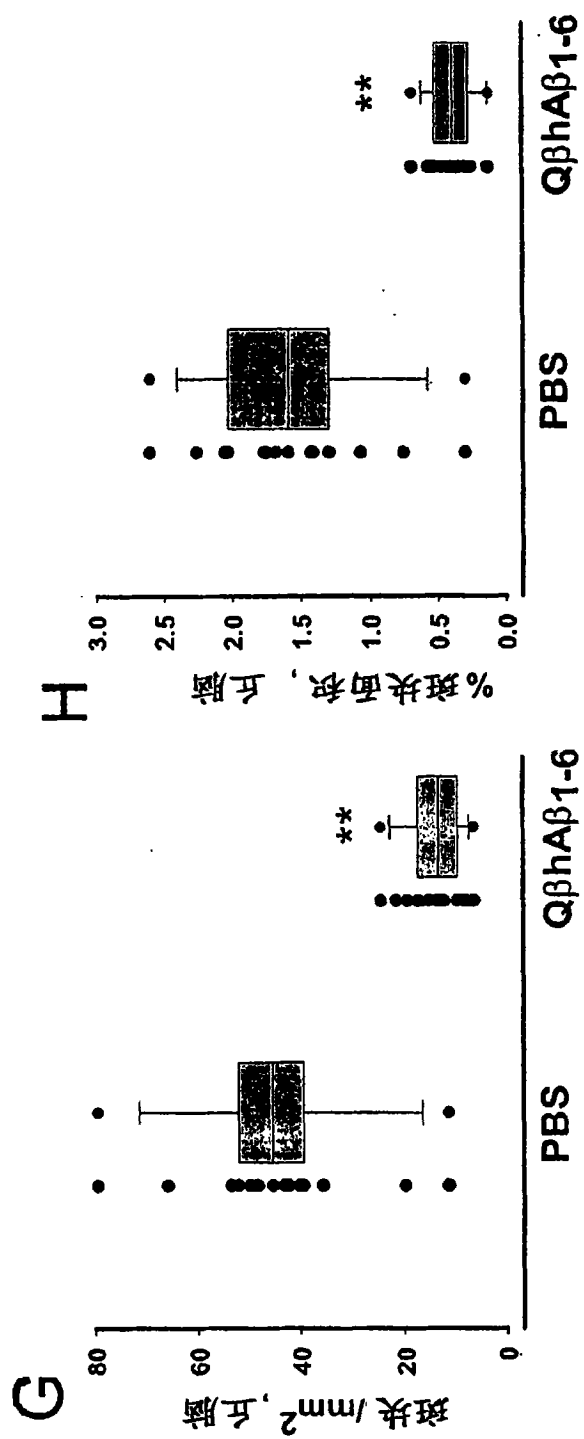


图 13G

图 13H

