



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I510247 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：099109094

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 26 日

(51)Int. Cl.：

*A61K39/145 (2006.01)**A61K39/155 (2006.01)**A61K39/29 (2006.01)**A61K39/21 (2006.01)**C07K14/11 (2006.01)**C07K14/135 (2006.01)**C07K14/18 (2006.01)**C07K14/155 (2006.01)**A61P31/12 (2006.01)**A61P31/14 (2006.01)**A61P31/16 (2006.01)**A61P31/18 (2006.01)*

(30)優先權：2009/03/27 美國

61/164,385

2009/03/28 美國

61/164,387

2009/03/28 美國

61/164,388

2009/03/28 美國

61/164,389

2010/03/12 美國

61/313,676

(71)申請人：中央研究院(中華民國) ACADEMIA SINICA (TW)

臺北市南港區研究院路 2 段 128 號

(72)發明人：翁啟惠 WONG, CHI HUEY (TW)；馬徹 MA, CHE (TW)；王正琪 WANG, CHENG

CHI (TW)；陳俊叡 CHEN, JUINE RUEY (TW)

(74)代理人：盧偉銘

(56)參考文獻：

WO 2007/150054A2

Munk K et al., Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus haemagglutinin independent of oligosaccharide size. *Glycobiology*. 1992 Jun;2(3):233-40.

S. Yasamin Mir-Shekari et al., The Glycosylation of the Influenza A Virus Hemagglutinin by Mammalian Cells. Vol. 272, No. 7, Issue of February 14, pp. 4027-4036, 1997.

審查人員：李家旭

申請專利範圍項數：40 項 圖式數：21 共 146 頁

(54)名稱

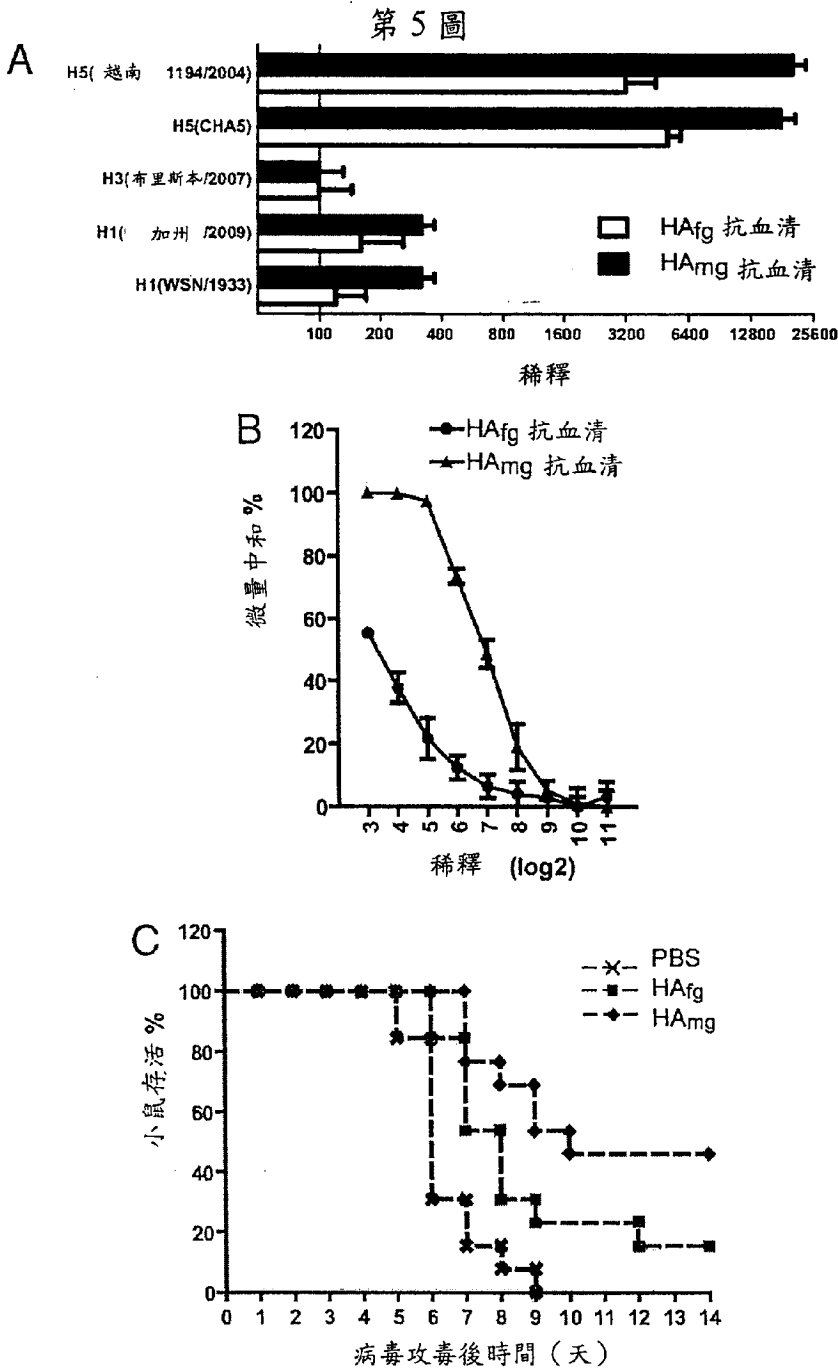
預防病毒的免疫方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR IMMUNIZATION AGAINST VIRUS

(57)摘要

本發明提供含有用作為對抗病毒疫苗之部分糖基化病毒糖蛋白的免疫原性組合物。本發明係利用單-、雙-或三糖基化病毒表面糖蛋白及多肽配製的疫苗即使在不同株之間亦具有對抗病毒的強力和廣效保護作用。本發明揭示含有單糖基化血球凝集素多肽的醫藥組合物和其所產生的疫苗以及其用於預防或治療病毒感染的方法。本發明揭示用於流感病毒 HA、NA 和 M2，RSV 蛋白 F、G 和 SH，登革熱病毒糖蛋白 M 或 E，C 型肝炎病毒糖蛋白 E1 或 E2 以及 HIV 糖蛋白 gp120 和 gp41 的方法和組合物。

Immunogenic compositions comprising partially glycosylated viral glycoproteins for use as vaccines against viruses are provided. Vaccines formulated using mono-, di-, or tri-glycosylated viral surface glycoproteins and polypeptides provide potent and broad protection against viruses, even across strains. Pharmaceutical compositions comprising monoglycosylated hemagglutinin polypeptides and vaccines generated therefrom and methods of their use for prophylaxis or treatment of viral infections are disclosed. Methods and compositions are disclosed for influenza virus HA, NA and M2, RSV proteins F, G and SH, Dengue virus glycoproteins M or E, hepatitis C virus glycoprotein E1 or E2 and HIV glycoproteins gp120 and gp41.



六、發明說明：

【發明相關參考文獻】

本申請案主張優先權案為美國臨時專利申請案第 61/164,385 號，發明名稱為「預防流感的免疫方法及組合物」，其係申請於 2009 年 3 月 27 日；美國臨時專利申請案第 61/164,387 號，發明名稱為「預防人類免疫缺陷病毒的免疫方法及組合物」，其係申請於 2009 年 3 月 28 日；美國臨時專利申請案第 61/164,388 號，發明名稱為「預防黃熱病毒的免疫方法及組合物」，其係申請於 2009 年 3 月 28 日；美國臨時專利申請案第 61/164,388 號，發明名稱為「預防黃熱病毒的免疫方法及組合物」，其係申請於 2009 年 3 月 28 日；美國臨時專利申請案第 61/164,389 號，發明名稱為「預防病毒感染的疫苗製造方法」其係申請於 2009 年 3 月 28 日；美國臨時專利申請案第 61/313,676 號，發明名稱為「預防流感的免疫方法及組合物」，申請於 2010 年 3 月 12 日，以上所有臨時專利申請之內容在此以參考方式全部併入。

【參考序列表】

本申請案包括序列表。序列表之電腦可讀取副本係透過 EFS-Web 以製作於 2010 年 3 月 24 日之 ASCII 檔案在此同時呈送，命名為 SEQ_OPK50101_ST25，大小為 42952 字元。序列表包括的資訊在此以參考方式全部併入。

【發明所屬之技術領域】

本發明一般係關於用於產生有效對抗病毒之強力、廣效反應性免疫原性組合物的部分糖基化病毒多肽。明確而

言，本發明係關於利用單糖基化流感病毒血球凝集素(HA)肽產生具有強力對抗流感病毒之活性的疫苗。本發明係關於含有依此方法產生之糖蛋白和疫苗的醫藥組合物，以及係關於利用該去糖基化 HA 多肽於預防和治療流感病毒感染的方法。

【先前技術】

在真核生物中，糖殘基通常連接至四個不同的胺基酸殘基。這些胺基酸殘基被分類為 O-連接(絲胺酸、蘇胺酸和羥基離胺酸)和 N-連接(天冬胺酸鹽)。於高基氏體或顆粒內質網(ER)內從核苷酸糖合成該 O-連接糖。從一般前體及後續加工合成 N-連接糖。已知添加 N-連接糖鏈對折疊的穩定、避免內質網的分解、寡聚化、生物學活性和糖蛋白運輸而言極為重要。添加 N-連接寡糖至特定 Asn 殘基在病毒之成熟蛋白的調節活性、穩定性或抗原性上扮演重要角色(Opdenakker G.等人, *FASEB Journal* 7: 1330~1337; 1993)。亦已認為 N-糖基化係糖蛋白的折疊、輸送、細胞表面表現、分泌(Helenius, A, *Mol. Bio. Of the Cell* 5: 253~265; 1994)，保護蛋白被蛋白分解及強化糖蛋白溶解度(Doms 等人, *Virology* 193: 545~562; 1993)所必需。病毒表面糖蛋白不僅為準確蛋白折疊所必需，亦提供對抗中和抗體如"聚糖屏障"的保護作用。因此，強宿主專一性的篩選經常伴隨可能 N-連接糖基化的密碼子位置。隨後的 N-連接糖化作用傾向被保留通過株和支系。

流感病毒具有三種主要類型：A、B 和 C。A 型流感病毒可造成嚴重的疾病以及是造成人類流行病的唯一類型。H5N1 株係一種 A 型流感病毒。B 型株為散發性和小規模爆發的人類病例。C 型株極少造成人類感染及未造成大規模爆發。就 A 型流感病毒而言，僅 H1、H2 和 H3 亞型易於

人類之間傳染。

A 型流感病毒的爆發持續造成全球廣泛的罹患率和死亡率。據估計單是美國每年感染 A 型流感的族群為 5 至 20%，此造成約 200,000 人住院及 36,000 人的死亡。建立綜合性防疫政策已經成為降低流感罹患率的有效方法。然而，病毒經常的基因漂移需每年重新配製疫苗，此將導致疫苗內病毒株與流行之間的不匹配。因此，對抗流感病毒的抗病毒療法為降低疾病嚴重程度及傳播的一種重要工具。

自從 2003 年高病原性 H5N1 流感病毒已爆發於禽類和野生鳥類(Li KS 等人(2004) *Nature* 430: 209~213)。在 2010 年 2 月時，這些病毒已不僅感染禽類亦造成 478 位人類的感染，其中 286 件造成死亡(www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_02_17/en/index.html)。該高病原性 H5N1 和 2009 豬源 A 型流感病毒已造成全球性的爆發並且更加關注該病毒可能進一步突變而造成致命的瘟疫(Garten RJ 等人(2009) *Science* 325: 197~201; Neumann G. 等人(2009) *Nature* 459: 931~939)。令人關心的是一流感病毒將獲得有效散佈於人類之間的能力，其所造成的流行病將成為一項威脅。因此，一流感疫苗必需為任何大流行應變計劃的一整合部分。

流感病毒為分節負鏈 RNA 病毒及屬於正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)。A 型流感病毒由 9 個結構蛋白和密碼加上具有調控功能的一非結構 NS1 蛋白所構成。該非結構 NS1 蛋白在繁殖循環期間被大量合成以及位於感染細胞的胞漿和胞核內。該病毒基因組的分節性質可使其在一細胞與不同病毒株混合感染期間產生基因重組的機制(交換基因組片段)。該 A 型流感病毒可視顯露於其表面的不同血球凝集素(HA)和神經胺酸酶(NA)病毒蛋白被進一步分類成各種

的亞型。藉由兩種病毒表面的糖蛋白，血球凝集素(HA 或 H)和神經胺酸酶(NA 或 N)可鑑定出 A 型流感病毒的亞型。依照其 H 和 N 蛋白的組合可鑑定各流感病毒的亞型。已有 16 種已知的 HA 亞型和 9 種已知的 NA 亞型。A 型流感病毒可感染人、鳥、豬、馬和其他動物，但是野鳥這些病毒的天然宿主。目前僅一些 A 型流感亞型(即 H1N1、H1N2 和 H3N2)流行於人類之間，但是 16H 和 9NA 亞型的全部組合已被鑑定於特別指水鳥和海鳥的禽類。此外，許多證據顯示 H5 和 H7 流感病毒亦可造成人類的疾病。

A 型流感病毒的 HA 含有兩個不同結構區，亦即球狀頭部區和幹區。該球狀頭部區含有負責病毒附著至一標的細胞及參與 HA 之凝集活性的一受體結合位點。該幹區含有病毒封套和細胞內質膜之間膜融合所必需以及與融合活性有關的一融合肽(Wiley 等人 *Ann. Rev. Biochem.* 56: 365~394(1987))。

感染流行性感冒之瞭解的重要貢獻係來自對血球凝集素(HA)的研究，一種結合至呼吸道內特異性唾液酸聚糖受體以使病毒進入細胞的病毒外套糖蛋白(Kuiken T 等人(2006) *Science* 312: 394~397; Maines TR 等人(2009) *Science* 325: 484~487; Skehel JJ, Wiley DC(2000) *Ann. Rev. Biochem.* 69: 531~569; van Riel D.等人(2006) *Science* 312: 399~399)。為穿越物種障礙及感染人類族群，禽 AV 必需從含 α -2,3(禽)-連接的終端唾液酸聚糖改變其受體-結合優先性至 α -2,6(人)-連接的唾液酸基序(Connor RJ 等人(1994) *Virology* 205: 17~23); 以及此轉變僅經由兩次發生於 1918 年大流行的突變(Tumpey TM 等人(2007) *Science* 315: 655~659)。因此，瞭解該影響流感結合至聚糖受體的因素為發展用於控制任何未來具有大流行可能性交叉感染流感病毒之方法的關鍵。

針對此製造可誘發對抗 H5N1 流感病毒相異品系之強效中和抗體的一候選流感疫苗需求，發展出可中和一組具有各種 H5N1 支系假型 HA 之病毒粒子(virions)的共有 H5N1 血球凝集素(HA)序列疫苗(Chen MW.等人(2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 : 13538~13543)。

HA 係一種具有由一球狀頭部和一幹區組成之胞外域的同三聚體跨膜蛋白(Kuiken T 等人(2006) *Science* 312 : 394~397)。該二區均攜帶可影響 HA 功能性(Chen ZY 等人(2008) *Vaccine* 26 : 361~371 ; Ohuchi R 等人(1997) *J. Virol.* 71 : 3719~3725)的 N-連接寡糖(Keil W 等人(1985) *EMBO J.* 4 : 2711~2720)。A 型流感病毒的不同亞型之中，在頭部區的糖基化位點有廣泛的變異，然而該幹部寡糖則更為保留及需要融合活性(Ohuchi R 等人(1997) *J. Virol.* 71 : 3719~3725)。接近抗原肽表位的聚糖干擾抗體的辨識(Skehel JJ 等人(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 1779~1783)，以及接近 HA 之蛋白水解活化位點的聚糖調節其斷裂和影響流感病毒的感染性(Deshpande KL 等人(1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 36~40)。HA 糖基化位點的缺失突變可影響病毒受體的結合(Gunther I 等人(1993) *Virus Res.* 27 : 147~160)。

改變於或接近糖基化位點的肽序列可能改變 HA 的立體結構，而因此具有受體結合特異性和親和力。事實上，來自不同 H5N1 亞型的 HA 具有不同聚糖結合模式(Stevens J 等人(2008) *J. Mol. Biol.* 381 : 1382~1394)。已於全病毒系統中研究 H1 和 H3 上糖基化位點的突變(Chandrasekaran A 等人(2008) *Nat. Biotechnol.* 26 : 107~113 ; Deom CM 等人(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 3771~3775)。然而，仍未知糖基化的改變如何影響受體的結合特異性和親和力，其特別指最具病原性的 H5N1 HA。

由於 HA 的低高度糖基化或無糖基化區持續地發生突變以逃避宿主的免疫系統，因此每年必需改變所製造的流感疫苗。

對抗異質性病原體之疫苗設計的目標為鑑定和設計有效且廣泛保護性抗原。在流行性感冒的例子中，已花費極大努力於實證檢驗保守的線性序列和區域但無成果。這些失敗的可取信理由為缺乏針對實際真正生產部位抗原性測試物件之反應以中和在建構一實際感染中之病原體上抗原的知識。

【發明內容】

明確而言，在目前和未來疫苗製造中需要一種能維持或加強交叉中和表位之品質和抗原性而且可被用於設計和確認疫苗生產過程的交叉中和單株抗體。假設結合至疫苗的抗體可反映出結構完整性和抗原強度，此將可測定交叉中和抗體的結合，例如去糖基化 HA 多肽至該疫苗加工衍生物而可定量性測定其交叉中和潛力。為了最大化針對這些通用表位的反應將創造出一種可增加針對這些通用表位之免疫原性的衍生物。

根據本發明，揭示一種利用這些原則的疫苗。藉由從病毒糖蛋白部分移除糖以暴露出糖基化位點(其為高度保留及不產生突變或非侵犯性突變)以及在同時保留適當糖以保存該糖蛋白的三級結構。藉由部分去糖基化該糖蛋白使一特定糖基化位點保留一、二或三個糖單位而產生該部分糖基化病毒糖蛋白。在一些態樣中藉由未糖化一或多個特定糖基化位點及共軛一單-、雙-或三糖至該糖基化位點提供一蛋白或多肽可產生該部分糖基化糖蛋白。

揭示含有至少一部分糖基化 HA、NA 或 M2 糖蛋白及醫藥上可接受載劑的疫苗。在一些實例中，該部分糖基化

HA 糖蛋白係選自由部分糖基化流感病毒 HI、H3 和 H5 所構成的群組。在一些實例中，H5 HA 於一或多個位置 39、127、170、181、302、495 和 500 的天冬胺酸殘基被糖基化。在一些實例中，該天冬胺酸殘基係於位置 177。

揭示一種包括將含有至少一去糖基化 HA 糖蛋白及一醫藥上可接受載劑之疫苗投與至流感敏感性生物體的方法。在一些實例中，該去糖基化 HA 糖蛋白係選自由 HI、H3 和 H5 構成的群組。

在一些實例中該去糖基化於糖蛋白上的一或多個糖基化位點產生一單糖基化作用(留下一個糖分子)。在一些實例中該去糖基化於糖蛋白上的至少一個糖基化位點產生雙糖基化作用(留下兩個糖分子)。在一些實例中該去糖基化於糖蛋白上的至少一或多個糖基化位點產生三糖基化作用(留下三個糖分子)。在一些實例中該去糖基化於糖蛋白上的至少一個糖基化位點產生至少一個單糖基化、雙糖基化和三糖基化作用。

本發明係關於一種用於提高對病毒、細菌、真菌或其他來源病原體之免疫反應的免疫原性組合物，該組合物包含：來自病毒、細菌、真菌或其他來源病原體的一抗原糖蛋白，其中該糖蛋白被部分糖基化。

在一些態樣中，該病原體係病毒以及該部分糖基化抗原係病毒、病毒樣顆粒、病毒肽、蛋白質、多肽，或源自該病毒的片段、或部分含有病毒蛋白序列的一融合蛋白。

該病毒係選自流感病毒、呼吸道融合病毒(RSV)、衣原體、腺病毒科、巨大腺病毒(mastadenovirus)、禽腺病毒、皰疹病毒科、單純皰疹病毒 1、單純皰疹病毒 2、單純皰疹病毒 5、單純皰疹病毒 6、光滑病毒科(leviviridae)、輕小病毒(levivirus)、腸桿菌噬菌體 MS2、蘿莉病毒(allolevirus)、痘病毒科、痘病毒脊索亞科(chordopoxvirinae)、副痘病毒

屬、禽痘病毒屬、山羊痘病毒屬、兔痘病毒屬、豬痘病毒屬、軟疣痘病毒屬、痘病毒昆蟲亞科、乳多瘤病毒科、多瘤病毒、乳頭瘤病毒、副黏液病毒科、副黏液病毒、副流感病毒 1、麻疹病毒屬、麻疹病毒、德國麻疹病毒屬、腮腺炎病毒、肺炎病毒亞科、肺炎病毒屬、間質肺炎病毒屬、禽肺炎病毒、人間質肺炎病毒、小 RNA 病毒科、腸病毒、鼻病毒、肝炎病毒、人 A 型肝炎病毒、心肌炎病毒、口蹄疫病毒屬、里奧病毒科、正里奧病毒、環狀病毒、輪狀病毒、多角體病毒屬、斐濟病毒屬、植物里奧病毒屬、水稻病毒屬、反轉錄病毒科、哺乳類 B 型反轉錄病毒、哺乳類 C 型反轉錄病毒、鳥類 C 型反轉錄病毒、D 型反轉錄病毒群、BLV-HTLV 反轉錄病毒、慢病毒(lentivirus)、人類免疫缺陷病毒 1、人類免疫缺陷病毒 2、HTLV-I 和-II 病毒、SARS 冠狀病毒、單純皰疹病毒、伊波病毒(Epstein Barr virus)、巨細胞病毒、肝炎病毒(HCV、HAV、HBV、HDV、HEV)、剛地弓蟲病毒、梅毒螺旋體病毒、人類嗜 T 淋巴球病毒、腦炎病毒、西尼羅河病毒、登革熱病毒、水痘帶狀疱疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、德國麻疹病毒、泡沫病毒屬、黃熱病毒科、C 型肝炎病毒、嗜肝 DNA 病毒科、B 型肝炎病毒、披膜病毒科、甲病毒新德比斯病毒(alphavirus sindbis virus)、風疹病毒屬、風疹病毒、棒狀病毒科、水泡病毒屬、莉莎病毒屬(lyssavirus)、流行熱病毒屬、胞內水稻黃矮炮彈病毒(cytorhabdovirus)、核內水稻黃矮炮彈病毒、沙狀病毒科(arenaviridae)、沙狀病毒屬、淋巴球性脈絡叢腦膜炎病毒、Ippya 病毒、拉薩熱病毒(lassa virus)、冠狀病毒和曲狀病毒(torovirus)。

該病毒胜肽、蛋白、多肽或其片段係選自流感病毒神經胺酸酶；流感病毒血球凝集素；人呼吸道融合病毒(RSV)-病毒蛋白；RSV F 糖蛋白；RSV G 糖蛋白；單純皰疹病毒

(HSV)病毒蛋白；單純皰疹病毒糖蛋白 gB、gC、gD 和 gE；衣原體 MOMP 和 PorB 抗原；核心蛋白；登革熱病毒的基質蛋白或其他蛋白；麻疹病毒血球凝集素；單純皰疹病毒第 2 型糖蛋白 gB；小兒麻痺病毒 1 VP1；HIV 1 的封套糖蛋白；B 型肝炎表面抗原；白喉毒素；鏈球菌 24H 表位；纖毛淋病雙球菌；假性狂犬病病毒 g50(gpD)；假性狂犬病病毒 II (gpB)；假性狂犬病病毒 III (gpC)；假性狂犬病病毒糖蛋白 H；假性狂犬病病毒糖蛋白 E；傳染性胃腸炎病毒糖蛋白 195；傳染性胃腸炎病毒基質蛋白；豬輪狀病毒糖蛋白 38；豬小病毒衣殼蛋白；豬痢疾蛇形螺旋體保護抗原；牛病毒性腹瀉糖蛋白 55；新城疫病毒血球凝集素-神經胺酸酶；豬流感血球凝集素；口蹄疫病毒；豬瘟病毒；豬流感病毒；非洲豬瘟病毒；豬肺炎黴漿菌；牛傳染性鼻氣管炎病毒；牛傳染性鼻氣管炎病毒糖蛋白 E、糖蛋白 G；傳染性喉氣管炎病毒；傳染性喉氣管炎病毒糖蛋白 G 或糖蛋白 I；拉克錫病毒(La Crosse virus)糖蛋白；初生仔牛下痢症病毒；委內瑞拉馬腦脊髓炎病毒；靜脈病毒(punta toro virus)；鼠白血病病毒；鼠乳腺腫瘤病毒；B 型肝炎病毒核心蛋白和 B 型肝炎病毒表面抗原或其片段或衍生物；馬流感病毒或馬皰疹病毒的抗原，包括馬流感病毒 A 型/Alaska 91 神經胺酸酶、馬流感病毒 A 型/Miami 63 神經胺酸酶、馬流感病毒 A 型/ Kentucky 81 神經胺酸酶、馬皰疹病毒 1 型糖蛋白 B 和馬皰疹病毒 1 型糖蛋白 D；牛呼吸道融合病毒或牛副流感病毒的抗原；牛呼吸道融合病毒附著蛋白(BRSV G)；牛呼吸道融合病毒融合蛋白(BRSV F)；牛呼吸道融合病毒核衣殼蛋白(BRSV N)；牛副流感病毒 3 型融合蛋白；牛副流感病毒 3 型凝集素神經胺酸酶；牛病毒性腹瀉病毒糖蛋白 48 和糖蛋白 53；登革熱病毒糖蛋白 E 以及人 C 型肝炎病毒的糖蛋白 E1 或 E2。

在一些態樣中，該糖基化病毒抗原係單-、雙-或三糖基化流感病毒血球凝集素。在一些具體實施例中，該去糖基化病毒抗原係選自由流感病毒 H1、H3 和 H5 構成之群組的單糖基化血球凝集素。在一些具體實施例中，該單糖基化流感病毒凝集素含胺基酸序列具有天冬胺酸鹽- X_{aa} -絲胺酸和天冬胺酸鹽- X_{aa} -蘇胺酸的 N-糖化位點，該 X_{aa} 係除脯胺酸之外的任何胺基酸。在一些態樣中，該單糖基化凝集素於糖化位點含有對 HA 受體結合呈現低特異性及較強親和力的一單 GlcNAc 糖。

在一些具體實施例中，該糖基化病毒抗原係以 N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)及/或甘露糖雙-或三糖基化的流感病毒凝集素。在一些態樣中，該糖基化病毒抗原係以 N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)單糖基化的流感病毒凝集素。

在一些態樣中，該單糖基化流感病毒凝集素含有包括共有 H5 HA 序列(序列辨識編號：4)的多肽。在一些具體實施例中，該單糖基化共有 H5 HA 序列(序列辨識編號：4)係於天冬胺酸殘基的位置 39、170、181、302 和 495 被糖基化。在其他態樣中，該單糖基化流感病毒血球凝集素含有選自由一 NIBRG-121 (2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)序列(序列辨識編號：6)、一共有 H1-A(序列辨識編號：8)和一共有 H1-C(序列辨識編號：10)序列構成之群組的 H1 多肽序列。在一些具體實施例中，修飾該 HA 序列使其可表現於一適當的真核細胞內。

在一具體實施例中，該單糖基化流感病毒血球凝集素含有一季節性 H1(布里斯本)多肽。

本發明亦係關於含有包括去糖基化至單-、雙-或三糖基化狀態之病毒糖蛋白的免疫原性多肽，及任選佐劑的疫苗，其中該疫苗能誘發對抗呼吸道病毒的免疫反應。在一些具體實施例中，該呼吸道病毒係一流感病毒及該病毒糖

蛋白係血球凝集素(HA)。

在一些態樣中，該流感病毒係選自由禽流感病毒及季節性流感病毒構成之群組。在一些具體實施例中，該禽流感病毒係 H5N1。在一些具體實施例中，該流感病毒係 A 型流感病毒。

在一態樣中，該病毒係呼吸道融合病毒(RSV)，以及該部分糖基化病毒抗原係單-、雙-或三糖基化 RSVF(融合)、G(附著)或 SH(低疏水性)糖蛋白，或其免疫原性片段。在一些具體實施例中，該單糖基化 RSVG 蛋白序列(序列辨識編號：12)於表 6 中所示一或多個可能 N-糖基化位點的天冬胺酸殘基被部分糖基化。

在一態樣中，該病毒係黃熱病毒，以及該部分糖基化病毒抗原係單-、雙-或三糖基化登革熱病毒封套糖蛋白 M、糖蛋白 E，或其免疫原性片段。在一些具體實施例中，該單糖基化登革熱病毒糖蛋白 E(序列辨識編號：13)於表 7 中所示一或多個 N-糖基化位點 N67 和 N153 的天冬胺酸殘基被部分糖基化。

在一態樣中，該病毒係 C 型肝炎病毒，以及該部分糖基化病毒抗原係單-、雙-或三糖基化 C 型肝炎封套糖蛋白 E1、糖蛋白 E2，或其免疫原性片段。在一些具體實施例中，該單糖基化 C 型肝炎封套糖蛋白 E1(序列辨識編號：14)於表 8 中所示一或多個 N-糖基化位點 N196、N209、N234、N305 和 N325 的天冬胺酸殘基被部分糖基化。

在一態樣中，該病毒係人類免疫缺陷病毒(HIV)，以及該部分糖基化病毒抗原係單-、雙-或三糖基化 HIV 封套糖蛋白 gp120、跨膜糖蛋白 gp41，或其免疫原性片段。在一些具體實施例中，該單糖基化 HIV 封套糖蛋白 gp120(序列辨識編號：15)係於如表 9 中所示天冬胺酸殘基的一或多個可能 N-糖基化位點被部分糖基化。

本發明亦係關於一種疫苗組合物包含：流感 HA 多肽，其中該流感 HA 多肽被去糖基化至單糖基化狀態；以及醫藥上可接受載劑，其中當將該單糖基化 HA 多肽被導入生物體時，該多肽可誘發該生物體產生結合至流感病毒的抗體。

