

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880010037.5

[51] Int. Cl.

C12N 15/62 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/112 (2006.01)
A61K 39/385 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 2 月 10 日

[11] 公开号 CN 101646772A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 14/08 (2006.01)
C07K 14/24 (2006.01)
C07K 14/255 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/40 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

[22] 申请日 2008.1.28

[21] 申请号 200880010037.5

[30] 优先权

[32] 2007.1.26 [33] US [31] 60/886,873

[86] 国际申请 PCT/CA2008/000154 2008.1.28

[87] 国际公布 WO2008/089569 英 2008.7.31

[85] 进入国家阶段日期 2009.9.25

[71] 申请人 弗利亚生物技术公司

地址 加拿大魁北克省

共同申请人 康斯坦丁诺·三世·罗伯托·洛佩斯-马西亚斯

[72] 发明人 丹尼斯·勒克莱尔

康斯坦丁诺·三世·罗伯托·洛佩斯-马西亚斯

[74] 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司

代理人 丁业平 戚秋鹏

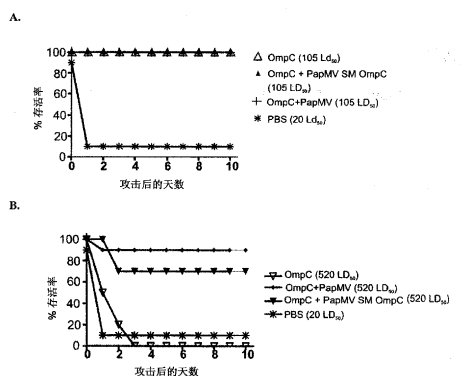
权利要求书 6 页 说明书 92 页 序列表 20 页
附图 33 页

[54] 发明名称

抗伤寒沙门氏菌和其它肠细菌病原体的基于番木瓜花叶病毒的疫苗

[57] 摘要

本发明提供一种抗原提呈系统 (APS)，该抗原提呈系统包含与番木瓜花叶病毒 (PapMV) 或源自番木瓜花叶病毒的病毒样颗粒 (VLP) 组合的一种或多种肠细菌抗原。APS 中包含的 PapMV 或 VLP 能够增强针对所述一种或多种肠细菌抗原的免疫应答。所述 APS 可以用作 (例如) 针对肠细菌疾病 (例如伤寒) 的疫苗。APS 中包含的一种或多种抗原能够与 PapMV 或 PapMV VLP 的外壳蛋白接合，或者它们可以是非接合的 (即，所述抗原与 PapMV 或 PapMV VLP 分离)，或者所述 APS 既包含接合的抗原也包含非接合的抗原。所述接合可以 (例如) 通过与外壳蛋白的基因融合来实现，或者通过共价、非共价或亲和方式结合来实现。



1. 一种抗原提呈系统，其包含与番木瓜花叶病毒（PapMV）或源自 PapMV 外壳蛋白的 VLP 组合的一种或多种肠细菌抗原，其中所述 PapMV 或 VLP 能够增强针对所述一种或多种肠细菌抗原的免疫应答。

2. 根据权利要求 1 所述的抗原提呈系统，其中所述 VLP 源自修饰的 PapMV 外壳蛋白，所述修饰的 PapMV 外壳蛋白能够多聚化以形成所述 VLP。

3. 根据权利要求 2 所述的抗原提呈系统，其中所述抗原提呈系统包含这样的 VLP，所述 VLP 包含与 SEQ ID NO:3 所列出的序列基本上相同的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1、2 或 3 中任一项所述的抗原提呈系统，其中所述一种或多种抗原与所述 PapMV 或 VLP 的外壳蛋白是接合的。

5. 根据权利要求 1、2 或 3 中任一项所述的抗原提呈系统，其中所述一种或多种抗原与所述 PapMV 或 VLP 是非接合的。

6. 根据权利要求 4 所述的抗原提呈系统，其中所述一种或多种抗原与所述外壳蛋白基因融合。

7. 根据权利要求 4 所述的抗原提呈系统，其中所述一种或多种抗原是通过亲和结合与所述外壳蛋白连接的。

8. 根据权利要求 7 所述的抗原提呈系统，其中所述亲和结合是通过与所述外壳蛋白基因融合的亲和肽实现的，所述亲和肽能够结合所述一种或多种抗原。

9. 根据权利要求 1、2、3、4、5、6、7 或 8 中任一项所述的抗原提呈系统，其中所述一种或多种抗原是孔蛋白或其抗原片段。

10. 根据权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 中任一项所述的抗原提呈系统，其中所述一种或多种抗原选自由 OmpC、OmpC 的片段、OmpF 和 OmpF 的片段所组成的组。

11. 根据权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 中任一项所述的抗原提呈系统，其中所述一种或多种抗原是伤寒沙门氏菌抗原。

12. 根据权利要求 1 所述的抗原提呈系统，其中所述抗原提呈系统包含这样的 VLP，所述 VLP 包含与 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:48 所列出的序列基本上相同的氨基酸序列。

13. 一种疫苗组合物，其包含：

权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 中任一项所述的抗原提呈系统；以及
可药用的载体。

14. 一种多肽，其包含与一种或多种亲和肽融合的番木瓜花叶病毒外壳蛋白，所述一种或多种亲和肽能够结合肠细菌抗原。

15. 根据权利要求 14 所述的多肽，其中所述抗原是伤寒沙门氏菌抗原。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的多肽，其中所述一种或多种亲和肽包含这样的序列，所述序列选自 SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:25 所列出的序

列。

17. 根据权利要求 14 或 15 所述的多肽，其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:48 所列出的序列基本上相同的氨基酸序列。

18. 一种多肽，其包含与一种或多种肠细菌抗原融合的番木瓜花叶病毒外壳蛋白。

19. 根据权利要求 18 所述的多肽，其中所述一种或多种抗原是伤寒沙门氏菌抗原。

20. 根据权利要求 18 或 19 所述的多肽，其中所述一种或多种抗原在所述 PapMV 外壳蛋白的 C-端处或内环中融合。

21. 一种多核苷酸，所述多核苷酸编码权利要求 13、14、15、16、17、18、19 或 20 中任一项所述的多肽。

22. 根据权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 中任一项所述的抗原提呈系统在需要其的动物中用于诱导针对肠细菌的免疫应答中的用途。

23. 根据权利要求 13 所述的疫苗在需要其的动物中用于诱导针对肠细菌的免疫应答中的用途。

24. 根据权利要求 22 或 23 所述的用途，其中所述肠细菌是伤寒沙门氏菌。

25. 根据权利要求 22、23 或 24 中任一项所述的用途，其中所述动物是人类。

26. 根据权利要求 22、23 或 24 中任一项所述的用途，其中所述动物是非人类动物。

27. 根据权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 中任一项所述的抗原提呈系统在制备疫苗中的用途。

28. 根据权利要求 27 所述的用途，其中所述疫苗在需要其的动物中用于诱导针对肠细菌的免疫应答。

29. 根据权利要求 27 或 28 所述的用途，其中所述肠细菌是伤寒沙门氏菌。

30. 根据权利要求 27、28 或 29 中任一项所述的用途，其中所述动物是人类。

31. 根据权利要求 27、28 或 29 中任一项所述的用途，其中所述动物是非人类动物。

32. 一种用于免疫动物以抗伤寒沙门氏菌感染的疫苗，所述疫苗包含抗原提呈系统，所述抗原提呈系统包含与番木瓜花叶病毒（PapMV）或源自 PapMV 外壳蛋白的 VLP 组合的抗原，所述抗原源自伤寒沙门氏菌 OmpC 或 OmpF，其中所述 PapMV 或 VLP 能够在所述动物中增强针对所述抗原的免疫应答。

33. 根据权利要求 32 所述的疫苗，其中所述抗原提呈系统包含这样的 VLP，所述 VLP 包含与 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:48 所列出的序列基本上相同的氨基酸序列。

34. 一种在动物中诱导针对肠细菌的免疫应答的方法，所述方

法包括给所述动物施用有效量的根据权利要求 1 所述的抗原提呈系统。

35. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述 VLP 源自修饰的 PapMV 外壳蛋白，所述修饰的 PapMV 外壳蛋白能够多聚化以形成所述 VLP。

36. 根据权利要求 35 所述的方法，其中所述抗原提呈系统包含这样的 VLP，所述 VLP 包含与 SEQ ID NO:3 所列出的序列基本上相同的氨基酸序列。

37. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述一种或多种抗原与所述 PapMV 或 VLP 的外壳蛋白是接合的。

38. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述一种或多种抗原与所述 PapMV 或 VLP 是非接合的。

39. 根据权利要求 37 所述的方法，其中所述一种或多种抗原与所述外壳蛋白是基因融合的。

40. 根据权利要求 37 所述的方法，其中所述一种或多种抗原通过亲和结合与所述外壳蛋白连接。

41. 根据权利要求 40 所述的方法，其中所述亲和结合是通过与所述外壳蛋白基因融合的亲和肽实现的，所述亲和肽能够结合所述一种或多种抗原。

42. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述一种或多种抗原是孔蛋白或其抗原片段。

43. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中所述一种或多种抗原选自 OmpC、OmpC 的片段、OmpF 和 OmpF 的片段所组成的组。

44. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中所述一种或多种抗原是伤寒沙门氏菌抗原。

45. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中所述抗原提呈系统包含这样的 VLP, 所述 VLP 包含与 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 或 SEQ ID NO:48 所列出的序列基本上相同的氨基酸序列。

46. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中所述肠细菌是伤寒沙门氏菌。

47. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中所述动物是人类。

48. 根据权利要求 34 所述的方法, 其中所述动物是非人类动物。

抗伤寒沙门氏菌和其它肠细菌病原体的 基于番木瓜花叶病毒的疫苗

技术领域

本发明涉及疫苗制剂和佐剂的领域，具体而言，本发明涉及基于植物病毒颗粒的疫苗。

背景技术

肠杆菌科细菌包括一大类革兰氏阴性菌，并且包括众多对人类医学和兽医学具有重要临床意义的病原体。肠细菌病原体是肠道感染和全身性感染的致病因子，并且其包括肠道沙门氏菌（*Salmonella enterica*）（伤寒和食源性胃肠炎）、致病性大肠杆菌（pathogenic *Escherichia coli*）（各种食源性肠道感染、尿路感染、脑膜炎、和败血症）、志贺菌属种（*Shigella spp.*）（细菌性痢疾）、耶尔森菌属种（*Yersinia spp.*）（鼠疫和小肠结肠炎）以及克雷白氏杆菌（*Klebsiella*）和肠杆菌属种（*Enterobacter spp.*）（肺炎和血液感染）。这些肠细菌品种还与医源性感染和革兰氏阴性菌败血症相关。此外，在治疗肠细菌引起的疾病时，对抗生素的多重耐药性已经成为一个主要问题（Paterson, 2006, *AJIC* 34:20-28）。

人体的至少 5 种胃肠疾病是由大肠杆菌引起的。大肠杆菌菌株的致病性是由于其内存在一种或多种毒力因子而产生。这些毒力因子包括：侵染因子（侵染素）、不耐热肠毒素和耐热肠毒素、细菌外毒素（verotoxin）以及定殖因子或粘附素。最近发现的大肠杆菌疾病是由血清型 0157:H7 的菌株引起的出血性结肠炎。这些菌株产生细菌外毒素，并且该疾病以痛苦的腹部绞痛和出血性腹泻为特征。该相同菌株还与人体的溶血性尿毒性综合征（HUS）有关。

小肠结肠炎耶尔森菌（*Yersinia enterocolitica*）亦引起人体中的腹泻。此外，腹泻还与迟缓爱德华菌（*Edwardsiella tarda*）和柠檬酸

杆菌 (*Citrobacter*) 的菌株引起的感染有关。肺炎克雷白氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 和阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 的菌株已经从患有热带口炎性腹泻的病人中分离出来。

伤寒 (一种严重的全身性感染) 是通过肠细菌伤寒沙门氏菌 (*S. typhi*) 对网状内皮系统的急性感染而引起的。每年至少发生 1600 万例的伤寒, 其中导致 60 万例死亡。这种感染通过粪-口途径传播并且通常通过摄入污染的食物或水而进入人体。在这种细菌穿过肠壁之后, 其在 24 至 72 小时内繁殖并进入血液内, 从而导致伤寒和菌血症。在 10 至 14 天的时期内, 伤寒的早期症状包括: 头疼、发热、便秘、胃疼、厌食和肌痛。

肠杆菌科细菌还代表非人类动物中的一大类病原体。例如, 肺炎克雷白氏杆菌是灵长类动物中呼吸系统疾病的常见病因, 并且假结核耶尔森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 与小肠结肠炎和腹膜炎有关。灵长类动物中最经常诊断出的腹泻病是由志贺氏杆菌、大肠杆菌和沙门氏菌引起的。猫狗等家庭宠物易患由大肠杆菌引起的诸如膀胱炎和其它泌尿生殖道感染之类的疾病。变形杆菌 (*proteus*) 类引起猫狗中的其它疾病。

牛犊等家畜易患全身性大肠杆菌病和新生牛犊腹泻 (犊牛白痢), 这些疾病是由含有 K99 菌毛粘附素的耐热肠毒素性大肠杆菌血清型引起的。牛的乳腺炎最通常由大肠杆菌和沙雷氏菌 (较少见的是克雷白氏杆菌和弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)) 的感染而引起的。都柏林沙门氏菌 (*Salmonella dublin*) 和鼠沙门氏菌 (*S. typhimurium*) 也是奶牛中的重要病原体。大肠杆菌的感染在小猪中引起腹泻, 或在轻度腹泻之后发生水肿。猪大肠杆菌菌株通过存在 K88 菌毛粘附素来表征, 所述 K88 菌毛粘附素的抗原性不同于上述的 K99 抗原。猪的乳腺炎和子宫炎由肺炎克雷白氏杆菌 (*K. pneumoniae*) 引起, 并且其肠炎和淋巴腺炎由小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*) 引起。猪霍乱沙门氏菌 (*S. choleraesuis*) 和猪伤寒沙门氏菌 (*S. typhisuis*) 亦引起猪的疾病。

沙门氏菌 (例如鼠沙门氏菌、新港沙门氏菌 (*S. newport*) 和鸭

沙门氏菌 (*S. anatum*) 引起马的肠炎, 这会导致高的致死率和脓毒性流产。马驹和母马会遭受肺炎克雷白氏杆菌的感染, 这可导致子宫炎 (母马) 和肺炎 (马驹)。绵羊亦会患肠杆菌科细菌引起的各种疾病。例如, 产生耐热肠毒素的大肠杆菌菌株引起羊羔的幼羊腹泻。这些菌株的大多数含有 K-99 菌毛粘附素。沙门氏菌性流产通常由流产沙门氏菌 (*Salmonella abortusovis*)、鼠沙门氏菌或都柏林沙门氏菌引起, 这些细菌还导致死产和羊毛损伤。

大肠杆菌引起的败血症是导致小鸡死亡的重要原因。肠道沙门氏菌血清型以及鸡白痢沙门氏菌 (*Salmonella pullorum*) 和鸡沙门氏菌 (*Salmonella gallinarum*) 是家禽的主要病原体。

渔业的巨大损失亦可归因于各种肠细菌的感染。例如, 鲑鱼和鳟鱼孵化场的红嘴病 (redmouth disease) 的爆发是由鲁氏耶尔森菌 (*Yersinia ruckeri*) 引起的。迟缓爱德华菌是鳗鲡、鲶鱼和金鱼的病原体, 并且鲶鱼爱德华菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 对鲶鱼具有致病性。

尽管抗生素治疗肠杆菌感染是可行的, 但是肠杆菌科细菌中耐药性的出现和蔓延使得传染病的治疗复杂化, 并有产生对目前所有可用的药剂都具有耐药性的菌种的危险 (Paterson, 2006, *AJIC* 34:20-28)。因此, 人们已经研究了用于预防和治疗细菌感染的疫苗。例如, 美国专利申请 No. 10/394,517 (公开号为 2003/0215464) 描述了缺失功能性脂蛋白 (LPS) 的减毒肠杆菌科细菌。这些减毒细菌不能够引起免疫应答, 因而只是潜在的候选疫苗。

人们还开发了抗伤寒的疫苗。口服的减毒活 galE 突变体 Ty21a (Vivotif[®]疫苗, 由位于瑞士的 Berne 市的 Berna Biotech 有限公司生产) 在流行病区有效, 但是它没有被许可用于小于六岁龄的儿童。此外, 需要 3 至 4 次的给药以实现部分保护的免疫应答 (Levine 等, 1999, *Vaccine* 1: S22-S27)。Vi 荚膜多糖疫苗 (Vi capsular polysaccharide vaccine) (ViCPS) (Typhim Vi[™]; Aventis Pasteur) 被许可用于超过 2 岁龄的儿童; Vi 的一次注射提供与 Ty21a 疫苗类似的保护作用, 但是仅仅短期地达到该效果。缺少持久性免疫是该疫苗的主要缺点 (Lin 等, 2001, *N Engl J Med.* 344:1263-9; Sabitha 等,

2004, *Indian J. Med. Sci.* 58:141-149)。此外, 这些疫苗通常在 50% 至 80% 的接受者中实现最佳的保护作用 (Crump 等, 2004, *Bulletin of the World Health Organisation*, 82; 346-353; Levine 等, 1999, *Vaccine* 17: S22- S27; Lin 等, 2001, *N Engl J Med.* 344:1263-9; Sabitha 等, 2004, *Indian J. Med. Sci.* 58:141-149)。基于伤寒沙门氏菌 (Ty-800) 的减毒菌株的新候选疫苗已经由 Emergent BioSolutions 公司(位于美国马里兰州的 Gaithersburg 市) 开发。该候选疫苗目前在越南(流行病区) 处于二期临床试验阶段 (Crump 等, 2004, *ibid.*)。关于 Ty21a 疫苗, 该疫苗通过口服途径给药, 并且可能不适于儿童服用。

尽管减毒细菌作为用于预防和治疗传染病的疫苗或疫苗载体的潜在广泛应用比其它疫苗具有显著优势, 但是关于使用减毒细菌的安全问题并不能忽视。因此, 据认为, 开发用于传染病的可替代治疗方案(包括结合有特异性抗原的新的疫苗平台) 是未来 5-10 年中改善全球卫生状况的重点 (Nikaido, 2003, *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:593-656)。在这发面, 已经有人体对表面细菌抗原的免疫应答的研究报导。例如, Vi (荚膜多糖)、H (鞭毛成分) 以及 O (脂多糖 [LPS]) 细菌抗原引起针对伤寒沙门氏菌的抗体应答的能力提供了使用特异性抗原开发可替代方案值得进行研究的证据(在文献 Calderon 等, 1986, *Infection and Immunity*, 52:209-212; Ortiz 等, 1989, *J Clin. Microbiol.* 27:1640-1645 中有所讨论)。最近, 研究人员发现, 孔蛋白也是引起对由多种革兰氏阴性菌引起的感染的特异性保护性免疫应答的重要抗原 (Humphries 等, 2006, *Vaccine* 24:36-44; Kim 等, 1999, *J Immunol.* 162:6855- 6866)。孔蛋白是革兰氏阴性菌的三聚体的、暴露的外膜蛋白 (OMP), 其起着相对非特异的通道的作用, 从而容许小的亲水性分子通过外膜 (Nikaido, 2003, *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:593-656)。

对孔蛋白的免疫应答似乎既涉及体液介导的免疫途径, 又涉及细胞介导的免疫途径。例如, 伤寒的严重或恢复期的患者表现出高水平的孔蛋白特异性抗体 (Calderon 等, 1986, *Infect. Immun.* 52:209-212; Ortiz 等, 1989, *J Clin. Microbiol.* 27:1640-1645)。此外, 伤寒患

者以及用 Ty21a 口服疫苗免疫的志愿者已经显示出孔蛋白特异性细胞免疫应答 (Salerno-Goncalves 等, 2002, *J Immunol.* 169:2196-203)。伤寒沙门氏菌的两种主要孔蛋白 OmpC 和 OmpF 已经显示出能够提高鼠的持久性抗体应答 (Secundino 等, 2006, *Immunology* 117:59)。因此, 综上所述, 这些数据表明, 孔蛋白是针对肠细菌感染的细胞免疫应答和体液免疫应答的重要靶点。

在各种疫苗开发的新方法中, 作为有前景的策略, 已经出现由病毒核壳体 (viral nucleocapsid) 制成的病毒样颗粒 (VLP)。迄今为止, 两种 VLP 疫苗 (乙型肝炎病毒 (HBV) 疫苗和人乳头瘤病毒 (HPV) 疫苗) 已经显示出在人体中起有效作用 (Fagan 等, 1987, *J. Med. Virol.* 21:49-56; Harper 等, 2004, *Lancet*, 364:1757-1765)。例如, 由人乳头瘤病毒 (HPV) 的主核壳体蛋白 L1 制成的 VLP 在抗妇女宫颈癌的发展时显示出提供 100% 的保护作用 (Ault, K.A., 2006, *Obstet. Gynecol. Surv.* 61:S26-S31; Harper 等, 2004, *Lancet* 364:1757-1765, 另外请参见国际专利申请 PCT/US01/18701 (WO 02/04007))。诸如噬菌体 Q β (Maurer 等, 2005, *Eur. J. Immunol.* 35:2031-2040)、由病毒核心蛋白制成的乙型肝炎病毒 VLP (Mihailova 等, 2006, *Vaccine* 24:4369-4377; Pumpens 等, 2002, *Intervirology* 45:24-32) 和细小病毒 VLP (Antonis 等, 2006, *Vaccine* 24:5481-5490; Ogasawara 等, 2006, *In Vivo* 20:319-324) 等平台也已经显示出携带抗原表位以及引起强的抗体应答的能力。类似地, 美国专利 No. 6,627,202 描述了用作抗原表位输送系统的 HBV 核心蛋白, 其含有通过 HBV 壳体结合肽交联的抗原 (包括靶向于或源自各种病毒和细菌的抗原)。

已经描述有使用来自植物病毒的 VLP 作为抗原表位提呈系统 (epitope presentation system)。植物病毒主要由高免疫原性的蛋白组成, 并具有复杂的、重复的和结晶的组织。此外, 它们在种系起源学上明显不同于动物免疫系统, 这使得它们成为开发疫苗的良好候选物。例如, 豇豆花叶病毒 (CPMV)、约翰逊草花叶病毒 (JGMV)、烟草花叶病毒 X (TMVX) 和苜蓿花叶病毒 (AIMV) 已经被修饰用于目标抗原表位的提呈 (Canizares, M. C. 等, 2005, *Immunol. Cell.*

Biol. 83:263-270; Brennan 等, 2001, *Molec. Biol.* 17:15-26; Saini 和 Vratl, 2003, *J. Virol.* 77:3487-3494)。国际专利申请 PCT/GB97/010659 (WO 97/39134) 描述了包含外壳蛋白和非病毒蛋白的嵌合的病毒样颗粒, 其可以用于 (例如) 肽抗原表位的提呈。国际专利申请 PCT/US01/07355 (WO 01/66778) 描述了一种植物病毒外壳蛋白, 特别是在 N-端处通过连接子与目标多肽融合的烟草花叶病毒外壳蛋白, 其可以包含病原性微生物的抗原表位。国际专利申请 PCT/US01/20272 (WO 02/00169) 描述了含有马铃薯病毒 Y 外壳蛋白或与外源肽融合的截断的菜豆黄花叶病毒外壳蛋白的疫苗, 特别是新城疫病毒 (Newcastle Disease Virus) 的抗原表位或人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的抗原表位。此外, 美国专利 No. 6,042,832 描述了将融合苜蓿花叶病毒或烟草线条病毒壳体蛋白的多肽 (例如病原体抗原表位) 施用给动物以提高免疫应答的方法。

已经描述有源自番木瓜花叶病毒 (PapMV) 的外壳蛋白的 VLP 及其作为免疫增强剂的用途 (国际专利申请 No. PCT/CA03/00985 (WO 2004/004761))。PapMV 在大肠杆菌中的表达导致由数百个以重复的和结晶的方式组织的 CP 亚单元构成的 VLP 的自组装 (Tremblay 等, 2006, *FEBS J* 273:14)。对 PapMV CP 缺失构建体的表达和纯化的研究进一步表明, CP 亚单元的自组装 (或多聚化) 对于功能是重要的 (Lecours 等, 2006, *Protein Expression and Purification*, 47:273-280)。已经表明, PapMV VLP (其含有源自 gp100 或流感病毒 M1 蛋白的抗原表位) 能够引起抗原表位的 MHC I 类交叉提呈, 从而导致特异性人体 T 细胞的扩增 (Leclerc, D. 等, *J. Virol.*, 2007, 81(3): 1319-26; 在 2006 年 11 月 22 日印刷之前电子出版)。

已经描述有源自携带各种抗原决定簇 (其来自 HIV、HCV、EBV 或流感病毒) 的马铃薯病毒 X (PVX) 的 VLP (欧洲专利申请 No. 1 167 530)。携带 HIV 抗原表位的 PVX VLP 能够在鼠体内通过体液介导的途径和细胞介导的途径来诱导抗体的产生。额外的佐剂可以与 PVX VLP 联用, 以增强这种效果。

已经报导, 乙型肝炎病毒核心蛋白或细小病毒 VLP 即使不携带

遗传信息时,也会诱导 CTL 应答(Ruedl 等, 2002, *Eur. J. Immunol.* 32; 818-825; Martinez 等, 2003, *Virology*, 305; 428-435), 并且它们在其嵌入的细胞内不能主动复制。还描述有携带有来自淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (lymphocytic choriomeningitis virus) (LCMV) 或卵清白蛋白的抗原表位的 VLP 通过树突状细胞在体内的交叉提呈 (Ruedl 等, 2002, *ibid.*; Moron 等., 2003, *J. Immunol.* 171:2242-2250)。还描述有携带有来自 LCMV 的抗原表位的乙型肝炎病毒核心蛋白 VLP 启动 CTL 应答的能力, 但是, 当单独施用该 VLP 不能够诱导 CTL 应答并且不能介导对病毒攻击的有效保护。只有当该 VLP 与抗 CD40 抗体或 CpG 寡核苷酸联用时才能诱导有效的 CTL 应答 (Storni 等., 2002, *J. Immunol.* 168:2880-2886)。较早的报导表明, 携带有来自 LCMV 的肽的猪细小病毒样颗粒 (PPMV) 能够保护小鼠抵抗致命的 LCMV 攻击 (Sedlik 等, 2000, *J. Virol.* 74:5769-5775)。

人们还描述了融合有亲和肽的番木瓜花叶病毒 VLP 的用途 (Morin 等, 2007, *J. Biotechnology*, 128: 423-434), 所述的 VLP 能够结合根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae*) 的休眠孢子。该 VLP 显示出能够以高亲和力结合根肿菌孢子, 并且被提出作为用于检测根肿菌的抗体的替代物。

提供上述背景信息的目的是使人们了解申请人认为可能与本发明有关的信息。提供上述信息既不是意图承认, 也不应该解释为其构成了针对本发明的现有技术。

发明概述

本发明的一个目的是提供抗伤寒沙门氏菌和其它肠细菌病原体的基于番木瓜花叶病毒的疫苗。根据本发明的一个方面, 提供一种抗原提呈系统, 其包含与番木瓜花叶病毒 (PapMV) 或者源自 PapMV 外壳蛋白的 VLP 组合的一种或多种肠细菌抗原, 其中, 所述 PapMV 或 VLP 能够增强针对所述一种或多种肠细菌抗原的免疫应答。

根据本发明的另一个方面, 提供一种疫苗组合物, 其包含本发明的一种或多种抗原提呈系统和可药用的载体。

根据本发明的另一个方面，提供一种多肽，其包含与一种或多种亲和肽融合的番木瓜花叶病毒外壳蛋白，所述一种或多种亲和肽能够结合肠细菌抗原。

根据本发明的另一个方面，提供一种多肽，其包含与一种或多种肠细菌抗原融合的番木瓜花叶病毒外壳蛋白。

根据另一个方面，提供一种编码本发明多肽的多核苷酸。

根据另一个方面，提供本发明的抗原提呈系统在需要其的动物中用于诱导针对肠细菌的免疫应答中的用途。

根据另一个方面，提供本发明的疫苗在需要其的动物中用于诱导针对肠细菌的免疫应答中的用途。

根据另一个方面，提供一种本发明的抗原提呈系统在制备疫苗中的用途。

根据本发明的另一个方面，提供一种用于免疫动物以抗伤寒沙门氏菌感染的疫苗，所述疫苗包含抗原提呈系统，所述抗原提呈系统包含与番木瓜花叶病毒（PapMV）或源自 PapMV 外壳蛋白的 VLP 组合的抗原，所述抗原源自伤寒沙门氏菌 OmpC 或 OmpF，其中所述 PapMV 或 VLP 能够在所述动物中增强针对所述抗原的免疫应答

根据本发明的另一个方面，提供一种在动物中诱导针对肠细菌的免疫应答的方法，所述方法包括给所述动物施用有效量的本发明的抗原提呈系统。

根据本发明的另一个方面，提供一种在动物中诱导针对肠细菌的免疫应答的方法，所述方法包括给所述动物施用有效量的本发明的疫苗。

附图简要说明

在下面结合附图的详细描述中，本发明的这些特征以及其它特征将变得显而易见。

图 1 示出（A）番木瓜花叶病毒外壳（或壳体）蛋白的氨基酸序列（GenBank 登录号 NP_044334.1；SEQ ID NO:1）、（B）编码番木瓜花叶病毒外壳蛋白的核苷酸序列（GenBank 登录号 NC_001748

(核苷酸 5889-6536); SEQ ID NO:2)、以及 (C) 修饰的 PapMV 的外壳蛋白 CP Δ N5 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)。

图 2 示出: (A) WT PapMV 病毒、(B) CP Δ N5 PapMV 病毒样颗粒 (VLP)、(C) E128A VLP、(D) K97A 纯化蛋白、(E) 免疫金标记的重组 CP Δ N5 VLP (其含有具有 6XH 标记物的抗体) 的电子显微照片, 其中横杠表示 200 nm; 以及 (F) PapMV 病毒和重组 CP Δ N5 VLP 以及 E128A VLP 的平均长度 (n=150)。

图 3 示出野生型 (WT) PapMV 和包含重组突变体 PapMV 外壳蛋白 CP Δ N5、E128A 或 K97A 的 PapMV 病毒样颗粒 (VLP) 的圆二色 (CD) 谱; (A) 显示 WT 病毒 (黑线)、CP Δ N5 (虚线) 和 E128A VLP (灰线) 的远紫外光谱, (B) 显示通过乙酸法从 WT 病毒分离的盘状物 (黑线) 和 CP Δ N5 蛋白 (盘状物) 的高速上清液 (虚线) 的远紫外光谱, (C) 显示 CP Δ N5 蛋白 (盘状物) (虚线) 和 K97A 蛋白 (灰线) 的远紫外光谱, (D) 显示 CP Δ N5 和 E128A VLP 在 250 nm 和 350 nm 之间的远紫外光谱, 以及 (E) 显示 CP Δ N5 和 K97A 盘状物在 250 nm 和 350 nm 之间的远紫外光谱。

图 4 示出重组突变体 PapMV 外壳蛋白、CP Δ N5 和 K97A 的凝胶过滤分析的结果; (A) 示出 CP Δ N5 纯化蛋白的蛋白洗脱曲线 (黑线; 灰线: 分子量标记物), 以及 (B) 示出 CP Δ N5 纯化蛋白 (黑线) 和 K97A 纯化蛋白 (灰线) 的蛋白洗脱曲线。

图 5 示出重组突变体 PapMV 外壳蛋白和野生型 (WT) PapMV 外壳蛋白的圆二色 (CD) 谱温度诱导变性曲线; (A) 显示 CP Δ N5 和 E128A 突变体 VLP 以及 WT 病毒的曲线, 以及 (B) 显示 CP Δ N5 和 WT 盘状物的曲线。光谱以平均残基椭圆率的单位进行显示。通过记录在 222 nm 处的 [Q] (其为温度的函数) 来监测解折叠 (unfolding)。所有显示的 CD 谱都是采用在 pH 7.2 的 10 mM NaP 缓冲液中浓度为 1 mg/毫升的蛋白产生的。

图 6 示出: (A) PapMV 外壳蛋白 (PapMV) 和修饰的 PapMV 构建体的 C-端序列的比对, 其中所述修饰的 PapMV 构建体含有来自流感病毒 M1 蛋白的 HLA-A*0201 限制抗原表位 (57 至 65 位, 标记

为 PapMV Flu) 或来自 gp100 的 HLA-A*0201 限制抗原表位 (在 210 位处具有 M 的 209-217 位; 标记为 PapMV gp100); 以及 (B) 各种重组的自组装 PapMV 制剂的电子显微照片。

图 7 示出重组的 PapMV 外壳蛋白 (PapMV) 和外壳蛋白融合体 (PapMV-gp100 和 PapMV-Flu) 在合成 2 个月和 7 个月之后的稳定性的 SDS-PAGE 分析结果。其还显示将 7 个月的原蛋白制剂在 23℃ 或 37℃ 下再培养 7 天的结果, 以及在加入加样缓冲液和在沸水中培养之前将其用蛋白酶 K 处理 5 分钟的结果。

图 8 示出当对两种不同来源的 APC 进行冲击时, 来自两种抗原的 MHC I 类抗原表位能够被交叉提呈。从 HLA-A*0201 供体制备 CD40 活化的 B 淋巴细胞和 DC, 并用所示的制剂在不同浓度下冲击 18 小时。清洗冲击后的细胞并加入 gp100-特异性 T 细胞(A)或 FLU-特异性 T 细胞(B), 以另外冲击 18 小时。通过用 ELISA 分析测量的 IFN- γ 分泌量来显示 T 细胞活化的证据。

图 9 示出得自 (A) 和 (B) 的结果, 其中 (A) 为: 将从 HLA-A*02 阳性或阴性的供体制备的经 PapMV Flu 或 PapMV gp100 冲击的 CD40 活化的 B 淋巴细胞与 FLU-特异性 T 细胞 (左栏) 或 gp100-特异性 T 细胞 (右栏) 共培养, 和 (B) 为: 将 HLA-A*0201⁺ 和 gp100⁺ 黑素瘤细胞系、或经 PapMV Flu 冲击的 HLA-A*02⁺ CD40 活化的 B 细胞与封闭 MHC I 类、II 类或 HLA-DR 提呈的抗体培养。然后添加 FLU-特异性 T 细胞或 gp100-特异性 T 细胞。结果以基于 IFN- γ 分泌测定法的识别百分比表示, 100% 对应于阳性对照的分泌量。

图 10 显示由 PapMV 介导的 MHC I 类交叉提呈是蛋白酶体非依赖性的。将 HLA-A*0201⁺ 和 gp100⁺ 黑素瘤细胞系、或经 PapMV Flu 冲击的 HLA-A*02⁺ CD40 活化的 B 细胞与封闭 MHC I 类、II 类或 HLA-DR 提呈的抗体培养。然后添加 FLU-特异性 T 细胞或 gp100-特异性 T 细胞。结果以基于 IFN- γ 分泌测定法的识别百分比表示, 100% 对应于阳性对照的分泌量。

图 11 示出用 PapMV Flu 冲击的 APC 使对源自流感病毒 M1 蛋白的 HLA-A*0201 抗原表位特异性的 T 淋巴细胞扩增的分析。(A)

将来自 HLA-A2⁺正常供体的 PBMC 与自体性 CD40 活化的 B 细胞(模拟物)或者用 PapMV、PapMV Flu 或 PapMV gp100 冲击的 CD40 活化的 B 细胞共培养。将培养的细胞在第 7 天再次刺激并且在不同时间添加 IL-2。在第 15 天通过将其与 T2 细胞(其经过源自 Flu 或 gp100 的 HLA-A*0201 肽冲击)共培养来评价扩增细胞的特异性。通过 ELISPOT 测定分泌 IFN- γ 的细胞的频率。(B) 将扩增培养的 T 细胞与受冲击的 CD40 活化的 B 淋巴细胞共培养。

图 12 示出按照图 11 中的方式处理的扩增的 T 细胞的 IFN- γ 分泌的分析结果。

图 13 示出在 CD-1 小鼠中隆起的背部气囊中, PapMV 外壳蛋白和 LPS 的促炎反应的比较。数据以 5 只小鼠的平均值 $\pm$ SEM 表示。结果代表两个相同但独立的试验。

图 14 示出在分别皮下注射多聚的 PapMV-E2、单体的对应物(PapMVCP27-215-E2)、单独的 HCV E2 肽或 PBS 的 C3H/HeJ 小鼠中, 对 PapMV 外壳蛋白特异性的 IgG 抗体的应答(ELISA 板涂上 PapMV-CP 或 PapMV27-215)。数据代表了 4 只小鼠的抗体效价的平均值。这些结果代表两个相同但独立的试验。图表上的黑箭头表示第 15 天的加强注射。

图 15 示出在分别用抗原、抗原加 PapMV、抗原加弗氏完全佐剂(FCA)或抗原加源自大肠杆菌 O111:B4 的 LPS 进行免疫的 BALB/c 小鼠(每组三只)中, PapMV 在第 0 天增强抗体对模型抗原(A)鸡卵溶菌酶(HEL)和(B)卵清蛋白(OVA)的应答的能力。图中示出了 2 个试验的代表性结果。对于(C) IgG1、(D) IgG2a 和(E) IgG2b 而言, 通过 ELISA 用模型抗原(HEL 或 OVA)将从免疫的动物采集的血清中的抗体同型化。

图 16 示出: (A) 野生型 PapMV 外壳蛋白和重组构建体的 C-端的氨基酸序列, 所述重组构建体在 PapMV 外壳蛋白的 C-端包含融合体, 所述融合体为亲和肽与 OmpC 的融合体或亲和肽与 OmpF 的融合体(分别为构建体 PapMV OmpC 和 PapMV OmpF); (B) 显示纯化的蛋白 PapMV、PapMV OmpC、PapMV OmpF、OmpC 和 OmpF

的 SDS-PAGE 图[第一泳道：分子量标记物，第二泳道：PapMV VLP，第三泳道：PapMV OmpC VLP，第四泳道：PapMV OmpF VLP，第五泳道：纯化的 OmpC，第六泳道：纯化的 OmpF]；和(C)重组 PapMV OmpC VLP 和 PapMV OmpF VLP 的高速粒状沉淀的电子显微照片。

图 17 示出 PapMV VLP 与它们各自的抗原高亲和力结合；(A) 为显示 PapMV OmpC VLP 与 OmpC 抗原高亲和力结合的 ELISA；

(B) 为显示 PapMV OmpF VLP 与 OmpF 抗原高亲和力结合的 ELISA。

图 18 示出小鼠中抗伤寒沙门氏菌攻击的保护试验的结果。(A) 示出单用 OmpC 免疫的小鼠和用含有 OmpC+PapMV OmpC VLP 的制剂免疫的小鼠中，抗 100 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌的保护能力；(B) 示出单用 OmpF 免疫的小鼠和用含有 OmpF+PapMV OmpF VLP 的制剂免疫的小鼠中，抗 100 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌的保护能力；(C) 示出单用 OmpC 免疫的小鼠和用含有 OmpC+PapMV OmpC VLP 的制剂免疫的小鼠中，抗 500 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌的保护能力；并且 (D) 示出单用 OmpF 免疫的小鼠和用含有 OmpF+PapMV OmpF VLP 的制剂免疫的小鼠中，抗 500 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌的保护能力。

图 19 示出：针对 OmpC 的抗体应答的评价(A-D)；在用 OmpC 或包含 OmpC+PapMV OmpC VLP 的疫苗免疫的小鼠之间测量针对同种型的 IgG1 (A)、IgG2a (B)、IgG2b (C) 和 IgG3 (D) 的 OmpC 的 IgG 应答，以及 (E) 与单用 OmpC 或 PapMV OmpC 免疫的情况相比，用 OmpC 和 PapMV OmpC 共免疫之后再用伤寒沙门氏菌攻击有利于小鼠对伤寒沙门氏菌感染的持久性主动保护（如存活率%所示）。

图 20 示出 PapMV 病毒增加了小鼠中的 OmpC 孔蛋白的保护能力；(A) 对雌性 BALB/c 小鼠（每组 10 只）单用 10 μg OmpC 或与 30 μg PapMV 联用进行腹腔内免疫。在第 15 天单用 OmpC 给予加强免疫。将对照小鼠注射盐水 (ISS) 或 PapMV。在第 21 天，用 100 LD₅₀（实心符号）或 500（空心符号）LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌对试验组进行攻击，并记录攻击 10 天之后的存活率。对照组用 20 LD₅₀ 的伤寒沙

门氏菌攻击。图中示出了3次试验的代表性结果。(B)将雌性BALB/c小鼠(每组5只)在第0天单用10 µg OmpC或者与30 µg PapMV或弗氏不完全佐剂(IFA)(1:1, v/v)联用进行腹腔内免疫。在第15天仅用OmpC对全部小鼠给予加强免疫。对照小鼠仅注射盐水(等渗盐水(ISS))。在初次免疫后的第21天通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测量抗体效价。

图21示出(A)源自肠道沙门氏菌亚种(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi) Ty2的OmpC前体的氨基酸序列(SEQ ID NO:39)(GenBank登录号P0A264);和(B)源自肠道沙门氏菌亚种CT18的OmpF前体蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:40)(GenBank登录号CAD05399)。

图22示出(A)和(B)的氨基酸序列,其中(A)为:包含用于结合OmpC的亲肽的PapMV外壳蛋白[SEQ ID NO:42],和(B)包含用于结合OmpF的亲肽的PapMV外壳蛋白[SEQ ID NO:43]。克隆型序列和野生型序列的不同以黑体和下划线标记出;所述亲肽序列加有下划线,并且组氨酸标记物显示为斜体。

