

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/62
A61K 31/713



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01808764.7

[43] 公开日 2003 年 6 月 25 日

[11] 公开号 CN 1426472A

[22] 申请日 2001.3.30 [21] 申请号 01808764.7
[30] 优先权
[32] 2000. 3.31 [33] AU [31] PQ6616
[86] 国际申请 PCT/AU01/00353 2001.3.30
[87] 国际公布 WO01/73078 英 2001.10.4
[85] 进入国家阶段日期 2002.10.28
[71] 申请人 麦克法兰布奈特医疗研究与公共健康
研究所有限公司
地址 澳大利亚维多利亚
[72] 发明人 李 凡 D·A·安德森
D·F·J·波塞尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 刘晓东

权利要求书 3 页 说明书 27 页 序列表 3 页
附图 7 页

[54] 发明名称 编码源于肝炎病毒 ORF2N 端区域的
加工组分以及抗原性多肽的核酸构
建体

[57] 摘要

本发明涉及增强对核酸疫苗的免疫应答的方法，其包含给予动物以编码融合蛋白质的核酸构建体，该融合蛋白质包含加工组分和目的抗原性多肽，其中当在宿主细胞中表达该核酸构建体时，所述加工组分对该抗原性多肽提供不均一性加工，并导致免疫应答增强。该加工组分来源于戊型肝炎病毒 PORF2 的 N 端部分。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 增强动物中对目的抗原性多肽免疫应答的方法，所述方法包括给予该动物有效量包含编码包含加工组分和目的抗原性多肽的融合蛋白质的核酸构建体的组合物，其中当在宿主细胞中表达该核酸构建体时，所述加工组分提供对抗原性多肽的不均一性加工，并导致对该抗原性多肽的免疫应答增强。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述加工组分来源于戊型肝炎病毒 PORF2 蛋白质的 N 端区域。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述的编码加工组分的核酸构建体编码包含如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所述氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物的加工组分。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述加工组分包含基本上如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所述的氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述加工组分包含由基本上如 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所述的核苷酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物编码的氨基酸序列。

6. 增强动物中对病毒衣壳多肽的免疫应答的方法，所述方法包含给予所述动物有效量包含编码包含加工组分和所述衣壳多肽的融合蛋白质的核酸构建体的组合物，其中所述加工组分由基本上如 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所述的核苷酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物编码，并对所述衣壳蛋白质提供不均一性加工，导致其免疫应答增强。

7. 权利要求 5 的方法，其中所述加工组分由 SEQ ID NO: 6 所述的核苷酸序列编码。

8. 包含编码加工肽的核苷酸序列的分离的核酸分子，当所述核酸分子在宿主细胞中表达为包含加工肽和抗原性多肽的融合蛋白质时，该加工肽可增强宿主对目的抗原性多肽的免疫应答。

9. 包含编码加工肽的核苷酸序列的分离的核酸分子，当所述核酸分子在宿主细胞中表达为包含加工肽和抗原性多肽的融合蛋白质时，该加工肽可提供对目的抗原性多肽的不均一性加工。

10. 权利要求 8 或 9 中的分离的核酸分子，其中所述加工组分来源于戊型肝炎病毒 PORF2 蛋白质的 N 端区域。

11. 权利要求 8 或 9 中的分离的核酸分子，其中所述加工组分由基本上如 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所述的核苷酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物编码。

12. 根据权利要求 8 或 9 中的分离的核酸分子，其中所述加工组分包含基本上如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所述的氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

13. 分离的核酸构建体，其包含编码融合蛋白质的核苷酸序列，该融合蛋白质包含加工组分和至少一个抗原性组分，所述加工组分包含基本上如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所述的氨基酸序列，其中当在宿主细胞表达该核酸构建体时，所述加工组分提供对抗原性多肽成分的不均一性加工，并导致对该抗原性多肽的免疫应答增强。

14.权利要求 8-12 中任一项的核酸分子或权利要求 13 的构建体转染的分离的细胞。

15.权利要求 14 的细胞，其中该细胞是抗原呈递细胞。

16.包含权利要求 8-13 中任一项的核酸分子或构建体的核酸疫苗。

17. 权利要求 16 的核酸疫苗，其中所述核酸疫苗包含病毒复制子。

编码源于肝炎病毒 ORF2 N 端区域的加工组分 以及抗原性多肽的核酸构建体

发明领域

本发明一般涉及增强对核酸疫苗免疫应答的策略。本发明尤其涉及表达包含目的抗原性多肽和加工肽、可增强对该目的抗原性多肽的抗体和/或细胞免疫应答的融合蛋白质的核酸构建体。本发明用于设计和开发可调节对抗原免疫应答的各类方法、构建体和载体，并用于诊断、治疗和/或预防病变、感染或疾病，例如而不限于癌症、自身免疫疾病或动物中（包括人及其它哺乳动物、鱼和鸟）细菌、病毒或寄生虫感染。

概述

本领域技术人员应当了解，此处所述本发明除明确描述的以外，可以变更和修改。应当理解，此处所述本发明包括所有这类变更和修改。本发明也包括本说明书单独或一起涉及或指明的所有这类方法、特征、组合物和化合物，以及任何和所有两个或更多所述方法或特性的组合。

贯穿本说明书，除非上下文需要，否则单词“包含”及其变化形式应当理解为，暗指包含所述整体或方法，或者一群整体或方法，但不排除其它任何整体或方法，或者整体或方法群。此处所述特定实施方案只是为了用来说明的目的，本发明不受其范围限制。如此处所述，功能等价的产物、组合物和方法显然都在本发明范畴之内。

本说明书中作者涉及的出版物的文献目录细节汇总于说明书结尾处。此处参考的现有技术，包括任何一个或多个现有技术文件，不作为致谢或建议，所述现有技术是普通常识或组成普通常识的一部分。

此处所用术语“源于”，将用来表明来源于指定物种的特定整体或整体群，而不一定直接从指定来源获得。

本说明书包含核苷酸和氨基酸序列信息，使用程序 PatentIn 版本 3.0 制作，此处权利要求书之后给出。依据数字指示<210>（其后为序列标识符[例如<210>1、<210>2 等等]）确定序列表中各个序列。数字指示区<211>、<212>和<213>分别提供的信息指明每个序列的长度、序列类型[DNA、蛋白质(PRT)等等]以及来源生物。说明书中涉及的核苷酸或氨基酸序列用术语“SEQ ID NO:”来确定，其后是序列标识符[例如 SEQ ID NO: 1 是指序列表中指定为<400>1 的序列]。

依据 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会的推荐，命名此处涉及的核苷酸残基，其中 A 代表腺嘌呤，C 代表胞嘧啶，G 代表鸟嘌呤，T 代表胸苷，Y 代表嘧啶残基，R 代表嘌呤残基，M 代表腺嘌呤或胞嘧啶，K 代表鸟嘌呤或胸苷，S 代表鸟嘌呤或胞嘧啶，W 代表腺嘌呤或胸苷，H 代表除鸟嘌呤以外的核苷酸，B 代表除腺嘌呤以外的核苷酸，V 代表除胸苷以外的核苷酸，D 代表除胞嘧啶以外的核苷酸，以及 N 代表任意核苷酸残基。

发明背景

“核酸疫苗”是反映通过给予或者 DNA(质粒)或者自我复制的亚基因组病毒核酸(病毒复制子)而指导受体细胞中靶(疫苗)蛋白质合成的技术的上位术语。

由于观测到裸 DNA 可以在体内诱导抗原合成，以致诱导免疫应答（Woff 等，1990），因此，核酸疫苗，特别是 DNA 疫苗（其中给予的是编码蛋白质抗原的质粒 DNA，而非蛋白质本身），已经成为全世界范围内研究的焦点。利用核酸疫苗的两个主要潜在优势为(a)蛋白质在受体细胞中表达后，以天然表位呈递给免疫系统，以及(b)核酸的化学均一性、易于制备和稳定性，使其特别适合用于联合疫苗以及用于缺少常规疫苗所需冷藏环节的情况。

