



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106573988 A

(43)申请公布日 2017. 04. 19

(21)申请号 201580041471.X

(22)申请日 2015.08.06

(30)优先权数据

62/034,475 2014.08.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.01.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2015/086264 2015.08.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/019890 EN 2016.02.11

(71)申请人 基亚生物科技股份有限公司

地址 中国台湾台北市南港区园区街F栋3号
14楼

(72)发明人 林阳生 郑金益 江雅铃 陈明正

K-T A • 赖 杨智雅

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 陈静

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 7/04(2006.01)

A61K 39/29(2006.01)

A61K 39/145(2006.01)

A61K 39/125(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

A61P 31/20(2006.01)

A61P 31/16(2006.01)

权利要求书8页 说明书30页

序列表6页 附图6页

(54)发明名称

病毒样颗粒疫苗

(57)摘要

本发明涉及二聚体融合蛋白和包含此类二聚体融合蛋白的病毒样颗粒。这些二聚体融合蛋白由两个病毒结构蛋白或其片段及抗原或抗原片段所组成,其中抗原或抗原片段位于两个病毒结构蛋白之间,且该抗原或抗原片段与该病毒结构蛋白之间可置入或不置入接头,以致相对于传统的单体平台,该抗原或抗原片段与该病毒结构蛋白或其片段得以立体阻碍最小化的方式折叠。这种新颖的设计,提供了多价且免疫原性增强的疫苗。本发明还涉及编码此种二聚体融合蛋白的核酸与含有此类核酸的宿主细胞。本发明进一步涉及包含本发明二聚体融合蛋白及/或病毒样颗粒的医药组合物,以及使用此种组合物的预防或治疗方法。

1. 一种融合蛋白, 包含:

(a) V1-L1-Ag-L2-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白,

L1是一N端接头,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段,

L2是一C端接头, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒;

(b) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白,

L1是一N端接头,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段,

L2是一C端接头, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒;

(c) V1-Ag-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒;

(d) V1-L1-Ag-L2-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白的一片段,

L1是一N端接头,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段,

L2是一C端接头, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且V1及V2是相同的;

(e) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白的一片段,

L1是一N端接头,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段,

L2是一C端接头, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且V1及V2是相同的;

(f) V1-Ag-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白的一片段,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且V1及V2是相同的;

(g) V1-L1-Ag-L2-V2, 其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段,
L1是一N端接头,
Ag是一病原体的抗原或抗原片段,
L2是一C端接头, 以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且V1及V2是来自相同病毒的不同蛋白;

(h) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2, 其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段,
L1是一N端接头,
Ag是一病原体的抗原或抗原片段,
L2是一C端接头, 以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且
V1及V2是来自相同病毒的不同蛋白;

(i) V1-Ag-V2, 其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段,
Ag是一病原体的抗原或抗原片段, 以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且
V1及V2是来自相同病毒的不同蛋白;

(j) V1-L1-Ag-L2-V2, 其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段,
L1是一N端接头,
Ag是一病原体的抗原或抗原片段,
L2是一C端接头, 以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且
V1及V2是来自不同病毒的蛋白;

(k) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2, 其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段,
L1是一N端接头,
Ag是一病原体的抗原或抗原片段,
L2是一C端接头, 以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且
V1及V2是来自不同病毒的蛋白;

(l) V1-Ag-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，且
V1及V2是来自不同病毒的蛋白；
(m) V1-L1-Ag-L2-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
L1是一N端接头，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，
L2是一C端接头，以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
其中该片段是来自相同病毒结构蛋白的不同部分，且
V1及V2的氨基酸序列长度总和少于该病毒结构蛋白的完整氨基酸序列长度；
(n) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
L1是一N端接头，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，
L2是一C端接头，以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
其中该片段是来自相同病毒结构蛋白的不同部分，且
V1及V2的氨基酸序列长度总和少于该病毒结构蛋白的完整氨基酸序列长度；
(o) V1-Ag-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
其中该片段是来自相同病毒结构蛋白的不同部分，且V1及V2的氨基酸序列长度总和少于该病毒结构蛋白的完整氨基酸序列长度；
(p) V1-L1-Ag-L2-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白，
L1是一N端接头，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，
L2是一C端接头，以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
且V2是V1的片段；
(q) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
L1是一N端接头，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，
L2是一C端接头，以及
V2是一C端病毒结构蛋白，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，且
V1是V2的片段；
(r) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白，
L1是一N端接头，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，
L2是一C端接头，以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，且V2是V1的片段；
(s) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
L1是一N端接头，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，
L2是一C端接头，以及
V2是一C端病毒结构蛋白，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，且
V1是V2的片段；
(t) V1-Ag-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，且
V2是V1的片段；
(u) V1-Ag-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，以及
V2是一C端病毒结构蛋白，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
且V1是V2的片段；
(v) V1-L1-Ag-L2-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白，
L1是一N端接头，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，
L2是一C端接头，以及

V2是一C端病毒结构蛋白的一片段，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
且V2是来自与V1相同病毒的不同蛋白的片段；
(w) V1-L1-Ag-L2-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
L1是一N端接头，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，
L2是一C端接头，以及
V2是一C端病毒结构蛋白，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
且V1是来自与V2相同病毒的不同蛋白的片段；
(x) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白，
L1是一N端接头，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，
L2是一C端接头，以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
且V2是来自与V1相同病毒的不同蛋白的片段；
(y) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
L1是一N端接头，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，
L2是一C端接头，以及
V2是一C端病毒结构蛋白，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
且V1及V2是来自相同病毒的不同蛋白；
(z) V1-Ag-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，以及
V2是一C端病毒结构蛋白的一片段，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
且V2是来自与V1相同病毒的不同蛋白的片段；
(aa) V1-Ag-V2，其中
V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，以及
V2是一C端病毒结构蛋白，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，且
V1是来自与V2相同病毒的不同蛋白的片段；

(bb) V1-L1-Ag-L2-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白,

L1是一N端接头,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段,

L2是一C端接头, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且

V2是来自与V1不同病毒的蛋白的片段;

(cc) V1-L1-Ag-L2-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白的一片段,

L1是一N端接头,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段,

L2是一C端接头, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒,

且V1是来自与V2不同病毒的蛋白的片段;

(dd) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白,

L1是一N端接头,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段,

L2是一C端接头, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且V2是来自与V1不同病毒的蛋白的片段;

(ee) V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白的一片段,

L1是一N端接头,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段,

L2是一C端接头, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒,

且V1是来自与V2不同病毒的蛋白的片段;

(ff) V1-Ag-V2, 其中

V1是一N端病毒结构蛋白,

Ag是一病原体的抗原或抗原片段, 以及

V2是一C端病毒结构蛋白的一片段,

其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒, 且

V2是来自与V1不同病毒的蛋白的片段; 或

(gg) V1-Ag-V2, 其中

- V1是一N端病毒结构蛋白的一片段，
Ag是一病原体的抗原或抗原片段，以及
V2是一C端病毒结构蛋白，
其中V1及V2能够单独或共同形成一病毒样颗粒，
且V1是来自与V2不同病毒的蛋白的片段。
2. 如权利要求1的融合蛋白，其中Ag选自于下列组成的群组：
- (a) 来自一病毒病原体的一抗原肽、多肽或蛋白，
 - (b) 来自一细菌病原体的一抗原肽、多肽或蛋白，
 - (c) 来自一寄生病原体的一抗原肽、多肽或蛋白，
 - (d) 来自一真菌病原体的一抗原肽、多肽或蛋白，以及
 - (e) 来自一感染性蛋白颗粒的一抗原肽、多肽，或蛋白。
3. 如权利要求1的融合蛋白，其中V1及V2选自于下列组成的群组：病毒壳蛋白与病毒包膜蛋白。
4. 如权利要求1的融合蛋白，其中V1及V2选自于下列组成的群组：
- (a) B型肝炎病毒的HBc，
 - (b) B型肝炎病毒衍生的小型表面抗原 (HBsAg)，
 - (c) 诺罗病毒壳蛋白VP1的S结构域，
 - (d) 诺罗病毒壳蛋白VP1的P结构域，
 - (e) 人类轮状病毒VP2，
 - (f) 人类轮状病毒VP6，
 - (g) 人类乳突病毒的L1主要壳蛋白，
 - (h) 人类多瘤性病毒的VP1，
 - (i) 人类JC病毒的VP1，
 - (j) 人类第二型腺相关病毒的VP2，
 - (k) 人类第二型腺相关病毒的VP3，
 - (l) E型肝炎病毒壳蛋白VP1的S与P1结构域，以及
 - (m) E型肝炎病毒壳蛋白VP1的P2结构域。
5. 如权利要求1的融合蛋白，其中 (a)、(b) 或 (c) 的V1及V2是相同的病毒结构蛋白。
6. 如权利要求1的融合蛋白，其中 (a)、(b) 或 (c) 的V1及V2是相同病毒的不同病毒结构蛋白。
7. 如权利要求1的融合蛋白，其中 (a)、(b) 或 (c) 的V1及V2是不同病毒的病毒结构蛋白。
8. 如权利要求1的融合蛋白，其中V1及V2至少一者在该融合蛋白、该病毒样颗粒、或该融合蛋白以及该病毒样颗粒中具有免疫原性。
9. 如权利要求1的融合蛋白，其中V1及V2在该融合蛋白、该病毒样颗粒、或该融合蛋白以及该病毒样颗粒中皆具有免疫原性。
10. 如权利要求1的融合蛋白，其中 (a)、(b)、(d)、(e)、(g)、(h)、(j)、(k)、(m)、(n)、(p) - (s)、(v) - (y) 或 (bb) - (ee) 的L1及L2中至少一者选自于下列组成的群组：柔性接头、可切割接头、刚性接头，以及非结构的随机螺旋肽。
11. 如权利要求1的融合蛋白，其中 (a)、(d)、(g)、(j)、(m)、(p)、(q)、(v)、(w)、(bb) 或

(cc)的L1及L2是相同的接头。

12. 如权利要求1的融合蛋白,其中(a)、(d)、(g)、(j)、(m)、(p)、(q)、(v)、(w)、(bb)或(cc)的L1及L2是不同的接头。

13. 一种重组核酸表达载体,包含编码如权利要求1的融合蛋白的多核苷酸。

14. 一种宿主细胞,包含如权利要求13的重组核酸表达载体。

15. 一种病毒样颗粒,包含如权利要求1的融合蛋白。

16. 一种医药组合物,包含如权利要求15的病毒样颗粒与一医药上可接受的载剂。

17. 一种医药组合物,包含如权利要求1的融合蛋白与一医药上可接受的载剂。

18. 一种制备病毒样颗粒的方法,该方法包含在允许该融合蛋白表达的条件下培养如权利要求14的宿主细胞,以及组装该融合蛋白以形成该病毒样颗粒。

19. 一种如权利要求1的融合蛋白在制造用以在哺乳类动物个体体内诱导免疫反应的药物的用途。

20. 一种如权利要求15的病毒样颗粒在制造用以在哺乳类动物个体体内诱导免疫反应的药物的用途。

病毒样颗粒疫苗

[0001] 本案主张美国临时申请案号62/034,475的优先权,其于2014年8月7日提出申请,以引用的方式并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学、生物化学,和遗传学的领域。具体而言,本发明涉及包含病毒样颗粒的免疫原性组合物,该病毒样颗粒包含融合蛋白,该融合蛋白包含病原体的抗原肽序列、病毒结构肽,以及,选择性地,一或多个接头(Linker),其中该病毒结构肽本身可能具备或不具免疫原性,若包含接头,其与该抗原或抗原片段以及该病毒结构蛋白相链接。本发明亦提供以本发明的融合蛋白引发免疫反应的方法。