图23示出:(A)野生型PapMV外壳蛋白和重组构建体的C-端的氨基酸序列,所述重组构建体包含在PapMV外壳蛋白和位于该蛋白的C-端的6XHis标记物(6His)之间融合的伤寒沙门氏菌孔蛋白的环6肽(以黑体和下划线示出);(B)显示重组蛋白的纯化结果的SDS-PAGE凝胶图。1.分子量标记物,2.在诱导蛋白PapMV-环6表达之前的细菌的总细菌裂解液,3.在用IPTG诱导蛋白PapMV-环6表达之后的细菌的总细菌裂解液,4.含有纯化的PapMV-环6蛋白的VLP的高速粒状沉淀,以及(C)显示PapMV病毒、没有任何融合的PapMV重组VLP以及含有环6肽的PapMV重组VLP(PapMV-环6)的电子显微照片。

图24示出:(A)源自包含伤寒沙门氏菌孔蛋白的环6肽的PapMV外壳蛋白(PapMV-环6)的外壳蛋白的氨基酸序列[SEQ ID NO:46],其中环6肽序列加下划线,并且组氨酸标记物用斜体示出,以及(B)编码PapMV-环6蛋白的核苷酸序列[SEQ ID NO:47]。

图 25 为显示对 PapMV-环 6 构建体的抗体应答的结果。将 5 只 Balb/c 小鼠用 100 μ g 的 PapMV-环 6 每隔两周进行皮下免疫。在第 28 天进行最后的采血，并使用以下的条件进行 ELISA，所述条件为：（A）合成的和纯化的环 6 肽，（B）PapMV 平台和（C）源自伤寒沙门氏菌的纯化的 OmpC。

图 26 示出在小鼠中抗伤寒沙门氏菌攻击的保护试验的结果。（A）示出在小鼠中分别用 OmpF 和含有 OmpF + PapMV OmpF VLP 或 OmpF + PapMV 的制剂抗 77 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌攻击的保护能力，和（B）示出在小鼠中用 OmpF 和含有 OmpF + PapMV OmpF VLP 或 OmpF + PapMV 的制剂抗 378 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌攻击的保护能力。

图 27 示出：（A）PapMV SM 外壳蛋白和重组构建体的 C-端的氨基酸序列，所述重组构建体包含亲和肽与 OmpC 在 PapMV SM 外壳蛋白的 C-端处的融合体；（B）显示纯化的蛋白 PapMV SM OmpC 的 SDS-PAGE 图[第一泳道：分子量标记物，第二泳道：用 IPTG 诱导前的细菌裂解液，第三泳道：表达高量的 PapMV SM CP 的细菌的裂解液，第四泳道：纯化的 PapMV SM OmpC 蛋白 PapMV OmpF]；以及（C）重组 PapMV SM OmpC 的高速粒状沉淀的放大 100,000 倍的电子显微照片。

图 28 示出：（A）包含亲和肽的 PapMV SM 外壳蛋白（PapMV SM OmpC）的氨基酸序列[SEQ ID NO:48]，所述亲和肽用于结合 OmpC，以及（B）编码 PapMV SM OmpC 蛋白的核苷酸序列[SEQ ID NO:49]。

图 29 示出在小鼠中抗伤寒沙门氏菌攻击的保护试验的结果，（A）示出在小鼠中用 OmpC 和用含有 OmpC + PapMV SM OmpC VLP 或 OmpC + PapMV VLP 的制剂抗 105 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌的保护能力，以及（B）示出在小鼠中用 OmpC 和含有 OmpC + PapMV SM OmpC VLP 或 OmpC + PapMV VLP 的制剂抗 520 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌的保护能力。

图 30 示出伤寒沙门氏菌孔蛋白的稳定性的评价结果。（A）示

出纯化的孔蛋白 (OmpC+OmpF) (5 μg) 的 SDS-PAGE 图, 所述孔蛋白为 1999 年 11 月 9 日制备的批次 ISIPOR (Salazar-Gonzales 等, 2004, *Immunology Letters* 93), (B) 示出 2008 年 1 月的相同的 ISIPOR 批次 (0.2 μg ; 泳道 2) 的 SDS-PAGE 图, 以及 (C) 示出纯化的 OmpC 蛋白、2007 年 4 月 30 日纯化的批次-1239 的 SDS-PAGE 图[左手泳道: 2007 年 4 月 30 日进行操作的凝胶; 泳道 1: 分子量标记物, 泳道 2: OmpC (10 μg); 右手泳道: 2008 年 1 月 18 日进行操作的凝胶, 泳道 1: OmpC (10 μg)]。

图 31 示出 PapMV 在体内引起了树突状细胞 (DC)、巨噬细胞和 B 细胞中的共刺激分子 (co-stimulatory molecule) 的上调。将 BALB/c 小鼠用 30 μg 经盐水稀释的 PapMV (灰线) 或 50 μg 的聚肌胞苷酸 (黑线) 腹腔内 (i.p.) 免疫, 并且将对照小鼠注射盐水 (实心柱状图)。在免疫后 24 小时, 采集淋巴结和脾脏的细胞并染色。进行流式细胞术以分析细胞群, 所述细胞群定义为: CD11c+CD11b-(DC)、CD11c-CD11b+(巨噬细胞) 和 CD11c-B220+(B 细胞)。图中示出两个试验的代表性结果。FITC, 异硫氰酸荧光素; MHC II, 主要组织相容性复合体 II 类。

发明详述

本发明提供一种抗原提呈系统 (APS), 该抗原提呈系统包含与番木瓜花叶病毒 (PapMV) 或源自番木瓜花叶病毒的 VLP 组合的一种或多种来自肠杆菌科细菌的抗原。根据本发明的一个实施方案, 该 APS 能够在动物内诱导体液免疫应答和/或细胞免疫应答。因此该 APS 适合用作抗细菌性疾病或病症的疫苗, 其可能需要免疫系统的这两种分支之一或二者的主动参与。

在本发明的一个实施方案中, 该 APS 包含一种或多种伤寒沙门氏菌 (*S. typhi*) 抗原, 并且适用作治疗和/或预防伤寒的疫苗。

在本发明的另一个实施方案中, 该 APS 包含一种或多种外膜蛋白 (Omp) 抗原。在一个具体的实施方案中, 该 APS 包含一种或多种 OmpC 和/或 OmpF 抗原。如本领域中已知的, 在肠杆菌科的成员

中，这两种蛋白的区域是保守的。因此，在另一个实施方案中，本发明提供包含一种或多种 OmpC 和/或 OmpF 抗原的 APS，该 APS 适用作多价疫苗，以对由多种肠细菌品种引起的感染提供保护作用。在另外的实施方案中，本发明提供包含一种或多种 OmpC 和/或 OmpF 抗原的 APS，该 APS 适用作单价疫苗。

定义

除非另有定义，否则本文使用的所有的技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员的一般理解相同的含义。

本文使用的术语“约”是指由给定值大致偏差 $\pm 10\%$ 。应当理解，无论是否特指，这样的偏差总是包括在本文提供的任何给定值中。

本文使用的术语“佐剂”是指扩大、激发、促进、增强和/或调节动物内的免疫应答的试剂。佐剂本身可能或不可能对免疫应答产生作用。

本文使用的“嵌合蛋白”是在在正常编码两种单独的蛋白或蛋白片段的两种或多种基因天然地或由于人工干预而发生重组，以提供编码这两种蛋白中的每一种的全部或部分的组合的蛋白（“嵌合蛋白”）的多核苷酸时而产生的蛋白。在本发明的上下文中，“融合蛋白”被视为“嵌合蛋白”。

本文使用的表述“融合外壳蛋白”是指这样的融合蛋白，其中融合体中的一种蛋白为 PapMV 外壳蛋白。

本文使用的术语“免疫应答”是指动物的免疫系统在响应抗原或抗原物质时发生的反应性变化，并且可能涉及抗体的产生、细胞介导免疫的诱导、补体活化、产生免疫耐受性或者它们的组合。

本文使用的术语“有效的免疫保护应答”和“免疫保护”是指这样的免疫应答，其针对一种或多种抗原，从而使接种的动物免受疾病和/或病原体感染。对于本发明的目的而言，免受疾病和/或病原体感染不仅包括绝对预防疾病或感染，还包括与未接种的感染或患病的动物相比，接种的动物在疾病或感染的程度或速率上任何可检

测的降低，或者接种的动物在疾病或由病原体感染所导致的任何症状或病症的严重程度方面任何可检测的降低。可以在动物中诱导有效的免疫保护应答，其中该动物之前未患有疾病、之前未感染病原体和/或在接种时没有疾病或感染。还可以在接种时已经患病或感染病原体的动物中诱导有效的免疫保护应答。免疫保护可以是一种或多种机制（包括体液免疫和/或细胞免疫）的结果。

本文中可交替使用的术语“免疫刺激”和“免疫性刺激”是指与动物病原体或疾病无关的分子（例如 PapMV 或 PapMV VLP）通过刺激免疫系统和/或提高免疫系统应答感染或疾病的能力而对病原体感染或疾病提供保护的能力。免疫性刺激可以具有预防效果、治疗效果或它们的组合。

“重组病毒”是这样的病毒，其中天然存在的病毒的遗传物质与其它遗传物质组合。

本文使用的应用于对象的术语“天然存在”是指这样的事实：该对象能够在自然界中找到。例如，能够从天然来源中分离出来、并且未经人工在实验室中有意修饰的有机体（包括病毒）或有机体中存在的多肽或多核苷酸序列就是天然存在的。

本文使用的术语“多肽”或“肽”意指其中具有通过肽键连接的至少 4 个氨基酸的分子。

本文使用的表达方式“病毒核酸”可以是病毒的基因组（或其 主要部分）、或碱基序列与该基因组互补的核酸分子。与病毒 RNA 互补的 DNA 分子也被视为病毒核酸，碱基序列与病毒 DNA 互补的 RNA 分子也是如此。

本文使用的术语“病毒样颗粒”（VLP）是指具有与病毒颗粒类似的物理外观的自组装颗粒。该 VLP 可以含有或不含有病毒核酸。VLP 通常不能复制。

本文使用的术语“假病毒”是指包含核酸序列（例如 DNA 或 RNA）的 VLP，包括质粒形式的核酸。假病毒通常不能复制。

本文使用的术语“疫苗”是指能够产生免疫应答的物质。

本文使用的术语“免疫原”和“抗原”是指能够单独或与佐剂

组合在对象中诱导免疫应答的一个分子、多个分子、分子的一部分或多部分、或分子的组合、直到并包括整个细胞和组织。该免疫原/抗原可以包含单个抗原表位，或者可以包含多个抗原表位。因此，该术语涵盖肽、碳水化合物、蛋白、核酸、各种微生物（包括病毒、细菌和寄生物）的整体或部分。半抗原亦被视为包含在本文使用的术语“免疫原”和“抗原”中。

本文中可交替使用的术语“免疫”和“接种”是指为提高免疫应答的目的而将疫苗施用给对象，并且其可具有预防效果、治疗效果或二者的组合。根据待治疗的对象，可以使用各种方法实现免疫，所述方法包括但不限于：腹腔注射（i.p.）、静脉注射（i.v.）、肌肉注射（i.m.）、口服、鼻腔内施用、喷雾施用以及浸渍施用。

本文使用的术语“初次（prime）”及其语法变体是指在用抗原进行加强接种之前，在动物内刺激和/或激活针对抗原的免疫应答。

本文针对疾病或病原体使用的术语“治疗”、“经治疗的”或“治疗的”是指增强对象对疾病或病原体感染的抵抗力的治疗（即降低了对对象染病或感染病原体的可能性）、以及在对象已经染病或感染之后为了对抗疾病或感染而进行的治疗（例如，使疾病或感染减轻、消除、改善或稳定）。

本文使用的术语“受试者”或“患者”是指需要治疗的动物。

本文使用的术语“动物”是指人以及非人类动物，其包括但不限于：哺乳动物、禽类和鱼类，并且涵盖家养、农场、动物园、实验室以及野生的动物，例如，奶牛、猪、马、山羊、绵羊和其它有蹄类动物、狗、猫、鸡、鸭、非人类的灵长类动物、豚鼠、兔子、雪貂、大鼠、仓鼠和小鼠。

本文涉及核酸或氨基酸序列而使用的术语“基本上相同”表示，当使用（例如）下文所述的方法进行最佳比对时，该核酸或氨基酸序列与确定的第二核酸或氨基酸序列（或“参考序列”）具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的序列同源性。“基本上同源”可用于指各种类型和长度的序列，例如全长序列、功能域、

编码序列和/或调节序列、启动子以及基因组序列。例如，可以通过本领域技术人员的技能范围内的各种方法、采用公开可得的计算机软件来确定两种氨基酸或核酸序列的同源百分比，所述软件例如为：Smith Waterman Alignment (Smith, T. F. and M. S. Waterman (1981) *J Mol Biol* 147:195- 7); 并入到 GeneMatcher Plus™(Schwarz 和 Dayhof (1979) *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Dayhof, M. O., Ed pp 353-358) 的“BestFit” (Smith 和 Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 482-489 (1981)); BLAST 程序(Basic Local Alignment Search Tool (Altschul, S. F., W. Gish 等. (1990) *J Mol Biol* 215: 403-10), 以及它们的各种变体, 包括: BLAST-2、BLAST-P、BLAST-N、BLAST-X、WU-BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、CLUSTAL, 以及 Megalign (DNASTAR) 软件。此外, 本领域技术人员能够确定用于测量比对的合适的参数, 其包括为了在比较的序列长度内实现最大比对而需要的算法。通常, 对于氨基酸序列而言, 比较序列的长度至少为 10 个氨基酸。本领域技术人员会理解, 实际长度取决于所比较的序列的全部长度, 并且可以是至少 20、至少 30、至少 40、至少 50、至少 60、至少 70、至少 80、至少 90、至少 100、至少 110、至少 120、至少 130、至少 140、至少 150 或至少 200 个氨基酸, 或其可以为氨基酸序列的全长。对于核酸而言, 比较序列的长度通常为至少 25 个核苷酸, 但是其可以是至少 50、至少 100、至少 125、至少 150、至少 200、至少 250、至少 300、至少 350、至少 400、至少 450、至少 500、至少 550、或至少 600 个核苷酸, 或其可以为核酸序列的全长。

术语“对应于”或“相当于”表示核酸序列与参考核酸序列的全部或部分相同。与此截然不同, 本文使用的术语“互补”表示核酸序列与参考核酸序列的互补链的全部或部分相同。为了解释, 核酸序列“TATAC”对应于参考序列“TATAC”并且与参考序列“GTATA”互补。

抗原提呈系统 (APS)

本发明的抗原提呈系统(APS)包含与番木瓜花叶病毒(PapMV)或源自 PapMV 外壳蛋白的 VLP 组合的一种或多种肠细菌抗原。“源自”的含义是指, VLP 包含这样的外壳蛋白, 如下面更详细的描述的那样, 该外壳蛋白具有与野生型外壳蛋白的序列基本上相同的氨基酸序列, 并且可以任选地包含一种或多种与外壳蛋白连接的抗原。PapMV 外壳蛋白可以是野生型外壳蛋白或其修饰形式(其能够多聚化并且自组装而形成 VLP)。如下面详细描述的那样, 在本发明的一个实施方案中, APS 包含源自肠细菌伤寒沙门氏菌(*S. typhi*)的一种或多种抗原。在另一个实施方案中, APS 包含源自肠杆菌科的不同细菌的一种或多种抗原。

APS 所包含的一种或多种抗原可以与 PapMV 或 PapMV VLP 的外壳蛋白接合, 或者它们可以是非接合的(即抗原与 PapMV 或 PapMV VLP 分离), 或 APS 可以既包含接合抗原, 也包含不接合的抗原。在后一种情况下, 不接合的抗原被称为额外的分离抗原(AIA)。AIA 可以与接合抗原相同或不同。接合可以是(例如)通过与外壳蛋白基因融合, 或通过共价、非共价或亲和方式结合而实现的。

因此, 包含在 APS 中的 PapMV 或 PapMV VLP 起到能够增强动物内的免疫应答的免疫增强剂的作用, 并且可任选地被用作 APS 所包含的一种或多种抗原的载体。根据本发明的一个实施方案, APS 能够诱导动物内的体液免疫应答和/或细胞免疫应答, 因此适用作(例如)抗肠细菌感染的疫苗。

番木瓜花叶病毒(PapMV)和 PapMV VLP

本发明的 APS 包含 PapMV 或 PapMV VLP。PapMV VLP 由重组 PapMV 外壳蛋白形成, 该重组 PapMV 外壳蛋白已经多聚化并自组装而形成 VLP。当组装后, 各 VLP 包含外壳蛋白亚单元的长的螺旋状阵列。野生型病毒包含超过 1200 个外壳蛋白亚单元, 并且长约 500 nm。但是, 短于或者长于野生型病毒的 PapMV VLP 仍然是有效的。在本发明的一个实施方案中, VLP 包含至少 40 个外壳蛋白亚单元。在另一个实施方案中, VLP 包含约 40 个到约 1600 个的外壳蛋

白亚单元。在可供选用的实施方案中，VLP 的长度为至少 40 nm。在另一个实施方案中，VLP 的长度在约 40 nm 和约 600 nm 之间。

本发明的 VLP 可以由多个具有相同的氨基酸序列的重组外壳蛋白制备，使得在组装后，最终的 VLP 包含相同的外壳蛋白亚单元，或者 VLP 可以由多个具有不同的氨基酸序列的重组外壳蛋白制备，使得在组装后，最终的 VLP 包含不同的外壳蛋白亚单元。

用于形成 VLP 的外壳蛋白可以是整个的 PapMV 外壳蛋白或其部分，或可以是 PapMV 外壳蛋白的基因修饰形式，该基因修饰形式（例如）包含一个或多个氨基酸的缺失、插入、替换等，条件是该外壳蛋白保持多聚化并组装成 VLP 的能力。野生型 PapMV 外壳（或壳体）蛋白的氨基酸序列是本领域中已知的（参见，Sit 等, 1989, *J. Gen. Virol.*, 70:2325-2331，以及 GenBank 登录号 NP_044334.1），并且在本文中表示为 SEQ ID NO:1（参见图 1A）。PapMV 外壳蛋白的核苷酸序列也是本领域中已知的（参见，Sit 等, *ibid.*，以及 GenBank 登录号 NC_001748 (核苷酸 5889-6536)），并且在本文中表示为 SEQ ID NO:2（参见图 1B）。

如上所述，VLP 所包含的重组 PapMV 外壳蛋白的氨基酸序列不必与亲本序列精确对应，即，其可以是修饰的或“变体序列”。例如，重组蛋白可以通过置换、插入或缺失一个或多个氨基酸残基来突变，使得该位置的残基不对应于亲本（参考）序列。但是，本领域技术人员将理解，这样的突变不是广泛的并且不会显著影响重组外壳蛋白多聚化并组装成 VLP 的能力。可以（例如）通过使用标准技术的电子显微镜法（例如本文中的实施例给出的示例性方法）来评价 PapMV 外壳蛋白的变体形式组装成多聚体和 VLP 的能力。

因此，本发明还涵盖为保持了多聚化并组装成 VLP 的能力的野生型蛋白的片段（即功能性片段）的重组外壳蛋白。例如，片段可以包含在蛋白的 N-端、C-端或内部缺失一个或多个氨基酸、或它们的组合。一般而言，功能性片段的长度为至少 100 个氨基酸。在本发明对一个实施方案中，功能性片段的长度为至少 150 个氨基酸、至少 160 个氨基酸、至少 170 个氨基酸、至少 180 个氨基酸、至少

190 个氨基酸。为了保持蛋白多聚化的能力，在蛋白的 N-端所进行的缺失应该通常缺失少于 25 个氨基酸。

根据本发明，当重组外壳蛋白包含变体序列时，该变体序列与参考序列至少约 70%相同。在一个实施方案中，该变体序列与参考序列至少约 75%相同。在其它的实施方案中，该变体序列与参考序列至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97%相同。在一个具体的实施方案中，该参考氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1。

在本发明对一个实施方案中，VLP 包含 PapMV 外壳蛋白的基因修饰的形式（即变体）。在另一个实施方案中，PapMV 外壳蛋白被基因修饰以在蛋白的 N-端或 C-端缺失氨基酸，和/或包括一个或多个氨基酸置换。在另外的实施方案中，PapMV 外壳蛋白被基因修饰以在蛋白的 N-端或 C-端缺失约 1 个至约 10 个氨基酸。

在具体的实施方案中，该 PapMV 外壳蛋白被基因修饰以去除位于靠近蛋白的 N-端（即在 SEQ ID NO: 1 的 1 和 6 位）并且能够启动转录的两个蛋氨酸密码子中的一个。去除一个转录启动密码子容许制备同质的蛋白组。可以通过（例如）以下方法去除选择的蛋氨酸密码子，所述方法为：置换组成该密码子的一个或多个核苷酸，使得该密码子编码不同于蛋氨酸的氨基酸，或变成无意义的密码子。可供选用的方式是，可以删除密码子的全部或部分，或编码包含所选密码子的蛋白的核酸的 5'区域。在本发明的具体的实施方案中，该 PapMV 外壳蛋白被基因修饰以从蛋白的 N-端缺失 1 个到 5 个氨基酸。在另外的实施方案中，经基因修饰的 PapMV 外壳蛋白具有与 SEQ ID NO: 3 基本上相同的氨基酸序列。

当重组蛋白包含含有一个或多个氨基酸置换的变体序列时，这些置换可以是“保守”置换或“非保守”置换。保守置换涉及到用具有类似侧链性质的另一种残基来替换一种氨基酸残基。如本领域中所已知，20 种天然存在的氨基酸可以根据其侧链的理化性质分组。合适的分组包括：丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸和色氨酸（疏水性侧链）；甘氨酸、丝氨酸、苏

氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺（极性，无电荷侧链）；天门冬氨酸和谷氨酸（酸性侧链）和赖氨酸、精氨酸和组氨酸（碱性侧链）。另一组氨基酸是苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸（芳香侧链）。保守置换涉及到用相同组的另一种氨基酸来置换氨基酸。非保守置换涉及到用具有不同的侧链性质的另一种残基来替换一种氨基酸残基，例如，用中性或碱性的残基来替换酸性残基，用酸性或碱性残基来替换中性残基，用亲水性残基来替换疏水性残基等等。

在本发明的一个实施方案中，变体序列包含一个或多个非保守置换。用另一种不同性质的氨基酸来替换一种氨基酸可以改善外壳蛋白的性质。例如，如本文所述，外壳蛋白的 128 位残基的突变会促进蛋白组装为 VLP。因此，在本发明的一个实施方中，外壳蛋白包含外壳蛋白的 128 位残基的突变，其中该位点的谷氨酸残基被中性残基置换。在另一个实施方案中，在 128 位的谷氨酸残基被丙氨酸残基置换。

同样，编码重组外壳蛋白的核酸序列不必与亲本参考序列精确对应，而是可以通过遗传码的简并性而变化，和/或使得其编码上述的变体氨基酸序列。因此，在本发明的一个实施方案中，编码重组外壳蛋白的核酸序列与参考序列至少约 70% 相同。在另一个实施方案中，编码重组外壳蛋白的核酸序列与参考序列至少约 75% 相同。在其它的实施方案中，编码重组外壳蛋白的核酸序列与参考序列至少约 80%、至少约 85% 或至少约 90% 相同。在具体的实施方案中，该参考核酸序列是 SEQ ID NO:2。

如下面更详细地描述的那样，PapMV VLP 外壳蛋白可以任选地与一种或多种抗原、亲和肽或其它短肽序列发生基因融合，以促进与一种或多种抗原的连接。

抗原

本发明的 APS 包含源自肠杆菌科的革兰氏阴性菌的一种或多种抗原。合适的肠杆菌科细菌的例子包括（但不限于）：大肠杆菌属（*Escherichia*）、沙门氏菌属（*Salmonella*）、耶尔森菌属（*Yersinia*）、

志贺菌属 (*Shigella*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、克雷白氏杆菌属 (*Klebsiella*) 以及肠杆菌属 (*Enterobacter*) 的品种。该抗原可以是源自肠细菌的免疫原、抗原表位、模拟抗原表位或抗原决定簇, 并且可以是 (例如) 肽、蛋白、核酸、或细菌表面抗原成分 (SBAC) (例如脂多糖 (LPS)、荚膜抗原(本质上是蛋白质或多糖)、或鞭毛成分), 或其可以是细菌的灭活或减毒形式。

可以基于所需要的 APS 的最终用途来选择候选抗原, 例如, 其针对何种细菌, 是打算用作多价疫苗还是单价疫苗, 和/或所施用的动物。合适的候选抗原可以被本领域技术人员容易地选择。多种抗原性肠细菌成分是本领域已知的, 并且是包含在本发明的 APS 中的合适的候选抗原。本领域技术人员也会理解, 可以基于使用本领域已知的免疫学技术测试抗原诱导动物内的免疫应答的能力, 来选择用于包含在本发明的 APS 中的适合候选抗原。

在本发明的一个实施方案中, 候选抗原选自大肠杆菌属 (*Escherichia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、耶尔森菌属 (*Yersinia*)、志贺菌属 (*Shigella*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、克雷白氏杆菌属 (*Klebsiella*) 或肠杆菌属 (*Enterobacter*) 中的品种。在本发明的另一个实施方案中, 候选抗原选自大肠杆菌属 (*Escherichia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、耶尔森菌属 (*Yersinia*)、志贺菌属 (*Shigella*)、克雷白氏杆菌属 (*Klebsiella*) 或肠杆菌属 (*Enterobacter*) 中的品种。在另一个实施方案中, 候选抗原选自大肠杆菌属 (*Escherichia*) 或沙门氏菌属 (*Salmonella*) 中的品种。在另一个实施方案中, 候选抗原选自沙门氏菌属 (*Salmonella*) 中的品种。在具体的实施方案中, 候选抗原是伤寒沙门氏菌 (*S. typhi*) 抗原。

合适的候选细菌表面抗原成分 (SBAC) 的例子包括: 各种肠杆菌 H (鞭毛成分) 抗原和 O (LPS) 抗原、伤寒沙门氏菌 Vi (荚膜多糖) 抗原、大肠杆菌 K 和 CFA (荚膜成分) 抗原、以及大肠杆菌菌毛粘附素抗原 (K88 和 K99)。合适的候选抗原蛋白的例子包括: 外膜蛋白 (Omp), 其也被称为孔蛋白 (Secundino 等, 2006, *Immunology* 117:59); 相关的孔蛋白, 如伤寒沙门氏菌铁调节的外膜蛋白 (IROMP,

Sood 等, 2005, *Mol Cell Biochem* 273:69-78) 和热休克蛋白 (HSP), 所述热休克蛋白包括(但不限于)伤寒沙门氏菌 HSP40(Sagi 等, 2006, *Vaccine* 24:7135- 7141)。合适的孔蛋白的非限定性的例子包括 OmpC 和 OmpF, 其在多种沙门氏菌属和大肠杆菌属的品种中有发现。在其它肠杆菌科中也发现有 OmpC 和 OmpF 的直系同源物(Orthologue), 并且该直系同源物是用于本发明的合适的候选抗原蛋白。此外, 基于肠杆菌科的孔蛋白中发现的序列的保守区域, Omp1B(弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*))、OmpC2(鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*))、OmpD(肠道沙门氏菌 (*S. enterica*))、OmpK36(肺炎克雷白氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*))、OmpN(大肠杆菌)和 OmpS(肠道沙门氏菌 (*S. enterica*))是合适的候选物(Diaz-Quinonez 等, 2004, *Infect. and Immunity* 72:3059-3062)。

还适合作为候选抗原的是金属转运蛋白, 例如: 大肠杆菌 SitABCD、MntH 和 FeoB 金属转运蛋白(Sabri 等, 2008, *Infect. Immun.* 76: 601-611; 在 2007 年 11 月 9 日印刷前电子出版)。

源自各种肠杆菌科的抗原蛋白的序列是本领域中已知的, 并且易于从国家生物技术信息中心 (NCBI) 维护的 Genbank 数据库中获取。例如: GenBank 登录号 P0A264 (SEQ ID NO:39; 亦见图 21A 所示)和 GenBank 登录号 NP_804453: OmpC(肠道沙门氏菌亚种 Ty2); GenBank 登录号 CAD05399 (SEQ ID NO:40; 亦见图 21B 所示): OmpF 前体蛋白(肠道沙门氏菌亚种 CT18); GenBank 登录号 16761195: OmpC(鼠伤寒沙门氏菌); GenBank 登录号 47797: OmpC(伤寒沙门氏菌); GenBank 登录号 8953564: OmpC(明尼苏达伤寒沙门氏菌); GenBank 登录号 19743624: OmpC(都柏林伤寒沙门氏菌); GenBank 登录号 19743622: OmpC(鸡伤寒沙门氏菌); GenBank 登录号 26248604: OmpC(大肠杆菌); GenBank 登录号 24113600: Omp1B(福氏志贺菌); GenBank 登录号 16764875: OmpC2(鼠疫杆菌); GenBank 登录号 16764916: OmpD(鼠伤寒沙门氏菌); GenBank 登录 151149831: OmpK36(肺炎克雷白氏杆菌); GenBank 登录号 3273514: OmpN(大肠杆菌); 以及 GenBank 登录号 16760442:

OmpS（伤寒沙门氏菌）。

在本发明的一个实施方案中，包含在 APS 中的抗原为蛋白抗原。该蛋白抗原可以是全长蛋白、基本上全长的蛋白（例如，N-端和/或C-端缺失约 25 个或更少的氨基酸的蛋白）、蛋白的抗原片段、或者它们的组合。在应用时，全长蛋白可以是蛋白的前体形式或蛋白的成熟（加工）形式。抗原片段可以包含一种或多种抗原表位，因此其长度的大小可以为数个氨基酸（例如，至少 4 个氨基酸）的肽至数百个氨基酸的多肽。在本发明的一个实施方案中，抗原片段的长度在约 4 个氨基酸至约 250 个氨基酸之间。在另一个实施方案中，抗原片段的长度在约 5 个氨基酸至约 200 个氨基酸之间。在其它的实施方案中，抗原片段的长度在约 5 个氨基酸至约 150 个氨基酸之间，在约 5 个氨基酸至约 100 个氨基酸之间，在约 5 个氨基酸至约 75 个氨基酸之间，在约 5 个氨基酸至约 70 个氨基酸之间，在约 5 个氨基酸至约 60 个氨基酸之间，以及在约 5 个氨基酸至约 50 个氨基酸之间。

在本发明的一个实施方案中，包含在 APS 中的抗原是全长或基本上全长的蛋白。在另一个实施方案中，包含在 APS 中的抗原是全长或基本上全长的孔蛋白。在另外的实施方案中，包含在 APS 中的抗原是全长或基本上全长的 OmpC 和/或 OmpF 蛋白，或全长或基本上全长的 OmpC 和/或 OmpF 的直系同源物。

如表 1 所示，伤寒沙门氏菌 OmpC 蛋白和源自其它肠杆菌科的 OmpC 直系同源物的序列高度保守。该序列在 *Salmonella* spp. 之间甚至更加高度保守（参见表 1）。同样，伤寒沙门氏菌 OmpF 蛋白和源自其它的沙门氏菌品种的 OmpF 直系同源物的序列高度保守（参见表 2）。因此，在本发明的一个实施方案中，包含在 APS 中的至少一个抗原是全长或基本上全长的 OmpC 或 OmpC 直系同源物，其具有与图 21A 所示的伤寒沙门氏菌 OmpC 蛋白序列[SEQ ID NO:39]至少约 75% 相同的氨基酸序列。在另一个实施方案中，包含在 APS 中的至少一个抗原是全长或基本上全长的 OmpC 或 OmpC 直系同源物，其具有与图 21A 所示的伤寒沙门氏菌 OmpC 蛋白序列[SEQ ID NO:39]

至少约 78%相同的氨基酸序列。在本发明的另一个实施方案中，包含在 APS 中的至少一个抗原是全长或基本上全长的 OmpC 或 OmpC 直系同源物，其具有与图 21A 所示的伤寒沙门氏菌 OmpC 蛋白序列 [SEQ ID NO:39]至少约 80%相同的氨基酸序列。

在本发明的另一个实施方案中，包含在 APS 中的至少一个抗原是全长或基本上全长的 OmpF 或 OmpF 直系同源物，其具有与图 21B 所示的伤寒沙门氏菌 OmpF 蛋白序列[SEQ ID NO:40]至少约 75%相同的氨基酸序列。在本发明的另一个实施方案中，包含在 APS 中的至少一个抗原是全长或基本上全长的 OmpF 或 OmpF 直系同源物，其具有与图 21B 所示的伤寒沙门氏菌蛋白 OmpF 序列[SEQ ID NO:40]至少约 78%相同的氨基酸序列。在本发明的另一个实施方案中，包含在 APS 中的至少一个抗原是全长或基本上全长的 OmpF 或 OmpF 直系同源物，其具有与图 21B 所示的伤寒沙门氏菌 OmpF 蛋白序列 [SEQ ID NO:40]至少约 80%相同的氨基酸序列。

在本发明的具体的实施方案中，包含在 APS 中的抗原是全长或基本上全长的伤寒沙门氏菌 OmpC 蛋白和/或 OmpF 蛋白。

表 1: OmpC 和源自多种肠杆菌科的 OmpC 直系同源物的序列同一性

有机体	蛋白	参考	同一性 % ¹
鼠沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>) LT2	OmpC	P0A263	100
邦戈尔沙门氏菌 (<i>Salmonella bongori</i>)	ORF_2828 (推定 OmpC)	<i>coliBase</i> ² : GL026809 ³	99
肠炎沙门氏菌 (<i>Salmonella enteritidis</i>) PT4	ORF_1402 (推定 OmpC)	<i>coliBase</i> ² : GL063386 ³	98
鸡沙门氏菌 (<i>Salmonella gallinarum</i>) 287/91	ORF_222 (推定 OmpC)	<i>coliBase</i> ² : GL064166 ³	98
大肠杆菌 O157: H7 EDL933	OmpC	Q8XE41	80
痢疾志贺菌 (<i>Shigella dysenteriae</i>)	ORF_14	<i>coliBase</i> ² :	78

M131649(M131)	(推定 OmpC)	GL018139 ³	
弗氏志贺菌 (<i>Shigella flexneri</i>) 2a 2457T	Omp1b	Q83QU7	78

¹ 同一性%相对于伤寒沙门氏菌 OmpC 蛋白 (GenBank 登录号 P0A264) 而言, 并且使用 BLASTP 2.2.3 [2002 年 4 月 24 日]程序来测定(Altschul, S.F 等, (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)。

²Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, Database issue D296-D299。

³2007 年 1 月 23 日的 GL 号。

表 2: OmpF 和源自多种肠杆菌科的 OmpF 直系同源物的序列同一性

有机体	蛋白	参考	同一性 % ¹
肠炎沙门氏菌 PT4	ORF_34	<i>coliBase</i> ² : GL060731 ³	100
鸡沙门氏菌 287/91	ORF_21	<i>coliBase</i> ² : GL069216 ³	99
鼠沙门氏菌 DT104	ORF_287	<i>coliBase</i> ² : GL0044362 ³	99
邦戈尔沙门氏菌	ORF_1160	<i>coliBase</i> ² : GL025398 ³	98
大肠杆菌 DH10B	ORF_2	<i>coliBBase</i> ² : GL037694 ³	58
弗氏志贺菌 2a 2457T	OmpF	Q83RY7	58

¹ 同一性%相对于伤寒沙门氏菌 OmpF 蛋白 (GenBank 登录号 CAD05399) 而言, 并且使用 BLASTP 2.2.3 [2002 年 4 月 24 日]程序来测定(Altschul, S.F.等, (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402)。

²Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, Database issue D296-D299。

³2007 年 1 月 23 日的 GL 号。

在可供选用的实施方案中, 包含在 APS 中的抗原是蛋白的抗原片段。上述蛋白的多个抗原区域已经被鉴定并且是用于本发明的 APS 的合适的候选抗原。例如, 外膜蛋白 (Omp) 的表面外露环构成了用

于包含在本发明的 APS 中的合适的候选抗原片段。从伤寒沙门氏菌分离的 OmpC 的环 6 (L6) 肽和环 7 (L7) 肽是候选抗原的非限定性例子。已经有伤寒沙门氏菌 OmpC 的 L6 肽和 L7 肽的序列的报导并分别鉴定为: GTSNGSNPST (SEQ ID NO:4)和 KDISNGYGASYGDQ (SEQ ID NO:5)(Paniagua-Solis 等, 1996, *FEMS* 141:31-36)。包含如 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 所列出的序列的全部或部分的抗原片段也是合适的候选物。例如, 具有序列 GTSNGSNPSTSYGFAN [SEQ ID NO:50]的孔蛋白片段 (其包含 L6 肽的关键氨基酸) 和具有序列 QSKGKDISNGYGASYGDQD [SEQ ID NO:54] 的孔蛋白片段 (其包含 L7 肽的关键氨基酸)。

其它的抗原性抗原表位也是已知的。例如, 除了 L6 肽和 L7 肽以外的 OmpC 的特异性片段可用作包含在本发明的 APS 中的候选抗原, 其包括: OmpC -73 肽[SEQ ID NO:6]和 OmpC- 132 肽[SEQ ID NO:7] (参见表 3) (Diaz-Quinonez 等, 2004, *Infect. and Immunity* 72:3059-3062)。这些肽的序列在不同的肠杆菌科细菌之间是高度保守的, 从而使这些肽适用作包含在 APS (希望使其用于多价疫苗) 中的候选抗原。其它抗原表位序列 (如 SEQ ID NO: 8、9 和 10) 的例子如表 3 所示。作为伤寒沙门氏菌特有的潜在 B 细胞抗原表位, 伤寒沙门氏菌 OmpC 蛋白的可变区也已经被鉴定 (Arockiasamy 和 Krishnaswamy, 1995, *J. Biosci*, 20:235-243) (参见表 3, SEQ ID NO:11、12、13、14、15、16、17 和 18)。包含这些区域的抗原片段也是包含在本发明的 APS 中的候选抗原。

表 3: 源自 OmpC 和其它肠杆菌科的孔蛋白的候选抗原表位的序列

蛋白	菌株	抗原表位序列	SEQ ID NO
OmpC	鼠伤寒沙门氏菌; 伤寒沙门氏菌; 明尼苏达伤寒沙门氏菌; 都柏林伤寒沙门氏菌;	TRVAFAGL	6

	鸡伤寒沙门氏菌 和大肠杆菌		
Omp1b	弗氏志贺菌	TRVAFAGL	6
OmpS	伤寒沙门氏菌	TRLAFAGL	9
OmpN	大肠杆菌	TRLAFAGL	9
OmpD	鼠伤寒沙门氏菌	TRLAFAGL	9
OmpC2	鼠疫耶尔森菌	TRLGFAGL	10
OmpK36	肺炎克雷白氏杆菌	TRLAFAGL	9
OmpC	鼠伤寒沙门氏菌； 伤寒沙门氏菌； 明尼苏达伤寒沙门氏菌； 都柏林伤寒沙门氏菌； 鸡伤寒沙门氏菌 和大肠杆菌	RNTDFFGL	7
Omp1b	弗氏志贺菌	RNSDFFGL	8
OmpS	伤寒沙门氏菌	RNTDFFGL	7
OmpN	大肠杆菌	RNTDFFGL	7
OmpD	鼠伤寒沙门氏菌	RNTDFFGL	7
OmpC2	鼠疫耶尔森菌	RNTDFFGL	7
OmpK36	肺炎克雷白氏杆菌	RNSDFFGL	8
OmpC (氨基酸 45-51)	伤寒沙门氏菌	SDDKGSD	11
OmpC (氨基酸 84-92)	伤寒沙门氏菌	NQTEGSNDS	12
OmpC (氨基酸 114-147)	伤寒沙门氏菌	NYGVITYDVTS WTDVLPE FGGDTYGADNF MQQRGN	13
OmpC (氨基酸 175-190)	伤寒沙门氏菌	GSVSGENTNGR SLLNQ	14

OmpC (氨基酸 218-236)	伤寒沙门氏菌	RTADQNNTANA RLYGNGDR	15
OmpC (氨基酸 262-282)	伤寒沙门氏菌	NATRFGTSNGS NPSTSYGFAN	16
OmpC (氨基酸 312-328)	伤寒沙门氏菌	DISNGYGASYG DQDIVK	17
OmpC (氨基酸 351-368)	伤寒沙门氏菌	NLLDKNDETRD AGINTDD	18

在本发明的一个实施方案中，APS 包含全长的 Omp 或含有数个上述的抗原表位的片段。在另一个实施方案中，抗原包含在变体之间保守的序列，例如，氨基酸 TRXXFAGL (SEQ ID NO: 19, 其中 X 可以是 V、L 或 G)，或氨基酸 RNXDFFGL (SEQ ID NO:20, 其中 X 可以是 T 或 S) 所限定的保守区域。

在本发明的一个实施方案中，所选的包含在 APS 中的至少一个抗原是孔蛋白抗原。根据另一个实施方案，至少一个抗原是整个孔蛋白。根据又一个实施方案，包含在 APS 中的候选抗原为 OmpC 和/或 OmpF 抗原。在另一个实施方案中，包含在 APS 中的候选抗原是 OmpC 肽或 OmpF 肽，例如：环 6 肽、环 7 肽、OmpC-73 肽或 OmpC-132 肽，或它们的变体。在另一个实施方案中，候选抗原包含与下面所列出的序列基本上相同的氨基酸序列或者它们的片段：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 或 SEQ ID NO:20。在另一个实施方案中，候选抗原包含与 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所列出的序列基本上相同的氨基酸序列或者它们的片段。

如上所述，所选抗原的大小可以变化并且所选抗原的大小对本发明的实施并非关键的。抗原可以是对于 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和巨噬细胞的表面结构、或者与细胞表面结构有关的 I 类或 II 类 APC

而言特异性的，或者被它们所识别。在一个实施方案中，本发明特别适用于小的免疫原性弱的抗原。所选的抗原应该不干扰 PapMV 或 PapMV VLP 的组装，或者不干扰 PapMV 或 PapMV VLP 免疫增强免疫应答的能力。本领域技术人员使用标准技术（例如下面的部分以及实施例中所述的那些）能够容易地从上述候选抗原中选出合适的抗原。