大多数有效的“传统”疫苗针对急性、自限感染，并激发酷似与相应感染的恢复和免疫力相关的免疫应答。即它们依赖针对来自感染物的、以其天然形式呈递的抗原的正常免疫应答。在这种系统中核酸疫苗具有重要的优势。过去，为达此目的，一般利用或者(i)活的减毒疫苗生物体(例如萨宾脊髓灰质炎(Sabin polio)疫苗)；(ii)随后是灭活的野生型生物体(或细菌毒素)(例如索尔克(Salk polio)脊髓灰质炎疫苗)，或者(iii)使用重组 DNA 技术制造天然抗原(例如乙型肝炎疫苗亚基)。在本发明中，DNA 疫苗具有巨大优势，其靶抗原是在受体细胞内以天然形式合成的。这也适用于基于病毒复制子的投递系统(例如，Kunjin 复制子系统(Khromykh 等人，1997；Varnavski 等人，1999；Varnavski 等人，2000)。但是，针对 DNA 疫苗所编码抗原的抗体反应常常很低或者检测不到。

在针对正常免疫应答所不能清除的感染的预防和治疗性疫苗的开发中取得的进展非常少。对于常规无法清除的感染因子，例如 HCV 和人类免疫缺陷性病毒(HIV)，那些能够针对相应抗原诱导正常免疫应答的疫苗，几乎没有用处。对于通常被视为“自我”的肿瘤特异性抗原也如此，其正常免疫应答就是一种耐受。尽管标准 DNA 或者复制子疫苗具有许多潜在的优势，但恰恰因为它们编码其天然形式的抗原，在所以这些情况下可能是无效的。

已经利用多种方法调节对 DNA 疫苗的免疫应答, 包括(i)与细胞因子或编码细胞因子的质粒共投递; (ii)在细菌(和质粒)DNA 中普遍发现的 CpG 二核苷酸免疫刺激作用(Hemmi 等人, 2000); 以及(iii)利用 DNA 疫苗连同痘病毒载体的引发-加强(Prime-Boost)方案。

现有的抗原靶向策略包括利用(a)泛素融合体(泛素-A76 或-G76-K)以靶向蛋白质进行多聚泛素化、在蛋白酶体内快速胞内降解及有效的 MHC-I 呈递; (b)与溶酶体相关膜蛋白 1(LAMP-1)融合, 以靶向 MHC-II 途径; (c)与腺病毒 E3 前导序列融合, 以靶向表位到内质网(ER); 以及(d)与 CTLA4 融合, 以靶向表位进行分泌, 并由专职抗原呈递细胞(APCs)摄取。

然而, 许多 DNA 疫苗的效果较弱(Gurunathan S 等人, 2000), 需要开发改进的技术和分子, 以调节对引起恢复或保护的 DNA 疫苗所表达蛋白质的免疫应答。

发明概述

在本发明的前序工作中, 发明人已经证明, 当在哺乳动物细胞中表达戊型肝炎病毒(HEV)的全长衣壳蛋白质 PORF2 时, 大约 80%新合成的蛋白质转运到内质网并快速降解, 而 20%蛋白质以完整形式蓄积存在于胞质溶胶中(4)。

根据本发明, 发明人已经鉴定了 HEV PORF2 的 N 端肽序列, 其允许不均一多肽加工(“加工肽”或“加工组分”), 并且已经利用这种加工肽序列开发了增强对目的抗原性多肽的免疫应答的策略。

发明人使用一系列表达载体(其编码无融合蛋白质的 ORF2.1 片段(ORF2.1)或者融合 HEV PORF2 N 端序列的蛋白质), 在动物细胞中表

达了 HEV PORF2.1 抗原性多肽片段；Sig1-ORF2.1 具有 PORF2 的 1-20 位氨基酸，Sig2-ORF2.1 具有 PORF2 的 1-36 位氨基酸，或者 Sig3-ORF2.1 具有 PORF2 的 1-50 位氨基酸。发明人确定，尽管发现 ORF2.1 蛋白质几乎专门存在于可溶性胞质溶胶级分中，但 Sig1 肽几乎专门被导向膜级分，而 Sig2 和 Sig3 肽引起不均一性定位。此外，就 Sig2-ORF2.1 和 Sig3-ORF2.1 多肽而言，发现胞质溶胶相关蛋白质稳定，而膜相关蛋白质则降解，与产生混合型免疫应答相符（分别为抗体和 CTL 反应）。

将 ORF2 的 N 端序列（Sig1、Sig2 和 Sig3）与谷胱甘肽 S 转移酶融合时，显示其以同样方式被不均一性加工（即，定位和加工），从而证实此发现具有广泛的共性。

在对 PORF2.1 的抗体反应为可测定的大鼠模型中，测定较之未修饰蛋白质，加工肽增强对抗原性多肽的免疫应答的能力。Sig1-ORF2.1 和 Sig3-ORF-2.1 诱导了增强的抗体反应，就 Sig3-ORF2.1 而言，大部分转运的级分被快速降解，这有助于 MHC-1 途径呈递并诱导细胞免疫应答。

因此，本发明一方面提供在动物中增强对目的抗原性多肽免疫应答的方法，所述方法包含给予该动物有效量的包含编码融合蛋白质的核酸构建体的组合物，该融合蛋白质包含加工组分和所述抗原性多肽，其中当在宿主细胞中表达该核酸构建体时，所述加工组分提供对抗原性多肽的不均一性加工，并导致对抗原性多肽的免疫应答增强。

本发明另一方面提供分离的核酸分子，其包含编码加工肽的核苷酸序列，当所述核酸分子在宿主细胞中表达为包含加工肽和抗原性多肽的融合蛋白质时，所述加工肽能调节宿主对抗原性多肽的免疫应答。

再一方面，本发明提供分离的核酸分子，其包含编码加工肽（其当所述核酸分子在宿主细胞中表达为包含加工肽和抗原性多肽的融合蛋白质时，所述加工肽能为目的抗原性多肽提供不均一性加工）的核苷酸序列。

本发明另一方面提供编码加工肽的分离的核酸分子，当所述核酸分子在宿主细胞中表达为包含加工肽和抗原性多肽的融合蛋白质时，该加工肽能够增强宿主对抗原性多肽的免疫应答，其中所述加工肽由戊型肝炎病毒 ORF2 核苷酸序列 N 端区域的毗邻核苷酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物编码。

本发明另一方面还提供编码加工肽的分离的核酸分子，当所述核酸分子在宿主细胞中表达为包含加工肽和抗原性多肽的融合蛋白质时，该加工肽能够调节宿主对抗原性多肽的免疫应答，其中所述加工肽包含选自戊型肝炎病毒 PORF2 蛋白质 N 端区域的大约 5-100 个毗邻氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

在本发明的一个实施方案中，该分离的核酸分子包含基本上如 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所述的核苷酸序列或其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

本发明另一方面还提供分离的多肽，其包含选自戊型肝炎病毒 PORF2 蛋白质 N 端区域的大约 5-100 个毗邻氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

优选地，上述分离的多肽具有基本上如 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所述的氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

本发明再一方面提供包含编码融合蛋白质的核苷酸序列的核酸构建体，其中所述融合蛋白质包含加工组分和至少一个抗原性组分，其中当在宿主细胞中表达该核酸构建体时，所述加工组分为抗原性组分提供不均一性加工，并导致宿主中针对该抗原性组分的免疫应答增强。

本发明另一相关方面提供包含编码融合蛋白质的核苷酸序列的核酸构建体，其中所述融合蛋白质包含加工组分以及至少一个宿主中的抗原性组分，所述加工组分能够增强对所述抗原性组分的免疫应答，并包含信号序列以及任选的中间肽，该中间肽包含基本上对应于能够不均一性胞内加工的蛋白质的N端区域的氨基酸序列。

优选地，上述加工组分包含信号序列和中间肽，该中间肽包含基本上对应于能够不均一性胞内加工的蛋白质的N端区域的氨基酸序列。

本发明另一方面还提供包含编码融合蛋白质的核苷酸序列的核酸构建体，所述融合蛋白质包含加工组分以及至少一个抗原性组分，所述加工组分能够增强对所述抗原性组分的免疫应答，所述加工组分包含信号序列以及任选的中间肽，该中间肽包含基本上对应于戊型肝炎病毒主要结构蛋白质(PORF2)的N端区域的氨基酸序列，或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

优选地，上述加工组分包含信号序列和来自戊型肝炎病毒主要结构蛋白质(PORF2)的N端区域的中间肽序列，或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

本发明再一方面还提供包含编码融合蛋白质的核苷酸序列的核酸构建体，其中所述融合蛋白质包含加工组分以及至少一个抗原性组分，所述加工组分能够调节宿主中对所述抗原性组分的免疫应答，并包含

选自戊型肝炎病毒主要结构蛋白质(PORF2)的N端区域大约5-100个毗邻氨基酸的氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