背景技术

[0003] 疫苗一般包括减毒病毒,或其它减毒微生物,或其组合。尽管这种疫苗可能产生强烈的免疫反应,它们具有回复到可能会伤害病人的感染性形式的风险。包含重组抗原的现有疫苗具有较低的感染风险,但他们往往引发较弱的免疫反应。传统的重组抗原疫苗之所以引发较弱的免疫反应,原因之一在于此类疫苗阻碍了重组抗原成为能够引起接种疫苗者最佳免疫反应的构形。

[0004] 病毒样颗粒(Virus-like particles,VLPs)在形态和结构上类似于病毒,提供了一个平台,用于以高免疫原性的形式在病毒样颗粒的表面呈现蛋白质。虽然病毒样颗粒包含病毒结构蛋白,但它们并不包含病毒基因组物质。

[0005] 相较于其他疫苗平台,病毒样颗粒具有几个优点。首先,病毒样颗粒比活化疫苗或减毒疫苗更安全,因为病毒样颗粒缺乏感染性遗传物质,可透过设计以排除具免疫抑制性的病毒蛋白,且不会回复到感染状态。第二,病毒样颗粒在非哺乳类动物细胞株中容易产生,从而提高生产速度、规模可扩展性和成本效益。第三,即使不含佐剂,病毒样颗粒通常能够诱导持续高含量的中和抗体产生,至少部分原因是它们高度有序的结构,这有利于呈现抗原决定簇。第四,病毒样颗粒可以作为异源抗原的呈现平台。第五,病毒样颗粒往往可以打破B细胞耐受性并诱导自我调节的自生抗体。第六,病毒样颗粒可携带抗原性抗原决定簇至第一类与第二类主要组织相容性复合体(MHC)两种途径。

[0006] 因为具备这些优点,病毒样颗粒已被用来作为用于附着或呈现外来抗原供免疫系统辨识的平台。然而,在传统的方法中,抗原与单一病毒结构蛋白相融合,且通常位于该病毒结构蛋白的一个圈环结构(loop structure)内。这样的结构在本文中称为“单体融合蛋白”。“单体融合蛋白”一词是指融合至单一病毒结构蛋白的N-或C-端的抗原或抗原片段,或是抗原或抗原片段置于单一病毒结构蛋白的一个圈环区域内的抗原或抗原片段。这种单体的配置会干扰抗原的折叠,特别是当抗原较大或其立体构形包含较复杂的折叠模式时,并且因为它们没有充分保持原始抗原构型,因此多数单体融合蛋白并不成功。包含或类似于原始构形的抗原构形在免疫系统识别中扮演重要的角色,然而以单体融合蛋白呈现抗原或抗原片段时,许多抗原与抗原片段无法维持或足以类似于其原始构形。因此,有必要开发一

种新的病毒样颗粒疫苗平台。

发明内容

[0007] 本发明不同于传统的病毒样颗粒平台,因为它不是用一个单体融合蛋白的设计。相反的,本发明包含非单体融合蛋白的设计,例如,一种二聚体融合蛋白的设计。“二聚体融合蛋白”一词是指一抗原或抗原片段的N-端,以接头或不以接头,融合于N-端病毒结构蛋白的C-端(亦即,一病毒结构蛋白位于该抗原的N端),且该抗原或抗原片段的C-端,以接头或不以接头,融合于C-端病毒结构蛋白的N-端(亦即,一病毒结构蛋白位于该抗原的C端)。相较于现有技术的平台,本发明的融合蛋白所包含的抗原或抗原片段,其构形具有增强或以其他方式优化个体免疫反应的能力。在某些具体实施例中,该构形类似存在于原始或其它非重组情况下的抗原或抗原片段的构形。本发明提供的抗原呈现平台,藉由降低或以其他方式改变蛋白质折叠时的立体阻碍及其他阻碍因素,有助于使抗原或其片段折叠成包含或类似于其原始构形的构形。

[0008] 本发明亦不同于传统的病毒样颗粒的平台,因为它不使用抗原或抗原片段置于病毒结构蛋白的圈环区域或融合到单一病毒结构蛋白末端的设计。相反地,本发明所包含的抗原置于两个病毒结构蛋白或其片段之间,且抗原与病毒结构蛋白之间可置入或不置入接头,前揭配置方式使得该病毒结构蛋白和选择性(optional)的接头将不会受到该抗原存在的影响,同时病毒结构蛋白及接头亦不会阻碍抗原折叠成包含或类似于原始构形的构形。在一些具体实施例中,病毒结构蛋白及/或选择性的接头将促进抗原折叠成包含或类似于原始构形的构形。

[0009] 本发明的设计使抗原更易于折叠成包含或类似的原始构形的构形,这有助于诱导个体的免疫反应。本发明之所以能达到此效果,至少部分是因为本发明的抗原和抗原片段,置于本融合蛋白及其所形成的病毒样颗粒中,较可能呈现出包含或类似于原始构形的构形。

[0010] 本发明的设计使具有抗原性的融合蛋白组合成为病毒样颗粒结构,且该病毒样颗粒结构所引起的免疫原性是超越传统平台的效果。相较于现有技术的设计,亦即抗原置于病毒结构蛋白的圈环区域,或抗原或抗原片段置于病毒结构蛋白的N-或C-端,本发明之所以能达到此效果,至少部分是因为本发明中的抗原或抗原片段比较不会阻碍病毒结构蛋白的折叠,或病毒结构蛋白比较不会阻碍抗原或抗原片段的折叠,或以上两个原因都存在。

[0011] 本发明的融合蛋白,因为较可能折叠成包含或类似于原始构形的构形,使本发明也可用以制造多价疫苗,除了抗原蛋白,也可以使病毒结构蛋白具备较强的免疫原性。

[0012] 在本发明中,意外地在本新颖的平台中发现优化的免疫原性和更佳的多价疫苗潜力,该平台包含含有抗原的重组融合蛋白,其中该抗原的N-端,以接头或不以接头,融合于N-端病毒结构蛋白,而且该抗原的C-端,以接头或不以接头,融合于C-端病毒结构蛋白,且其中该病毒结构蛋白能单独或共同形成病毒样颗粒。本发明的融合蛋白能够形成新颖的病毒样颗粒平台,该平台可以将该抗原以包含或类似其原始构形的构形来呈现,并以稳定且重复的方式呈现,因而作为一种能够有效产生T及/或B细胞介导的免疫力的疫苗。

[0013] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端

接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒。

[0014] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,以及V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒。

[0015] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒。

[0016] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1和V2是相同的。

[0017] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1和V2是相同的。

[0018] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中每个V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1和V2是相同的。

[0019] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1和V2是来自相同病毒的不同蛋白的片段。

[0020] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2是能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1和V2是来自相同病毒的不同蛋白的片段。

[0021] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1和V2都来自相同病毒的不同蛋白的片段。

[0022] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1和V2是来自不同病毒的蛋白的片段。

[0023] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1和V2是来自不同病毒的蛋白的片段。

[0024] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1和V2是来自不同病毒的蛋白的片段。

[0025] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且其中该片段是来自相同病毒结构蛋白的不同部分,且V1和V2的氨基酸序列长度总和小于该病毒结构蛋白的完整氨基酸序列长度。

[0026] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且其中该片段来自相同病毒结构蛋白的不同部分,且V1和V2的氨基酸序列长度总和小于该病毒结构蛋白的完整氨基酸序列长度。

[0027] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且其中该片段是来自相同病毒结构蛋白的不同部分,且该V1和V2的氨基酸序列长度总和小于该病毒结构蛋白的完整氨基酸序列长度。

[0028] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,L1是一N-端接头,Ag是一种病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V2是V1的片段。

[0029] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1是V2的片段。

[0030] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V2为V1的片段。

[0031] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1是V2的片段。

[0032] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V2是V1的片段。

[0033] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一

N-端病毒结构蛋白的片段,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1是V2的片段。

[0034] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V2为来自与V1相同病毒的不同蛋白的片段。

[0035] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且其V1是来自与V2相同病毒的不同蛋白的片段。

[0036] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且其V2为来自与V1相同病毒的不同蛋白的片段。

[0037] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1是来自与V2相同病毒的不同蛋白的片段。

[0038] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V2为来自与V1相同病毒的不同蛋白的片段。

[0039] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1是来自与V2相同病毒的不同蛋白的片段。

[0040] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V2为来自与V1不同病毒的蛋白的片段。

[0041] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1为来自与V2不同病毒的蛋白的片段。

[0042] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V2是来自与V1不同病毒的蛋白的片段。

[0043] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合

蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,L1是一N-端接头,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,L2是一C-端接头,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1是来自与V2不同病毒的蛋白的片段。

[0044] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白的片段,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V2是来自与V1不同病毒的蛋白的片段。

[0045] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种包含V1-Ag-V2的融合蛋白,其中V1是一N-端病毒结构蛋白的片段,Ag是一病原体的抗原或抗原片段,而V2是一C-端病毒结构蛋白,且其中V1和V2能够单独或共同形成病毒样颗粒,且V1是来自与V2不同病毒的蛋白的片段。

[0046] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中Ag选自于下列组成的群组:(a)来自一病毒病原体的一抗原肽、多肽,或蛋白,(b)来自一细菌病原体的一抗原肽、多肽,或蛋白,(c)来自一寄生病原体的一抗原肽、多肽,或蛋白,(d)来自真菌病原体的一抗原肽、多肽,或蛋白,以及(e)来自感染性蛋白颗粒的一抗原肽、多肽,或蛋白。

[0047] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中V1和V2是来自于以下的病毒结构蛋白:

[0048] a.腺病毒科的成员(包括,例如,鸟类腺病毒属、禽类腺病毒属、鱼类腺病毒属、美洲白鲟腺病毒属,和唾液酸酶腺病毒属的成员);

[0049] b.指环病毒科的成员(包括,例如,甲型细环病毒属的成员);

[0050] c.沙状病毒科的成员(包括,例如,沙状病毒属的成员);

[0051] d.动脉炎病毒科的成员(包括,例如,动脉炎病毒属的成员);

[0052] e.星状病毒科的成员(包括,例如,禽肾炎病毒属、牛星状病毒属、獐鹿星状病毒属、鸡星状病毒属、鸭星状病毒属、猫星状病毒属、人类星状病毒属、哺乳动物星状病毒属、水貂星状病毒属、绵羊星状病毒属、猪星状病毒属,和土鸡星状病毒属的成员);

[0053] f.玻那病毒科的成员(包括,例如,玻那病毒属的成员);

[0054] g.布尼亚病毒科的成员(包括,例如,汉他病毒属、奈洛病毒属、布尼亚病毒属、白蛉热病毒属,和西红柿斑萎病毒属的成员);

[0055] h.杯状病毒科的成员(包括,例如,兔类病毒属、诺博病毒属、诺罗病毒属、沙波病毒属,和囊泡状病毒属的成员);

[0056] i.冠状病毒科的成员(包括,例如,甲型冠状病毒属、乙型冠状病毒属、丁型冠状病毒属,和丙型冠状病毒属的成员);

[0057] j.丝状病毒科的成员(包括,例如,奎瓦病毒属、伊波拉病毒属,和马尔堡病毒属的成员);

[0058] k.黄病毒科的成员(包括,例如,肝炎病毒属、黄病毒属、佩基病毒属,和瘟疫病毒属的成员);

[0059] l.肝病毒科的成员(包括,例如,禽肝病毒属和正肝病毒属的成员);

[0060] m.肝炎病毒科的成员(包括,例如,正肝炎病毒属和鱼肝炎病毒属的成员);