在一些態樣中，將該單糖基化 HA 多肽導入生物體可誘發該生物體產生中和季節性和禽流感病毒的抗體。

在一具體實施例中，該單糖基化流感病毒凝集素含有季節性 H1(布里斯本)HA 多肽以及當將該單糖基化 HA 多肽導入一生物體時，該 H1(布里斯本)HA 多肽可誘發該生物體產生中和 NIBRG-121(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)流感病毒的抗體。

在另一具體實施例中，該單糖基化流感病毒血球凝集素含有 NIBRG-121(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)多肽以及當將該單糖基化 HA 多肽導入生物體時，該 NIBRG-121(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)多肽可誘發該生物體產生中和季節性 H1(布里斯本)HA 流感病毒的抗體。

在一些態樣中，該疫苗進一步含有佐劑，其可被選自氫氧化鋁、磷酸鋁、氫氧化鋁和磷酸鋁、佛氏(Freund's)不完全佐劑(IFA)、角鯊烯(squalene)、角鯊烷(squalane)、明礬和 MF59。

本發明係關於免疫哺乳動物以對抗病毒性呼吸道感染的方法，該方法包含：將含有包括去糖基化病毒糖蛋白至單-、雙-或三糖基化狀態之免疫原性多肽的疫苗投與至感染呼吸道病毒的感受性哺乳動物，其中該疫苗能誘發對抗該呼吸道病毒的免疫反應。在一些具體實施例中，該呼吸道病毒係流感病毒以及該病毒糖蛋白係血球凝集素(HA)。該疫苗可經由腸道外投藥、吸入法、鼻內被投與，以及有時可用於預防。

在一些態樣中，該疫苗可誘發對抗病毒或不同於所選用部分糖基化病毒糖蛋白病毒之不同株相同病毒的免疫反應。在一些具體實施例中，該去糖基化病毒糖蛋白係單糖基化流感血球凝集素(HA)。

本發明提供可有效對抗 A 型流感病毒的疫苗。在一具體實施例中，該疫苗含有功能上模擬此處所述分子之中和表位的胜肽或多肽。在另一具體實施例中，該疫苗可有效對抗病毒抗原其含有功能上模擬此處所述分子之中和表位之胜肽或多肽。在一具體實施例中，該病毒抗原係來自流感病毒或 HIV-1、HIV-2 病毒或黃熱病毒，例如登革熱病毒或 C 型肝炎病毒。

在另一具體實施例中，該疫苗係一種有效對抗 A 型流感病毒的疫苗，其含有功能上模擬此處所述分子之中和表位之胜肽或多肽。在一具體實施例中，該分子係抗體。在另一具體實施例中，該抗體可結合 HA 抗原。在其他具體實施例中，該 HA 抗原係 H5 亞型。在其他具體實施例中，該 HA 抗原係 H1 亞型。在一其他具體實施例中，該抗原被呈現於該 A 型流感病毒的表面。在其他具體實施例中，該胜肽或多肽含有產生中和抗體的抗原決定部位。

從下列較佳具體實施例的描述配合下列的附圖將可更瞭解諸如此類的態樣，其雖然受變化和改良的影響但仍不偏離該揭示之新穎概念的精神和範圍。

【實施方式】

下列本發明具體實施例的詳細說明係參考以相同之元件編號表示類似元件的附圖，以及其係藉由本發明可實施的特定具體實施例進行說明。這些具體實施例被詳細描述以使熟習本領域之技術者能實施本發明，以及必需瞭解可利用其他具體實施例並且進行邏輯上、構造上、功能上和其他的改變而不偏離本發明的範圍。因此，下列的詳細說

明不被視為具有限制性的意義。

流感病毒的血球凝集素(HA)係一種具有由球狀頭部和幹區組成之胞外域的同三聚體跨膜蛋白。該二區均攜帶依照一般 N 糖基化徑路進行生合成的 N-連接寡糖。特定位置的糖基化可影響 HA 的功能性。包圍該抗原肽表位的糖類干擾與抗體的接觸，以及此效應將導致流感病毒的抗原性漂移。先前對 HA 的研究亦顯示被糖基化的肽序列具有高度保留性，以及藉由失去接近該受體結合位點的複合聚糖鏈可影響該 HA 受體的結合特異性。此外，藉由接近斷裂位點之聚糖調節該 HA 的蛋白水解活性可影響流感病毒的感染性。在 A 型流感病毒的不同亞型中已顯示其頭部區在糖基化位點的構造和數目上有許多的變異，反之該幹部寡糖較為保留並且需要融合活性。全部這些發現已顯示 HA 糖基化對其活性的重要性。

病毒傳播開始於血球凝集素(HA)糖蛋白於流感病毒外套上以及於宿主細胞表面上含聚糖之唾液酸之間的關鍵性相互作用。為說明 HA 糖基化於此重要相互作用的角色，定義各種 HA 糖型，以及藉由利用合成 SA 晶片研究其結合親和力和特異性。截斷 HA 上的 N-聚糖結構可增加 SA 結合親和力同時降低對不同 SA 配體的特異性。定量地劃分 SA 配體結構內各單糖和硫酸根基團對 HA 結合能的貢獻。已發現該硫酸根基團對全部糖基化 HA 而言可增加接近 100 倍(2.04 kcal/mol)的結合能，以及雙枝聚糖對單糖基化 HA 糖型亦相同。於各糖基化位點僅攜帶單一 N-連接 GlcNAc 之對抗 HA 蛋白的抗體比完全糖基化 HAs 所誘發對抗流感亞型顯示具有較佳的結合親和力及中和活性。因此，於病毒表面糖蛋白上移除結構上非必需聚糖在用於設計對抗流感及其他人類病毒之疫苗上係一種極有效和通用的方法。

除非另有說明，否則此處使用之技術和科學名詞與熟

習本領域之技術者通常所瞭解者的意義相同。Singleton 等人，微生物學和分子生物學詞典第二版，J. Wiley & Sons(紐約，紐約 1994)中提供本領域技術者許多用於本申請案之名詞的通則。

熟習本領域之技術者將瞭解可被用於本發明實務之類似或等同於此處所述的許多方法和材料。事實上，本發明在任何情況下非僅侷限於所述的方法和材料。就本發明的目的而言，下列的名詞被定義如下。

名詞"A 型流感亞型"或"A 型流感病毒亞型"可互用，以及指具有凝集素(H)病毒表面蛋白之特徵的 A 型流感病毒變異株而被標示以 H 數字舉例如 H1、H3 和 H5。此外，該亞型進一步具有以 N 數字表示之神經胺酸酶(N)病毒表面蛋白的特徵，舉例如 N1 和 N2。依此，可藉由 H 和 N 數字表示一亞型舉例如 H1N1、H5N1 和 H5N2。此名詞特別包括各亞型內的全部病毒株(包括滅絕株)，其通常導因於突變及呈現不同的致病概貌。此類病毒株亦將被稱為一病毒亞型的各種"分離株"，包括全部過去、現在和未來的分離株。因此，在本文中名詞"病毒株"和"分離株"可互用。亞型含有以 A 型流感病毒為基礎的抗原。該抗原可以血球凝集素病毒表面蛋白為基礎以及可被稱為"HA 抗原"。在一些實例中，此類抗原係基於舉例如 H1 亞型和一 H5 亞型的一特定亞型蛋白，其可分別被稱為 H1 抗原和 H5 抗原。

揭示於本發明之名詞"去糖基化"或"部分糖基化"蛋白意指具有一或多個移除自完全糖基化蛋白實例及該蛋白實質上保留其原始構形/折疊之聚糖結構的糖蛋白。一"去糖基化"蛋白包括一部分糖基化的蛋白，其中該糖基化過程可在一或多個糖基化位點留下單糖基化、雙糖基化或三糖基的糖蛋白。

一"部分糖基化"蛋白包括一"去糖基化"蛋白，其中一或

多個糖被保留於各糖基化位點以及各部分糖基化位點與完全糖基化糖蛋白的實例比較含有一較小聚糖結構(含有較少的糖單位)，以及該部分糖基化蛋白實質上保留其原始構形/折疊。藉由完全糖基化糖蛋白實例中部分去糖基化至少一糖基化位點的聚糖結構而產生一"部分糖基化"蛋白。亦可藉由在一蛋白的未糖基化位點引入糖基化作用而在完全糖基化的糖蛋白實例中使該位置加入的糖基化序列較小於該聚糖結構的方法產生一"部分糖基化"蛋白。亦可藉由在序列的糖基化位點引入糖基化胺基酸單體(例如 GlcNA-精胺酸基團)而使該加入的聚糖結構較小於完全糖基化之糖蛋白實例中在該位置的聚糖結構合成一病毒糖蛋白序列或其片段的方法產生一"部分糖基化"蛋白。

於此處可互用的名詞"核酸"和"多核苷酸"指單-或雙鏈 RNA、DNA，或混合聚合物。多核苷酸包括基因組序列、基因組外序列和質體序列，以及可表現或可用於表現多肽的較小基因工程片段。

一"分離核酸"係實質上分離自其他基因組 DNA 序列以及如自然地伴隨一天然序列核糖體和聚合酶之蛋白質或複合物的一種核酸。該名詞包含已移除自其天然環境的一核酸序列，以及包括重組或選殖 DNA 分離物和化學合成類似物或藉由異源系統生物合成的類似物。一實質純核酸包括分離自該核酸的分離型。當然，此係指原始分離的核酸以及包括後來藉由人工加至該分離核酸的基因或序列。

名詞"多肽"具有習知的意義，即指一胺基酸的序列。該多肽的產品非侷限於一特定的長度。胜肽、低聚肽和蛋白質均屬於多肽的定義範圍內，以及除非另有明述否則此處可互用這些名詞。此名詞亦非指或排除多肽的表現後修飾，例如糖基化、乙醯化、磷酸化等，以及已知技術中天然和非天然的其他修飾。一多肽可為一全蛋白質，或其子

序列。本發明文中重要的特殊多肽為含有 CDRs 及能結合一抗原或 HIV-感染病毒的胺基酸子序列。

一"分離多肽"係已被鑑定和分離及/或收獲自其天然環境之成分者。在較佳具體實施例中，該分離多肽可被純化至(1) 當藉由 Lowry 法測定時大於 95%重量比，以及最佳為大於 99%重量比的多肽；(2) 藉由旋轉杯定序儀測定時至足以獲得至少 N-端或內部胺基酸序列 15 個殘基的程度；或(3) 藉由 SDS-PAGE 時在還原或非還原條件下利用考馬斯藍(Coomassie blue)或較佳為銀染劑至同質化。由於不呈現多肽天然環境的至少一成分，因此分離多肽包括原位重組細胞內的多肽。然而，通常可藉由至少一種純化步驟製備分離多肽。

一"天然序列"多核苷酸係具有相同核苷酸序列作為源自天然之多核苷酸者。一"天然序列"多肽係具有相同胺基酸序列作為源自天然(例如來自任何品種)之多肽(例如抗體)者。此類天然序列多核苷酸和多肽可被分離自天然或可藉由重組或合成法被製備。

如此處所述之名詞，一多核苷酸"變體"係在一或多個取代、刪除、添加及/或插入上不同於特別揭示於此處之多核苷酸的一多核苷酸。此類變體可為天然或被合成產生，例如藉由藉由修飾本發明的一或多個多核苷酸序列以及如此處所述及/或利用本領域中任何習知的許多技術評估該多核苷酸的一或多種生物活性。

如此處所述之名詞，一多肽"變體"係在一或多個取代、刪除、添加及/或插入上不同於特別揭示於此處之多肽的一多肽。此類變體可為天然或被合成產生，例如藉由藉由修飾本發明的上述多肽序列以及如此處所述及/或利用本領域中任何習知的許多技術評估該多肽的一或多種生物活性。

可在本發明之多核苷酸和多肽的構造內進行修飾並且

仍可獲得編碼一變體或具有所欲特性之衍生多肽的一功能性分子。當欲改變該多肽的胺基酸序列以產生一等效物，或甚至本發明的一改良、變異或部分多肽時，熟習本領域之技術者通常需改變該編碼 DNA 序列的一或多個密碼子。

例如，在蛋白結構內的某些胺基酸可以其他胺基酸被取代而不嚴重損及結合其他多肽(如抗原)或細胞的能力。由於一蛋白的結合能力及性質定義蛋白質的生物功能活性，因此可在蛋白序列及其基本 DNA 編碼序列內進行某些胺基酸序列的取代作用而仍可獲得具有相同性質的蛋白質。因此預期可在揭示組合物之胜肽序列或編碼該胜肽的對應 DNA 序列內進行各種的變化而不嚴重損及其生物學效用或活性。

在進行此類改變的過程中，必需考慮胺基酸的親水指數。親水胺基酸指數於授予一蛋白質之互動生物學功能上的重要性已為技術中所習知(Kyte 和 Doolittle, 1982)。可接受的是胺基酸之相對親水性有助於定義該蛋白與其他分子相互作用之形成蛋白的二級結構，該其他分子為例如酵素、基質、受體、DNA、抗體、抗原等。各胺基酸具有根據其疏水性和電荷性質的親水指數(Kyte 和 Doolittle, 1982)。這些值為：異白胺酸(+4.5)、纈胺酸(+4.2)、白胺酸(+3.8)、苯丙胺酸(+2.8)、半胱胺酸/胱胺酸(+2.5)、甲硫胺酸(+1.9)、丙胺酸(+1.8)、甘胺酸(-0.4)、蘇胺酸(-0.7)、絲胺酸(-0.8)、色胺酸(-0.9)、酪胺酸(-1.3)、脯胺酸(-1.6)、組胺酸(-3.2)、麩胺酸鹽(-3.5)、麩醯胺酸(-3.5)、天門冬酸鹽(-3.5)、天門冬胺酸(-3.5)、離胺酸(-3.9)，及精胺酸(-4.5)。技術中已知某些胺基酸可被具有類似親水指數或分數的其他胺基酸所取代並且仍能產生具有類似生物學活性的蛋白質，即仍可獲得一生物學功能等效蛋白。在進行此類的改變中，胺基酸取代作用的親水指數較佳為在 ± 2 ，更佳為在 ± 1 ，最佳

為在 ± 0.5 的範圍內。

技術中亦瞭解可根據親水性有效地進行類似胺基酸的取代作用。美國專利案 4,554,101 宣稱受鄰近胺基酸之親水性所支配的蛋白質最大局部平均親水性與該蛋白的生物學性質有關。如美國專利案 4,554,101 所詳述，具有下列親水值的胺基酸殘基：精胺酸(+3.0)、離胺酸(+3.0)、天門冬酸鹽(+3.0 $\pm$ 1)、麩胺酸鹽(+3.0 $\pm$ 1)、絲胺酸(+0.3)、天門冬胺酸(+0.2)、麩醯胺酸(+0.2)、甘胺酸(0)、蘇胺酸(-0.4)、脯胺酸(-0.5 $\pm$ 1)、丙胺酸(-0.5)、組胺酸(-0.5)、半胱胺酸(-1.0)、甲硫胺酸(-1.3)、纈胺酸(-1.5)、白胺酸(-1.8)、異白胺酸(-1.8)、酪胺酸(-2.3)、苯丙胺酸(-2.5)、色胺酸(-3.4)。已瞭解一胺基酸可被另一具有類似親水值的胺基酸所取代並且仍可獲得生物性等效物，以及特別指一免疫等效蛋白。在此類變化中，胺基酸的取代作用其親水值較佳為在 ± 2 ，較佳為在 ± 1 ，以及最佳為在 ± 0.5 的範圍內。

如上述概述，胺基酸取代作用因此通常係根據該胺基酸側鏈取代基的相對類似性，如其疏水性、親水性、電荷、大小等。採用上述各種特性之範例取代作用已為本領域技術者所習知以及包括：精胺酸和離胺酸；麩胺酸鹽和天門冬酸鹽；絲胺酸和蘇胺酸；麩醯胺酸和天門冬胺酸；以及纈胺酸、白胺酸和異白胺酸。

多肽含有在蛋白 N-端的一訊息(或前導)序列，其共轉譯或轉譯後引導蛋白質的傳輸。該多肽亦可被共軛至連接子或易於該多肽(例如聚-His)之合成、純化或鑑定，或加強多肽至固態載體之結合的其他序列。

多肽的糖基化作用通常為 N-連接或 O-連接。N-連接指將糖基團附著至一天門冬胺酸殘基的側鏈。一"序列子(sequon)"係蛋白質內作為至一多糖(醣)之附著位點被稱為一 N-連接聚糖的三個連續胺基酸序列。此係經由天門冬胺



酸(Asn)之側鏈的氮原子連接至該蛋白的一多糖。一序列子可為 Asn-X_{aa}-Ser 或 Asn-X_{aa}-Thr，該 X_{aa} 係除了脯胺酸之外的任何胺基酸。因此，多肽內存在這些三肽序列可產生一潛在的糖基化位點。O-連接糖基化作用係指 N-乙醯半乳糖胺、半乳糖或木糖的其中一種糖被附著至一羥基胺基酸，最常見為絲胺酸或蘇胺酸，但是亦可使用 5-羥基脯胺酸或 5-羥基離胺酸。雖然 N-連接寡糖附著至一糖蛋白的過程中絕對需要該 Asn-X-Ser/Thr 序列子(Marshall RD, *Biochem. Soc. Symposia* 40: 17~26; 1974)，但是其存在不必然導致糖基化並且糖蛋白內的一些序列子可能保留未糖基化(Curling EM 等人, *Biochem. Journal* 272: 333~337; 1990)。

聚糖晶片係用於研究糖-蛋白相互作用及提供用於流感病毒亞型之新平台的有力工具(Blixt O 等人(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17033~17038; Chandrasekaran A 等人(2008) *Nat. Biotechnol.* 26: 107~113; Liang PH 等人(2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129: 11177~11184; Stevens J 等人(2008) *J. Mol. Biol.* 381: 1382~1394)。其模擬細胞表面上之聚糖以呈現高親和力和特異性的多價相互作用。利用此技術，具有受體特異性之各種天然和突變 HAs 的特性可提供用於辨別流感病毒亞型的新平台。

雖然為一種有力方法，但是藉由聚糖晶片之分析瞭解 HA-聚糖的相互作用在兩個議題上變得更為複雜：第一，HA 結合特異性可受空間配置以及該陣列化聚糖之組合物和所使用的結合偵測法的影響(Srinivasan A 等人(2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 2800~2805)。第二，於或接近糖基化位點的胜肽序列內變化可改變 HA 的三維結構，而因此改變受體結合的特異性和親和力。事實上，來自不同 H5N1 亞型的 HA 具有不同聚糖結合模式(Stevens J 等人(2008) *J. Mol. Biol.* 381: 1382~1394)。已於全病毒系統內研

究 H1 和 H3 上糖基化位點的突變(Chandrasekaran A 等人(2008)*Nat. Biotechnol.* 26 : 107~113 ; Deom CM 等人(1986)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 3771~3775)。然而，仍未知糖基化內變化對受體結合特異性和親和力的影響，其特別指最具病原性的 H5N1 HA。針對這些議題，發展出一種定量聚糖晶片的分析法以克服傳統 HA 結合實驗上的限制。

先前的試驗已經利用取得自昆蟲細胞之表現系統的 HA(Chandrasekaran A 等人(2008) *Nat. Biotechnol.* 26 : 107~113)。然而，昆蟲細胞與哺乳動物細胞比較具有不同的細胞內糖基化作用，其明顯差異在於複合型 N-聚糖終止於半乳糖以及昆蟲細胞內不產生唾液酸。

從人類細胞表現 HA 糖基化變體

針對人類細胞內的糖基化變化如何影響受體結合特異性和親和力，藉由利用流感 H5N1 HA 共有序列製備含有 HA-結合配體之大量構造類似物的聚糖晶片以及數種已定義糖型的 HA(Chen MW 等人(2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 : 13538~13543)於定量性結合分析。

藉由利用人類密碼子最適化用於表現的 CHA5 密碼子。如表 1 中所示，為避免蛋白質被酵素切割成 HA1 和 HA2 將該原始病毒蛋白酶切割位點 PQRERRRKKRG(序列辨識編號：1)突變成 PQRERG(序列辨識編號：2)。在 HA 構體的 C 端以附加殘基 LVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLGH **HHHHH**(序列辨識編號：3)取代該跨膜區(殘基：533~555)，斜體字為該凝血酶的切割點，劃底線者為噬菌體 T4 fibrin-foldon 三聚合序列，以及粗體字者為 His-標籤(Stevens J.等人(2006) *Science* 312 : 404~410)。



表 1 共有 H5 血球凝集素序列

粗體字表示共有 H5 HA 之胺基酸序列：訊號序列；以及劃底線者：三聚合序列和 His-標籤。

MEKIVLLFAIVSLVKS**DQICIG**SHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILE 50
KTHNGKLCDLGKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINPEWSYIVEKAN 100
PANDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSSHEASSGVSSA 150
CPYQGKSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNTNQEDLLVLWGIHHPNDA 200
AEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMEFFWTILK 250
PNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG DSTIMKSELEYGNCNTKCQTPMGA 300
INSSMPFHNHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRNSPQ RERGLFGA IAGF 350
IEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTNKVNSIIDKM 400
NTQFEAVGREFNNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLD 450
FHDSNVKNLYDKVRLQLRDN AKELGNGCFEFYHKCDNECMESVRNGTYDY 500
PQYSEEARLKREEISGVDIRSLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKDG EW 550
VLLSTFLGHHHHH

(序列辨識編號：4)

共有 H5 HA 的核苷酸序列

1 ATGGAGAAGA TCGTGCTGCT GTTCGCCATC GTGAGCCTGG TGAAGAGCGA
51 CCAGATCTGC ATCGGATCCC ACGCCAACAA CAGCACCGAG CAGGTGGACA
101 CCATCATGGA GAAGAACGTG ACCGTGACCC ACGCCCAGGA CATCCTGGAG
151 AAGACCCACA ACGGCAAGCT GTGCGACCTG GACGGCGTGA AGCCTCTGAT
201 CCTGAGAGAC TGCAGCGTGG CCGGCTGGCT GCTGGGCAAC CCTATGTGCG
251 ACGAGTTCAT CAACGTGCCT GAGTGGAGCT ACATCGTGGA GAAGGCCAAC
301 CCTGCCAACG ACCTGTGCTA CCCTGGCGAC TTCAACGACT ACGAGGAGCT
351 GAAGCACCTG CTGAGCAGAA TCAACCACTT CGAGAAGATC CAGATCATCC
401 CTAAGAGCAG CTGGAGCAGC CACGAGGCCA GCAGCGGCGT GAGCAGCGCC

```

451 TGCCCTTACC AGGGCAAGAG CAGCTTCTTC AGAAACGTGG TGTGGCTGAT
501 CAAGAAGAAC AGCACCTACC CTACCATCAA GAGAAGCTAC AACAAACACCA
551 ACCAGGAGGA CCTGCTGGTG CTGTGGGGCA TCCACCACCC TAACGACGCC
601 GCCGAGCAGA CCAAGCTGTA CCAGAACCCT ACCACCTACA TCAGCGTGGG
651 CACCAGCACC CTGAACCAGA GACTGGTGCC TAAGATCGCC ACCAGAAGCA
701 AGGTGAACGG CCAGAGCGGC AGAATGGAGT TCTTCTGGAC CATCCTGAAG
751 CCTAACGACG CCATCAACTT CGAGAGCAAC GGCAACTTCA TCGCCCCTGA
801 GTACGCCTAC AAGATCGTGA AGAAGGGCGA CAGCACCATC ATGAAGAGCG
851 AGCTGGAGTA CGGCAACTGC AACACCAAGT GCCAGACCCC TATGGGCGCC
901 ATCAACAGCA GCATGCCTTT CCACAACATC CACCCTCTGA CCATCGGCGA
951 GTGCCCTAAG TACGTGAAGA GCAACAGACT GGTGCTGGCC ACCGGCCTGA
1001 GAAACAGCCC TCAGAGAGAG AGAGGCCTGT TCGGCGCCAT CGCCGGCTTC
1051 ATCGAGGGCG GCTGGCAGGG CATGGTGGAC GGCTGGTACG GCTACCACCA
1101 CAGCAACGAG CAGGGCAGCG GCTACGCCGC CGACAAGGAG AGCACCCAGA
1151 AGGCCATCGA CGGCGTGACC AACAAAGTGA ACAGCATCAT CGACAAGATG
1201 AACACCCAGT TCGAGGCCGT GGGCAGAGAG TTCAACAACC TGGAGAGAAG
1251 AATCGAGAAC CTGAACAAGA AGATGGAGGA CGGCTTCCTG GACGTGTGGA
1301 CCTACAACGC CGAGCTGCTG GTGCTGATGG AGAACGAGAG AACCTTGAC
1351 TTCCACGACA GCAACGTGAA GAACCTGTAC GACAAGGTGA GACTGCAGCT
1401 GAGAGACAAC GCCAAGGAGC TGGGCAACGG CTGCTTCGAG TTCTACCACA
1451 AGTGCGACAA CGAGTGCATG GAGAGCGTGA GAAACGGCAC CTACGACTAC
1501 CCTCAGTACA GCGAGGAGGC CAGACTGAAG AGAGAGGAGA TCAGCGGCGT
1551 GGATATCAGA TCTCTGGTGC CAAGAGGATC TCCAGGATCT GGATACATCC
1601 CAGAGGCTCC AAGAGATGGA CAAGCTTACG TGAGAAAGGA CGGAGAGTGG
1651 GTGCTGCTGT CTACTTTCCT GGGACACCAC CACCACCACC ACTAA

```

(序列辨識編號：5)

使用該H5共有序列以產生表現自HEK293人類細胞的



HA 糖基化變體。為產生高甘露糖型糖基化作用(HA_{hm})，使用缺少 N-乙醯基葡胺糖基轉移酶 I(GnTI)的 HEK293S 細胞。為了進一步針對 HA 糖基化作用對受體結合親和力和特異性的效應，系統性地從原始複合型 N-聚糖移除 HA 上的糖(第 1A 圖)。藉由神經胺酸酶(NA)的處理從 HA_{fg} 移除唾液酸殘基而產生去唾液酸 HA(HA_{ds})。使用內切糖苷酶 H(Endo H)將全部聚糖結構截斷成一單 GlcNAc 殘基而產生單糖基化 HA(HA_{mg})。因此，可產生總共四個糖型的 HA： HA_{fg} —來自 HEK293E 細胞的完全糖基化 HA；來自經神經胺酸酶(NA)處理之 HA_{fg} 的 HA_{ds} 去唾液酸 HA； HA_{hm} —來自缺少人類 N-乙醯基葡胺糖基轉移酶 I(GnTI) HEK293S 細胞的高甘露糖型 HA；以及 HA_{mg} —於其糖基化位點具有來自經內切糖苷酶 H(Endo H)處理之 HA_{hm} 的單 N-乙醯葡萄糖胺殘基 HA(第 1A 和 6 圖)。藉由質譜分析確認該聚糖結構(第 7、8、9 圖)。該變體的圓二色性(circular dichroism)證實其具有類似的二級結構(第 1C 圖)。然後研究 N-聚糖對不同糖型 HA 的唯一效應，假設這些樣本具有類似的蛋白三維結構以及在分析中不造成偏差(第 1B 圖)。應注意由於缺乏糖基化作用而無法於大腸桿菌中表現功能性 HA。

此外，質譜儀分析證實(a) HA_{fg} 優勢地含有複合型 N-聚糖(第 7A 圖)；(b) 已從 HA_{ds} 上的複合型 N-聚糖移除唾液酸(第 7B 圖)；(c) HA_{hm} 優勢地含有該高甘露糖型 N-聚糖(第 7C 圖)；以及(d) HA_{mg} 顯示 HA 上僅一 N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)(第 1 和 8 圖)。

HA 糖基化變體的聚糖晶片輪廓

藉由利用習知的三明治法檢查 HA 糖基化變體 HA_{fg} 、 HA_{ds} 、 HA_{hm} 和 HA_{mg} 的聚糖晶片輪廓。該合成唾液酸聚糖陣列係由設計用於探測該流感病毒聚糖特異性之 17α

2,3(聚糖 1~17)和 7 α 2,6(聚糖 21~27)的唾液酸糖苷(sialosides)所構成(請看第 4 圖)。製備具有終止於胺之五碳連接子的該合成唾液酸糖苷以及藉由在室溫的含水條件下形成一醯胺鍵而共價地附著於塗佈 NHS 載玻片上。該印刷程序係根據先前所述的標準晶片機械手印刷技術(Blixt O 等人(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 : 17033~17038 ; Wang CC 等人(2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 : 11661~11666)。將 HA 變體用於該唾液酸玻片然後雜合初級抗體，接著以共軛至 Cy3 的次級抗體進行偵測。此分析顯示 H5N1 HA 共有序列根據先前試驗可特異性地結合至 α 2,3 唾液酸糖苷但非 α 2,6 唾液酸糖苷(第 2A 圖)(Chandrasekaran A 等人(2008) *Nat. Biotechnol.* 26 : 107~113 ; Stevens J 等人(2008) *J. Mol. Biol.* 381 : 1382~1394)。意外地，藉經由相對螢光強度的定量結合 HA_{fg}、HA_{ds} 和 HA_{hm}，至 HA_{mg} 與 α 2,3 唾液酸糖苷的結合強度成功地變得較強(第 2A 圖)。

HA 被與設計用於流感病毒之含 17 α 2-3(聚糖 1~17)和 7 α 2-6(聚糖 21~27)唾液酸糖苷的合成聚糖晶片接觸(第 4 圖)，然後該 HA 蛋白被雜合未標示初級抗體接著藉由 Cy3 標示次級抗體進行偵測。該分析顯示共有序列的流感 H5N1 血球凝集素可特異性地結合至 α 2-3 唾液酸糖苷，但非 α 2-6 唾液酸糖苷(第 2A 圖)。意外地，與聚糖晶片分析比較 HA_{fg}、HA_{ds} 和 HA_{hm}，至 HA_{mg} 與 α 2-3 唾液酸糖苷的結合強度成功地變得較強(第 2A 圖)。