在本发明特别优选的一个方面,该融合蛋白质的加工组分包含基本上如SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3所述的氨基酸序列,其分别对应于PORF2的N端区域的1-22、1-36或1-50位氨基酸或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

本发明另一方面提供了分离的包含编码融合蛋白质的核苷酸序列的核酸构建体,其中所述融合蛋白质包含由戊型肝炎病毒ORF2基因5'区编码的加工组分以及抗原性组分,其中当在宿主细胞中表达该核酸构建体时,所述的加工组分可调节宿主中针对抗原性组分的免疫应答。

本发明再一方面还提供包含上述核酸构建体的疫苗,例如病毒复制子或DNA分子。

本发明的一个相关方面提供了用上述核酸构建体转染的细胞,例如抗原呈递细胞。

本发明又一方面还提供了用于增强动物中免疫应答的组合物,其包含上述核酸构建体以及一种或多种药物学上可接受的载体和/或稀释剂。

本发明再一方面提供了调节动物中针对目的抗原的免疫应答的方法,所述方法包含,在足以调节对所述抗原的免疫应答的时间和条件下,给予动物有效量的上述核酸构建体、或者编码或包含上述核酸构建体的疫苗或细胞。

本发明也涉及上述核酸分子或构建体在制备治疗或预防疾病或感染（包括而不限于癌症或癌前病变、自身免疫疾病、动物包括人及其它哺乳动物、鱼或鸟中病毒、细菌或寄生虫感染）的药物中的应用。

附图简述

图 1 提供了相对于戊型肝炎病毒 PORF2 全长蛋白质的 sig1、sig2 和 sig3 肽的图谱，以及各个蛋白质的氨基酸序列。显然可以预见到介于这些例子之间的中间大小蛋白质具有类似用途。

图 2 为放射性标记的 ORF2.1 和 sig1-2.1、sig2-2.1 和 sig3-2.1 的免疫沉淀和 PAGE 示意图，显示编码的蛋白质在细胞的胞质溶胶(c)或膜结合(m)部分的不同定位。注意 ORF2.1 和 sig1-2.1 具有均一性定位，而 sig2-2.1 和 sig3-2.1 具有不均一性定位。还应注意不同迁移率的多个条带，是由于转运到膜部分的蛋白质的部分糖基化造成的。

图 3 为放射性标记的 ORF2.1 和 sig1-2.1、sig2-2.1 和 sig3-2.1 的免疫沉淀和 PAGE 分析示意图，显示编码的蛋白质在细胞的胞质溶胶(cyto)或膜结合(memb)部分的不同定位(如图 2)，以及每一蛋白质种类在标记后 0、1 或 4 小时的不同稳定性。注意 ORF2.1 和 sig1-2.1 具有均一性加工(分别在 4 小时后降解或保持稳定)，而 sig2-2.1 和 sig3-2.1 具有与其不均一性定位(分别是 cyto 和 memb)一致的不均一性加工(稳定和降解的)。

图 4 为放射性标记的 sig1-GST、sig2-GST 和 sig3-GST 的免疫沉淀和 PAGE 分析示意图，显示编码蛋白质在细胞的胞质溶胶(cyto)或膜结合(memb)部分的不同定位，以及每一蛋白质种类在标记后 0 或 3 小时的不同稳定性。注意 sig1-GST 具有不均一性定位(cyto 加 memb)但均一性加工(稳定的)，而 sig2-GST 和 sig3-GST 具有不均一性定位

(cyto 加 memb)并且不均一性加工(稳定和降解的)。

图 5 为动物或人中针对基于核酸或病毒载体的疫苗的免疫应答示意图。(A). 针对抗原蛋白质的免疫应答的一般模式, 取决于其胞内加工和定位。注意大多数单一的蛋白质种类可能只遵循所示四个途径之一。(B)利用融合目的抗原的 sig 肽预测的调节免疫应答的模式。在使用的实施例中, HEV 的 ORF2.1 抗原是靶抗原, 包含线性和构象性两种 B 细胞表位, 并可能包含 T 细胞表位, 疫苗是基于质粒的 DNA 疫苗, 其编码 ORF2.1、sig1-2.1 或 sig3-2.1、或泛素-2.1, 产生快速降解的产物(参考文献 8 和 9)。给出了对接受不同疫苗的动物所预测的免疫应答途径。注意在体液(抗体)和细胞两种免疫应答的活化中, sig3-2.1 不均一性定位和加工是独特的, 其两种免疫应答之间正反馈的可能性增加。

缩写: Ab, 线性: 线性肽表位的抗体。Ab, 构象: 构象性肽表位的抗体。CTL: 细胞免疫应答。

图 6 为表示用各种 DNA 疫苗构建体免疫的大鼠中针对 HEV ORF2.1 的抗体的产生示意图(vec; 单独载体; 单独 ORF2.1, Ub. 2.1; 泛素-A76-ORF2.1, sig1.2.1; Sig1-ORF2.1, sig3.2.1; Sig3-ORF2.1)。每组两只大鼠, 在 0、4 和 8 周通过肌肉内注射溶于盐水的 100µg DNA 进行免疫, 并在指定时间利用 ORF2.1 ELISA 测定抗体反应(安德森等人, 1999)。

图 7 为 Western 印迹示意图, 显示在用 DNA 疫苗构建体免疫的大鼠中 HEV ORF2.1 的抗体的产生。利用 Riddell 等人(2000)所述方法, 通过针对全长 ORF2 蛋白质的各种片段的 Western 免疫印迹, 测试来自经 Sig1-ORF2.1 或 Sig3-ORF2.1 免疫的大鼠的抗体。注意 Sig1-ORF2.1 DNA 疫苗诱导针对构象性 ORF2.1 表位的抗体, 而 Sig3-ORF2.1 DNA 疫苗诱导针对构象性 ORF2.1 表位和线性表位两种表位的高水平抗体, 这

与通过 MHC-II 途径呈递完整和降解的抗原相符。

表 1

SEQ ID NOS 概述

序列	SEQ ID NO:
HEV PORF2 的氨基酸序列 Sig1	1
HEV PORF2 的氨基酸序列 Sig2	2
HEV PORF2 的氨基酸序列 Sig3	3
HEV ORF2 的 Sig1 的核酸序列	4
HEV ORF2 的 Sig2 的核酸序列	5
HEV ORF2 的 Sig3 的核酸序列	6

优选实施方案详述

本发明部分依据对戊型肝炎病毒 PORF2 衣壳蛋白质 N 端肽的鉴定，这些肽赋予包含与异源蛋白质融合的这些肽之一的融合蛋白质以独特的细胞内蛋白质加工模式。产生合适的表达载体以及克隆策略的方法为本领域公知。这样，可以同时加工 DNA 疫苗编码的抗原，以达到细胞和体液两种免疫应答的最佳刺激。

可以预想到编码与任何目的抗原性肽或多肽融合的本发明加工肽序列的核酸构建体，当其在宿主细胞中表达时，将会调节对目的多肽的免疫应答。

近来对核酸疫苗的研究表明，通过融合泛素，经由蛋白酶体途径快速降解蛋白质，可以增强细胞免疫应答，但此种降解大大消除对同一蛋白质的抗体(体液)免疫应答(8 和 9)。类似地，通过以保持与细胞相结合的或者由细胞中分泌出来的形式表达相同抗原蛋白质，可激发不同的免疫应答(3)。因此，针对核酸疫苗的细胞和体液免疫应答对抗原的胞内蛋白质加工模式敏感。很多情况下，两条免疫途径均可能为

疫苗的防护效力所必需，均衡的反应可能需要特定抗原蛋白质的不同加工。

在细胞内表达蛋白质抗原时，其胞内加工一般是均一性的。也就是说，蛋白质的每个拷贝基本上按相同方式加工，例如通过转运到内质网，并随后于细胞表面表达或分泌而被加工，或者通过滞留在胞质溶胶中或靶向蛋白酶体或其它降解途径进行降解而被加工。结果，在给予核酸疫苗之后，其蛋白质表达将导致该编码的蛋白质以均一模式加工，依特定蛋白质的加工途径不同而偏向细胞或体液途径的免疫应答。

对许多疾病而言，并不了解是体液还是细胞免疫力更可能提供对疾病防护或治疗效果，可能两种免疫应答通常均为最佳防护或治疗效果所必需。另外，有许多疾病，其特征在于受侵袭个体中缺少防护或治疗性免疫应答，例如癌症和慢性病毒感染，如丙型肝炎、乙型肝炎和人类免疫缺陷病毒(HIV-1 和 HIV-2)感染。对于这些疾病，显然疾病相关蛋白质抗原的常规蛋白质加工模式不能激发可导致复原或保护的免疫应答。