[0061] n.疱疹病毒科的成员(包括,例如,巨细胞病毒属、传染性喉气管炎病毒属、淋巴潜伏病毒属、马卡病毒属、马立克病毒属、老鼠细胞巨大型病毒属、马疱疹病毒属、长鼻动物病毒属、猴病毒属、玫瑰疹病毒属、盾病毒属、单纯疱疹病毒属,和水痘病毒属的成员);

[0062] o. 正黏液病毒科的成员(包括,例如,A型流感病毒属、B型流感病毒属、C型流感病毒属、传染性鲑鱼贫血病毒属、夸兰菲病毒属,和托高土病毒属的成员);

[0063] p. 乳头瘤病毒科的成员(包括,例如,甲型乳头瘤病毒属、乙型乳头瘤病毒属、丙型乳头瘤病毒属、丁型乳头瘤病毒属、戊型乳头瘤病毒属、庚型乳头瘤病毒属、壬型乳头瘤病毒属、癸型乳头瘤病毒属、子型乳头瘤病毒属、丑型乳头瘤病毒属、寅型乳头瘤病毒属、辰型乳头瘤病毒属、巳型乳头瘤病毒属、辛型乳头瘤病毒属、戌型乳头瘤病毒属,和己型乳头瘤病毒属的成员);

[0064] q. 副黏液病毒科的成员(包括,例如,水副黏液病毒属、禽副黏病毒属、法拉病毒属、立百病毒属、偏肺病毒属、麻疹病毒属、肺病毒属、呼吸道病毒属、腮腺炎病毒属,和类TPMV病毒属的成员);

[0065] r. 小DNA病毒科的成员(包括,例如,周围浓稠病毒属、貂阿留申小DNA病毒属、平均小DNA病毒属、牛科小DNA病毒属、短浓稠病毒属、科比小DNA病毒属、依赖小DNA病毒属、红小DNA病毒属、黑盆浓稠病毒属、重复小DNA病毒属、潘使代浓稠病毒属、原小DNA病毒属、四小DNA病毒属的成员);

[0066] s. 小RNA病毒科的成员(包括,例如,口蹄疫病毒属、阿葵玛病毒属、禽肝炎病毒属、艾维西病毒属、心病毒属、柯沙病毒属、戴西皮病毒属、肠病毒属、马鼻病毒属、吉力病毒属、肝病毒属、哈尼病毒属、嵴病毒属、关山崎病毒属、马格利病毒属、密司奇病毒属、马沙病毒属、奥西病毒属、双埃柯病毒属、帕西病毒属、帕西里病毒属、玫瑰病毒属、沙卡布病毒属、沙力病毒属、扎幌病毒属、塞内卡病毒属、西卡内病毒属、捷申病毒属和震颤病毒属的成员);

[0067] t. 多瘤病毒科的成员(包括,例如,多瘤病毒属、禽多瘤病毒属、正多瘤病毒属,和乌齐多瘤病毒属的成员);

[0068] u. 痘病毒科的成员(包括,例如,甲型昆虫痘病毒属、禽痘病毒属、乙型昆虫痘病毒属、山羊痘病毒属、鹿痘病毒属、鳄痘病毒属、丙型昆虫痘病毒属、野兔痘病毒属、软疣痘病毒属、正痘病毒属、副痘病毒属、猪痘病毒属,和亚塔痘病毒属的成员);

[0069] v. 呼肠孤病毒科的成员(包括,例如,水生动物呼肠孤病毒属、心呼肠孤病毒属、科罗拉多壁虱热病毒属、质型多角体病毒属、迪诺维病毒属、斐济病毒属、昆虫非包裹呼肠孤病毒属、原生生物微胞藻呼肠孤病毒属、真菌呼肠孤病毒属、环状病毒、正呼肠孤病毒属、水稻病毒属、植物呼肠孤病毒属、轮状病毒,和东南亚十二RNA病毒属的成员);

[0070] w. 弹状病毒科的成员(包括,例如,细胞质弹状病毒属、短暂热病毒属、狂犬病病毒属、非毒粒蛋白弹状病毒属、细胞核弹状病毒属、佩弹状病毒属、西格马病毒属、使力维病毒属、蒂布鲁病毒属、突跖病毒属,和水泡性病毒属的成员);和

[0071] x. 披膜病毒科的成员(包括,例如,甲病毒属和风疹病毒属的成员)。

[0072] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中V1和V2是选自以下形成病毒样颗粒的病毒多肽,但不限于:(a) B型肝炎病毒的HBc, (b) B型肝炎病毒衍生的小型表面抗原(HBsAg), (c) 诺罗病毒壳蛋白VP1的S结构域, (d) 诺罗病毒壳蛋白VP1的P结构域, (e) 人类轮状病毒VP2, (f) 人类轮状病毒VP6, (g) 人类乳突病毒的L1主要壳蛋白, (h) 人类多瘤性病毒(polyomavirus)的VP1, (i) 人类JC(John Cunningham)病毒的VP1, (j) 人类第二型腺相关病毒(Adeno-associated virus)的VP2, (k) 人类第二型腺相关病毒(Adeno-associated virus)的VP3, (l) E型肝炎病毒壳蛋白VP1的S与P1结构域,以及(m) E型肝炎病

毒壳蛋白VP1的P2结构域。

[0073] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中每个V1及V2选自于下列组成的群组:病毒包膜蛋白与病毒壳蛋白。例如,诺罗病毒的P结构域、诺罗病毒的S结构域,及HBc都是壳蛋白,而HBs则是病毒包膜蛋白。在一个具体实施例中,V1和V2都是病毒壳蛋白。在一个具体实施例中,V1和V2均为包膜蛋白。在一个具体实施例中,V1和V2的一为病毒壳蛋白,且V1和V2的另一是病毒包膜蛋白。

[0074] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中,除非另外指明,V1和V2是相同的病毒结构蛋白。

[0075] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中,除非另外指明,V1和V2是相同病毒的不同病毒结构蛋白。

[0076] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中,除非另外指明,V1和V2是不同病毒的病毒结构蛋白。

[0077] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中V1及V2至少一者在该融合蛋白、该病毒样颗粒、或该融合蛋白以及该病毒样颗粒中具有免疫原性。

[0078] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中V1及V2在该融合蛋白、该病毒样颗粒、或该融合蛋白以及该病毒样颗粒中皆具有免疫原性。

[0079] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中L1及L2中至少一者选自于下列组成的群组:柔性接头、可切割接头、刚性接头,以及非结构的随机螺旋肽。

[0080] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中L1和L2是相同的接头。

[0081] 在一个具体实施例中,本发明提供了任何上述的融合蛋白,其中L1和L2是不同的接头。

[0082] 在一个具体实施例中,本发明提供了包含编码任何上述的融合蛋白的多核苷酸的重组核酸表达载体。

[0083] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种宿主细胞,其包含含有编码上述任意的融合蛋白的多核苷酸的重组核酸表达载体。

[0084] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种病毒样颗粒,其包含任何上述的融合蛋白。

[0085] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种医药组合物,其包含一病毒样颗粒,该病毒样颗粒包含任何上述的融合蛋白和一医药上可接受的载剂。

[0086] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种医药组合物,其包含任何上述的融合蛋白和一医药上可接受的载剂。

[0087] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种在哺乳类动物个体中诱导免疫反应的方法,包含向该个体施用一种医药组合物,其包含病毒样颗粒,该病毒样颗粒包含任何上述的融合蛋白和医药上可接受的载剂,其含量达到足以在个体体内产生免疫反应。

[0088] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种在哺乳类动物个体中诱导免疫反应的方法,包含向该个体施用一种医药组合物,其包含任何上述的融合蛋白和医药上可接受的载剂,其含量达到足以在个体体内产生免疫反应。

[0089] 在一个具体实施例中,本发明提供了一种制备病毒样颗粒的方法,其包含在允许

该融合蛋白表达的条件下培养宿主细胞,该宿主细胞包含含有编码任何上述的融合蛋白的多核苷酸的重组核酸表达载体,以及组装该融合蛋白以形成该病毒样颗粒。

[0090] 在一个具体实施例中,本发明提供如本文所述的融合蛋白或病毒样颗粒在制备一种用以在哺乳类动物个体体内诱导免疫反应的药物的用途。

附图说明

[0091] 前面的概述,以及本发明以下的详细描述,在结合附图一起阅读时将可以被更好地理解。为了说明本发明,所附图式示出一些,但不是所有的,可替代的具体实施例。然而,应该理解的是,本发明并不限于所示的精确安排和手段。这些图式,其被并入并构成说明书的一部分,有助于解释本发明的原理。

[0092] 图1例示实施例中所使用的病毒样颗粒(VLP)模板的示意结构。如图1A所示,VLP模板包含一或多个N-或C-端标签、二个病毒结构蛋白(VP1和VP2)、一抗原,以及连接该病毒结构蛋白与该抗原的接头。图1B描绘了在该实施例中所使用的接头系统。

[0093] 图2例示以下的重组VLP蛋白的表达:SP-GG、SP-GE、SP-GR、SP-EG、SP-EE、SP-ER、SP-RG、SP-RE和SP-RR。重组病毒样颗粒蛋白于毕赤酵母菌GS115中表达,经过1%甲醇的诱导。24小时后,以法国压力机(20,000psi,一次)收集并均质化细胞沉淀物。分别取10 μ L的全部均质物(T)、上清液(S)或沉淀物(P)以WesternBlot法、使用抗His标签初级抗体进行分析。

[0094] 图3例示带有C-端标记的VP1的表达(图3A)和以下带有C-端标记的VLP重组蛋白(图3B): Δ SP-GG-VP1-C、 Δ SP-GE-VP1-C、 Δ SP-GR-VP1-C、 Δ SP-EG-VP1-C、 Δ SP-EE-VP1-C、 Δ SP-ER-VP1-C、 Δ SP-RG-VP1-C、 Δ SP-RE-VP1-C、 Δ SP-RR-VP1-C。该重组蛋白于毕赤酵母菌GS115中表达,经过1%甲醇的诱导。24小时后,以法国压力机(20,000psi,一次)收集并均质化细胞沉淀物。分别取10 μ L的全部均质物(T)、上清液(S)或沉淀物(P)以Western Blot法、使用抗EV71VP1初级抗体进行分析。

[0095] 图4例示N-端标记的HA1(图4A)和SP-EE-HA1重组VLP蛋白(图4B)的表达。该重组蛋白于毕赤酵母菌GS115中表达,经过1%甲醇的诱导。24小时后,以法国压力机(20,000psi,一次)收集并均质化细胞沉淀物。分别取10 μ L的全部均质物(T)、上清液(S)或沉淀物(P)以WesternBlot法、使用抗His标签初级抗体进行分析。

[0096] 图5例示SP-RE-M2e重组VLP蛋白的表达。重组VLP蛋白于毕赤酵母菌GS115中表达,经过1%甲醇的诱导。24小时后,以法国压力机(20,000psi,一次)收集并均质化细胞沉淀物。分别取10 μ L的全部均质物(T)、上清液(S)或沉淀物(P)以WesternBlot法、使用抗His标签初级抗体进行分析。N=甲醇诱导的GS115。

[0097] 图6例示了SH-GR-VP1重组VLP蛋白的表达。重组VLP蛋白于毕赤酵母菌GS115中表达,经过1%甲醇的诱导。24小时后,以法国压力机(20,000psi,一次)收集并均质化细胞沉淀物。分别取10 μ L的全部均质物(T)、上清液(S)或沉淀物(P)以WesternBlot法、使用抗VP1初级抗体进行分析。