定量性聚糖晶片

由於聚糖晶片分析僅提供相對的螢光強度而限制結合試驗中的可定量性，以及使用者無法從個別試驗中分辨至受體的結合親和力。為了能在結合試驗中進行準確地測

定，引用此晶片平台至測定 HA-聚糖定量地相互作用的解離常數。

設計一種定量性晶片以測定表面解離常數(Liang PH 等人(2007) *J. Am. Chem. Soc.* 129: 11177~11184)。為了避免抗體層疊造成的任何扭曲，以螢光染料 Cy3 直接標示 HA (Srinivasan A 等人(2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 2800~2805)。藉由 Cy3-標示 HAs 的序列稀釋進行直接結合試驗以建立相對結合強度。藉由繪製該 HA 濃度對各別 24 種唾液酸糖苷印於載玻片上之螢光強度測定表面上的解離常數。根據 Langmuir 等溫線計算該解離常數 $K_{D,surf}$ 值(請看第 2B 圖)。該單 HA-唾液酸糖苷的結合力弱，顯現解離常數為在克分子範圍內($K_D=2.5 \times 10^{-3} M$)(Sauter NK 等人(1989) *Biochemistry* 28: 8388~8396)；然而，HA 涉及可從定量性晶片分析中觀察之宿主細胞表面上與唾液酸糖苷的多價相互作用(表 2)。隨著 HAs 上 N-聚糖長度的減少而全方位地和實質性地降低該 $K_{D,surf}$ 值(第 2B 圖)。

全部 HA 糖型顯示與受體聚糖以硫酸根基團在第三 GlcNAc 殘基之第 6 個位置的還原端(聚糖 4 和 7)具有強結合力。此硫酸根基團對結合至 H5 HA 而言極為重要(Chandrasekaran A 等人(2008) *Nat. Biotechnol.* 26: 107~113; Stevens J 等人(2008) *J. Mol. Biol.* 381: 1382~1394)。此外，已觀察到聚糖 4 為 HA_{fg} 的最佳配體，反之對 HA_{mg} 的配體而言聚糖 13~15 較聚糖 6 為佳，此顯示該配體結合位點內具有一可能的多價相互作用，或更多受體結合區暴露於較大的雙枝唾液酸糖苷(聚糖 13 和 14)。有趣地，當其 N-聚糖結構變得較不複雜時可實質上增加 HA 的結合力(第 2B 圖)。然而，對 HA_{mg} 的該 $K_{D,surf}$ 值雖然顯示較強及類似至少數 SA 聚糖的結合力，但是其他 HA 變體對聚糖配體則呈現較弱及更具特異性的結合力(第 2B 和 10 圖)。因此，結合特異性及結合

親和力具有一藉由受聚糖結構而調節的反向關係。此調節具有重要的生物學意義，其在 HA 上的糖可調節肺上皮細胞上聚糖受體的辨識程度。

歸因於受體唾液酸糖苷的結合能

動力學參數可被應用於熱力學參數以解釋分子內的相互作用。HA-聚糖相互作用的解離常數($K_{D,surf}$)可被用於計算結合力的 Gibbs 自由能變化(ΔG_{multi})。 ΔG_{multi} 為來自 HA-聚糖相互作用之穩定能的定量測量值。系統性地降低 HA 上 N-聚糖結構的複雜性/切割度與成功地降低 ΔG_{multi} 有關(表 2)。

表 2 結合至 α 2,3 唾液酸糖苷 1~15 之 HA 糖基化變體的解離常數($K_{D,surf}$)和自由能變化(ΔG)

唾液酸 類似物	$K_{D,surf}$ $\mu M \pm SD$				ANOVA P*	ΔG , kcal/mol $\pm SD$			
	HA _{fg}	HA _{fg}	HA _{fg}	HA _{fg}		HA _{fg}	HA _{fg}	HA _{fg}	HA _{fg}
1	6.99 $\pm$ 0.41	2.86 $\pm$ 0.93	2.09 $\pm$ 0.59	0.27 $\pm$ 0.16	<0.0001	-7.03 $\pm$ 0.03	-7.58 $\pm$ 0.19	-7.76 $\pm$ 0.17	-8.80 $\pm$ 0.15
2	3.72 $\pm$ 1.01	2.47 $\pm$ 0.21	1.75 $\pm$ 0.32	0.20 $\pm$ 0.07	0.0002	-7.41 $\pm$ 0.16	-7.66 $\pm$ 0.06	-7.86 $\pm$ 0.11	-9.03 $\pm$ 0.07
3	4.55 $\pm$ 1.85	2.34 $\pm$ 0.27	0.92 $\pm$ 0.16	0.26 $\pm$ 0.06	0.0002	-7.31 $\pm$ 0.25	-7.68 $\pm$ 0.07	-8.24 $\pm$ 0.10	-8.90 $\pm$ 0.01
4	0.27 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.09	0.13 $\pm$ 0.06	0.0048	-8.96 $\pm$ 0.03	-8.95 $\pm$ 0.10	-8.84 $\pm$ 0.16	-9.45 $\pm$ 0.27
5	ND	5.20 $\pm$ 1.01	9.40 $\pm$ 3.20	0.54 $\pm$ 0.15	ND	ND	-7.21 $\pm$ 0.11	-6.88 $\pm$ 0.21	-8.49 $\pm$ 0.13
6	20.03 $\pm$ 4.24	9.22 $\pm$ 2.05	2.71 $\pm$ 0.53	0.80 $\pm$ 0.05	<0.0001	-6.41 $\pm$ 0.13	-6.87 $\pm$ 0.13	-7.65 $\pm$ 0.06	-8.32 $\pm$ 0.05
7	0.57 $\pm$ 0.10	0.77 $\pm$ 0.08	0.61 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.10	0.0010	-8.46 $\pm$ 0.06	-8.36 $\pm$ 0.04	-8.47 $\pm$ 0.02	-8.78 $\pm$ 0.14
8	2.49 $\pm$ 0.58	2.48 $\pm$ 0.41	1.69 $\pm$ 0.53	0.36 $\pm$ 0.13	0.0008	-7.65 $\pm$ 0.14	-7.65 $\pm$ 0.10	-7.89 $\pm$ 0.21	-8.82 $\pm$ 0.30
9	ND	15.34 $\pm$ 5.06	4.40 $\pm$ 0.56	0.86 $\pm$ 0.34	ND	ND	-6.58 $\pm$ 0.20	-7.31 $\pm$ 0.08	-8.18 $\pm$ 0.16
10	7.64 $\pm$ 2.3	3.61 $\pm$ 0.61	1.22 $\pm$ 0.52	0.29 $\pm$ 0.14	0.0003	-6.99 $\pm$ 0.18	-7.43 $\pm$ 0.10	-8.09 $\pm$ 0.24	-8.77 $\pm$ 0.03
11	6.02 $\pm$ 1.04	2.32 $\pm$ 0.14	1.11 $\pm$ 0.51	0.33 $\pm$ 0.08	<0.0001	-7.12 $\pm$ 0.10	-7.68 $\pm$ 0.04	-8.15 $\pm$ 0.25	-8.91 $\pm$ 0.18
12	40.23 $\pm$ 9.77	ND	2.45 $\pm$ 0.52	1.41 $\pm$ 0.92	ND	-6.00 $\pm$ 0.15	ND	-7.66 $\pm$ 0.12	-7.85 $\pm$ 0.25
13	3.38 $\pm$ 1.06	1.37 $\pm$ 0.30	0.31 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.01	0.0008	-7.47 $\pm$ 0.19	-8.05 $\pm$ 0.13	-8.88 $\pm$ 0.13	-9.77 $\pm$ 0.09
14	2.72 $\pm$ 0.41	0.97 $\pm$ 0.41	0.42 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01	<0.0001	-7.59 $\pm$ 0.09	-8.27 $\pm$ 0.28	-8.69 $\pm$ 0.04	-9.60 $\pm$ 0.01
15	2.37 $\pm$ 0.19	1.32 $\pm$ 0.16	0.89 $\pm$ 0.35	0.09 $\pm$ 0.01	0.0002	-7.67 $\pm$ 0.05	-8.02 $\pm$ 0.07	-8.29 $\pm$ 0.27	-9.62 $\pm$ 0.08

表 2 顯示對於 $\alpha 2,3$ 唾液酸糖苷 1~15 具有不同糖基化 HA 的熱動力學參數。其顯示對於 $\alpha 2,3$ 唾液酸糖苷 1~15 之 HA-聚糖相互作用的自由能變化(ΔG)和 $K_{D,surf}$ 。藉由利用方程式 $\Delta G_{multi} = -RT \ln(K_{D,surf}^{-1})$ 可從 $K_{D,surf}$ 值衍生出 ΔG 值。根據 $K_{D,surf}$ 值計算出該 ΔG 值以獲得 HA-聚糖結合鍵的自由能變化。未測定聚糖 5 和 9 的 $\Delta G(HA_{fg})$ 。ND 代表未測定(* 來自 15 個經鑑定 HA-結合唾液酸糖苷，利用單因子 ANOVA($P < 0.05$ 視為具有顯著性)表示四種 HA 糖型中之 $K_{D,surf}$ 值的統計學上顯著性差異)。

HA 變體之間在自由能變化($\Delta\Delta G$)上的差異係導因於獨特的聚糖結構(第 10 圖)，以及 HA_{fg} 和 HA_{mg} ($\Delta\Delta G HA_{fg} \rightarrow HA_{mg}$ ；請看第 10 圖)之間具有最大的差異，此與修除大部 N-糖基至單一 GlcNAc 時具有最大結合能差異的結果一致)。應注意除了聚糖 4 和 7 之外具有類似的 $\Delta\Delta G$ 值(第 10 圖)，此表示 HA 上聚糖對硫酸化 $\alpha 2,3$ 三糖結合親和力無明顯影響(Chandrasekaran A 等人(2008) *Nat. Biotechnol.* 26 : 107~113)。

HA 受體的結合

藉由比較不同受體唾液酸糖苷間之自由能變化($\Delta\Delta G$ 值)的差異可說明 HA-受體結合的分子細節(即貢獻自含有一聚糖受體的各結構成分)(第 4 和 11 圖)。詳細分析該負責 HA 結合之受體唾液酸糖苷的能量貢獻可揭露出用於設計新 HA 抑制劑之特異性的關鍵點。以 $\beta 1,4$ (Gal $\beta 1 \sim 4$)鍵結連接至半乳糖殘基的唾液酸糖苷 $\alpha 2,3$ 比以 Gal $\beta 1 \sim 3$ 鍵結者具有較佳的結合親和力(Stevens J 等人(2008) *J. Mol. Biol.* 381 : 1382~1394)。此可發現於 Neu5Ac- $\alpha 2,3$ -半乳糖 (Neu5Ac $\alpha 2,3$ Gal)雙糖主鏈的比較(第 4A 圖，聚糖 1，紅色箱形圖)，該三糖 3 和 6 僅在 Gal 和 GlcNAc 間鍵結上的差

異。此處，全部 HA 變體的 $\Delta\Delta G(1\rightarrow 3)$ 為負(穩定化 HA-受體相互作用)，反之全部 HA 變體的 $\Delta\Delta G(1\rightarrow 6)$ 為正(去穩定化 HA-受體相互作用；第 4A 和 11 圖)。此觀察顯示 Neu5Ac- $\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}/\text{GlcNAc}$ 係與 HA-結合袋相互作用的核糖聚糖成分。此外，全部 HA 變體的 $\Delta\Delta G(1\rightarrow 9)$ 值為正，顯示在第三位置具有導因於 $\beta 6$ -連接甘露糖的負擾動(第 4A 和 11 圖)。因此，結合能可受至遠端 Neu5Ac- $\alpha 2,3\text{Gal}$ 雙糖配體之內糖殘基及其鍵結模式的影響(第 4A 圖)。此分析顯示在第三位置的一 GlcNAc 殘基有利於全部 HA 變體。然而，比較對聚糖 13 和 14(第 4E 和 11 圖)至聚糖 6 的 $\Delta\Delta G$ 值，明顯呈現結合位點與雙枝唾液酸糖苷的多價相互作用，以及就 HA_{mg} 而言，此分子內親和力更強於第三糖結構效應所驅動的結合力。

接著，製備受體聚糖 10、11、12 和 15。這些具有相同基本核心結構(聚糖 8 三糖)但是於第三位置具有不同伸長(聚糖 11 和 12)或添加的 $\alpha 2,6$ 唾液酸(聚糖 15；第 4B 圖)。有趣的是該具有分枝 $\alpha 2,6$ 唾液酸的唾液酸糖苷可大為增加 HA 親和力，反之延伸自聚糖 8 的較長 $\alpha 2,3$ 唾液酸糖苷則具有較弱的 HA 結合力($\Delta\Delta G(8\rightarrow 15) > \Delta\Delta G(8\rightarrow 11) - \Delta\Delta G(8\rightarrow 10) > \Delta\Delta G(8\rightarrow 12)$)；第 4B 和 11 圖)。

聚糖 3~5 和 6~7 共用相同的三糖主鏈但在第三 GlcNAc 的非還原端上添加不同的硫酸基團(聚糖 4)或岩藻糖殘基(聚糖 5)。該硫酸基團可穩定化 HA-受體聚糖相互作用高至 2.044 kcal/mol($\Delta\Delta G(6\rightarrow 7)$)，此為兩個受體唾液酸糖苷之間最大的能隙。全部 HA 變體之中，完全糖基化變體在自由能變化中具有最大差異，其值為 $\Delta\Delta G(3\rightarrow 4)\text{HA}_{\text{fg}}(-1.653 \text{ kcal/mol})$ 和 $\Delta\Delta G(6\rightarrow 7)\text{HA}_{\text{fg}}(-2.044 \text{ kcal/mol})$ ，以及更簡化的聚糖結構可獲得較低量的自由能；亦即 $\text{HA}_{\text{fg}} > \text{HA}_{\text{ds}} > \text{HA}_{\text{hm}} > \text{HA}_{\text{mg}}$ 。因此，硫酸化聚糖可戲劇性地增強 HA 結合力，以

及完全糖基化HA可最大化此對H5N1病因極為重要的效應(第4C和D圖)。另一方面,該岩藻糖化受體類似物大為降低糖基化HA變體的結合穩定度而呈現正 $\Delta\Delta G(3\rightarrow5)$ (第4C圖)。最大化硫酸根基團及岩藻糖立體塊之受體-結合袋內重要的結合相互作用將導致極大差異的 $\Delta\Delta G(3\rightarrow4)$ 和 $\Delta\Delta G(3\rightarrow5)$ 。由於移除唾液酸對結合具些微效應以及 HA_{fg} 對某些特定唾液酸化聚糖仍呈現強的親和力,因此 HA_{fg} 的弱結合能力不似導因於其唾液酸化聚糖的競爭。

利用單糖基化HA設計疫苗

該單糖基化凝集素 HA_{mg} 與其完全糖基化副本比較顯示具有一類似次級結構以及對宿主受體具有較佳的結合親和力。近期研究亦指出至Asn的GlcNAc殘基為用於糖蛋白折疊和穩定化所需的最低N-聚糖成分(Hanson SR等人(2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 3131~3136)。由於對聚糖而言蛋白為優異免疫原,因此測試以該單糖基化HA作為對抗流感病毒的蛋白疫苗。比較來自 HA_{fg} 和 HA_{mg} 免疫抗血清之結合原始HAs及中和H5病毒的能力(第5圖)。事實上,與 HA_{fg} 對照之下,該來自 HA_{mg} 的抗血清顯示較強的病毒中和能力。該 HA_{mg} 抗血清除了H5亞型越南/1194, H5(安徽)和H5(ID5/2005)之外亦結合至H1(New Caledonia/1999)(第5D圖)。值得注意的是,該 HA_{mg} 疫苗在一免疫試驗中較 HA_{fg} 疫苗更具有保護效果(第5C圖)。

第3圖中比較分離自人類之H1、H3和H5的胺基酸序列。當比較H1與H3以及H3與H5時,可觀察到全部以及接近N-糖基化位點之胺基酸序列的差異。H1和H5顯示全部胺基酸序列具有較高的類似度,以及接近N-糖基化位點具有更保留的序列。季節性(A/布里斯本/59/2007)和大流行(A/加州/07/2009)H1株顯示約具有79%的序列一致性。H1

和 H5 之間的整體序列一致性為約 63%，以及 H3 和 H5、與 H1 和 H3 之間為約 40%。此外，H1 和 H5 之間的 N-糖基化位點(示於第 3 圖的紅色箱形圖)和劃底線胜肽序列較 H1/H3 和 H5 之間更為保留。

本發明顯示 HA 上 N-聚糖的系統性簡化可逐步增加對 $\alpha 2,3$ 唾液酸糖苷但非 $\alpha 2,6$ 唾液酸糖苷的結合力。發明者第一次指出 HA 之外和內聚糖對受體結合的效應以及定量性地分析 HA-受體相互作用的結合親和力和能量貢獻。

HA 糖基化作用影響流感 HA 的功能(Wagner R 等人(2002) *J. Gen. Virol.* 83: 601~609)。有趣的是，自從 1968 年由於增加流感 H3N2 上糖基化的程度，因此已降低病毒的罹患率、死亡率及肺部病毒力價(Vigerust DJ 等人(2007) *J. Virol.* 81: 8593~8600)。

在不侷泥於理論之下，發現附著至該糖基化位點之具有單一 GlcNAc 的 HA 顯示對 $\alpha 2,3$ 唾液酸糖苷具有低特異性及較強的親和力而認為 HA 上的 N-聚糖可造成接近該 HA-受體結合區的立體障礙。對受體唾液酸糖苷的高特異性可避免病毒結合至位於人類肺上皮細胞表面上的其他特異性聚糖。另一方面，具有截斷聚糖的 HA 能以較高結合親和力及較低特異性辨認 $\alpha 2,3$ 受體唾液酸糖苷，而認為減少 HA 上聚糖長度可能增加感染禽流感的危險。然而，仍不瞭解經由糖基化改變 HA-受體的相互作用如何影響病毒的感染性以及病毒壽命中的 NA 活性。

具有單一 GlcNAc 的 HA 由於可保留 HA 的完整結構及可輕易地被製備(例如經由酵素)因此係一種用於流感的理想候選疫苗。其亦可暴露被大聚糖遮蔽的保留性表位以誘發可辨認 HA 變體的較高力價免疫反應。此策略伴隨其他不同疫苗策略(Hoffmann E 等人(2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 12915~12920; Huleatt JW 等人(2008) *Vaccine* 26:

201~214; Scanlan CN 等人(2007) *J. Mol. Biol.* 372 : 16~22 ; Yang ZY 等人(2007) *Science* 317 : 825~828)以及 HA-中和抗體的近期發現(Ekiert DC 等人(2009) *Science* 324 : 246~251 ; Kashyap AK 等人(2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 : 5986~5991 ; Scheid JF 等人(2009) *Nature* 458 : 636~640 ; Stevens J 等(2006) *Science* 312 : 404~410 ; Sui JH 等人(2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 : 265~273)應有助於對抗病毒例如流感、C 型肝炎病毒和 HIV 的疫苗開發而開啟一頁疫苗設計的新方向。

因此，測試具有單一 GlcNAc 的 HA 是否可作為流感的理想疫苗。就受益其與 0.2~3 唾液酸糖苷的強結合力而言，具有單一 GlcNAc 的 HA 可誘發辨認接近 RBD 區的較高力價免疫反應，顯示添加寡糖可為一種經由修飾或遮蔽病毒上抗原表位以逃避免疫的有效方法。因此，移除大部分聚糖但保留至少單一 GluNAc 的策略為開啟未來疫苗設計的新方向，以及此概念有助於更深入瞭解其他抗病毒疫苗例如 HCV、HBV 和 HIV 的設計。其他迭代方法為保留具有二、三或更多聚糖的原始聚糖鏈。

以部分糖基化細胞表面糖蛋白作為疫苗

病毒的細胞表面糖蛋白為用於疫苗發展的極佳標的。然而，此類表面蛋白常被宿主高度糖基化以保護病毒免於宿主的免疫系統。此外，糖基化位點周圍的病毒蛋白序列通常被高度保留而因此成為用於疫苗設計的極佳抗原，然而，這些高度保留區域至少部分由於糖基化覆蓋數量或其阻斷區域而無法輕易地接近宿主的免疫系統。例如，限制成功製備對抗完整 HIV 疫苗的其一原因為病毒表面 gp 120 被高度糖基化。

該新疫苗更具免疫原性及預期該誘發的抗體具有對抗

病毒和宿主所製造之完整糖蛋白的較佳中和活性。該抗體能攻擊很可能產生突變的低度或未糖基化區域以及較不可能突變及/或對突變較敏感的高度保留糖基化區域。如此產生的抗體由於此類抗體對蛋白較糖類具有高度親和力以及因而熱動力學地將推擠聚糖鏈離開與糖基化位點周圍之高度保留區的結合而將與標的蛋白部分相互作用。

在 O-和 N-連接的糖蛋白中，一級糖(N-糖蛋白的 N-乙醯葡萄糖胺以及 O-糖蛋白的 N-乙醯葡萄糖胺或 N-乙醯半乳糖胺)為保留糖蛋白的三級結構所必需同時其餘的糖並不重要。以內切糖苷酶(endo H)處理 N-糖蛋白將可移除糖鏈以及使該 N-乙醯葡萄糖胺附著至該蛋白。甘露糖苷酶亦可被用於將 N-糖蛋白切割成雙-或三聚糖，由於其可接近蛋白上保留糖蛋白位點甚至與雙-、三-和較大去糖基化蛋白之免疫系統的能力，因此其於此處被預期視為可能的疫苗。其他糖苷酶亦可被用於從 O-糖蛋白移除糖鏈以及使該一級糖附著至該蛋白。

當以 endoH 處理表現於人類細胞內之來自禽流感(H5)的一完全糖基化血球凝集素(HA)以減少糖基化至一單糖基化狀態以及用於兔之免疫時，該產生的抗血清較產生自完全糖基化血球凝集素的抗血清具有更高的力價(第 13A~13B 圖)。其亦能中和來自其他禽流感株以及來自人流感之凝集素 H1 的血球凝集素，但是該來自完全糖基化 HA 的抗血清無法中和 H1 以及對該禽流感株而言更具特異性。

單糖基化 H5 抗血清能與 H1 產生交叉反應的可能原因為由於糖基化模式及 H1 和 H5 之間的相似性。利用兔抗血清獲得該資料(第 13 圖)。如第 12~14 圖所示，H3 血球凝集素不具有如 H5 HA 對 H1 HA 相同程度的同源性。因此，產生自 H1 和 H5 的抗血清無法中和 H3。然而，由於 H3 在保留區與 H1 和 H5 具有其他同源性，因此產生自去糖基化凝

集素 H3 的抗血清除了凝集素 H3 之外可中和凝集素 H1 和凝集素 H5。

製備單糖基化凝集素時，由於附著至該蛋白(即 N-乙醯葡萄糖胺-蛋白)之具有最初三個糖(甘露糖-N-乙醯葡萄糖胺-N-乙醯葡萄糖胺)或僅具有單糖(N-乙醯葡萄糖胺)的糖蛋白在真核生物中具有高度保留性因此不需從人類細胞培養製造該糖蛋白。因此，可在酵母、桿狀病毒或其他真核宿主中製造該糖蛋白及以適當的糖苷酶例如用於 N-連接糖蛋白的 endoH 或甘露糖苷酶處理該糖蛋白混合物以製備用作為疫苗的同質單糖基化蛋白。

在不侷泥於理論之下，假定 N-連接聚糖較長於 O-連接聚糖以及其為需被修剪以移除其餘糖鏈的 N-連接聚糖。因此，該 O-連接聚糖即使為完整亦不造成問題。

暴露至該免疫系統的一原始糖蛋白具有一 N-連接分枝糖蛋白。由於該高度保留區的糖基化作用無法接近該免疫系統。因此，該免疫系統僅能靶向高度變異區，因而當該變異區產生突變時可降低生物體對多重病毒感染的敏感性。若該免疫系統能接近高度保留區時，則能引導抗體至這些不隨時間改變的序列而提供一種對抗病毒的接種途徑，該病毒具有突變的可變區及因而使現有抗體無法對抗該糖蛋白或被密實地糖基化而無法實質上接近該免疫系統。

因此，為使該蛋白能經由疫苗接近該免疫系統，移除該糖基化而暴露出原始病毒蛋白至該免疫系統。重要的是，從蛋白完全移除該糖已顯示會造成蛋白的變性；在許多病毒中的糖基化糖蛋白為至三級結構糖蛋白的關鍵組分。

藉由暴露經分離原始糖基化蛋白至 N-糖苷酶如 endoH 或甘露糖苷酶以移除該糖，其將從該糖蛋白切斷全部除了

第一、二或三個之外的糖而不使該蛋白失去其三級結構。然後該去糖基化蛋白與適當醫藥載劑被配製成疫苗並且被投與至一生物體。由於該高度保留糖基化區被去糖基化及暴露至該免疫系統因而產生對抗該高度保留區的抗體。

當病毒感染該經免疫生物體及該病毒糖蛋白暴露於免疫系統時，被引導至蛋白之高度保留區的該抗體因而存在於生物體的系統內。因此，由於抗體仍被引導至該糖蛋白的非突變保留區而與可變區的突變無關。

此外，由於降低該抗體結合至蛋白的熱動力學以及該糖被"推擠"而使該抗體結合至該高度保留區，因此糖基化無法阻擋抗體至該高度保留區的結合。重要的是，在病毒蛋白例如 HIV 之 gp120 中，此策略提供無法產生足夠抗體力價以有效對抗感染之免疫系統的一種用於接種之方法和組合物。

根據具體化這些原則的實施例中，一疫苗含有至少一種去糖基化凝集素以及一醫藥上可接受載劑。可利用表現糖基化蛋白的任何系統例如酵母和桿狀病毒製造該疫苗。一旦製出該蛋白，可利用適當方法例如凝膠電泳法、層析法或能分離蛋白的其他方法被分離。

幾近全部真核生物保留該糖蛋白位點的糖基化模式 (GlcNAc-GlcNAc-Man)。因此，若保留最初 1~3(可能更依賴被接種的生物以及產生該蛋白的生物)個糖時何種下游糖基化並不重要。因此，就人類疫苗而言，由於一旦除了第一至第三個糖之外全都被切斷時該模式與人類版糖蛋白的第一至第三個糖相同，因而可使用酵母製造該用於人類接種的蛋白。因此，本發明提供用於對抗病毒例如流感、HIV 和黃熱病毒之高通量、高產量疫苗的一種獨特平台。

為生產該疫苗，分離該糖基化蛋白及然後利用一糖苷酶，或另一酵素或可選擇性地消化該糖而形成糖基化作用

的方法(部分)去糖基化。然而，不論使用何種方法切斷該糖鏈其必需不影響劃底線蛋白的三級結構。

亦可利用合成方法製備該部分糖基化糖蛋白，或其片段。有兩種用於合成糖肽的方法：(i) 逐步法：使用糖基化胺基酸作為固相合成的結構單元。此方法的優點為被"廣泛"用於製備各種的糖肽。此方法可製備具有一些寡糖基團的糖肽。(ii) 收斂法：分開製備一寡糖基團或一胜肽基團，然後相互偶合。通常，此方法被用於製備 N-糖肽。此方法需要用於胜肽基團內"糖基化點"的一特殊正交側鏈保護基。

在一具體實施例中，利用硫酯法合成連接至該胜肽之天冬胺酸殘基的 N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)以構築該多肽片段(Merrifield RB; *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149(1983))以及利用二甲基硫磷酸混合酐(Mpt-MA)法併入該糖肽基團(Guo ZW 等人(1997) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36: 1464~1466)。

產生自單糖基化 HA 蛋白的交叉反應流感疫苗

(A) 接種季節性 H1(布里斯本)單糖基化 HA 蛋白

利用一種血球凝集抑制檢測法偵測來自 H1(布里斯本)接種的抗血清是否具有抑制 NIBRG-121 (2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)病毒凝集紅血球細胞的能力。如第 15A 圖所示，來自接種 H1(布里斯本)之單糖基化 HA(HA_{mg})的抗血清與完全糖基化 HA(HA_{fg})和未糖基化 HA(HA_{ug})相比證明具有較佳抑制 NIBRG-121(H1N1/2009)病毒凝集紅血球細胞的能力。

利用微量中和檢測法偵測來自 H1(布里斯本)接種的抗血清是否具有中和 NIBRG-121(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)病毒感染 MDCK 細胞的能力。如第 15B 圖所示，來自 H1(布里斯本)的單糖基化 HA(HA_{mg})與完全糖基化 HA(HA_{fg})和未糖基化 HA(HA_{ug})相比證明具有較佳中和

NIBRG-121(H1N1/2009)病毒感染 MDCK 細胞的能力。

進行一種病毒攻毒試驗以證明接種來自 H1(布里斯本)的單糖基化 HA 可對抗 NIBRG-121(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)病毒的攻毒。如第 15C 圖所示，單糖基化 HA(布里斯本)疫苗可保護 BALB/c 小鼠對抗 NIBRG-121(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)病毒的攻毒。對照之下，製造自不活化病毒之傳統流感疫苗的完全糖基化 HA 顯示無對抗 H1N1(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)病毒感染的交叉保護能力。

第 16A~16C 圖顯示藉由產生自以單糖基化 H1(布里斯本)HA 作為抗原的抗血清可抑制 WSN(H1N1)1933。第 16A 圖顯示其抑制 WSN(H1N1)1933 病毒凝集紅血球細胞的能力。第 16B 圖顯示抑制 WSN(H1N1)1933 病毒感染 MDCK 細胞的能力。第 16C 圖顯示其可保護 BALB/c 小鼠對抗 WSN(H1N1)1933 流感病毒的感染。該抗血清使用以布里斯本 HA 蛋白(5 ug)免疫的小鼠血清以及該攻毒病毒為 WSN(H1N1)1933($100 \times LD_{50}$)。

如第 16A 圖所示，來自接種 H1(布里斯本)之單糖基化 HA(HA_{mg})的抗血清與完全糖基化 HA(HA_{fg})和未糖基化 HA(HA_{ug})相比證明具有較佳抑制 WSN(H1N1)1933 病毒凝集紅血球細胞的能力。如第 16B 圖所示，來自 H1(布里斯本)的單糖基化 HA(HA_{mg})與完全糖基化 HA (HA_{fg})和未糖基化 HA(HA_{ug})相比證明具有較佳中和 WSN(H1N1)1933 病毒感染 MDCK 細胞的能力。如第 16C 圖所示，單糖基化 HA(布里斯本)疫苗可保護 BALB/c 小鼠對抗 WSN(H1N1)1933 病毒的攻毒。對照之下，製造自不活化病毒之傳統流感疫苗的完全糖基化 HA 顯示無對抗 WSN(H1N1)1933 病毒感染的交叉保護能力。