本发明的 APS 可以包含一种或多种抗原，各抗原均具有能够触发特异性免疫应答的单个抗原表位，或者该 APS 可以包含一种或多种抗原，其中各抗原包含多个抗原表位。APS 所包含的抗原可以是相同的，或者它们可以是不同的，并且当存在多个蛋白抗原时，它们可以源自单一一种蛋白或源自多种蛋白，包括源自多于一种类型的蛋白的抗原（例如，源自 Omp 和 HSP 的抗原）。还涵盖包含代表肠细菌抗原蛋白的组合（例如，源自多于一种肠细菌的抗原）的抗原的 APS，也涵盖包含源自蛋白的相同的保守区域、但是代表了不同的肠细菌中所见的蛋白的变体的抗原的 APS。

在本发明的一个具体的实施方案中，APS 包含在肠杆菌科的不同成员或者肠杆菌科的亚群之间保守的一种或多种抗原。例如，OmpC 或其片段，和/或 OmpF 或其片段。这样的抗原适合包含在打算用作多价疫苗的 APS 中。序列比较表明 OmpC/OmpF 和它们的肠细菌直系同源物之间高度保守（包括成段的相同的氨基酸）。事实上，在所有的沙门氏菌属中，OmpC 和 OmpF 显示了 98%-100% 的同一性（参见表 1）。这些蛋白与源自其它肠细菌（包括大肠杆菌、志贺菌属、肺炎克雷白氏杆菌和产气肠杆菌）的直系同源物的比较表明与源自伤寒沙门氏菌的蛋白序列具有 75%-85% 的同一性（参见表 2）。

本发明还涵盖了 APS 可以包含这样的抗原：该抗原为与一种或多种细菌表面抗原成分（SBAC）（例如，O 抗原）组合的整个蛋白或其片段。因此，根据一个实施方案，该 APS 包含一种或多种 SBAC 与一种或多种抗原蛋白、肽、或其片段的组合。

如上所述，本发明的 APS 可以包含一种或多种接合抗原或一种

或多种额外的分离抗原（AIA）。所述 AIA 可以与 APS 的接合抗原相同或不同。本发明涵盖接合抗原和 AIA 的各种组合，并且包括下面的非限定性的例子：源自第一肠细菌品种的一种或多种接合抗原和源自相同的肠细菌品种的一种或多种 AIA；源自第一肠细菌品种的一种或多种接合抗原和源自另一种肠细菌品种的一种或多种 AIA；一种或多种接合蛋白或蛋白片段抗原和一种或多种整个蛋白或蛋白片段的 AIA；一种或多种接合 SBAC 抗原和一种或多种 SBAC AIA；一种或多种接合蛋白或蛋白片段抗原和一种或多种 SBAC AIA（或反之亦然）；一种或多种接合的整个蛋白抗原和一种或多种整个蛋白 AIA；一种或多种接合的整个蛋白抗原和作为所述整个蛋白的肽的一种或多种 AIA。一种或多种接合抗原和 AIA 可以属于同一蛋白族（例如，Omp）或者它们可以属于不同的族（例如，Omp 和 HSP）。

在本发明的一个实施方案中，APS 包含一种或多种接合抗原和一种或多种作为整个蛋白的 AIA。根据另一个实施方案，至少一种 AIA 是整个的孔蛋白。根据另一个实施方案，至少一种 AIA 是 OmpC 或者 OmpF。在另一个实施方案中，至少一种 AIA 是 OmpC 的肽（例如，环 6 肽、环 7 肽、OMPC-73 肽、或 OMPC-132 肽、或者它们的变体）或 OmpF 的肽。在另一个实施方案中，至少一种 AIA 包含与下列序列基本上相同的氨基酸序列：SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19 或者 SEQ ID NO:20。在另一个实施方案中，由 APS 所包含的接合抗原和 AIA 是相同的。

抗原-PapMV 组合和抗原 PapMV-VLP 组合

如上所述，由 APS 所包含的一种或多种抗原可以与 PapMV 或 PapMV VLP 的外壳蛋白接合，或者它们可以以非接合的形式存在于 APS 中（即抗原与 PapMV 或 PapMV VLP 仅简单地组合），或者它们可以同时以接合和非接合的形式存在。接合可以通过（例如）抗

原与外壳蛋白发生基因融合来实现，或者通过共价、非共价或亲和方式结合来实现。但是，抗原与 PapMV 或 VLP 的组合不应影响宿主免疫系统对该抗原的识别或者不应影响 PapMV 或 VLP 增强免疫应答的能力。

根据本发明的一个实施方案，一种或多种抗原与 PapMV VLP 的外壳蛋白接合。由于 VLP 包含自组装外壳蛋白的多种拷贝，因此抗原与外壳蛋白的连接容许抗原以有组织的方式在 VLP 的表面上提呈。根据该实施方案，所述 VLP 包含这样的外壳蛋白，该外壳蛋白包括作为重组 PapMV 外壳蛋白的第一部分，所述第一部分与包含一种或多种抗原的第二部分接合。由于接合抗原的外壳蛋白保持了与其它融合外壳蛋白或野生型外壳蛋白组装而形成免疫原-载体 VLP 的能力，因此选择不会干扰上述能力的抗原用于接合。

为了容许抗原在 VLP 的表面上提呈并提高抗原的免疫识别性，优选使抗原与外壳蛋白的设置于 VLP 的外表面上的区域连接。因此可以将抗原插至邻近外壳蛋白的氨基-（N-）端或羧基-（C）端处或者与其连接，或者可以将其插至外壳蛋白的设置于 VLP 的外表面上的内环中或与其连接。这样的环的例子如 SEQ ID NO:1 所列的 PapMV 外壳蛋白的包含第 49 至 52 个氨基酸的区域。在本发明的一个实施方案中，抗原存在于 PapMV 外壳蛋白的 C-端。

根据本发明的一个实施方案，所述 APS 包含与一种或多种抗原基因融合的 PapMV 外壳蛋白。为了避免抗原可能干扰 PapMV 外壳蛋白-抗原融合而自组装成 VLP 能力，所选的用于与 PapMV 外壳蛋白基因融合的抗原长度通常小于约 50 个氨基酸。在本发明的一个实施方案中，所选的用于与 PapMV 外壳蛋白基因融合的抗原长度通常小于约 45 个氨基酸。

如下文更详细描述的那样，较大的抗原可以通过与 PapMV 或 VLP 的简单组合、或者通过化学交联或亲和连接而容易地包含在 APS 内。后一种连接方法能够促进抗原与 PapMV 的结合并且在施用给动物时产生针对抗原的改善的免疫应答。

在另一个实施方案中，通过共价或非共价的（例如，离子、疏

水、氢键等)连接方式使抗原与外壳蛋白化学交联。如本领域已知的那样,可以修饰抗原和/或外壳蛋白以促进这样的交联,例如,通过将官能团或化学部分添加至蛋白和/或抗原(例如在 C-端、或 N 端、或内部位置)中来实现。示例性的修饰包括:添加诸如 S-乙酰基巯基琥珀酸酐(SAMSA)或 S-乙酰基硫代乙酸酯(SATA)等官能团,或添加一种或多种半胱氨酸残基。其它的交联剂是本领域中已知的并且很多是市售可得的(例如,参见 Pierce Chemical 公司和 Sigma-Aldrich 公司的商品目录)。其例子包括(但不限于):二胺,例如 1,6-己二胺、1,3-丙二胺和 1,3-二氨基乙烷;二醛,例如戊二醛;琥珀酰亚胺酯,例如乙二醇-双(琥珀酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯)、二琥珀酰亚胺基戊二酸酯、二琥珀酰亚胺基辛二酸酯、N-(g-马来酰亚胺基丁酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯和乙二醇双(琥珀酰亚胺琥珀酸酯);二异氰酸酯,例如六亚甲基二异氰酸酯;双环氧乙烷,1,4-丁二醇二缩水甘油醚;二羧酸,例如琥珀酰二水杨酸酯;3-马来酰亚胺基丙酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯等等。上述交联剂中许多都含有将抗原与 VLP 隔开的间隔物。本发明亦涵盖使用其它间隔物。各种间隔物在本领域中是已知的,并且包括(但不限于):6-氨基己酸;1,3-丙二胺;1,3-二氨基乙烷;以及短的氨基酸序列,例如 1 至 5 个氨基酸的聚甘氨酸序列。

为了促进一种或多种抗原与 VLP 的外壳蛋白的共价连接,外壳蛋白可以与暴露于 VLP 表面的短肽或氨基酸连接子(amino acid linker)基因融合并提供用于抗原化学连接的合适位点。例如,包含半胱氨酸残基的短肽,或具有能够形成共价键的侧链的其他氨基酸残基(例如,酸性或碱性的残基)或者可以容易修饰而形成共价键的氨基酸残基在本领域内是已知的。所述氨基酸连接子或肽的长度可以(例如)在 1 个和约 20 个氨基酸之间。在一个实施方案中,所述外壳蛋白与含有一个或多个赖氨酸残基的短肽融合,所述短肽可通过使用上述的合适交联剂与(例如)抗原中的半胱氨酸残基共价结合。在一个具体的实施方案中,外壳蛋白与甘氨酸和赖氨酸残基的短肽序列融合。在另一个实施方案中,所述肽包含序列:GGKGG。

在本发明的另一个实施方案中，抗原通过存在于外壳蛋白表面上的亲和部分连接。根据该实施方案，PapMV VLP 包含亲和部分（例如肽），在自组装后所述亲和部分暴露于 VLP 表面并能够特异地结合抗原。所述亲和部分可以与 PapMV 或 VLP 基因融合（在肽或蛋白片段的情况下），或者与 PapMV 或 VLP 共价或非共价连接。抗原与亲和部分的结合不应干扰宿主免疫系统对抗原的识别。根据本发明的一个实施方案，所述 PapMV VLP 包含能够结合整个蛋白的亲和部分。根据本发明的另一个实施方案，所述 PapMV VLP 包含能够结合蛋白片段或肽的亲和部分。根据本发明的另一个实施方案，所述 PapMV VLP 包含能够结合细菌表面抗原成分（SBAC）的亲和部分。

在本发明的一个具体的实施方案中，提供包含 PapMV VLP 的 APS，所述 PapMV VLP 包含与孔蛋白结合的亲和肽。在本发明的另一个实施方案中，提供包含 PapMV VLP 的 APS，所述 PapMV VLP 包含与 OmpC 或 OmpF 结合的亲和肽。

合适的亲和部分的例子包括（但不限于）：抗体和抗体片段（例如 Fab 片段、Fab' 片段、Fab'-SH 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、双抗体、以及单链 Fv（scFv）分子）、链霉抗生物素蛋白（以结合生物素标记的抗原）、特异地结合抗原的亲和肽或蛋白片段。

可以通过本领域已知的技术（例如噬菌体或酵母展示技术）来选择用作亲和部分的合适的肽或抗体（包括抗体片段）。所述肽可以是天然存在的、重组的、合成的或者这些的组合。例如，所述肽可以是天然存在的蛋白或多肽的片段。术语“肽”还包括肽的类似物、肽的衍生物以及类肽化合物。这样的化合物是本领域中众所周知的，并且较天然存在的肽，其可以更有优势，包括（例如）：更好的化学稳定性、增强的耐蛋白降解性、提高的药理学性能（例如半衰期、吸收性、效价和效能）和/或降低的抗原性。

合适的肽的长度可以在约 3 个氨基酸至约 50 个氨基酸的范围内。根据本发明的一个实施方案，亲和结合肽的长度至少为 5 个氨基酸。根据本发明的另一个实施方案，亲和结合肽的长度至少为 7 个氨基酸。根据本发明的另一个实施方案，所述亲和结合肽的长度

在约 5 至约 50 个氨基酸之间。根据本发明的另一个实施方案，所述亲和结合肽的长度在约 7 至约 50 个氨基酸之间。在本发明的其它的实施方案中，所述亲和结合肽的长度在约 5 至约 45 个氨基酸之间，在约 5 至约 40 个氨基酸之间，在约 5 至约 35 个氨基酸之间，在约 5 至约 30 个氨基酸之间。根据本发明的具体的实施方案，所述亲和结合肽的长度为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个氨基酸。如本领域的技术人员将会理解的那样，所选的用于使抗原与亲和部分结合的肽的长度不应干扰 PapMV VLP 自组装的能力，或者一旦结合，其不应干扰宿主免疫系统识别抗原的能力。

PapMV 或 VLP 所包含的亲和部分可以是单个肽或者可以是肽的串联或重排。为了促进大的抗原的结合，如果需要，可以在亲和部分和外壳蛋白之间引入间隔物。合适的间隔物包括短的中性氨基酸（例如甘氨酸）片段。例如，约 3 个至约 10 个中性氨基酸的片段。

使用标准技术（例如，参见 *Current Protocols in Immunology*, ed. Coligan 等, J. Wiley & Sons, New York, NY）和/或市售可得的噬菌体展示试剂盒（例如，可得自 New England Biolabs 的 Ph.D. 系列试剂盒，和可得自 Novagen 公司的 T7-Select® 试剂盒），可以将噬菌体展示技术用于选择与目标抗原蛋白结合的特定肽。下面的实施例 VII 还提供了通过噬菌体展示技术来选择肽的例子。

表 4 示出了通过噬菌体展示技术鉴定的结合孔蛋白的代表性肽。本领域技术人员将理解，这些肽仅仅是例子，并且其它对目标孔蛋白具有亲和性的肽也可以容易地使用本领域已知的技术来鉴别。还涵盖表 4 中所列出的序列的保持结合孔蛋白能力的截断形式，其包含（例如）至少 4 个连续的氨基酸。根据本发明的具体的实施方案，提供包含 PapMV VLP 的 APS，所述 PapMV VLP 包含一种或多种亲和肽，所述亲和肽包含下面所列出的序列的全部或部分：SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25 或 SEQ ID NO:26。

表 4：通过噬菌体展示技术和亲和肽的频率来选择的亲和肽

靶	选择的亲和肽	SEQ ID NO
OmpC	SLSLIQT	21
OmpC	EAKGLIR	22
OmpC	TATYLLD	23
OmpF	FHENWPS	24
OmpF	FHEFWPT	25
OmpF	FHEXWPT，其中 X 是 N 或 F	26

APS 的制备

本发明提供 APS，所述 APS 包含 PapMV 或源自重组的 PapMV 外壳蛋白的 PapMV VLP。本发明还提供重组的 PapMV VLP，所述重组的 PapMV VLP 包含与外壳蛋白基因融合的一种或多种抗原或亲和部分。这些重组的外壳蛋白能够多聚化并组装成 VLP。下文和实施例中描述了使抗原或用于连接抗原的亲和肽和外壳蛋白基因融合的方法。将各种分子与蛋白化学交联的方法是本领域中众所周知的并可以使用。

番木瓜花叶病毒

PapMV 是本领域中已知的，并且可以以 ATCC No. PV-204™ 得自（例如）美国典型培养物保藏中心（ATCC）。该病毒可以依照标准程序（例如，参见 Erickson, J. W. & Bancroft, J. B., 1978, *Virology* 90:36-46）保存在宿主植物（例如番木瓜（*Carica papaya*）和金鱼草（*Antirrhinum majus*））中并从其中纯化。

PapMV VLP

本领域的技术人员可以采用野生型蛋白的序列，通过标准的基因工程技术容易地制得用于制备本发明的 VLP 的重组外壳蛋白。蛋白基因工程的方法是本领域中已知的（例如，参见 Ausubel 等. (1994

& updates) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York), 并且野生型 PapMV 外壳蛋白的序列也是已知的(参见 SEQ ID NO: 1 和 2)。

可以使用标准技术(参见, 例如, Ausubel 等, *ibid.*) 实现编码野生型蛋白的核酸序列的分离和克隆。例如, 可以通过以下的方法从 PapMV 中直接获得核酸序列, 所述方法为: 通过标准方法提取 RNA, 然后从 RNA 模板合成 cDNA (例如, 通过 RT-PCR 实现)。PapMV 可以通过标准技术从感染的植物叶子(其表现出花斑症状)提纯(例如, 参见下文提供的实施例 I)。

然后将编码外壳蛋白的核酸序列直接插入到合适的表达载体或经过一个或多个亚克隆步骤后插入到合适的表达载体。本领域技术人员将会理解, 所用的精确的载体并非本发明的关键。合适的载体的例子包括(但不限于): 质粒、噬粒(phagemid)、柯斯质粒(cosmid)、噬菌体、杆状病毒、逆转录病毒或 DNA 病毒。然后可以按照下面更详细描述的方法将该外壳蛋白表达和纯化。

可供选用的另外一种方式是, 通过本领域中已知的标准体外定点突变技术, 可以进一步改造编码外壳蛋白的核酸序列以引入一个或多个突变(例如前面描述的那些)。可以通过一个或多个组成编码序列的合适核苷酸的缺失、插入、置换、逆转或其组合来引入突变。例如, 这可以通过基于 PCR 的技术实现上述过程, 为此, 应设计包含错配、插入或缺失一个或多个核苷酸的引物。突变的存在可以通过多种标准技术来验证, 例如通过限制性分析法或通过 DNA 测序法来验证。

如上所述, 还可以改造外壳蛋白以产生包含一种或多种抗原或亲和肽(其与外壳蛋白融合)的融合蛋白。制备融合蛋白的方法是本领域技术人员所熟知的。可以将编码融合蛋白的 DNA 序列插入如上所述的合适的表达载体。

本领域普通技术人员将会理解, 可以以诸多方式改变编码外壳蛋白或融合蛋白的 DNA 而不影响编码的蛋白的活性。例如, DNA 序列的变化可以优化用于表达蛋白的宿主细胞内的优先密码子, 或

可以含有其它的有利于表达的序列改变。

本领域技术人员将会理解，表达载体还可以包含有效转录编码外壳蛋白或融合蛋白的 DNA 序列所需要的调节元件，例如转录元件。可以包含于载体中的调节元件的例子包括（但不限于）：启动子、增强子、终止子和多聚腺苷酸化信号。因此，本发明提供包含调节元件的载体，所述调节元件与编码经基因改造的外壳蛋白的核酸序列操作地连接。本领域技术人员将会理解，合适的调节元件的选择取决于用于表达基因改造的外壳蛋白所选的宿主细胞，并且上述调节元件可以来自多种来源，其包括细菌、真菌、病毒、哺乳动物或昆虫的基因。

在本发明的上下文中，所述表达载体可以额外地含有有利于表达的蛋白纯化的异源核酸序列。这种异源核酸序列的例子包括（但不限于）：亲和标记物（例如金属亲和标记物、组氨酸标记物）、编码抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白的序列、编码谷胱甘肽-S-转移酶（GST）的序列和编码生物素的序列。在使用前，可以根据本领域中已知的技术，将所述异源核酸序列编码的氨基酸从表达的外壳蛋白中除去。可供选用的另外一种方式是，如果对应于异源核酸序列表达的氨基酸不干扰随后组装成 VLP，可以将其保留在外壳蛋白。

在本发明的一个实施方案中，外壳蛋白被表达为组氨酸标记的蛋白。所述组氨酸标记物可以位于外壳蛋白的羧基端或氨基端。

可以通过本领域中已知的各种方法之一将表达载体引入合适的宿主细胞或组织。这样的方法通常可以在 Ausubel 等(*ibid.*)中具有描述，并且包括（例如）：稳定或瞬时转染法、脂质转染法、电穿孔法和重组病毒载体感染法。本领域技术人员将会理解，用于表达外壳蛋白的合适的宿主细胞的选择取决于所选的载体。宿主细胞的例子包括（但不限于）：细菌、酵母、昆虫、植物和哺乳动物细胞。精确的宿主细胞并非本发明的关键。所述外壳蛋白可以在原核宿主（例如，大肠杆菌、杀鲑气单胞菌或枯草杆菌）或在真核宿主（例如，拟酵母菌(*Saccharomyce*)或毕赤酵母属(*Pichia*)；哺乳动物细胞，如 COS、NIH3T3、CHO、BHK、293 或 HeLa 细胞；昆虫细胞或植

物细胞)中制备。

如果需要,可以通过本领域中已知的标准技术从宿主细胞中纯化外壳蛋白(例如,参见 *Current Protocols in Protein Science*, ed. Coligan, J.E.等, Wiley & Sons, New York, NY),并使用完整的蛋白或其蛋白水解片段通过标准的肽测序技术进行测序以证实蛋白的同一性。

本发明的重组外壳蛋白能够多聚化并组装成 VLP。一般而言,组装在表达外壳蛋白的宿主细胞中发生。可以通过标准技术(例如下文的实施例部分提供的那些)从宿主细胞中分离 VLP。可以通过标准技术(例如层析技术)进一步纯化 VLP,以去除污染的宿主细胞蛋白或其它化合物(例如 LPS)。在本发明的一个实施方案中,所述 VLP 被纯化以去除 LPS。

在本发明的一个实施方案中,所述外壳蛋白在宿主细胞中组装以提供重组病毒并且能够用于制备包含核酸和融合蛋白的感染性病毒颗粒。这可以使感染性病毒颗粒能够感染邻近的细胞并在其中表达融合蛋白。在该实施方案中,用于复制病毒的宿主细胞可以是容许病毒复制的植物细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞或细菌细胞。该细胞可以是用于病毒(病毒样颗粒源于该病毒)的天然的宿主细胞,但这并不是必需的。宿主细胞可以用颗粒形式的病毒(即,包含核酸和蛋白的组装的棒)或可供选用的核酸形式的病毒(即, RNA, 如病毒 RNA; cDNA 或由 cDNA 制备的失控转录物)初始感染,条件是用于初始感染的病毒核酸能够复制并产生具有嵌合蛋白的整个病毒颗粒。

重组和修饰的外壳蛋白的特征

可以通过标准技术,例如,通过电子显微镜观察纯化的蛋白(例如,参见实施例 I),来分析重组外壳蛋白和共价连接有抗原或亲和肽的外壳蛋白的多聚化并自组装成 VLP 的能力。此外,可以使用超速离心将 VLP 分离为粒状沉淀,而将较小的聚集物(20 聚体和更小的聚集物)留在上清液中,并且可以使用圆二色(CD)光谱来比较

重组或修饰的蛋白与 WT 病毒的二级结构（例如，参见实施例 I）。

如果需要，可以通过本领域中已知的技术测定 VLP 和 PapMV 的稳定性，所述技术例如为 SDS-PAGE 法和蛋白酶 K 降解分析法（参见实施例 II）。根据本发明的一个实施方案，本发明的 PapMV 和 PapMV VLP 在高温下是稳定的，并且能够在室温下容易地贮藏。

PapMV 或 VLP 贮备物的制备

可以通过标准技术制备重组 PapMV 或 VLP 的贮备物。例如，含有重组外壳蛋白的 PapMV 或假病毒可以在合适的宿主（例如番木瓜或金鱼草）中增殖，使得可以收获足够的 PapMV 或假病毒。

可以从合适的宿主细胞（例如大肠杆菌）中制备 PapMV VLP 贮备物，所述合适的宿主细胞被表达载体或编码组成 VLP 的重组外壳蛋白的载体转化或转染。然后按照本领域中已知的那样，将所述宿主细胞在适于编码的蛋白表达的条件下培养。所表达的外壳蛋白在宿主细胞中多聚化并组装成 VLP，并可以通过标准技术从细胞中分离（例如，通过将细胞裂解并使细胞裂解液进行一个或多个层析纯化步骤）。

如下文提供的实施例所示的那样，PapMV VLP 是稳定的结构，因此 VLP 贮备物可以容易地在室温下或冰箱中贮藏。

效能评价

为了评价本发明的 APS 作为疫苗的效能，可以进行攻击研究。该研究涉及通过标准技术将几组测试动物（例如小鼠）接种本发明的 APS。平行地制备包含未接种动物和/或接种市售可得的疫苗的对照组、或其它阳性对照。在接种后的合适的一段时间，用合适的肠细菌攻击动物。采集接种之前和之后以及攻击之后的动物血样，然后分析针对病毒的抗体应答。抗体应答的合适的测试方式包括（但不限于）：免疫印迹分析法和酶联免疫吸附测定法（ELISA）。

还可以通过本领域中已知的技术（包括下面提供的实施例中描述的那些）来评价细胞免疫应答。例如，在体外和体内通过树突状

细胞将在 PapMV VLP 上表达的抗原表位处理并交叉提呈至特异性 T 淋巴细胞。用于评价细胞 (T 淋巴细胞) 免疫的诱导的其它有用的技术包括: (例如) 通过 ELISA 监测 T 淋巴细胞的增殖和 IFN- γ 分泌物的释放, 以监测细胞因子的诱导 (参见实施例 III)。

疫苗组合物

本发明提供适于用作治疗或预防肠细菌感染的疫苗的组合物, 所述组合物包含一种或多种本发明的 APS 以及一种或多种无毒的可药用的载体、稀释剂和/或赋形剂。如果需要, 可以在该组合物中包含其它的活性成分、佐剂和/或免疫增强剂。

该组合物可以被配制为适合于各种途径施用。例如, 该组合物可以被配制为用于口服、局部施用、鼻腔施用、直肠施用、或胃肠外施用, 包括吸入或喷雾施用。本文使用的术语“胃肠外”包括: 皮下注射、静脉注射、肌肉注射、鞘内注射 (intrathecal injection)、胸骨内注射 (intrasternal injection) 或输注技术。在本发明的一个实施方案中, 该组合物被配制为用于局部施用、直肠施用或胃肠外施用、或通过吸入或喷雾而施用。在本发明的另一个实施方案中, 该组合物被配制为胃肠外施用。

所述组合物优选包含有效量的一种或多种本发明的 APS。本文所用的术语“有效量”是指表现出可检测的免疫应答所需要的 APS 的量。对于给定的指标, 可以用 (例如) 细胞培养测定或者动物模型 (通常为啮齿动物、兔、犬、猪或灵长类) 来最初估测 APS 的有效量。所述动物模型还可以用于确定施用的合适浓度和途径。然后这样的信息可以用于确定对要治疗的动物 (包括人) 施用的有用剂量和施途径。在本发明的一个实施方案中, 单位剂量包含约 10 μ g 至约 10 mg 的外壳蛋白。在另一个实施方案中, 单位剂量包含约 10 μ g 至约 5 mg 的外壳蛋白。在另外的实施方案中, 单位剂量包含约 40 μ g 至约 2 mg 的外壳蛋白。可以使用一种或多种剂量免疫动物, 并且这些剂量可以在同一天施用或在数天或数周的期间内施用。

如上所述, 本发明的 APS 可以包含多个抗原 (接合和/或非接合

的形式），并因此单一一种 APS 可以提供多价疫苗制剂。还可以通过使用包含在肠杆菌科的不同品种之间保守的抗原（接合和/或非接合的形式）的 APS 来提供多价疫苗。还涵盖包含多种 APS 的多价疫苗组合物，其中各 APS 包含不同的抗原。多价疫苗可用于（例如）提供针对肠杆菌科的多于一个品种的防护。除了具有更高价的疫苗以外，多价疫苗制剂还包括二价制剂和三价制剂。本发明的一个实施方案提供一种多价疫苗。本发明的另一个实施方案提供一种包含在多个肠杆菌科的品种之间保守的抗原的多价疫苗。另一个实施方案提供这样一种多价疫苗，该多价疫苗包含多个（即 2 个或更多个）APS，各 APS 包含不同的抗原。在本发明的另一个实施方案中，提供这样一种多价疫苗，该多价疫苗包含含有接合的 OmpC 或 OmpF 抗原和非接合的 OmpC 或 OmpF 抗原的 APS。

包含多个（即 2 个或更多个）APS（各 APS 包含不同的抗原）的疫苗制剂由于在制剂中具有更高数目的抗原表位，因此可以提供增强的保护作用。因此本发明的一个实施方案提供包含 2 个或更多个 APS 的疫苗制剂，各 APS 包含不同的抗原。在另一个实施方案中，提供这样一种疫苗制剂，该疫苗制剂包含含有 OmpC 抗原的 APS 和含有 OmpF 抗原的 APS。在一个具体的实施方案中，疫苗制剂所包含的 2 个或更多个 APS 既包含接合抗原，又包含非接合抗原。

用于口服使用的组合物可以被配制为（例如）片剂、锭剂（troche）、糖锭（lozenge）、水性或油性悬浮液、分散性粉末剂或颗粒剂、乳剂、硬胶囊剂或软胶囊剂、或糖浆剂、或酞剂。所述组合物可以根据本领域中已知的用于制备药物组合物的标准方法来制备，并且可以含有选自由甜味剂、调味剂、着色剂以及防腐剂所组成的组中的一种或多种试剂，以提供药学上美观和可口的制剂。片剂含有与合适的无毒的可药用的赋形剂混合的 APS，所述赋形剂包括（例如）：惰性稀释剂，例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠；成粒剂和崩解剂，例如玉米淀粉或海藻酸；粘合剂，例如淀粉、明胶或阿拉伯胶；以及润滑剂，例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。所述片剂可以是无包衣的，或者它们可以通过已知的技术包

衣以延缓在胃肠道中的分解和吸收，从而在延长的时间内提供持续的作用。例如，可以使用诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯等延时材料。

用于口服使用的组合物还可以表现为硬明胶胶囊的形式，其中所述 APS 与惰性固态稀释剂（例如，碳酸钙、磷酸钙或高岭土）混合；或表现为软明胶胶囊的形式，其中活性成分与水介质或油介质（例如，花生油、液态石蜡或橄榄油）混合。

用于鼻腔施用的组合物可以包括（例如）：鼻腔喷雾剂、滴鼻剂、悬浮液、溶液、凝胶剂、膏剂、乳膏和粉剂。该组合物被配制为用于通过合适的市售可得的鼻腔喷射装置（例如，Accuspray™（得自 Becton Dickinson 公司））施用。其它的鼻腔施用方法是本领域中已知的。

配制为水性悬浮液的组合物含有与一种或多种合适的赋形剂混合的 APS，所述赋形剂例如为：悬浮剂，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基-β-环糊精、黄耆胶以及阿拉伯胶；分散剂或润湿剂，例如天然存在的磷脂（例如卵磷脂），或者环氧烷烃与脂肪酸的缩合产物（例如，聚氧乙烯硬脂酸酯），或者环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物（例如十七碳乙氧基十六醇（hepta-decaethyleneoxycetanol）），或者环氧乙烷与源自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物（例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯），或者环氧乙烷与源自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物（例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯）。所述水性悬浮液还可以含有一种或多种防腐剂（例如对羟基苯乙酯、或对羟基苯甲酸正丙酯）、一种或多种着色剂、一种或多种调味剂或者一种或多种甜味剂（例如蔗糖或糖精）。

可以通过将 APS 悬浮于植物油（如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油）或矿物油（如液体石蜡）中而将组合物配制成油性悬浮液。油性悬浮液可含有增稠剂，例如蜂蜡、硬石蜡或十六醇。可以任选地添加将上述的甜味剂和/或调味剂以提供可口的口服制剂。可通过添加抗氧化剂（例如抗坏血酸）来使这些组合物保存。

所述组合物可以配制为分散性粉末剂或颗粒剂，所述粉末剂或颗粒剂随后可通过加水而制备水性悬浮液。这些分散性粉末剂或颗粒剂提供了与一种或多种分散剂或湿润剂、悬浮剂和/或防腐剂混合的 APS。合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂示例为上文所提到的那些。在这些组合物中，还可以包含其它赋形剂，例如甜味剂、调味剂以及着色剂。

本发明的组合物还可以配制成水包油型乳剂。油相可以是植物油（如橄榄油或花生油）、或矿物油（如液体石蜡）、或可以是这些油的混合物。这些组合物中所包含的合适乳化剂包括：天然存在的树胶，如阿拉伯树胶或黄蓍胶；天然存在的磷脂，如大豆、卵磷脂；或衍生自脂肪酸和己糖醇、酐的酯或偏酯，例如脱水山梨糖醇单油酸酯，以及所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物，例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。所述乳剂还可任选地含有甜味剂和调味剂。

可通过将 APS 与一种或多种甜味剂（例如甘油、丙二醇、山梨糖醇或蔗糖）组合而将所述组合物配制成糖浆剂或酏剂。这些制剂还可任选地含有一种或多种缓和剂（demulcent）、防腐剂、调味剂和/或着色剂。

可根据本领域已知的方法并使用上述合适的一种或多种分散剂或润湿剂和/或悬浮剂将所述组合物配制为无菌注射水性悬浮液或油性悬浮液。无菌注射制剂可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂（例如 1,3-丁二醇）中的无菌注射溶液或悬浮液。所用的可接受载体和溶剂包括（但不限于）：水、林格氏溶液（Ringer's solution）、乳酸盐林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。其它例子包括常规用作溶剂或悬浮介质的无菌非挥发性油，以及多种刺激性小的非挥发性油（包括（例如）合成的单甘油酯或二甘油酯）。诸如油酸等脂肪酸也可以用于注射剂的制备。

本发明的组合物可以任选地含有：防腐剂，如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体；和/或稳定剂，如碳水化合物（例如山梨糖醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、葡萄糖或葡聚糖）、蛋白（例如白蛋白或酪蛋白）或含有蛋白的试剂（例如胎牛血清或脱脂牛奶）；

以及合适的缓冲液（例如磷酸盐缓冲液）。可以根据熟知的参数来调节该组合物的 pH 和各种组分的具体浓度。

此外，可以任选地将具有佐剂活性的一种或多种化合物添加至疫苗组合物。合适的佐剂包括（例如）：明矾佐剂（例如氢氧化铝、磷酸盐或氧化物）；油-乳液（例如 Bayol F®或 Marcol52®）；皂角苷、或维生素 E 溶解物（solubilisate）。已知病毒颗粒也具有佐剂的性质（Adjuvant and Antigen Delivery Properties of Virosomes, Glück, R 等, 2005, *Current Drug Delivery*, 2:395-400），并且可以与本发明的 APS 联用。

如本文中以上所述和指出的，PapMV 和 PapMV VLP 具有佐剂性质。因此，在本发明的一个实施方案中，所述疫苗组合物包含额外的 PapMV 或 PapMV VLP 作为佐剂。在一些实施方案中，使用 PapMV 或 PapMV VLP 可以提供超过市售可得的佐剂的优点，因为已经观察到，当通过注射施用，PapMV 或 PapMV VLP 不会引起明显的局部毒性。

本发明还包括经调理的疫苗组合物，例如，该疫苗组合物包含由以前免疫过疫苗、抗原或 PapMV VLP 的动物或人体中分离的抗体。基于由以前免疫过疫苗、抗原或 PapMV VLP 的动物或人体中分离的抗体的重组抗体也可以用于调理该疫苗组合物。

本发明还包括含有本发明的 APS 的疫苗组合物和市售可得的肠细菌疫苗的组合。这种疫苗包括 Vi 和 Ty21a 伤寒疫苗。

其它的药物组合物和制备药物组合物的方法是本领域中已知的并（例如）在文献“*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*”（以前为“*Remingtons Pharmaceutical Sciences*”）；Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA（2000）中有所描述。

疫苗稳定性

如前文和本文提供的实施例所述，PapMV VLP 是稳定的结构，因此提供稳定的疫苗组合物。源自伤寒沙门氏菌的孔蛋白在冰箱或室温下亦表现出长期的稳定性（例如，参见下面的实施例 XIII 和图

30)。因此，本发明的一个实施方案提供一种疫苗组合物，所述疫苗组合物含有 PapMV、或 PapMV VLP 以及一种或多种伤寒沙门氏菌孔蛋白，其中，在不存在常规的防腐剂或存在少量的合适去污剂的情况下，所述疫苗组合物在冰箱中（例如，约 1℃至约 10℃）、在较长的时间（例如六个月或更长）内是稳定的。在另一个实施方案中，本发明提供一种疫苗组合物，所述疫苗组合物含有 PapMV、或 PapMV VLP 以及一种或多种伤寒沙门氏菌孔蛋白，所述疫苗组合物在冰箱中、在至少 6 个月至约 36 个月内是稳定的。在另一个实施方案中，本发明提供一种疫苗组合物，所述疫苗组合物含有 PapMV、或 PapMV VLP 以及一种或多种伤寒沙门氏菌孔蛋白，所述疫苗组合物在冰箱中在约 5 年内是稳定的。在另一个实施方案中，本发明提供一种疫苗组合物，所述疫苗组合物含有 PapMV、或 PapMV VLP 以及一种或多种伤寒沙门氏菌孔蛋白，其中在不存在常规的防腐剂或存在少量的合适去污剂的情况下，所述疫苗组合物在常温下在至少 1 个月至 6 个月内是稳定的。

应用和用途

本发明提供了本文描述的 APS 的多种应用和用途。非限定性的例子包括将 APS 作为针对一种或多种肠细菌感染的疫苗的用途，以及将 APS 用于筛选针对肠细菌的抗体的用途。因此本发明还提供在动物内诱导针对一种或多种肠细菌抗原的免疫应答的方法。此外，本发明的 APS 用于制备药物（例如佐剂、疫苗和/或药物组合物）的用途也在本发明的范围内。

本发明的 APS 适合用于人类和非人类动物，包括家畜和农畜。APS 的施用方案不必与任何其它通常可接受的接种程序不同。可以以足以产生有效的免疫应答的量而单次施用 APS，或者可供选用的另外一种方式是，可以使用其他的方案，其中在初始施用 APS 后，只用抗原或用 APS 进行加强。类似地，在初始施用后，如果抗体效价落在可接受的水平以下，可以用 APS 或抗原进行加强。

当 APS 包含非接合的抗原时，根据需要免疫应答的受试者的需

要，PapMV 或 VLP 组分可以与抗原同时施用，或者其可以在施用抗原之前或之后施用。

本发明的一个实施方案提供包含 APS 的疫苗和常规的肠细菌疫苗（例如 Vi 或 Ty21a 伤寒疫苗）的联用。根据该实施方案，所述 APS 疫苗可以与常规的疫苗同时施用（例如，通过联用两种组合物来实现），或者其可以在施用常规的疫苗之前或之后施用。

本发明的一个实施方案提供所述 APS 作为人用肠细菌疫苗的用途。本发明的另一个实施方案提供所述 APS 作为针对下列菌属的品种植种的人用肠细菌疫苗的用途：埃希氏菌属、沙门氏菌属、耶尔森菌属、志贺菌属、变形杆菌属、克雷白氏杆菌属、或肠杆菌属。本发明的又一个实施方案提供所述 APS 作为针对下列属种的人用肠细菌疫苗的用途：沙门氏菌属种、大肠杆菌、耶尔森菌属种、志贺菌属种、克雷白氏杆菌属种、或肠杆菌属种。另一个实施方案提供所述 APS 作为针对下列属种的人用肠细菌疫苗的用途：沙门氏菌属种、大肠杆菌、或志贺菌属种。用于所述用途的 APS 包含选自孔蛋白抗原、HSP 抗原和 SBAC 抗原中的一种或多种抗原。

根据所述 APS 中包含的抗原，所述疫苗用于治疗 and/或预防肠细菌引起的疾病和病症，例如伤寒、食源性胃肠炎、食源性肠道感染、尿路感染、脑膜炎、败血症、细菌性痢疾、瘟疫、小肠结肠炎、肺炎、血流感染、医源性感染、和革兰氏阴性菌败血症。

在本发明的一个实施方案中，所述 APS 包含一种或多种 OmpC 抗原、OmpF 抗原、源自 OmpC 直系同源物的抗原、或源自 OmpF 直系同源物的抗原。本发明的一个实施方案提供 APS 作为针对各种沙门氏菌属种、大肠杆菌和志贺菌属种的肠细菌疫苗的用途，所述 APS 包含一种或多种 OmpC 和/或 OmpF 抗原、或其直系同源物。在本发明的一个具体的实施方案中，提供包含 OmpC 或其直系同源物的 APS 单独地、或与包含 OmpF 或其直系同源物的 APS 联用作为多价疫苗的用途。

本发明的另一个实施方案提供 APS 作为针对伤寒沙门氏菌和用于治疗或预防人伤寒的疫苗的用途。在一个实施方案中，所述疫苗

既适用于成人，也适用于儿童。在本发明的一个具体的实施方案中，提供一种用作人用伤寒疫苗的 APS，所述 APS 包含至少一种源自伤寒沙门氏菌的孔蛋白的抗原。如上所述，所述 APS 可以任选地包含一种或多种 AIA（所述 AIA 为孔蛋白抗原）和/或源自不同的伤寒沙门氏菌的细菌成分（即源自其它蛋白，如 HSP；和/或源自 SBAC）的抗原。在一个具体的实施方案中，提供包含 OmpC 或其直系同源物的 ASP 单独地或与包含 OmpF 或其直系同源物的 ASP 联用作为伤寒疫苗的用途。在本发明的另一个实施方案中，提供一种 APS 作为人伤寒疫苗的用途，所述 APS 包含至少一种氨基酸序列基本等同于下述序列中的任意一种的抗原：SEQ ID NO：4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20、或者它们的变体。在另一个实施方案中，提供一种 APS 作为人伤寒疫苗的用途，所述 APS 包含至少一种氨基酸序列基本等同于 SEQ ID NO：4、或 5、或者它们的变体的抗原。

本发明的可供选用的另外一种实施方案提供所述 APS 作为非人类动物（例如奶牛、猪、马、山羊、绵羊、犬、猫、鸡、鸭、火鸡、非人类的灵长类、豚鼠、兔、雪貂、大鼠、仓鼠、小鼠、鱼或禽）的肠细菌疫苗的用途。该疫苗可用于治疗和/或预防肠细菌疾病或病症，例如，呼吸系统疾病、肠炎、腹膜炎、膀胱炎和其它泌尿生殖道感染、全身性大肠杆菌病、牛腹泻、水肿、乳腺炎、淋巴结炎、肠炎、败血性流产、子宫炎、肺炎、腹泻、死胎、羊毛损伤、和败血症。