[0098] 图7A例示以下重组VLP蛋白产生的病毒样颗粒以蔗糖梯度(Sucrose gradient)分析的结果:SP-GG、SP-GE、SP-GR、SP-EG、SP-EE、SP-ER、SP-RG、SP-RE、SP-RR、 Δ SP-GG-VP1-C、 Δ SP-GE-VP1-C、 Δ SP-GR-VP1-C、 Δ SP-EG-VP1-C、 Δ SP-EE-VP1-C、 Δ SP-ER-VP1-C、 Δ SP-

RG-VP1-C、 Δ SP-RE-VP1-C、 Δ SP-RR-VP1-C。图7B显示SP-EE-HA1重组VLP蛋白产生的病毒样颗粒以蔗糖梯度分析的结果。图7C显示SP-RE-M2e重组VLP蛋白产生的病毒样颗粒以蔗糖梯度分析的结果。图7D显示SH-GR-VP1重组VLP蛋白产生的病毒样颗粒以蔗糖梯度分析的结果。酵母均质物上清液中的病毒样颗粒是以10-50%的蔗糖梯度(35,000rpm离心4小时)进行分析。从上到下收集十一个馏分物,每个1mL。以Western Blot法、使用抗His标签或抗VP1初级抗体分析重组VLP蛋白的分布,如图所示。IP=输入。SP-(3 $\times$ 3)、SP-(3 $\times$ 3)-HA1、SP-(3 $\times$ 3)-M2e、和SH-(3 $\times$ 3)-VP1是具有N-端标记的构建体。 Δ SP-(3 $\times$ 3)-VP1-C是具有C-端标签的构建体。

[0099] 图8例示SP-GG-VP1病毒样颗粒的电子显微镜照片(0.5 μ g/ μ L Δ SP-GG-VP1-C进行3分钟,1%UA处理30秒)。蛋白质样品吸附在碳-弗姆瓦-涂覆的铜网上,并以1%乙酸双氧铀水溶液进行负染色。在80kV和100kV的条件下以JEM-1230电子显微镜(JEOL有限公司,东京,日本)检查网格。

[0100] 图9例示实施例中使用的类病毒S-VP1-S颗粒(VLP)模板的示意结构。该VLP模板包含,从N-端到C-端为:N-端标签、诺罗病毒S结构域、(G4S)₂柔性接头、EV71VP1、(G4S)₂柔性接头、诺罗病毒S结构域、(G4S)₂柔性接头。

[0101] 图10例示S-VP1-S病毒样颗粒的透射电子显微照片。8 μ g的S-VP1-S病毒样颗粒被吸附到铜网格(300目)在室温下进行3分钟。该网格是用滤纸缓慢的干燥。在以1%乙酸双氧铀水溶液染色30秒后,移除过量的液体。在80kV的条件下以JEM-1400电子显微镜检查网格。

[0102] 图11例示对获自以S-VP1-S病毒样颗粒免疫的小鼠的抗血清的Western Blot法分析。使用来自EV71-感染的RD细胞裂解物所制备的20 μ g蛋白质作为起始材料,并使用稀释1:500与1:1000倍的来自以10 μ g的S-VP1-S病毒样颗粒进行初次免疫(第一次)、促进一次免疫(第二次)以及促进二次免疫(第三次)的小鼠的抗血清来进行Western Blot分析。使用稀释1:1000倍的抗VP1单克隆抗体(0.5 μ g/ μ L, Abnova公司,型号MAB1255-M05)作为对照组。

[0103] 图12例示表示在接种S-VP1-S病毒样颗粒的小鼠体内的EV71B4中和抗体效价的图形。50 μ L的100TCID₅₀的EV71B4与50 μ L的来自只免疫VP1-S-S、和S-VP1-S蛋白的小鼠的2倍系列稀释的血清混合。病毒-血清混合物在37 $^{\circ}$ C下培养2小时,然后加入到2 $\times$ 10⁴细胞/孔的Vero细胞。经过4天的培养,以100 μ L/孔的3.7%甲醛(用1 $\times$ PBS稀释)固定细胞。在室温(RT)1小时后,以结晶紫溶液对细胞染色。在这样的稀释条件中,以超过50%的保护率来决定中和效价。

具体实施方式

[0104] 应当理解的是,前述一般描述和下面的详细描述都是示例性和说明性的,但并非用以限制本发明所请的权利。本发明的一个或多个具体实施例的某些细节阐述于以下说明中。从以下代表性实施例的非穷举的列表中,亦从所附的权利要求中,本发明的其它特征或优点将是显而易见的。

[0105] 如上所述,传统的病毒样颗粒的平台是将抗原连接至单一病毒结构蛋白,且通常是置于在一圈环(loop)结构内。但这样的构形通常阻碍了该抗原的折叠并导致免疫原性降低。本发明不采用典型单体融合蛋白的设计,即包含非单体融合蛋白设计,且令人惊讶地,相较于传统设计,其允许更好的抗原折叠和提升抗原免疫原性,并提供可选择的多价性,例

如,透过选用一个或多个具免疫原性的病毒结构蛋白。

[0106] 本发明是基于关于融合蛋白的数个发现,其能够组合成病毒样颗粒,并且包含至少两个病毒结构蛋白,至少一抗原或抗原片段,以及选择性的一个或多个接头。首先,本发明是基于以下发现:该融合蛋白呈现抗原或抗原性片段的方式,相较于许多其他呈现抗原的病毒样颗粒,能促使抗原或抗原片段折叠成为具免疫原性的构形。第二,本发明是基于以下发现:该融合蛋白可选择性地包含具有免疫原性的病毒结构蛋白,在至少一些情况下,免疫原性是单独来自于该融合蛋白,与抗原或抗原片段的免疫原性无关。

[0107] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域中的技术人员所通常理解相同的含义。

[0108] 如本文所用,冠词“一”、“一个”和“任何”是指一个或多于一个(即至少一个)的物品的文法受词。例如,“一组件”意指一个组件或多于一个组件。

[0109] 如本文所用,“佐剂”一词是指一种试剂,若施用到已经施用、同时施用、或将会施用本发明的组合物的个体,其能够有助于改变在未施用佐剂时将会产生的免疫反应。佐剂通常用于增强疫苗的效力。经由依赖佐剂的变化,这样的增强可发生于:细胞毒性T淋巴细胞反应的免疫调节、呈现、目标、囤积产生、诱导,或其组合。为了促进改变的免疫反应,佐剂不一定需要(i)经由相同的方式施用;(ii)施用到相同位置或目标组织;或(iii)在施用本发明的组合物之前、同时,或任何其他时间顺序关系。佐剂的类型可包括,但不限于,铝盐、细菌毒素、碳水化合物聚合物、细胞因子、衍生化多糖体、免疫刺激复合物、脂质A、脂质体、胞壁酰二肽衍生物、奈米-及微米颗粒、非离子型阻断共聚物、非颗粒佐剂、水包油乳剂、颗粒佐剂、皂甙、油包水乳剂,或其组合。

[0110] 如本文所用,“抗原”一词是指能够被抗体或,若是由MHC分子呈现的话,被T-细胞受体(TCR)结合的分子。如本文所用的“抗原”一词,也包括T细胞抗原决定簇。抗原另外也具有一或多个以下的特性:被免疫系统识别;诱导体液免疫反应;及/或诱导细胞免疫反应。然而,至少在某些情况下,抗原可能需要包含或与一个T细胞抗原决定簇结合,及/或给与额外的一佐剂,但不一定有任何特定时间顺序关系。抗原可以具有一个或多个抗原决定簇(B和T抗原决定簇)。上面提到的特异性反应是指用以指示该抗原将有可能发生反应,通常是以一个高度选择性的方式,与其相应的抗体或TCR,而不与众多可由其它抗原诱发的其它抗体或TCR。抗原如本文所用也可以是一个以上的个别的抗原或抗原片段的混合物。

[0111] “融合蛋白”一词是指包含通过肽键连接的氨基酸的非天然存在的序列的蛋白质。融合蛋白不会在天然情况下,但会在人为操作下产生。如本文所用,“融合蛋白”一词是指至少一种病毒结构蛋白融合到至少一个抗原或抗原片段,以及选择性地,一个或多个接头。例如,融合蛋白可以包含抗原,其中该抗原的N-或C-端,带有或不带有接头,融合于病毒结构蛋白的C-或N-端。在另一实例中,融合蛋白可以包含具有圈环区域的病毒结构蛋白,其中该圈环区域的氨基酸序列已被修改为在该圈环区域内编码一或多个抗原或抗原片段,以及选择性地,一或多个接头。在另一实例中,融合蛋白可包含一个抗原,其中该抗原的N-端,带有或不带有接头,融合于一N-端病毒结构蛋白,且该抗原的C-端,带有或不带有接头,融合于一C-端病毒结构蛋白。组成融合蛋白的病毒结构蛋白能够单独或共同组合为大分子结构,如,例如,病毒样颗粒。

[0112] 在本申请案中,当用于与病毒结构蛋白或接头有关时,“N-端”一词是指病毒结构

蛋白或接头位于该融合蛋白的抗原或抗原片段的N-端。同样地,当用于与病毒结构蛋白或接头有关时,“C-端”是指病毒结构蛋白或接头位于该融合蛋白的抗原或抗原片段的C-端。

[0113] 如本文所用,“宿主细胞”一词是指单细胞的原核或真核生物体,包括但不限于:放线菌、古细菌、细菌和酵母菌。宿主细胞还可以是单细胞,包括但不限于培养细胞-来自高阶生物体如植物和动物,包括但不限于脊椎动物,如哺乳动物和无脊椎动物如昆虫。

[0114] 如本文所用,“免疫反应”一词是指体液免疫反应和细胞免疫反应的至少一种,导致B淋巴细胞、T淋巴细胞,及/或抗原呈现细胞的至少一种的活化或增殖。在一些情况下,免疫反应可能具有低强度及/或仅当除了但不一定必要在任何特定的时间顺序关系,施用融合蛋白及/或本发明的病毒样颗粒,以及施用至少一种佐剂时可能变得可被检测的。“免疫原”意指刺激免疫系统的试剂,使得免疫系统的至少一个功能是直接被该免疫原所改变。免疫原可以包括但不限于,例如,引起体液免疫反应和细胞免疫反应至少一种的免疫原性蛋白质,无论单独或与载体一起,以及佐剂的存在与否。抗原呈现细胞被活化是可能的。相对于未施用该试剂的免疫反应,施用该免疫原试剂在任何方面具有有益的改变时,则免疫反应被“强化”。例如,分泌的细胞因子或诱导的抗体的量或类型可以被改变。

[0115] 如本文所用,“接头”一词意指至少一个氨基酸残基,连接抗原与病毒结构蛋白或以其他方式使两者相连接。接头的氨基酸残基可能是由天然存在的氨基酸或本领域中已知的非天然氨基酸,全L型或全D型,或其组合所组成。“接头”一词不应被解释为是指该接头仅仅由氨基酸残基所组成,即使这样的接头被包含在本发明的一个特定备选的具体实施例中。本发明还包括不具有任何的氨基酸残基或具有至少一个氨基酸残基的接头,其包含具有巯基或半胱氨酸残基的分子。这样的分子可能包含C1-C6烷基-环烷基(C5,C6)、芳基或杂芳基部分。该接头与抗原和病毒结构蛋白质中的至少一种之间,可能是通过至少一个共价键的方式,并可能通过至少一个肽键的方式连接。此外,本发明包括柔性接头、刚性接头、可切割接头、非结构的随机螺旋肽,或其组合。柔性接头可以,但不一定,包含至少一个小氨基酸,无论是极性或非极性。它们可以提供增强的与实体相关联的柔性和移动性。至少一种其它氨基酸残基的并入,包括但不限于丝氨酸或苏氨酸,有助于在含水条件下维持该接头的稳定性,可能但不必要是透过与水分子形成氢键以及减少接头和相关的实体之间不利的交互作用来达成。刚性接头可以,但不一定,包含至少一种 α 螺旋结构、富含脯氨酸的序列,或其组合。它们可以提供相关的实体之间的固定距离,有助于防止阻碍,例如,功能的阻碍。切割接头可以但不一定,包含至少一个双硫键、凝血酶敏感序列、蛋白酶敏感序列,或其组合。非结构的随机螺旋肽接头可以但不一定,包含富含甘氨酸的区域、显著的任何长度的未折叠特征,或其组合。