第 17A~17C 圖顯示藉由產生自以單糖基化 H1(布里斯本)HA 作為抗原的抗血清可抑制 A/波多黎各/8/34(H1N1)：

PR8。第 17A 圖顯示其抑制 PR8 病毒凝集紅血球細胞的能力。第 17B 圖顯示其抑制 PR8 病毒感染 MDCK 細胞的能力。第 17C 圖顯示其可保護 BALB/c 小鼠對抗 PR8 流感病毒的感染。該抗血清使用以布里斯本 HA 蛋白(5 ug)免疫的小鼠血清以及該攻毒病毒為 PR8 (100xLD₅₀)。

如第 17A 圖所示，來自接種 H1(布里斯本)之單糖基化 HA(HA_{mg})的抗血清與完全糖基化 HA(HA_{fg})和未糖基化 HA(HA_{ug})相比證明具有較佳抑制 PR8 病毒凝集紅血球細胞的能力。如第 17B 圖所示，來自 H1(布里斯本)的單糖基化 HA(HA_{mg})與完全糖基化 HA (HA_{fg})和未糖基化 HA(HA_{ug})相比證明具有較佳中和 PR8 病毒感染 MDCK 細胞的能力。如第 17C 圖所示，單糖基化 HA(布里斯本)疫苗可保護 BALB/c 小鼠對抗 PR8 病毒的攻毒。對照之下，製造自不活化病毒之傳統流感疫苗的完全糖基化 HA 顯示無對抗 PR8 病毒感染的交叉保護能力。

(B) 接種新型 H1(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)單糖基化 HA 蛋白

分離及修飾用於如實施例 1 所述之表現的流感 H1 (2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)HA 編碼序列。表 3 顯示經修飾 2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株 H1/HA del-TM-FH6 的序列其訊號肽序列被劃底線及加粗體字，斜體字為凝血酶切割點，該噬菌體 T4 fibritin-foldon 三聚合序列和 His-標籤被劃底線，以及該連接序列為粗體字和被劃底線。

表 3 流感 H1(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)凝集素序列

流感 H1(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)HA del-TM-FM6 的胺基酸序列
<u>MKAILVLLLYTFATANADTL</u> <u>CIGYHANNSTD</u> <u>TVDTVLEKNVT</u> <u>VT</u> <u>THSVNLL</u> 50

EDKHNGKLCKLRGVAPLHLGKCNIAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETP	100
SSDNGTCYPGDFIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSWPNHDSNKGVT	150
AACPHAGAKSFYKNLIWLVKKGNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHP	200
TSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKKFKPEIAIRPKVRDQEGRMNYYWTL	250
VEPGDKITFEATGNLVVPRIYAFAMERNAGSGIIISDTPVHDCNTTCQTPK	300
GAINTSLPFQNIHPITIGKCPKYVKSTKLRLATGLRNIPSIQSRGLFGAI	350
AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADLKSTQNAIDEITNKVNSVI	400
EKMNTQFTAVGKEFNHLEKRIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER	450
TLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCDNTCMESVKNGT	500
YDYPKYSEEAKLNREEIDGV <u>DIRSLVPRGSP</u> PGSGYIPEAPRDGQAYVRKD	550
<u>GEWVLLSTFLGHHHHH</u>	
(序列辨識編號：6)	

流感 H1(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)HA del-TM-FM6 的核苷酸序列

1	ATGGCGCGCC GCTAGCATGA AGGCCATCCT GGTGTGCTG CTGTACACCT
51	TCGCTACCGC CAACGCCGAT ACCCTGTGCA TCGGCTACCA CGCCAACAAC
101	AGCACCGACA CCGTGATAC CGTGCTGGA AAGAACGTGA CCGTGACCCA
151	CAGCGTGAAC CTGCTGGAAG ATAAGCACAA CGGCAAGCTG TGCAAGCTGA
201	GAGGCGTGGC CCCTCTGCAC CTGGGCAAGT GCAATATCGC CGGCTGGATC
251	CTGGGCAACC CCGAGTGCGA GAGCCTGAGC ACCGCCAGCA GCTGGTCCTA
301	CATCGTGGAG ACACCCAGCA GCGACAATGG CACCTGTTAC CCCGGCGACT
351	TCATCGACTA CGAGGAACTG CGGGAGCAGC TGAGCAGCGT GTCCAGCTTC
401	GAGCGGTTCG AGATCTTCCC CAAGACCAGC TCTTGGCCCA ACCACGACAG
451	CAACAAGGGC GTGACCGCCG CCTGTCCTCA CGCTGGCGCC AAGAGCTTCT
501	ACAAGAACCT GATCTGGCTG GTCAAGAAGG GCAACAGCTA CCCCAAACCTG
551	AGCAAGAGCT ACATCAACGA CAAGGGCAAA GAAGTGCTGG TGCTGTGGGG
601	CATCCACCAC CTAGCACCA GCGCCGACCA GCAGAGCCTG TACCAGAACG



```

651 CCGACGCCTA CGTGTTCTGT GGCAGCAGCC GGTACAGCAA GAAGTTCAAG
701 CCCGAGATCG CCATCAGACC CAAAGTGCGG GACCAAGAGG GCCGGATGAA
751 CTACTACTGG ACCCTGGTGG AGCCCGGCGA CAAGATCACC TTCGAGGCCA
801 CCGGCAATCT GGTCGTGCCC AGATACGCCT TCGCCATGGA AAGAAACGCC
851 GGCAGCGGCA TCATCATCAG CGACACCCCC GTGCACGACT GCAACACCAC
901 CTGTCAGACC CCCAAAGGCG CCATCAACAC CAGCCTGCCC TTCCAGAACA
951 TCCACCCCAT CACCATCGGC AAGTGCCCTA AGTACGTGAA GTCTACCAAG
1001 CTGAGGCTGG CCACAGGCCT GCGGAACATC CCCAGCATCC AGAGCAGAGG
1051 CCTGTTTGGC GCCATTGCCG GCTTTATCGA GGGCGGCTGG ACCGGAATGG
1101 TGGATGGATG GTATGGCTAC CACCACCAGA ATGAGCAGGG AAGCGGCTAC
1151 GCCGCCGACC TGAAGTCCAC ACAGAACGCC ATCGACGAGA TCACCAACAA
1201 AGTGA ACTCA GTGATCGAGA AGATGAACAC CCAGTTCACC GCCGTGGGCA
1251 AAGAATTCAA CCACCTGGAA AAGCGGATCG AGAACCTGAA CAAGAAGGTG
1301 GACGACGGCT TCCTGGACAT CTGGACCTAC AACGCCGAGC TGCTCGTGCT
1351 GCTGGAAAAC GAGCGGACCC TGGACTACCA CGACTCCAAC GTGAAGAATC
1401 TGTACGAGAA AGTTCGCTCC CAGCTGAAGA ACAACGCCAA AGAGATCGGC
1451 AACGGCTGCT TCGAGTTCTA CCACAAGTGC GACAACACCT GTATGGAAAG
1501 CGTGAAGAAC GGCACCTACG ACTACCCCAA GTACAGCGAG GAAGCCAAGC
1551 TGAACCGGGA AGAGATCGAC GGCCTGGATA TCAGATCTCT GGTGCCAAGA
1601 GGATCTCCAG GATCTGGATA CATCCCAGAG GCTCCAAGAG ATGGACAAGC
1651 TTACGTGAGA AAGGACGGAG AGTGGGTGCT GCTGTCTACT TTCCTGGGAC
1701 ACCACCACCA CCACCACTAA

```

(序列辨識編號：7)

利用一種血球凝集抑制檢測法偵測來自 H1(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)接種的抗血清是否具有抑制 WSN (H1N1)病毒凝集紅血球細胞的能力。如第 18A 圖所示，來自接種 H1(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)之單糖基化 HA

(HA_{mg})的抗血清與完全糖基化 HA(HA_{fg})和未糖基化 HA (HA_{ug})相比證明具有較佳抑制 WSN(H1N1)病毒凝集紅血球細胞的能力。

利用微量中和檢測法偵測來自 H1(2009 年大流行 A (H1N1)疫苗株)接種的抗血清是否具有中和 WSN(H1N1)病毒感染 MDCK 細胞的能力。如第 18B 圖所示，來自 H1(2009 年大流行 A (H1N1)疫苗株)的單糖基化 HA(HA_{mg})與完全糖基化 HA(HA_{fg})和未糖基化 HA(HA_{ug})相比證明具有較佳中和 WSN(H1N1)病毒感染 MDCK 細胞的能力。

利用一種病毒攻毒試驗以證明接種來自 H1(2009 年大流行 A (H1N1)疫苗株)的單糖基化 HA 可對抗 WSN(H1N1) 1933 或 A/波多黎各/8/34(H1N1)：PR8 病毒的攻毒。單糖基化 HA(2009 年大流行 A (H1N1)疫苗株)疫苗可保護 BALB/c 小鼠對抗 WSN(H1N1)或 PR8 病毒的攻毒。對照之下，製造自不活化病毒之傳統流感疫苗的完全糖基化 HA 顯示無對抗 WSN(H1N1)或 PR8 病毒感染的交叉保護能力。

來自其他流感病毒株的部分糖基化(例如單糖基化) HA 可被用於配製有效預防或降低一或多種流感病毒株或亞型感染的強效疫苗。分離及修飾用於如實施例 1 所述之表現的流感 HA 編碼序列。選殖該 HA 以及表現於一真核表現系統內然後進行去糖基化以保留一至三個糖基(較佳為單糖基化)於糖基化位點。

表 4 顯示經修飾 H1 A del-TM-FH6 的共有序列其訊號肽序列被劃底線及加粗體字，斜體字為凝血酶切割點，該噬菌體 T4 fibritin-foldon 三聚合序列和 His-標籤被劃底線，以及該連接序列為粗體字和被劃底線。

表 4 共有 H1 A del-TM-FH6 凝集素序列

流感 H1 A del-TM-FH6 凝集素的共有胺基酸序列



MKVKLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVLEKNVTVTHSVNLL 50
 EDSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETP 100
 NPENGTCYPGYFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHVTGKVS 150
 ASCSHNGKSSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHP 200
 NIGDQRALYHTENAYVSVVSSHYSRRFTPEIAKRPKVRDQEGRINYWTL 250
 LEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALSRRGFGSGIITSNAPMDECDACQTPQ 300
 GAINSSLFPQNVHPVTIGECPKYVRSTKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAI 350
 AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQSGYAADQKSTQNAINGITNKVNSVI 400
 EKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER 450
 TLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGT 500
 YDYPKYSEESKLNREKIDGVDIRSLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKD 550
GEWVLLSTFLGHHHHH

(序列辨識編號：8)

流感 H1 A del-TM-FH6 凝集素的核苷酸序列

1 ATGAAGGTGA AACTGCTGGT GCTGCTGTGC ACCTTCACCG CCACCTACGC
 51 CGACACCATC TGCATCGGCT ACCACGCCAA CAACAGCACC GACACCGTGG
 101 ATACCGTGCT GGAAAAGAAC GTGACCGTGA CCCACAGCGT GAACCTGCTG
 151 GAAGATAGCC ACAACGGCAA GCTGTGCCTG CTGAAGGGCA TTGCCCCCT
 201 GCAGCTGGGC AACTGTAGCG TGGCCGGCTG GATTCTGGGC AACCCCGAGT
 251 GCGAGCTGCT GATCAGCAAA GAGTCCTGGT CCTACATCGT GGAGACACCC
 301 AACCCCGAGA ACGGCACCTG TTACCCCGGC TACTTCGCCG ACTACGAGGA
 351 ACTGAGAGAG CAGCTGTCCT CTGTCTCCAG CTTCGAGCGG TTCGAGATCT
 401 TCCCCAAAGA GAGCAGCTGG CCAACCACA CCGTGACAAA GGGCGTGAGC
 451 GCCAGCTGCT CCCACAATGG CAAGAGCAGC TTCTACCGGA ACCTGCTGTG
 501 GCTGACCGGC AAGAACGGCC TGTACCCCAA CCTGAGCAAG AGCTATGCCA
 551 ACAACAAAGA GAAAGAGGTC CTCGTCCTCT GGGGCGTGCA CCACCCCCC
 601 AACATCGGCG ACCAGCGGGC CCTGTACCAC ACCGAGAACG CCTACGTGTC

```

651 CGTGGTGTCC AGCCACTACA GCAGACGGTT CACCCCCGAG ATCGCCAAGA
701 GGCCCAAAGT GCGGGACCAG GAAGGCCGGA TCAACTACTA CTGGACCCTG
751 CTGGAACCCG GCGACACCAT CATCTTCGAG GCCAACGGCA ACCTGATCGC
801 CCCAGATAC GCCTTTGCCC TGAGCAGAGG CTTGCGCAGC GGCATCATCA
851 CCAGCAACGC CCCCATGGAC GAGTGCGACG CCAAGTGTCA GACCCCCCAG
901 GCGGCCATCA ACAGCAGCCT GCCCTTCCAG AACGTGCACC CCGTGACCAT
951 CGGCGAGTGC CCTAAGTACG TCGGGAGCAC CAAGCTGAGA ATGGTGACCG
1001 GCCTGCGGAA CATCCCCAGC ATCCAGAGCA GAGGCCTGTT TGGCGCCATT
1051 GCCGGCTTTA TCGAGGGCGG CTGGACCGGA ATGGTGGACG GGTGGTACGG
1101 CTACCACCAC CAGAATGAGC AGGGCAGCGG CTACGCCGCC GATCAGAAGT
1151 CCACCCAGAA CGCTATCAAC GGCATCACCA ACAAAGTGAA CAGCGTGATC
1201 GAGAAGATGA ACACCCAGTT CACCGCCGTG GGCAAAGAGT TCAACAAGCT
1251 GGAACGGCGG ATGGAAAACC TGAACAAGAA GGTGGACGAC GGCTTCCTGG
1301 ACATCTGGAC CTACAACGCC GAGCTGCTGG TCCTGCTGGA AAACGAGCGG
1351 ACCCTGGACT TCCACGACAG CAACGTGAAG AACCTGTACG AGAAAGTGAA
1401 GTCCCAGCTG AAGAACAACG CCAAAGAGAT CGGCAACGGC TGCTTCGAGT
1451 TCTACCACAA GTGCAACGAC GAGTGCATGG AAAGCGTGAA GAACGGCACA
1501 TACGACTACC CCAAGTACAG CGAGGAAAGC AAGCTGAACC GGGAGAAGAT
1551 CGACGGCGTG GATATCAGAT CTCTGGTGCC AAGAGGATCT CCAGGATCTG
1601 GATACATCCC AGAGGCTCCA AGAGATGGAC AAGCTTACGT GAGAAAGGAC
1651 GGAGAGTGGG TGCTGCTGTC TACTTTCCTG GGACACCACC ACCACCACCA
1701 CTAA

```

(序列辨識編號：9)

表 5 顯示經修飾 H1-C del-TM-FH6 的共有序列其訊號肽序列被劃底線及加粗體字，斜體字為凝血酶切割點，該噬菌體 T4 fibritin-foldon 三聚合序列和 His-標籤被劃底線，以及該連接序列為粗體字和被劃底線。



表 5 共有 H1-C del-TM-FH6 凝集素序列

流感 H1-C del-TM-FH6 凝集素的共有氨基酸序列	
MKVLLVLLCTFTATYADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLL	50
EDSHNGKLCLLKGIAPLQLGNCSVAGWILGNPECELLISKESWSYIVETP	100
NPENGTCYPGHFADYEELREQLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHDTVTGVS	150
ASCSHNGESSFYRNLLWLTGKNGLYPNLSKSYANNKEKEVLVLWGVHHP	200
NIGDQKALYHTENAYVSVVSSHYSRKFTPEIAKRPKVRDQEGRINYYWTL	250
LEPGDTIIFEANGNLIAPRYAFALS RGFSGIINSNAPMDKCDAKCQTPQ	300
GAINSSLPFQNVHPVTIGECPKYVRS AKLRMVTGLRNIPSIQSRGLFGAI	350
AGFIEGGWTGMVDGWYGYHHQNEQGS GYAADQKSTQNAINGITNKVNSVI	400
EKMNTQFTAVGKEFNKLERRMENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENER	450
TLDFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGCFEFYHKCNDECMESVKNGT	500
YDYPKYSEESKLNREKIDGVDIRSLVPRGSPGSGYIPEAPRDGQAYVRKD	550
GEWVLLSTFLGHHHHH	
(序列辨識編號：10)	
流感 H1-C del-TM-FH6 凝集素的核苷酸序列	
1 ATGAAGGTGA AACTGCTGGT GCTGCTGTGC ACCTTCACCG CCACCTACGC	
51 CGACACCATC TGCATCGGCT ACCACGCCAA CAACAGCACC GACACCGTGG	
101 ATACCGTGCT GGAAAAGAAC GTGACCGTGA CCCACAGCGT GAACCTGCTG	
151 GAAGATAGCC ACAACGGCAA GCTGTGCCTG CTGAAGGGCA TTGCCCCCCT	
201 GCAGCTGGGC AACTGTAGCG TGGCCGGCTG GATTCTGGGC AACCCCGAGT	
251 GCGAGCTGCT GATCTCCAAA GAGTCCTGGT CTTACATCGT GGAGACACCC	
301 AACCCCGAGA ACGGCACCTG TTACCCCGGC CACTTCGCCG ACTACGAGGA	
351 ACTGCGGGAG CAGCTGAGCA GCGTGTCCAG CTTCGAGCGG TTCGAGATCT	
401 TCCCCAAAGA GAGCAGCTGG CCAACCACG ATACCGTGAC CGGCGTGAGC	
451 GCCAGCTGTT CCCACAACGG CGAGAGCAGC TTCTACCGGA ACCTGCTGTG	
501 GCTGACCGGC AAGAACGGCC TGTACCCCAA CCTGAGCAAG AGCTATGCCA	

```

551 ACAACAAAGA GAAGGAAGTC CTGGTCCTCT GGGGCGTGCA CCACCCCCC
601 AACATCGGCG ACCAGAAGGC CCTGTACCAC ACCGAGAACG CCTACGTGTC
651 CGTGGTGTCC AGCCACTACA GCCGGAAGTT CACCCCCGAG ATCGCCAAGA
701 GGCCCAAAGT GCGGGACCAG GAAGGCCGGA TCAACTACTA CTGGACCCTG
751 CTGGAACCCG GCGACACCAT CATCTTCGAG GCCAACGGCA ACCTGATCGC
801 CCCAGATAC GCCTTTGCCC TGAGCAGAGG CTTGCGCAGC GGCATCATCA
851 ACAGCAACGC CCCCATGGAC AAGTGCGACG CCAAGTGCCA GACACCCAG
901 GGCGCCATCA ACAGCTCCCT GCCCTTCCAG AACGTGCACC CCGTGACCAT
951 CGGCGAGTGC CCTAAGTACG TGCGGAGCGC CAAGCTGAGA ATGGTGACCG
1001 GCCTGCGGAA CATCCCCAGC ATCCAGAGCA GAGGCCTGTT TGGCGCCATT
1051 GCCGGCTTTA TCGAGGGCGG CTGGACCGGA ATGGTGGACG GGTGGTACGG
1101 CTACCACCAC CAGAATGAGC AGGGCAGCGG CTACGCCGCC GATCAGAAGT
1151 CCACCCAGAA CGCCATCAAC GGCATCACCA ACAAAGTGAA CAGCGTGATC
1201 GAGAAGATGA ACACCCAGTT CACCGCCGTG GGCAAAGAGT TCAACAAGCT
1251 GGAACGGCGG ATGGAAAACC TGAACAAGAA GGTGGACGAC GGCTTCCTGG
1301 ACATCTGGAC CTACAACGCC GAGCTGCTGG TGCTGCTGGA AAACGAGCGG
1351 ACCCTGGACT TCCACGACAG CAACGTGAAG AACCTGTACG AGAAAGTGAA
1401 GTCCCAGCTG AAGAACAACG CCAAAGAGAT CGGCAACGGC TGCTTCGAGT
1451 TCTACCACAA GTGCAACGAC GAGTGCATGG AAAGCGTGAA GAACGGCACA
1501 TACGACTACC CCAAGTACAG CGAGGAAAGC AAGCTGAACC GGGAGAAGAT
1551 CGACGGCGTG GATATCAGAT CTCTGGTGCC AAGAGGATCT CCAGGATCTG
1601 GATACATCCC AGAGGCTCCA AGAGATGGAC AAGCTTACGT GAGAAAGGAC
1651 GGAGAGTGGG TGCTGCTGTC TACTTTCCTG GGACACCACC ACCACCACCA
1701 CTAA

```

(序列辨識編號：11)

產生自本發明去糖基化 HA 胜肽的疫苗具有對抗呼吸
道病毒的抗病毒活性，包括呼吸融合病毒(RSV)和各型流感



病毒例如 A 型和 B 型流感病毒。本發明的抗病毒胜肽具有對抗許多流感病毒株的有益抗病毒活性，包括季節性、禽(例如 H5N1 株)和豬流感病毒。根據此處揭示的一些方法可預防或治療被這些病毒感染造成的疾病。

(C) H1/HA 蛋白上的糖基化位點

該流感 H1 HA 分子具有四個不同的抗原區：Sa、Sb、Ca 和 Cb(Luoh SM 等人(1992) *J. Virol.* 66：1066~1073)。這些位置包括自從 1918 年浮現以來已產生抗體介導免疫需求之季節性人類 H1N1 病毒的 HA 分子內大部分可變胺基酸。

利用凝集抑制(HI)檢測法及接種/攻毒試驗，已證明 2009 年大流行 H1N1 病毒的抗原性類似流行於 1918~1943 年的人類 H1N1 病毒以及傳統豬 H1N1 病毒。已發現對抗類 1918 年或傳統豬 H1N1 疫苗的抗體可完全保護 C57B/6 小鼠對抗流感 A/紐西蘭/602/2009 分離病毒的致死性攻毒。增加對抗 1918 或 A/加州/04/2009 HA 蛋白之交叉反應單株抗體(mAbs)的被動免疫已發現可提供降低死亡率的完全保護作用。藉由 2009H1N1 病毒篩選所產生之 mAb 抗體逃避突變株的分析指出抗原區 Sa 係其中一保留交叉保護表位(Manicassamy B 等人；*PloS Pathogens* 2010 年 1 月/第 6 卷/第 1 期/e1000745)。

藉由 HA 結構的同源模擬法已顯示 2009 H1N1 和 1918 大流行病毒的 HAs 在已知抗原位點具有大量的共同胺基酸殘基，而認為兩種用於中和抗體交叉反應的 HAs 具有共同表位(Igarashi M 等人；*PloS ONE* 2010 年 1 月/第 5 卷/第 1 期/e8553)。存在於 HA 上 Asn177 殘基的一可能糖基化位點係在該抗原性保留 Sa 區內(請看第 19 圖)。使用攜帶在布里斯本 H1 之 HA 內之 Asn177 糖基化位點的突變蛋白免疫小鼠。測定對抗 NIBRG-121 的交叉保護作用。

來自接種攜帶來自 H1(布里斯本)Asn177 突變之單糖基化 HA(HA_{mg})的抗血清與在 Asn177 攜帶突變之完全糖基化 HA(HA_{fg})和在 Asn177 攜帶突變之未糖基化 HA(HA_{ug})比較證明具有抑制 NIBRG-121 病毒凝集紅血球細胞的能力。來自 H1(布里斯本)在 Asn177 攜帶突變的單糖基化 HA (HA_{mg})與在 Asn177 攜帶突變之完全糖基化 HA(HA_{fg})和在 Asn177 攜帶突變之未糖基化 HA(HA_{ug})比較證明具有較佳中和 NIBRG-121 病毒感染 MDCK 細胞的能力。單糖基化 HA(布里斯本)疫苗可保護 BALB/c 小鼠對抗 NIBRG-121 病毒的攻毒。對照之下，在 Asn177 攜帶突變之完全糖基化 HA 顯示低或無對抗 NIBRG-121 病毒感染的交叉保護能力。

此處"治療活性"或"活性"指其與人類，或與非人類哺乳動物或其他屬或生物中所欲治療效果一致的活性。可於體內或體外測定該治療活性。例如，可於細胞培養內檢測該所欲效力。

根據本發明揭示之疫苗的"抗病毒活性"指疫苗被接種生物體內所產生的一免疫反應，其中該免疫反應足以預防或改善與病毒感染有關例如一流感病毒的全面性病毒感染及/或症狀。產生自本發明揭示之去糖基化 HA 胜肽的疫苗證明具有利於對抗流感病毒的顯著抗病毒活性。此處"顯著抗病毒活性"可藉由與病毒模擬治療樣本比較該疫苗抑制至少約 50%的病毒性凝集作用被測定。在某些具體實施例中，該抗病毒胜肽當與病毒模擬治療樣本比較時可抑制至少約 60%的病毒凝集作用，更佳為至少約 70%，更佳為至少約 80%，更佳為至少約 90%，以及更佳為至少約 95%。

證明抗病毒組合物對病毒複製之抑制效應的方法已為技術中所習知。可於實驗動物內證明本發明作為抗病毒劑之疫苗的治療效果，例如利用小鼠模式(請看例如 Jones 等人；*J. Virol.* 2006 第 80 卷第 24 號第 11960~11967 頁)。此



外，本發明藥理上活性肽的治療效果可經由本領域中習知的技術被呈現於人類。

本發明的中和抗體可被附加地用作為流感 A 病毒抗原決定區之抗原表位測定的一種工具，以及被用於疫苗的發展。事實上，如下列實施例所述，發明者已於此處鑑定出數種可被用於引導疫苗設計的廣效反應性中和抗體。

因此，本發明的中和抗體可被用於篩選可被抗體結合之中和表位功能性模擬肽的胜肽或多肽，亦即其可被發展成對抗 A 型流感病毒感染的疫苗。在一具體實施例中，本發明提供一種有效對抗 A 型流感病毒的疫苗，其含有可被此處所述抗體結合之中和表位功能性模擬肽的一胜肽或多肽。在一具體實施例中，該疫苗含有可結合一血球凝集素(HA)抗原結合抗體之中和表位功能性模擬肽的一胜肽或多肽。在另一具體實施例中，該疫苗可被合成。在其他具體實施例中，該疫苗含有：(i) 一減毒 A 型流感病毒，或其一部分；或(ii) 一死毒 A 型流感病毒，或其一部分。在一其他具體實施例中，該疫苗含有可結合一血球凝集素(HA)抗原結合抗體之中和表位功能性模擬肽的一胜肽或多肽。該 HA 抗原可為 H5 亞型或 H1 亞型。在另一具體實施例中，該 HA 抗原被展示於 A 型流感病毒的表面。

流感病毒疫苗

流感 H5 HA 的 N-糖基化位點序列被高度保留。該 H5 HA 具有原型序列 N-X-(S/T)的總共 15 個 N-糖基化位點。各單體於位置 N27、N39、N170、N181 和 N500 具有 5 個 N-糖基化位點。HA 結構上的聚糖可影響宿主受體的結合。H5 HA 於位置 39、127、170、181 和 500 具有糖基化位點。

可利用流感病毒任何表面蛋白的部分糖基化版產生本發明的疫苗，包括 HA、NA 和 M2。該 A 型流感病毒神經

胺酸酶(NA)蛋白被呈現於其表面。A 型流感病毒 M2 蛋白係一種 97 個胺基酸的整合膜蛋白，其被表現於具有 18 至 23 個胺基酸殘基之細胞外 N-端區、約 19 個殘基之內部疏水區以及 54 個殘基之 C-端胞質區的感染細胞表面 Zebedee SL 等人；*J. Virol.*；1988 年 8 月；62(8)：2762~2772)。

此外，藉由改變於 N-或 O-糖基化位點上用作為抗原蛋白的糖基化模式可產生該部分糖基化流感蛋白。

在另一具體實施例中，該疫苗的胜肽或多肽含有提高 A 型流感病毒中和抗體的抗原決定區。

在一更常見的態樣中，該包括但不侷限於抗體的中和分子被有效用於預防或治療病毒感染。因此，本發明的中和分子被用於免疫療法，例如利用一或多種此類分子的被動免疫，以及被用於發展針對該病毒抗原靶標的疫苗。

本發明提供用於預防和治療禽流感中和病毒感染的疫苗組合物。雖然在 80 年前已知免疫血清的被動免疫可用於預防感染(Luke, T.C.等人、Kilbane E.M.、Jackson J.L.和 Hoffman S.L.(2006) *Ann. Intern. Med.* 145：599~609)，但是最近單株抗體的研究亦極具價值(Hanson, B.J.等人(2006) *Respir. Res.* 7：126；Huang, C.C.等人(2004) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101：2706~2711；Simmons C.P.等人(2007) *Plos Med.* 4/e178)。例如，Hanson 等人指出一針對 H5N1 病毒的單株抗體於接種三天之後的小鼠即具有防止致死性感染的保護(Hanson, B.J.等人(2006) *Respir. Res.* 7：126)。

基於毀滅性大流行的可能性，已建議政府應保持例如此處所述中和抗體的庫存。已成功地被分離自對抗病毒感染之個體的純人源化抗體具有其價值。然而，即使已庫存此類的抗體，但是若編碼抗體結合表位的基因產生突變，則可能降低該抗體的效力。同樣，已有一些證據顯示細胞免疫可能加速該病毒的清除。儘管如此，若僅利用該被動

免疫效應降低感染嚴重性，則必需於此時間點使用其他免疫效應細胞，其對於降低患有免疫不全、心血管疾病、呼吸道系統疾病和老年的病人而言極為重要。被動免疫可預防對抗病毒快速增殖的細胞活素風暴(cytokine storm)，其在1918年流感爆發期間甚至發生於健康的年輕成人。

呼吸道融合病毒(RSV)疫苗

人類呼吸道融合病毒(RSV)係一種導致呼吸道感染的病毒。其主要造成下呼吸道的感染以及嬰兒和孩童的院區感染。RSV 係一種副黏液病毒科以及肺炎病毒屬的封套RNA病毒。目前無可使用的疫苗。