对于在非人类动物中的用途，所述 APS 可以包含上文鉴定的人用的一种或多种抗原，其包括（但不限于）：OmpC 抗原、OmpF 抗原、HSP 抗原和 SBAC 抗原。在本发明的另一个实施方案中，提供 APS 在非人类动物中作为肠细菌疫苗的用途，其中所述肠细菌疫苗针对医学相关的肠杆菌科中的一种或多种菌种。上述菌种的例子包括（例如）：在灵长类动物中的肺炎克雷白氏杆菌、假结核耶尔森菌、志贺菌属种、大肠杆菌、沙门氏菌属种；在猫和犬中的大肠杆菌和变形杆菌属种；在马中的伤寒沙门氏菌、新港沙门氏菌、鸭沙

门氏菌和肺炎克雷白氏杆菌；在禽中的大肠杆菌、肠道沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌和鸡沙门氏菌；在绵羊中的大肠杆菌、流产沙门氏菌、伤寒沙门氏菌和都柏林沙门氏菌；在奶牛中的大肠杆菌、沙雷氏菌属种、克雷白氏杆菌属种、弗氏柠檬酸杆菌、都柏林沙门氏菌和伤寒沙门氏菌；在猪中的大肠杆菌、肺炎克雷白氏杆菌、小肠结肠炎耶尔森菌、猪霍乱沙门氏菌、猪伤寒沙门氏菌、鼠沙门氏菌和德尔卑沙门氏菌；以及在鱼中的鲁氏耶尔森菌、迟缓爱德华菌、和鲶鱼爱德华菌。

如本文所指出, PapMV VLP 能够增强针对抗原的体液和/或 CTL 应答。因此, 在本发明的一个实施方案中, 提供一种包含 APS 的疫苗, 所述 APS 包含能够产生体液应答和/或 CTL 应答的伤寒沙门氏菌抗原。

本发明还提供所述 APS 作为筛选试剂的用途, 例如, 筛选肠细菌 (例如伤寒沙门氏菌) 的抗体。所述 APS 可以容易地适用于常规的免疫技术 (例如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或免疫印迹分析), 因此可用于诊断和研究的领域中。

试剂盒

本发明还提供包含一种或多种用作肠细菌疫苗的 APS 的试剂盒。在一个实施方案中, 本发明提供包含一种或多种用作针对伤寒的疫苗的 APS 的试剂盒, 所述 APS 包含伤寒沙门氏菌抗原。所述试剂盒的单独的组分被封装在单独的容器中, 并且这种容器可附带监管药品或生物制品的生产、使用或销售的政府机构规定形式的通知书, 该通知书反映了政府机构对生产、使用或销售的许可。该试剂盒可以可任选地包含列出疫苗的使用方法或施用方案的说明或指导。

当试剂盒的一种或多种组分以溶液 (例如水溶液或无菌水溶液) 形式提供时, 容器构件本身可以是吸入器、注射器、吸量管、眼滴管或其他类似的装置, 所述溶液可以从这些装置中施用给受试者或用于与试剂盒内的其它组分混合。

所述试剂盒的组分还可以以干燥或冻干形式提供，并且所述试剂盒还可另外含有用于冻干组分的还原的合适溶剂。不管容器的数量或类型如何，本发明的试剂盒还可含有辅助组合物施用给受试者的工具。这种工具可以是吸入器、注射器、吸量管、镊子、测量勺、眼滴管或类似的医学上批准的递送载体。

本发明还提供了包含用于抗体检测的本发明的一种或多种 APS 的筛选试剂盒。该试剂盒可以是诊断试剂盒或用于研究目的的试剂盒。所述试剂盒的单独的组分封装在单独的容器中，并且这种容器可附带监管生物制品的生产、使用或销售的政府机构规定形式的通知书，该通知书反映了政府机构对生物制品的生产、使用或销售的许可。该试剂盒可以可任选地包含列出疫苗的使用方法或施用方案的说明或指导。

为了更好地理解本文所述的发明而给出了下面的实施例。应当理解，这些实施例旨在描述本发明的示例性实施方案，并且无意于以任何方式限制本发明的范围。

实施例

实施例 I：突变对 RNA 结合和 PapMV 外壳蛋白的自组装的影响

按照文献 Tremblay, M-H.等, 2006, *FEBS J.*, 273:14-25 所列的方法，使用 PapMV 外壳蛋白 (CP Δ N5；如 SEQ ID NO:3 所示) 制备一系列突变体，所述 PapMV 外壳蛋白具有在 2 位处插入的丙氨酸，并且其 N-端的 5 个氨基酸被从 WT 序列中删除。根据 PapMV CP 的氨基酸 90 至 169 之间的 19 个马铃薯 X 病毒 CP 的氨基酸序列的比对（其显示了在大多数马铃薯 X 病毒中，对应于 PapMV CP 的 128 位的氨基酸是 A，但是在 PapMV 中是 E）以及带电荷的残基 R104、K133、K137 和 R161 可能涉及与基因组 RNA 的相互作用并且在病毒基因组的组装和封装中起重要作用的报导 (Abouhaidar, & Lai, 1989, *J. Gen. Virol.* 70, 1871-5)，制备如下的突变体：E128A；K97A；R104K105R108/A；R118D120K121/A；K133K137/A；D142D145/A；E148A；R161A 或 E166E168/A。

电子显微镜检测和免疫金标记

将 VLP 或病毒在 10 mM Tris-HCl (pH 8) 中稀释, 并在涂覆碳的 formvar 栅格上吸附 3 分钟。将栅格用 8 mL 的 BSA (10 mg/毫升) 封闭 30 秒并用 PBS 清洗。在室温下将栅格与在 PBS 中 1:10 稀释的兔抗 6XH 标记物抗体 (得自位于美国宾夕法尼亚州 Pittsburgh 市的 Amersham 公司) 培养 30 分钟。然后将栅格用 PBS 清洗 3 次, 并在室温下与在 PBS 中 1:20 稀释的接合有 6 nm 金颗粒的驴抗兔抗体 (Jackson Immuno Research, West Baltimore Pike, West Grove, PA, USA) 培养 30 分钟。然后如上所述用去离子水清洗栅格并染色。

圆二色谱

在 20℃ 下用 Olis RSM 1000 (Olis, Conway Drive Suites A & B, Bogart, GA, USA) 快速扫描单色仪记录 CD 谱。对于远紫外 CD (260 nm-190 nm), 使用通路长度为 0.1 cm 的恒温石英皿。使用公式 $[\theta]MRW = [\theta] * MRW / (10 \times c \times l)$ 来计算平均残基椭圆率值 ($[\theta]MRW$, 单位为 $\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}$), 其中 $[\theta]$ 是椭圆率 (单位为度), MRW 是蛋白中的残基的平均分子量 (本研究中使用 108), c 是单位为 g/毫升的蛋白浓度, 并且 l 是单位为 cm 的通路长度 (Johnson, W. C. (1996) *Circular Dichroism Instrumentation in Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (Fasman, G. D., ed) pp. 635-652, Kluwer Academic / Plenum Publishers)。

在室温下用 Jasco Model J-710 仪器 (Jasco, Commerce Dr. Easton, MD, USA) 记录近紫外 CD 谱 (250 nm-350 nm)。使用石英比色杯进行记录 (通路长度为 0.1 cm)。以速率为 100 nm/分钟、步长为 0.2 nm 的 10 次扫描将光谱平均化。棒状和盘状样品的浓度分别为 1.5 mg/毫升和 5.5 mg/毫升。

RNA 转录物和电泳迁移率变动分析 (EMSA)

使用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 试剂盒

(Promega P1300, Madison, WI, USA)和 T7 启动子之前的 PapMV 的 5'端的 80 nt 克隆通过体外转录来制备 RNA 探针。所述克隆在体外转录之前用 EcoRI 线性化。在用于 DNA/RNA 纯化的 G50 Quick Spin Column (Roche 1273 965) 上将所述 RNA 转录物纯化。使用相同的方法制备用于体外组装分析的 PapMV 的 5'端的 1800 个核苷酸的转录物。使用虾碱性磷酸酶 (Fermentas, Hanover, MD, USA, EFO511) 使该 RNA 探针脱磷酸化,并用 T4 多核苷酸激酶 (NEB, Ipswich, MA, USA, M0201 S) 使其进行 γ ^{32}P -ATP 标记。然后如前所述使用 G-50 Quick Spin Column 将该探针纯化。将标记的 RNA 与重组蛋白在室温下培养 60 分钟。每一个反应均使用 165 fmol 的 RNA 和各种量的在体外的组装缓冲液中的纯化重组蛋白,所述组装缓冲液含有 7.5 U 的核糖核酸酶抑制剂 (Amersham Biosciences 27-081601)。反应的终体积是 10 μL ; 在上样至 5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶之前,向样品中加入 2 μL 的上样染料。在 0.5 X 的 Tris-硼酸盐-EDTA 缓冲液中在 10 mA 的条件下进行 90 分钟电泳。将凝胶干燥并在 Kodak BioMax MS 膜 (Amersham Biosciences V8326886) 上进行 16 小时的自动射线照相并显影。

PapMV 的纯化和盘状物的分离

通过差速离心从显示出花斑症状的感染的番木瓜叶子中纯化 PapMV。将感染的叶子 (100 g) 在盛有 100 ml 的 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) (含有 10 mM EDTA) 的市售混合器中研磨。将研磨的叶子通过纱布过滤,向滤液中加入 1%的 Triton X-100,并将滤液轻轻搅拌 10 min。逐滴加入氯仿至其体积相当于滤液体积的 1/4。在 4℃ 下将溶液再搅拌 30 min,并在 10 000 g 下离心 20 min 以去除沉淀物。将上清液进行高速 (100 000 g) 离心 120 min。使病毒粒状沉淀悬浮并通过蔗糖垫 (30%蔗糖) 在 100 000 g 下进行另一次高速离心达 3.5 h。将最终的病毒粒状沉淀悬浮于 10 mL 50 mM 的 Tris (pH 8.0) 中。如果存留有颜色,则使用氯仿进行额外的净化。通过超速离心收集纯化的病毒。按照前面所述的方法 (Erickson 等,1976, *Virology*. 72,

514-7)，通过乙酸降解法进行盘状物的分离。

胰蛋白酶消化

在 37℃ 下，将 10 µg 蛋白以 50 µL 的体积在 pH 8.5 的 100 mM Tris HCl 缓冲液中培养 120 分钟，所述缓冲液含有 0.2 µg 胰蛋白酶（Roche, Indianapolis, IN, USA, 1418475）。通过加入 10 µL 的上样染料来终止反应，所述上样染料含有 5% 的 SDS、5 mM DTT 和 40% 的甘油。在上样至 SDS-PAGE 凝胶之前将样品煮沸 5 分钟。通过考马斯亮蓝（Coomassie blue）染色使所述蛋白可视化。

结果

该 PapMV CP 在 CP 的开放阅读框（ORF）的 1 位和 6 位具有两个 M 残基。尚不清楚是否这两个起始密码子在病毒的复制期间都被使用。但是，已经显示，纯化病毒的 CP 的一大部分在 N-端都缺失了数个氨基酸（Zhang 等, 1993, *J. Mol. Biol.* 234, 885-7）。为了确保在大肠杆菌中只产生一种开放阅读框，将 N-端的 5 个氨基酸去除，使得 M⁶ 起到起始密码子的作用。在 NcoI 位点引入起始密码子引入了在所有的构建体中均发现的额外的 A。在蛋白的 C-端引入 6XH 标记物以有利于纯化过程。所述重组蛋白 CP Δ N5 在大肠杆菌 BL21（pLysS）中表达，并显示比从纯化病毒中提取的 WT CP 稍大的分子量（MW）。所观察到的两种蛋白之间的差异可能是由融合在 C-端的 6XH 标记物引起的。用 Ni²⁺ 柱将所述重组蛋白亲和纯化，并用 1 M 咪唑洗脱。据估测，纯化重组蛋白的收率为 40 mg/升至 50 mg/升。使用针对 WT PapMV CP 而出现的抗体的免疫印迹分析证明该纯化的蛋白确为 PapMV CP。

制备具有一个、二个或三个 A 置换的 9 个不同的突变体。五个突变体（R118-D120-K121/A、K133-K137/A、D142-D145/A、R161A 和 E166-E167-R168/A）产生不稳定的蛋白并且检测不到或以非常低的水平表达。这可能是在该保守区域的诱变影响了该 CP 的自然折叠。突变体 K97A、R104K105R108/A、E128A 和 E148A 能够以与 CP Δ

N5 类似的水平表达,并且如 CP Δ N5 所示易于使用 6XH 标记物纯化。但是,在透析期间咪唑的去除使得突变体 R104K105R108/A 和 E148A 聚集并沉淀,并且这种突变可能影响蛋白的折叠。

如纯化重组蛋白的电子显微照片所示(图 2B),构建体 CP Δ N5 在大肠杆菌中自组装成 VLP。该 VLP 与天然的病毒颗粒的形状和直径相似(比较图 2A 和 2B)。为了分析和定量以 VLP 形式存在的纯化蛋白的比例,通过在 100,000 g 下超速离心 2 小时来分离 VLP 和较小的聚集体。发现大多数 CP Δ N5 蛋白(80%)在上清液中。发现 VLP 在粒状沉淀中,并占总的纯化重组蛋白的 20%。但是,纯化的蛋白 K97A 在超速离心后留在上清液中。与之相反,发现重组蛋白 E128A 在超速离心后全部在粒状沉淀中。

电子显微镜检测显示,从高速粒状沉淀中分离的 E128A VLP 与 WT 病毒类似(图 2C)。分别测量 CP Δ N5 和 E128A 的 150 个 VLP 的长度并确定平均长度(图 2F)。如图所示,CP Δ N5 VLP 的长度(50 nm)比天然病毒(长度为 500 nm)短 10 倍。但是,E128A VLP 约比 CP Δ N5 VLP 长 3 倍(图 2C 和 2F),这表明该突变体能够更有效地支持组装的起始和延伸。最后,纯化 K97A 蛋白的电子显微照片显示了直径为 15 nm 至 50 nm 的无组织的聚集体(图 2D)。该聚集体的轮廓是不规则的,从而表明该蛋白不能够自组织成 VLP。

使用 Ni²⁺柱对 VLP 的纯化是有效的,从而表明 6XH 标记物位于表面并能够与亲和柱相互作用。为了证实这个假设,对 CP Δ N5 VLP 进行免疫金标记试验,其方法为:使用抗 6XHis 标记物兔抗血清,之后使用金颗粒标记的二级驴抗兔抗体。正如预料的那样,该 VLP 饰有金颗粒(图 2E),从而表明肽(6XH)与 C-端的融合是允许的并且暴露于 VLP 的表面。该 C-端融合的肽的表面暴露表明了 C-端作为连接免疫原的合适位点是适宜的。

圆二色(CD)谱用于比较重组蛋白和 WT 病毒的二级结构。据估测,CP Δ N5 的二级结构为 49%的 α -螺旋和 15%的无规卷曲。CP Δ N5 VLP 和 WT 病毒的 CD 谱显示出略微不同的曲线(图 3A)。WT 病毒在 208 nm 处测得的 CD 信号比 CP Δ N5 VLP 更明显(图 3A)。

有趣的是，E128A VLP 在 208 nm 处测得的 CD 信号与 WT 病毒重叠（图 3A）。

分离的 CP Δ N5 盘状物（纯化的蛋白的高速上清液）的 CD 信号与使用乙酸方法从纯化的病毒中分离的盘状物的 CD 信号一致（图 3B）。有趣的是注意到在 208 nm 处测得的盘状物的 CD 信号通常不如 VLP 明显。该结果表明当盘状物组装成 VLP 时， α -螺旋的含量增加。最后，将纯化的 K97A 蛋白的折叠与 CP Δ N5 的高速上清液相比较。两种蛋白显示了一致的 CD 曲线（图 3E）。

还获得了 250 nm 和 350 nm 之间的光谱以测量蛋白中芳香族残基和色氨酸残基的吸收。这些残基的环境的变化影响记录的信号并显示了三级结构的变化。CP Δ N5 和 E128A 的 VLP 看起来是类似的（图 3D），表明这两种 VLP 的三级结构相同。CP Δ N5 盘状物和 K97A 的光谱非常相似，这表明两种蛋白具有相似的三级结构（图 3E）。样品之间的曲线强度的微小差异可能是由于蛋白浓度的微小变化所致。

在超速离心之后，发现 80% 的纯化重组蛋白 CP Δ N5 和全部的 K97A 蛋白以多聚体（盘状物）的形式存在于上清液中。为了测量这些蛋白的多聚化的水平，使用 Superdex™ 200 分析 CP Δ N5 和纯化 K97A 蛋白的高速上清液。对于 CP Δ N5，大多数蛋白以 450 kDa 的高分子量复合物（相当于约 20 个亚单元（该蛋白亚单元的分子量为 23 kDa）的多聚体）形式洗脱。收集在 81.27 ml 处洗脱的第二个峰，并上样至 Superdex™ 75 柱以提高分离度。洗脱的蛋白为 39 kDa 的蛋白。将从得自该峰的样品进行 SDS-PAGE，并显示出独特的条带；该样品小于 CP Δ N5，因而对应于 CP Δ N5 的降解产物。可能的情况是，该降解的蛋白不能够形成高分子量的复合物并以二聚体留在溶液中。

K97A 的洗脱曲线可以划分成 3 个主要的峰（图 4B）。第二个峰在 50 ml 处洗脱并与 CP Δ N5 盘状物重叠（图 4A），这可能对应于盘状物结构。第一个峰在 41 ml 和 43 ml 之间洗脱，并对应于尺寸大于 700 kDa 的聚集的物质。该洗脱曲线较宽，并显示出肩峰，这表

明该物质并不是均匀的,并且可能对应于 K97A 盘状物通过非特异性相互作用粘合在一起的聚集体。第三个峰没有进一步分析,并且可能对应于 CPΔN5 构建体所显示的截断的蛋白。这些结果证实,K97A 能够与其它蛋白亚单元形成盘状物,但是不能够在大肠杆菌中组装成 VLP。

通过亲和色谱将 CPΔN5 盘状物从纯化蛋白的高速上清液中分离并用于体外的组装测试。通过凝胶过滤分离直径为 17 nm 的盘状物。在室温下将 50 ml 浓度为 1 mg/毫升的 CPΔN5 盘状物与 0.05 mg 的 RNA 培养 30 分钟。电子显微镜检测显示该 RNA 和该蛋白组装成规则长度 (150 nm) 的 VLP,该长度相当于在体外的组装测试中使用的 RNA (PapMV 的 5'端 1800 nt) 的长度。该结果清楚地显示,在体外,约 20 个亚单元的盘状物是 VLP 的组成部件(building block)。纯化的 K97A 重组蛋白不能在这些条件下与 RNA 组装成 VLP。

K97A 和 E128A 突变体显示了对 PapMV CP 完全相反的效果。为了评价 CPΔN5 和 E128A VLP 是否含有 RNA,以分光光度法测量不同的 VLP 的 280/260 比率,并与纯化的病毒的蛋白相比较(表 5)。正如预料的那样,由于该 VLP 具有较低水平的 RNA,因此显示出比盘状物小的 280/260 比率。E128A VLP 的 280/260 比率与纯化的病毒相当。有趣的是,CPΔN5 VLP 的该比率高出了 50%。CPΔN5 和 K97A 的分离的盘状物的 280/260 比率与用乙酸从纯化的病毒中提取的盘状物相当。

表 5: PapMV VLP 的 OD 280/260

病毒或 VLP			提取盘状物所用的物质		
纯化的 PapMV	CPΔN5 VLP	E128A VLP	纯化的 PapMV	CPΔN5 VLP	E128A VLP
0.75	1.10	0.75	1.5	1.64	1.55

为了评价形成 VLP 的能力与 CP 对 RNA 的亲合性是否直接相

关, 从 CP Δ N5 和 E128A 突变体中分离盘状物并与 K97A 相比较。将 CP Δ N5 的高速上清液用于分离 450 kDa 的多聚体(盘状物)。由于 E128A 突变体在大肠杆菌中只形成 VLP, 因此通过乙酸处理使这些 VLP 分裂并分离 E128A 盘状物(Abouhaidar & Bancroft, 1978, *Virology*. 90, 54-9)。将不同量的盘状物在含有 165 fmol 的 ^{32}P 标记的 RNA 探针的 10 μL 的体积中培养, 所述 RNA 探针由 PapMV 的 5' 端非编码区的 80 个核苷酸的转录物制得。通过电泳迁移率变动分析法(EMSA)来分离蛋白-RNA 复合物。CP Δ N5 的盘状物以协作的方式与该探针相互作用, 并且引起 500 ng (22 pmol) 的蛋白的变动。该结果显示, 只有当摩尔比(盘状物/RNA)达到 1,000 (这对应于与 RNA 亲和性较弱)时, 分离后不含 RNA 的 CP Δ N5 盘状物才能够在体外与 RNA 相互作用。当以 E128A 突变体的分离盘状物和相同的探针进行类似的试验时, 该 E128A 盘状物比 CP Δ N5 更有效地结合 RNA。仅仅 50 ng 的蛋白就足以生成蛋白 RNA 的复合物。即使在高浓度(多达 1500 ng)下, 纯化的 K97A 蛋白在同样条件的下也不能引起蛋白 RNA 的复合物的形成。用从 CP Δ N5 VLP 中提取的 RNA (按照前述标记)重复 EMSA, 并且用该不含 PapMV 封装信号的 RNA 得到了同样的结果。

为了评价 VLP 的稳定性, 并测量盘状物组装成棒状结构是否提高了该复合物的稳定性, 通过 CD 分光光度法监测它们的耐热性。在表现出任何的疲劳(fatigue)迹象之前, CP Δ N5 VLP 和病毒都耐高温(超过 60 $^{\circ}\text{C}$) (图 5A)。纯化的 PapMV 是所测试的最稳定的结构并且能够耐接近 100 $^{\circ}\text{C}$ 的温度。报导的 PapMV 的失活温度是 70 $^{\circ}\text{C}$ 。CP Δ N5 VLP 比 WT 病毒更敏感, 这可由于存在位于 C-端得 6XHis 标记物所致。E128A VLP 似乎对热更为敏感并在 42 $^{\circ}\text{C}$ 下表现出疲劳的迹象(图 5A)。盘状物在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时迅速变性(图 5B)。该结果显示, 盘状物封装为棒状结构显著地提高了稳定性。

据估测, 用胰蛋白酶处理 PapMV 会导致 C-端的氨基酸 198 处发生断裂。在这些条件下, 余下的蛋白耐蛋白酶。对纯化的病毒颗粒和重组 VLP 以及盘状物进行类似的分析, 并且显示 PapMV 似乎不

受胰蛋白酶的影响。电子显微镜检测证实处理的病毒与未处理的病毒外观一致，然而，从 CP Δ N5 和 CP Δ N5 VLP 分离的盘状物都对胰蛋白酶非常敏感，并产生对应于降解片段的数个较低分子量的条带，这表明 VLP 的表面暴露有数个带正电荷的残基并且是可利用的。E128A 显示了与 WT 病毒类似的耐胰蛋白酶性。

实施例 II: PapMV gp100 和 PapMV Flu VLP 的制备和改造 PapMV CP 基因的克隆

将 CP Δ N5 PapMV 外壳蛋白 (CP) 基因用于下面的实施例，并且按照文献 Tremblay, M-H.等, .2006, *FEBS J.*, 273:14-25 中所述的方法进行制备。简言之，使用下面的寡核苷酸引物，通过 RT-PCR 由分离的病毒 RNA 扩增 CP 基因。

正向 CP Δ N5 引物:

5'-AGTCCCATGGATCCAACGTCCAATCTTCTG-3' [SEQ ID NO: 27]

反向 CP Δ N5 引物:

5'-ATGCGGATCCTTACTAATGGTGATGGTGATGGTGTTTCGGGGGTGGAAG-3' [SEQ ID NO: 28]

将 PCR 产物用 *NcoI* 和 *BamHI* 消化，并插入载体 pET-3d 内以制备 CP Δ N5 PapMV VLP 克隆，其中 N-端的 5 个氨基酸从 WT 序列中缺失。PapMV VLP 还在重组蛋白的 2 位具有插入的丙氨酸。CP Δ N5 PapMV VLP 克隆的氨基酸序列如图 1C[SEQ ID NO:3]所示。

PapMV gp100 和 PapMV Flu 构建体的克隆和改造

选择源自确切的肿瘤抗原 gp100 的 9 聚体 (9-mer) HLA-A*0201 抗原表位 (IMDQVPFSV; SEQ ID NO:51) 和源自流感病毒 M1 蛋白的 9 聚体 HLA-A*0201 抗原表位 (GILGFVFTL; SEQ ID NO:52)。HLA-A*0201 抗原表位的 N-端和 C-端侧的侧面连接来自各自的天然序列的 5 个残基，以有利于通过蛋白酶体进行天然加工(参见图 6A)。

为了制备 PapMV gp100 构建体，使用下面的寡核苷酸:

gp100 正义寡核苷酸

5'-CTAGTTCTTCTGCGTTCACCATCATGGACCAGGTTCGGTTCTCTGTTTCTGTTTCTCAGCTGA-3' [SEQ ID NO: 29], 和

gp100 反义寡核苷酸

5'-CTAGTCAGCTGAGAAACAGAAACAGAGAACGGAACCTGTGCCATGATGGTGAACGCAGAAGAA-3' [SEQ IDNO:30]。

将这两个寡核苷酸退火，并克隆至 CP Δ N5 PapMV CP 克隆的 *SepI* 和 *MluI* 位点，其中所述 CP Δ N5 PapMV CP 克隆已经用相同的酶线性化。

为了制备 PapMV FLU 构建体，使用下面的寡核苷酸：

FLU 正义寡核苷酸

5'-CTAGTTCTCCGCTGACCAAAGGTATCCTGGGTTTCGTTTT CACCCTGACCGTTCCGTCTGAAA-3' [SEQ ID NO:31], 和

FLU 反义寡核苷酸

5'-CTAGTTTCAGACGGAACGGTCAGGGTGAAAACGAAACC CAGGATACCTTTGGTCAGCGGAGAA-3' [SEQ IDNO:32]。

如针对 gp100 构建体所述的那样，将这两个寡核苷酸退火并在 CP Δ N5 PapMV CP 的 C-端处克隆。

得到的 PapMV gp100 和 PapMV FLU 构建体包含 PapMV CP 基因，其各自的肽在 C-端融合并具有 6XH 标记物以容易进行纯化过程。通过 DNA 测序证实 PapMV 克隆的序列。

PapMV、PapMV FLU 和 PapMV gp100 在大肠杆菌中的表达

大肠杆菌表达株 BL21 (DE3) RIL (Stratagene, La Jolla, CA) 被含有上述构建体之一的质粒 pET-3d 转化，并保持在含有氨苄青霉素 (50 μ g/毫升) 的 2xYT 培养基中。细菌细胞在 37°C 下生长至在 600 nm 下的光密度为 0.6，并用 1 mm 异丙基-b-d-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达。诱导在 25°C 下进行 16 小时。通过以 6000 r.p.m 离心 15 分钟来收集细菌。将粒状沉淀在用冰冷却的裂解缓冲液 (50 mm NaH_2PO_4 pH 8.0、300 mm NaCl, 10 mm 咪唑、20 μ m 苯甲磺酰氟、1

mg/毫升裂解酶)中重新悬浮,并以一次通过弗氏细胞压碎器(French Press)使细菌裂解。将裂解液在13 000 r.p.m.下离心2次,每次30 min,以清除细胞碎片。在4℃和温和搅拌的条件下,将上清液与1 mL Ni-NTA (Qiagen, Valencia, CA)培养4小时。将裂解液上样至柱子上,并以3×15 mL洗脱缓冲液(50 mm NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mm NaCl)清洗珠子,所述缓冲液含有浓度增加的咪唑(10 mm, 20 mm和50 mm)。然后用15 mL工作缓冲液(10 mm Tris /HCl pH 8或10 mm 磷酸钠缓冲液 pH 7.2)清洗珠子。进行2次清洗步骤以去除LPS污染物,一次用pH 8的10 mM Tris-HCl、50 mM咪唑、0.5% Triton X100,另一次用pH 8的10 mM Tris-HCl、50 mM咪唑、1%两性清洗剂。蛋白以含1 M咪唑的工作缓冲液洗脱。将洗脱的蛋白在Beckman 50.2 TI转子中进行高速的超速离心(100 000 g) 120 min。将VLP粒状沉淀在无内毒素的PBS (Sigma公司)中重新悬浮。最后,使用0.45 μm的过滤器过滤蛋白溶液。通过BCA蛋白试剂盒(Pierce公司)评价蛋白浓度。按照制造商的说明书(Cambrex),用鲎试验评价纯化的蛋白中的LPS的水平,并且评价结果为低于0.005内毒素单位(EU)/μg蛋白。该过程得到大于20 mg的纯化VLP/升细菌培养物。

电子显微镜检测和 SDS-PAGE

将蛋白用PBS稀释,并在涂覆碳的formvar栅格上吸附3分钟。将栅格用去离子水清洗2次并在室温下用0.1%的醋酸双氧铀染色10分钟。然后在Jeol JEM220FS透射电子显微镜上观察该栅格。使用Adobe Photoshop软件评价100个VLP的平均长度。

使用得自Bio-Rad公司(Hercules, CA)的mini-protean系统,按照本领域中描述的方法(Lepage和Lapointe, 2006, *Cancer Res.* 66:2423-2432)进行SDS-PAGE分析。通过考马斯亮蓝染色(Bio-Rad)显示蛋白。在一些试验中,添加最终浓度为13 μg/毫升的蛋白酶K (Invitrogen)。

结果

在大肠杆菌中制备的不同 PapMV VLP 的电子显微镜检测分析 (图 6B) 显示出长度在 80 nm 至 200 nm 范围内的典型的长棒状结构, 并且 PapMV VLP 的直径为 15 nm; 而改造的 PapMV gp100 和 Flu VLP 的直径为 16 nm。所述 PapMV CP 能够在大肠杆菌中自发地组装成尺寸和形状与 PapMV VLP 类似的 VLP。

将新鲜的和 7 个月的 VLP 制剂在 4℃ 的 PBS 中进行 SDS-PAGE 分析 (图 7)。没有在凝胶上检测到降解的证据。此外, 将制剂在室温下或在 37℃ 继续培养 7 天, 而没有任何明显的降解。最后, 将 PapMV 制剂与蛋白酶 K 培养 (作为降解的阳性对照), 其导致了改造的 PapMV VLP 的快速降解。没有融合肽的 PapMV VLP 对蛋白酶 K 更具耐性, 这表明 C-端处的融合可能局部地使该区域不稳定, 并且增加了对该酶的易感性。

实施例 III: 在 PapMV VLP 上表达的 gp100 和流感病毒 M1 抗原表位的体外加工和交叉提呈

肽

Gp100 肽和 Flu 肽由 GLBiochem 上海有限公司合成, 并在 DMSO (Sigma) 中重新悬浮。

培养基和细胞培养物

按照本领域中描述的方法 (Lapointe 等, 2003, *Can. Res.* 63:653-662), 在完全培养基 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Invitrogen; Carlsbad, CA; 和 Wisent; St-Bruno, Québec, Canada) 中培养 T 淋巴细胞、树突状细胞 (DC) 和 CD40 刺激的 B 淋巴细胞 (CD40-B), 所述完全培养基补加 7.5% 的人血清 (热灭活, 从正常的供体制备)、2 mM 的 L-谷氨酰胺、100 U/毫升的青霉素/链霉素和 10 µg/毫升的庆大霉素 (后面的三者得自 Invitrogen 和 Wisent 公司)。

按照本领域中描述的方法 (Lapointe 等, 2003, *Can. Res.* 63:653-662; Lepage and Lapointe, 2006, *Cancer Res.* 66:2423-2432),

通过加入 500 ng/毫升的可溶的 CD40L 三聚体(Immunex Corporation; Seattle, WA) 和 500 U/毫升的重组人 IL-4 (Peprotech; Rocky Hill, NJ), 将 CD40 活化的 B 细胞由外周血单核细胞 (PBMC) 扩增和培养。

通过改变由文献 “Sallusto 等, 1994, *J.Exp. Med.* 179:1109-1118” 所述的原始方案, 由 PBMC 制备 DC, 所述 PBMC 是由源自正常供体的血液净化制剂(apheresis preparation)中收集的(Lapointe 等, 2000, *Eur. J. Immunol.* 30:3291-3298)。简言之, 通过离心淋巴细胞分离培养基 (Wisent) 从血液中富集 PBMC。在 37°C 下, 通过在组织培养瓶或培养板中进行 2 小时贴壁 (adherence) 来富集单核细胞 (在 T-25 中 3×10^7 个细胞, 在 6 孔平底培养板中 1.5×10^7 个细胞/孔、或在 24 孔平底培养板中 5×10^6 个细胞/孔, 其全部得自 Costar, Corning, NY)。将贴壁的细胞用 PBS (Wisent) 清洗一次然后在完全培养基中培养, 所述完全培养基补加 100 ng/毫升的 GM-CSF (1,000 U/毫升) 和 500 ng/毫升的 IL-4 (1,000 U/毫升) (其均得自 Peprotech, Rocky Hill, NJ)。在第 3 和第 5 天再次添加 GM-CSF 和 IL-4。在第 6 天添加 PapMV VLP (按照实施例 II 描述的方法制备) 并在第 7 天收集以用于识别和扩增试验。

黑色素瘤细胞系 1088mel 在 Surgery Branch (NCI/NIH) 得到。SK23、T2 和乳腺肿瘤细胞系 MDA231 从美国典型培养物保藏中心 (ATCC; Manassas, VA) 获得。将所有的肿瘤细胞系培养于 RPMI 1640 培养基, 所述培养基补加 10% 热灭活的 FBS、2mM L-谷氨酰胺、100 U/毫升的青霉素/链霉素和 10 μ g/毫升的庆大霉素。

PapMV 冲击的 APC 的交叉提呈

通过 gp100-特异性 T 细胞或流感病毒 M1-特异性 T 细胞分析不同的靶细胞, 以用于确定抗原表位的 MHC I 类提呈。Gp100-特异性 CD8⁺T 细胞克隆由 National Cancer Institute; NIH, Bethesda, MD 友善提供, 并且其对 209-217 位处的天然 HLA-A*0201-限制性抗原表位 (ITD QVP FSV; SEQ ID NO:53) 和在 210 位处用 M 修饰的形式 (IMD

QVP FSV; SEQ ID NO:51) 均具有特异性, 这提高了肽/MHC 复合物的稳定性。使用在文献“Dudley 等, 1999, *J. Immunother*, 22:288-298”中所描述的快速扩增方案扩增 gp100-特异性 T 细胞。

按照以下方法制备对流感病毒 M1 衍生的 HLA-A*0201-限制性抗原表位 (59-67; GIL GFV FTL; SEQ ID NO:52) 具有特异性的 T 细胞系。以特异性的抗体 (OneLambda, Canoga Park, CA), 通过流式细胞仪 (FACScalibur; BD Biosciences, Mississauga, ON) 鉴定源自 HLA-A*02⁺正常供体的 PBMC。在 48 孔培养板的多个孔中, 将以上制备的 PBMC 用 1 μ M 合成 FLU 肽在上述培养基内进行刺激。7 天后将培养物用肽冲击 (以 1 μ M 的浓度进行 3 小时, 之后用 PBS 清洗 3 次) 的自体 PBMC 或 CD40 刺激的 B 淋巴细胞培养物再次刺激。然后每 2-3 天以 150 IU/毫升的量添加白细胞介素 (IL)-2 (Chiron, Emeryville, CA), 并将培养物保持在 0.5×10^6 个细胞/毫升和 2×10^6 个细胞/毫升之间。在按照本领域描述的方法 (Lapointe 等, 2001, *J. Immunol.* 167:4758-4764) 将各培养物与肽冲击的 T2 细胞共培养之后, 使用偶联抗体 (Endogen, Woburn, MA) 通过 ELISA 进行干扰素 (IFN)- γ 分泌测定来评价其特异性。

为了评价由 PapMV CP 介导的交叉提呈, 用各种形式的修饰 PapMV CP 以 10 μ g/毫升-50 μ g/毫升的量将 CD40 活化的 B 细胞或 DC 冲击 20 小时。收集细胞, 用 PBS 清洗 2 次, 并接种至 96 孔培养板中的完全培养基 (4×10^4 - 10×10^4 个细胞/孔) 内。将 gp100-特异性 T 细胞或流感病毒 M1-特异性 T 细胞以 2×10^4 - 10×10^4 个细胞/孔的量添加到完全培养基内, 并保持 20 小时。收集培养物上清液并按照本领域中描述的方法 (Lepag 和 Lapointe, 2006, *Cancer Res.* 66:2423-2432) 通过 ELISA 评价干扰素 (IFN)- γ 。在一些试验中, 将 APC 用 50 μ M-70 μ M 的氯喹 (Sigma) 或 20 μ g/毫升-25 μ g/毫升的乳胞素或 1.3 μ M-3.3 μ M 的 MG-132 (后两种得自 Calbiochem 公司, San Diego, CA) 预处理 1 小时。用 PBS 清洗细胞并在含有 1/20 初始抑制剂浓度的培养基中重新悬浮。将处理的细胞用不同的 PapMV 变体冲击并且按照上述的方法进行 MHC I 类介导的提呈的分析。

T 细胞扩增

用各种形式的修饰 PapMV CP（如前面的实施例 II 所描述）将 CD40 活化的 B 细胞或 DC 冲击 20 小时。收集细胞，用 PBS 清洗 2 次。在 48 孔培养板的单个孔中，将冲击的 APC (2×10^5 - 5×10^5) 与自体的 PBMC (2×10^6 个细胞) 在 500 μ L 完全培养基中共培养。当培养基变黄时，去除 200 μ L 培养基，并加入 400 μ L 新鲜的完全培养基。在第 7 至 10 天向单独的培养物中加入新鲜的经 PapMV 冲击的 APC (5×10^5 ; 冲击 20 小时并用 PBS 清洗 2 次)。然后每 3 天以 100 IU/毫升的量添加 IL-2。

然后在第 15 至 20 天测量 T 细胞的特异性。简言之，按照本领域中描述的方法（Lapointe 等, 2001, *J. Immunol.* 167:4758-4764）将扩增的细胞与经肽冲击的 T2 细胞、或经 PapMV 冲击的 APC 共培养。然后按照本领域中描述的方法（Lepage 和 Lapointe, 2006, *ibid.*）使用偶联抗体（Endogen; Woburn, MA）通过 ELISA 评价 IFN- γ 的分泌。可供选用的另外一种方式是，按照制造商的说明，使用偶联抗体（MABTECH）通过 ELISPOT 分析法来评价抗原-特异性 T 细胞的频率。使用自动计数器（得自 CTL Technologies 公司，Cleveland, OH）计算斑点。

结果

DC 在本领域中被定义为最佳的 APC，并且在当前的试验以及本领域中已经证明在 CD40 刺激之后扩增的 B 淋巴细胞是有效的 APC。将这些 APC 用 PapMV VLP、PapMV gp100 和 PapMV-Flu 冲击，并与对源自 gp100 和流感病毒 M1 蛋白的 MHC I 类抗原表位具有特异性的确定的 T 细胞共培养。如图 8A 所呈现，用 PapMV gp100 冲击的 APC 被 gp100-特异性 T 细胞克隆所识别。相反地，只有用 PapMV Flu 冲击的 APC 被流感病毒 M1 特异性 T 细胞所识别（图 8B）。各 T 细胞培养物的特异性通过用对应于各抗原表位的合成肽冲击的 CD40 活化 B 细胞来证实。此外，向特异性 T 细胞中添加 PapMV-Flu

不能刺激它们分泌 IFN- γ ，表明 APC 对于肽识别是必需的。

为了证实 HLA-A*02 是参与肽提呈的限制性要素，用由 2 个额外的 HLA-A*02 供体以及对该等位基因阴性的其他 2 个供体制备的 APC 进行类似的试验。如图 9A 所示，对于 PapMV-Flu 冲击的 HLA-A*02⁺供体而言，FLU-特异性 T 细胞最具反应性（左栏）。其与供体 #3 具有弱的反应性可以通过这样的事实来解释：该 FLU T-细胞系是异源的，并且对可能由另一种 MHC I 类等位基因提呈的肽具有特异性的 T-细胞可能存在于培养物中。此外，gp100 特异性 T-细胞克隆只与 PapMV gp100 冲击的 HLA-A*02⁺APC 具有反应性（图 9A；右栏），这进一步证实了表达相关限制性要素的 APC 对抗原提呈是必需的。最后，根据本领域中所实施的方法（Lapointe 等, 2003, *Can. Res.* 63:2836-2843; Lapointe 等, 2001, *J. Immunol.* 167:4758- 4764），使用封闭 MHC I 类、或 MHC II 类或 HLA-DR 提呈的抗体来控制 MHC I 类的提呈。作为对照，将表达 HLA-A*0201 和 gp100 的黑素瘤细胞系与 gp100-特异性的 T-细胞克隆共培养，并且正如预料的那样，只有封闭 MHC I 类提呈的抗体丧失了识别（图 9B；右部）。如本领域中所证明的那样（Dudley 等, 1999, *J. Immunother.* 22:288-298; Lapointe 等, 2001, *ibid.*），将 gp100-特异性 T-细胞克隆与细胞系 HLA-A*02⁻/gp100⁺、或 +/-、或 -/- 共培养均不能激发 IFN- γ 的分泌。当将一组封闭性抗体施加至 PapMV Flu 冲击的 APC 时，只有抗-MHC I 类会降低特异性 T 细胞系的识别（图 9B；左部）。后面的这些数据显示，源自 PapMV-Flu 的 FLU 肽通过 MHC I 类（特别是 HLA-A*02）提呈。

为了确定 PapMV VLP 的加工是否由蛋白酶体介导，使用两种不同的蛋白酶体抑制剂，即，乳胞素和 MG-132，并且通过封闭来自 gp100（黑素瘤细胞）的 HLA-A*0201 抗原表位的典型 MHC I 类提呈来控制其活性（图 10，右部）。当使用 PapMV Flu 冲击的 APC 时，M1 肽的提呈不受两种抑制剂的影响（图 10，左部）。正如预料的那样，氯喹预处理（其中和了核内体的 pH）对 FLU 抗原表位的交叉提呈有微弱的负面影响，而类似的处理没有改变黑素瘤细胞的典型的