[0116] 如本文所用,“核苷酸”一词意指包含连接到糖磷酸盐的氮碱基的单体,该糖磷酸盐含糖,如核糖或2'-脱氧核糖,连接到一个或多个磷酸基。“多核苷酸”和“核酸”意指包含超过一个的核苷酸单体的聚合物,其中该单体通常被糖-磷酸主链的糖-磷酸键所连接。多核苷酸不必只包含一个类型的核苷酸单体。例如,包含一个给定的多核苷酸的核苷酸可以仅为核糖核苷酸、仅为2'-脱氧核糖核苷酸,或核糖核苷酸和2'-脱氧核糖核苷酸二者的组合。多核苷酸包括天然存在的核酸,例如脱氧核糖核酸(“DNA”)和核糖核酸(“RNA”),以及包含一种或多种非天然存在的单体的核酸类似物。多核苷酸可以被合成,例如,使用自动化DNA合成仪。“核酸”一词通常是指大的多核苷酸。将会理解的是,当核苷酸序列由DNA序列

(即A、T、G、C)所表示,这还包括RNA序列(即A、U、G、C),其中“U”取代“T”。“cDNA”一词意指一种与一mRNA互补或相同的DNA,不论是以单链或双链形式,但在其中的“T”取代“U”。“重组核酸”一词意指具有非天然接合在一起的序列的多核苷酸或核酸。重组核酸可以存在于载体的形式。

[0117] 如本文所用,“病原体”一词意指一种寄生物或其它微生物,或者可能是一个病原性蛋白颗粒,其能够造成在活生物体的免疫反应。这样的寄生物和微生物可以包括但不限于:病毒、细菌、古细菌、原生动物、真菌、藻类、轮虫,和蠕虫。这样病原性蛋白颗粒可能包括与疾病状态相关的异常折叠的蛋白质,该疾病状态包括但不限于,传染性海绵状脑病变,如牛海绵状脑病变、克雅氏病,和绵羊搔痒病。

[0118] 如本文所用,“医药组合物”一词是指任何制剂,其中本发明的该融合蛋白或病毒样颗粒,或其组合,可以被配制、存储、保存、改变、施用、或其组合。如下所述,该制剂可以包含它们的任何医药上可接受的稀释剂、佐剂、缓冲剂、赋形剂、载体或其组合。在一般情况下,该制剂的组成是基于施用的方式和途径,以及标准药理学实行而被选择的。如本文所用,“医药用载体”一词是指任何物质或其组合与本发明的融合蛋白或病毒样颗粒可以是物理或化学地混合、溶解、悬浮,或以其它方式组合以产生本发明的医药组合物。

[0119] 如本文所用,“医药有效量”一词意指能够或足以维持或产生所期望的生理结果的量,包括但不限于,治疗、减轻、消除、基本上防止或预防,或其组合、疾病、病症,或其组合。医药有效量可以包含依序地或同时地施用一个或多个剂量。本发明技术领域的技术人员将知道调节本发明的剂量,以考虑到各种类型的制剂,包括但不限于缓释制剂,用于影响其他能够影响免疫反应的组合物,用于佐剂,或用于其组合。如本文所用,“预防”一词意指能基本上防止或预防疾病、病症,或其组合的任何方面的组合物。如本文所用,“治疗的”一词意指能够治疗、减少、停止进展、减缓进展、有利地改变、消除、或其组合,疾病、病症的任何方面,或其组合的组合物。

[0120] 如本文所用,“蛋白质”一词是指一种分子,其包含通过肽键线性连接的氨基酸。“蛋白质”的这种定义特定包括多肽、寡肽、三肽,和二肽。蛋白质可以以任何方式产生,包括化学合成,并且不必从一特定的核酸分子转译。蛋白质包括具有或不具有表达后修饰如糖基化、乙酰化,和磷酸化的分子。“片段”一词意指包含一氨基酸序列的蛋白质,该序列被另一个特定蛋白质所包含,但含有比该另一特定蛋白质较少的残基。例如,包含氨基酸序列丙氨酸-亮氨酸-甘氨酸的蛋白质的可能的片段为丙氨酸-亮氨酸;亮氨酸-甘氨酸;丙氨酸;亮氨酸;和甘氨酸。

[0121] 如本文所用,“个体”一词意指任何施用本发明的个体。个体可以是,例如,哺乳动物。个体可以是人或兽医动物,不考虑性别、年龄、或它们的任意组合,并且包括胎儿。个体可以选择性地受特定疾病、病症或其组合的影响,或具有风险,或其组合。

[0122] 如本文所用,“疫苗”一词意指一种制剂,其包含本发明的一种或多种融合蛋白、本发明的病毒样颗粒,或其组合,以在能够对个体施用的形式,亦即能够影响个体的免疫反应。在个体体内,疫苗可以是治疗及/或预防特定疾病、病症或其组合。疫苗通常,但不一定,包含制剂的医药有效量。疫苗通常,但不一定,影响在给定的个体内的免疫反应。

[0123] 如本文所用,“载体”一词意指一种藉由核酸可以被引入宿主细胞,以转化该宿主细胞,并促进该核酸的表达的手段。载体可包含给定的目标核苷酸序列以及调节序列。载体

可被用于表达该给定核苷酸序列或维持该给定的核苷酸序列,以复制它、操纵它、改变它、截断它、扩展它,及/或在不同的位置之间转移它(例如,在不同的生物体或宿主细胞或其组合之间)。

[0124] 如本文所用,“病毒结构蛋白”一词意指,有助于病毒的壳蛋白或该蛋白核心的结构的任何蛋白,或在病毒或病毒颗粒中扮演结构的角色,包括但不限于组装、折叠,或其组合。“病毒结构蛋白”一词包括天然病毒蛋白质的序列,以及突变体和保留组合为病毒样颗粒能力的这样的天然蛋白质的变体。本发明的病毒结构蛋白本身可具有免疫原性。病毒结构蛋白可以包括包膜蛋白或核心蛋白。例如,诺罗病毒P结构域、诺罗病毒S结构域,和HBc都是壳蛋白,而HBs则是一种病毒包膜蛋白。在一个具体实施例中,病毒结构蛋白二者都是病毒壳蛋白。在一个具体实施例中,病毒结构蛋白二者均为包膜蛋白。在一个具体实施例中,病毒结构蛋白中的一个病毒壳蛋白,而另一个是病毒包膜蛋白。

[0125] 如本文所用,“病毒样颗粒”(或“VLP”)一词意指一种类似于病毒颗粒的结构。按照本发明的病毒样颗粒是非复制性和非感染性的,因为它缺乏全部或部分的病毒基因组,具体而言是缺乏病毒基因组具复制能力和感染性的部分。按照本发明的病毒样颗粒可能含有与病毒基因组不同的核酸残基。传统的病毒样颗粒包含单体融合蛋白,其包含抗原和病毒结构蛋白,而本发明的病毒样颗粒包含非单体融合蛋白,如二聚体融合蛋白,其包含至少一抗原或抗原性片段、至少两个病毒结构蛋白或其片段,以及选择性的一个或多个接头。该包含病毒样颗粒的融合蛋白通常形成具有固有重复组织的结构,以及,典型地,球形或管形的形状。按照本发明的病毒样颗粒的一个可能的具体实施例是病毒壳蛋白,如相应病毒、噬菌体,或RNA噬菌体的病毒壳蛋白。例如,RNA噬菌体或HBcAgs的壳蛋白具有二十面体对称的球形形式。如本文所用,“类壳蛋白结构”一词意指由病毒结构蛋白次单位所组成的巨大分子组合物,其类似于在上述定义的意义上的壳蛋白形态,但是不同于典型对称组合且维持足够程度的顺序和重复性。为了形成本发明的病毒样颗粒,本发明的融合蛋白可以通过共价方式、非共价方式,或其组合而链接。非共价的连结可以包含,例如,疏水力、静电力、圆周力、范德华力,或其组合。

[0126] 因此,本发明提供了一种重组融合蛋白,其包含至少一种抗原或抗原片段,其中该抗原或抗原片段的每个N-端和C-端,具有或不具有接头,融合到病毒结构蛋白。该病毒结构蛋白能够单独或共同组合成本发明的病毒样颗粒。本发明的病毒样颗粒能够呈现抗原或抗原片段,该抗原或抗原片段包含或类似于其原始构形的构形,通常形成一种稳定和重复的方式,从而可作为产生一种T-及/或B-细胞介导的免疫反应的有效疫苗。

[0127] 如上所讨论,本发明不同于传统的疫苗平台,甚至不同于传统的病毒样颗粒的平台。具体而言,本发明包含在两个病毒结构蛋白或其片段之间置入抗原,病毒结构蛋白与抗原之间置入或不置入接头,使得该结构蛋白不受或相对不受抗原存在的影响,同时抗原亦不受结构蛋白存在的影响。这使得本发明可以产生多价疫苗和增强免疫原性。

[0128] 在一些具体实施例中,在融合蛋白中的抗原可以来自哺乳动物的病毒性病原体的多肽,包括但不限于:肠病毒71型的VP1蛋白、流感病毒的HA蛋白、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、轮状病毒的VP8蛋白、H1N1病毒的M2蛋白、H7N9的F蛋白、马疱疹病毒第1型的糖蛋白14、卡波西肉瘤相关病毒的糖蛋白M、人类疱疹病毒第1型的壳蛋白、分枝杆菌15预测的8.2Kd蛋白、呼肠孤病毒第1型的 σ -1蛋白、仙台病毒的C'蛋白质、三叶草黄色叶脉病毒的多

蛋白、猪腺病毒第3型的六邻体蛋白(病毒粒子组分ii),和人腺病毒第34型的六邻体蛋白。

[0129] 在其他具体实施例中,融合蛋白的抗原可以是来自哺乳动物的细菌病原体的多肽,包括但不限于:假单胞菌物种铁氧还蛋白还原酶组分、大肠杆菌双官能青霉素结合蛋白、伯克霍尔德物种水合酶/醛缩酶PhnE、脑膜炎奈瑟氏球菌推定噬菌体病毒粒子蛋白质、甲烷氧化菌物种甲烷单加氧酶 α 次单位、集胞藻属物种多磷酸外切酶gb、粪产碱菌菲降解基因簇、集胞藻属PCC6803多磷酸激酶、空肠弯曲菌脂多糖生物合成的蛋白质wlaK、不动杆菌属终端烷烃羟化酶、橙色滑柱菌甲基转移酶HgiDIM、结核杆菌假想蛋白Rv0235c、结核分枝杆菌假想蛋白Rv3629c、天蓝色链霉菌A3(2)邻氨基苯甲酸合酶、坚强芽孢杆菌msyB基因、大肠杆菌URF、集胞藻属PCC6803细胞色素C氧化酶次单位I、大肠杆菌49kd蛋白质,和结核分枝杆菌可能的氧化还原酶。