RSV 病毒粒子含有三種表面糖蛋白F、G 和 SH(微疏水性)。於病毒表面的F 蛋白造成細胞附近之細胞膜的融合而形成融合細胞(syncytia)。F(融合)和 G(附著)糖蛋白的病毒必需進入細胞內以及其亦決定抗體的反應。已闡明 RSV 的構造和組合物以及詳述於 Knipe, D.M.等人編輯"臨床病毒學"教科書，Lippincott Williams & Wilkins 紐約(2001)，特別指第 45 章第 1443~1485 頁，Collins, P、Chanock, R.M.和 Murphy, B.R.所著的"呼吸道融合病毒"一章。

具有 33 kDa 未糖基化的 RSV G 蛋白當被完全糖基化(N-和 O-連接糖基化)時約為 90 kDa。F 和 G 蛋白存在於 RSV 感染細胞表面上的蛋白複合物(Low K.W.等人, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 366(2)：2008, 308~313)。

表 6 指出 RSV 糖蛋白 G 的序列具有劃底線的可能 N-糖基化位點。

表 6 RSV 糖蛋白 G 多肽序列

MSKNKDQRTT KTLEKTWDTL NHLLFISSCL YKLNLSIAQ ITLSILAMII STSLHAAII	60
FIASANHKVT LTTAIIQDAT SQIKNTTPTY LTQNPQLGIS FSNLSETTSQ TTILASTTP	120
SVKSTLQSTT VKTKNTTTTK IQPSKPTTKQ RQNKPPNKPND FHFVEVFNF VPCSICSNPN	

180

TCWAICKRIP NKKPGKKT TTT KPTKKPTIKT TKKDLKPQTT KPKEVPTTKP TEKPTINTTK

240

TNIRTTLLTN NTTGNPEHTS QKGT LHSTSS DGNPSPSQVY TTSEYLSQPP SPSNTTNQ 298

(序列辨識編號：12)

部分去糖基化 RSV 糖蛋白 F 和 G 可被用作為更有效的 RSV 疫苗。

黃熱病毒疫苗

黃熱病毒係屬於黃熱病毒科(*Flaviviridae*)。黃熱病毒係利用節肢動物例如蚊蟲傳播至其他脊髓動物宿主的小型、封套 RNA 病毒，以及包括黃熱病(YFV)、西尼羅河病毒(WNV)、蜱傳腦炎病毒、日本腦炎病毒(JE)和登革熱 2 病毒(Weaver SC、Barrett AD, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 : 789~ 801, 2004)。黃熱病毒由三種結構蛋白所構成：核心核殼蛋白 C 以及封最糖蛋白 M 和 E。糖蛋白 E 係一種介導受體結合及融合的第 II 類病毒融合蛋白。第 II 類病毒融合蛋白被發現於黃熱病毒和阿爾發病毒。

糖蛋白 E 包含三種區域：區域 I(雙聚合區)係一 8-股 β 桶狀、區域 II(中心區)係一由 12 個 β 股和 2 個 α 螺旋組成的延伸區，以及區域 III(類免疫球蛋白區)係一具有 10 個 β 股的 IgC-樣模塊。區域 I 和 II 為相互纏繞。

病毒表面上的該 495 AA 糖蛋白 E 雙聚體當暴露於低 pH 時不可逆地再聚集成融合三聚體，其如同內質體於酸性環境內所發現者。三聚體的形成導致造成暴露區域 II 頂部融合肽環的構型改變，其為藉由插入膜內以促使細胞膜和病毒套膜相互接觸之融合步驟所必需(Modis Y 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 : 6989~91 ; 2003)。

登革熱病毒封套蛋白(E)在 Asn-67 和 Asn-153 含有兩個

主要 N-連接的糖蛋白位點。在大部分黃熱病毒保留於位置 153 的糖基化位點，同時位置 67 的位點為登革熱病毒所特有。黃熱病毒 E 蛋白上的 N-連接寡糖側鏈與病毒形態形成、感染性和趨向性有關。登革熱病毒於位置 67 缺少 N-糖基化而顯示降低對人類細胞的感染性(Mondotte JA 等人, *J. Virol.* 81(3)：7136~7148(2007))。

表 7 指出該登革熱病毒糖蛋白 E 的序列具有在 N-67 和 N-153 劃底線的可能 N-糖基化位點。

表 7 登革熱病毒糖蛋白 E 多肽序列

MRCVGIGNRD FVEGLSGATW VDVVLEHGSC VTMAKNKPT LDIELLKTEV TNPAVLRKLC	60
IEAKIS <u>NT</u> TTT DSRCP <u>TQ</u> GEA TLVEEQDANF VCRRTFVDRG WNGCGLFGK GSLLTCAFK	120
CVTKLEGKIV QYENLKYSVI VTVHTGDQHQ <u>VG</u> NETTEHGT IATITPQAPM SEIQLTDYGA	180
LTLDCSPRTG LDFNEMVLLT MKEKSWLVHK QWFLDLPLPW TSGASTSQET WNRQDLLVTF	240
KTAHAKKQEV VVLGSQEGAM HTALTGATEI QTSGTTTIFA GHLKCRLKMD KLTLKGVSYV	300
MCTGSFKLEK EVAETQHGTV LVQVKYEGTD APCKIPFSTQ DEKGVTONGR LITANPIVTD	360
KEKPVNIETE PPFGESYIVI GAGEKALKLS WFKKGSSIGK MFEATARGAR RMAILGDTAW	420
DFGSIGGAFT SVGKLVHQVF GTAYGVLFSG VSWTMKIGIG ILLTWLGLNS RSTSLSMTCI	480
AVGMVTLYLG VVVQA	
495	
(序列辨識編號：13)	

因此，登革熱病毒糖蛋白 E 的部分去糖基化可被用於更有效地產生和廣泛對抗黃熱病毒的疫苗。第 21A~B 圖所述模式中顯示獲得的登革熱 3 型病毒 E 蛋白雙聚體的部分去糖基化。第 21B 圖顯示單糖基化登革熱 E 蛋白。

C 型肝炎病毒(HCV)為人類輸血後感染及社區非 A、非 B 型肝炎感染的主要病原菌，其大約感染 1%的全世界人口。HCV 係黃熱病毒屬中的一員，其包括黃熱病毒和瘟疫病毒(Miller RH 和 Purcell RH, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87：2057~2061；1990)。

該 C 型肝炎病毒(HCV)基因組編碼兩個膜相關封套糖

蛋白(E1 和 E2)，其相互作用而形成一非共價鍵異源二聚複合體。HCV 糖蛋白 E1 和 E2 被 N-連接糖基化所高度地修飾。視 HCV 基因型該 E1 蛋白由 192 個胺基酸所組成以及含有 5 至 6 個 N-糖基化位點。視 HCV 基因型該 E2 蛋白由 363 至 370 個胺基酸所組成以及含有 9~11 個 N-糖基化位點 (Maertens G 和 Stuyver L, C 型肝炎病毒的基因型和基因變異於:病毒性肝炎的分子醫學;Harrison T.J.和 Zuckerman A.J.編輯, 1977)。

一項最近的研究披露當以內切糖苷酶 H 部分糖基化時僅利用分別在 HCV 糖蛋白 E1 之胺基酸位置 196、209、234、305 和 325 的五個可能糖基化位點中的四個。於位置 N2(196) 和 N3(234)的突變在組合 E1E2 複合體上僅具有此微的效應，反之於位置 N1(196)以及主要於位置 N4(305)的突變可戲劇性地降低形成非共價鍵 E1E2 複合體的效率(Meunier J.C.等人, *J. Gen. Virol.*(1999)80：887~896)。

表 8 指出 C 型肝炎分離 HC-J6 封套糖蛋白 E1 的序列在劃底線的位置 196、209、234、305 和 325 具有可能的 N-糖基化位點。

表 8 C 型肝炎病毒封套糖蛋白 E1 多肽序列

AEV <u>K</u> NISTGY MVTNDCT <u>N</u> DS ITWQLQAAVL HVPGCVPCEK VG <u>N</u> TSRCWIP VSPNVAVQQP	252
GALTQGLRTH IDMVMSATL CSALYVGDLG GGVMLAAQMF IVSPQHWFV QDC <u>N</u> CSIYPG	312
TITGHRMAWD <u>M</u> MM <u>N</u> WSPTAT MILAYAMRVP EVIIDIIGGA HWGVMFGLAY FSMQGAWAKV	372
VVILLLAAGV DA	
384	
(序列辨識編號：14)	

因此，HCV 糖蛋白 E1 和 E2 的部分去糖基化可被用於更有效地產生和廣泛對抗 HCV 的疫苗。

人類免疫缺陷病毒(HIV)疫苗



人類免疫缺陷病毒 HIV-1 和 HIV-2 及相關猿猴免疫缺陷病毒(SIV)可造成其各自宿主的 CD4⁺淋巴球破壞，此將導致形成後天免疫缺乏症候群(AIDS)。HIV 藉由病毒封套糖蛋白的介導進入宿主細胞內，其被組織成展示於病毒粒子表面上的寡聚合或可能三聚合的棘突。這些封套複合體藉由 gp41 跨膜封套糖蛋白被錨固於病毒套膜內。棘突的表面主要係由外部封套糖蛋白、gp120，聯合各次單位三聚合 gp41 糖蛋白複合體的非共價鍵相互作用所組成。

人類免疫缺陷 1 型(HIV-1)封套的 gp120 和 gp41 糖蛋白添加天冬胺酸鹽(N)-連接多糖鏈(即聚糖)不僅為校正蛋白折疊所必需，亦可提供對抗中和抗體作為"聚糖屏障"的保護作用(Wei X 等人, *Nature* 422 : 307~312, 2003)。代表病毒與宿主環境之間主要介面之人類免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)封套的表面糖蛋白(gp120)係目前已知最高度被糖基化的蛋白，其接近一半的分子量歸因於添加 N-連接聚糖(Allan JS 等人, *Science* 228 : 1091~1094, 1985)。HIV-1 封套的跨膜糖蛋白(gp41)亦被糖基化，但較低的糖化程度。添加 N-連接聚糖為 HIV-1 gp120 被折疊成可結合至 CD4 受體的適當構形所必需，以及影響另類輔助受體 CXCR4 和 CCR5 的結合，該結合效應可介導融合及 HIV-1 進入宿主細胞內。

由於許多 N-連接聚糖係 HIV-1 封套的高度保留成分，其本身可提供用於中和抗體的一理想標的。該廣效中和性人類單株抗體 2G12 結合至一含有附著至該 gp120 糖蛋白之 N-連接聚糖的表位(Trloka A 等人, *J. Virol.* 70 : 1100~1108, 1996)。N-連接糖基化位點已被實驗室地刪除或修飾的 HIV-1 株對中和作用變得更為敏感(Koch 等人, 2003 *Virology* 313 : 387~400)。

成熟 gp120 含有 24 個用於 N-糖基化的可能位點，其辨識序列為 Asn-Xaa-Ser/Thr(Kornfeld 和 Kornfeld, *Ann. Rev.*

Biochem. 54 : 631~664, 1985)。表 9 指出 HIV-1 HXB2 序列內的 24 個位點。劃底線者為可能的 N-糖基化位點。

表 9 HIV gp120 多肽序列

LWVTVYYGVP VWKEATTTLF CASDAKAYDT EVHNVWATHA CVPTDPNPQE VVLV <u>N</u> VTENF	60
NMWKNDMVEQ MHEDIISLWD QSLKPCVKLT PLCVSLKCTD LK <u>N</u> DTNT <u>N</u> SS SGRMIMEKGE	120
IK <u>N</u> CSF <u>N</u> IST SIRGKVQKEY AFFYKLDIIP ID <u>N</u> DTTSYKL TSC <u>N</u> TSVITQ ACPKVSFEPI	180
PIHYCAPAGF AILKCN <u>N</u> KTF <u>N</u> GTGPCT <u>N</u> VS TVQCTHGIRP VVSTQLLL <u>N</u> G SLAEEEVVIR	240
SV <u>N</u> FTDNAKT IIVQL <u>N</u> TSVE I <u>N</u> CTRP <u>N</u> NNT RKRIRIQRGP GRAFVTIGKI GNMQRQAHC <u>N</u> I	300
SRAKW <u>N</u> NNTLK QIASKLREQF GN <u>N</u> KTIIFKQ SSGGDPEIVT HSFNCGGEFF YC <u>N</u> STQLF <u>N</u> S	360
TFW <u>N</u> STWSTE GS <u>N</u> NTEGSDT ITLPCRIKQI INMWQKVGKA MYAPPISGQI RCSS <u>N</u> ITGLL	420
LTRDGGNS <u>N</u> N ESEIFRPGGG DMRDNWRSEL YKYKVVKIEP LGVAPTKAKR RVVQREKR	478

(序列辨識編號：15)

在 HIV-1 跨膜糖蛋白 gp41 中，該保留糖蛋白位點位於 Asn621、Asn630 和 Asn642。

因此，HIV 封套蛋白 gp120 或跨膜蛋白 gp41 的部分去糖基化可被用於更有效地產生和廣泛對抗黃熱病毒的疫苗。所形成的部分去糖基化 HIV gp120 蛋白三聚體示於第 20A~B 圖所描述的模型中。第 20B 圖顯示單糖基化 HIV gp120 蛋白三聚體。

製造部分糖基化細胞表面糖蛋白的方法

如同慣用的自動寡核苷酸合成儀，藉由例如化學方法直接合成該片段可輕易地製備本發明的多核苷酸，或其片段或變異株。同樣，藉由運用核酸複製技術例如美國專利案 4,683,202 的 PCR™ 技術以及藉由分子生物學領域中技術者一般已知的其他重組 DNA 技術將選取序列導入重組製造用的重組載體。

本發明提供含有本發明一核酸的載體和宿主細胞，以及用於製造本發明之多肽的重組技術。本發明的載體包括

能複製於任何類型細胞或有機體內者，包括例如質體、噬菌體、黏質體(cosmids)，以及迷你染色體。在各種具體實施例中，含有本發明一多核苷酸的載體為適合用於傳播或複製多核苷酸的載體，或適合用於表現本發明之多肽的載體。此類載體為技術中所習知以及可取自市售商品。

可結合全部或部分合成的本發明多核苷酸，然後利用習知分子和細胞生物學技術插入一載體內，包括例如利用適當限制位點和限制酶次選殖該多核苷酸進入一線性化載體內。藉由聚合酶鏈鎖反應利用與多核苷酸各股互補的寡核苷酸引子擴增本發明的多核苷酸。這些引子亦包括易於次選殖入一載體的限制酶切割位點。該可複製載體通常包括，但不侷限於一或多種下列的成分：一信號序列、一複製起點，以及一或多種標記或選擇基因。

為表現本發明的多肽，編碼該多肽或功能相等物的核苷酸序列被插入一適當的表現載體，即含有用於轉錄和轉譯該插入編碼序列所需元件的載體。利用本領域技術者所習知的方法構建含有編碼重要多肽及適當轉錄和轉譯控制元件之序列的表現載體。這些方法包括體外重組 DNA 技術、合成技術，以及體內基因重組。此類技術已述於例如 Sambrook J 等人(1989) *Molecular Cloning* 實驗室手冊，紐約 Plainview 市冷泉港出版及 Ausubel F.M. 等人(1989) 現行分子生物學實驗手冊，John Wiley & Sons，紐約紐約市。

可利用許多表現載體/宿主系統被含於及表現多核苷酸序列。這些包括，但不侷限於微生物例如以重組噬菌體、質體或黏質體 DNA 表現載體轉殖的細菌；以酵母表現載體轉殖的酵母；感染病毒表現載體(桿狀病毒)的昆蟲細胞系統；以病毒表現載體(例如花椰菜鑲嵌病毒、CaMV、菸草鑲嵌病毒、TMV)或以細菌表現載體(例如 Ti 或 pBR322 質體)轉殖的植物細胞系統；或動物細菌系統。

已知為真核生物的任何啟動子序列均可被用於本發明。實際上全部真核細胞基因具有位於從轉錄起始位點上游約 25 至 30 個鹼基的一富含 AT 區。許多基因轉錄起始位點上游 70 至 80 個鹼基的另一序列係一 CNCAAT 區，該 N 為任何的核苷酸。大部分真核細胞基因的 3'端係一 AATAAA 序列，其可為將聚 A 尾部加至該編碼序列 3'端的信號序列。全部這些序列適合被插入真核細胞表現載體內。

在哺乳動物細胞系統中，通常較佳為使用來自哺乳動物基因或來自哺乳動物病毒的啟動子。若此類啟動子與宿主細胞相容時，可藉由例如獲得自病毒如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒 2)、牛乳頭瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨細胞病毒(CMV)、逆轉錄病毒、B 型肝炎病毒以及最佳為猴病毒 40(SV40)之基因組的啟動子；來自異源哺乳動物啟動子如肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白的啟動子，及來自熱休克蛋白的啟動子控制哺乳動物宿主細胞內表現載體的多肽。若需產生含有編碼一多肽的多複本序列時，較佳為使用具有一適當選擇標記之根據 SV40 或 EBV 的載體。適當表現載體的一實施例為 pcDNA-3.1(加州 Carlsbad 市 Invitrogen 公司)，其包括一 CMV 啟動子。

許多的病毒表現系統可用於表現哺乳動物的多肽。例如，在使用腺病毒作為一表現載體時，編碼標的多肽的序列可被接合入由晚期啟動子和三聯前導序列所組成的一腺病毒轉錄/轉複合體內。插入病毒基因組的一非必需 E1 或 E3 區可被用於獲得在感染宿主細胞內能表現該多肽的一活病毒(Logan, J.和 Shenk, T.(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 3655~3659)。此外，轉錄增強子例如勞氏肉瘤病毒(RSV)增強子可被用於增強哺乳動物宿主細胞內的表現。

在細菌系統中，視表現多肽的用途選擇許多表現載體中的任一種。例如，當需要大量時，使用易於純化之可高

度表現融合蛋白的載體。此類載體包括，但不侷限於多功能大腸桿菌選殖和表現載體如 BLUESCRIPT(Stratagene)，該編碼重要多肽的序列可被接合入具有 β -半乳糖苷酶之胺基端 Met 和子序列 7 殘基序列框內的載體，因而可產生一雜合蛋白；pIN 載體(Van Heeke, G 和 S.M. Schuster(1989) *J. Biol. Chem.* 264: 5503~5509)；及其類似物。亦可以麴胱苷肽 S-轉移酶(GST)使用 pGEX 載體(威斯康辛 Madison 市 Promega 公司)表現作為融合蛋白的外源多肽。通常，此類正合蛋白為水溶性以及藉由吸附至麴胱苷肽-瓊脂珠接著於存在游離麴胱苷肽下的透析可輕易地從裂解細胞被純化。此類系統製造的蛋白質被設計成包括肝素、凝血酶或因子 XA 蛋白酶斷裂位點，因而可從任意的 GST 基團釋出該經選殖的重要多肽。

在釀酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)中，使用許多含有組成型或誘導型啟動子例如 α 因子、醇氧化酶和 PGH 的載體。其他用於酵母宿主之適當啟動子序列的實施例包括磷酸甘油酸激酶或其他糖解酶的啟動子，例如烯醇酶(enolase)、甘油醛-3-磷酸脫氫酶、己糖激酶、丙酮酸脫羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸異構酶、3-磷酸甘油酯變位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖異構酶、磷酸葡萄糖異構酶，及葡萄糖激酶。就評論而言請看 Ausubel 等人(同上)和 Grant 等人(1987) *Methods Enzymol.* 153: 516~544。其他酵母為具有生長條件控制轉錄之附加優點的誘導型啟動子包括用於醇去氫酶 2、異細胞色素 C、酸性磷酸酶、與氮代謝有關之降解酵素、金屬硫蛋白(metallothionein)、甘油醛-3-磷酸脫氫酶，以及負責麥芽糖和半乳糖利用之酵素的啟動子區。用於酵母表現的適合載體和啟動子進一步說明於 EP 73,657。在酵母中糖基化 HCV 表面蛋白的表現已揭示於 WO 96/04385。酵母增強子亦有利地與酵母啟動子共同使

用。

在使用植物表現載體的實例中，可藉由任何數目的啟動子驅動編碼多肽之序列的表現。例如，可單獨使用病毒啟動子例如 CaMV 的 35S 和 19S，或結合來自 TMV 的 ω 前導序列(Takamatsu, N.(1987) *EMBO J.* 6 : 307~311)。或者，使用植物啟動子例如小亞單位 RUBISCO 或熱休克啟動子(Coruzzi, G.等人(1984) *EMBO J.* 3 : 1671~1680 ; Broglie, R.等人(1984) *Science* 224 : 838~843 ; 以及 Winter, J.等人(1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17 : 85~105)。這些構體可藉由直接 DNA 轉殖或病原介導轉染被導入植物細菌。此類技術已述於許多常見的文獻中(請看例如 Hobbs, S.或 Murry, L.E.於 *McGraw Hill 科學和技術年鑑*(1992)紐約州紐約市 McGraw Hill 第 191~196 頁)。

亦使用一種昆蟲系統表現一標的多肽。例如，在一此類系統中，使用苜蓿銀紋夜蛾核多角體病毒(AcNPV)作為秋黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)細胞或擬尺蠖幼蟲(*Trichoplusia larvae*)內表現外來基因的載體。編碼該多肽的序列被選殖入該病毒的一非必需區如多角體蛋白(polyhedrin)基因，然後受到多角體蛋白啟動子的控制。成功插入該多肽編碼序列使該多角體蛋白基因不活化及產生缺乏外鞘蛋白的重組病毒。該重組病毒然後被用於感染例如表現該標的多肽的秋黏蟲細胞或擬尺蠖幼蟲(Engelhard, E.K.等人(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 : 3224~3227)。

藉由控制各種糖苷酶組合的用途完成重組表面糖蛋白的部分去糖基化，例如以神經胺酸酶移除唾液酸、以 α -1-甘露糖苷酶(Sigma)切斷外部甘露糖殘基，或以可有效地切斷 N-連接高甘露糖和複合聚糖之內 F-N 聚糖酶(德國 Mannheim 市 Boehringer Mannheim 生物化學公司)的處理。

藉由併入常用於肽合成的方法例如胺基酸殘基及/或

胜肽片段偶合的傳統溶液以及必需的固相技術合成本發明的 HA 胜肽。可使用技術中習知的任何方法合成該胜肽，例如 Schroeder 和 Lubke 於"*The Peptides*"第 1 卷校園版紐約州紐約市第 2~128 頁(1965)；"*The Peptides：分析、合成、生物學*"(E. Gross 等人編輯)校園版紐約州紐約市第 1~8 卷(1979~1987)；Stewart 和 Young 於"*固相胜肽合成*"第 2 版，Pierce Chem. Co., Rockford, Ill(1984)；Wild 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10537(1992)；以及 Rimsky 等人，*J. Virol.*, 72:986(1998)；Chan & White 於"*Fmoc 固相胜肽合成：實踐入門*"，牛津大學出版(2000)。在一些具體實施例中，可利用糖基化胺基酸合成該糖肽而使糖基化胺基酸如 GlcNAc-Asn(加州 Covington 市 V-Labs)被併入該胜肽的適當糖基化位點。

本發明所揭示的疫苗可藉由局部、鼻內或腸道外如經由皮下注射、肌肉內注射、靜脈注射、腹腔內注射或皮內注射至溫血動物如人、馬、其他哺乳動物等的投藥被用作為一抗病毒劑。可單獨或混合使用該抗病毒肽。此外，可單獨投與該抗病毒肽或作為進一步含有一或多種醫藥上可接受載劑之組合物的一部分，其混合比例視該胜肽的溶解度及化學性質、所選擇投藥和標準生物學投藥途徑而定。由於本發明的胜肽可靶向病毒及/或細胞表面的蛋白以確保其藥效，因此於此類調配物內的載劑必需不含或實質上無(例如濃度高於 90、95、98 或 99 重量%)結合至該胜肽的蛋白。

醫藥組合物

根據另一態樣，本發明揭示的疫苗和去糖基化蛋白可被含於醫藥或醫用營養組合物或含有熟習本領域技術者詳讀本揭示時能辨識之其他活性劑、載劑、載體、佐劑、賦

形劑或助劑的配製物內。

本發明所揭示的疫苗將有利地包含有效佐劑量的一佐劑肽。如熟習本領域之技術者所瞭解，佐劑肽或胜肽的最適濃度需視所使用特定胜肽、病人的特性、所使用的免疫原，以及尋求治療或預防之病毒感染性質而定。熟習本揭示之醫學和藥學領域的技術者可輕易地判定這些因素。通常，該佐劑肽最佳為投與可產生不導致任何有害或有毒副作用之佐劑活性的濃度。一般而言，較佳為一有效佐劑量。一有效佐劑量指對一經投與免疫原能產生免疫反應的佐劑肽數量。

本發明組合物內所含的適合佐劑包括技術中所習知者，例如非用於人類的佛氏完全佐劑(CFA)、佛氏不完全佐劑(IFA)、角鯊烯、角鯊烷、明礬和各種的油類，其全部已為技術中所習知並且可供應自市售的許多來源，例如來自諾華藥廠(如 MF59 佐劑)。

該醫藥或醫用營養組合物較佳為含有至少一種醫藥上可接受載劑。在此類醫藥組合物中，該疫苗或去糖基化蛋白所形成的"活性化合物"亦被稱為"活性劑"。此處所述的"醫藥上可接受載劑"包括醫藥上可相容的溶劑、分散介質、塗料、抗菌和抗真菌劑、等張和吸收延遲劑等。補充活性化合物亦可被併入該組合物內。根據所欲的投藥途徑配製一醫藥組合物。投藥途徑的實施例包括腸道外例如靜脈內、皮內、皮下、口服(如吸入)、經皮(局部)、經黏膜，以及直腸投藥。用於腸道外、皮內或皮下投藥的溶液或懸浮液包括下列的成分：滅菌稀釋液例如注射用水、食鹽溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇，或其他合成溶劑；抗菌劑例如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑例如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑例如四醋酸乙二胺(EDTA)；緩衝劑例如醋酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽以及用於調節張力的

物質例如氯化鈉或右旋糖。可利用酸或鹼調節 pH，例如鹽酸或氫氧化鈉。該腸道外製劑可被置於玻璃瓶、拋棄式針筒，或玻璃或塑膠製成的多劑量瓶內。

用於含胜肽組合物的適當醫藥上可接受載劑已述於標準藥理教科書中。請看例如"雷明登製藥科學"第 18 版，賓州 Easton 市 Mack 出版公司(1990)。適當醫藥上可接受載劑的特殊非限制性實施例包括水、鹽水、右旋糖、甘油、乙醇等，以及其組合。此外，若需要時該組合物可進一步含有微量的輔助物質例如濕潤劑或乳化劑、可加強組合物之抗病毒效果的 pH 緩衝劑。

此處的生物體指人類以及非人類靈長類(例如大猩猩、獼猴、絹猴)；牲畜動物(例如羊、牛、馬、驢和豬)；伴侶動物(例如犬、貓)；實驗動物(例如小鼠、兔、大鼠、天竺鼠、倉鼠)；野生動物(例如狐、鹿)；以及可受益於本發明製劑的任何其他生物。受益於本發明所揭示的製劑並非限制於任何類型的動物。一生物體不論其為人類或非人類生物均可被稱為一患者、個體、動物、宿主，或接受者。

就腸道外投藥而言，本發明所揭示的胜肽或其所產生的疫苗可單獨或結合其他醫藥上可接受載劑經由靜脈內、皮下、肌肉內、腹腔內或皮內注射被投藥。就藉由注射投藥而言，較佳為使用滅菌水性載劑溶液內的抗病毒肽其亦可含有其他溶質例如緩衝劑或防腐劑以及產生等張溶液的足量醫藥上可接受鹽或葡萄糖。本發明揭示的抗病毒肽可被製成技術中習知的治療上可接受鹽型。

適合注射用的醫藥組合物包括滅菌水溶液(可溶於水)或用於臨時製備滅菌可注射溶液或分散液的分散和滅菌粉末。就靜脈內投藥而言，適合載劑包括生理鹽水、抑菌水、Cremophor EL(紐澤西州 Parsippany 市 BASF 公司)或磷酸鹽緩衝液(PBS)。在任何情況下，該組合物必需為無菌並且為

可注射液體。其必需穩定存在於製造和儲存條件下以及被保存於無微生物例如細菌和真菌污染的環境。該載劑可為含有例如水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇和液態聚乙二醇等)，及其適當混合物的溶劑或分散介質。

可藉由例如利用塗佈如卵磷脂、藉由維持分散體的所需粒徑以及藉由使用表面活性劑維持適當的流動性。預防微生物的污染可藉由加入各種抗菌和抗真菌劑例如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗壞血酸、硫柳汞鈉(thimerosal)等。在許多情況下，該組合物較佳為含有等張劑，例如糖；聚合醇如甘露糖醇、山梨糖醇，或氯化鈉。延長可注射組合物的吸收可藉由將可延遲吸收的例如單硬脂酸鋁和明膠加入組合物內。

滅菌可注射溶液的製備可藉由將所需量的活性組合物併入含有上述其一系列成分或其組合的適當溶劑內，需要時繼之以過濾滅菌。通常，分散液的製備可藉由將活性化合物併入含有一鹼性分散介質和上述列舉所需其他成分的一滅菌載劑內。在以滅菌粉末製造滅菌可注射溶液的實例中，其製備方法包括真空乾燥和冷凍乾燥所產生的活性成分粉末加上來自其先前滅菌過濾溶液的任何其他所需成分。

疫苗亦可被口服投藥。口服組合物通常含有一惰性稀釋劑或一可食用載劑。就口服治療的投藥目的而言，該活性化合物可併入賦形劑及被製成錠劑、喉錠或膠囊如明膠膠囊。利用液體載劑亦可製備用作為漱口液的口腔組合物。醫藥上相容黏合劑或佐劑材料亦可為該組合物的一部分。錠劑、藥丸、膠囊、喉錠等可含有任何下列的成分或類似性質的化合物：一黏合劑例如微晶纖維素、黃耆樹膠或明膠；一賦形劑例如澱粉或乳糖；一分解劑例如褐藻酸、Primogel 或玉米澱粉；一潤滑劑例如硬脂酸鎂或 Sterotes；