MHC I 类提呈。总而言之，这些数据表明由 PapMV VLP 介导的 MHC I 类的交叉提呈是蛋白酶体非依赖性的。

还评价了用 PapMV VLP 冲击的 APC 是否具有扩增源自异源的 T 细胞群（源自 PBMC）的抗原特异性 T 淋巴细胞的能力。将 DC 和 CD40 活化的 B 淋巴细胞用 PapMV VLP 冲击，并根据上述方案将冲击的 APC 与自体 PBMC 共培养。首先通过 ELISPOT 分析法来评价特异性扩增的 T 细胞的频率。如图 11A 所示，当将 PapMV Flu 冲击的 APC 与 PBMC 一起使用时，产生对 HLA-A*0201 流感病毒 M1 肽特异性的细胞。正如预料的那样，未冲击的 APC 或用 PapMV 或 PapMV gp100 冲击的 APC 不能产生 Flu 特异性 T 细胞。正如预料的那样，对于没有黑素瘤的健康的正常供体，没有产生 gp100-特异性 T 细胞。然后评价扩增的 T 细胞对各种冲击的 APC 的反应性，并且当使用通过经 FLU 肽或 PapMV Flu 冲击的 APC 扩增的 T 细胞来扩增 T 细胞时，IFN- γ 的分泌似乎一样高（>5000；图 11B）。用 PapMV、PapMV gp100 或 PapMV Flu 冲击的 APC 不能产生对 PapMV CP 特异性的 T 细胞，这表明针对 PapMV CP 的细胞超前免疫（cellular pre-immunity）是微弱的。最后，将扩增的 T 细胞与用不同量的 HLA-A*0201 流感病毒 M1 肽冲击的 T2 细胞共培养（图 12）。在两个独立的试验中，由于 T 细胞具有识别用 0.1 nM 和 0.01 nM 的肽冲击的 T2 细胞的能力，因此产生了具有高亲和力的高反应性 T 细胞。分泌量大多 >100 000 pg/毫升（这是很高的），并且用流感病毒 M1 肽冲击的 APC 培养的 T 细胞通常亲和力较低。从这些试验中可得出结论：经 PapMV 冲击的 APC 具有扩增高亲和力的特异性 T 细胞的能力。有趣的是，没有先前存在针对 PapMV CP 的细胞超前免疫的证据。

实施例 IV：PapMVCP-E2 和 PapMVCP27-215-E2 的制备和改造

该实施例证明，PapMV 外壳蛋白的多聚化对 PapMV VLP 的免疫原性是关键。

PapMV 外壳蛋白的克隆和改造

按照实施例 IV 描述的方法克隆 PapMV CP 基因。为了制备 PapMVCP-E2 构建体, 使用下面的寡核苷酸:

5'-GATCACTAGTGTGGTGGTGGGTACCACCGATCGTAGCGG
TGCGCCGACCTACAGCTGGGGTGCGAACGATACGCGTCATG-3'
[SEQ ID NO:33], 和

5'-CATGACGCGTATCGTTCGCACCCCAGCTGTAGGTCGGCG
CACCGCTACGATCGGTGGTACCCACCACCACACTAGTGATC-3'
[SEQ ID NO:34]。

在连接至经 *SpeI*/*MluI* 线性化的 PapMVCP 克隆之前, 将这两个寡核苷酸一起退火并用 *SpeI* 和 *MluI* 消化。

通过以下方法由 PapMVCP-E2 质粒构建用于截断的外壳蛋白 E2 融合体 (PapMVCP27-215-E2) 的表达载体, 所述方法为: 首先制备下面的用于 PCR 的两个寡核苷酸 (包含 *NocI* 限制性位点), 所述寡核苷酸被设计为缺失 PapMV CP 的前 26 个氨基酸:

正向引物:

5'-AGTCCCATGGCCGATCCAACGTCCAATCTTCTG-3' [SEQ
ID NO:35], 和

反向引物:

5'-ACGTCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAG-3' [SEQ ID
NO:36]。

然后将 PCR 产物自连接。按照与用于构建 PapMVCP27-215-E2 克隆相同的程序由 PapMVCP 质粒获得用于 PapMVCP27-215 的表达载体。通过 DNA 测序验证所有的 PapMV 克隆的序列。

PapMVCP-E2 和 PapMVCP27-215-E2 的表达和纯化

按照实施例 IV 中描述的方法进行 PapMVCP 构建体的表达和纯化。E2 肽由 GLBiochem 上海有限公司合成, 并在无内毒素的 PBS (Sigma 公司) 中重新悬浮。在使用之前, 用 0.45 μ m 的过滤器过滤蛋白溶液。使用 BCA 蛋白试剂盒 (Pierce 公司) 评价蛋白的量。按照制造商的说明 (Cambrex 公司), 用鲎试验评价纯化的蛋白中的

LPS 的水平，并且结果为低于 0.005 内毒素单位 (EU) / μg 蛋白。

SDS-PAGE、电印迹和电子显微镜检测

按照前面的实施例中描述的方法进行 SDS-PAGE 和电印迹。将蛋白以 PBS 稀释并在涂覆碳的 formvar 栅格上吸附 3 分钟。将栅格用去离子水清洗 2 次并在室温下用 0.1% 的醋酸双氧铀染色 10 分钟。然后在 Jeol JEM220FS 透射电子显微镜上观察该栅格。使用 Adobe Photoshop 软件来评价 100 个 VLP 的平均 VLP 长度。

免疫

将 5 只 4 至 8 周龄的 C3H/HeJ 小鼠（得自 Charles Rivers Laboratories）皮下注射 25 μg 的 PapMVCP-E2、PapMVCP27-215-E2 或相同量的 E2 肽（2 μg ）或无内毒素的 PBS（Sigma 公司）。初次免疫 2 周后给予一次加强剂量。在不同的时间点获得血样并贮存于 -20°C 直至分析。所有的试验方案经 Laval 大学的动物保护委员会批准。

ELISA 定量

将在 pH9.6 的 0.1 M NaHCO_3 缓冲液中被稀释至浓度为 1 μg /毫升的 P3、P3E2、PapMVCP、PapMVCP27-215 或 PapMVCP-E2 以 100 μl /孔-200 μl /孔的量，涂覆在 96 孔 Costar 高结合性培养板（得自 Corning 公司，NY, USA）上过夜。在 37°C 下将该培养板用 PBS/0.1% Tween-20/2% BSA（150 μl /孔）封闭 1 小时。在用 PBS/0.1% Tween-20 清洗 3 次之后，添加从 1:50 开始以 2 倍次序稀释的血清并在 37°C 下培养 1 小时。培养之后，将培养板清洗 3 次，并与在 PBS/0.1% Tween-20/2% BSA 中以 1/10,000 稀释的 100 μl 的偶联过氧化酶的山羊抗小鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b（其均得自 Jackson ImmunoResearch 公司）、IgG3（得自 Rockland 公司）在 37°C 下培养 1 小时。清洗 3 次之后，根据制造商的说明用 100 μl 的 TMB-S 检测 IgG 的存在；通过添加 100 μL 0.18 mM 的 H_2SO_4 终止反应并且在 450 nm 处读取 OD。

该结果表示为抗体的终点效价，并且在 OD 值为用 PBS 小鼠的血清的 1:50 稀释液得到的背景值的 3 倍时测定。

关于确定人血清中的抗体水平，应用相同的条件，不同之处在于使用以 1/80000 稀释的偶联过氧化酶的山羊抗人 IgG 作为二级抗体。源自感染 HCV 患者的血清由 B. Willems (Hopital Saint Luc, CHUM) 提供：该结果表示为抗体的终点效价，并且在 OD 值为 15 个未感染的患者的血清池 (pool of sera) 的血清的 1:25 稀释液得到的背景值的 3 倍时测定。

脾细胞的再激发

在第 65 天将 CD-1 小鼠 (22 周龄) 杀死之前，在第 0、15、30、45 天将其免疫 PapMVCP-E2 (25 μ g)。取出脾脏并悬浮于 DMEM (2×10^5 个细胞/孔)。用高渗的氯化铵溶液去除红血球。清洗脾细胞并重新悬浮于 200 μ l 的 DMEM 培养基 (补加 10% FBS [HyClone]、100 U/毫升青霉素、100 μ g/毫升链霉素、2 mM L-谷氨酰胺、1 mM 丙酮酸钠和 50 μ M β -巯基丙醇的 DMEM) 中，直到在 96 孔平底培养小板 (Costar) 中的浓度为 2.5×10^5 个细胞/毫升。将样品与 25 μ g/毫升的 PapMVCP 或 PapMVCP-E2 VLP 培养 4 天。使用 Concavalin A (ConA-10 μ g/毫升) 和 PBS 作为阳性和阴性对照。收集细胞培养物的上清液，并使用 liquid mouse 10 细胞因子试剂盒 (得自 Qiagen 公司) 测量细胞因子。

小鼠中的气囊

在 10 至 12 周龄的 CD-1 小鼠 (Charles River Laboratories) 中凸起气囊。通过在第 0、3 天皮下注射 3 ml 无菌空气在背部凸起气囊。在第 7 天，将 1 ml 的重组 PapMVCP (1 μ g/毫升至 10 μ g/毫升)、LPS (10 μ g/毫升) 或 PBS 注射进气囊。处理 6 小时后，通过 CO₂ 窒息杀死小鼠。用 1 mL PBS-5 mM EDTA 清洗该气囊 1 次，然后用 2 mL PBS-5 mM EDTA 清洗该气囊 2 次，并将渗出液在室温下以 $500 \times g$ 离心 5 min。在醋酸蓝 (acetic blue) 染色之后用血细胞计数器对细胞

计数。

骨髓细胞提取和在 APC 中的分化

从 BALN/c 小鼠的大腿骨中获得骨髓祖细胞 (progenitors cell), 并在树突状细胞分化骨髓培养基 (其含有 95% 的 RPMI 和 1% 青霉素-链霉素并补加 5% 的 X63-GM-CSF 培养基培养物的上清液; X63-GM247 CSF 细胞系由 B. Ludewig, Research Department, Kantonal Hospital St. Gallen, Switzerland 提供) 中培养 6 天。在第 2 和 4 天部分置换培养基。在第 6 天, 用下列培养基来置换上述培养基: 没有 LX63 调节的培养基。在第 7 天, 使用 FITC 抗-CD11c 和 PE-Cy5.5 抗-CD11b 表面标记物 (BD Biosciences) 通过流式细胞术来验证 APC 的富集。该制剂含有 25% 的 CD11c⁺CD11b⁺ 细胞和超过 80% 的 CD11b⁺ 细胞。该制剂在本文中被称为 APC。

流式细胞术

为了评价 PapMVCP-E2 或 PapMVCP27-215-E2 在 APC 中的内化, 将 1 百万个源自骨髓的 APC 在 37°C 下与 25 µg 的 PapMVCP-E2 或 PapMVCP27-215-E2 培养 2 小时。简言之, 在 4°C 下将细胞用 PBS 10%、FBS 和抗-CD 16/CD32 (1 µg/百万个细胞) 封闭 15 min。在用 PBS 清洗 2 次之后, 在室温下将细胞用 PBS/2% 多聚甲醛固定 10 min。在用渗透缓冲液 (PBS 10%; FBS 0.2%; Triton X-100) 清洗 2 次之后, 在 4°C 下将细胞与在渗透缓冲液中经 1/200 稀释的兔多克隆抗体培养 45 min。在用渗透缓冲液清洗 2 次之后, 在 4°C 将细胞与渗透缓冲液中经 1/5000 稀释的二级抗体抗兔 IgG alexa 488 (Molecular Probes) 培养 45 min。在用 PBS 清洗之后, 立即用 EPICS-XL 细胞荧光计分析细胞。使用 WINMDI2.8 进行数据分析。用于检测的兔多克隆 Ab 以我们自己的设备制备: 将兔免疫前的血清用作阴性对照。

共聚焦显微镜

按照与前面描述相同的分化方案, 使 APC 在底部包括无菌载玻

片的 12 孔培养板 (Cornin, NY, USA) 中生长 (200,000 个细胞/孔)。对于抗原内化的研究, 使用 5 μg 抗原/200 000 个细胞。固定、渗透、初级和二级抗体培养的步骤如流式细胞术中所述的那样。立即通过 Fluoview Fv300 共聚焦显微镜用 X60 的油浸物镜来分析载玻片。通过 x-z 切片依次地获得荧光图像, 以避免非特异性的波道干扰。然后将图像用 Image J 软件数字化处理。

统计分析

将非参数的 Krustal-Wallis 和 Dunn's 多重比较测试用于统计分析。 $P < 0.05$ 的值被认为具有统计学显著意义。使用程序 PRISM 3.03 进行统计分析。

结果

纯化的重组蛋白表现出预期的 23 kDa 的分子量 (PapMVCP27-215-E2), 对于 PapMVCP 和 PapMVCP-E2 而言分子量是 26 kDa, 并且内毒素水平总是在 0.005 EU/ μg 蛋白以下。电子显微镜 (EM) 观察证实, 在 PapMVCP 的 C-端处 E2 肽并没有影响蛋白自组装成与重组的 PapMVCP VLP 类似的 VLP 的能力。正如所预料的那样, PapMVCP27-215-E2 不能形成 VLP, 并保持为以前所显示的那样的单体形式 (Leclerc 等, 1998, *J Biol Chem*, 273:29015-21)。VLP 的长度是可变的, 尺寸在 201 ± 80 nm 的范围内。201 nm 长的蛋白代表 560 个 CP 拷贝, 所述 CP 以重复和结晶的形式呈现 E2 肽。

为了测试 PapMVCP VLP 的促炎性能, 使用小鼠气囊模型。注射 LP 含量极低 (< 0.005 EU/ μg) 的 10 μg PapMVCP VLP 不能在处理 6 小时之后引起白细胞汇集至 CD1 小鼠的气囊内。与此形成对比的是, 以 1,000 和 1 EU 的剂量注射 LPS 非常有效地引起白细胞的汇集 (图 13)。该结果表明 PapMVCP VLP 在 6 小时后并不促炎, 并且在 PapMVCP 蛋白样品中极低水平的 LPS 不会在随后的试验中发挥任何显著的免疫原性效果。

测试单体形式 (PapMVCP27-215-E2) 和多聚形式

(PapMVCP-E2)形式在源自骨髓的 APC 中内化的能力,所述 APC 富集在源自骨髓的树突状细胞 (BMDDC) 中。流式细胞术显示多聚形式和单体形式均能有效地对 APC 进行免疫标记 (对于 PapMVCP-E2 VLP 而言为 95.3%,并且对于 PapMVCP27-215-E2 VLP 而言为 92.6%)。为了使重组蛋白和 APC 之间的相互作用可视化,通过共聚焦显微镜观察经处理的 APC。在两种情况下,免疫标记的 PapMVCP 信号清楚地为泡状 (胞质内和细胞核周围)。两种重组蛋白都在 APC 中有效地内化。

为了检验 PapMVCP VLP 诱导免疫应答的能力,将 C3H/HeJ 小鼠皮下注射 25 μ g 的重组 VLP (PapMVCP-E2) 或 25 μ g 的单体形式 (PapMVCP27-215-E2)。各剂量中存在的 E2 肽的量估计为 2 μ g。初次免疫后第 15 天给予加强剂量。分析小鼠血清的抗 PapMVCP、PapMVCP27-215 和抗 E2 肽的抗体。在第 12 天,在用 PapMVCP-E2 免疫的小鼠中清晰地检测到抗-CP IgG,而在用 PapMVCP27-215-E2 接种的小鼠的血清中,即使是在第 15 天给予加强剂量之后,也仅仅检测到微弱的抗-CP 水平 (图 14)。

实施例 V: PapMV 的佐剂效果

按照实施例 I 描述的方法纯化 PapMV。

抗原

不含 LPS 的 OVA Grade VI 购自 Sigma-Aldrich Chemical 公司 (St Louis, Mo)。鸡卵白溶菌酶 (HEL) 购自 Research Organics 公司 (Cleveland, OH)。源自大肠杆菌 O111:B4 的 LPS 购自 Sigma-Aldrich 公司 (St Louis, MO)。

免疫

将 6-8 周龄的 BALB/c 小鼠饲养并保持在墨西哥国立自治大学 (UNAM) 医学院实验医学系的动物实验室中,并遵照良好实验室规范指南进行饲养。为了研究佐剂的效果,在第 0 天单用 2 mg 的 OVA

或 HEL 或者与 30 mg 的 PapMV、CFA 1:1 (v/v) 或 5 mg 的来自大肠杆菌 O111:B4 的 LPS (Sigma-Aldrich) 联合对各组小鼠进行腹腔内免疫。对照小鼠仅注射盐水溶液。如图 15 所示, 在不同的时间从眼眶后静脉窦 (retro-orbital sinus) 采集血样。将各种血清样品贮存于 -20°C 下直至分析。每次试验使用 3 只小鼠。

通过 ELISA 测定抗体效价

用在 0.1M 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 (pH9.5) 中的 1 mg/毫升的 PapMV、100 mg/毫升的 HEL 或 150 mg/毫升的 OVA 涂覆 96 孔高结合性聚苯乙烯培养板 (Corning®, New York, NY)。将培养板在 37°C 下培养 1 小时, 然后在 4°C 下过夜。在次日使用之前, 将培养板用含有 0.05% Tween-20 的 PBS (pH7.2) (PBS-T) (Sigma-Aldrich) 清洗 3 次。在 37°C 下用 5% 的稀释于 PBS 中的脱脂奶粉 (PBS-M) 封闭非特异性结合 1 小时。清洗之后, 将小鼠血清以 1:40 在 PBS-M 中稀释, 并将 2 倍次序稀释液加到孔内。将培养板在 37°C 下培养 1 小时, 然后用 PBS-T 清洗 4 次。添加偶联过氧化酶的兔抗小鼠 IgM (优选以 1:1000 稀释) IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b 抗体 (Zymed 公司, San Francisco, CA) 或 Ig3 (优选以 1:3000 稀释) (Rockland 公司, Gilbertsville, PA), 然后将培养板在 37°C 下培养 1 小时并用 PBS-T 清洗 3 次。使用在 0.1 M 柠檬酸盐缓冲液 (含有 30% 的过氧化氢, pH5.6) 中的邻苯二胺 (0.5 mg/毫升; Sigma-Aldrich 公司) 作为酶底物。用 2.5 N 的 H₂SO₄ 终止反应, 并使用装有 BIOLINX 2.22 软件的自动 ELISA 培养板读取器 (Dynex Technologies MR11 公司, Chantilly, VA, USA) 测定在 490 nm 处的吸光度。抗体效价以 -Log₂ 稀释度 × 40 计算。阳性效价被定义为在阴性对照的平均值以上 3 SD。

结果

当将佐剂与免疫原性差的疫苗同时施用, 观察到固有免疫应答向抗体应答的转译 (translation)。佐剂是能够增强或提高抗体或细胞针对抗原的免疫应答的物质。为了确定 PapMV 是否是能够促进

对其它抗原的持久性抗体应答的佐剂，单用 OVA 或 HEL 或与下列佐剂联用免疫 BALB/c 小鼠：PapMV、CFA 或 LPS。在图 15A 和 15B 所表示的时间点，通过 ELISA 测量对 OVA 或 HEL 特异性的 IgG 抗体效价。在免疫动物内，根据对 OVA 和 HEL 的总 IgG 应答观察到 PapMV 的佐剂效果。在免疫后的第 30 天，观察到 PapMV 对 HEL 引起佐剂效果，此时与单用 HEL 引起的抗体效价相比，抗体效价增加了 8 倍。该抗体效价的差异维持至第 120 天但是在第 400 天则消失（图 15A）。尽管 LPS 仅仅在免疫后的前 30 天引起了佐剂效果，但是 CFA 在免疫后的第 8 天至第 400 天试验的终结显示了最强的佐剂效果（图 15A）。对于用 OVA 免疫，仅仅直至初次免疫后的第 120 天才观察到对总 IgG 抗体效价的佐剂效果，之后抗体效价随时间下降，并且与第 400 天的 OVA 相比，其抗体效价高 4 倍（图 15B）。在第 20 天进行进一步的分析以鉴别 OVA 和与佐剂共免疫的 OVA（其中 PapMV 并不表现出总 IgG 应答的佐剂效果）诱导何种 IgG 亚类。PapMV、LPS 和 CFA 产生了 OVA-特异性的 IgG2a 和 IgG2b 抗体效价，而单独的 OVA 只产生了 IgG1-特异性抗体效价（图 15C-E）。当将 OVA 与所用的任何一种佐剂共免疫时，没有观察到对 IgG1 的佐剂效果。这些结果显示，PapMV、LPS、和 CFA 对 IgG 亚类针对 OVA 应答的具有佐剂效果。此外，PapMV 显示了引起对模型抗原的特异性抗体效价持久性增加的佐剂性能。总而言之，这些数据表明 PapMV 具有内在的佐剂性能，其可能介导了所观察到的固有应答向持久的抗原特异性抗体应答的转译。

实施例 VI：伤寒沙门氏菌孔蛋白的纯化

下列纯化步骤用于纯化 OmpC 和 OmpF。该纯化步骤基于文献 Secundino 等.(2006), *Immunology* 117:59 描述的方法。

将两种蛋白从伤寒沙门氏菌中共纯化。使用敲除突变体的伤寒沙门氏菌实现对 OmpC 和 OmpF 各自的纯化，其中 OmpC[STYC171 (OmpC⁻)]或者 OmpF[STYF302 (OmpF⁻)]的开放阅读框被中断。就共纯化而言，用于从敲除突变体形式的细菌中纯化各蛋白的步骤如下

所示。该步骤概括如下：

在 37℃、200 rpm 的条件下使菌株伤寒沙门氏菌 9、12、Vi:d (ATCC 9993) 在补加酵母提取物、镁和葡萄糖的基本培养基 A (Minimal medium A) 中生长。10 L 补加酵母提取物、镁和葡萄糖的基本培养基 A 的配方是：5.0 g 的脱水柠檬酸钠 ($\text{NaC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、31.0 g 的磷酸二氢钠 (NaH_2PO_4)、70.0 g 的磷酸一氢钠 (Na_2HPO_4)、10.0 g 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、200 mL 5% 的酵母提取物溶液 (在 300 mL 中 15.0 g)。每个 4 L 的锥形烧瓶分配 1.434 L 培养基。在 121℃、15 磅压力/平方英寸的条件下进行 15 min 灭菌。然后各烧瓶中加入以下物质：6.0 mL 25% 的无菌 MgSO_4 溶液和 60.0 mL 12.5% 的葡萄糖溶液。将烧瓶与伤寒沙门氏菌培养物培养过夜并且当 OD_{540} 达到 1.0 时，停止培养，并将培养物在 4℃ 下以 7,500 rpm 离心 15 min。最后将粒状沉淀重新悬浮于 100 mL 的 pH7.7 的 Tris-HCl (6 g, Tris 碱/L)，并将生物质 (biomass) 在冰中超声 90 min 然后在 4℃ 下以 7,500 rpm 离心 20 min。向每 10 ml 上清液中加入以下物质：2.77 mL MgCl_2 1M、25 mL RNaseA (10,000 U/毫升)、25 mL DNaseA (10,000 U/毫升)。然后将该混合物在 37℃ 下以 120 rpm 培养 30 min。

按照以下方法从该混合物中提取孔蛋白：

1. 在 4℃ 下以 45,000 rpm 进行超速离心 45 min，保留粒状沉淀。
2. 将粒状沉淀重新悬浮于 10 mL 2% 的 Tris-HCl-SDS 中，之后均质化。
3. 在 32℃、120 rpm 的条件下进行 30 min 的培养步骤。
4. 在 20℃ 下以 40,000 rpm 进行超速离心 30 min，保留粒状沉淀。
5. 将粒状沉淀重新悬浮于 5 mL 2% 的 Tris-HCl-SDS 中，之后均质化。
6. 在 32℃、120 rpm 的条件下进行 30 min 的培养步骤。
7. 在 20℃ 下以 40,000 rpm 进行超速离心 30 min，保留粒状沉淀。
8. 将粒状沉淀重新悬浮于 20 mL 1% 的 Nikaido 缓冲液-SDS 中，之后均质化。[对于 1 L 的 Nikaido 缓冲液：将 6.0 g Tris 碱、10.0 g SDS、23.4 g NaCl、1.9 g EDTA 溶解于水中，并将 pH 调至 pH 7.7。然后加

入 0.5 mL β -巯基乙醇溶液]

9. 在 37°C、120 rpm 的条件下培养混合物 120 min。

10. 在 20°C 下以 40,000 rpm 进行超速离心 45 min。回收含有孔蛋白提取物的上清液。

使用快速蛋白液相色谱法 (FPLC) 从该上清液中纯化孔蛋白。在纯化过程中使用不含 β -巯基乙醇的 0.5X Nikaido 缓冲液 (参见上文)。使用 Sephacryl S-200 (FPLC WATERS 650 E) 以 10 ml/分钟的流速分离孔蛋白。使用 22 mL 上清液上柱。在 260 nm 和 280 nm 处监测洗脱组分。保留含有纯化的孔蛋白的主峰并在 4°C 下贮存。纯化的孔蛋白在长时间内 (超过一年) 稳定。

结果: 图 16B 示出通过上述步骤纯化的孔蛋白 OmpC 和 OmpF 的 SDS-PAGE 图。

实施例 VII: 包含亲和肽的 PapMV VLP 的制备和改造 亲和肽的选择

使用 Ph.D-7 噬菌体展示肽实验室试剂盒 (New England Biolabs 公司) 来选择针对纯化的 OmpC 和 OmpF 的特异性肽。所采用的方案是被称为“淘洗” (panning) 的体外选择过程, 其按照制造商的说明书进行。简言之, 将 2×10^{11} 的噬菌体加到结合到 ELISA 板的孔的底部的 10 μ g 纯化的 OmpC 或 OmpF 中, 并将孔的内容物在室温下轻轻混合 1 小时。通过在室温下培养 10 min, 用 1 mL 200 mM 的甘氨酸-HCl (pH2.2) 洗脱没有结合的噬菌体。为了中和上清液并避免杀死噬菌体, 加入 150 μ L 的 1 M 的 Tris-HCl (pH9.1)。然后扩增洗脱的噬菌体, 并使其通过额外的结合/扩增循环, 以富集有利于结合序列的噬菌体群。用于第一轮淘洗的清洗缓冲液含有 0.1% 的 Tween 20, 并将其浓度在随后几轮中增加至 0.5%。在每一轮的淘洗之间, 将选择的噬菌体在大肠杆菌 ER2738 中扩增。该循环重复 3 次以选择对各孔蛋白具有最高亲和性的那些蛋白。这样鉴定的肽如表 6 所示。

表 6: OmpC 和 OmpF 亲和肽的序列和出现频率

靶蛋白	肽的序列	频率	SEQ ID NO
OmpC	SLSLIQT	1/8	21
OmpC	EAKGLIR	6/8	22
OmpC	TATYLLD	1/8	23
OmpF	FHENWPS	3/5	24
OmpF	FHEFWPT	2/5	25

与选择的亲和肽融合的高亲和力 PapMV VLP 的改造、表达和纯化

从以上淘洗过程中鉴定的那些肽中选择出一种亲和肽以用于各孔蛋白 (OmpC 和 OmpF)。在 PapMV 外壳蛋白 (CP) 的 C-端处克隆相应的 DNA 序列。使用 PapMV CP CP Δ N5 (Tremblay, M-H.等, 2006, *FEBS J.*, 273:14-25; 参见实施例 I) 作为模板。使用 PCR 将编码所选的各肽的序列引入并克隆至 pET-3D 表达载体 (Stratagene 公司, La Jolla, CA)。简言之, 在 PCR 反应中, 使用正向引物 (SEQ ID NO:37; 如下) 和引物 PapOmpC (SEQ ID NO:38; 如下), 并且使用 PapMV CP 基因 PapMV CP CP Δ N5 作为模板。

正向引物:

5'-ATCGCCATGGCATCCACACCCAACATAGCCTTCCCCGCC
ATCACC-3' [SEQ ID NO: 37]

PapOmpC (反向引物):

3'-GGTTAAGGAAGGTGGGGGGCTTCTCCGCTTCCCCAACTA
AGCATGGTAGTGGTAGTGGTAATCATTCTAGGTGAC-5' [SEQ
ID NO: 38]

得到的 PCR 片段含有在 PapMV CP 的 C-端融合的肽 EAKGLIR。以相同的方法, 使用正向引物 (SEQ ID NO:37) 和引物 PapOmpF (SEQ ID NO:41; 如下) 通过 PCR 在 PapMV CP 的 C-端处引入融合的肽 FHENWPS。

PapOmpF (反向引物):

3'-GGTTAAGGAAGGTGGGGGGCTTAAAGTACTCTTAACCG

GAAGCGTGGTAGTGGTAGTGGTAATCATTCTAGGTGAC-5'

[SEQ ID NO: 41]

将两个 PCR 片段分别用限制性酶 NcoI 和 BamHI 消化并克隆至以相同的酶消化的 pET3-D 载体。对克隆进行测序以证实该肽在 PapMV CP 的框架内。

按照前述的方法 (Tremblay, M-H 等, 2006, *FEBS J.*, 273:14-25; Secundino 等, 2006, *Immunology* 117:59), 将包含亲和肽的改造的 PapMV CP 在大肠杆菌 BL21 RIL 中表达。简言之, 通过弗氏细胞破碎机使细菌裂解, 并上 Ni²⁺柱上, 用 pH 8 的 10 mM Tris-HCl、50 mM 咪唑、0.5% Triton X100 清洗, 然后用 pH 8 的 10 mM Tris-HCl、50 mM 咪唑、1%两性清洗剂清洗, 以除去内毒素污染物。将洗脱的蛋白在 Beckman 50.2 TI 转子中进行高速离心 (100 000 g) 120 min。将 VLP 粒状沉淀在无内毒素的 PBS (Sigma) 中重新悬浮。在使用前将蛋白用 0.45 μm 的过滤器过滤。通过 SDS-PAGE 测定蛋白的纯度。使用 BCA 蛋白试剂盒 (Pierce) 评价蛋白的量。按照制造商的说明 (Cambrex), 用鲎试验评价纯化的蛋白中的 LPS 的水平, 并且结果为低于 0.005 内毒素单位 (EU) /μg 蛋白。

该两种 PapMV 外壳蛋白的序列如图 22 所示 (SEQ ID NO:42-包含 OmpC 亲和肽的 PapMV 外壳蛋白(图 22A), 和 SEQ ID NO:43-包含 OmpF 亲和肽的 PapMV 外壳蛋白(图 22B))。与野生型相比, 在包含 OmpC 亲和肽的 PapMV 外壳蛋白的外壳蛋白序列中观察到两个氨基酸差异(在图 22A 中以黑体和下划线标出), 这可能是在 PRC 反应期间引入的。

ELISA

对于各验, 使用 10 μg 的各个靶蛋白 (OmpC 或 OmpF) 涂覆 ELISA 板。将增加量的 PapMV VLP 用于结合分析。使用针对 PapMV CP 的多克隆鼠抗体和与偶联过氧化酶的二级抗小鼠抗体来揭示 VLP 对它们的靶蛋白的亲和性。

结果

亲和肽的选择

使用噬菌体展示技术来选择与 OmpC 或 OmpF 结合的特异性肽。对结合至 OmpC 的 8 个噬菌体和结合至 OmpF 的 5 个噬菌体进行测序。这些肽的序列和出现频率如表 6 所示。肽 EAKGLIR [SEQ ID NO:22]显示了最高的频率，因此被选为 OmpC 的亲肽。肽 FHENWPS [SEQ ID NO:23]在 OmpF 筛选中频率最高，因此被选为 OmpF 的亲肽。有趣的是，OmpF 的两种亲肽是同源的，这是因为 7 个氨基酸中有 5 个是相同的并在亲肽的相同的位点出现。

高亲和力 PapMV VLP 的合成

将肽序列 EAKGLIR [SEQ ID NO:22]和 FHENWPS [SEQ ID NO:23]融合至 PapMV 外壳蛋白的 C-端（图 16A）。所述融合肽连接有 6XH 标记物以利于纯化过程（Tremblay, M-H.等, 2006, *ibid.*）。将重组构建体在大肠杆菌中表达并通过使用 Ni^{2+} 柱的亲和色谱来纯化。将该蛋白用 500 mM 的咪唑洗脱、透析并以 100,000 g 超速离心，以使 VLP 形成粒状沉淀（图 16B）。电子显微镜（EM）观察证实，在 PapMV CP 的 C-端引入所述肽并不影响该蛋白自组装成 VLP 的能力（图 16C）。VLP 的长度是可变的，尺寸在 201 ± 80 nm 范围内。201 nm 长度的蛋白代表 560 个 CP 拷贝，所述 CP 以重复的形式呈现该肽。

通过 ELISA 型结合试验来显示各 PapMV VLP 与它们各自的抗原的高亲和力。对于两种 VLP，已经清楚地证明其与它们各自的抗原的结合，并且所述的结合随着在分析中使用的 VLP 的量而增加（图 17A-B）。因此，推断当在溶液中以 1:1 的比率混合时，PapMV VLP 将结合同类的抗原以形成复合体。

实施例 VIII: 具有高亲和力 PapMV VLP 对伤寒沙门氏菌的免疫小鼠

使用 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠（Harlan, Mexico 或 Charles River, Canada），并饲养于墨西哥国家自立大学(UNAM)的医学院实

验医学系的动物设施或者拉瓦尔大学附属医院 (Centre Hospitalier de l'Université Laval) 的动物设施内。

攻击试验

在不存在外部佐剂的情况下, 用 10 μg OmpC、10 μg OmpC + 10 μg PapOmpC、10 μg OmpF、10 μg OmpF + 10 μg PapOmpF、10 μg PapOmpC、10 μg PapOmpF 或盐水(ISS)对小鼠 (每组 10 只) 进行腹腔内 (i.p) 免疫 (第 0 天)。在第 15 天, 分别用无佐剂的 10 μg OmpC 或 10 μg OmpF 使小鼠接受腹腔内加强免疫。在第 25 或 140 天, 用 100 或 500 LD_{50} 的伤寒沙门氏菌 (ATCC 9993) 对小鼠进行腹腔内攻击, 所述伤寒沙门氏菌重新悬浮于 500 μL 含有 5% 胃膜素 (Sigma) 的 TE 缓冲液 (50 mM Tris, pH 7.2、5mM EDTA) 内。将保护率定义为攻击 10 天之后的存活百分比。1 LD_{50} 在 90 000 CFU 的条件下确定。

免疫

在不存在外部佐剂的情况下, 用 10 μg OmpC、10 μg OmpC + 10 μg PapOmpC、10 μg PapOmpC 或等渗盐水(ISS)对小鼠 (每组 5 只) 进行腹腔内 (i.p) 免疫 (第 0 天)。在第 15 天, 用无佐剂的 10 μg OmpC 使小鼠接受腹腔内加强免疫。在图 18 和 19 所示的不同的时间从颈静脉采集血样。将各种血清样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存直至分析。

ELISA

用在 0.1 M 的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 (pH9.5) 中的 10 μg /毫升的 OmpC 涂覆 96 孔高结合性聚苯乙烯培养板 (Nunc)。将培养板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 1 小时, 然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜。将培养板用蒸馏水-0.1% Tween-20 清洗 4 次。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下用封闭缓冲液 (PBS pH 7.4 -2% BSA(Sigma)) 封闭非特异性结合 1 小时。清洗之后, 将混合的小鼠血清以 1:40 在封闭缓冲液中稀释, 并将 2 倍次序稀释液加到孔内。将培养板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 1.5 小时, 然后清洗 4 次。添加 HRP 偶联的

山羊抗小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b (Jackson Immunochemicals) 或 IgG3 (Rockland) (1:10 000), 并在 37°C 下培养 1 小时, 然后清洗 4 次。作为检测体系, 使用 TMB 过氧化酶底物 (Fitzgerald)。在 37°C 下于黑暗中培养 10 分钟之后, 用 2.5 N 的 H_2SO_4 终止反应, 并使用自动 ELISA 培养板读取器测定在 450 nm 处的吸光度。抗体效价以 $-\log_2$ 稀释度 $\times 40$ 计算。将阳性效价定义为在阴性对照的平均值以上的 3 SD。

被动免疫和攻击

在不存在外部佐剂的情况下, 用 10 μ g OmpC、10 μ g OmpC + 10 μ g PapMV OmpC、10 μ g PapMV OmpC 或等渗盐水 (ISS) 对小鼠 (每组 5 只) 进行腹腔内免疫 (第 0 天)。在第 15 天, 用无佐剂的 10 μ g OmpC 使小鼠接受腹腔内加强免疫。在第 23 天进行心脏穿刺, 并收集各组的血清样品, 然后在 -20°C 下贮存。使未试验过的小鼠 (每组 5 只) 腹腔内接受 200 μ L 收集的补体失活的免疫血清。在转移 3 小时后, 按照上述的方法将小鼠用重新悬浮在粘蛋白中的 100 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌攻击。将保护率定义为攻击 10 天后的存活百分比。

结果

PapMV VLP 提高了孔蛋白的保护能力

之前已表明纯化的蛋白 OmpC 和 OmpF 在小鼠中提供对伤寒沙门氏菌攻击的保护, 其中单用 OmpC 提供对 100 LD₅₀ 的 60% 保护率 (Secundino 等, 2006, *Immunology* 117:59)。为了提高每一种孔蛋白 (OmpC 和 OmpF) 各自的免疫原性, 制备包含 PapMV VLP 的疫苗制剂。测试两种不同的制剂 PapMV OmpC VLP + OmpC 和 PapMV OmpF + OmpF 在小鼠中对 100 和 500 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌的保护能力, 并将结果与单用 OmpC 或 OmpF 免疫小鼠获得的结果相比较。所述 PapMV VLP 与其孔蛋白的比率保持在 1:1。

在用 100 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌攻击的情况下, 向 OmpC 添加 PapMV OmpC VLP 将 OmpC 的保护能力从 70% 提高为 100% (图

18A)。当用 500 LD₅₀ 攻击小鼠时,保护效力的提高甚至更大,其中当 OmpC 与 PapMV OmpC VLP 联用时,观察到保护率从 30%增加至 90%(图 18C)。类似地,使用 100 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌攻击时,PapMV OmpF VLP 将 OmpF 的保护能力从 60%提高至 90%(图 18B)。但是,当用 500 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌进行攻击时,只观察到较小的差异(图 18D)。结果表明对于针对伤寒沙门氏菌攻击的保护,OmpC 是比 OmpF 更好的抗原。在两种情况下,PapMV VLP 显著地提高了孔蛋白的保护能力。

为了确定 PapMV VLP 是否提高了对 OmpC 的抗体效价,测量使用 10 µg OmpC 或使用含有 10 µg OmpC 和 10 µg PapMV OmpC VLP 的接合疫苗接种的小鼠的 IgG 效价。在任何一种处理情况下都没有发现不同的 IgG 同种型 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 的效价的显著差异(图 19A-D),这表明在使用 PapMV VLP 的情况下,所观察到的保护的提高可能与 CTL 应答和/或抗体在抗伤寒沙门氏菌感染时的结合效力的提高有关,而非增加了抗体本身的产率。

接种 PapMV VLP 提高了对孔蛋白的记忆应答

为了评价包含 PapMV VLP 以及 OmpC 的疫苗制剂的记忆应答,单用 OmpC 或用包含 PapMV OmpC VLP 和 OmpC 的疫苗制剂每隔两周免疫小鼠两次,接着在第 15 天单用 OmpC 加强免疫。在第 140 天,将小鼠用 100 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌攻击。结果清楚地显示,用包含 PapMV OmpC VLP 和 OmpC 的疫苗制剂初次显著地提高(3 倍提高)了接种小鼠的保护能力(图 19E)。因而,该试验证明,PapMV VLP 不仅提高了小鼠对伤寒沙门氏菌攻击的保护,还提供了更好的记忆应答。

实施例 IX: PapMV 和 OmpC 的组合针对伤寒沙门氏菌的保护能力

按照实施例 I 描述的方法纯化 PapMV。

保护试验

在第 0 天用 10 μg OmpC 或者之前已经与 30 μg PapMV 在 4°C 下培养 1 小时的 10 μg OmpC 腹腔内接种 BALB/c 小鼠（每组 10 只）。在第 15 天单用 10 μg OmpC 进行加强接种。对照小鼠仅注射盐水。在第 21 天，将小鼠用悬浮于 5% 的粘蛋白（如上所述）中的 100 和 500 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌（STYC302 DompF 菌株）攻击，并按照之前描述的方法（Isibasi 等, 1992, *Vaccine* 10:811-813; Isibasi 等, 1988, *Infect. Immun.* 56:2953-2959），监测攻击 10 天之后的存活率。

结果

为了测试从受感染的植物中分离的 PapMV 病毒在增强由 OmpC 提供的保护方面的佐剂能力，将用 OmpC 免疫和用混合有 PapMV 纯化病毒的 OmpC 免疫、随后都用伤寒沙门氏菌攻击的小鼠进行比较。与单用 OmpC 的情况相比，当使用混合有 PapMV 纯化病毒的 OmpC 时，在用 100 LD₅₀ 或 500 LD₅₀ 的伤寒沙门氏菌攻击之后，观察到存活率高出 30%（图 20A）。在第 0 天和第 15 天仅用 PapMV 免疫并在第 21 天攻击的小鼠中没有观察到保护（图 21A），在用 PapMV 免疫并在 24 小时后攻击的小鼠中也没有观察到保护。这些数据排除了观察到的保护是由于 PapMV 诱导炎症增强所致的想法。为了测试增加的保护是否与对 OmpC 特异性的抗体效价的增加相关，测试了 PapMV 对 OmpC-特异性抗体效价的佐剂效果。PapMV 与 OmpC 共免疫引起了抗 OmpC 的 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 的效价增加（图 21B）。这些结果进一步证实，PapMV 的佐剂性能增强了由 OmpC 引发的固有免疫应答以及适应性免疫应答，从而实现对伤寒沙门氏菌攻击的保护。因此，可以将 PapMV 和伤寒沙门氏菌 OmpC 孔蛋白的同时施用视为增强对伤寒沙门氏菌攻击的保护能力。