[0130] 在其他具体实施例中,融合蛋白的抗原可以来自哺乳动物的一个寄生病原体的多肽,包括但不限于:疟原虫物种的HRP II、疟原虫物种的pLDH,和疟原虫物种的pAldo。

[0131] 在其他具体实施例中,融合蛋白的抗原可以是来自哺乳动物的真菌病原体的多肽,包括但不限于:杂色曲菌AVS、杂色曲菌AVL、杂色曲菌AveX、黄曲菌Asp f1 1、烟曲菌Asp f 1、烟曲菌Asp f 2、烟曲菌Asp f 3、烟曲菌Asp f 4、烟曲菌Asp f 5、烟曲菌Asp f 6、烟曲菌Asp f 7、烟曲菌Asp f 8、烟曲菌Asp f 9、烟曲菌Asp f 10、烟曲菌Asp f 11、烟曲菌Asp f 12、烟曲菌Asp f 13、烟曲菌Asp f 15、烟曲菌Asp f 16、烟曲菌Asp f 17、烟曲菌Asp f 18、烟曲菌Asp f 25W、烟曲菌Asp f 23、烟曲菌Asp f 27、烟曲菌Asp f 28、烟曲菌Asp f 29、黑曲菌Asp n 14、黑曲菌Asp n 18、黑曲菌Asp n 25、黑曲菌Asp n、黑曲菌Asp o 13,和黑曲菌Asp o 21。

[0132] 在其他具体实施例中,融合蛋白的抗原可以是来自病原性蛋白颗粒的多肽,包括但不限于那些与疾病或病症状态有关,包括但不限于传染性海绵状脑病变,如牛海绵状脑病变、克雅氏相关疾病,和绵羊瘙痒病。

[0133] 在一些具体实施例中,融合蛋白中的V1和V2的至少一个可以是来自一群组,包括,但不限于:(a) B型肝炎病毒的HBc, (b) 该B型肝炎病毒衍生的小型表面抗原(HBsAg), (c) 诺罗病毒壳蛋白VP1的S结构域, (d) 诺罗病毒壳蛋白VP1的P结构域, (e) 人类轮状病毒VP2, (f) 人类轮状病毒VP6, (g) 人类乳突病毒的L1主要壳蛋白, (h) 人类多瘤性病毒的VP1, (i) 人类JC病毒的VP1, (j) 人类第二型腺相关病毒的VP2, (k) 人类第二型腺相关病毒的VP3, (l) E型肝炎病毒壳蛋白VP1的S与P1结构域,以及(m) E型肝炎病毒壳蛋白VP1的P2结构域。

[0134] 在一些具体实施例中,V1是透过N端的接头连接到该抗原,或者V2是透过C端的接头连接到该抗原。在其他具体实施例中,V1是透过N端的接头连接到该抗原且V2是透过C端的接头连接到该抗原,而且和该N-端接头和C-端接头可以是相同或不同的,选自下列群组,包括但不限于:从EV71的VP1的前面59个氨基酸;小于200个氨基酸的任何非结构的随机螺旋肽;(GGGGS)_n; (G1y)_n; (EAAAK)_n; A(EAAAK)₄ALFA(EAAAK)₄A (SEQ ID NO:1); PAPAP (SEQ ID NO:2); AEAAAKEAAKA (SEQ ID NO:3); (X-P)_n, 其中X为任何氨基酸,例如丙氨酸、赖氨酸,或谷氨酸;二硫化物;VSQTSKLTRAETVFPDV (SEQ ID NO:4); PLGLWAC (SEQ ID NO:5); RVLAE (SEQ ID NO:6); EDVVCCSMSY (SEQ ID NO:7); GGIEGRGS (SEQ ID NO:8); TRHRQPRGWE (SEQ ID NO:9); AGNRVRRSVG (SEQ ID NO:10); RRRRRRRRR (SEQ ID NO:11); GFLG; LE; (GS)_n; GSGGGMGSGG (SEQ ID NO:12); GSGGGGG (SEQ ID NO:13); GT; GSGGSGGSGG (SEQ ID NO:14); SGGGSSHS

(SEQ ID NO:15);SGGSGGSSHS (SEQ ID NO:16);SGGSGGSGGSSHS (SEQ ID NO:17);GGSGG (SEQ ID NO:18);GGGSLVPRGSGGGGS (SEQ ID NO:19);GGGSEGGGSEGGGSEGGG (SEQ ID NO:20);AAGAATAA (SEQ ID NO:21);GGGGG (SEQ ID NO:22);GGSSG (SEQ ID NO:23);及GSGGGTGGGSG (SEQ ID NO:24)。

[0135] 本领域技术人员将理解,至少在某些本发明的具体实施例涉及重组核酸技术,包括,但不限于,克隆、聚合酶链反应、纯化DNA和RNA、限制酶消化、连接反应,以及在原核或真核细胞中表达重组蛋白。这些程序的基本实验室技术被充分地在各种已知的出版品中被描述,例如Michael A.Green所著MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL第4版,2012年。

[0136] 例如,本发明提供了包含编码本发明的融合蛋白的核苷酸序列的重组核酸,其包含病毒结构蛋白、至少一种抗原或抗原片段,以及选择性的,一或多个接头。该核酸序列可操作地被连接,以便它们可以被转录和翻译以产生一种具有组合为病毒样颗粒能力的融合蛋白。

[0137] 编码本发明的融合蛋白的核酸可包含以在许多公知形式的RNA或DNA,包括但不限于单链或双链的实体和载体。任何上述核酸可以使用任合本领域已知的适合的方法来构建,例如于Ralph Rapley所著的THE NUCLEIC ACID PROTOCOLS HANDBOOK,2000年,中所描述的方法。

[0138] 编码本发明的融合蛋白的重组构建体可以在合适的载体,如表达载体,并使用常规且本领域中公知的方法制备。重组构建体,例如表达载体,包含核酸,其编码本发明的至少一种融合蛋白。重组构建体可包含以单链或双链形式的RNA或DNA。对重组蛋白合适的表达载体乃是常规且本领域中所公知的。合适的载体可以,但不一定,包含,例如:复制起点;一或多个选择性标记基因;一或多种表达控制组件,例如像启动子、增强子、终止子,和一或多个转译信号的转录控制组件;用于目标的信号序列或前导序列,例如,在宿主细胞的分泌途径;或其组合。合适的载体可以,但不一定,包含一或多种可检测的标记物,如,例如,赋予对一或多种抗生素具有抗性的蛋白质。合适的载体可以包含,但不一定,一个载体表达系统,例如自我复制的核酸。

[0139] 可使用编码本发明的融合蛋白的任何合适的核酸序列或其组合。可使用在那些在本领域中公知的适合的方法,如PCR,来扩增核酸。本领域的普通技术人员将知道使用引物来进行PCR,例如,设计包含一个前导序列、限制酶切位,以及编码目标蛋白的特定的核酸。在PCR扩增后,本领域的普通技术人员将知道纯化所得的扩增子。也会知道如何然后分别以限制酶消化扩增子和表达载体,然后执行接合反应以将扩增子插入载体中,并再次纯化连接产物。具有产生载体,其包含编码本发明的融合蛋白的插入序列,本领域的普通技术人员将知道如何接着转化或转染特定宿主细胞和培养该宿主细胞以诱导表达。再次地,示例性技术描述在,例如,Ralph Rapley所著的THE NUCLEIC ACID PROTOCOLS HANDBOOK,2000年。

[0140] 制造本发明的融合蛋白的方法可以,但不一定需要,包含培养已转化或转染编码本发明的融合蛋白的重组核酸的宿主细胞,在适合表达核酸的条件下,并有可能在适合于病毒样颗粒形成的条件下。这样的条件是本领域技术人员所熟知。例如,参见Kushnir,N.等人所著的“Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development”,Vaccine期刊,2012年,第31卷,第58-83页,和其中的参考文献。这样的方法

可选择性的包括一个或多个步骤,以分离病毒样颗粒,纯化病毒样颗粒,或其组合。这样的方法还可以提供用于生产多价的病毒样颗粒。

[0141] 本发明还提供了一种方法,以从宿主细胞中、培养介质,或其组合分离或纯化病毒样颗粒。病毒样颗粒可能直接从条件培养基中,如宿主细胞培养基,分离或纯化。此外,宿主细胞可以被回收,可以形成宿主细胞均质物或溶解物,并分离病毒样颗粒。裂解细胞而不破坏病毒样颗粒的适当方法是本领域熟知的,且描述在,例如,Kirnbauer等人所著的“Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16L1 and L1-L2 into virus-like particles”,*J Virol*期刊,1993年,第67卷第12期:第6929-36页。用于从培养基或宿主细胞中分离病毒样颗粒的合适的方法也是公知的现有技术,并描述在,例如,Wagner,R.等人所著的“Construction,expression,and Immunogenicity of Chimeric HIV-1 virus-like particles”,*Virol*期刊,1996年,第220卷,第128-40页;Yamshchikov,G.V.等人所著的“Assembly of SIV virus-like particles containing envelope proteins using a baculovirus expression system”,*Virol*期刊,1995年,第214卷,第50-58页;Sakuragi,S.等人所著的“HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*”,*PNAS*期刊,2002年,第99卷,第7956-61页;Andreadis,S.T.等人所著的“Large-scale processing of recombinant retroviruses for gene therapy”,*Biotechnol Prog*期刊,1999年,第15卷,第1-11页;Bachmann,A.S.等人所著的“A simple method for the rapid purification of copia virus-like particles from *Drosophila Schneider* 2 cells”,*J.Virol.Methods*期刊,2004年,第115卷,第159-65页。这样的方法可以包括密度梯度离心,如蔗糖梯度、团块,和PEG沉淀法,且它们还可以包括,例如离子交换和凝胶过滤层析等标准的纯化技术。

[0142] 在蔗糖梯度或缓冲离心是自细胞成分中分离病毒样颗粒的一种可能手段,至少有一项研究表明超速离心后,未组装的蛋白质集中在上部的分层,其具有相对低的蔗糖浓度,而组装的病毒样颗粒则集中在较低的分层,其具有相对高的蔗糖浓度。参见,例如,Zlotnick,A等人所著的“Separation and crystallization of T=3 and T=4 icosahedral complexes of the hepatitis B virus core protein”,*Acta Cryst*期刊,1999年,第D55卷:第717-20页。上述技术可能是单独、相继,或当加入到更大的系统后有用的。

[0143] 尽管对于实践本发明来说不是必需的,电子显微镜提供用于确认病毒样颗粒的组装的手段。例如,在超速离心后,从下部分层而来的样本,其假定包含组装的病毒样颗粒,可以经由电子显微镜检查。合适的技术对于以本领域技术人员而言是众所周知的,例如,Han,M.G.等人所著的“Self-assembly of the recombinant capsid protein of a bovine norovirus (BoNV) into virus-like particles and evaluation of cross-reactivity of BoNV with human noroviruses”,*J Clin Microbiol*期刊,2005年,第43卷第2期:第778-85页。

[0144] 抗原性的确认可以透过在分析血液血清的中和活性之前,对啮齿动物施用本发明的融合蛋白及/或病毒样颗粒来实现。参见,例如,Xu L等人所著的“Protection against Lethal Enterovirus 71 Challenge in Mice by a Recombinant Vaccine Candidate Containing a Broadly Cross-Neutralizing Epitope within the VP2EF Loop”,

Theranostics期刊,2014年,第4卷第5期:第498-513页。另外,中和反应可以蓝色非变性PAGE(Blue Native PAGE)进行测定。合适的BN-PAGE技术对于以本领域技术人员而言是众所周知的,例如,Moore,P.L.等人所著的“Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1”,J Virol期刊,2006年,第80卷,第2515-28页。抗原性的这种测试还可以包含在体外比较传统的病毒样颗粒平台和本发明的病毒样颗粒平台之间的免疫原性。