一滑動劑例如二氧化矽膠體；一甜味劑例如蔗糖或糖精；或調味劑例如薄荷、甲基水楊酸或香橙調味粉。

由於本發明的胜肽和疫苗已顯示具有對抗呼吸道病毒的活性，因此其亦可局部地被輸送至呼吸系統例如進入鼻腔、鼻竇、竇膜或肺臟。該含有一或多種胜肽或疫苗的胜肽、疫苗或醫藥組合物可藉由任何適當方法例如經由口腔或鼻內的吸入被輸送至呼吸系統。本發明組合物可為分散粉末或液體鼻噴劑、懸浮液、滴鼻劑、一凝膠或藥膏、經由一輸管或導管，其可藉由注射器、packtail、小紗布，或黏膜下的輸注。該胜肽或疫苗可以噴霧劑的方式被方便地輸送，其係利用加壓組或噴霧器及一適當的推噴劑例如，但不侷限於二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳。在加壓噴霧劑的實例中，可藉由計量閥控制其傳送的劑量。用於一吸入器或吹藥器的膠囊和明膠匣盒可被配製成含有該胜肽及一適當粉末基質例如乳糖或澱粉的粉末混合物。鼻內配製物的實施例及投藥方法請看 PCT 公開案 WO01/41782、WO00/33813 及美國專利案 6,180,603、6,313,093 和 5,624,898。藉由引述將後者引證的美國專利案併入於此以及供各種的用途。用於一噴霧調配物的推噴劑可含有加壓空氣、氮、二氧化碳，或一烴基低沸點溶劑。本發明的胜肽或疫苗可藉由噴霧器等的噴霧劑型式被方便地輸送。在一些態樣中，該活性成分較佳為被微粒化而可在投與乾粉末配製物時實質上將全部的活性成分吸入肺內，因而該活性成分較佳為具有低於 100 微米、較佳為低於 20 微米，以及最佳為在 1 至 10 微米範圍內的粒徑。在一具體實施例中，一或多種的胜肽或疫苗被包裝入可經由例如鼻腔噴劑或吸入器的吸入法輸送預設及有效量胜肽的裝置內。

亦可藉由經黏膜或經皮進行全身性投藥。就經黏膜或

經皮投藥而言，配製物內可使用適合滲透載劑的滲透劑。此類滲透劑通常已為技術中所習知，以及包括例如用於經黏膜投藥的清潔劑、膽鹽及褐黴酸(fusidic)衍生物。可透過使用鼻內噴霧或栓劑完成經黏膜的投藥。就經皮投藥而言，該活性化合物被配製成技術中所習知的藥膏、油膏、凝膠或乳霜。該化合物亦可被製備成栓劑(例如與習知的栓劑基質如可可脂和其他甘油脂)或用於直腸輸送的滯留灌腸劑。

根據實施例，利用可保護該化合物避免迅速從體內被清除的載劑製備該活性化合物例如一控釋配製物包括植入物及微膠囊化輸送系統。可使用生物可分解、生物相容性聚合物例如乙烯醋酸乙酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯，及聚乳酸。熟習本領域之技術者將瞭解此類配製物的製備方法。該材料可從市面上購自 Alza 公司及 Nova 製藥公司。亦可使用微脂粒懸浮劑(包括靶向感染細胞之具有單株抗體對細胞特異性抗原的脂質體)用作為醫藥上可接受載劑。其製備可根據本領域技術者所熟知的方法，例如述於美國專利案號 4,522,811，藉由引述將其併入於此。

口服或腸道外組合物較佳為被配製成單位劑型以便於投藥及劑量的一致性。此處單位劑型指適合用於被治療生物體作為單一劑量的實體上分開單位；各單位含有一預設量以及併用所需醫藥載劑以產生所欲治療效應的活性化合物。

熟習本領域之技術者將瞭解此處所述的治療包括預防以及已形成之感染或症狀的治療。可治療性或預防性地投與本發明所揭示的胜肽和疫苗。治療較佳為開始於感染或在該哺乳動物暴露於能造成呼吸道病毒感染之病毒時或之前，以及持續直至病毒不再出現或活動於呼吸道內為止。然而，該治療亦可開始於感染後、在該哺乳動物暴露於能

造成呼吸道病毒感染之病毒後，或已形成感染症狀之後。

將可進一步瞭解用於治療或預防流感之本發明抗病毒肽數量不僅視所選擇特定胜肽亦仍需視投藥途徑、被治療疾病的性質以及該病人的年齡和狀況而定，並且最後決定於巡診醫生或獸醫的判斷。然而一般而言，適當劑量的範圍為每天每公斤體重在約 0.01 至 750 毫克/公斤，較佳為在 0.1 至 100 毫克/公斤/天的範圍，以及最佳為在 0.5 至 25 毫克/公斤/天的範圍。

該胜肽或疫苗的投藥可方便地利用單位劑型，例如每單位劑型含有 10 至 1500 毫克，更佳為 20 至 1000 毫克，最佳為 50 至 700 毫克的活性成分，例如 1 毫克/公斤即 75 毫克/75 公斤體重。

疫苗內所含各流感病毒株的免疫原濃度係可誘發免疫反應而無明顯副作用的數量。此數量將視所使用免疫原和其類型以及含於疫苗內的佐劑肽數量而不同。通常，當藉由 SRD 測定時疫苗內所含免疫原的數量係每毫升從約 1 至約 1000 微克，更佳為每毫升從約 3 至約 300 微克以及最佳為每毫升從約 10 至約 15 微克。在初次免疫之後，生物體可在其後的適當間隔時間接受一或數次的加強免疫。

可在細胞培養或實驗動物內依照標準藥學程序測定此類組合物的毒性和治療效率，例如測定其 LD_{50} (族群中 50% 致死的劑量) 和 ED_{50} (族群中 50% 產生治療效應的劑量)。毒性和治療效應之間的劑量比為其治療指數以及其可被表示為 LD_{50}/ED_{50} 比。較佳為使用具有高治療指數的化合物。雖然可使用具有毒性副作用的化合物，但是必需小心選擇僅靶向不損傷未感染細胞位置之化合物因而可降低該副作用的輸送系統。

配製用於人類的系列範圍劑量可利用獲得自細胞培養檢測法及動物試驗的資料。此類化合物的劑量較佳為在極

低或無毒性 ED_{50} 的循環濃度範圍內。該劑量視所使用的劑型及投藥途徑可在該範圍內。就用於本發明方法的任何化合物而言，可從細胞培養檢測法初步測定該治療有效劑量。一劑量可被配製於動物模式內以達到包括在細胞培養內測定之 IC_{50} (即達到半最大抑制症狀的受測化合物濃度) 的一循環血漿濃度範圍。此類資料可被用以更準確地測定人類中的有效劑量。可測定血漿中濃度，例如利用高效液態層析法。

如此處所定義，該活性化合物的治療有效量(即一有效劑量)可在從約 0.001 至 100 克/公斤體重的範圍，或顯而易見及無不當實驗下技術者所瞭解的其他範圍。熟練之技士將瞭解某些因素可能影響有效治療一生物體所需的劑量和時間，包括但不侷限於該疾病或障礙的嚴重度、先前療法、該生物體的健康狀態或年齡，以及其他存在的疾病。

在無意圖限制本發明的範圍之下，下列為根據本發明具體實施例的範例儀器、設備、方法及其相關結果。注意，為了讀者的方便標題或副標題可被用於實例中，但是其非為限制本發明的範圍。此外，此處已建議和揭示某些理論；然而，在不考慮任何特定理論或行動方案之下祇要本發明係根據本發明而執行時其不論對錯與否不應限制本發明的範圍。

實施例 1：構建用於 HA 表現的基因

流感 H5N1 HA 序列係來自共有序列 H5、CHA5 (Chen MW 等人 (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 : 13538~13543)。藉由利用人類密碼子最佳化用於表現 CHA5 的密碼子。原始病毒蛋白酶切割位點 PQRERRRK KRG 被突變成 PQRERG 以避免蛋白被酵素切割形成 HA I 和 HA2。在 HA 構體的 C 端以附加殘基 (LVPRGSPGSGYIPEAPRDGOAYVRKDGGEWV)

LLSTFLGHHHHHH)取代該跨膜區(殘基：533~555)，斜體字為該凝血酶的切割點，劃底線者為噬菌體 T4 fibrin-foldon 三聚合序列，以及粗體字者為 His-標籤 (Stevens J.等人(2006) *Science* 312:404~410)。經修飾 HA 序列被選殖入 pTT 載體以供蛋白表現(Durocher Y 等人(2002)*Nucleic Acids Res.* 30:E9)。

實施例 2：蛋白的表現和純化

藉由利用乙烯亞胺以及被培養於補充以 0.5%胎牛血清的 Freestyle 293 表現培養基(Invitrogen 公司加州 Carlsbad 市)內將編碼分泌型 HA 的質體轉染入 HEK293 EBNA(ATCC 編號 CRL-10852)或 GnTI-HEK293S 細胞的人類胚胎腎細胞株(Reeves PJ 等人(2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13419~13424)。轉染 72 小時之後收集上清液以及藉由離心使其澄清。利用如先前所述的鎳螯合層析法純化 HA 蛋白(Wei CJ 等人(2008) *J. Virol.* 82:6200~6208)以獲得完全糖基化 HA_{fg} 及高甘露糖型 HA_{hm}。為獲得未經唾液酸修飾的 HA 蛋白—該去唾液酸 HA_{ds}—以 20 毫克分子梭菌神經胺酸酶(NA; Sigma)在 37°C 將該純化蛋白處理 2 小時。於 NA 處理之後，再一次純化該蛋白而從 NA 被分離。以 Endo H(NEB)在 37°C 將該純化 HA_{hm} 處理 2 小時以產生在糖基化位點具有單一 GlcNAc 的 HA 蛋白，即為單糖基化 HA_{mg}。以 SDS PAGE、聚糖晶片以及質譜法(MS)分析全部的純化 HA 蛋白。

實施例 3：從糖蛋白釋出用於 MS 分析的 N-聚糖

以 10 毫克分子二硫代蘇糖醇(DTT; Sigma)在 37°C 將該純化 HA 糖蛋白還原 1 小時。以 50 毫克分子碘乙醯胺(IAA; Merck)在黑暗中將該還原樣本烷基化 1 小時以及藉由雙蒸餾(ddH₂O)被脫鹽，然後在旋轉乾燥機內進行乾燥。首先以胰蛋白酶(Roche)於 50 毫克分子碳酸氫銨的 pH 8.3 緩衝液內以 1:20(重量/重量)適當酵素對蛋白比例在 37°C

將該經還原和烷基化 HA 蛋白萃取物消化 4 小時，接著再以第二胰蛋白酶(Roche)消化，然後裝載於反向 C18 層析管柱(Waters 公司)上。以 N-糖苷酶 F(Roche)於 50 毫克分子的 pH 8.3 碳酸氫銨內在 37°C 進一步將該樣本培養 16 小時，然後以兩倍的 N-糖苷酶 F 培養。藉由 C18 層析管柱程序將從含有 N-聚糖之胜肽/糖肽所分離的釋出 N-聚糖收集流通部分於 5%醋酸(AcOH)內。以 5% AcOH 於 20%、40%和 60% 1-丙醇內透析該胜肽。

實施例 4：MALDI-MS 和 MS/MS 分析

利用 NaOH/二甲亞砜漿法過甲基化全部的聚糖樣本。在旋蓋玻璃瓶內將 NaOH/DMSO 漿混合乾燥聚糖樣本然後瓶內加入 300 微升碘甲烷(Merck)，以及將玻璃瓶輕微振盪 25 分鐘。藉由逐滴加入~1 毫升 ddH₂O 終止該反應，然後加入等量的氯仿。將過甲基化聚糖萃取入底部有機層及藉由 ddH₂O 重複萃取移除額外 NaOH 和其他親水性污染物。藉由氮氣蒸發氯仿。就聚糖圖譜而言，在乙腈內以 1:1 比例混合過甲基化聚糖與 10 毫克/毫升之 50%乙腈內的 2,5-二羥基苯甲酸(DHB)，噴滴於加熱標靶板上，及以乙腈再結晶於板上。於反射模式操作的 ABI 4700 蛋白質分析儀(Applied Biosystems)上取得所需的資料。射出雷射(5 赫；每頻譜發射 10 次)累積至當結合及穩定時達到滿意的訊噪比。在 TOF/TOF 儀器上，人工獲得高能量 CID MS/MS 資料以及一般包含在 5000~5500 設定雷射能之總共 125 次射注雷射的 40 次頻譜。

實施例 5：聚糖晶片的製造

以化學方法製備 24 種用於 HAs 的含唾液酸聚糖，以及用於製造晶片。從一 384-孔平板於塗佈 NHS 玻片(Nexterion H 玻片；南美 SCHOTT 公司)上藉由自動鍍(SMP3；TeleChem 國際公司)沈積~0.7 奈升之各種濃度含胺聚糖於點樣溶液



(300 毫莫耳磷酸鹽緩衝液；pH 8.5；含 0.005% Tween 20) 內進行晶片的印刷(BioDot；Cartesian 科技公司)。該用於唾液酸糖苷的玻片從各行具有 12 重複以水平放置於各次陣列內的底至頂部沾有 100 微克分子濃度的其一聚糖 1~17 和 21~27，以及各玻片被設計成可進行其他培養試驗的 16 網格。使印製玻片在 80%濕度的大氣下反應一小時接著乾燥隔夜，以及在使用前將其儲存於室溫下的防潮箱內。在結合試驗之前，以乙醇胺(50 毫克分子乙醇胺於 pH 9.2 的硼酸鹽緩衝液內)阻斷這些玻片然後以水和 pH 7.4 的 PBS 緩衝液清洗兩次。

實施例 6：標示以 Cy3-NHS 酯的血球凝集素

以 PBS(pH=7.4)將各 HA 蛋白樣本稀釋至 1 毫克/毫升的終濃度，然後標示以 Cy3Mono NHS 酯(5 微升，0.2 毫克/毫升)(GE Healthcare，英國)。反應於冰上進行 18 小時之後，各試管內加入 20 微升的 PBS 內 500 毫克分子甘胺酸以冷卻該反應。然後於冰上將該溶液再培養 30 分鐘。藉由將各溶液通過具有 30 仟道耳頓切割分子量的尺寸排阻旋轉過濾器(Microcon YM-30；Milipore 公司美國)移除未反應染料分子。為了獲得染料/蛋白質的比例，藉由利用 NanoDrop ND-100 分光光度計(美國 NanoDrop 科技公司)以用於在 280 奈米(蛋白質)及在 552 奈米(Cy3；莫耳消光係數為在此波長的 $150,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)雙吸光測量的 PBS 稀釋標示蛋白的各樣本。校正 280 奈米之 CyDye 吸光度(約 8%在 552 奈米的吸光度)的計算之後，從雙吸收測量的結果產生染料/蛋白質的比例。

實施例 7：間接結合試驗

於 0.005% Tween 20/PBS 的 pH 7.4 緩衝液內製備 HA 糖基化變體，以及加入以蓋玻片覆蓋聚糖晶片上的網格。在加濕盒內振盪培養 1 小時之後，以 0.005% Tween 20/PBS

的 pH 7.4 緩衝液將該玻片清洗三次。接著，將兔抗-H5N1 HA 抗體加至該玻片並且在加濕盒內培養 1 小時。在以 0.005% Tween 20/PBS 緩衝液清洗三次之後，將 Cy3-共軛山羊抗兔 IgG 抗體加至該玻片並且在加濕盒內再培養 1 小時。以 0.05% Tween 20/PBS 的 pH 7.4 緩衝液將該玻片清洗三次；以 PBS 緩衝液清洗三次；及以水洗清三次，然後乾燥。以微陣列螢光晶片判讀器(GenePix Pro 6.0；Molecular Devices 公司)在 595 奈米(Cy3)掃描該玻片。

實施例 8：直接結合試驗

於 0.005% Tween 20/PBS 緩衝液(pH 7.4)內製備 HA 糖基化 Cy3-標示 HA 蛋白，以及加入以蓋玻片覆蓋聚糖晶片上的網格。在加濕盒內振盪培養 1 小時之後，以 0.005% Tween 20/PBS 緩衝液(pH 7.4)將該玻片清洗三次；以 PBS 緩衝液(pH 7.4)清洗三次；及以水洗清三次，然後乾燥。以微陣列螢光晶片判讀器(GenePix Pro 6.0；美國 Molecular Devices 公司)在 595 奈米(Cy3)掃描該玻片。

實施例 9：微量中和檢測法

以半數組織培養感染劑量(TCID₅₀)定量該新鮮製備 H5N1(NIBRG-14)病毒(英國 Potters Bar 市國家生物製品檢定所)。在 96-孔平板內以等量混合 100 倍 TCID₅₀ 的病毒與 2 倍序列稀釋的血清儲備液，以及在 37°C 培養 1 小時。將該混合物置於平板的 MDCK 細胞(每孔內含有 1.5×10^4 個細胞)上，然後在 37°C 培養 16~20 小時。以 PBS 清洗該細胞，於丙酮/甲醇溶液(1:1 的體積/體積)內固定，及以 5% 脫脂乳阻斷。以抗流感 ANP(Sui JH 等人(2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:265~273)的 mAb 藉由間接 ELISA 偵測該病毒抗原。

實施例 10：小鼠、接種及攻毒

雌性 6 至 8 週齡 BALB/c 小鼠(數目=15)在第 0 和 2 週以肌肉內免疫於 50 微升 pH 7.4 之 PBS 及混合 50 微升之 1

毫克/毫升氫氧化鋁(Alum; Sigma 公司)內的 20 微克純化 HA_{fg} 或 HA_{mg} 蛋白。在免疫後第 14 天收集血液，及收集各小鼠的血清樣本。以基因改造 H5N1 病毒 NIBRG-14 經由鼻腔刺激以致死劑量(100 倍的 50%小鼠致死劑量)免疫該經免疫小鼠。刺激後 14 天期間每天監控該小鼠的存活率。利用中央研究院委員會的動物實驗管理小組評估全部動物實驗。

實施例 11：血球凝集素(HA)檢測

如 Jones 等人 *J. of Virology* 80(24): 11960~11967 (2006) 中所述，在圓底 96-孔微滴定盤內藉由 PBS 內病毒樣本的兩倍稀釋製備雞紅血球的血球凝集素(cRBCs; Lampire 生物實驗室，賓州 Pipersville 市)。以每 50 微升(HAU/50 微升)樣本的血球凝集素單位表示其力價。

實施例 12：病毒血球凝集素的純化

改良如 Johansson 等人 *J. of Virology*; 1989 第 63(3)卷第 1239~1246 頁中所述從流感病毒顆粒純化病毒粒子相關血球凝集素(HA)。簡言之，從感染雞蛋的尿囊液及如上述純化的蔗糖收集病毒。將病毒粒再懸浮於 0.5 毫升的醋酸鈉緩衝液(0.05 克分子醋酸鈉、2 毫克分子 CaCl₂、0.2 毫克分子 EDTA，至 pH 7.0)內，通過 18 號針頭均質化，以及混合等量的醋酸鈉緩衝液內 15%辛烷基葡糖苷(辛基-β-d-硫代葡萄糖苷; Fisher 科技公司，喬治亞州 Norcross 市)，接著激烈攪拌 5 分鐘。該懸浮液在 4°C 以 18,400 xg 離心 60 分鐘，然後小心地移除上清液及保留富含 HA 部分。將 2%含水鯨蠟基三甲基溴化銨(CTAB, Bio-World, 俄亥俄州 Dublin 市)加入該 HA 部分至 0.1% CTAB 的終濃度，以及將該樣本放置於以含 0.1%辛烷基葡糖苷之 0.05 克分子 Tris-鹽酸(pH 7.5)預膨脹及平衡的 DEAE-葡聚糖凝膠(A-50; 瑞典 Uppsala 市 GE Healthcare 公司)離子交換管柱(床，0.7x6.0 釐米)。藉由

具有低鹽 HA 沖提液(0.05 克分子 Tris-HCl、0.1 克分子 NaCl、0.1% Triton X-100，至 pH 7.5)以及再一次以高鹽 HA 沖提液的重力收集 20 個 0.5 毫升餾分物。藉由在非還原條件下的 SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳法接著藉由膠態考馬斯藍染色法檢測個別餾分物的 HA 活性及分析純度。根據製造商的指示藉由 BCA 檢測法測定蛋白質的濃度(伊利諾州 Rockford 市 Pierce 公司)。

實施例 13：晶片數據分析

使用 GenePix Pro 軟體(Axon 儀器公司)於擷取數據的螢光分析。從信號的各觀察點減去局部背景。從分析中去除 <100 之明顯缺陷、無可偵測信號或淨螢光的觀察點。從重複觀察點平均相同晶片內的"比值中數"。相同晶片於相同條件下進行 HA 結合至晶片的分析(第 2A 圖)以及相關常數的測定(第 2B 圖)以確保數據的常態化。

為測定 $K_{D,surf}$ 值，利用布售非線性回歸程式 Grad Pad PRISM(Graph-Pad)，假設配體結合至一或兩個獨立位點，藉由適配該數據至朗繆爾等溫(方程式 1)分析該平衡結合資料。

一種測量表面活性糖類數量的 F_{max} 係其最大的螢光強度；(P)係總 HA 蛋白濃度，以及 $K_{D,surf}$ 係表面糖類與該蛋白之間的平衡解離常數。

重複測量各樣本的 $K_{D,surf}$ 值以及至少計算 4 次以獲得 $K_{D,surf}$ 的平均值。藉由利用 $K_{D,surf}$ 值，從下列方程式(2)和(3)可獲得其熱力學參數。

$$F_{obs} = F_{max}(P)/(K_{D,surf} + (P)) \quad \{\text{方程式 1}\}$$

$$K_{D,surf} = K_{A,surf}^{-1} \quad \{\text{方程式 2}\}$$

$$\Delta G_{multi} = RT \ln(K_{A,surf}) \quad \{\text{方程式 1}\}$$

$K_{A,surf}$ 代表方程式(1)中的結合常數。方程式(2)中， $R=1.987\text{cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ ； T 為絕對溫度，以及在 298 K 之下進行該試驗。藉由利用微軟優算程式計算各樣本的這些值。藉由單因子變異數分析 (ANOVA) 利用 GraphPad PRISM(GraphPad)進行不同 HA 糖型之 $K_{D,surf}$ 的統計分析。

實施例 14：藉由 ELISA 測定血清內的 HA-特異性抗體

從 HEK293 純化 HA 蛋白以及於 96-孔平板(5 微克/毫升)上塗佈隔夜。將小鼠血清 100 倍稀釋以作為用於 HA 結合測定的儲備血清。該塗佈 HA 平板與 2 倍系列稀釋的血清培養 1 小時。藉由利用 HRP-共軛抗小鼠抗體偵測 HA-特異性 IgG。藉由選擇其讀取值高於免疫前 1:50 稀釋血清的稀釋值計算其稀釋終點(Stevens J 等人(2006) *Science* 312: 404~410)。藉由 LTK 生物實驗室製備來自兔的抗血清。藉由混合完全或不完全佐劑之約 0.25~0.35 毫克的 HA 蛋白免疫兔子。在六次免疫之後從該兔子收集血液，其程序為每 2 週免疫一次。

實施例 15：HA 的糖基化位點分析

來自 H1、H3 和 H5 流感病毒的總共 297 株全長 HA 序列係調用自美國國家生物技術中心(NCBI)資料庫以及藉由 EMBL-EBI 的 ClustalW2 程式進行比對(Larkin MA 等人(2007) *Bioinformatics* 23: 2947~2948)。該序列數據係來自 1918 至 2000 年代以及係分離自人類。為減少冗餘，在一國家內僅選定一次用於分析的病毒株。用於比對的序列包括：H1(AAX56530、AAY78939、ABA18037、ABB51962、ABC42750、ABD60867、ABD62061、ABE11690、ABF47869、ABF82830、ABF82852、ABG37362、ABI19015、ABI21211、ABI95294、ABI96103、ABK39995、ABK57092、ABK57093、ABK79970、ABO32948、

ABO32970、ABR15885、ABS71664 和 ABS76427)；H3(AAT08000、AAT12654、AAX11455、AAY58320、AAZ32943、AAZ43394、ABA26700、ABA26777、ABB51961、ABB71825、ABC42596、ABC42607、ABC42629、ABC43017、ABD15713、ABD59850、ABD61359、ABF17954、ABG37450 和 ABG37461)；H5(AAS65618、AAT39065、AAT73273、AAT73274、AAT73275、AAT84153、AAV32636、ABC72655、ABD28180、ABD28182、ABE97624、ABI16504、ABI36144、ABI36439、ABO10181、ABO36644 和 ABP51968)。藉由生物序列分析中心預測網(www.cbs.dtu.dk/services/)預測 N-連接糖基化 HA 序列。就天門冬胺酸(Asn)而言，含胺基酸模式 Asn-X_{aa}-(Ser/Thr)的序列，該 X_{aa} 可為除了脯胺酸之外的任何胺基酸(Gavel Y 等人(1990) *Protein Eng.* 3: 433~442)，繼之以絲胺酸或蘇胺酸。藉由利用 PRISM 程式(GraphPad)和 Jalview(Waterhouse AM 等人(2009) *Bioinformatics* 25: 1189~1191)製備資料分析的結果。

實施例 16：用於合成 HA 糖肽的化學方法

藉由二甲基硫磷酸混合酐法(Mpt-MA)進行 HA 糖肽的逐步合成(Inazu,T 等人(1997)於 1996 年 *肽化學*(Kitada, C 編輯)第 41~44 頁，蛋白研究基金會，大阪)。藉由用於 N-糖基化但無糖鏈之具有一共同序列"Asn-X- Ser/Thr"的硫酯法可合成 HA 糖蛋白。藉由利用供應 Boc 策略程式的自動化合成儀製備肽片段。藉由利用 DCC/HOBt 作為活化試劑進行偶合反應。藉由 Mpt-MA 法利用 Boc-Asn(GlcNAc)-OH(3 當量)偶合 Asn(GlcNAc)殘基。進行 1 小時的偶合反應然後在監控下再重複一次。以含 10% 苯甲

醚的無水 HF 處理之後進行 HPLC 純化，可獲得糖肽硫酯。此糖肽硫酯片段被偶合其他肽片段，其係藉由硫酯片段縮合法被分開製備。在去保護及形成雙硫鍵之後，可獲得 GlcNAc-HA 類似物。

或者，藉由肽基 Asn 之 β -羧基與糖基胺的偶合反應進行收斂法合成 HA 糖肽(請看 Cohen-Abisfeld, S.T. 和 Lansbury, P.T.(1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115: 10531~10537)。

實施例 17：用於合成 HA 糖肽的化學酵素法

藉由利用協同化學法的酵素法製備含複合寡糖的糖肽。利用內切- β -N-乙醯基葡萄糖胺酶(endo- β -Glc NAc-ase)的轉糖苷活性進行 N-糖肽的合成(Takegawa, K 等人(1995) *J. Biol. Chem.* 270: 3094~3099)。內切- β -N-乙醯基葡萄糖胺酶水解 N-連接寡糖之 N,N'-二乙醯幾丁二糖基團間的糖苷鍵，以及將釋出寡糖片段轉移至一羥基化合物。以兩步驟進行 endo- β -GlcNAc-ase 的 N-糖肽合成。首先，藉由化學途徑製備含 GlcNAc 肽。然後藉由 endo- β -GlcNAc-ase 的轉糖基化反應將糖基化供體的一寡糖片段轉移至作為糖基化受體的該糖肽之 GlcNAc 基團。

本發明雖然已於此處描述特定具體實施例以作為說明之目的，但是可進行各種的改良而不偏離本發明的精神及範圍。因此，本發明非僅侷限於申請專利範圍附件。

本發明雖然已配合其詳細描述做為說明，但是上述描述僅為說明之目的而並非限制本發明申請專利範圍附件內所界定的範圍。其他態樣、優點和修改仍屬於申請專利範圍附件的範圍內。

熟習本領域技術者均可取得此處引證之專利和科學文獻所建立的知識。藉由引述將全部引證的美國專利案和已公告或未公告美國專利申請案併入於此。

藉由併入於此以供參考的引述登錄號表示基因庫和 NCBI 的遞交號。於此藉由引述併入全部其他的公開文獻、文件、手稿和科學文獻。

本發明雖然特別顯示及說明於其參考的較佳具體例中，但是熟習本技藝者應瞭解其可有各種形式和細部的變化而 仍不偏離包含於本發明申請專利附件的精神和範圍。

【圖式簡單說明】

下列附圖構成本專利說明書的一部分以及被用於進一步說明本發明所揭示的某些態樣，配合此處所示特定具體實施例的詳細說明藉由參考一或多種這些附圖可更加瞭解本發明。本專利或申請文件含有至少一種以顏色區別的附圖。在被要求及繳清所需費用之下承辦人將提供含顏色附圖之此專利或專利申請公開案的副本。

第 1A~1C 圖為示意圖及具有不同糖基化 HA 的圓二色譜。(第 1A 圖)具有不同糖基化 HA 蛋白的四種變體： HA_{fg} ，HA(一種表現於 HEK293E 細胞內之具有典型複合型 N-聚糖的共有序列(Chen MW 等人(2008)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:13538~13543))； HA_{ds} ，造成從 HA_{fg} 移除唾液酸的經 NA 處理 HA； HA_{hm} ，表現於 GnTI-HEK293S 細胞內之具有高甘露糖型 N-聚糖的 HA；以及 HA_{mg} ，僅在其 N-糖基化位點具有 GlcNAc 的經內切 H 處理 HA(第 1B 圖)。具有附著至其 N-糖基化位點之代表不同 N-聚糖 HA_{fg} 、 HA_{ds} 、 HA_{hm} 和 HA_{mg} 的構造。產生灰色之具有蛋白資料庫識別碼 2FK0 (Viet04 HA)以及綠色之 N-連接聚糖的蛋白構造。