实施例 V-IX 概括的试验结果表明，PapMV 具有内在的佐剂性能，该性能能够引起抗原特异性免疫球蛋白的转换，提供对模型抗原的持久性抗体应答，并且增强了单用 OmpC 或 OmpF 的保护能力。这些数据表明，PapMV 和 PapMV VLP 增强了由 OmpC 孔蛋白引发的固有免疫应答和适应性免疫应答向对伤寒沙门氏菌攻击的保护的

转译。

实施例 X: 含有伤寒沙门氏菌孔蛋白抗原表位的 PapMV VLP 的免疫原效果

已经表明, 暴露于细菌表面上的伤寒沙门氏菌孔蛋白的环 6 和环 7 对应的两个小的抗原表位参与通过孔蛋白免疫引发的保护机制 (Panigua-Solis 等, 1995, *Immunol Infect. Dis.* 5:244-249)。这些区域仅存在于伤寒沙门氏菌的孔蛋白中, 因此没有发现其与其它革兰氏阴性菌的孔蛋白具有交叉反应性。因此, 包含这些抗原表位的孔蛋白片段代表了用于开发利用 PapMV VLP 作为佐剂-载体的重组亚单位疫苗的优异候选抗原。

重组 PapMV VLP 的制备

将 PapMV 外壳蛋白进行改造, 以在其 C-端处引入氨基酸序列 GTSNGSNPSTSYGFAN [SEQ ID NO:50], 该序列包含源自伤寒沙门氏菌孔蛋白的免疫显性的环 6 抗原表位 (参见图 23A)。使用前面的实施例所述的方法将该重组蛋白在大肠杆菌中表达 (参见图 23B)。简言之, 在 PCR 反应中, 以 PapMV CP CP Δ N5 基因为模板, 使用正向引物 (SEQ ID NO:44; 如下) 和反向引物 (SEQ ID NO:45; 如下)。

正向引物:

5'-CTAGTGGTACTTCTAACGGTTCTAACCCGTCTACTTCTTACGGTTTCGCGAACA-3' [SEQ ID NO: 44]

反向引物:

5'-CTAGTGTTTCGCGAAACCGTAAGAAGTAGACGGGGTTAGAACCGTTAGAAGTACCA-3' [SEQ ID NO: 45]

如前面的实施例所述, 通过 Ni²⁺亲和性标记物层析从大肠杆菌中纯化重组蛋白, 并且其表现出自组装成与从受感染的植物叶子中纯化的天然病毒颗粒类似的 VLP (参见图 23C)。

包含环 6 肽的 PapMV 外壳蛋白的氨基酸序列 (PapMV-环 6) 如

图 24A (SEQ ID NO:46) 所示, 并且编码 PapMV-环 6 蛋白的核苷酸序列如图 24B (SEQ ID NO:47) 所示。

Balb/c 小鼠中对 PapMV-环 6 的免疫应答

使用 6-8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 (Harlan, Mexico 或 Charles River, Canada), 并将其饲养在拉瓦尔大学附属医院的动物设施内。在不存在外部佐剂的情况下, 用 100 μ g PapMV-环 6 对小鼠通过皮下途径 (s.c.) 进行免疫 (第 0 天)。在第 15 天, 用 100 μ g PapMV-环 6 使小鼠接受皮下加强免疫。在第 28 天采集最终的血样并使用合成的环 6 肽和纯化的 OmpC 蛋白通过标准的 ELISA 测定免疫应答。

结果证实, PapMV 平台具有高度的免疫原性 (图 25A), 因为其在 5 只小鼠的 4 只中触发了环 6 特异性抗体的产生。尽管 PapMV-环 6 VLP 在 5 只处理的小鼠中触发了针对 PapMV 平台的大量抗体 (图 25B), 但是同样的血清并未表现出对纯化的 OmpC 蛋白的反应 (图 25C)。该结果表明在 PapMV CP 融合体中的环 6 肽的结构可能采用了与该肽在 OmpC 蛋白的固有环境中略微不同的构型。

为了容许环 6 肽序列在融合至 PapMV CP 时采用其固有构型, 将上文的序列 (SEQ ID NO:50) 克隆至 PapMV CP 的残基 49-52 之间的内环中。使用生物信息学技术鉴定用于此目的环。

实施例 XI: 与伤寒沙门氏菌 OmpF 组合的 PapMV VLP 的保护能力

本试验使用实施例 VII、VIII 和 IX 中所描述的下列蛋白:

- PapMV CP Δ N5 VLP (“PapMV”) (参见图 1C)
- 包含针对伤寒沙门氏菌 OmpF 的亲肽的 PapMV OmpF VLP (参见图 22B)
- OmpF (参见图 21B)

在第 0 天, 将 Balb/c 小鼠 (每组 10 只) 按照如下方法进行腹腔内 (i.p.) 免疫:

组 1-10 μ g OmpF

组 2-10 μg OmpF + 10 μg PapMV

组 3-10 μg OmpF + 10 μg PapMV OmpF

组 4-10 μg PapMV

组 5-10 μg PapMV OmpF

在第 15 天, 对组 1、2 和 3 使用 10 μg OmpF 进行第二免疫(加强免疫)。组 4 用 10 μg PapMV 加强免疫, 组 5 用 10 μg PapMV OmpF 加强免疫。在第 21 天用伤寒沙门氏菌进行攻击。通过试验确立, 粘蛋白中的 90 000 CFU 的伤寒沙门氏菌对应于 1 LD₅₀。在第 31 天杀死所有的小鼠。

结果

在 77 LD₅₀(图 26A)的条件下, 所有含有 OmpF 的制剂提供 100% 的保护率。正如预料的那样, 用不含 OmpF 的制剂接种的小鼠在攻击(剂量低至 14 LD₅₀)数天内全部死亡。但是, 当用更高剂量的伤寒沙门氏菌(378 LD₅₀)攻击小鼠时, 在含有 OmpF 的制剂之间观察到差异。如图 26B 所示, 在该剂量下最有效的制剂是用 PapMV OmpF+OmpF 的组合(组 3)第一免疫和单用 OmpF 加强免疫。与单用 PapMV 作为 OmpF 的佐剂相比, 可能是 PapMV OmpF VLP 对其靶 OmpF 具有高的亲和力, 从而提高了保护能力。

该数据与实施例 VIII 中所示的情况相一致, 并且证实了 PapMV OmpF 提高了 OmpF 对伤寒沙门氏菌攻击的保护能力。此外, 该数据显示, PapMV OmpF 是比没有亲和肽的 PapMV VLP 更好的佐剂。如上所述, 可能是 PapMV OmpF VLP 对 OmpF 较强的结合力促进了 VLP-OmpF 复合体的形成, 这又使 VLP 分子的佐剂能力最大化。

实施例 XII: 与伤寒沙门氏菌 OmpC 组合的 PapMV VLP 的保护能力

本试验使用实施例 VII、VIII 和 IX 中所描述的下列蛋白:

- PapMV CPΔN5 VLP (“PapMV”) (参见图 1C)
- OmpC (参见图 21A)

构建包含 OmpC 亲和肽 EAKGLIR [SEQ ID NO:22]的另一个 PapMV CP 融合体,所述融合体包含额外的 4 个氨基酸,在亲和肽的每一侧各有 2 个(如图 27A 所示,在 N-端一侧是 TR 并且在 C-端一侧是 TS)。这些氨基酸是限制性位点 SpeI-MluI 存在的结果,其中所述限制性位点被用于与 PapMV CP 融合的亲和肽的克隆。将上述构建体命名为“PapMV SM OmpC”。图 28A 提供了 PapMV SM OmpC 蛋白的完整氨基酸序列(SEQ ID NO:48),并且图 28B 提供了编码 PapMV SM OmpC 蛋白的核苷酸序列(SEQ ID NO:49)。

按照上述实施例描述的方法纯化 PapMV SM OmpC 蛋白(参见图 27B)。正如预料的那样,通过电子显微镜,纯化的该蛋白显示了 VLP 的形成(图 27C)。

免疫

在第 0 天,将 Balb/c 小鼠(每组 10 只)按照如下方法进行腹腔内(i.p.)免疫:

组 1-10 μ g OmpC

组 2-10 μ g OmpC + 10 μ g PapMV

组 3-10 μ g OmpC + 10 μ g PapMV OmpC

组 4-10 μ g PapMV

组 5-10 μ g PapMV OmpC

在第 15 天,在组 1、2 和 3 中使用 10 μ g OmpC 进行第二免疫(加强免疫)。组 4 用 10 μ g PapMV 加强免疫,组 5 用 10 μ g PapMV OmpC 加强免疫。在第 21 天用伤寒沙门氏菌进行攻击。通过试验确立,粘蛋白中 90 000 CFU 的伤寒沙门氏菌对应于 1 LD₅₀。在第 31 天杀死所有的小鼠。

结果

在 105 LD₅₀(图 29A)的条件下,所有含有 OmpC 的制剂提供 100%的保护率。正如预料的那样,用不含 OmpC 的制剂接种的小鼠

在攻击（剂量低至 20 LD₅₀）的数天内全部死亡。但是，当用更高剂量的伤寒沙门氏菌（520 LD₅₀）攻击小鼠时，在含有 OmpC 的制剂之间观察到差异。如图 29B 所示，在该剂量下最有效的制剂是用 PapMV + OmpC 的组合（组 2）第一免疫和单用 OmpC 加强免疫。包含与 OmpC 结合的 PapMV SM OmpC VLP 的制剂（组 3）也表现良好，但是似乎效果略逊于 PapMV + OmpC 的组合。但是，在本试验中，不能确定效力的差异是否足以具有统计学显著意义。

总而言之，如实施例 VII、XI 和 XII 所示，具有或没有亲和肽的重组 PapMV VLP 能够用作分别提高对伤寒沙门氏菌的两种不同抗原 OmpC 和 OmpF 的保护能力的强的佐剂。

实施例 XIII：伤寒沙门氏菌孔蛋白的稳定性

通过标准的 SDS-PAGE 评价伤寒沙门氏菌的纯化孔蛋白的稳定性。使用 2 种孔蛋白样品。第一种样品包含 OmpC 以及 OmpF 纯化蛋白（批次 ISIPOR）并在 1999 年 11 月 9 日制备（该制剂与文献 Salazar-Gonzales 等, 2004, *Immunology Letters* 93 的图 1（b）中所示的制剂相一致）。第二种样品仅包含纯化的 OmpC 蛋白（批次 1239）并在 2007 年 4 月 30 日制备。

将两种样品在 4±3℃ 下避光贮存于 PBS 溶液（pH 7.4±0.1）中。通过下列条件进行 SDS-PAGE：

- 12%的丙烯酰胺。
- 在上样至凝胶上之前，通过加入 β-巯基乙醇并在 95℃ 加热 5min 将所有的样品变性。

该结果如图 30 所示。从该图可以看出，两种孔蛋白制剂都十分稳定。由于没有通过 SDS-PAGE 看到降解迹象（参照图 30A 和 30B），因此 ISIPOR 似乎在超过 9 年（从 1999 至 2008）的时间内都非常稳定。纯化的 OmpC 也表现出高的稳定性，其中蛋白在贮存 9 个月之后保持完整（参照图 30C 的左栏和右栏）。

实施例 XIV：PapMV 在体内引起了 DC、巨噬细胞和 B 细胞的

活化标志物的上调

按照实施例 I 中描述的方法纯化 PapMV。

DC、巨噬细胞和 B 淋巴细胞的体内活化试验

用分别混悬在 500 μ l 盐水中的 30 μ g PapMV 和 50 μ g 聚肌胞苷酸 (Poly I:C) 腹腔内免疫 BALB/c 小鼠 (7 周龄)。使用盐水 (500 μ l) 作为对照, 并在免疫 24 小时后获取淋巴结和脾脏。从这些器官制备细胞悬浮液, 并使用藻红蛋白 (PE)-CD 11c、别藻蓝蛋白-CD 11b、B220-多甲藻叶绿素蛋白 (PerCP)、FITC-CD80、FITC-CD86、FITC-CD40、FITC-CD69 和 FITC-主要组织相容性复合体 II 类 (MHC II 类) 抗体 (全部购自 BD Pharmingen 公司) 进行流式细胞术染色。

结果

据信 PapMV 作为病原相关分子模式 (PAMP) 而被免疫系统识别, 因此, 如同其它的模式识别受体 (PRR) 激动剂那样, 它也应该促进不成熟的 DC 成熟化或者活化 APC。为了表征 PapMV 在体内刺激 APC 的能力, 分离用 PapMV 免疫的小鼠的淋巴结和脾脏, 并分析共刺激和活化分子 (CD80、CD86、CD40、CD69 以及 MHC II 类) 的上调。如图 31 所示, PapMV 引起了淋巴结 (LN) DC (CD11c+CD11b-) 中的 CD80 和 CD69 以及脾脏 DC 中的 CD40 和 CD69 的上调。对于巨噬细胞 (CD11c- CD11b+), 在 LN 中观察到 CD80 和 CD69 的上调, 而在脾脏中观察到 CD40 和 CD69 的上调。在 LN B 淋巴细胞 (CD11c- B220+) 中 CD69 上调, 而在脾脏 B 细胞中 CD40 和 CD69 上调。TLR-3 激动剂 (聚肌胞苷酸) 引起所测试的标志物的上调, 但是所观察到的曲线与由 PapMV 所引起的情况显著不同 (图 31)。

APC 针对 T 细胞的抗原提呈已经显示出固有免疫系统对活化适应性免疫系统的重要性。观察到载有 PapMV 的 APC 有效地引起抗体应答。这些数据以及 PapMV 对 APC 引起的效果 (图 31) 表明, PapMV 刺激的 APC 提供了促进有效的 T 细胞依赖性抗体应答所需要

的抗原和细胞因子环境，并且这可能是由 PapMV 传递的内在佐剂信号转译成已观察到的持久性抗体应答所涉及的机制。PapMV 可能作为 PAMP 和作为抗原（Pamptigen）被免疫系统所感知，同时活化固有免疫系统和适应性免疫系统，这将有利于诱导记忆间隔（memory compartment）。Pamptigen 还可以结合特异性 B 细胞上的 BCR 和 PRR（例如 TLR），从而导致抗体分泌性细胞的分化或记忆 B 细胞的产生。Pamptigen 可以降低活化免疫应答所需要的抗原阈值。因此，少量的持久性抗原可以保持高的抗体效价。

PapMV 的强的免疫原性和内在佐剂性能可以转译成针对 PapMV 和共免疫的模型抗原的持久的特异性抗体应答（参见实施例 IX）。由于 PapMV 可以用经济的过程制备并且在室温下稳定，因此其非常适合于开发诱导持久性免疫的新的佐剂和疫苗平台。

尽管已经结合某些的具体实施方案描述了本发明，但是在不背离本发明的精神和范围的情况下，其各种修改对本领域的技术人员是显而易见的。对本领域技术人员显而易见的所有这些修改都意图包含在所附的权利要求的范围内。

<110> 弗利亚生物技术公司

康斯坦丁诺·三世·罗伯托·洛佩斯-马西亚斯

<120> 抗伤寒沙门氏菌和其它肠细菌病原体的基于番木瓜花叶病毒的疫苗

<130> VI-090902-59

<140> PCT/CA2008/000154

<141> 2008-01-28

<150> 60/886,873

<151> 2007-01-26

<160> 54

<170> FastSEQ for -Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 215

<212> PRT

<213> 番木瓜花叶病毒

<400> 1

```

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

```

	180		185		190
Ser	Ala Phe Ile Thr Lys Gly Gln Ile Ser Gly Ser Thr Pro Thr Ile				
	195		200		205
Gln	Phe Leu Pro Pro Pro Glu				
	210		215		

<210> 2

<211> 648

<212> DNA

<213> 番木瓜花叶病毒

<400> 2

```

atgtctaagt caagtatgtc cacacccaac atagccttcc ccgccatcac ccaggaacag 60
atgagctcga ttaaggtcga tccaacgtcc aatcttctgc cctccaaga gcagttaaag 120
tcagtgtcca cctcatggt agctgctaag gttccagcag ccagtgttac aactgtggca 180
ttggagtgg tcaacttctg ctatgacaat gggtcagcgc cgtacaccac agtgactggc 240
ccatcatcaa taccggagat atcactggca caattggcta gtattgtcaa agcttccggc 300
acttccctta gaaaattctg ccggtacttc gcgccaataa tctggaatct gaggacggac 360
aaaatggctc ctgccaattg ggaggcttca ggatacaagc caagcgccaa atttgccgcg 420
ttcgacttct tcgacggggt ggagaatccg gcggccatgc aaccccttc gggactaatc 480
aggtcgccga cccaggaaga gcggattgcc aatgctacca acaaacaggt gcattctctc 540
caagccgcgg cacaggacaa caactttacc agcaactccg ctttcatcac caaaggccaa 600
atttctgggt caacccaac catccaattc ctccacccc ccgaataa 648

```

<210> 3

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的 PapMV 外壳蛋白 CPdeltaN5

<400> 3

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

130 135 140
Asn Pro Ala Ala Met Gln Pro Pro Ser Gly Leu Thr Arg Ser Pro Thr
145 150 155 160
Gln Glu Glu Arg Ile Ala Asn Ala Thr Asn Lys Gln Val His Leu Phe
165 170 175
Gln Ala Ala Ala Gln Asp Asn Asn Phe Ala Ser Asn Ser Ala Phe Ile
180 185 190
Thr Lys Gly Gln Ile Ser Gly Ser Thr Pro Thr Ile Gln Phe Leu Pro
195 200 205
Pro Pro Glu
210

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 源自伤寒沙门氏菌孔蛋白的环 6 肽

<400> 4
Gly Thr Ser Asn Gly Ser Asn Pro Ser Thr
1 5 10

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 源自伤寒沙门氏菌孔蛋白的环 7 肽

<400> 5
Lys Asp Ile Ser Asn Gly Tyr Gly Ala Ser Tyr Gly Asp Gln
1 5 10

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 6
Thr Arg Val Ala Phe Ala Gly Leu
1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 7

Arg Asn Thr Asp Phe Phe Gly Leu

1

5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 8

Arg Asn Ser Asp Phe Phe Gly Leu

1

5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 9

Thr Arg Leu Ala Phe Ala Gly Leu

1

5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 10

Thr Arg Leu Gly Phe Ala Gly Leu

1

5

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 11
 Ser Asp Asp Lys Gly Ser Asp
 1 5

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 12
 Asn Gln Thr Glu Gly Ser Asn Asp Ser
 1 5

<210> 13
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 13
 Asn Tyr Gly Val Thr Tyr Asp Val Thr Ser Trp Thr Asp Val Leu Pro
 1 5 10 15
 Glu Phe Gly Gly Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Asn Phe Met Gln Gln Arg
 20 25 30
 Gly Asn

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 14

Gly Ser Val Ser Gly Glu Asn Thr Asn Gly Arg Ser Leu Leu Asn Gln
1 5 10 15

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 15

Arg Thr Ala Asp Gln Asn Asn Thr Ala Asn Ala Arg Leu Tyr Gly Asn
1 5 10 15
Gly Asp Arg

<210> 16

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 16

Asn Ala Thr Arg Phe Gly Thr Ser Asn Gly Ser Asn Pro Ser Thr Ser
1 5 10 15
Tyr Gly Phe Ala Asn
20

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 17

Asp Ile Ser Asn Gly Tyr Gly Ala Ser Tyr Gly Asp Gln Asp Ile Val
1 5 10 15
Lys

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

<220>
<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<400> 18
Asn Leu Leu Asp Lys Asn Asp Glu Thr Arg Asp Ala Gly Ile Asn Thr
1 5 10 15
Asp Asp

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<223> Xaa 可以是 VAL、LEU 或 GLY

<400> 19
Thr Arg Xaa Xaa Phe Ala Gly Leu
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肠细菌孔蛋白抗原表位序列

<223> Xaa 可以是 THR 或 SER

<400> 20
Arg Asn Xaa Asp Phe Phe Gly Leu
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和肽

<400> 21

Ser Leu Ser Leu Ile Gln Thr

1

5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和肽

<400> 22

Glu Ala Lys Gly Leu Ile Arg

1

5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和肽

<400> 23

Thr Ala Thr Tyr Leu Leu Asp

1

5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 亲和肽

<400> 24

Phe His Glu Asn Trp Pro Ser

1

5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 亲和肽

<400> 25
Phe His Glu Phe Trp Pro Thr
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 亲和肽

<223> Xaa 可以是 ASN 或 PHE

<400> 26
Phe His Glu Xaa Trp Pro Thr
1 5

<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 27
agtcccatgg atccaacgtc caatcttctg 30

<210> 28
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 28
atgcggatcc ttactaatgg tgatggtgat ggtgttcggg gggtggaag 49

<210> 29
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 29

ctagttcttc tgcgttcacc atcatggacc aggttccgtt ctctgtttct gtttctcage 60
tga 63

<210> 30

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 30

ctagtcagct gagaaacaga aacagagaac ggaacctggt ccatgatggt gaacgcagaa 60
gaa 63

<210> 31

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 31

ctagttctcc gctgaccaaa ggtatcctgg gtttcgtttt caccctgacc gttccgtctg 60
aaa 63

<210> 32

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 32

ctagtttcag acggaacggt cagggtgaaa acgaaacca ggataccttt ggtcagcgga 60
gaa 63

<210> 33

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 33	
gatcactagt gtggtggtgg gtaccaccga tcgtagcggg gcgccgacct acagctgggg	60
tgccaacgat acgcgtcatg	80
<210> 34	
<211> 80	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 34	
catgacgcgt atcgttcgca ccccagctgt aggtcggcgc accgctacga tcggtgttac	60
ccaccaccac actagtgatc	80
<210> 35	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 35	
agtcccatgg ccgatccaac gtccaatctt ctg	33
<210> 36	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 36	
acgtccatgg tatatctcct tcttaaag	28
<210> 37	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 37	
atcgccatgg catccacacc caacatagcc ttccccgcc tcacc	45
<210> 38	
<211> 76	

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 38

```

ggttaaggaa ggtggggggc ttctccgctt ccccaactaa gcatggtagt gtagtggtta 60
atcattccta ggtgac

```

76

<210> 39

<211> 378

<212> PRT

<213> 伤寒沙门氏菌 Ty2

<400> 39

```

Met Lys Val Lys Val Leu Ser Leu Leu Val Pro Ala Leu Leu Val Ala
 1              5              10              15
Gly Ala Ala Asn Ala Ala Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Gly Asn Lys Leu
      20              25              30
Asp Leu Phe Gly Lys Val Asp Gly Leu His Tyr Phe Ser Asp Asp Lys
      35              40              45
Gly Ser Asp Gly Asp Gln Thr Tyr Met Arg Ile Gly Phe Lys Gly Glu
      50              55              60
Thr Gln Val Asn Asp Gln Leu Thr Gly Tyr Gly Gln Trp Glu Tyr Gln
65              70              75              80
Ile Gln Gly Asn Gln Thr Glu Gly Ser Asn Asp Ser Trp Thr Arg Val
      85              90              95
Ala Phe Ala Gly Leu Lys Phe Ala Asp Ala Gly Ser Phe Asp Tyr Gly
      100             105             110
Arg Asn Tyr Gly Val Thr Tyr Asp Val Thr Ser Trp Thr Asp Val Leu
      115             120             125
Pro Glu Phe Gly Gly Asp Thr Tyr Gly Ala Asp Asn Phe Met Gln Gln
      130             135             140
Arg Gly Asn Gly Tyr Ala Thr Tyr Arg Asn Thr Asp Phe Phe Gly Leu
145             150             155             160
Val Asp Gly Leu Asp Phe Ala Leu Gln Tyr Gln Gly Lys Asn Gly Ser
      165             170             175
Val Ser Gly Glu Asn Thr Asn Gly Arg Ser Leu Leu Asn Gln Asn Gly
      180             185             190
Asp Gly Tyr Gly Gly Ser Leu Thr Tyr Ala Ile Gly Glu Gly Phe Ser
      195             200             205
Val Gly Gly Ala Ile Thr Thr Ser Lys Arg Thr Ala Asp Gln Asn Asn
      210             215             220
Thr Ala Asn Ala Arg Leu Tyr Gly Asn Gly Asp Arg Ala Thr Val Tyr
225             230             235             240
Thr Gly Gly Leu Lys Tyr Asp Ala Asn Asn Ile Tyr Leu Ala Ala Gln
      245             250             255
Tyr Ser Gln Thr Tyr Asn Ala Thr Arg Phe Gly Thr Ser Asn Gly Ser
      260             265             270
Asn Pro Ser Thr Ser Tyr Gly Phe Ala Asn Lys Ala Gln Asn Phe Glu

```

```

      275              280              285
Val Val Ala Gln Tyr Gln Phe Asp Phe Gly Leu Arg Pro Ser Val Ala
      290              295              300
Tyr Leu Gln Ser Lys Gly Lys Asp Ile Ser Asn Gly Tyr Gly Ala Ser
305              310              315              320
Tyr Gly Asp Gln Asp Ile Val Lys Tyr Val Asp Val Gly Ala Thr Tyr
      325              330              335
Tyr Phe Asn Lys Asn Met Ser Thr Tyr Val Asp Tyr Lys Ile Asn Leu
      340              345              350
Leu Asp Lys Asn Asp Phe Thr Arg Asp Ala Gly Ile Asn Thr Asp Asp
      355              360              365
Ile Val Ala Leu Gly Leu Val Tyr Gln Phe
      370              375

```

<210> 40

<211> 363

<212> PRT

<213> 伤寒沙门氏菌 CT18

<400> 40

```

Met Met Lys Arg Lys Ile Leu Ala Ala Val Ile Pro Ala Leu Leu Ala
 1              5              10              15
Ala Ala Thr Ala Asn Ala Ala Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Gly Asn Lys
      20              25              30
Leu Asp Leu Tyr Gly Lys Ala Val Gly Arg His Val Trp Thr Thr Thr
      35              40              45
Gly Asp Ser Lys Asn Ala Asp Gln Thr Tyr Ala Gln Ile Gly Phe Lys
      50              55              60
Gly Glu Thr Gln Ile Asn Thr Asp Leu Thr Gly Phe Gly Gln Trp Glu
65              70              75              80
Tyr Arg Thr Lys Ala Asp Arg Ala Glu Gly Glu Gln Gln Asn Ser Asn
      85              90              95
Leu Val Arg Leu Ala Phe Ala Gly Leu Lys Tyr Ala Glu Val Gly Ser
      100             105             110
Ile Asp Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Ile Val Tyr Asp Val Glu Ser Tyr
      115             120             125
Thr Asp Met Ala Pro Tyr Phe Ser Gly Glu Thr Trp Gly Gly Ala Tyr
      130             135             140
Thr Asp Asn Tyr Met Thr Ser Arg Ala Gly Gly Leu Leu Thr Tyr Arg
145             150             155             160
Asn Ser Asp Phe Phe Gly Leu Val Asp Gly Leu Ser Phe Gly Ile Gln
      165             170             175
Tyr Gln Gly Lys Asn Gln Asp Asn His Ser Ile Asn Ser Gln Asn Gly
      180             185             190
Asp Gly Val Gly Tyr Thr Met Ala Tyr Glu Phe Asp Gly Phe Gly Val
      195             200             205
Thr Ala Ala Tyr Ser Asn Ser Lys Arg Thr Asn Asp Gln Gln Asp Arg
      210             215             220
Asp Gly Asn Gly Asp Arg Ala Glu Ser Trp Ala Val Gly Ala Lys Tyr
225             230             235             240

```


Asp Ala Asn Asn Val Tyr Leu Ala Ala Val Tyr Ala Glu Thr Arg Asn
 245 250 255
 Met Ser Ile Val Glu Asn Thr Val Thr Asp Thr Val Glu Met Ala Asn
 260 265 270
 Lys Thr Gln Asn Leu Glu Val Val Ala Gln Tyr Gln Phe Asp Phe Gly
 275 280 285
 Leu Arg Pro Ala Ile Ser Tyr Val Gln Ser Lys Gly Lys Gln Leu Asn
 290 295 300
 Gly Ala Asp Gly Ser Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Gln Ala Gly Ala
 305 310 315 320
 Thr Tyr Tyr Phe Asn Lys Asn Met Asn Val Trp Val Asp Tyr Arg Phe
 325 330 335
 Asn Leu Leu Asp Glu Asn Asp Tyr Ser Ser Ser Tyr Val Gly Thr Asp
 340 345 350
 Asp Gln Ala Ala Val Gly Ile Thr Tyr Gln Phe
 355 360

<210> 41
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 41
 ggtaaggaa ggtggggggc ttaaagtact cttaaccgga agcgtggtag tggtagtgggt 60
 aatcattcct aggtgac . 77

<210> 42
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 包含用于与 OmpC 结合的亲和肽的 PapMV 外壳蛋白

<400> 42
 Met Ala Ser Thr Pro Asn Ile Ala Phe Pro Ala Ile Thr Gln Glu Gln
 1 5 10 15
 Met Ser Ser Ile Glu Val Asp Pro Thr Ser Asn Leu Leu Pro Ser Gln
 20 25 30
 Glu Gln Leu Lys Ser Val Ser Thr Leu Met Val Ala Ala Lys Val Pro
 35 40 45
 Ala Ala Ser Val Thr Thr Val Ala Leu Glu Leu Val Asn Phe Cys Tyr
 50 55 60
 Asp Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Thr Thr Val Thr Gly Pro Ser Ser Ile
 65 70 75 80
 Pro Glu Ile Ser Leu Ala Gln Leu Ala Ser Ile Val Lys Ala Ser Gly
 85 90 95

Thr Ser Leu Arg Lys Phe Cys Arg Tyr Phe Ala Pro Ile Ile Trp Asn
 100 105 110
 Leu Arg Thr Asp Lys Met Ala Pro Ala Asn Trp Glu Ala Ser Gly Tyr
 115 120 125
 Lys Pro Ser Ala Lys Phe Ala Ala Phe Asp Phe Phe Asp Gly Val Glu
 130 135 140
 Asn Pro Ala Ala Met Gln Pro Pro Ser Gly Leu Thr Arg Ser Pro Thr
 145 150 155 160
 Gln Glu Glu Arg Ile Ala Asn Ala Thr Asn Lys Gln Val His Leu Phe
 165 170 175
 Gln Ala Ala Ala Gln Gly Asn Asn Phe Ala Ser Asn Ser Ala Phe Ile
 180 185 190
 Thr Lys Gly Gln Ile Ser Gly Ser Thr Pro Thr Ile Gln Phe Leu Pro
 195 200 205
 Pro Pro Glu Glu Ala Lys Gly Leu Ile Arg His His His His His His
 210 215 220

<210> 43

<211> 224

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含用于与 OmpF 结合的亲和肽的 PapMV 外壳蛋白

<400> 43

Met Ala Ser Thr Pro Asn Ile Ala Phe Pro Ala Ile Thr Gln Glu Gln
 1 5 10 15
 Met Ser Ser Ile Lys Val Asp Pro Thr Ser Asn Leu Leu Pro Ser Gln
 20 25 30
 Glu Gln Leu Lys Ser Val Ser Thr Leu Met Val Ala Ala Lys Val Pro
 35 40 45
 Ala Ala Ser Val Thr Thr Val Ala Leu Glu Leu Val Asn Phe Cys Tyr
 50 55 60
 Asp Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Thr Thr Val Thr Gly Pro Ser Ser Ile
 65 70 75 80
 Pro Glu Ile Ser Leu Ala Gln Leu Ala Ser Ile Val Lys Ala Ser Gly
 85 90 95
 Thr Ser Leu Arg Lys Phe Cys Arg Tyr Phe Ala Pro Ile Ile Trp Asn
 100 105 110
 Leu Arg Thr Asp Lys Met Ala Pro Ala Asn Trp Glu Ala Ser Gly Tyr
 115 120 125
 Lys Pro Ser Ala Lys Phe Ala Ala Phe Asp Phe Phe Asp Gly Val Glu
 130 135 140
 Asn Pro Ala Ala Met Gln Pro Pro Ser Gly Leu Thr Arg Ser Pro Thr
 145 150 155 160
 Gln Glu Glu Arg Ile Ala Asn Ala Thr Asn Lys Gln Val His Leu Phe
 165 170 175
 Gln Ala Ala Ala Gln Asp Asn Asn Phe Ala Ser Asn Ser Ala Phe Ile
 180 185 190

Thr Lys Gly Gln Ile Ser Gly Ser Thr Pro Thr Ile Gln Phe Leu Pro
 195 200 205
 Pro Pro Glu Phe His Glu Asn Trp Pro Ser His His His His His His
 210 215 220

<210> 44
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 44
 ctagtgttac ttctaacggt tctaaccgt ctacttctta cggtttcgcg aaca 54

<210> 45
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 45
 ctagtgttcg cgaaaccgta agaagtagac gggttagaac cgtagaagt acca 54

<210> 46
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 包含伤寒沙门氏菌孔蛋白环 6 肽的 PapMV 外壳蛋白

<400> 46
 Met Ala Ser Thr Pro Asn Ile Ala Phe Pro Ala Ile Thr Gln Glu Gln
 1 5 10 15
 Met Ser Ser Ile Lys Val Asp Pro Thr Ser Asn Leu Leu Pro Ser Gln
 20 25 30
 Glu Gln Leu Lys Ser Val Ser Thr Leu Met Val Ala Ala Lys Val Pro
 35 40 45
 Ala Ala Ser Val Thr Thr Val Ala Leu Glu Leu Val Asn Phe Cys Tyr
 50 55 60
 Asp Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Thr Thr Val Thr Gly Pro Ser Ser Ile
 65 70 75 80
 Pro Glu Ile Ser Leu Ala Gln Leu Ala Ser Ile Val Lys Ala Ser Gly
 85 90 95
 Thr Ser Leu Arg Lys Phe Cys Arg Tyr Phe Ala Pro Ile Ile Trp Asn
 100 105 110

Leu Arg Thr Asp Lys Met Ala Pro Ala Asn Trp Glu Ala Ser Gly Tyr
 115 120 125
 Lys Pro Ser Ala Lys Phe Ala Ala Phe Asp Phe Phe Asp Gly Val Glu
 130 135 140
 Asn Pro Ala Ala Met Gln Pro Pro Ser Gly Leu Thr Arg Ser Pro Thr
 145 150 155 160
 Gln Glu Glu Arg Ile Ala Asn Ala Thr Asn Lys Gln Val His Leu Phe
 165 170 175
 Gln Ala Ala Ala Gln Asp Asn Asn Phe Ala Ser Asn Ser Ala Phe Ile
 180 185 190
 Thr Lys Gly Gln Ile Ser Gly Ser Thr Pro Thr Ile Gln Phe Leu Pro
 195 200 205
 Pro Pro Glu Thr Ser Gly Thr Ser Asn Gly Ser Asn Pro Ser Thr Ser
 210 215 220
 Tyr Gly Phe Ala Asn Thr Arg His His His His His His
 225 230 235

<210> 47

<211> 714

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码包含伤寒沙门氏菌孔蛋白环 6 肽的 PapMV 外壳蛋白的核苷酸序列

<400> 47

atggcatcca cacccaacat agccttcccc gccatcaccc aggaacaaat gagctcgatt 60
 aaggtcgatc caacgtccaa tcttctgccc tcccaagagc agttaagtc agtgtccacc 120
 ctcatggttag ctgctaaggt tccagcagcc agtggttaca ctgtggcatt ggagttgggt 180
 aacttctgct atgacaatgg gtccagcgcg tacaccacag tgactggccc atcatcaata 240
 ccggagatat cactggcaca attggccagc attgtcaaag cttccggcac ttcccttagg 300
 aaattctgcc ggtacttcgc gccataatc tggaatctga ggacggacaa aatggctcct 360
 gccaatggg aggcctcagg atacaagcca agcgccaaat ttgccgcgtt cgacttcttc 420
 gacggggtgg agaatccggc ggccatgcaa ccccttcgg gactaaccag gtcgccgacc 480
 caggaagagc ggattgccaa tgccaccaac aaacaggtgc atctcttcca agccgcggca 540
 caggacaaca actttgccag caactccgcc ttcatacca aaggccaaat ttctgggtca 600
 accccaacca tccaattcct tccaccccc gaaactagt gtacttctaa cggttctaac 660
 ccgtctactt cttacggttt cggaacacg cgtcaccatc accatcacca ttag 714

<210> 48

<211> 228

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含用于与 OmpC 结合的亲和肽的 PapMV SM 外壳蛋白

<400> 48

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

Met Ser Ser Ile Lys Val Asp Pro Thr Ser Asn Leu Leu Pro Ser Gln
 20 25 30
 Glu Gln Leu Lys Ser Val Ser Thr Leu Met Val Ala Ala Lys Val Pro
 35 40 45
 Ala Ala Ser Val Thr Thr Val Ala Leu Glu Leu Val Asn Phe Cys Tyr
 50 55 60
 Asp Asn Gly Ser Ser Ala Tyr Thr Thr Val Thr Gly Pro Ser Ser Ile
 65 70 75 80
 Pro Glu Ile Ser Leu Ala Gln Leu Ala Ser Ile Val Lys Ala Ser Gly
 85 90 95
 Thr Ser Leu Arg Lys Phe Cys Arg Tyr Phe Ala Pro Ile Ile Trp Asn
 100 105 110
 Leu Arg Thr Asp Lys Met Ala Pro Ala Asn Trp Glu Ala Ser Gly Tyr
 115 120 125
 Lys Pro Ser Ala Lys Phe Ala Ala Phe Asp Phe Phe Asp Gly Val Glu
 130 135 140
 Asn Pro Ala Ala Met Gln Pro Pro Ser Gly Leu Thr Arg Ser Pro Thr
 145 150 155 160
 Gln Glu Glu Arg Ile Ala Asn Ala Thr Asn Lys Gln Val His Leu Phe
 165 170 175
 Gln Ala Ala Ala Gln Asp Asn Asn Phe Ala Ser Asn Ser Ala Phe Ile
 180 185 190
 Thr Lys Gly Gln Ile Ser Gly Ser Thr Pro Thr Ile Gln Phe Leu Pro
 195 200 205
 Pro Pro Glu Thr Ser Glu Ala Lys Gly Leu Ile Arg Thr Arg His His
 210 215 220
 His His His His
 225

<210> 49

<211> 687

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码包含用于与 OmpC 结合的亲和肽的 PapMV SM 外壳蛋白的核苷酸序列

<400> 49

atggcatcca caccaacat agccttcccc gccatcaccc aggaacaaat gagctcgatt 60
 aaggctgata caacgtccaa tcttctgccc tcccaagagc agttaagtc agtgtccacc 120
 ctcatggttag ctgctaaggt tccagcagcc agtggttaca ctgtggcatt ggagttgggt 180
 aacttctgct atgacaatgg gtccagcgcg tacaccacag tgactggccc atcatcaata 240
 ccggagatat cactggcaca attggccagc attgtcaaag cttccggcac ttcccttagg 300
 aaattctgcc ggtacttcgc gccataatc tggaatctga ggacggacaa aatggctcct 360
 gccaatggg aggcctcagg atacaagcca agcgccaaat ttgccgcgtt cgacttcttc 420
 gacggggtgg agaatccggc ggccatgcaa ccccttcgg gactaaccag gtcgccgacc 480
 caggagagc ggattgccaa tgccaccaac aaacaggtgc atctcttcca agccgcggca 540
 caggacaaca actttgccag caactccgcc ttcacacca aaggccaaat ttctgggtca 600
 accccaacca tccaattcct tccaccccc gaaactagtg aggcaagg gttgattcgt 660
 acgcgtcacc atcaccatca ccattag 687

<210> 50
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 包含源自伤寒沙门氏菌孔蛋白的环 6 抗原表位的肽

<400> 50
Gly Thr Ser Asn Gly Ser Asn Pro Ser Thr Ser Tyr Gly Phe Ala Asn
1 5 10 15

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 源自 gp100 肿瘤抗原的抗原表位

<400> 51
Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 源自流感病毒 M1 蛋白的抗原表位

<400> 52
Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 源自 gp100 肿瘤抗原的抗原表位

<400> 53
Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 5

<210> 54
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 源自伤寒沙门氏菌孔蛋白的环 7 肽

<400> 54
Gln Ser Lys Gly Lys Asp Ile Ser Asn Gly Tyr Gly Ala Ser Tyr Gly
1 5 10 15
Asp Gln Asp

A.
MSKSSMSTPNIAFPAITQEQMSSIKVDPTSNLLPSQEQLKSVSTLMVAAKVPAASVTTVALE
LVNFCYDNGSSAYTTVTGPSSIPEISLAQLASIVKASGTS LRKFCRYFAPIIWNLRD KMAPA
NWEASGYKPSAKFAAFDFFDGVENPAAMQPPSGLIRSPTQEERIANATNKQVHLFQAAAQ
DNNFTSNSAFITKGQISGSTPTIQF LPPPE

B.
ATGTCTAAGTCAAGTATGTCCACACCCAACATAGCCTTCCCCGCCATCACCCAGGAACA
GATGAGCTCGATTAAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAA
AGTCAGTGTCCACCCTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTTACAAGTGTG
GCATTGGAGTTGGTCAACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGA
CTGGCCCATCATCAATACCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCTAGTATTGTCAAAGCT
TCCGGCACTTCCCTTAGAAAAATTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAG
GACGGACAAAATGGCTCCTGCCAATTGGGAGGCTTCAGGATACAAGCCAAGCGCCAAA
TTTGCCGCGTTCGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAACCCCCCTTC
GGGACTAATCAGGTCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCTACCAACAAACA
GGTG CATCTCTTCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAAC TTTACCAGCAACTCCGCCTTCA
TCACCAAAGGCCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCCCGAA
TAA

C.
MASTPNIAFPAITQEQMSSIKVDPTSNLLPSQEQLKSVSTLMVAAKVPAASVTTVALELVNF
CYDNGSSAYTTVTGPSSIPEISLAQLASIVKASGTS LRKFCRYFAPIIWNLRD KMAPANWE
ASGYKPSAKFAAFDFFDGVENPAAMQPPSGLTRSPTQEERIANATNKQVHLFQAAAQDNN
FASNSAFITKGQISGSTPTIQFLPPPE