因此，本发明一方面提供增强动物对目的抗原性多肽的免疫应答的方法，所述方法包含给予所述动物有效量的其中包含编码融合蛋白质的核酸构建体的组合物，该融合蛋白质包含加工组分和所述抗原性多肽，其中当宿主细胞表达该核酸构建体时，所述加工组分提供对该抗原性多肽的不均一性加工，并导致对该抗原性多肽的免疫应答增强。

在一个实施方案中，所述编码加工组分的核酸构建体编码包含如 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 所述的氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物的加工组分。

此处涉及的“增强免疫应答”或“调节免疫应答”应当理解为，包

含涉及上调和下调一种或多种免疫应答,并包含细胞和/或体液(抗体)免疫应答的最佳刺激,也可能包含两种免疫应答之间有利的反馈机制。除细胞免疫应答之外还活化体液免疫应答也可能具有可调节炎症反应和特别是 T_H1 型免疫细胞的额外优势。根据一个优选的实施方案,抗原性多肽的不均一性加工,可增强混合的免疫应答,即抗体和细胞两种反应。

此处涉及融合蛋白质“加工组分”或“加工肽”时,应当理解为包含涉及特别影响融合蛋白质的胞内定位和/或蛋白酶解加工的肽或多肽。优选地,该加工组分能使抗原性组分在胞内不均一性定位。加工组分可来自 HEV 或者其它任何来源。加工肽可定位在抗原性多肽的 5' 处。可选地,加工多肽可在相对于抗原性多肽的 3' 位置起作用。再可选地,加工组分可从融合蛋白质内的嵌套位置起作用。很明显,本发明人设想的融合蛋白质不包括天然存在的分子。本领域技术人员应当理解,此处所述方法可用来鉴定另外的允许对包含它们的融合蛋白质进行不均一性加工的加工肽。

本发明另一方面提供包含编码加工肽的核苷酸序列的分离的核酸分子,当所述核酸分子在宿主细胞中表达为包含加工肽和抗原性多肽的融合蛋白质时,该加工肽能够调节宿主针对该抗原性多肽的免疫应答。

本发明另一方面还提供上述分离的核酸分子,其包含基本上对应于戊型肝炎病毒 ORF2 基因 N 端区域的核苷酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

本发明另一方面更提供上述分离的编码加工肽的核酸分子,该加工肽包含选自戊型肝炎病毒 PORF2 蛋白质 N 端区域的大约 5-100 个毗邻氨基酸的序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

根据本发明的这个特定方面，氨基酸 1 是最 N 端的氨基酸。N 端区域可包含多达约 100 个氨基酸。

优选地，被试肽包含 PORF2 N 端区域 1-22 或 1-36 位氨基酸，更优选地，被试肽包含 PORF2 的 N 端区域 1-50 位氨基酸，或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

根据本发明的这个方面，涉及“功能性”时，均包含多肽及其编码多核苷酸，在宿主细胞表达该多核苷酸时，其能够调节免疫应答。

本发明一方面提供包含编码融合蛋白质的核苷酸序列的核酸构建体，其中所述融合蛋白质包含加工组分和至少一个抗原性组分，所述加工组分位于抗原性组分的 5' 端，在宿主细胞中表达所述核酸构建体时，所述加工组分能够增强宿主对该抗原性组分的免疫应答。

适用于本发明的核酸分子可能是任何形式的核酸分子，例如 DNA 或者 RNA。

在本发明这方面的一个特定实施方案中，该加工组分包含能在宿主细胞中指导融合蛋白质定位到膜和胞质溶胶的信号序列，该融合蛋白质在几小时内稳定，并可有效增强对抗所述原组分的抗体反应。

本发明的一个优选方面中，该加工组分提供不均一性胞内定位(即胞质溶胶和膜区室)和/或混合型胞内蛋白酶解加工(稳定和降解的)的特征。本发明不受任何一种作用模式或理论的限制，据认为本发明的加工组分同时靶向融合蛋白质，以达到细胞和体液免疫应答的最佳刺激。

因此，本发明另一方面提供包含编码融合蛋白质的核苷酸序列的

核酸构建体，其中所述融合蛋白质包含加工组分以及至少一个抗原性组分，所述加工组分位于抗原性组分的 5' 端，并能够调节宿主中对所述抗原性组分的免疫应答，所述加工组分包含信号序列以及任选的中间肽，其包含基本上对应于能够进行细胞内不均一性翻译后加工的蛋白质 N 端区域的氨基酸序列。

优选地，上述加工组分包含信号序列和中间肽，其包含基本上对应于能够进行细胞内不均一性翻译后加工的蛋白质 N 端区域的氨基酸序列。

此处涉及“信号序列”时，应当理解为包含涉及通常、但不一定必须位于新合成多肽的 N 端的肽。信号序列可指导细胞器的翻译后摄取，并于蛋白质成熟时被切掉。它包含任何真核或原核的信号序列，可以是天然存在形式或与目的抗原蛋白质相关联或来自任何其它有用来源。根据本发明，信号序列可能是全功能的并完全断裂的，或者其断裂和/或信号序列功能可能无效。本领域技术人员公知，可以利用各种已知算法预测多肽的信号序列 (G. von Heijne 等人, 1989)。

本发明另一方面还提供包含编码融合蛋白质的核苷酸序列的核酸构建体，其中所述融合蛋白质包含加工组分以及至少一个宿主中的抗原性组分，所述加工组分位于抗原性组分的 5' 端，能够调节对所述抗原性组分的免疫应答，所述加工组分包含信号序列以及任选的中间肽，其包含基本上对应于戊型肝炎病毒主要结构蛋白质 (PORF2) 的 N 端区域的氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

优选地，上述加工组分包含信号序列和中间肽，其肽包含基本上对应于戊型肝炎病毒主要结构蛋白质 (PORF2) 的 N 端区域的氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

此处涉及的“中间肽序列”应当理解为包含涉及位于信号序列 3' 端的序列, 该 3' 序列可改变通过融合蛋白质上的加工组分赋予的加工特性。如同信号序列一样, 中间肽序列可以来自任何来源, 包括戊型肝炎病毒 PORF2 N 端区域的。

本发明又一方面还提供了包含编码融合蛋白质的核苷酸序列的核酸构建体, 其中所述融合蛋白质包含加工组分以及至少一个抗原性组分, 所述加工组分位于抗原性组分的 5' 端, 能够调节对所述抗原性组分的免疫应答, 所述加工组分包含信号序列以及中间肽, 其中所述加工组分包含基本上对应于选自戊型肝炎病毒主要结构蛋白质(PORF2)N 端区域的 5-100 个毗邻氨基酸的氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

在一个实施方案中, 加工组分包含选自 PORF2 N 端区域的大约 5-100 个氨基酸, 更优选 30-90 个, 再优选 20-60 个氨基酸, 或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

优选地, 加工组分包含基本上如 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:3 所述、分别相当于 PORF2 蛋白质 N 端区域的 1-22、1-36 或 1-50 位氨基酸的氨基酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物。

根据本发明的这一方面涉及的“衍生物”, 包含片段、部分、部分、等价物、类似物、突变体、模拟物或者同系物。多肽衍生物可能来自氨基酸插入、缺失或者置换。多核苷酸衍生物可以来源于单个或者多个核酸置换、缺失、和/或添加, 包含与其它核酸分子融合。等价物应当理解为包含可作为功能类似物或激动剂的分子。例如可通过天然产物筛选检测到等价物。涉及的“变体”包含与多肽或多核苷酸序列具有至少 50%, 或优选 60%或 65-80%, 并最优选至少 90%相似性的分子。可以通

过诱变研究或合理设计,建立功能性变体。此外,多核苷酸变体也可能包含在中等严谨条件下能够与本发明多核苷酸杂交的多核苷酸。

在本发明的一个相关方面,融合蛋白质的加工组分包含由基本上对应于 HEV ORF2 基因 N 端区域毗邻核苷酸的 1-300 个核苷酸的序列编码的肽。

优选地,该加工组分包含由基本上如 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 6 所述的核苷酸序列或者其功能性衍生物、变体、部分或同系物编码的肽。