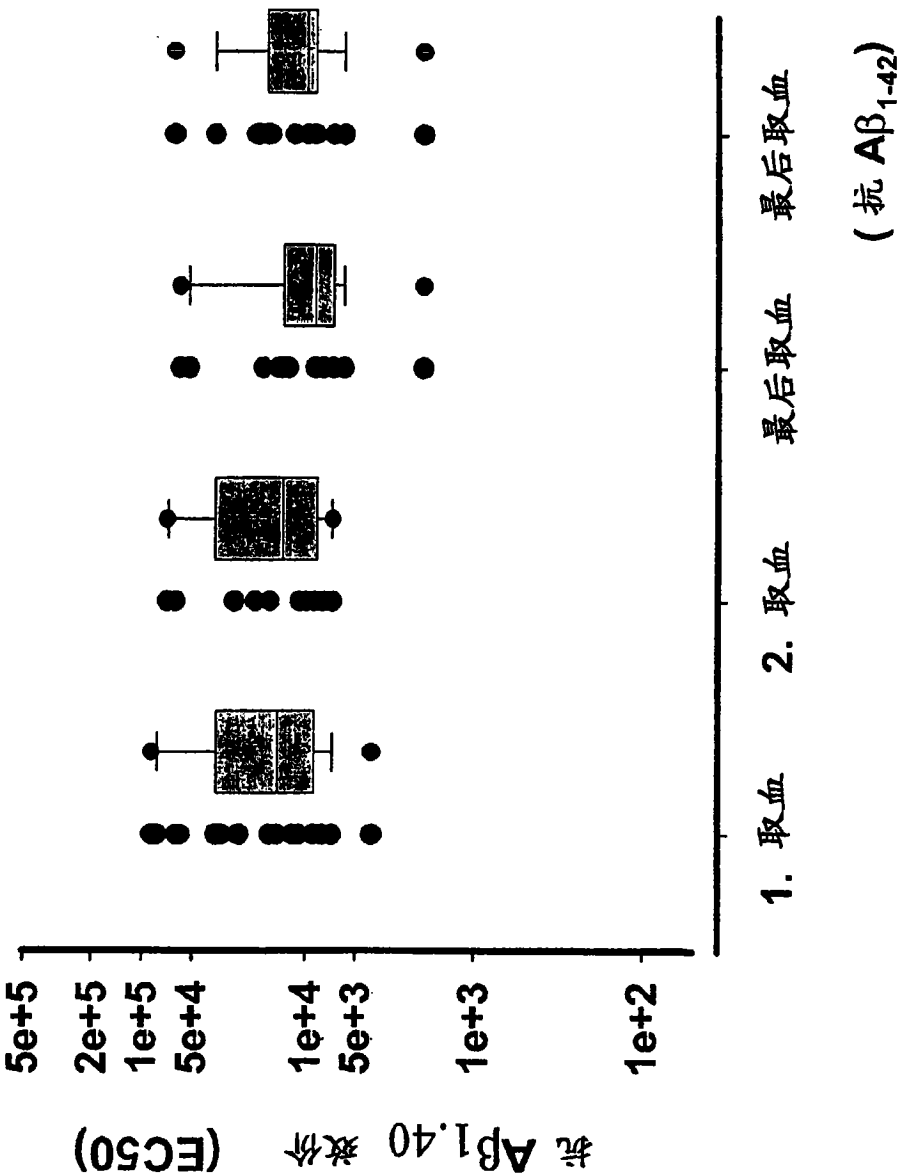


图 14

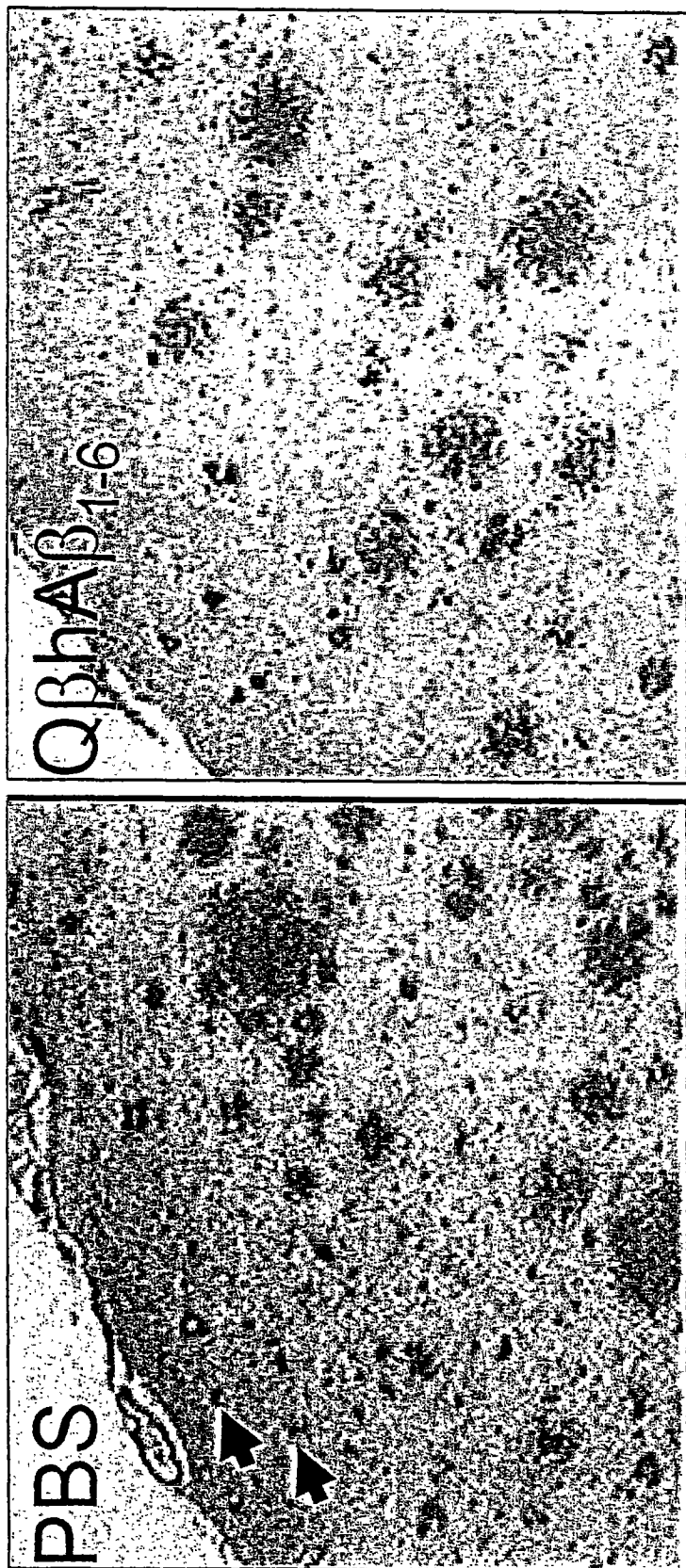