[0145] 本发明的融合蛋白质、本发明的病毒样颗粒,或其组合,可以通过任何合适的方式施用,肠内、肠胃外,或以其他方式,并且包括,但不限于,口腔内、皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、膀胱内、鞘内、经眼、经口、直肠、皮下、舌下、局部,或其组合,依次或同时进行。

[0146] 适用于本发明施用的制剂可包含,可能在本领域技术人员公知的其他事物之中:水性和非水性溶液;抗氧化剂;抑菌剂;缓冲液;影响等渗性的溶质;防腐剂;增溶剂;稳定剂;悬浮剂;增稠剂;或其组合。

[0147] 此外或在替代方案中,适用于本发明施用的制剂可以包含,可能在本领域技术人员公知的其他事情之中:凝胶;PEG如PEG 400;丙二醇;盐水;香囊;水;本领域中已知的其他适当的液体;或其组合。

[0148] 此外或在替代方案中,适用于本发明施用的制剂可以包含,可能在本领域技术人员公知的其他事物之中:黏合剂;缓冲剂;磷酸钙;纤维素;胶体,如胶体二氧化硅;着色剂;稀释剂;崩解剂;染料;填料;调味剂;明胶;乳糖;硬脂酸镁;甘露醇;微晶明胶;润湿剂;石蜡烃;锭剂;聚乙二醇;防腐剂;山梨糖醇;淀粉,如玉米淀粉、马铃薯淀粉,或其组合;硬脂酸;蔗糖;滑石;甘油三酯;或其组合。

[0149] 此外或在替代方案中,适用于本发明施用的制剂可以包含,可能在本领域技术人员公知的其他事情之中:醇,如苯甲醇或乙醇;苯扎氯铵;缓冲剂如磷酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂,或其组合;羧甲基纤维素或微晶纤维素;胆固醇;葡萄糖;果汁,如柚子汁;牛奶;磷脂如卵磷脂;油如植物、鱼,或矿物油,或其组合;本领域中已知的其它医药上相容的载体;或其组合。

[0150] 此外或在替代方案中,适用于本发明施用的制剂可以包含,可能在本领域技术人员公知的其他事情之中:可生物降解,例如聚乳酸-聚乙二醇酸(PLGA)聚合物,其它实体的降解产物可以迅速地从一个生物系统,或其组合被清除。

[0151] 制剂的降解性,例如,在缓释制剂中-可以通过那些本领域技术人员已知的技术调整。参见,例如,Danny Lewis所著的CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE AGENTS FROM LACTIDE/GLYCOLIDE POLYMERS,IN BIODEGRADABLE POLYMERS AS DRUG DELIVERY SYSTEMS,Chasin,M.与Langer,R.编辑,1990年,Marcel Dekker出版社:纽约。

[0152] 本发明的制剂可以单位剂量形式、多剂量形式,或其组合方式来施用。它们可以被包装在单位剂量容器中、多剂量容器,或其组合。本发明可能存在于安瓿;小胶囊;胶囊;颗粒;含片;粉;片;小瓶;乳剂,包括但不限于阿拉伯胶乳剂;悬浮液;或其组合。

[0153] 免疫原性组合物可包含本发明的融合蛋白、本发明的病毒样颗粒、编码本发明融合蛋白,或其组合的核酸。一个或多个这样的组合物,相同的、不同的,或其组合,可使用相同或不同的制剂施用。这样的免疫原性组合物可以预防性施用、治疗性施用,或其组合,并且可以施用一次或多次,给一个给定的个体。例如,多次施用到一个给定的个体可以包含初

次施用,并接着加强施用,以测试或优化所需的免疫反应或缺乏之。重复施用到一个给定的个体不一定包含相同的免疫原性组合物。免疫原性组合物可包含,但不一定要包含,适当的核酸递送系统,例如,但不限于,乳液、颗粒、载体、病毒颗粒、脂质体、脂质复合物、复制子,或其组合。

[0154] 本发明的融合蛋白、本发明的病毒样颗粒,及其组合可选择性地依序地或同时与一种或多种佐剂施用,如以上所讨论。佐剂可以修饰细胞因子的活性,例如,通过整个免疫系统的广泛向上调节、通过特定的细胞因子的向上调节、通过特定细胞因子的向下调节,或其任意组合。可替代地或另外地,佐剂可以帮助将本发明的一个给定的抗原或抗原片段,以包含或类似于其原始构形的构形,呈现给免疫效应细胞。可替代地或另外地,佐剂可以帮助将本发明的抗原或抗原片段递送到免疫效应细胞。可替代地或另外地,佐剂可将本发明给定的抗原或抗原片段困在注射部位,可能,例如,以帮助延长给药、以防止降解,或其组合。可替代地或另外地,佐剂可以帮助诱导C8+细胞毒性T淋巴细胞的反应。

[0155] 佐剂,如果选择性地使用,可以选自一以下的群组,包括但不限于:氢氧化铝;磷酸铝;明矾;由界面活性剂稳定的水的微滴,如二缩甘露醇单油酸酯,在连续的油相,例如矿物油、角鲨烯、或角鲨烷;弗氏不完全佐剂;油的微滴,如角鲨烯或角鲨烷,由界面活性剂稳定,如Tween 80或Span 85,在连续的水相;免疫刺激复合物;脂质体;奈米微粒;粒状佐剂,如钙盐、蛋白酶体、病毒颗粒、硬脂酪氨酸、 γ -菊粉、明矾菊粉、非颗粒的佐剂;胞壁酰二肽和其衍生物,包括N-乙酰基胞壁酰-L-丙氨酰-D-异谷氨酰胺、苏氨酰基MDP、莫拉丁酯、N-乙酰葡萄糖胺-MDP、GMDP、目拉美肽(murametide)和去甲MDP,和MTP-PE;非离子型嵌段共聚物,如CRL 1005;皂甙,包括三萜类、皂苷、奎尔A、Spikoside、QS21和ISCOPREP™ 703的混合物;脂质A;4'单磷酸脂质A(MPL);细胞壁骨架;细胞因子;碳水化合物聚合物,如甘露聚糖、葡聚糖、醋孟南、蘑菇多糖;衍生的多糖、包括糊精、二乙氨基葡聚糖;细菌毒素,包括霍乱毒素、CTB五聚体、大肠杆菌不稳定毒素、LTB,或突变或其他衍生物;其他非颗粒佐剂,如脱氢表雄酮、维生素D3、海藻糖二霉菌酸酯、P₃CSS、Poly I:C、Poly ICLC、Poly A:U,或其组合。

[0156] 为了揭露与描述方法与组合物的目的,其可能被用于制造或使用本发明,本文提及的所有的出版物和其他参考文献在此透过引用的方式被全然的并入。

[0157] 本发明通过下列的实施例进一步说明,其提供了用于示范而非限制的目的。本领域中的技术人员应,在根据本公开内容,应当理解,许多变化可以在所公开的特定具体实施例中产生,且仍然获得相同或类似的结果而不脱离本发明的精神和范围。

[0158] 实施例

[0159] 在以下的实施例中,没有定义的缩写具有其通常被接受的含义,且以下的缩写具有下列含义:

[0160] HBc与H是指来自B型肝炎病毒的核心抗原的次结构域。

[0161] S是指诺罗病毒VP1蛋白的S结构域。

[0162] P是指诺罗病毒VP1蛋白的P结构域。

[0163] EV71是肠病毒第71型。

[0164] VP1是EV71的壳蛋白。

[0165] VP8是来自轮状病毒的VP8结构域。

[0166] M2是H1N1病毒的跨膜蛋白。

[0167] M2e是M2的胞外结构域。

[0168] HA1是A型流感病毒血球凝集素1蛋白。

[0169] CVB3VP1是科萨奇病毒B3的VP1壳蛋白。

[0170] Sp1是E型肝炎病毒的S结构域+P1结构域。

[0171] P₂是E型肝炎病毒的P结构域。

[0172] HBs是HBV衍生的小型表面抗原。

[0173] G是具有以下序列的柔性接头：(GGGS)₃，即，GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:25)。

[0174] E是具有以下序列的刚性接头：(EAAAK)₃，即，EAAAKEAAAKEAAAK (SEQ ID NO:26)。

[0175] R是具有该EV71VP1蛋白的前面59个氨基酸(氨基酸1-59)的氨基酸序列的随机螺旋接头(即，SDRVADVIESSIGDSVSRALTHALPAPTQNTQVSSHRLDTGKVPALQAAEIGASSNAS (SEQ ID NO:27))。

[0176] 在这些实施例中所描述的病毒样颗粒(VLPs)的命名如下：V1V2-L1L2-Ag。例如，名为SP-GG-VP1的病毒样颗粒包含一个N-端的SP病毒结构蛋白、一个N-端(GGGS)₃柔性接头、一个VP1抗原，一个C-端(GGGS)₃柔性接头，以及一个C-端SP病毒结构蛋白。

[0177] 实施例1：病毒样颗粒模板的构建

[0178] 以GenScript在质体pUC57中合成该病毒样颗粒模板(图1)，并将序列进行适合酵母菌的密码子优化。使用EcoRI(5'-端)与SacII(3'-端)切位将该病毒样颗粒模板的片段亚克隆到酵母菌表达质体载体pPICZ A，并且使用甲醇诱导的AOX1启动子调节表达。使用在5'与3'端的XhoI+NheI配对的限制酶切位，将编码该N-端病毒结构蛋白(VP1)的序列克隆到该模板中。使用在5'与3'端的NheI+NdeI配对的限制酶切位，将编码该N-端接头(接头1)的序列克隆到该模板中。使用在5'与3'端的NdeI+PstI配对的限制酶切位，将编码该抗原的序列克隆到该模板中。使用在5'与3'端的PstI+KpnI配对的限制酶切位，将编码该C-端接头(接头2)的序列克隆到该模板中。使用在5'与3'端的KpnI+SpeI配对的限制酶切位，将编码该C-端病毒结构蛋白(VP2)的序列克隆到该模板中。

[0179] 例如，在名为SP-GG-VP1的病毒样颗粒中，使用XhoI+NheI将该诺罗病毒VP1蛋白的S结构域克隆到该模板中，使用NheI+NdeI将该N-端柔性接头(GGGS)₃克隆到该模板中，使用NdeI+PstI将该VP1抗原克隆到该模板中，使用PstI+KpnI将该C-端柔性接头(GGGS)₃克隆到该模板中，以及使用KpnI+SpeI将该诺罗病毒VP1蛋白的P结构域克隆到该模板中。

[0180] 以下实施例1-1至1-108的重组蛋白使用该病毒样颗粒模板来产生：

[0181]

实施例	名称	VP1	L1	Ag	L2	VP2
1-1	SP-GG	S	G	-	G	P
1-2	SP-GE	S	G	-	E	P
1-3	SP-GR	S	G	-	R	P
1-4	SP-EG	S	E	-	G	P
1-5	SP-EE	S	E	-	E	P
1-6	SP-ER	S	E	-	R	P
1-7	SP-RG	S	R	-	G	P
1-8	SP-RE	S	R	-	E	P
1-9	SP-RR	S	R	-	R	P
1-10	SP-GG-VP1	S	G	VP1	G	P
1-11	SP-GE-VP1	S	G	VP1	E	P
1-12	SP-GR-VP1	S	G	VP1	R	P
1-13	SP-EG-VP1	S	E	VP1	G	P
1-14	SP-EE-VP1	S	E	VP1	E	P
1-15	SP-ER-VP1	S	E	VP1	R	P
1-16	SP-RG-VP1	S	R	VP1	G	P
1-17	SP-RE-VP1	S	R	VP1	E	P
1-18	SP-RR-VP1	S	R	VP1	R	P
1-19	SP-GE-HA1	S	G	HA1	E	P