本发明另一方面提供了包含编码融合蛋白质的核苷酸序列的核酸构建体,其中所述融合蛋白质包含由戊型肝炎病毒 ORF2 5' 区编码的加工组分以及抗原性组分,其中当在宿主细胞中表达该核酸构建体时,所述加工组分可调节宿主中针对该抗原性组分的免疫应答。

本发明再一方面还提供了包含上述核酸构建体的疫苗。

本发明另一相关方面提供了用上述核酸构建体转染的细胞。本发明适用的细胞可以是免疫细胞和/或呈递细胞(其能够在宿主生物内呈递或靶向或引导融合蛋白质,以优化对抗原性组分的免疫应答)。根据这个方面,细胞可以在体外或体内转染。特别优选的细胞类型是树突状细胞。

本发明又一方面还提供了用于调节动物中免疫应答的组合物,其包含上述核酸构建体以及一种或多种药物可接受的载体和/或稀释剂。

此处涉及的“动物”广义地包含哺乳动物、鸟、鱼和爬行动物,并扩展到例如而不限于人类、灵长类、家畜动物(例如羊、猪、牛、马)相伴动物(例如狗、猫)、实验室试验动物(例如小鼠、大鼠、兔、豚鼠、

仓鼠)、捕获的野生动物(例如狐狸、鹿)、笼养鸟类(例如鸚鵡)以及家禽鸟类(例如鸡、鸭)动物。优选的被试动物是人或灵长类。最优选的被试者是人。

适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液(当水溶性时),以及可即时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。在任何情况下,该形式必须是无菌的,并必须是易于注射的流体。它必须在生产和贮存条件下稳定,并必须防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇、等等)、其适当的混合物、以及植物油。可以通过例如利用卵磷脂包被、保持分散剂所需的颗粒大小以及利用表面活性剂维持适当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟苯甲酸酯、氯代丁醇、酚、山梨酸、硫柳汞(thimerosal)等防止微生物作用。在很多情况下,其优选包含等渗剂,例如糖或氯化钠。可以在组合物中使用延迟吸收的试剂,例如一硬脂酸铝和明胶,来延长该注射组合物的吸收。

如能适当地保护其活性成分,可以经口服给药,例如与惰性稀释剂或可吸收的食用载体一起,或者装入硬壳或软壳胶囊中,或者压成片剂,或者直接混入膳食中。对于口服治疗给药,该活性化合物可以与赋形剂混合,并以可食入的片剂、颊含片、锭剂、胶囊剂、酏剂、悬浮液、糖浆剂、干胶片等形式应用。这种组合物和制剂应当包含至少1%(重量)的活性化合物。当然可以改变该组合物和制剂的百分比,可以方便地介于单位重量的大约5-80%。活性化合物在这种治疗用组合物中的数量,应使能够获得适当的剂量。根据本发明制备优选的组合物或者制剂,使得其口服单位剂型包含大约0.1 μ g-2000mg的活性化合物。

片剂、锭剂、丸剂、胶囊剂等也可以包含:粘合剂例如西黄蓍胶、

阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂例如磷酸氢钙；崩解剂例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸等；润滑剂例如硬脂酸镁；以及甜味剂例如蔗糖、乳糖或可以添加糖精，或者调味剂例如薄荷油、冬青油、或樱桃香精。如果单位剂型是胶囊剂，则除上述类型材料之外，还可以包含液体载体。其它多种材料可以用作包衣，或用于修饰剂量单位的外观。例如，片剂、丸剂、或胶囊剂可以用虫胶、糖或其两者包被。糖浆剂或酞剂可包含活性化合物、甜味剂蔗糖、防腐剂对羟基苯甲酸甲酯和丙酯、染料以及香料，例如樱桃或柑桔香料。当然，用于制备任何单位剂型的任何材料应该是药物学纯的，并在应用剂量内基本上没有毒性。此外，活性化合物可以掺入缓释制剂。

药物可接受的载体和/或稀释剂包含任意及所有溶剂、分散剂、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂或促进剂等等。为药理学活性物质应用此类介质和试剂为本领域所公知。除去与该活性成分或细胞不相容的任何常规介质或试剂之外，其均可考虑用于该治疗组合物。补充的活性成分也可以掺入组合物中。

按照便于给药和统一剂量的单位剂型配制非肠道组合物，特别有利。此处使用的单位剂型是指对于要被治疗的哺乳动物受试者适合作为单元剂量的物理上的离散单元；每个单元包含经计算可产生目的治疗效果的预定量的活性物质和所需药物载体。对本发明新颖的单位剂型的说明取决并直接依赖于(a)活性物质的独特特征和欲达到的特定治疗效果，以及(b)本领域对混合此类活性物质用于治疗活的受试者中的疾病所固有的限制，该活的受试者处于如此处详述的身体健康失调的病态。

按照上文公开，将主要活性成分按有效量与药学上可接受的合适载体混合，制成单位剂型，以方便和有效给药。例如，每单位剂型可以包含总计 0.5 μ g-约 2000mg 的主要活性化合物。按比例表示，通常

每 ml 载体含活性化合物大约 0.5 μ g-2000mg。就包含补充活性成分的组合物而言，参照所述成分的常用量和给药方式，确定其剂量。

组合物形式的核酸构建体或疫苗可以通过任何方便方式给药，例如而不限于，基因枪直接给药、脂质体或聚合微球体传送或者通过基于病毒的载体传送。按特定情况的用量，药用组合物制剂可预期展现其治疗或预防活性。其变动取决于例如动物、给药方法和治疗需要。适用的剂量范围很宽。例如，对于病人，每公斤体重可给予大约 0.1 μ g-1mg 的核酸构建体。可以调整剂量方案，以产生最佳的治疗反应。可按照任何方便的方式给药，例如通过口服、静脉内（当水溶性时）、鼻内、腹膜内、肌内、皮下、皮内或栓剂途径或者植入（例如利用缓释分子）。

本发明又一方面提供了在动物中调节对目的抗原的免疫应答的方法，所述方法包含在足以调节对所述抗原的免疫应答时间和条件下给予所述动物有效量的上述核酸构建体、或者编码或包含上述核酸构建体的疫苗或细胞。

上述方法可以提供包括在实验动物或体外或体内生产抗体、包括单克隆抗体的特别有用的方法。

本发明也提供上述核酸构建体在制造治疗或预防疾病或感染（包括但不限于癌症或癌前病变、自身免疫疾病、病毒、细菌或寄生虫感染）的药物中的用途。

以下非限制性实施例更完全地描述了本发明的其它特性。

实施例 1

HEV 融合蛋白质在细胞的胞质溶胶或膜结合部分的不同定位

使用一系列表达载体在哺乳动物细胞中表达 HEV 编码的抗原蛋白质 ORF2.1, 该表达载体编码无融合蛋白质 (ORF2.1)、或者具有 sig1(sig1-2.1)、sig2(sig2-2.1)或 sig3(sig3-2.1)的 N 端融合蛋白质的 ORF2.1(图 1)。细胞在放射性甲硫氨酸和半胱氨酸存在下温育, 以标记新合成的蛋白质, 将细胞分成可溶性胞质溶胶(c)和膜部分(m), 利用特异性 ORF2.1 多克隆抗体, 通过免疫沉淀选择包含 ORF2.1 序列的蛋白质, 经 SDS-PAGE 和放射自显影检测。可以看出, 显然 ORF2.1 几乎完全存在于可溶性胞质溶胶部分, sig1-2.1 几乎完全存在于膜部分, 而 sig2-2.1 和 sig3-2.1 以相近比例存在于两个部分中。注意多条不同迁移率的条带, 是由于转运到膜部分的蛋白质的部分糖基化作用引起的, 因为当用衣霉素处理细胞以防止 N-糖基化时, 这些条带消失了(未显示)。此图表明每个 sig 蛋白质对细胞内蛋白质定位所带来的独特效果, 特别是 sig2 和 sig3 带来不均一性定位。

实施例 2

HEV 融合蛋白质的不同稳定性

如图 2 所示, 表达每种蛋白质的细胞在放射性氨基酸存在下温育, 然后在过量非放射性氨基酸存在下进一步温育不同时间, 如前所述分级分离并分析。通过比较放射性标记结束(时间 0 小时)、进一步温育 1 或 4 小时后细胞中每种放射性蛋白质的量, 可以确定每种蛋白质的加工模式。可以看出(图 3), 蛋白质 ORF2.1 主要发现于胞质溶胶中(cyto), 合成之后 1 小时是稳定的, 而蛋白质 sig1-2.1 主要发现于膜部分(memb), 合成之后 4 小时是稳定的。相反, sig2-2.1 和 sig3-2.1 于 cyto 和 memb 部分中均有发现, cyto-相关蛋白质 4 小时后是稳定的, 而 memb-相关蛋白质 4 小时后几乎完全降解。因此预计, 在这些实施例中, sig2-2.1 和 sig3-2.1 由于其不均一性加工和定位, 将引起对