图 1

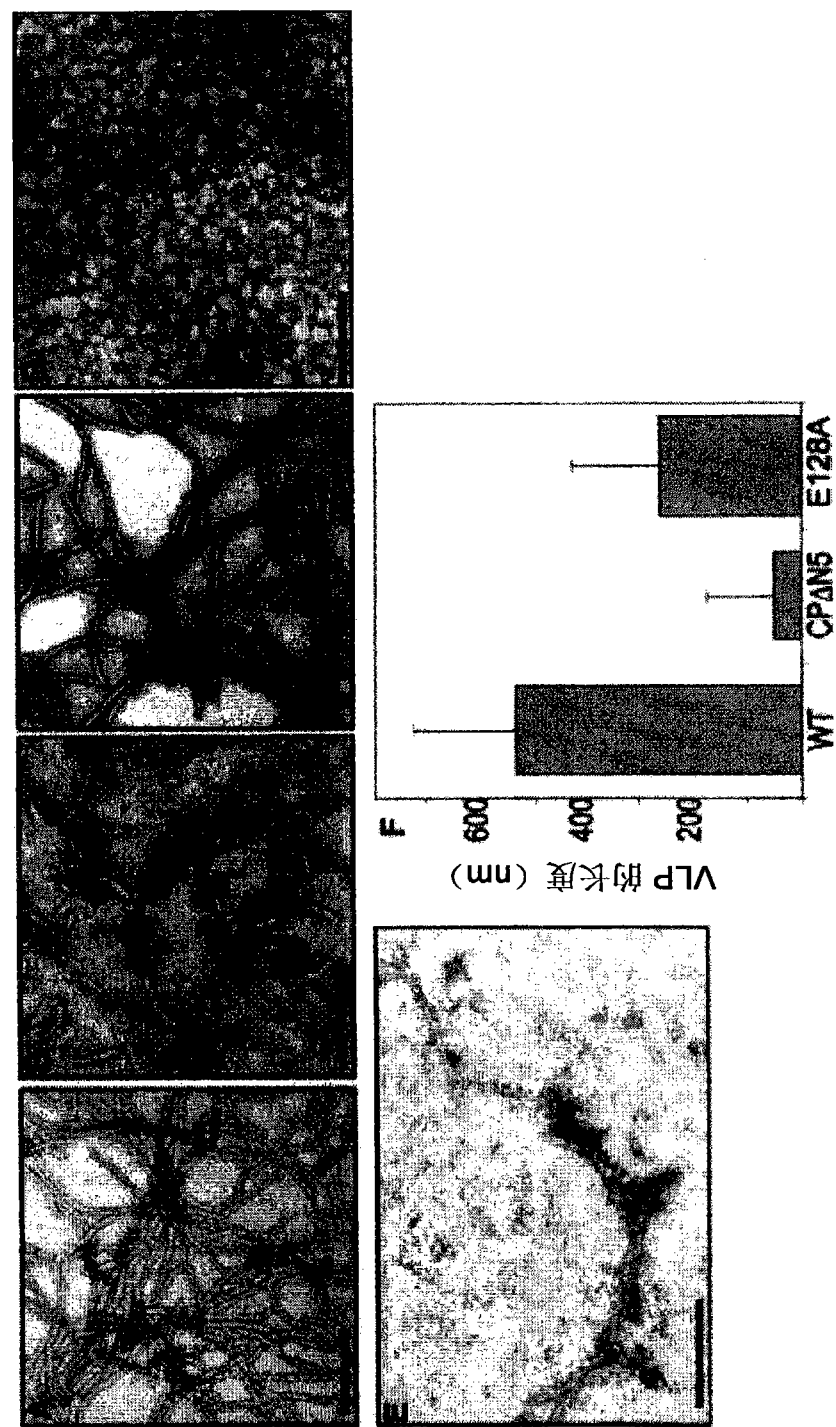


图 2

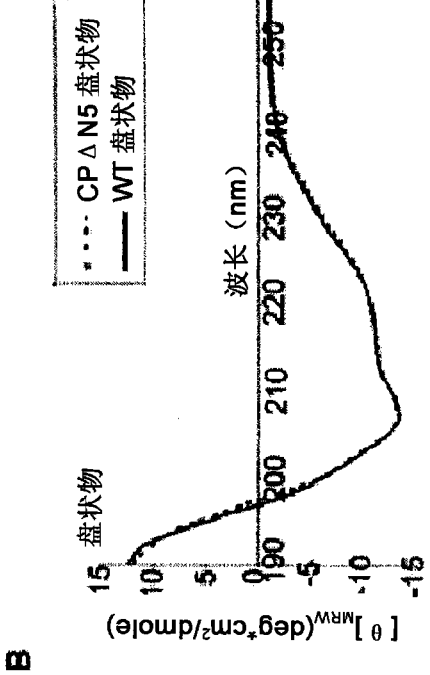
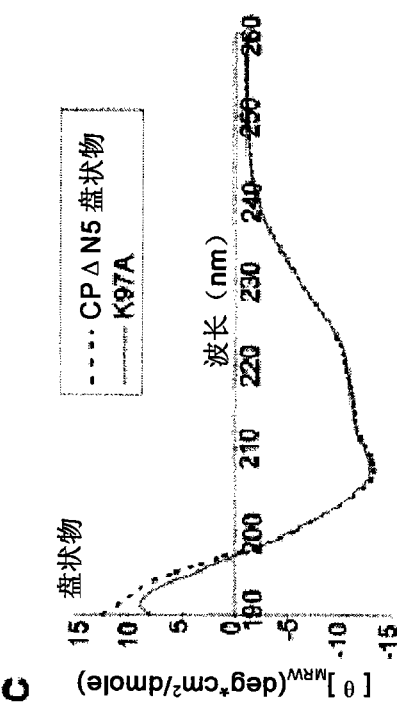
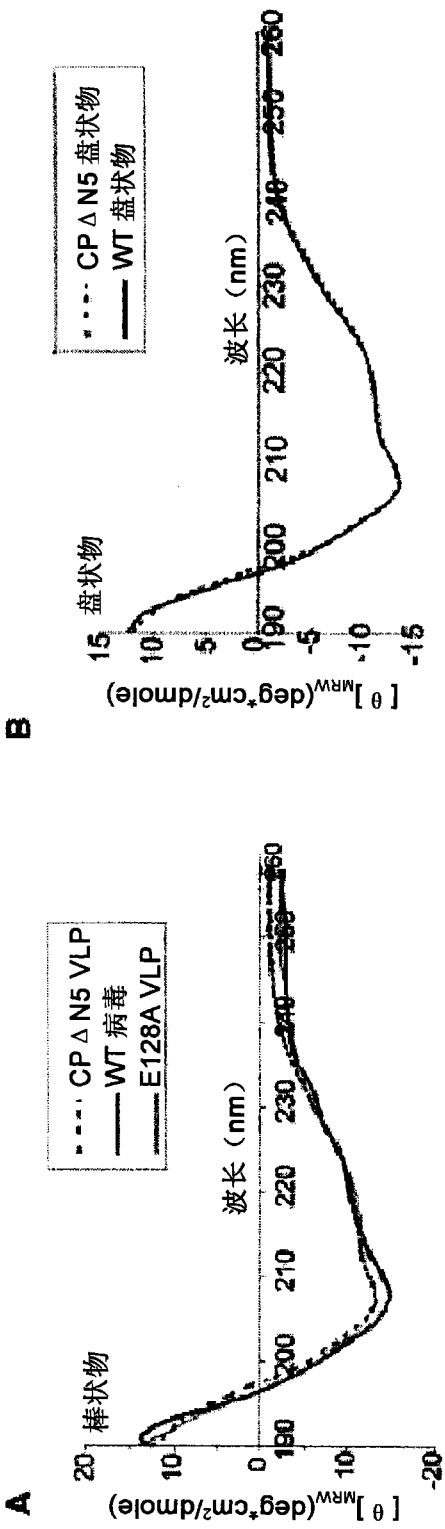


图 3

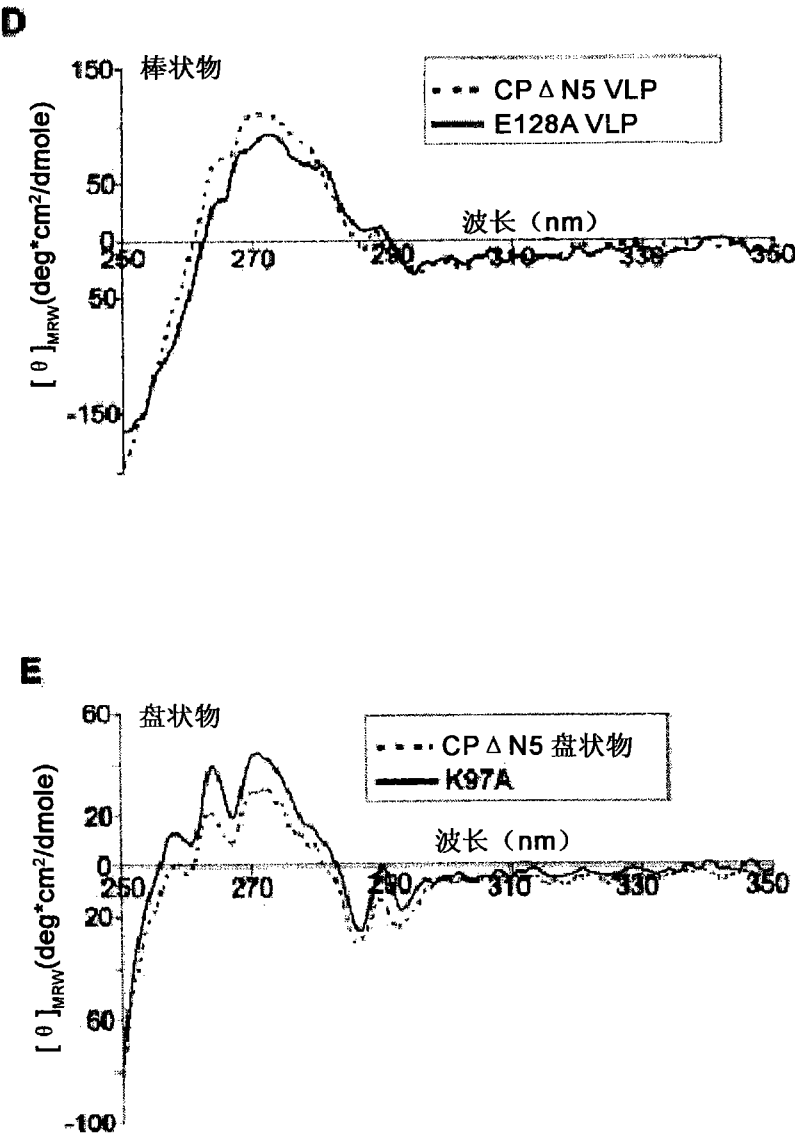


图 3 (续)

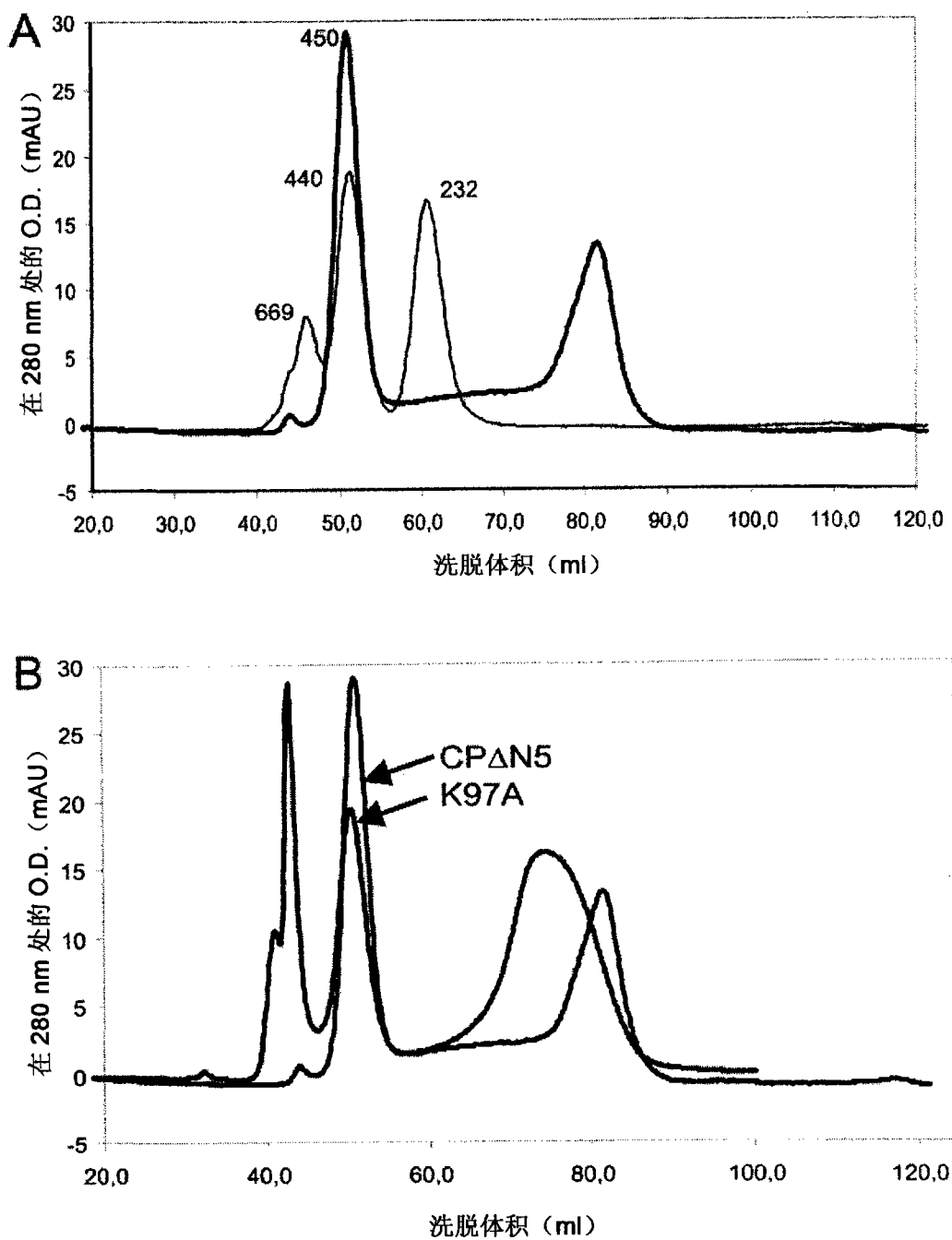


图 4

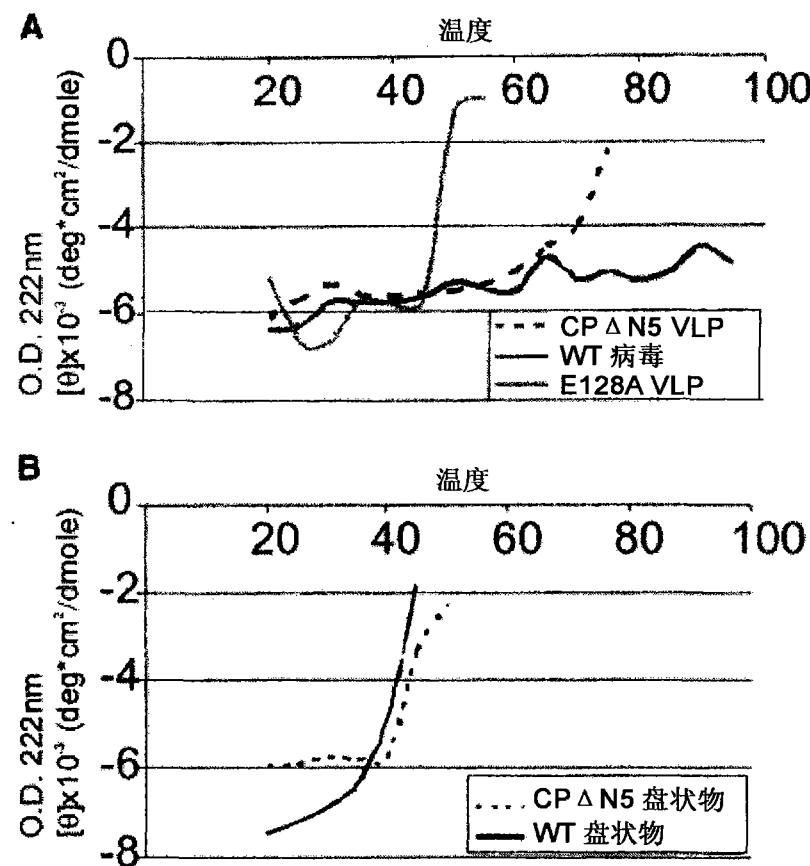


图 5

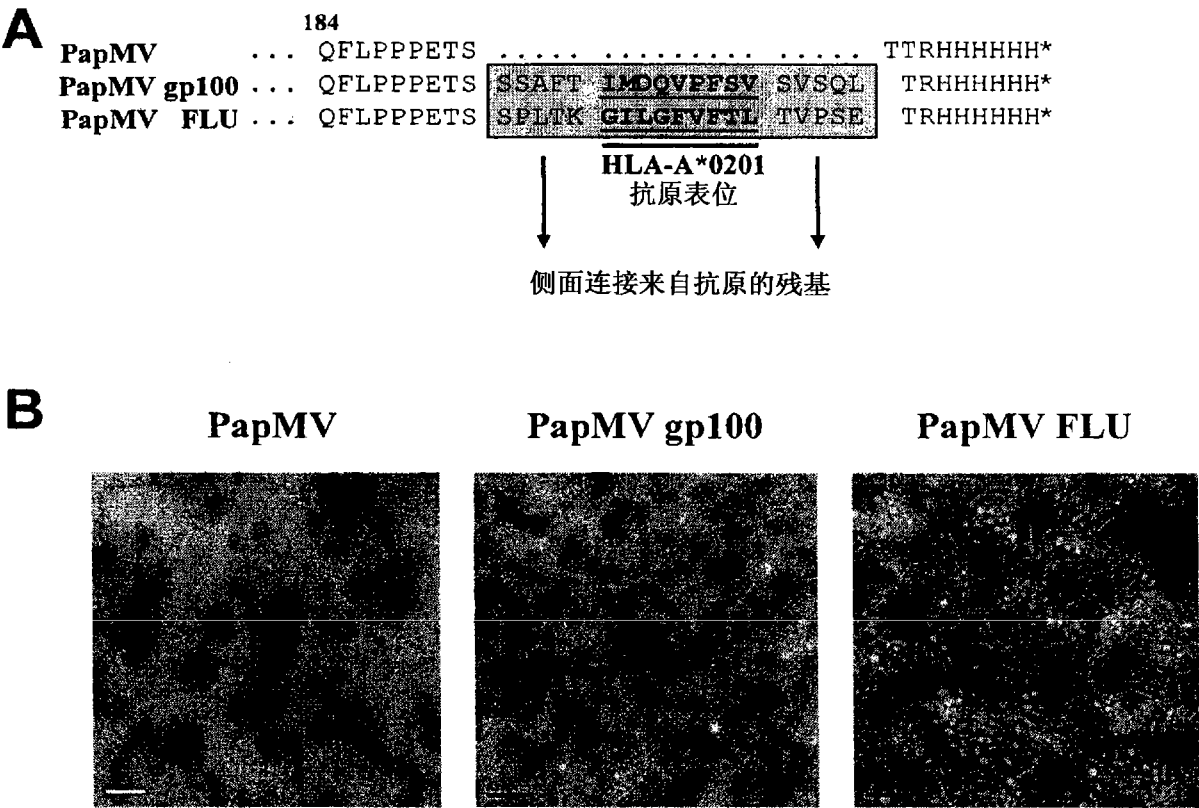


图 6

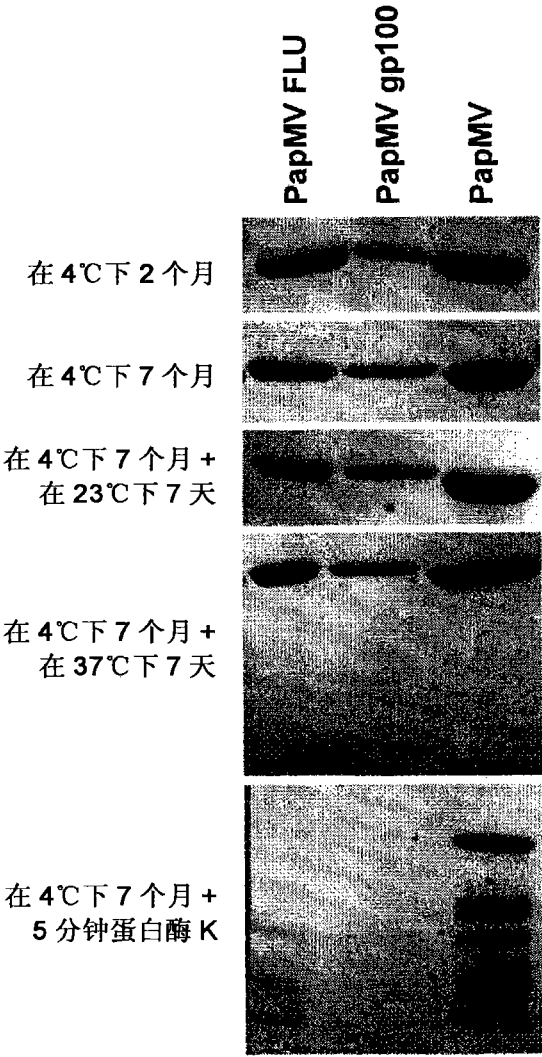


图 7

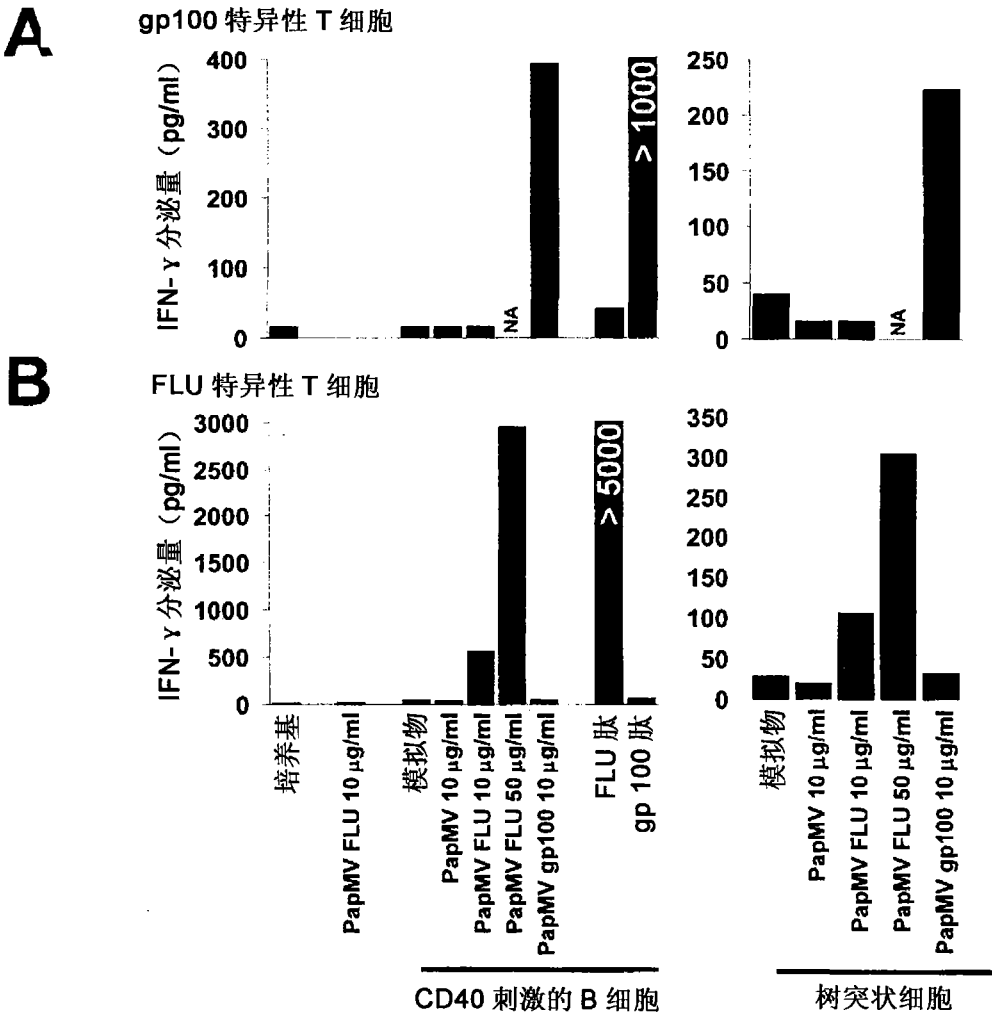
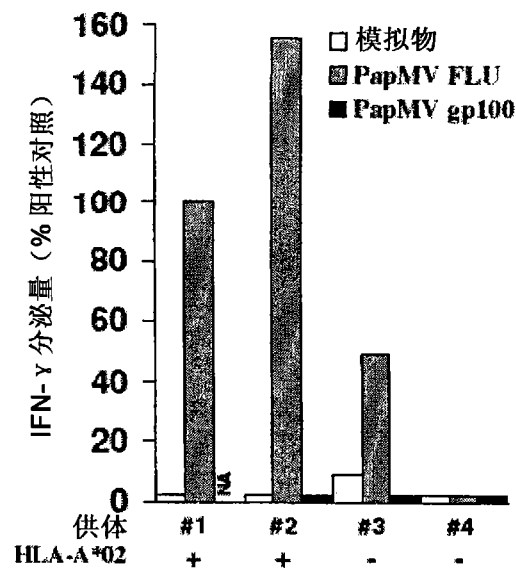


图 8

A.

FLU 特异性 T 细胞



B.

gp 100 特异性 T 细胞

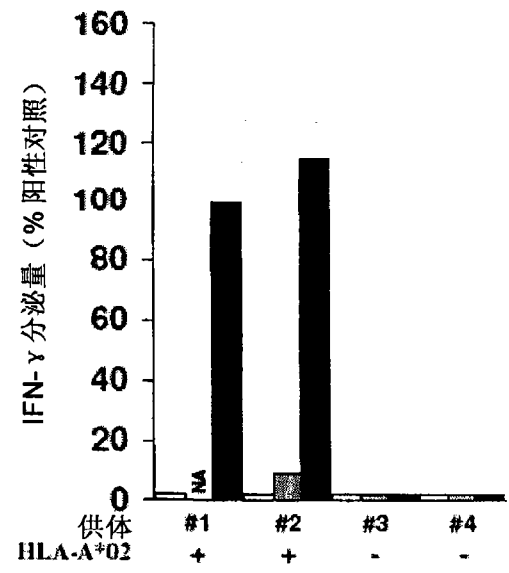


图 9

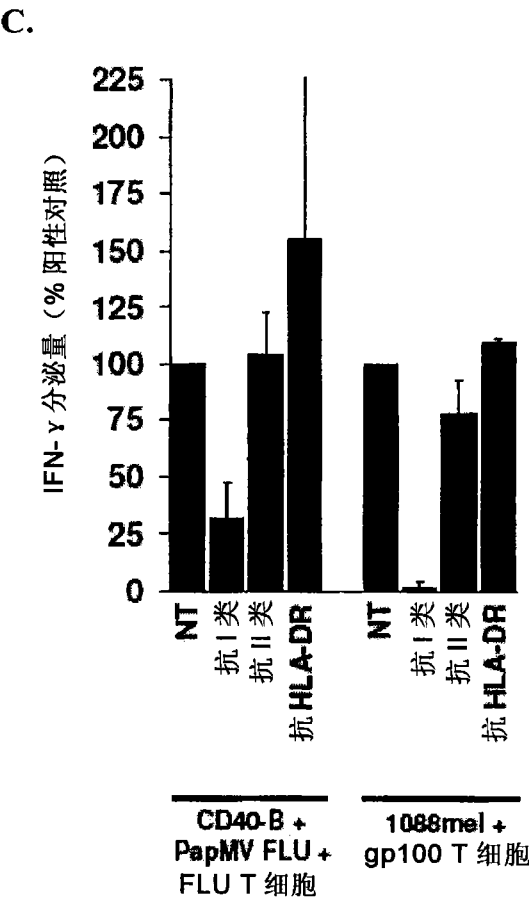


图 9 (续)

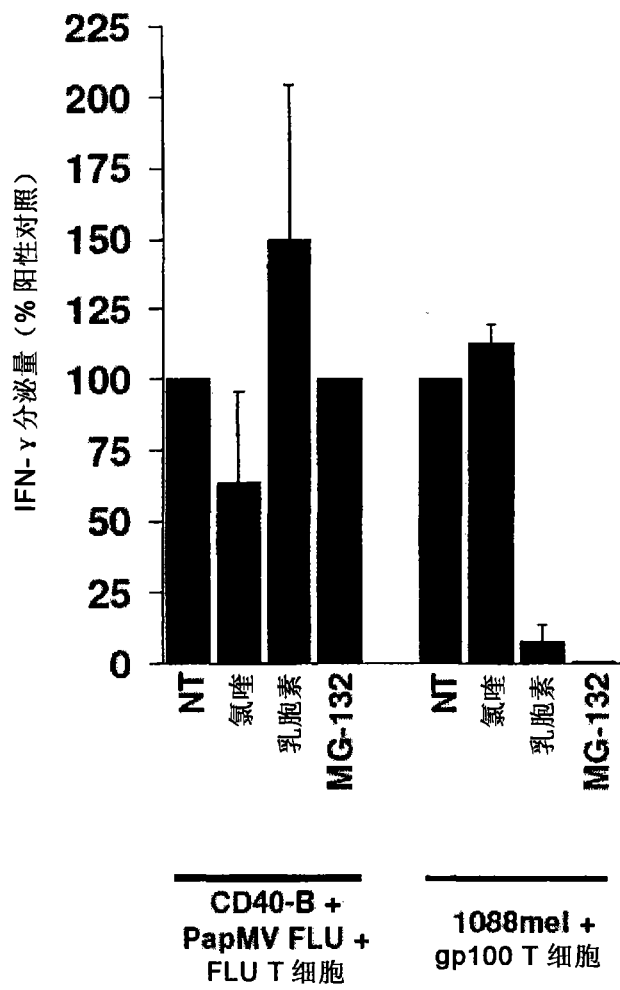
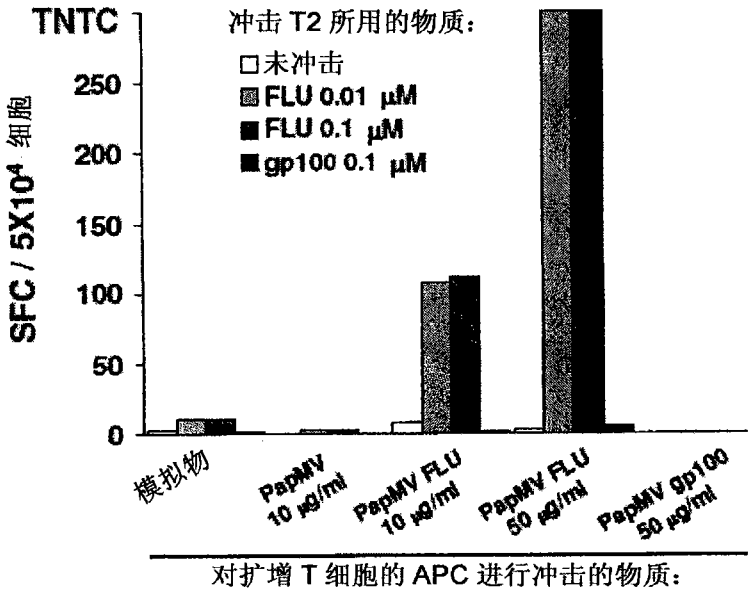


图 10

A.



B.