全部 N-聚糖被 GlyProt(Bohne-Lang A 等人(2005)*Nucleic Acids Res.* 33:W214~W219)所模型化，以及產生 PyMOL 的圖形(www.pymol.org)。(第 1C 圖) HA_{fg} 、 HA_{ds} 、 HA_{hm} 和 HA_{mg} 的圓二色譜證明具有類似次級結構的四種不同糖基化 HA 蛋白。

第 2A~2B 圖顯示具有不同糖基化 HA 的聚糖晶片分析。(第 2A 圖)為 HA 變體 HA_{fg} 、 HA_{ds} 、 HA_{hm} 和 HA_{mg} 的聚糖晶片分析。以顏色分類聚糖的相關鍵結，主要為 $17\alpha 2,3$ 唾液酸糖苷(黃)或 $7\alpha 2,6$ 唾液酸糖苷(藍)。晶片上聚糖的構造被示於第 2B 圖。以對應 $\alpha 2,3$ 唾液酸糖苷

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請

※申請案號：99109094

※申請日：99.3.26

※IPC 分類：

A61K	39/145	2006.01
A61K	39/155	2006.01
A61K	39/29	2006.01
A61K	39/21	2006.01
C07K	14/11	2006.01
C07K	14/135	2006.01
C07K	14/18	2006.01
C07K	14/155	2006.01
A61P	31/12	2006.01
A61P	31/14	2006.01
A61P	31/16	2006.01
A61P	31/18	2006.01

一、發明名稱：(中文/英文)

預防病毒的免疫方法及組合物

METHODS AND COMPOSITIONS FOR
IMMUNIZATION AGAINST VIRUS

二、中文發明摘要：

本發明提供含有用作為對抗病毒疫苗之部分糖基化病毒糖蛋白的免疫原性組合物。本發明係利用單-、雙-或三糖基化病毒表面糖蛋白及多肽配製的疫苗即使在不同株之間亦具有對抗病毒的強力和廣效保護作用。本發明揭示含有單糖基化血球凝集素多肽的醫藥組合物和其所產生的疫苗以及其用於預防或治療病毒感染的方法。本發明揭示用於流感病毒 HA、NA 和 M2，RSV 蛋白 F、G 和 SH，登革熱病毒糖蛋白 M 或 E，C 型肝炎病毒糖蛋白 E1 或 E2 以及 HIV 糖蛋白 gp120 和 gp41 的方法和組合物。

三、英文發明摘要：

Immunogenic compositions comprising partially glycosylated viral glycoproteins for use as vaccines against viruses are provided. Vaccines formulated using mono-, di-, or tri-glycosylated viral surface glycoproteins and polypeptides provide potent and broad protection against viruses, even across strains. Pharmaceutical compositions

comprising monoglycosylated hemagglutinin polypeptides and vaccines generated therefrom and methods of their use for prophylaxis or treatment of viral infections are disclosed. Methods and compositions are disclosed for influenza virus HA, NA and M2, RSV proteins F, G and SH, Dengue virus glycoproteins M or E, hepatitis C virus glycoprotein E1 or E2 and HIV glycoproteins gp120 and gp41.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (5) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

1~15 之 HA 變體的 $K_{A,surf}$ 值表示 HA 變體 HA_{fg} 、 HA_{ds} 、 HA_{hm} 和 HA_{mg} 的結合常數。

第 3 圖顯示布里斯本 H1；最近 HAs 之加州 H1、H3 和 H5；以及自從 2000 年之 H1、H3 和 H5 的序列比對分析。如圖 3 顯示，胺基酸序列為來自 H1N1 A/布里斯本/59/2007 的 HA (SEQ ID NO: 16)；來自 H1N1 A/加州/07/2009 的 HA (SEQ ID NO: 17)；來自 H5N1 A/越南/1203/2004 的 HA (SEQ ID NO: 18)；以及來自 H3N2A 布里斯本/10/2007 的 HA (SEQ ID NO: 19)。季節性流感 HA 係來自 A/布里斯本/59/2007。全球性流感 HA 係來自 A/加州/07/2009。H5 係來自 A/越南/1203/2004。H3 係來自 A 布里斯本/10/2007。H5 HA 上的 N-糖基化位點被示於紅色框內。該比對顯示 H1 和 H5 HAs 之間於其 N-糖基化位置具有類似性，反之 H3 則具有不同於 H1 和 H5 的低保留糖基化位置。

第 4A~4F 圖顯示歸因於糖或修飾對應不同糖基化 HAs 之 HA 聚糖相互作用的結合能。藉由減去指定參考聚糖之 ΔG 值(標示於紅色框內；請看表 S3)可獲得這些值。(第 4A 圖)聚糖 2、3、6 和 8~10 具有僅不同於非還原端第三糖之雙糖聚糖 1 的相同主鏈。計算 $\Delta\Delta G$ 值以證明改變第三糖的結合能差異。(第 4B 圖)聚糖 10~12 和 15 具有雙糖聚糖 8 但是不同線性延伸之糖構造或添加一分枝糖的相同主鏈。(第 4C 圖)聚糖 4 和 5 具有三糖聚糖 3 但是與非還原端不同分枝岩藻糖或第三位置上硫酸根的相同主鏈。(第 4D 圖)聚糖 6 和 7 不同於聚糖 7 非還原端之第三位置上的硫酸根。(第 4E 圖)聚糖 13 和 14 為具有不同內糖變化的 $\alpha 2,3$ 雙枝唾液酸糖苷。(第 4F 圖)聚糖 16 和 17 為極少或未結合至 HA 的 $\alpha 2,6$ 唾液酸糖苷(編號 21~27)。

第 5A~5D 圖顯示作為疫苗之 HA_{fg} 和 HA_{mg} 的比較。(第 5A 圖)利用 ELISA 分析來自 HA_{fg} 和 HA_{mg} 抗血清之間，以及各種 HAs 的結合。與 HA_{fg} 抗血清的比較中， HA_{mg} 抗血清顯示對 H5(越南 1194/2004 和 CHA5)有較佳的結合。此外，該 HA_{mg} 抗血清亦結合至 H1(加州 07/2009 和 WSN)。(第 5B 圖) H5N1(NIBRG-14)病毒與 HA_{fg} 和 HA_{mg} 抗血清的微量中和作用。與 HA_{fg} 抗血清的比較中， HA_{mg} 抗血清顯示對抗感染 MDCK 細胞的流感病毒具有較佳的中和活性($P < 0.0001$)。(第 5C 圖)對抗 H5N1 病毒之致死劑量攻毒的疫苗保護作用。各注射兩劑 HA_{fg} 、 HA_{mg} 和對照 PBS 的 HA 蛋白疫苗以免疫 BALB/c 小鼠。以致死劑量 H5N1 (NIBRG-14)病毒經鼻攻毒該經免疫小鼠。攻毒後，記錄 14 天的存活率。(第 5D 圖)藉由 ELISA 測定來自 HA_{mg} 之兔抗血清與不同 HAs 的結合力。對抗 HA_{mg} 之兔抗血清證明對 H5(CHAS 和越南/1194)具有強結合力。此外，亦觀察與 H5(安徽和 ID5/2005)和 H1(新喀里多尼亞/1999)的相互作用。

第 6A~6C 圖顯示 H5 HA 蛋白的構建、純化及凝膠過濾層析。(第 6A 圖)將編碼改變切割位點 HA 之胞外域的 DNA 選殖入哺乳動物表現載體、pTT(Durocher Y 等人(2002) Nucl. Acids Res. 30:E9)內，而使 HEK293 細胞培養有效分泌 HA 蛋白。HA 的原始蛋白酶切割位點被突變成 PQRERG 以避免 HA0 被處理成 HA1 和 HA2。為穩定 HA 蛋白的三聚體構型，其為噬菌體三聚合片段的"foldon"序列被轉殖入該質體構體內，以及 His-標籤亦被加入純化用的 COOH 端。藉由表現載體的瞬時轉染法進行 HA 蛋白的表現。(第 6B 圖)藉由 SDS/PAGE 分析該經純化 HA 蛋白。M 指示標記。第 1 行： HA_{fg} ，純化自 293E 細胞的 HA；第 2 行： HA_{ds} ，

被 HA 消化的 HA_{fg} ；第 3 行： HA_{hm} ，純化自 293S 細胞的 HA(Reeves PJ 等人(2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 13419~13424)；第 4 行： HA_{mg} ，被內切 H 消化的 HA_{hm} 。(第 6C 圖)藉由凝膠過濾層析法分析該經 HA 純化蛋白。洗提峰顯示在凝膠過濾之後該 HA_{fg} 三聚體 >200 kDa(紅色線)，該 HA_{ds} 三聚體 >200 kDa(黑色線)，該 HA_{hm} 三聚體 > 200 kDa(藍線)，以及該 HA_{mg} 三聚體 > 180 kDa(綠色線)。該圖形代表與蛋白標記貼合之 HA 蛋白的重疊洗提曲線(虛線)。

第 7A~7C 圖顯示來自不同 HA 蛋白之全甲基化 N-聚糖的質譜儀分析。來自不同 HA 蛋白之全甲基化 N-聚糖的 MS 分析。(第 7A 圖)MALDI-MS 譜顯示表現自 HEK293E 之 HA 的 N-聚糖如主波峰偵測和表 S1 列舉的註釋包含主要為核心海藻糖化、雙枝、三枝和四枝複合型 N-聚糖構造。根據組合物進行排列，其中僅少數進一步藉由 MS/MS 分析獲得證實。各種程度的唾液酸化為其主要特徵。(第 7B 圖)經 NA 的處理，無法再偵測出全部被指定為唾液酸化 N-聚糖的信號(例如 m/z 2605、3054、3503、3864、4226)，伴隨增加無唾液酸化三枝和四枝構造的信號強度(m/z 2693、3142)，此與唾液酸被完全移除相符合。(第 7C 圖)源自表現於 GnT $_{I\eta}$ -缺乏 HEK293S 株 HA 之 N-聚糖的 MALDI-MS 譜顯示主要為相當於在 m/z 1579 之 Man5GlcNAc2 的信號，以及於糖基化過程中被不完全修剪之高甘露糖型的 N-聚糖小波峰 (m/z 1783 至 2396；Hex6HexNAc2-Hex9HexNAc2)。

第 8A~8D 圖顯示 HA 變體的 MALDI-TOF 分析。 HA_{fg} 的分子量為 75186.343(第 8A 圖)， HA_{ds} 為 75290.023(第 8B 圖)， HA_{hm} 為 69314.645(第 8C 圖)，以

及 HA_{mg} 為 63314.761 (第 8D 圖)。

第 9 圖顯示 HA 三聚體之全甲基化 N-聚糖的 MALDI 譜中所觀察到的主要分子離子的配置。

第 10 圖顯示對應 α 2,3 唾液酸糖苷 1~15 之 HA 糖基化變體的 $\Delta\Delta G$ ，仟卡/莫耳。藉由從前者 HA 減去後者 HA 的 -G 值可獲得最左欄的部分(例如， $\Delta\Delta G(\text{HA}_{\text{fg}} \rightarrow \text{HA}_{\text{ds}}) = \Delta G(\text{HA}_{\text{ds}}) - \Delta G(\text{HA}_{\text{fg}})$)。ND 表示未被測定。

第 11 圖顯示對應 HA 變體之不同唾液酸糖苷配體間之結合游離能的差異。以 $\Delta\Delta G$ ，仟卡/莫耳表示其值。藉由從前者 HA 減去後者 HA 的 ΔG 值可獲得最左欄的部分(例如， $\Delta\Delta G(1 \rightarrow 2) = \Delta G(2) - \Delta G(1)$)。ND 表示未被測定。

第 12 圖顯示產生自完全糖基化、高甘露糖和單糖基化 H5 HA 之抗血清對抑制越南 1203HA 假型病毒轉導入 HEK 293 細胞內的能力。高甘露糖和單糖基化 HA 抗血清均可抑制病毒的侵入，但是完全糖基化 HA 抗血清則否。

第 13A~13B 圖顯示兔 HA_{fg} 和 HA_{mg} 抗血清之血球凝集分析的結果。第 13A 圖顯示對 H1、H3 和 H5 血球凝集分析中之完全糖基化共有 H5 HA 抗血清的結果。第 13B 圖顯示單糖基化 H5 HA 抗血清的結果。該單糖基化 H5 HA 抗血清不僅對 H5 亦對 H1 具有良好血球凝集抑制活性。兩者抗血清對 H3 的血球凝集均無影響。

第 14 圖顯示與 H3 相比(0.9Å 的均方根偏差(RMSD))H5 和 H1 的蛋白結構較為類似(2.5Å 的均方根偏差(RMSD))。

第 15A~15C 圖顯示利用單糖基化 H1(布里斯本)HA 作為抗原可產生抑制 NIBRG-121(2009 年大流行 A 型(H1N1)疫苗株)的抗血清。第 15A 圖顯示

NIBRG-121(2009 年大流行 A 型(H1N1)疫苗株)病毒對抑制紅血球凝集的能力。第 15B 圖顯示 NIBRG-121(2009 年大流行 A 型(H1N1)疫苗株)病毒對抑制感染 MDCK 細胞的能力。第 15C 圖顯示 BALB/c 小鼠對感染 NIBRG-121(2009 年大流行 A 型(H1N1)疫苗株)流感病毒的保護作用。所使用的抗血清係來自經布里斯本 HA 蛋白(5 微克)免疫的小鼠以及該用於攻毒的病毒係 NIBRG-121(100xLD₅₀)。

第 16A~16C 圖顯示產生自作為抗原之單糖基化 H1(布里斯本)HA 的抗血清對 WSN(H1N1)1933 的抑制作用。第 16A 圖顯示 WSN(H1N1)1933 病毒對抑制紅血球凝集的能力。第 16B 圖顯示 WSN(H1N1)1933 病毒對抑制感染 MDCK 細胞的能力。第 16C 圖顯示 BALB/c 小鼠對感染 WSN (H1N1)1933 流感病毒的保護作用。所使用的抗血清係來自經布里斯本 HA 蛋白(5 微克)免疫的小鼠以及該用於攻毒的病毒係 WSN(H1N1)1933(100xLD₅₀)。

第 17A~17C 圖顯示產生自作為抗原之單糖基化 H1(布里斯本)HA 的抗血清對 A/波多黎各/8/34(H1N1):PR8 的抑制作用。第 17A 圖顯示 PR8 病毒對抑制紅血球凝集的能力。第 17B 圖顯示 PR8 病毒對抑制感染 MDCK 細胞的能力。第 17C 圖顯示 BALB/c 小鼠對感染 PR8 流感病毒的保護作用。所使用的抗血清係來自經布里斯本 HA 蛋白(5 微克)免疫的小鼠以及該用於攻毒的病毒係 PR8(100x LD₅₀)。

第 18A~18B 圖顯示利用單糖基化 H1(2009 年大流行 A 型(H1N1)疫苗株；示於圖中的加州/2009)HA 作為抗原可產生抑制 WSN(H1N1)的抗血清。第 18A 圖顯示 WSN(H1N1)病毒對抑制紅血球凝集的能力。第 18B 圖

顯示 WSN(H1N1)病毒對抑制感染 MDCK 細胞的能力。

第 19 圖顯示 H1 HA 蛋白上糖基化位點的結構比較。

第 20 圖顯示完全糖基化型(第 20A 圖)和單糖基化型(第 20B 圖)的第 3 型登革熱病毒封套糖蛋白 E 雙聚體。產生自 GlyProt 服務網具有 4 個可能複合型 N-聚糖之 PDB 碼 1UZG 的模型。

第 21 圖顯示完全糖基化型(第 21A 圖)和單糖基化型(第 21B 圖)的人類免疫缺陷病毒封套糖蛋白 gp120 三聚體。產生自每單聚體具有 13 個可能複合型 N-聚糖之 PDB 碼 2BF1 的模型。

序列表

<110> 中央研究院
<120> 預防病毒的免疫方法及組合物
<130> OPK-50101US
<140> US 12/748,265
<141> 2010-03-26

<150> US 61/164,385
<151> 2009-03-27

<150> US 61/164,387
<151> 2009-03-28

<150> US 61/164,388
<151> 2009-03-28

<150> US 61/164,389
<151> 2009-03-28

<150> US 61/313,676
<151> 2010-03-12

<160> 19
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 1

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly
1 5 10

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 2

Pro Gln Arg Glu Arg Gly
1 5

<210> 3
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成

<400> 3

Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro
 1 5 10 15

Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu
 20 25 30

Ser Thr Phe Leu Gly His His His His His His
 35 40

<210> 4
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> A型流感病毒

<400> 4

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Ser His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

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

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Gln Arg Glu Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu
340 345 350

Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser
355 360 365

Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys
370 375 380

Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met
385 390 395 400

Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg
405 410 415

Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val
420 425 430

Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr
435 440 445

Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg
450 455 460

Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu
465 470 475 480

Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly
485 490 495

Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu
500 505 510

Glu Ile Ser Gly Val Asp Ile Arg Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Pro
515 520 525

Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val
530 535 540

Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu Gly His His
545 550 555 560

His His His His

<210> 5
 <211> 1695
 <212> DNA
 <213> A型流感病毒

<400> 5
 atggagaaga tcgtgctgct gttcgccatc gtgagcctgg tgaagagcga ccagatctgc 60
 atcggatccc acgccaacaa cagcaccgag caggtggaca ccatcatgga gaagaacgtg 120
 accgtgaccc acgcccagga catcctggag aagaccaca acggcaagct gtgcgacctg 180
 gacggcgtga agcctctgat cctgagagac tgcagcgtgg ccggctggct gctgggcaac 240
 cctatgtgcg acgagttcat caacgtgcct gagtggagct acatcgtgga gaaggccaac 300
 cctgccaacg acctgtgcta ccctggcgac ttcaacgact acgaggagct gaagcacctg 360
 ctgagcagaa tcaaccactt cgagaagatc cagatcatcc ctaagagcag ctggagcagc 420
 cacgaggcca gcagcggcgt gagcagcgcc tgcccttacc agggcaagag cagcttcttc 480
 agaaacgtgg tgtggctgat caagaagaac agcacctacc ctacatcaa gagaagctac 540
 aacaacacca accaggagga cctgctggtg ctgtggggca tccaccacc taacgacgcc 600
 gccgagcaga ccaagctgta ccagaaccct accacctaca tcagcgtggg caccagcacc 660
 ctgaaccaga gactggtgcc taagatcgcc accagaagca aggtgaacgg ccagagcggc 720
 agaatggagt tcttctggac catcctgaag cctaacgacg ccatcaactt cgagagcaac 780
 ggcaacttca tcgcccciga gtacgcctac aagatcgtga agaaggcgga cagcaccatc 840
 atgaagagcg agctggagta cggcaactgc aacaccaagt gccagacccc tatgggcgcc 900
 atcaacagca gcatgccttt ccacaacatc caccctctga ccatcggcga gtgccctaag 960
 tacgtgaaga gcaacagact ggtgctggcc accggcctga gaaacagccc tcagagagag 1020
 agaggcctgt tcggcgccat cgccggcttc atcgaggcg gctggcaggg catggtggac 1080
 ggctggtacg gctaccacca cagcaacgag cagggcagcg gctacgccgc cgacaaggag 1140
 agcaccaga aggccatcga cggcgtgacc aacaaggtga acagcatcat cgacaagatg 1200
 aacaccagat tcgaggccgt gggcagagag ttcaacaacc tggagagaag aatcgagaac 1260
 ctgaacaaga agatggagga cggcttcttg gacgtgtgga cctacaacgc cgagctgctg 1320
 gtgctgatgg agaacgagag aaccctggac ttccacgaca gcaacgtgaa gaacctgtac 1380
 gacaaggtga gactgcagct gagagacaac gccaaaggagc tgggcaacgg ctgcttcgag 1440

ttctaccaca agtgcgacaa cgagtgcattg gagagcgtga gaaacggcac ctacgactac 1500
cctcagtaca gcgaggaggc cagactgaag agagaggaga tcagcggcgt ggatatcaga 1560
tctctggtgc caagaggatc tccaggatct ggatacatcc cagaggctcc aagagatgga 1620
caagcttacg tgagaaagga cggagagtgg gtgctgctgt ctactttcct gggacaccac 1680
caccaccacc actaa 1695

<210> 6
<211> 567
<212> PRT
<213> A型流感病毒

<400> 6

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
50 55 60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
130 135 140

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
145 150 155 160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
180 185 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
210 215 220

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225 230 235 240

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
260 265 270

Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
290 295 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
325 330 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
420 425 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
500 505 510

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Asp Ile Arg Ser Leu Val Pro Arg
515 520 525

Gly Ser Pro Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln
530 535 540

Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
545 550 555 560

Gly His His His His His His
565

<210> 7
<211> 1720
<212> DNA
<213> A型流感病毒

<400> 7
atggcgcgcc gctagcatga aggccatcct gggtgtgctg ctgtacacct tcgctaccgc 60
caacgccgat accctgtgca tcggctacca cgccaacaac agcaccgaca ccgtggatac 120
第 8 頁

cgctgtggaa aagaacgtga ccgtgaccca cagcgtgaac ctgctggaag ataagcacia	180
cggcaagctg tgcaagctga gaggcgtggc ccctctgcac ctgggcaagt gcaatatcg	240
cggctggatc ctgggcaacc ccgagtgcga gagcctgagc accgccagca gctggtccta	300
catcgtggag acacccagca gcgacaatgg cacctgttac cccggcgact tcatcgacta	360
cgaggaactg cgggagcagc tgagcagcgt gtccagcttc gagcggttcg agatcttccc	420
caagaccagc tcttggccca accacgacag caacaagggc gtgaccgccg cctgtcctca	480
cgctggcgcc aagagcttct acaagaacct gatctggctg gtcaagaagg gcaacagcta	540
cccaaactg agcaagagct acatcaacga caagggcaaa gaagtgtctg tgctgtgggg	600
catccaccac cctagcacca gcgccgacca gcagagcctg taccagaacg ccgacgccta	660
cggtgttcgtg ggcagcagcc ggtacagcaa gaagtccaag cccgagatcg ccatcagacc	720
caaagtgcgg gaccaagagg gccggatgaa ctactactgg accctgggtg agcccggcga	780
caagatcacc ttcgaggcca ccggcaatct ggtcgtgccc agatacgct tgcctatgga	840
aagaaacgcc ggcagcggca tcatcatcag cgacaccccc gtgcacgact gcaacaccac	900
ctgtcagacc ccaaaggcg ccatcaacac cagcctgccc ttccagaaca tccaccccat	960
caccatcggc aagtgcccta agtacgtgaa gtctaccaag ctgaggctgg ccacaggcct	1020
gcggaacatc ccagcatcc agagcagagg cctgtttggc gccattgccg gctttatcga	1080
gggcggctgg accggaatgg tggatggatg gtatggctac caccaccaga atgagcaggg	1140
aagcggctac gccgccgacc tgaagtccac acagaacgcc atcgacgaga tcaccaacaa	1200
agtgaactca gtgatcgaga agatgaacac ccagttcacc gccgtgggca aagaattcaa	1260
ccacctggaa aagcggatcg agaacctgaa caagaaggtg gacgacggct tcctggacat	1320
ctggacctac aacgccgagc tgctcgtgct gctggaaaac gagcggaccc tggactacca	1380
cgactccaac gtgaagaatc tgtacgagaa agttcgctcc cagctgaaga acaacgcca	1440
agagatcggc aacggctgct tcgagttcta ccacaagtgc gacaacacct gtatggaaag	1500
cgtgaagaac ggcacctacg actaccccaa gtacagcgag gaagccaagc tgaaccggga	1560
agagatcgac ggcgtggata tcagatctct ggtgccaaga ggatctccag gatctggata	1620
catcccagag gctccaagag atggacaagc ttacgtgaga aaggacggag agtgggtgct	1680
gctgtctact ttctgggac accaccacca ccaccactaa	1720

<211> 567
 <212> PRT
 <213> A型流感病毒

<400> 8

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
 1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
 20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
 35 40 45

Leu Leu Glu Asp Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
 50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
 65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
 85 90 95

Val Glu Thr Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Tyr Phe
 100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
 115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
 130 135 140

Val Thr Lys Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Lys Ser Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro
 165 170 175

Asn Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val
 180 185 190

Leu Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asp Gln Arg Ala Leu
 195 200 205

Tyr His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser
210 215 220

Arg Arg Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225 230 235 240

Glu Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr
245 250 255

Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe
260 265 270

Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Thr Ser Asn Ala Pro
275 280 285

Met Asp Glu Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn
290 295 300

Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Arg Ser Thr Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg
325 330 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys
405 410 415

Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
420 425 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
450 455 460

Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
500 505 510

Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Asp Ile Arg Ser Leu Val Pro Arg
515 520 525

Gly Ser Pro Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln
530 535 540

Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
545 550 555 560

Gly His His His His His His
565

<210> 9
<211> 1704
<212> DNA
<213> A型流感病毒

<400> 9
atgaaggtga aactgctggt gctgctgtgc accttcaccg ccacctacgc cgacaccatc 60
tgcacgggct accacgccaa caacagcacc gacaccgtgg ataccgtgct ggaaaagaac 120
gtgaccgtga cccacagcgt gaacctgctg gaagatagcc acaacggcaa gctgtgcctg 180
ctgaagggca ttgccccct gcagctgggc aactgtagcg tggccggctg gattctgggc 240
aaccccgagt gcgagctgct gatcagcaaa gagtcctggt cctacatcgt ggagacaccc 300
aaccccgaga acggcacctg ttaccccggc tacttcgccg actacgagga actgagagag 360
cagctgtcct ctgtctccag cttcgagcgg ttcgagatct tcccaaaga gagcagctgg 420
cccaaccaca ccgtgacaaa gggcgtgagc gccagctgct ccacaatgg caagagcagc 480

ttctaccgga acctgctgtg gctgaccggc aagaacggcc tgtaccccaa cctgagcaag 540
agctatgcca acaacaaaga gaaagaggtc ctcgtcctct ggggcggtgca ccaccccccc 600
aacatcggcg accagcgggc cctgtaccac accgagaacg cctacgtgtc cgtgggtgtcc 660
agccactaca gcagacgggt ccccccgag atcgccaaga ggcccaaagt gcgggaccag 720
gaaggccgga tcaactacta ctggaccctg ctggaaccgc gcgacaccat catcttcgag 780
gccaacggca acctgatcgc cccagatac gcctttgccc tgagcagagg cttcggcagc 840
ggcatcatca ccagcaacgc ccccatggac gagtgcgacg ccaagtgtca gacccccag 900
ggcgccatca acagcagcct gcccttccag aacgtgcacc ccgtgacat cggcgagtgc 960
cctaagtacg tgcggagcac caagctgaga atggtgaccg gcctgcggaa catccccagc 1020
atccagagca gaggcctgtt tggcgccatt gccggcttta tcgagggcgg ctggaccgga 1080
atggtggacg ggtggtacgg ctaccaccac cagaatgagc agggcagcgg ctacgccgcc 1140
gatcagaagt ccaccagaa cgctatcaac ggcatcacca acaaagtga cagcgtgatc 1200
gagaagatga acaccagtt caccgccgtg ggcaaagagt tcaacaagct ggaacggcgg 1260
atggaaaacc tgaacaagaa ggtggacgac ggcttccttg acatctggac ctacaacgcc 1320
gagctgctgg tcctgctgga aaacgagcgg accctggact tccacgacag caacgtgaag 1380
aacctgtacg agaaagtga gtcccagctg aagaacaacg ccaaagagat cggcaacggc 1440
tgcttcgagt tctaccacaa gtgcaacgac gagtgcattg aaagcgtgaa gaacggcaca 1500
tacgactacc ccaagtacag cgaggaaagc aagctgaacc gggagaagat cgacggcgtg 1560
gatatcagat ctctggtgcc aagaggatct ccaggatctg gatacatccc agaggctcca 1620
agagatggac aagcttacgt gagaaaggac ggagagtggg tgctgctgtc tactttcctg 1680
ggacaccacc accaccacca ctaa 1704

<210> 10
<211> 567
<212> PRT
<213> A型流感病毒

<400> 10

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

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

Ile Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe
260 265 270

Ala Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro
275 280 285

Met Asp Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn
290 295 300

Ser Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys
305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg
325 330 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser
370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys
405 410 415

Leu Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
420 425 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
450 455 460

Lys Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu
500 505 510

Asn Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Asp Ile Arg Ser Leu Val Pro Arg
515 520 525

Gly Ser Pro Gly Ser Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln
530 535 540

Ala Tyr Val Arg Lys Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
545 550 555 560

Gly His His His His His His
565

<210> 11
<211> 1704
<212> DNA
<213> A型流感病毒

<400> 11
atgaaggtga aactgctggt gctgctgtgc accttcaccg ccacctacgc cgacaccatc 60
tgcacgggct accacgcca caacagcacc gacaccgtgg ataccgtgct ggaaaagaac 120
gtgaccgtga cccacagcgt gaacctgctg gaagatagcc acaacggcaa gctgtgcctg 180
ctgaagggca ttgccccct gcagctgggc aactgtagcg tggccggctg gattctgggc 240
aaccgaggt gcgagctgct gatctccaaa gagtcctggt cttacatcgt ggagacaccc 300
aaccgagaga acggcacctg ttaccccggc cacttcgccg actacgagga actgcgggag 360
cagctgagca gcgtgtccag cttcgagcgg ttcgagatct tcccaaaga gagcagctgg 420
cccaaccacg ataccgtgac cggcgtgagc gccagctgtt ccacaacgg cgagagcagc 480
ttctaccgga acctgctgtg gctgaccggc aagaacggcc tgtaccccaa cctgagcaag 540
agctatgcca acaacaaaga gaaggaagtc ctggtcctct ggggcgtgca ccaccccccc 600
aacatcggcg accagaaggc cctgtaccac accgagaacg cctacgtgtc cgtggtgtcc 660
agccactaca gccggaagtt ccccccgag atcgccaaga ggcccaaagt gcgggaccag 720
gaaggccgga tcaactacta ctggaccctg ctggaacccg gcgacacat catcttcgag 780
gccaacggca acctgatcgc cccagatac gcctttgccc tgagcagagg cttcggcagc 840

ggcatcatca acagcaacgc ccccatggac aagtgcgacg ccaagtgcc aacacccag 900
ggcgccatca acagctccct gcccttccag aacgtgcacc ccgtgacat cggcgagtg 960
cctaagtacg tgcggagcgc caagctgaga atggtgaccg gcctgcggaa catccccagc 1020
atccagagca gaggcctgtt tggcgccatt gccggcttta tcgagggcgg ctggaccgga 1080
atggtggacg ggtggtacgg ctaccaccac cagaatgagc agggcagcgg ctacgccgcc 1140
gatcagaagt ccacccagaa cgccatcaac ggcatcacca acaaagtga cagcgtgatc 1200
gagaagatga acacccagtt caccgccgtg ggcaaagagt tcaacaagct ggaacggcgg 1260
atggaaaacc tgaacaagaa ggtggacgac ggcttcctgg acatctggac ctacaacgcc 1320
gagctgctgg tgctgctgga aaacgagcgg accctggact tccacgacag caacgtgaag 1380
aacctgtacg agaaagtga gtcccagctg aagaacaacg ccaaagagat cggcaacggc 1440
tgcttcgagt tctaccacaa gtgcaacgac gagtgcattg aaagcgtga gaacggcaca 1500
tacgactacc ccaagtacag cgaggaaagc aagctgaacc gggagaagat cgacggcgtg 1560
gatatcagat ctctggtgcc aagaggatct ccaggatctg gatacatccc agaggctcca 1620
agagatggac aagcttacgt gagaaaggac ggagagtggg tgctgctgtc tactttcctg 1680
ggacaccacc accaccacca ctaa 1704