ORF2.1 蛋白质的混合型免疫应答, 而 ORF2.1 和 sig1-2.1 由于其均一性加工和定位, 每种会引起单一模式的免疫应答。

实施例 3

SIG. GST 融合蛋白质的不同定位和稳定性

如实施例 2 所述, 为在哺乳动物细胞中表达, 将 sig1、sig 2 或 sig3 与谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 融合。在这个实施例中可以看出, sig1-GST 在 cyto 和 memb 部分具有相同比例的不均一性定位, 而两个部分的均一性加工在 4 小时后是稳定的。相反, sig2-GST 和 sig3-GST 在 0 小时时 cyto 和 memb 部分具有相同比例的不均一性定位, cyto 部分的不均一性加工在 3 小时后是稳定的, 而 memb 部分在 3 小时后几乎完全地降解。因此预计通过利用这些 sig1、sig2 或 sig3 融合蛋白质, 将会调节针对靶抗原例如 GST 的免疫应答。

实施例 4

Sig1、Sig2 和 Sig3 的核酸序列

利用带有添加的限制性位点的引物经 PCR 扩增全长 ORF2 序列的适当片段得到以下序列。

Sig1 SEQ ID NO: 4

ATGCGCCCTCGGCCTATTTTGCTGTTGCTCCTCATGTTTCTGCCTATGCTGCCCCGCGCCACCGCCC

Sig2 SEQ ID NO: 5

ATGCGCCCTCGGCCTATTTTGCTGTTGCTCCTCATGTTTCTGCCTATGCTGCCCCGCGCCACCGCCCGGTCAGCCGTCTGGCCGCCGTCGTGGGCGGCGCAGCGGCGGT

Sig3 SEQ ID NO: 6

ATGCGCCCTCGGCCTATTTTGCTGTTGCTCCTCATGTTTCTGCCTATGCTGCCCCGCG

GCCACCGCCCGGTCAGCCGTCTGGCCGCCGTCGTGGGCGGCGCAGCGGCGGTTC
CGGCGGTGGTTTCTGGGGTGACCGGGTTGATTCTCAGCCC

用于表达的哺乳动物表达载体是 pCl-neo(Promega)，其具有 CMV 立即早期启动子、SV40 多聚腺苷酸化以及嵌合的剪接信号。

实施例 5

用质粒构建体免疫 Balb/C 小鼠

通过标准方法例如基因枪或肌肉内注射，将质粒构建体 ORF2.1、sig1-2.1、sig2-2.1 和 sig3-2.1 以及 GST、sig1-GST、sig2-GST 和 sig3-GST 中的每一种接种 Balb/C 小鼠证明 sig1、sig2 和 sig3 肽的活性，并利用例如特异性抗体同型方式、T 细胞增殖反应、以及溶细胞性 T 细胞反应方法，比较接受每种疫苗的动物中的免疫应答。可以预料，此处所示实施例中在细胞培养物中观察到的不同胞内加工方式，也会在接种 DNA 疫苗的小鼠细胞中发生，并将根据各个构建体的蛋白质加工，引起调节的免疫应答。可以通过将每个 sig 肽与其它目的抗原融合进行进一步测试，目的抗原包括而限于流感病毒核蛋白(NP)和血细胞凝集素(HA)、丙型肝炎病毒和乙型肝炎病毒包膜和核心蛋白质、人免疫缺陷病毒包膜和 gag 蛋白质、以及源于人和动物的其它病毒、细菌、真菌和寄生虫病原体的目的抗原、以及癌症相关抗原。图 5 为预期的每种疫苗构建体的不同免疫应答的示意图。

总之，由核酸疫苗编码的 sig1、sig2 和 sig3 以及源于 HEV PORF2 的相关肽，与单独抗原或具有胞内均一性加工和定位模式的肽-抗原融合蛋白质(例如泛素-抗原融合蛋白质)相比，由于其不均一性的胞内加工和定位模式，将可应用于调节和增强对融合蛋白质抗原的免疫应答。

实施例 6

对融合异源蛋白质的 HEV 信号肽的免疫应答

在 0、4 和 8 周肌肉内 (IM) 注射溶于盐水中的 100 μ g DNA, 将 ORF2.1 系列质粒构建体给予大鼠, 并利用 ORF2.1 ELISA (Anderson 等人, 1999) 测量抗体反应 (表 1、图 6、图 7)。编码单独 ORF2.1 或融合有泛素-A76 的质粒未能激发任何可检测的抗体, 而 Sig1-ORF2.1 在 2/2 只大鼠中诱导强烈的抗体反应。最有趣的是, Sig3-ORF2.1 在 1/2 只大鼠中诱导强烈的抗体反应。此外, 大部分蛋白质 (转运的部分) 在 4h 内降解, 这很可能有利于 MHC-I 途径呈递和 CTL 反应的诱导。

通过针对 ORF2 蛋白质的不同片段的 Western 免疫印迹检测大鼠中的抗体反应 (Li 等人, 1997; Riddell 等人, 2000), 可以揭示对线性和构象性表位的反应性 (图 7)。值得注意的是, Sig1-和 Sig3-ORF2.1 均诱导针对 HEV ORF2.1 构象性表位的抗体 (Riddell 等人, 2000), 其被认为是对于 DNA 疫苗的广泛效用重要的特性。还应注意, Western 免疫印迹中 SIG3-ORF2.1 诱导的抗体反应性水平高于 SIG1-ORF2.1, 大概是由于呈递给 B 细胞的是完整 (构象性) 和降解 (线性) 的抗原的混合物。

这些实验因此证明与 DNA 疫苗编码的未修饰蛋白质相比, Sig1 和 Sig3 的融合可促进增强的抗体反应, 并伴随着一部分融合 Sig3 的蛋白质快速降解, 这将导致 CTL 反应和抗体反应两者的平衡, 其将继而改善编码抗原例如感染物或肿瘤的抗原的 DNA 疫苗效果。

实施例 7

HEV 信号肽靶向系统的广泛应用

在 pCI-neo 中制备 DNA 疫苗构建体来编码 Sig1 和 Sig3 与下列抗原的融合体：(i) HCV 核心/E1/E2；(ii) HCV 核心；(iii) HCV E1/E2；(iv) 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)；(v) 流感核蛋白(NP)；(vi) 流感血细胞凝集素(HA)。利用 PCR 从现有质粒扩增每种蛋白质的编码序列，在各种情况下，还构建表达相应的全长(天然)蛋白质以及与泛素-A76 的 C 端融合的全长蛋白质(对照，靶向 MHC-I)的质粒。用每种质粒转染 Cos 细胞，通过脉冲追踪放射性标记、细胞分级分离、western 免疫印迹以及免疫沉淀分析靶蛋白质的命运，以证明是否可以赋予各种靶抗原以 HEV Sig1 和 Sig3 的靶向作用。

每组 6 只小鼠，在 0 和 4 周每只通过肌肉注射 100 μ g 载体(pCI-neo 质粒，阴性对照)、或编码形式为(a)全长蛋白质(对照)；(b) Ub-A76-蛋白质(对照)；(c) Sig1-蛋白质；(d) Sig3-蛋白质的靶抗原 GST、ORF2.1、HBsAg、NP 和 HA 之一的载体进行免疫。对应的蛋白质疫苗作为附加的对照。

在 0、4、8 和 12 周收集血液，在 12 周采集组织(淋巴结、脾)。通过 ELISA 确定全部以及同型特异性 IgG 反应，分别表示体液免疫应答的大小以及倾向 Th1/Th2 反应的替代标志。HA 和 NP 的分析包括(a)CTL 活性和(b)ELISPOT 和/或胞内细胞因子染色，以确定其频率以及特异性 T 细胞的 Th1/Th2 倾向性。

为更严格试验 HEV Sig1 或 Sig3 所致效能，利用流感感染的亚致死小鼠模型，检测 HA 和 NP 的 DNA 疫苗构建体。如前所述免疫动物，并在 12 周通过鼻内接种亚致死剂量的轻度流感病毒株激发全部动物。五天后无痛处死小鼠，采集肺组织，通过噬斑分析测定病毒载荷。这些研究将证实，HEV Sig 序列的混合型靶向作用导致增强的免疫应答。