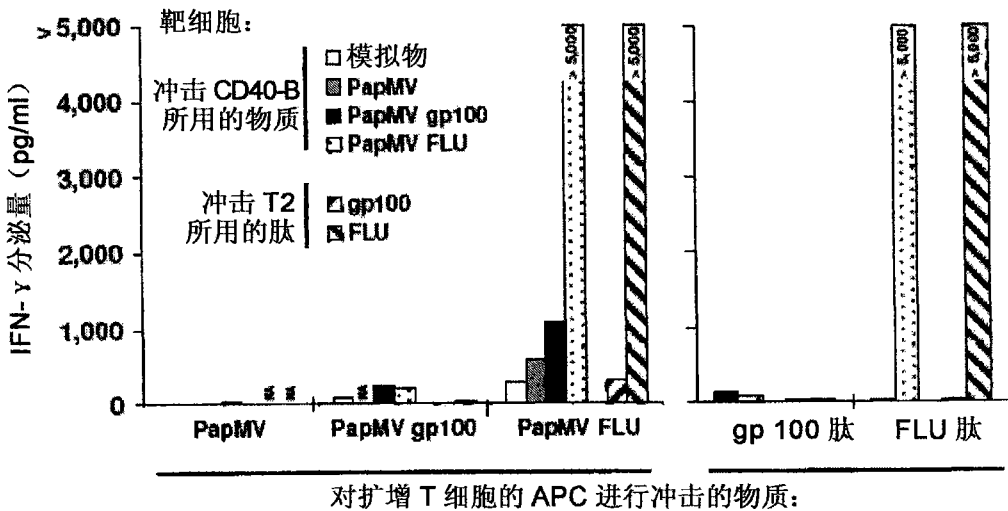


图 11

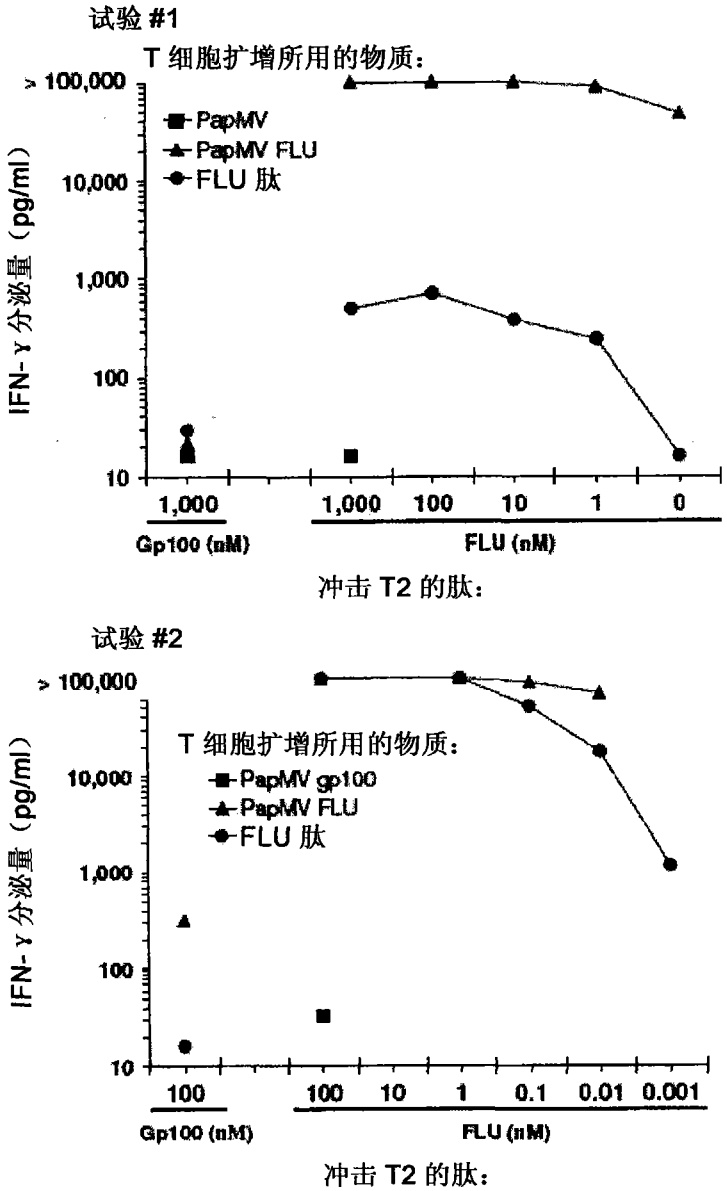


图 12

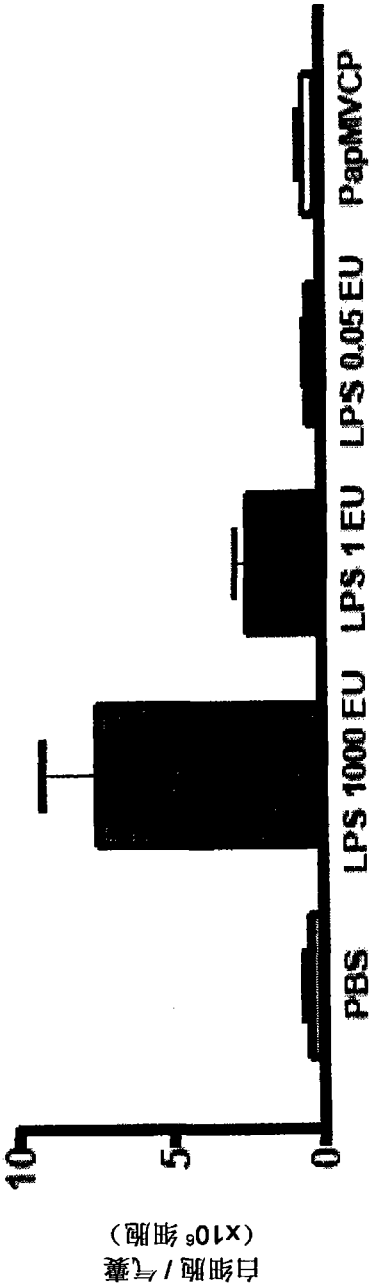


图 13

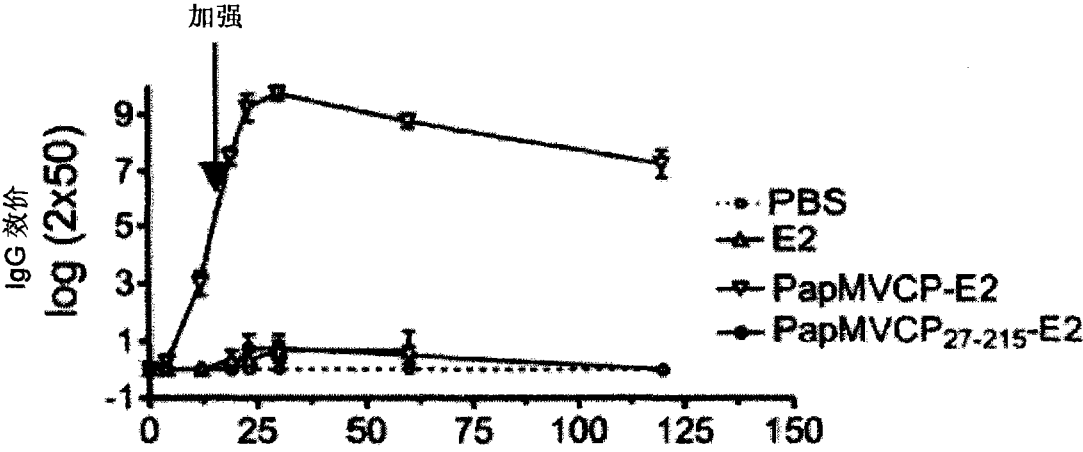


图 14

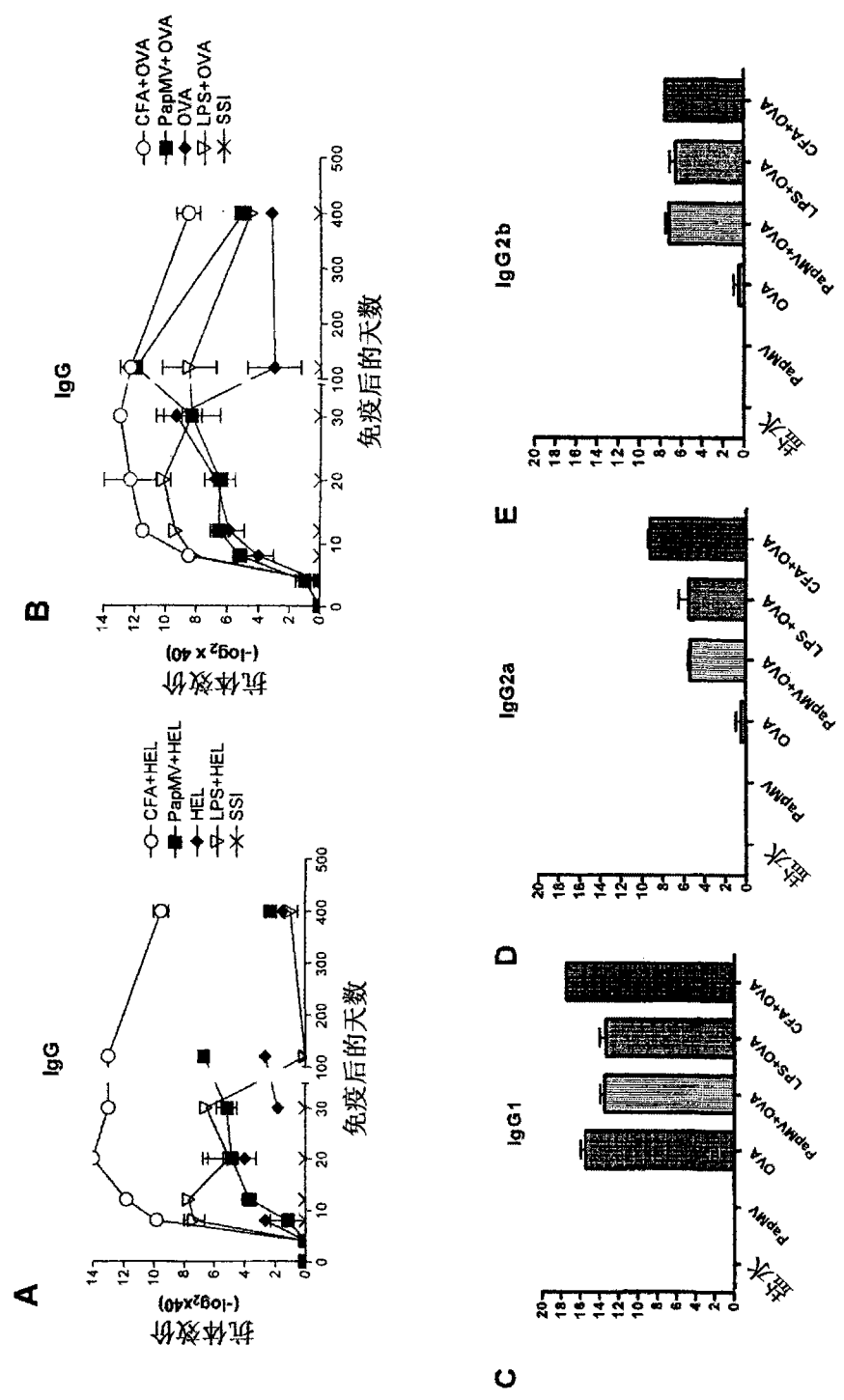


图 15

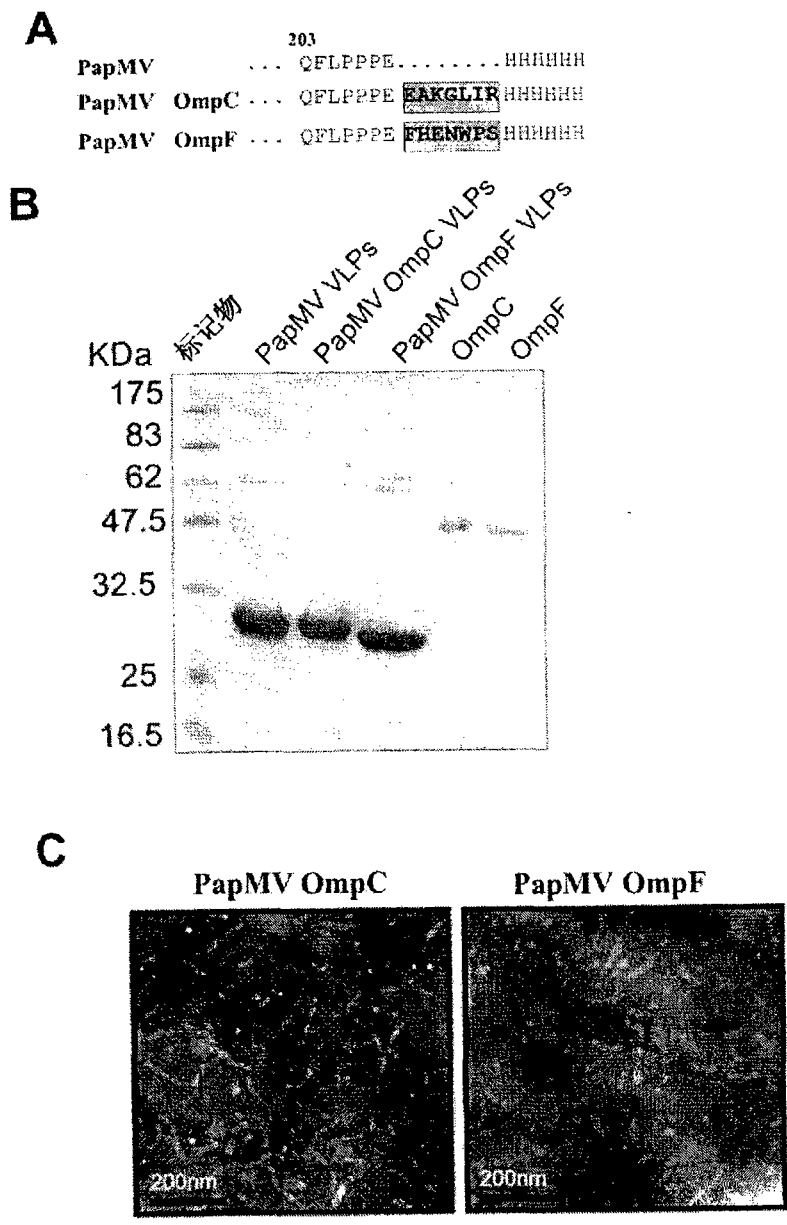


图 16

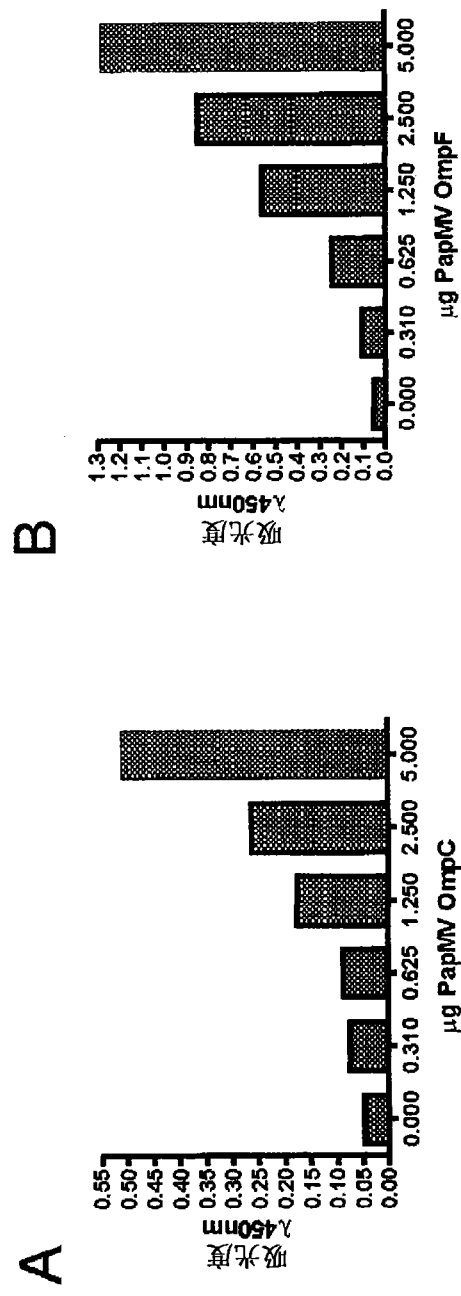


图 17

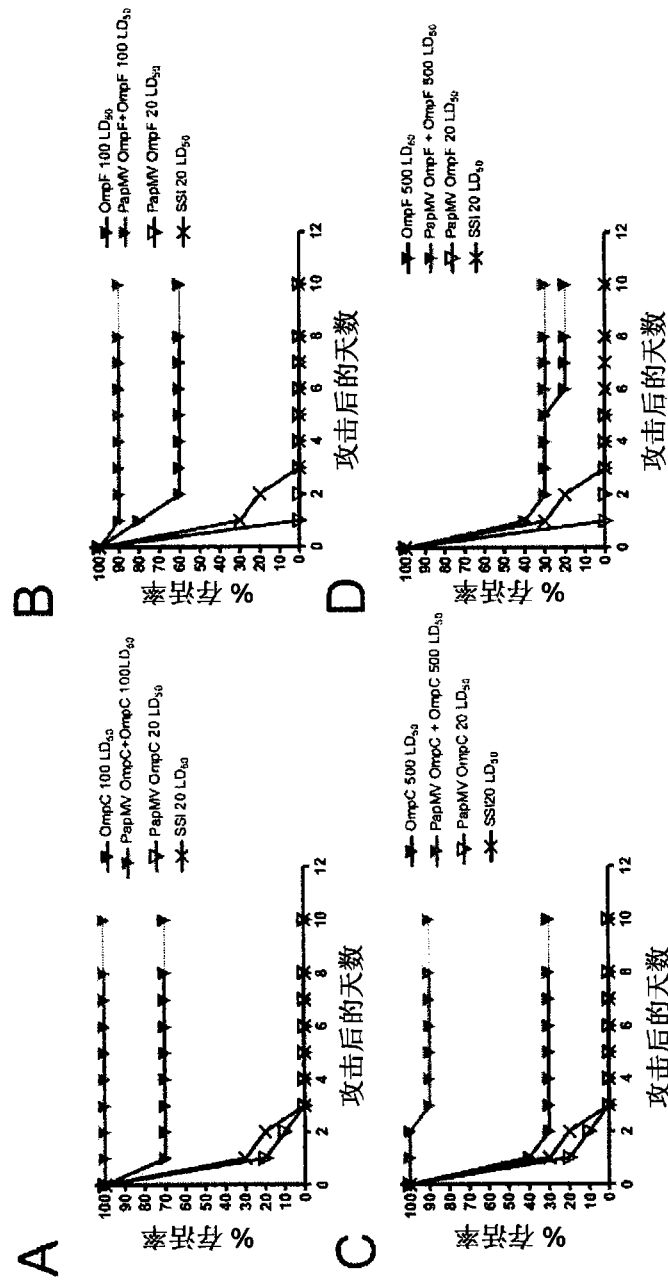


图 18

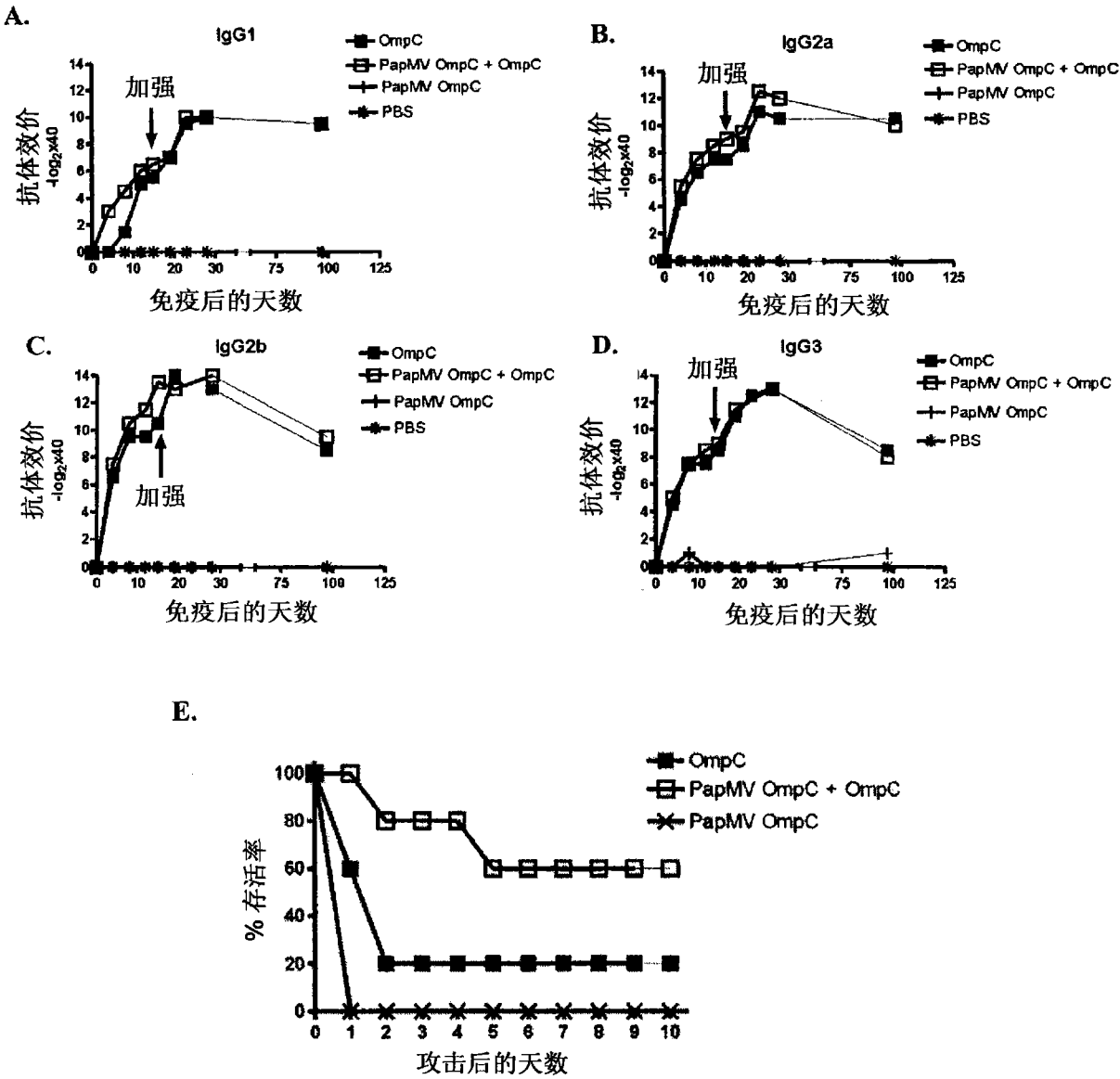
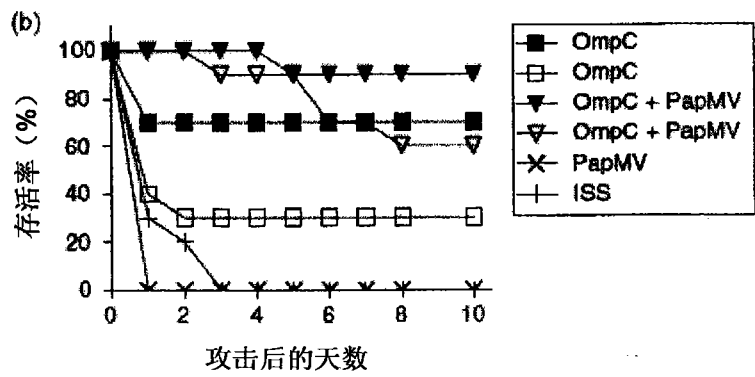


图 19

A.



B.

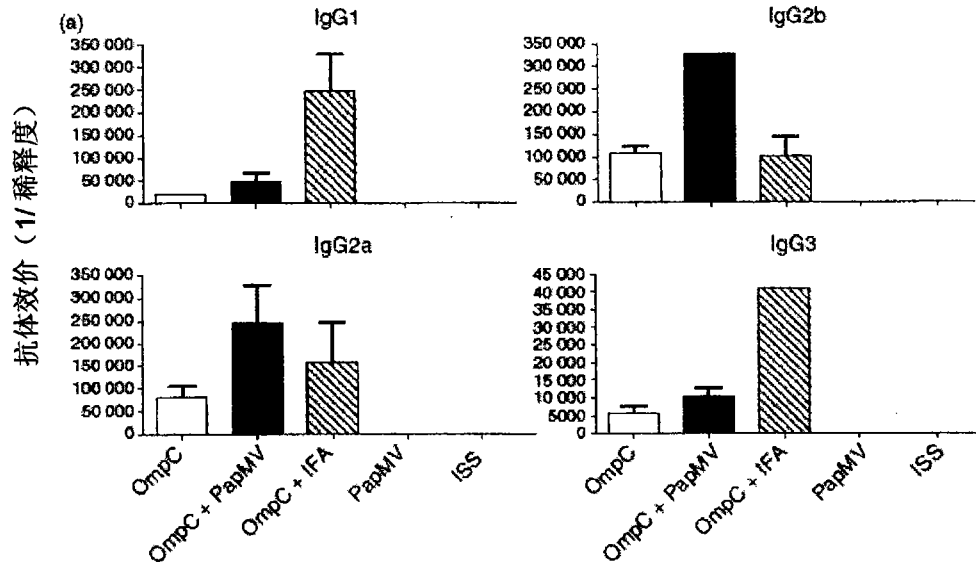


图 20

A.

MKVKVLSELLVPALLVAGAANA AEIYNKDGNKLDLFGKVDGLHYFSDDKGS DGD
QTYMRIGFKGETQVNDQLTGYGQWEYQIQGNQTEGSNDSWTRVAFAGLKFADA
GSFDYGRNYGV TYDVT SWTDVLPEFGGDTYGADNFMQQRGNGYATYRNTDFFG
LVDGLDFALQYQGKNGSVSGENTNGRSLLNQNGDGYGGS LTYAIGEGFSVGGAI
TTSKRTADQNNTANARLYGNGDRATVYTGGLKYDANNIYLAAQYSQTYNATRF
GTSNGSNPSTSYGFANKAQNF EVVAQYQFDFGLRDAGINTDDIVALGLVYQF

B.

MMKRKILAAV IPALLAAATA NAAEIYNKDG NKLDLYGKAV GRHVWTTTGD
SKNADQTYAQ IGFKGETQIN TDLTGFGQWE YRTKADRAEG EQQNSNLVRL
AFAGLK YAEV GSIDYGRNYG IVYDVESYTD MAPYFSGETW GGAYTDNYMT
SRAGGLTYR NSDFFGLVDG LSFGIQYQGK NQDNHSINSQ NGDGVGYTMA
YEFDGFGVTA AYSNSKRTND QQDRDGNGDR AESWAVGAKY DANNVYLA AV
YAETRNMSIV ENTVTDTVEM ANKTQNLEVV AQYQFDFGLR PAISYVQSKG
KQLNGADGSA DLAKYIQAGA TYYFNKNMNV WVDYRFNLLD ENDYSSSYVG
TDDQAAVGIT YQF

图 21

A.

MASTPNIAFP AITQEQMSSI EVDPTS~~N~~LLP SQEQLKSVST LMVAAKVPAA SVTTVALELV
NFCYDNGSSA YTTVTGPSSI PEISLAQLAS IVKASGTSR KFCRYFAPII WNLRTDKMAP
ANWEASGYKP SAKFAAFDFF DGVENPAAMQ PPSGLTRSPT QEERIANATN
KQVHLFQAAA QGNNFASNSA FITKGQISGS TPTIQFLPPP EEAKGLIR*HH HHHH*

B.

MASTPNIAFP AITQEQMSSI KVDPTS~~N~~LLP SQEQLKSVST LMVAAKVPAA SVTTVALELV
NFCYDNGSSA YTTVTGPSSI PEISLAQLAS IVKASGTSR KFCRYFAPII WNLRTDKMAP
ANWEASGYKP SAKFAAFDFF DGVENPAAMQ PPSGLTRSPT QEERIANATN
KQVHLFQAAA QDNNFASNSA FITKGQISGS TPTIQFLPPP EFHENWPS*HH HHHH*

图 22

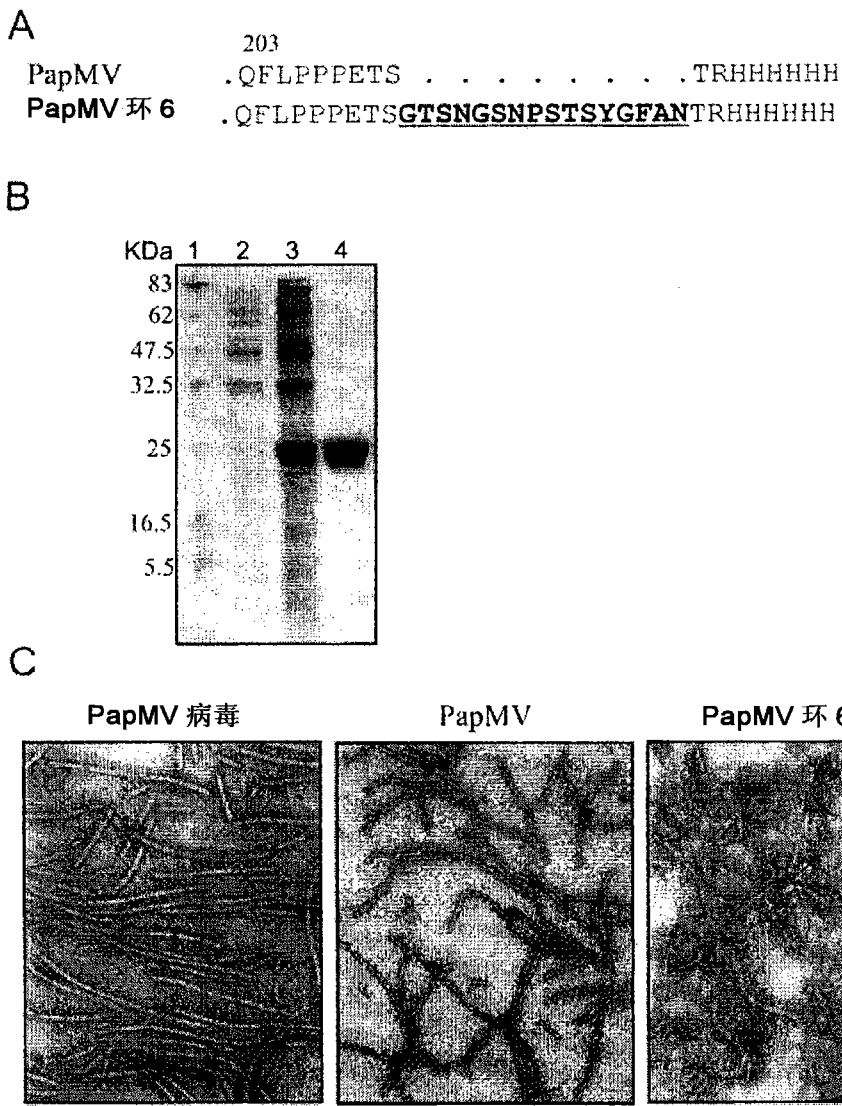


图 23

A.

MASTPNIAFFAITQEQMSSIKVDPTSNLLPSQEQLKSVSTLMVAAKVPAASVTTVALELVNF
CYDNGSSAYTTVTGPSSIPEISLAQLASIVKASGTS LRKFCRYFAPIIWNLRD KMAPANWE
ASGYKPSAKFAAFDFFDGVENPAAMQPPSGLTRSPTQEERIANATNKQVHLFQAAAQDNN
FASNSAFITKGQISGSTPTIQFLPPETS SGTSNGSNPSTSYGFANTRHHHHH

B.

ATGGCATCCACACCCAACATAGCCTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGA
TTAAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCC
ACCCTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTTACAACCTGTGGCATTGGAGTT
GGTTAACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCAT
CAATACCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCC
CTTAGGAAATTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAA
TGGCTCCTGCCAATTGGGAGGCCTCAGGATACAAGCCAAGCGCCAAATTTGCCGCGTT
CGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAACCCCCTTCGGGACTAACC
AGGTCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCCACCAACAAACAGGTGCATCTCT
TCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGCCAGCAACTCCGCCTTCATCACCAAAGG
CCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCCCGAACTAGTGGTA
CTTCTAACGGTTCTAACCCGTCTACTTCTTACGGTTTCGCGAACACGCGTCACCATCAC
CATCACCATTAG

图 24

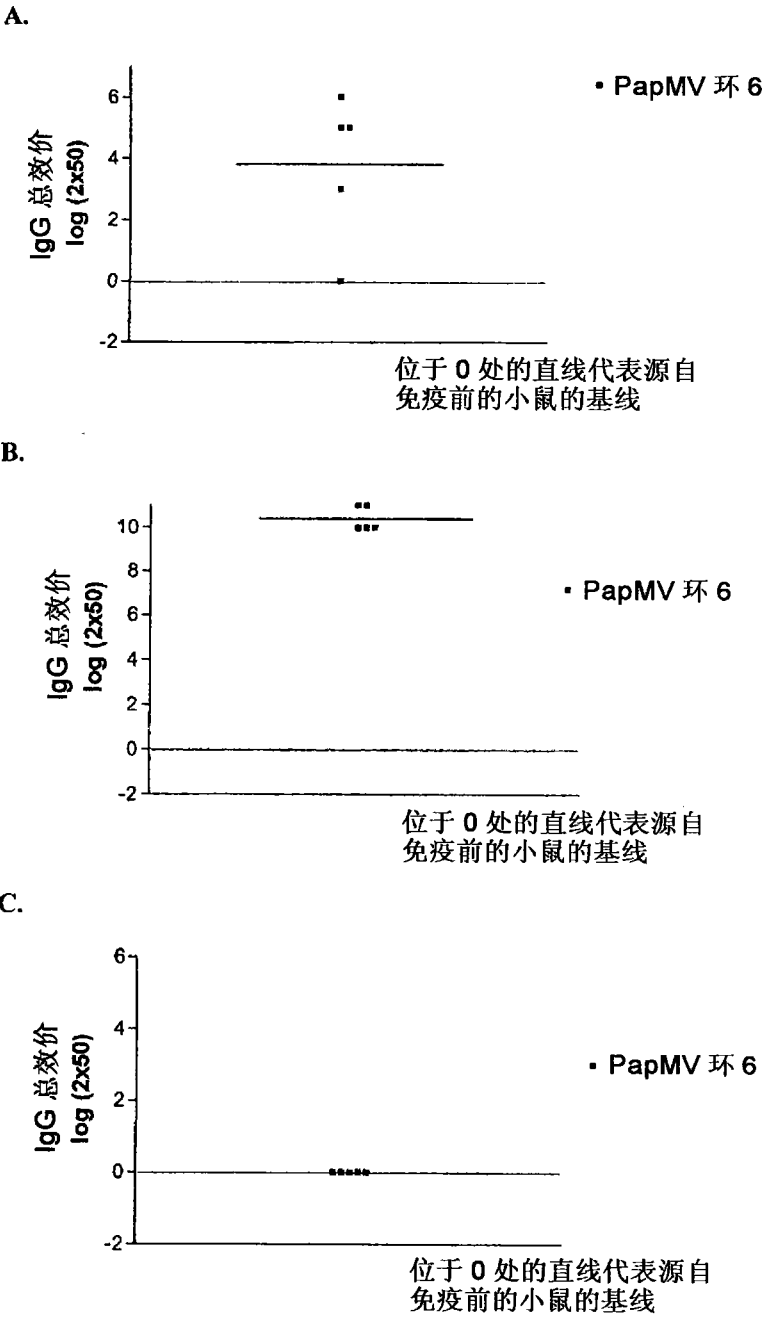


图 25

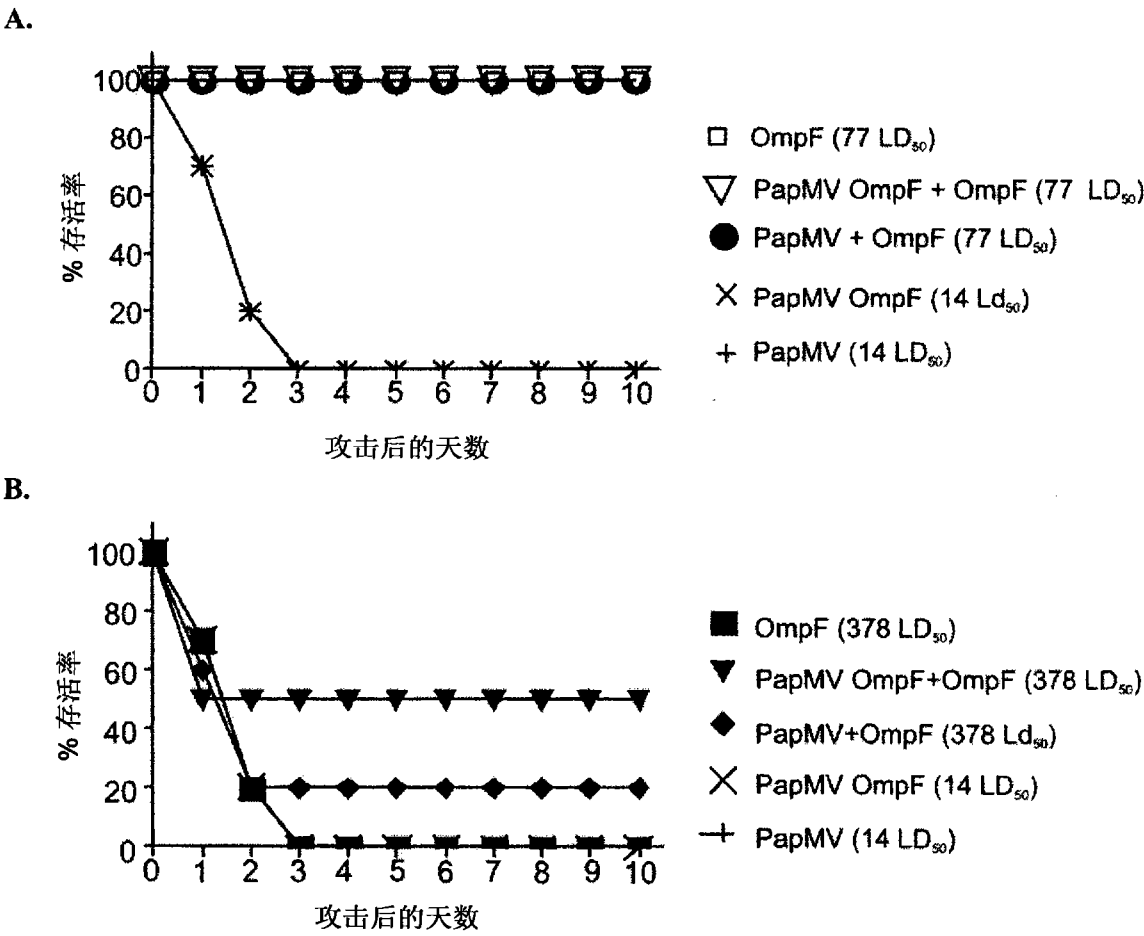


图 26

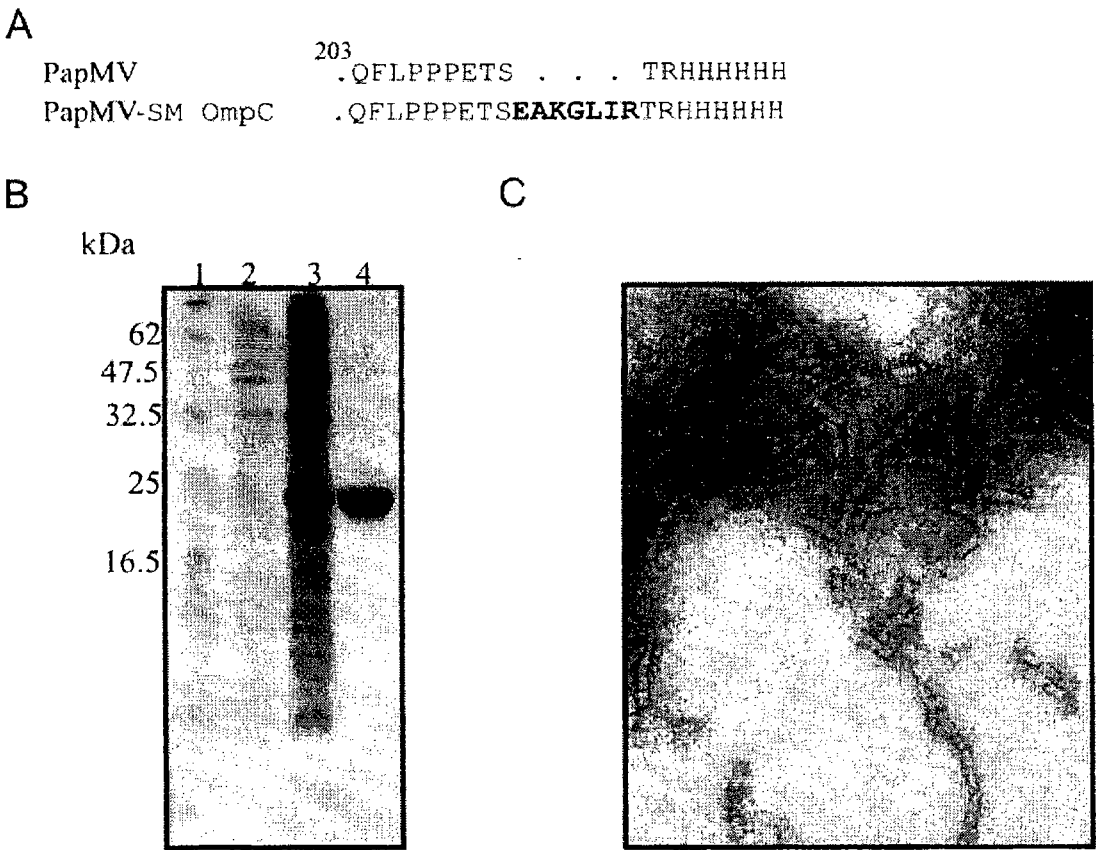


图 27

A.

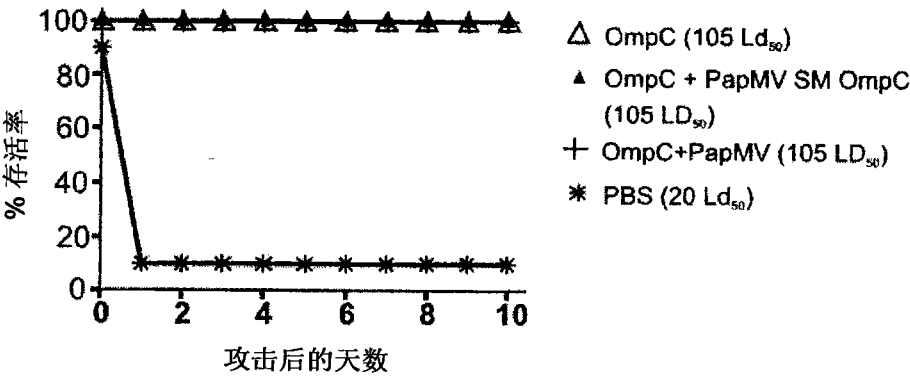
MASTPNIAFPAITQEQMSSIKVDPTSNLLPSQEQLKSVSTLMVAAKVPAASVTTVALELVNF
CYDNGSSAYTTVTGPSSIPEISLAQLASIVKASGTS LRKFCRYFAPIIWNLRTDKMAPANWE
ASGYKPSAKFAAFDFFDGVENPAAMQPPSGLTRSPTQEERIANATNKQVHLFQAAAQDNN
FASNSAFITKGQISGSTPTIQFLPPPETSEAKGLIRTRHHHHH

B.

ATGGCATCCACACCCAACATAGCCTTCCCCGCCATCACCCAGGAACAAATGAGCTCGA
TTAAGGTCGATCCAACGTCCAATCTTCTGCCCTCCCAAGAGCAGTTAAAGTCAGTGTCC
ACCCTCATGGTAGCTGCTAAGGTTCCAGCAGCCAGTGTTACAACGTGTGGCATTGGAGTT
GGTTAACTTCTGCTATGACAATGGGTCCAGCGCGTACACCACAGTGACTGGCCCATCAT
CAATACCGGAGATATCACTGGCACAATTGGCCAGCATTGTCAAAGCTTCCGGCACTTCC
CTTAGGAAATTCTGCCGGTACTTCGCGCCAATAATCTGGAATCTGAGGACGGACAAAA
TGGCTCCTGCCAATTGGGAGGCCTCAGGATACAAGCCAAGCGCCAAATTTGCCGCGTT
CGACTTCTTCGACGGGGTGGAGAATCCGGCGGCCATGCAACCCCCTTCGGGACTAACC
AGGTCGCCGACCCAGGAAGAGCGGATTGCCAATGCCACCAACAAACAGGTGCATCTCT
TCCAAGCCGCGGCACAGGACAACAACCTTTGCCAGCAACTCCGCCTTCATCACCAAAGG
CCAAATTTCTGGGTCAACCCCAACCATCCAATTCCTTCCACCCCCCGAACTAGTGAGG
CGAAGGGGTTGATTTCGTACGCGTCACCATCACCATCACCATTAG

图 28

A.



B.

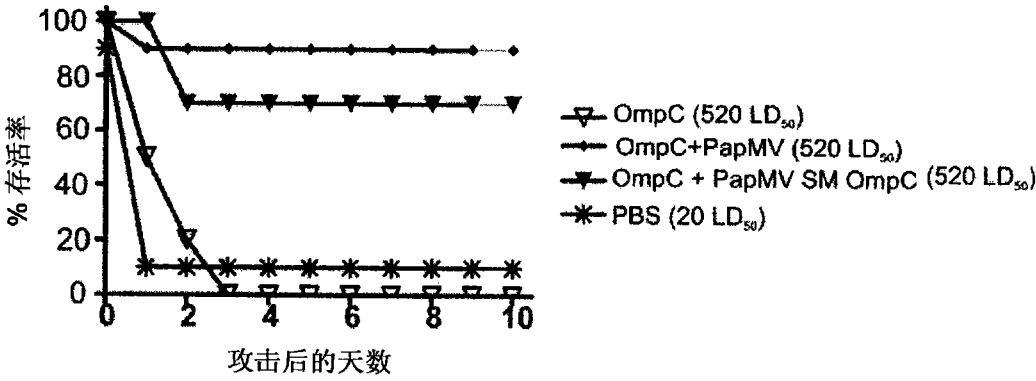


图 29

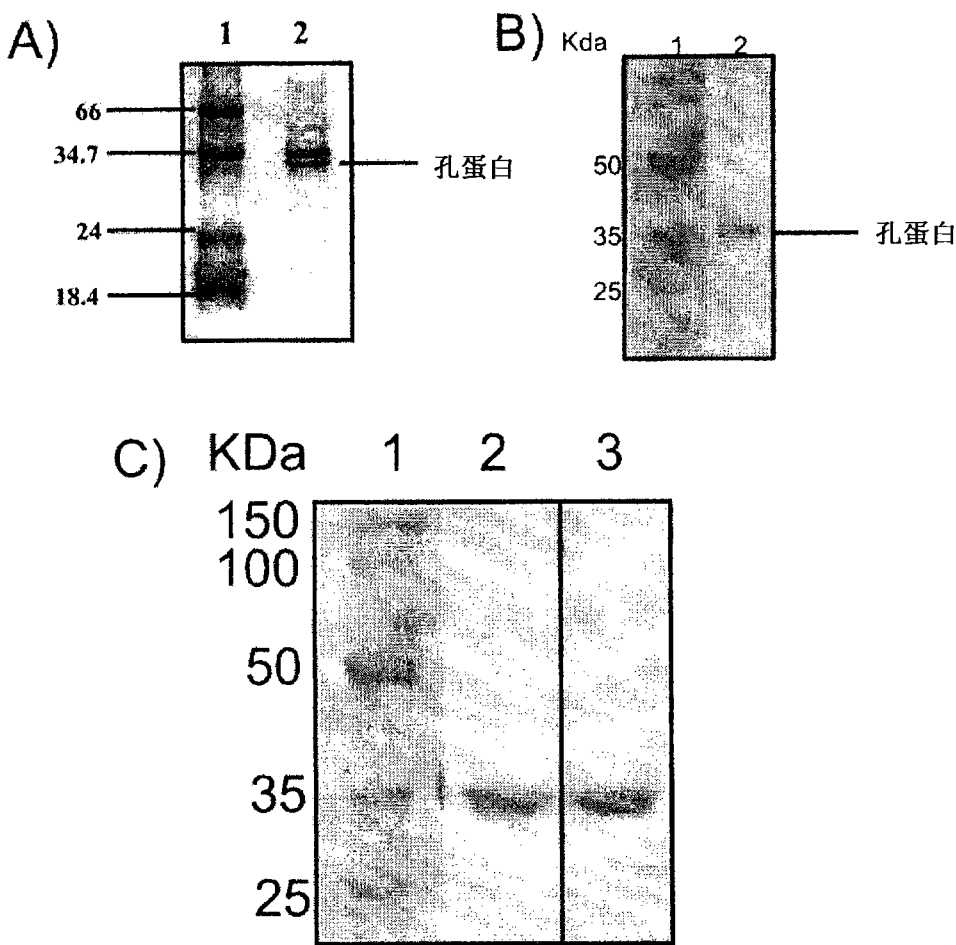


图 30

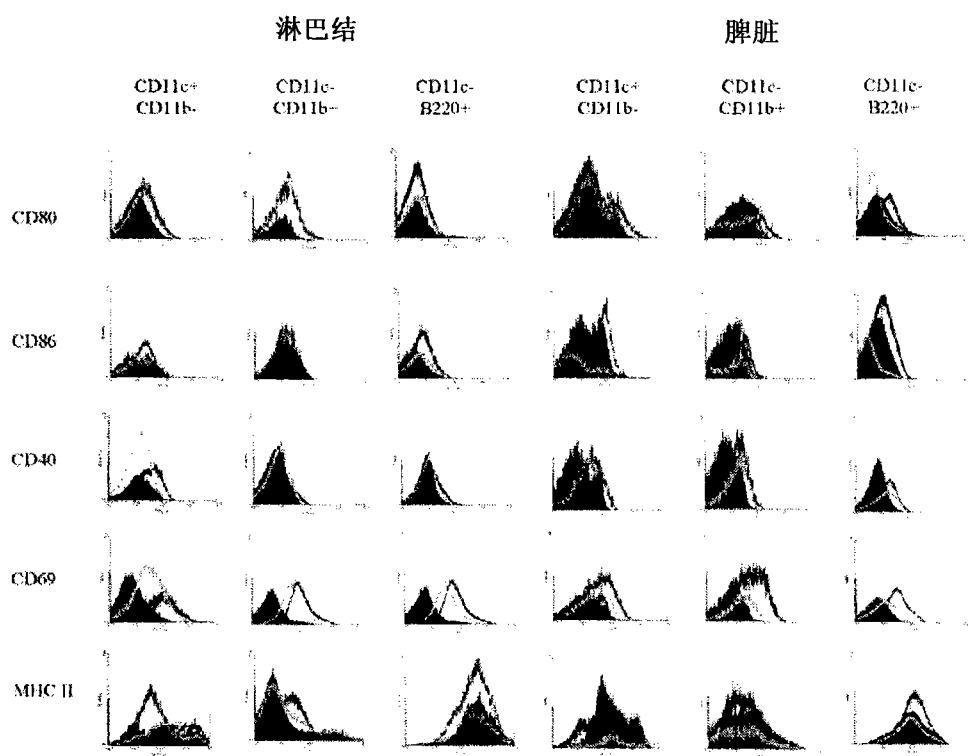


图 31