<210> 12
<211> 298
<212> PRT
<213> 人類呼吸道融合病毒

<400> 12

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Thr Lys Thr Leu Glu Lys Thr
1 5 10 15
Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys
20 25 30
Leu Asn Leu Lys Ser Ile Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
35 40 45
Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
50 55 60
Ala Asn His Lys Val Thr Leu Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr
65 70 75 80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln
85 90 95

Leu Gly Ile Ser Phe Ser Asn Leu Ser Glu Thr Thr Ser Gln Thr Thr
100 105 110

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Ser Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser
115 120 125

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Lys Ile Gln Pro Ser
130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn
145 150 155 160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ile
195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Leu Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu
210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Lys Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
225 230 235 240

Thr Asn Ile Arg Thr Thr Leu Leu Thr Asn Asn Thr Thr Gly Asn Pro
245 250 255

Glu His Thr Ser Gln Lys Gly Thr Leu His Ser Thr Ser Ser Asp Gly
260 265 270

Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Tyr Thr Thr Ser Glu Tyr Leu Ser Gln
275 280 285

Pro Pro Ser Pro Ser Asn Thr Thr Asn Gln
290 295

<210> 13
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> 登革熱病毒

<400> 13

Met Arg Cys Val Gly Ile Gly Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Ala Thr Trp Val Asp Val Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
 20 25 30

Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Ile Glu Leu Leu Lys Thr
 35 40 45

Glu Val Thr Asn Pro Ala Val Leu Arg Lys Leu Cys Ile Glu Ala Lys
 50 55 60

Ile Ser Asn Thr Thr Thr Asp Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Ala
 65 70 75 80

Thr Leu Val Glu Glu Gln Asp Ala Asn Phe Val Cys Arg Arg Thr Phe
 85 90 95

Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser
 100 105 110

Leu Leu Thr Cys Ala Lys Phe Lys Cys Val Thr Lys Leu Glu Gly Lys
 115 120 125

Ile Val Gln Tyr Glu Asn Leu Lys Tyr Ser Val Ile Val Thr Val His
 130 135 140

Thr Gly Asp Gln His Gln Val Gly Asn Glu Thr Thr Glu His Gly Thr
 145 150 155 160

Ile Ala Thr Ile Thr Pro Gln Ala Pro Met Ser Glu Ile Gln Leu Thr
 165 170 175

Asp Tyr Gly Ala Leu Thr Leu Asp Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 180 185 190

Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Thr Met Lys Glu Lys Ser Trp Leu Val
 第 19 頁

195	200	205
His Lys Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ser Gly Ala		
210	215	220
Ser Thr Ser Gln Glu Thr Trp Asn Arg Gln Asp Leu Leu Val Thr Phe		
225	230	235
Lys Thr Ala His Ala Lys Lys Gln Glu Val Val Val Leu Gly Ser Gln		
245	250	255
Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Thr		
260	265	270
Ser Gly Thr Thr Thr Ile Phe Ala Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys		
275	280	285
Met Asp Lys Leu Thr Leu Lys Gly Val Ser Tyr Val Met Cys Thr Gly		
290	295	300
Ser Phe Lys Leu Glu Lys Glu Val Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Val		
305	310	315
Leu Val Gln Val Lys Tyr Glu Gly Thr Asp Ala Pro Cys Lys Ile Pro		
325	330	335
Phe Ser Thr Gln Asp Glu Lys Gly Val Thr Gln Asn Gly Arg Leu Ile		
340	345	350
Thr Ala Asn Pro Ile Val Thr Asp Lys Glu Lys Pro Val Asn Ile Glu		
355	360	365
Thr Glu Pro Pro Phe Gly Glu Ser Tyr Ile Val Ile Gly Ala Gly Glu		
370	375	380
Lys Ala Leu Lys Leu Ser Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Lys		
385	390	395
Met Phe Glu Ala Thr Ala Arg Gly Ala Arg Arg Met Ala Ile Leu Gly		
405	410	415
Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Ala Phe Thr Ser Val		
420	425	430

Gly Lys Leu Val His Gln Val Phe Gly Thr Ala Tyr Gly Val Leu Phe
435 440 445

Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Gly Ile Gly Ile Leu Leu Thr
450 455 460

Trp Leu Gly Leu Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Met Thr Cys Ile
465 470 475 480

Ala Val Gly Met Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Val Val Gln Ala
485 490 495

<210> 14
<211> 192
<212> PRT
<213> C型肝炎病毒

<400> 14

Ala Glu Val Lys Asn Ile Ser Thr Gly Tyr Met Val Thr Asn Asp Cys
1 5 10 15

Thr Asn Asp Ser Ile Thr Trp Gln Leu Gln Ala Ala Val Leu His Val
20 25 30

Pro Gly Cys Val Pro Cys Glu Lys Val Gly Asn Thr Ser Arg Cys Trp
35 40 45

Ile Pro Val Ser Pro Asn Val Ala Val Gln Gln Pro Gly Ala Leu Thr
50 55 60

Gln Gly Leu Arg Thr His Ile Asp Met Val Val Met Ser Ala Thr Leu
65 70 75 80

Cys Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Gly Val Met Leu Ala
85 90 95

Ala Gln Met Phe Ile Val Ser Pro Gln His His Trp Phe Val Gln Asp
100 105 110

Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly Thr Ile Thr Gly His Arg Met Ala
115 120 125

Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Thr Met Ile Leu Ala
130 135 140

Tyr Ala Met Arg Val Pro Glu Val Ile Ile Asp Ile Ile Gly Gly Ala
145 150 155 160

His Trp Gly Val Met Phe Gly Leu Ala Tyr Phe Ser Met Gln Gly Ala
165 170 175

Trp Ala Lys Val Val Val Ile Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Asp Ala
180 185 190

<210> 15

<211> 478

<212> PRT

<213> 人類免疫不全病毒第1型

<400> 15

Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr
1 5 10 15

Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val
20 25 30

His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro
35 40 45

Gln Glu Val Val Leu Val Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys
50 55 60

Asn Asp Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp
65 70 75 80

Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Ser Leu
85 90 95

Lys Cys Thr Asp Leu Lys Asn Asp Thr Asn Thr Asn Ser Ser Ser Gly
100 105 110

Arg Met Ile Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile
115 120 125

Ser Thr Ser Ile Arg Gly Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe Tyr
130 135 140

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

Thr Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser
165 170 175

Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile
180 185 190

Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn
195 200 205

Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr
210 215 220

Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val Ile Arg
225 230 235 240

Ser Val Asn Phe Thr Asp Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn
245 250 255

Thr Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys
260 265 270

Arg Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly
275 280 285

Lys Ile Gly Asn Met Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys
290 295 300

Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln Ile Ala Ser Lys Leu Arg Glu Gln Phe
305 310 315 320

Gly Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro
325 330 335

Glu Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys
340 345 350

Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp Ser
355 360 365

Thr Glu Gly Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu Pro
370 375 380

Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys Ala
385 390 395 400

Met Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile
405 410 415

Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Asn Asn Glu Ser
420 425 430

Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser
435 440 445

Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala
450 455 460

Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg
465 470 475

<210> 16
<211> 565
<212> PRT
<213> A型流感病毒

<400> 16

Met Lys Val Lys Leu Leu Val Leu Leu Cys Thr Phe Thr Ala Thr Tyr
1 5 10 15

Ala Asp Thr Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asn Ser His Asn Gly Lys Leu Cys Leu Leu Lys Gly Ile
50 55 60

Ala Pro Leu Gln Leu Gly Asn Cys Ser Val Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Leu Leu Ile Ser Lys Glu Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Lys Pro Asn Pro Glu Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly His Phe
100 105 110

Ala Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Glu Ser Ser Trp Pro Asn His Thr
130 135 140

Val Thr Gly Val Ser Ala Ser Cys Ser His Asn Gly Glu Ser Ser Phe
145 150 155 160

Tyr Arg Asn Leu Leu Trp Leu Thr Gly Lys Asn Gly Leu Tyr Pro Asn
165 170 175

Leu Ser Lys Ser Tyr Ala Asn Asn Lys Glu Lys Glu Val Leu Val Leu
180 185 190

Trp Gly Val His His Pro Pro Asn Ile Gly Asn Gln Lys Ala Leu Tyr
195 200 205

His Thr Glu Asn Ala Tyr Val Ser Val Val Ser Ser His Tyr Ser Arg
210 215 220

Lys Phe Thr Pro Glu Ile Ala Lys Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln Glu
225 230 235 240

Gly Arg Ile Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Leu Glu Pro Gly Asp Thr Ile
245 250 255

Ile Phe Glu Ala Asn Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Tyr Ala Phe Ala
260 265 270

Leu Ser Arg Gly Phe Gly Ser Gly Ile Ile Asn Ser Asn Ala Pro Met
275 280 285

Asp Lys Cys Asp Ala Lys Cys Gln Thr Pro Gln Gly Ala Ile Asn Ser
290 295 300

Ser Leu Pro Phe Gln Asn Val His Pro Val Thr Ile Gly Glu Cys Pro
305 310 315 320

Lys Tyr Val Arg Ser Ala Lys Leu Arg Met Val Thr Gly Leu Arg Asn
325 330 335

Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe
340 345 350

Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr His
355 360 365

His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Gln Lys Ser Thr
370 375 380

Gln Asn Ala Ile Asn Gly Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile Glu
385 390 395 400

Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn Lys Leu
405 410 415

Glu Arg Arg Met Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe Ile
420 425 430

Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn Glu
435 440 445

Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu Lys
450 455 460

Val Lys Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly Cys
465 470 475 480

Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asn Asp Glu Cys Met Glu Ser Val Lys
485 490 495

Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ser Lys Leu Asn
500 505 510

Arg Glu Lys Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Met Gly Val Tyr Gln
515 520 525

Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Leu Val
530 535 540

Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
545 550 555 560

Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 17
<211> 566
<212> PRT
<213> A型流感病毒

<400> 17

Met Lys Ala Ile Leu Val Val Leu Leu Tyr Thr Phe Ala Thr Ala Asn
1 5 10 15

Ala Asp Thr Leu Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Asp Thr
20 25 30

Val Asp Thr Val Leu Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ser Val Asn
35 40 45

Leu Leu Glu Asp Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Lys Leu Arg Gly Val
50 55 60

Ala Pro Leu His Leu Gly Lys Cys Asn Ile Ala Gly Trp Ile Leu Gly
65 70 75 80

Asn Pro Glu Cys Glu Ser Leu Ser Thr Ala Ser Ser Trp Ser Tyr Ile
85 90 95

Val Glu Thr Pro Ser Ser Asp Asn Gly Thr Cys Tyr Pro Gly Asp Phe
100 105 110

Ile Asp Tyr Glu Glu Leu Arg Glu Gln Leu Ser Ser Val Ser Ser Phe
115 120 125

Glu Arg Phe Glu Ile Phe Pro Lys Thr Ser Ser Trp Pro Asn His Asp
130 135 140

Ser Asn Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Pro His Ala Gly Ala Lys Ser
145 150 155 160

Phe Tyr Lys Asn Leu Ile Trp Leu Val Lys Lys Gly Asn Ser Tyr Pro
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Lys Gly Lys Glu Val Leu Val
180 185 190

Leu Trp Gly Ile His His Pro Ser Thr Ser Ala Asp Gln Gln Ser Leu
195 200 205

Tyr Gln Asn Ala Asp Ala Tyr Val Phe Val Gly Ser Ser Arg Tyr Ser
210 215 220

Lys Lys Phe Lys Pro Glu Ile Ala Ile Arg Pro Lys Val Arg Asp Gln
225 230 235 240

Glu Gly Arg Met Asn Tyr Tyr Trp Thr Leu Val Glu Pro Gly Asp Lys
245 250 255

Ile Thr Phe Glu Ala Thr Gly Asn Leu Val Val Pro Arg Tyr Ala Phe
260 265 270

Ala Met Glu Arg Asn Ala Gly Ser Gly Ile Ile Ile Ser Asp Thr Pro
275 280 285

Val His Asp Cys Asn Thr Thr Cys Gln Thr Pro Lys Gly Ala Ile Asn
290 295 300

Thr Ser Leu Pro Phe Gln Asn Ile His Pro Ile Thr Ile Gly Lys Cys
305 310 315 320

Pro Lys Tyr Val Lys Ser Thr Lys Leu Arg Leu Ala Thr Gly Leu Arg
325 330 335

Asn Ile Pro Ser Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly
340 345 350

Phe Ile Glu Gly Gly Trp Thr Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr
355 360 365

His His Gln Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Leu Lys Ser
370 375 380

Thr Gln Asn Ala Ile Asp Glu Ile Thr Asn Lys Val Asn Ser Val Ile
385 390 395 400

Glu Lys Met Asn Thr Gln Phe Thr Ala Val Gly Lys Glu Phe Asn His
405 410 415

Leu Glu Lys Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Val Asp Asp Gly Phe
420 425 430

Leu Asp Ile Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Leu Glu Asn
435 440 445

Glu Arg Thr Leu Asp Tyr His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr Glu
450 455 460

Lys Val Arg Ser Gln Leu Lys Asn Asn Ala Lys Glu Ile Gly Asn Gly
465 470 475 480

Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Thr Cys Met Glu Ser Val
485 490 495

Lys Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Lys Tyr Ser Glu Glu Ala Lys Leu
500 505 510

Asn Arg Glu Glu Ile Asp Gly Val Lys Leu Glu Ser Thr Arg Ile Tyr
515 520 525

Gln Ile Leu Ala Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Val Leu Val
530 535 540

Val Ser Leu Gly Ala Ile Ser Phe Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu
545 550 555 560

Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 18
<211> 565
<212> PRT
<213> A型流感病毒

<400> 18

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
第 29 頁

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

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
340 345 350

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
355 360 365

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
485 490 495

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
530 535 540

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg
565

<210> 19
<211> 566
<212> PRT
<213> A型流感病毒

<400> 19

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

Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
20 25 30

His His Ala Val Pro Asn Gly Thr Ile Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
35 40 45

Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr
50 55 60

Gly Glu Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly Glu Asn Cys
65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro Gln Cys Asp Gly Phe Gln
85 90 95

Asn Lys Lys Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Asn
第 32 頁

	100		105		110
Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg Ser Leu Val	115		120		125
Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe Asn Trp Thr	130		135		140
Gly Val Thr Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ala Cys Ile Arg Arg Ser Asn	145		150		155
Asn Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu Thr His Leu Lys Phe Lys	165		170		175
Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys Phe Asp Lys	180		185		190
Leu Tyr Ile Trp Gly Val His His Pro Gly Thr Asp Asn Asp Gln Ile	195		200		205
Phe Leu Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Ile Thr Val Ser Thr Lys Arg	210		215		220
Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro Arg Val Arg	225		230		235
Asn Ile Pro Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val Lys Pro Gly	245		250		255
Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala Pro Arg Gly	260		265		270
Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg Ser Asp Ala	275		280		285
Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn Gly Ser Ile	290		295		300
Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr Tyr Gly Ala	305		310		315
Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr Gly Met	325		330		335

Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly Ala Ile Ala
340 345 350

Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
355 360 365

Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Ile Gly Gln Ala Ala Asp Leu Lys
370 375 380

Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asp Gln Ile Asn Gly Lys Leu Asn Arg Leu
385 390 395 400

Ile Gly Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys Glu Phe Ser
405 410 415

Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val Glu Asp Thr
420 425 430

Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Ala Leu Glu
435 440 445

Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn Lys Leu Phe
450 455 460

Glu Lys Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp Met Gly Asn
465 470 475 480

Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys Ile Gly Ser
485 490 495

Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp Glu Ala Leu
500 505 510

Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser Gly Tyr Lys
515 520 525

Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe Leu Leu Cys
530 535 540

Val Ala Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys Gly Asn Ile
545 550 555 560

2
5

Arg Cys Asn Ile Cys Ile
565

七、申請專利範圍：

1. 一種用於提高免疫反應的免疫原性組合物，該組合物包含：

部分糖基化的流感病毒糖蛋白，其係選自來自流感病毒株 H1、H3 及 H5 之血球凝集素 (HA) 或其片段所組成之群組，其中該部分糖基化的流感病毒糖蛋白含有至少一糖基化位點且在該至少一糖基化位點被部分糖基化至單-、雙-或三糖狀態。

2. 如申請專利範圍第 1 項之免疫原性組合物，其進一步包括完全或部分糖基化的表面糖蛋白或其片段，其係選自流感病毒神經胺酸酶；流感病毒凝集素；流感病毒 M2 蛋白；人呼吸道融合病毒 (RSV)-病毒蛋白；RSV F 糖蛋白；RSV G 糖蛋白；單純皰疹病毒 (HSV) 病毒蛋白；單純皰疹病毒糖蛋白 gB、gC、gD 和 gE；衣原體 MOMP 和 PorB 抗原；核心蛋白；登革熱病毒之基質蛋白或其他蛋白；麻疹病毒凝集素；單純皰疹病毒第 2 型糖蛋白 gB；小兒麻痺病毒 1 VP1；HIV 1 之封套糖蛋白；B 型肝炎表面抗原；白喉毒素；鏈球菌 24H 表位；纖毛淋病雙球菌；假性狂犬病病毒 g50(gpD)；假性狂犬病病毒 II (gpB)；假性狂犬病病毒 III (gpC)；假性狂犬病病毒糖蛋白 H；假性狂犬病病毒糖蛋白 E；傳染性胃腸炎病毒糖蛋白 195；傳染性胃腸炎病毒基質蛋白；豬輪狀病毒糖蛋白 38；豬小病毒衣殼蛋白；豬痢疾蛇形螺旋體保護抗原；牛病毒性腹瀉糖蛋白 55；新城疫病毒凝集素-神經胺酸酶；豬流感凝集素；豬流感神經胺酸酶；口蹄疫病毒；豬瘟病毒；豬流感病毒；

非洲豬瘟病毒；豬肺炎黴漿菌；牛傳染性鼻氣管炎病毒；牛傳染性鼻氣管炎病毒糖蛋白 E、糖蛋白 G；傳染性喉氣管炎病毒；傳染性喉氣管炎病毒糖蛋白 G 或糖蛋白 I；拉克錫病毒糖蛋白；初生仔牛下痢症病毒；委內瑞拉馬腦脊髓炎病毒；靜脈病毒；鼠白血病病毒；鼠乳腺腫瘤病毒；B 型肝炎病毒核心蛋白和 B 型肝炎病毒表面抗原或其片段或衍生物；馬流感病毒或馬皰疹病毒之抗原，包括馬流感病毒 A 型/Alaska 91 神經胺酸酶、馬流感病毒 A 型/Miami 63 神經胺酸酶、馬流感病毒 A 型/Kentucky 81 神經胺酸酶、馬皰疹病毒 1 型糖蛋白 B 和馬皰疹病毒 1 型糖蛋白 D；牛呼吸道融合病毒或牛副流感病毒之抗原；牛呼吸道融合病毒附著蛋白(BRSV G)；牛呼吸道融合病毒融合蛋白(BRSV F)；牛呼吸道融合病毒核衣殼蛋白(BRSVN)；牛副流感病毒 3 型融合蛋白；牛副流感病毒 3 型凝集素神經胺酸酶；牛病毒性腹瀉病毒糖蛋白 48 和糖蛋白 53；登革熱病毒糖蛋白 E 以及人 C 型肝炎病毒之糖蛋白 E1 或 E2 的表面糖蛋白。

3. 如申請專利範圍第 1 項之免疫原性組合物，其中該部分糖基化的流感病毒糖蛋白係利用一或多種化學或酵素法藉由部分去糖基化所產生。
4. 如申請專利範圍第 1 項之免疫原性組合物，其中該部分糖基化的流感病毒糖蛋白含 N-糖化位點，其含有天冬胺酸鹽- X_{aa} -絲胺酸和天冬胺酸鹽- X_{aa} -蘇胺酸的胺基酸序列，該 X_{aa} 係除脯胺酸之外的任何胺基酸。

5. 如申請專利範圍第 1 項之免疫原性組合物，其中該部分糖基化的流感病毒糖蛋白係以 N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)及/或甘露糖糖基化。
6. 如申請專利範圍第 1 項之免疫原性組合物，其中該部分糖基化的流感病毒糖蛋白係單糖基化流感病毒凝集素 (HA)。
7. 如申請專利範圍第 6 項之免疫原性組合物，其中該部分糖基化的流感病毒糖蛋白係以 N-乙醯葡萄糖胺(GlcNAc)糖基化的單糖基化流感病毒凝集素。
8. 如申請專利範圍第 7 項之免疫原性組合物，其中該以 GlcNAc 糖基化的單糖基化流感病毒凝集素含具有 Sa 區的 N-糖基化位點。
9. 如申請專利範圍第 7 項之免疫原性組合物，其中所述部分糖基化係於位於 HA 的位置 177 的天冬胺酸殘基。
10. 如申請專利範圍第 7 項之免疫原性組合物，其中該以 GlcNAc 糖基化的單糖基化流感病毒凝集素對 HA 受體的結合具有較低的特異性及較強的親和力，其係相對於對應的流感病毒凝集素在去糖基化前對 HA 受體結合之特異性及親和力而言。
11. 如申請專利範圍第 10 項之免疫原性組合物，其中該以 GlcNAc 糖基化的單糖基化流感病毒凝集素結合唾液酸化 HA-受體，其中該受體在標的細胞上。
12. 如申請專利範圍第 7 項之免疫原性組合物，其中該以 GlcNAc 糖基化的單糖基化流感病毒凝集素含有包括共有 H5 HA 序列(序列辨識編號：4)的

多肽。

13. 如申請專利範圍第 12 項之免疫原性組合物，其中該以 GlcNAc 糖基化的單糖基化流感病毒凝集素係於該共有 H5 HA 序列(序列辨識編號：4)的一或多個位置 39、127、170、181、302、495 和 500 的天冬胺酸殘基被糖基化。
14. 如申請專利範圍第 7 項之免疫原性組合物，其中該以 GlcNAc 糖基化的單糖基化流感病毒凝集素含有選自由季節性 NIBRG-121 (2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)序列(序列辨識編號：6)、共有 H1-A(序列辨識編號：8)和共有 H1-C(序列辨識編號：10)序列構成之群組的 H1 多肽序列。
15. 如申請專利範圍第 7 項之免疫原性組合物，其中該以 GlcNAc 糖基化的單糖基化流感病毒凝集素含有選自由共有 H5 HA 序列(序列辨識編號：4)、NIBRG-121(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)序列(序列辨識編號：6)、共有 H1-A(序列辨識編號：8)和共有 H1-C(序列辨識編號：10)序列構成之群組的 HA 序列，其中該 HA 序列藉由取代 HA 上的跨膜區被修飾成能表達於一適當真核細胞內並由其分泌。
16. 如申請專利範圍第 7 項之免疫原性組合物，其中該以 GlcNAc 糖基化的單糖基化流感病毒凝集素含有季節性 H1 多肽。
17. 一種疫苗包含：
 - (a) 免疫原性多肽，其包含部分糖基化的流感病毒糖蛋白，其係選自來自流感病毒株 H1、H3 及 H5 之血球凝集素 (HA) 或其免疫

活性片段所組成之群組，其在一或多個糖基化位點被部分糖基化至單-、雙-或三糖狀態；以及

(b) 選擇性佐劑，其中該疫苗能誘發對抗病毒的免疫反應。

18. 如申請專利範圍第 17 項之疫苗，其中該流感病毒係禽流感病毒或人流感病毒。

19. 如申請專利範圍第 18 項之疫苗，其中該禽流感病毒係 H5N1。

20. 如申請專利範圍第 17 項之疫苗，其中該部分糖基化的流感病毒糖蛋白係單糖基化流感病毒 HA 多肽，而當將該單糖基化流感病毒 HA 多肽導入一生物體時，該單糖基化流感病毒 HA 多肽可誘發該生物體產生結合至呼吸道病毒的抗體，其中該呼吸道病毒為禽類或人類流感病毒。

21. 如申請專利範圍第 17 項之疫苗，其中該部分糖基化的流感病毒糖蛋白係單糖基化流感病毒 HA 多肽，其含有部分糖基化 N-糖基化位點，含有天冬胺酸鹽- X_{aa} -絲胺酸和天冬胺酸鹽- X_{aa} -蘇胺酸的胺基酸序列，該 X_{aa} 係除脯胺酸之外的任何胺基酸。

22. 如申請專利範圍第 21 項之疫苗，其中該 N-糖基化位點含有單 GlcNAc，且其中該單糖基化流感病毒 HA 多肽對 HA 受體結合呈現低特異性及較強親和力，其係相對於對應的流感病毒凝集素在去糖基化前對 HA 受體結合之特異性及親和力而言。

23. 如申請專利範圍第 20 項之疫苗，其中該單糖基

化流感病毒 HA 多肽含具有 Sa 區的 N-糖基化位點。

24. 如申請專利範圍第 20 項之疫苗，其中該單糖基化流感病毒 HA 多肽含有於 HA 多肽(SEQ ID NO: 10) 位置 177 天冬胺酸殘基的 N-糖基化位點。
25. 如申請專利範圍第 22 項之疫苗，其中該單糖基化流感病毒 HA 多肽結合唾液酸化 HA 受體，其中該受體在標的細胞上。
26. 如申請專利範圍第 20 項之疫苗，其中該單糖基化流感病毒 HA 多肽含有包括共有 H5 HA 序列(序列辨識編號：4)的多肽。
27. 如申請專利範圍第 26 項之疫苗，其中該單糖基化流感病毒 HA 多肽係於該共有 H5 HA 序列(序列辨識編號：4)的一或多個位置 39、170、181、302 和 495 的天冬胺酸殘基被糖基化。
28. 如申請專利範圍第 20 項之疫苗，其中該單糖基化流感病毒 HA 多肽含有選自由 NIBRG-121 (2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)序列(序列辨識編號：6)、共有 H1-A (序列辨識編號：8)和共有 H1-C(序列辨識編號：10)序列構成之群組的 H1 多肽序列。
29. 如申請專利範圍第 20 項之疫苗，其中該該單糖基化流感病毒 HA 多肽含有季節性 H1HA 多肽以及當將該該單糖基化流感病毒 HA 多肽導入生物體時，該 H1HA 多肽可誘發該生物體產生中和 NIBRG-121(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)、WSN(H1N1)1933，或 A/波多黎各/8/34(H1N1)：PR8 株流感病毒的抗體。

30. 如申請專利範圍第 20 項之疫苗，其中該單糖基化流感病毒 HA 多肽含有 NIBRG-121(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)多肽以及當將該單糖基化流感病毒 HA 多肽導入生物體時，該 NIBRG-121(2009 年大流行 A(H1N1)疫苗株)多肽可誘發該生物體產生中和季節性 H1(布里斯本)HA、WSN(H1N1)1933，或 A/波多黎各/8/34(H1N1)：PR8 株流感病毒的抗體。
31. 如申請專利範圍第 20 項之疫苗，其中該生物體係哺乳動物或鳥類。
32. 如申請專利範圍第 20 項之疫苗，其中該疫苗具有對抗一或多株流感病毒的抗病毒活性。
33. 如申請專利範圍第 17 項之疫苗，其中該佐劑係選自氫氧化鋁、磷酸鋁、氫氧化鋁和磷酸鋁、佛氏不完全佐劑(IFA)、角鯊烯、明礬和 MF59。
34. 一種製備免疫原性組合物的方法，其包含：
- 提供糖基化流感病毒血球凝集素(HA)蛋白，其係來自流感病毒株 H1、H3 或 H5 或其免疫活性片段；
- 移除該糖基化流感病毒 HA 蛋白上結合至一或多個糖基化位點的聚糖之至少一部分，而形成一具有部分糖基化位點之部分糖基化流感病毒 HA 蛋白，其中至少一單糖、雙糖或三糖保持結合至該部分糖基化流感病毒 HA 蛋白之該部分糖基化位點以及其中該部分糖基化流感病毒 HA 蛋白保留免疫上活性構形；以及
- 將該部分糖基化流感病毒 HA 蛋白配製成一免疫原性組合物。

35. 如申請專利範圍第 34 項之方法，其進一步包含：
提供包含適合用於表達該糖基化流感病毒 HA 蛋白
或其免疫上活性片段之構體的真核宿主細胞；以
及
從該真核宿主細胞分離該糖基化流感病毒 HA 蛋
白。
36. 如申請專利範圍第 34 項之方法，其中該部分糖
基化流感病毒 HA 蛋白保留該糖基化流感病毒
HA 蛋白於其天然狀態的三級結構。
37. 如申請專利範圍第 34 項之方法，其中利用糖苷
酶、神經胺酸酶、 α -1-甘露糖苷酶、內切 F-N 聚
糖酶，或選擇性消化該糖於 N-或 O-連接糖基化
位點的酵素移除該聚糖部分。
38. 如申請專利範圍第 34 項之方法，其中利用選擇
性消化該糖於 N-或 O-連接糖基化位點的化學方
法移除該聚糖部分。
39. 如申請專利範圍第 35 項之方法，其中該真核宿
主係選自酵母菌、昆蟲細胞、桿狀病毒、哺乳動
物細胞，及人類細胞。
40. 如申請專利範圍第 39 項之方法，其中該真核宿
主係 HEK293E 細胞。