图 15B

图 15A

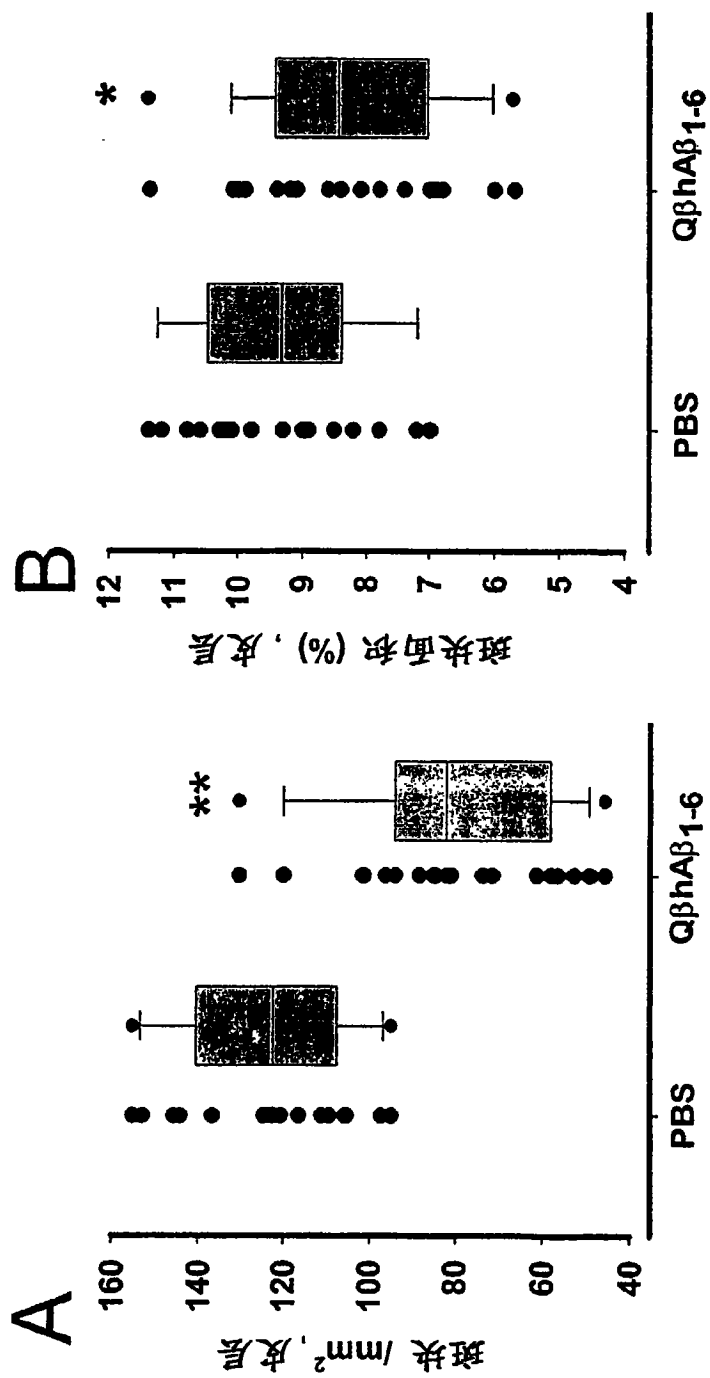


图 16B

图 16A