参考文献

1. Anderson, D., et al. (1999) *J. Virological Methods* 81: 131-142
2. Gurunathan, S. et. al. (2000) *Ann Rev Immunol.* 18:927-74.
3. Forns, X., S. U. et. al. (1999). *Vaccine.* 17: 1992-2002.
4. von Heijne G. et al (1989) *Protein Eng.*, 2:531
5. Khromykh, A. A., et al. (1997). *J Virol.* 71:1497-505.
6. Li, F., et al. (1997) *J. Virological Methods* 52: 289-300
7. Riddell, M., et al. (2000) *J Virol.* 74: 8011-8017
8. Rodriguez F., et. al. (1997). *J Virol.* 71: 8497-503.
9. Rodriguez, F., et. al. (1998) *J Virol.* 72: 5174-81.
10. Torresi, J., F. et. al. (1999). *J Gen Virol.* 80: 1185-8.
11. Varnavski, A. N. et al. (1999) *Virology.* 255:366-75.
12. Varnavski, A. N. et al. (2000). *J Virol.* 74:4394-403.
13. Wolff, J. A. et. al. (1990) *Science.* 247:1465-8.

表 2.

DNA 质粒编码的 HEV 信号肽融合蛋白质的胞内加工和免疫原性概述

构建体	ER 转运	快速降解 ^a	分泌	抗体诱导 ^b
ORF2.1	-	+	-	-
Sig1-ORF2.1	++	-	-	++++
Sig2-ORF2.1	+	+	-	nt
Sig3-ORF2.1	+	+	-	++
UbA76-ORF2.1	-	+	-	-
GST	-	-	-	nt
Sig1-GST	+	-	+	nt
Sig2-GST	+	+	+	nt
Sig3-GST	+	+	+	nt
UbA76-GST	-	+	nt	nt

^a 4hr 后靶蛋白质降解 75%以上 (即 $t_{1/2} < 2\text{hr}$)。Sig2-和 Sig3-蛋

白质只有转运部分降解。

^b 在 0、4 和 8 周肌肉内注射 100 μ g DNA，每组 2 只大鼠，在 12 周测定 ORF2.1-特异性 Ab。

<212> PRT

<213> 戊型肝炎病毒

<400> 1

Met Arg Pro Arg Pro Ile Leu Leu Leu Leu Leu Met Phe Leu Pro Met

1

5

10

15

Leu Pro Ala Pro Pro Pro

20

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> 戊型肝炎病毒

<400> 2

Met Arg Pro Arg Pro Ile Leu Leu Leu Leu Leu Met Phe Leu Pro Met

1

5

10

15

Leu Pro Ala Pro Pro Pro Gly Gln Pro Ser Gly Arg Arg Arg Gly Arg

20

25

30

Arg Ser Gly Gly

35

<210> 3

<211> 50

<212> PRT

<213> 戊型肝炎病毒

<400> 3

Met Arg Pro Arg Pro Ile Leu Leu Leu Leu Leu Met Phe Leu Pro Met

1

5

10

15

Leu Pro Ala Pro Pro Pro Gly Gln Pro Ser Gly Arg Arg Arg Gly Arg

20

25

30

Arg Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Phe Trp Gly Asp Arg Val Asp Ser

35

40

45

Gln Pro

50

<210> 4

<211> 66

<212> DNA

<213> 戊型肝炎病毒

<400> 4

atgagccctc ggccatatttt gctgttgctc ctcatgtttc tgcctatgct gcccgcgcca 60

ccgccc

66

<210> 5

<211> 108

<212> DNA

<213> 戊型肝炎病毒

<400> 5

```
atgcgccctc ggcctatattt gctgttgctc ctcatgtttc tgcctatgct gcccgcgcca 60
ccgcccggtc agccgtctgg ccgccgtcgt gggcggcgca gcggcggt 108
```

<210> 6

<211> 150

<212> DNA

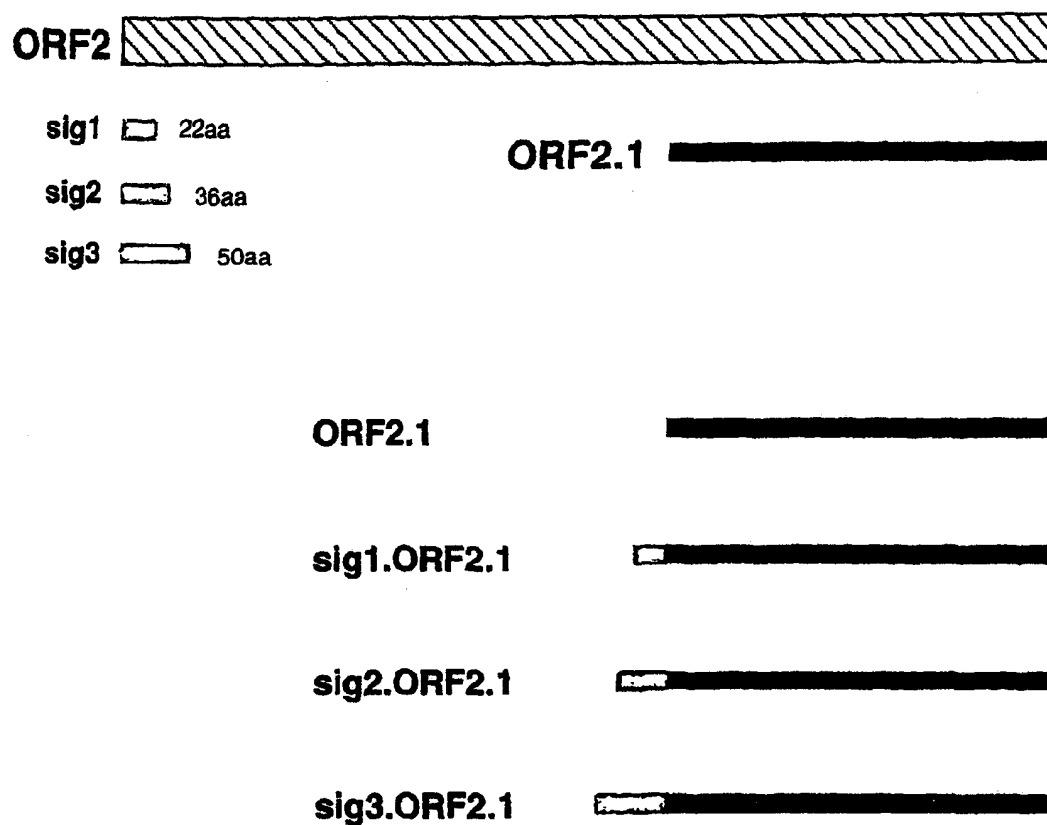
<213> 戊型肝炎病毒

<400> 6

```
atgcgccctc ggcctatattt gctgttgctc ctcatgtttc tgcctatgct gcccgcgcca 60
ccgcccggtc agccgtctgg ccgccgtcgt gggcggcgca gcggcggttc cggcggtggt 120
ttctggggtg accgggttga ttctcagccc 150
```

图1

ORF2.1 系列



sig1 MRPRPILLLLLMFLPMLPAPPP

sig2 MRPRPILLLLLMFLPMLPAPPPGQPSGRRRGRRSGG

sig3 MRPRPILLLLLMFLPMLPAPPPGQPSGRRRGRRSGGSGGGFWGDRVDSQP

图2

标记样品的免疫沉淀反应

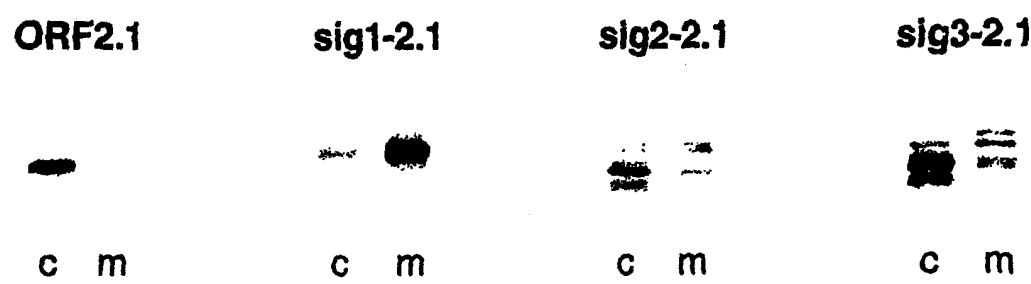


图 3

脉冲标记样品的免疫沉淀反应

模拟物 ORF2.1

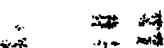


0 0 0 1 4 0 1 4 小时
c m cyto memb

sig1-2.1

sig2-2.1

sig3-2.1



0 1 4 0 1 4
cyto memb

0 1 4 0 1 4
cyto memb

0 1 4 0 1 4 小时
cyto memb

图 4

脉冲标记样品的免疫沉淀反应



图5

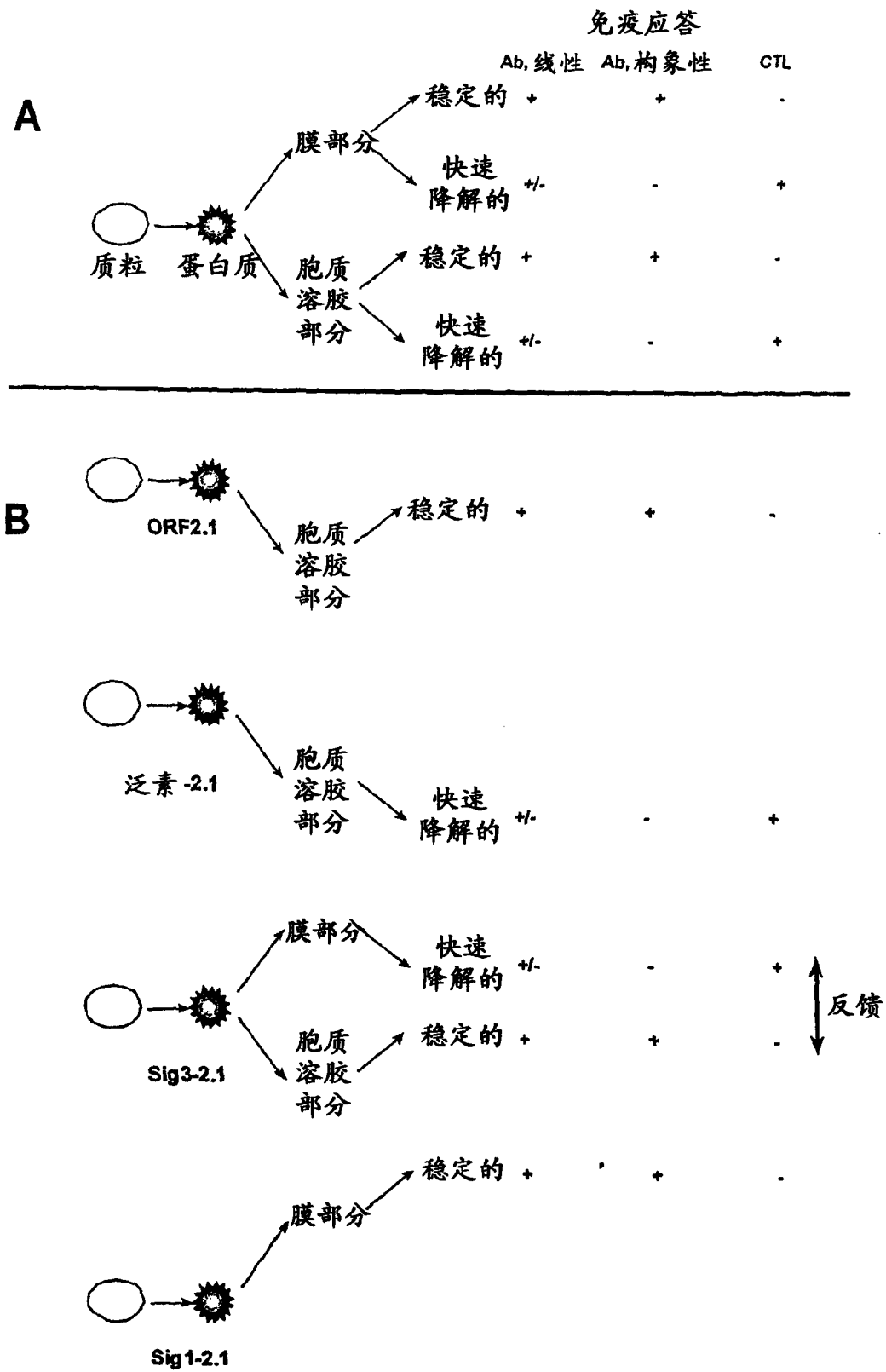


图6
ELISA检测的抗体反应

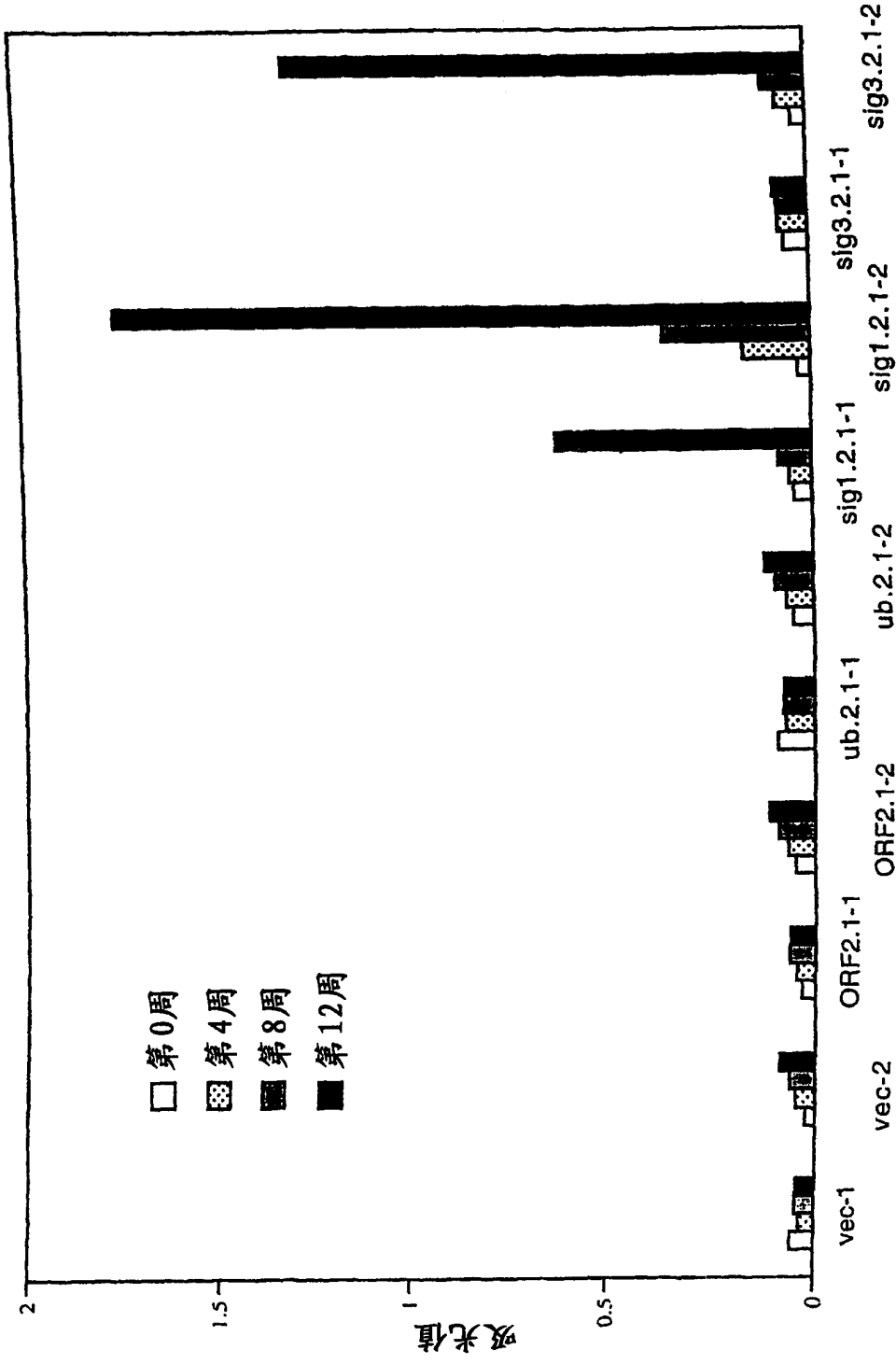


图 7

缺失系列的GST融合蛋白的Western印迹