[0182]

实施例	名称	VP1	L1	Ag	L2	VP2
1-20	SP-GG-HA1	S	G	HA1	G	P
1-21	SP-GR-HA1	S	G	HA1	R	P
1-22	SP-EE-HA1	S	E	HA1	E	P
1-23	SP-EG-HA1	S	E	HA1	G	P
1-24	SP-ER-HA1	S	E	HA1	R	P
1-25	SP-RE-HA1	S	R	HA1	E	P
1-26	SP-RG-HA1	S	R	HA1	G	P
1-27	SP-RR-HA1	S	R	HA1	R	P
1-28	SP-GG-M2e	S	G	M2e	G	P
1-29	SP-GE-M2e	S	G	M2e	E	P
1-30	SP-GR-M2e	S	G	M2e	R	P
1-31	SP-EG-M2e	S	E	M2e	G	P
1-32	SP-EE-M2e	S	E	M2e	E	P
1-33	SP-ER-M2e	S	E	M2e	R	P
1-34	SP-RG-M2e	S	R	M2e	G	P
1-35	SP-RE-M2e	S	R	M2e	E	P
1-36	SP-RR-M2e	S	R	M2e	R	P
1-37	SH-GG-VP1	S	G	VP1	G	H
1-38	SH-GE-VP1	S	G	VP1	E	H
1-39	SH-GR-VP1	S	G	VP1	R	H
1-40	SH-EG-VP1	S	E	VP1	G	H
1-41	SH-EE-VP1	S	E	VP1	E	H
1-42	SH-ER-VP1	S	E	VP1	R	H
1-43	SH-RG-VP1	S	R	VP1	G	H
1-44	SH-RE-VP1	S	R	VP1	E	H
1-45	SH-RR-VP1	S	R	VP1	R	H
1-46	SP-GG-VP8	S	G	VP8	G	P
1-47	SP-GE-VP8	S	G	VP8	E	P

[0183]

实施例	名称	VP1	L1	Ag	L2	VP2
1-48	SP-GR-VP8	S	G	VP8	R	P
1-49	SP-EG-VP8	S	E	VP8	G	P
1-50	SP-EE-VP8	S	E	VP8	E	P
1-51	SP-ER-VP8	S	E	VP8	R	P
1-52	SP-RG-VP8	S	R	VP8	G	P
1-53	SP-RE-VP8	S	R	VP8	E	P
1-54	SP-RR-VP8	S	R	VP8	R	P
1-55	SP-GG-CVB3 VP1	S	G	CVB3 VP1	G	P
1-56	SP-GE-CVB3 VP1	S	G	CVB3 VP1	E	P
1-57	SP-GR-CVB3 VP1	S	G	CVB3 VP1	R	P
1-58	SP-EG-CVB3 VP1	S	E	CVB3 VP1	G	P
1-59	SP-EE-CVB3 VP1	S	E	CVB3 VP1	E	P
1-60	SP-ER-CVB3 VP1	S	E	CVB3 VP1	R	P
1-61	SP-RG-CVB3 VP1	S	R	CVB3 VP1	G	P
1-62	SP-RE-CVB3 VP1	S	R	CVB3 VP1	E	P
1-63	SP-RR-CVB3 VP1	S	R	CVB3 VP1	R	P
1-64	SHBc-GG-HA1	S	G	HA1	G	HBc
1-65	SHBc-GE-HA1	S	G	HA1	E	HBc
1-66	SHBc-GR-HA1	S	G	HA1	R	HBc
1-67	SHBc-EG-HA1	S	E	HA1	G	HBc
1-68	SHBc-EE-HA1	S	E	HA1	E	HBc
1-69	SHBc-ER-HA1	S	E	HA1	R	HBc
1-70	SHBc-RG-HA1	S	R	HA1	G	HBc
1-71	SHBc-RE-HA1	S	R	HA1	E	HBc
1-72	SHBc-RR-HA1	S	R	HA1	R	HBc
1-73	SP ₁ P ₂ -GG-VP1	SP ₁	G	VP1	G	P ₂
1-74	SP ₁ P ₂ -GE-VP1	SP ₁	G	VP1	E	P ₂
1-75	SP ₁ P ₂ -GR-VP1	SP ₁	G	VP1	R	P ₂

[0184]

实施例	名称	VP1	L1	Ag	L2	VP2
1-76	SP ₁ P ₂ -EG-VP1	SP ₁	E	VP1	G	P ₂
1-77	SP ₁ P ₂ -EE-VP1	SP ₁	E	VP1	E	P ₂
1-78	SP ₁ P ₂ -ER-VP1	SP ₁	E	VP1	R	P ₂
1-79	SP ₁ P ₂ -RG-VP1	SP ₁	R	VP1	G	P ₂
1-80	SP ₁ P ₂ -RE-VP1	SP ₁	R	VP1	E	P ₂
1-81	SP ₁ P ₂ -RR-VP1	SP ₁	R	VP1	R	P ₂
1-82	SP ₁ P ₂ -GG-HA1	SP ₁	G	HA1	G	P ₂
1-83	SP ₁ P ₂ -GE-HA1	SP ₁	G	HA1	E	P ₂
1-84	SP ₁ P ₂ -GR-HA1	SP ₁	G	HA1	R	P ₂
1-85	SP ₁ P ₂ -EG-HA1	SP ₁	E	HA1	G	P ₂
1-86	SP ₁ P ₂ -EE-HA1	SP ₁	E	HA1	E	P ₂
1-87	SP ₁ P ₂ -ER-HA1	SP ₁	E	HA1	R	P ₂
1-88	SP ₁ P ₂ -RG-HA1	SP ₁	R	HA1	G	P ₂
1-89	SP ₁ P ₂ -RE-HA1	SP ₁	R	HA1	E	P ₂
1-90	SP ₁ P ₂ -RR-HA1	SP ₁	R	HA1	R	P ₂
1-91	SP ₁ P-GG-VP1	SP ₁	G	VP1	G	P
1-92	SP ₁ P-GE-VP1	SP ₁	G	VP1	E	P
1-93	SP ₁ P-GR-VP1	SP ₁	G	VP1	R	P
1-94	SP ₁ P-EG-VP1	SP ₁	E	VP1	G	P
1-95	SP ₁ P-EE-VP1	SP ₁	E	VP1	E	P
1-96	SP ₁ P-ER-VP1	SP ₁	E	VP1	R	P
1-97	SP ₁ P-RG-VP1	SP ₁	R	VP1	G	P
1-98	SP ₁ P-RE-VP1	SP ₁	R	VP1	E	P
1-99	SP ₁ P-RR-VP1	SP ₁	R	VP1	R	P
1-100	SP ₁ P-GG-HA1	SP ₁	G	HA1	G	P
1-101	SP ₁ P-GE-HA1	SP ₁	G	HA1	E	P
1-102	SP ₁ P-GR-HA1	SP ₁	G	HA1	R	P
1-103	SP ₁ P-EG-HA1	SP ₁	E	HA1	G	P

[0185]

实施例	名称	VP1	L1	Ag	L2	VP2
1-104	SP ₁ P-EE-HA1	SP ₁	E	HA1	E	P
1-105	SP ₁ P-ER-HA1	SP ₁	E	HA1	R	P
1-106	SP ₁ P-RG-HA1	SP ₁	R	HA1	G	P
1-107	SP ₁ P-RE-HA1	SP ₁	R	HA1	E	P
1-108	SP ₁ P-RR-HA1	SP ₁	R	HA1	R	P
1-109	S-VP1-S	S	G	VP1	G	P

[0186] 实施例1A:S-VP1-S的构建

[0187] 以GenScript在质体pUC57中合成S-VP1-S的编码区域(参见图9),并将序列进行适合E.coli宿主的密码子优化。以PCR将病毒样颗粒模板的片段亚克隆到质体载体pCRT7NT(Invitrogen公司),并以IPTG诱导的T7启动子调节表达。这种技术被用来生产在上表中的实施例1-109的重组蛋白。

[0188] 实施例2:酵母转化作用

[0189] 以Pme I限制酶(NEB公司)对重组质体DNA进行线性化,并以NucleoSpin[®](Macherey-Nagel公司)清理该重组质体,以进行接续的转化作用。藉由氯化锂的方法并根据EasySelect[™]毕赤表达试剂盒(Invitrogen公司)的操作手册,将5-10μg的线性化质体DNA转化至毕赤酵母菌宿主菌株GS115中。将转化物接种于含有50μg/ml博来霉素(Invivogen公司)的YPDS平板培养基上(1% (w/v) 酵母萃取物、2% (w/v) 胰蛋白胨、2% (w/v) 葡萄糖以及1.5% (w/v) 琼脂)。筛选对博来霉素有抗性的菌落,并以菌落PCR确认插入物,PCR使用以下引物:5' AOX1引物:5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' (SEQ ID NO:28);3' AOX1引物:5'-GCAATGGCATTCTGACATCC-3' (SEQ ID NO:29)。

[0190] 实施例3:蛋白表达

[0191] 所有构建体的重组蛋白的表达是以甲醇诱导,但S-VP1-S除外。在250mL的烧瓶中将单一菌落接种于40mL的YPD培养基(1% (w/v) 酵母萃取物、2% (w/v) 胰蛋白胨以及2% (w/v) 葡萄糖)中。在30℃下将培养物置于一个轨道摇动的培养箱中(250rpm)生长,直到细胞在指数期生长(OD₆₀₀=1.3-1.8)。将细胞在室温(RT)下以1500xg离心5分钟后收获。倒出上清液,并以YP培养基(1% (w/v) 酵母萃取物以及2% (w/v) 胰蛋白胨)与0.5% (v/v) 甲醇将细胞沉淀物重新悬浮至OD₆₀₀为1.0。24小时后,以离心法收集细胞沉淀物,并储存于-80℃下直到准备分析。以冷的氯化钾缓冲液(100mM KCl、20mM HEPES、1mM EDTA和1mM的PMSF, pH 8.0)重新悬浮细胞沉淀物,然后以法国压力机均质化(20,000psi;EmulsiFlex-B15, AVESTIN公司)。以离心(在4℃下以15000xg离心30分钟)分离可溶性与不可溶性的重组病毒样颗粒蛋白,并以Western Blot法分析(图2-图6)。

[0192] 如图4所示,单独表达的HA1抗原大多是不可溶的(图4A)。但是,一旦该HA1抗原被置入到本发明的病毒样颗粒构建体中,其溶解度得到改善(图4B)。这显示本发明的病毒样颗粒设计有助于HA1抗原的折叠。

[0193] 实施例3A:S-VP1-S蛋白表达

[0194] 以1mM IPTG诱导S-VP1-S的重组蛋白表达。在一个250mL的烧瓶中将单一菌落接种于10mL的LB培养基(1% (w/v) 胰蛋白胨、0.5% (w/v) 酵母萃取物及1% (w/v) 氯化钠)。在37℃下将培养物置于一个轨道摇动的培养箱中(250rpm)生长,直到细胞在指数期生长($OD_{600}=0.6-0.8$)。将细胞在室温下以8000xg离心10分钟后收获。以离心法收集细胞沉淀物,并储存于-80℃下直到准备分析。以冷的氯化钾缓冲液(100mM KCl、20mM HEPES、1mM EDTA和1mM的PMSF,pH 8.0)重新悬浮细胞沉淀物,然后以法国压力机均质化(20,000psi;EmulsiFlex-B15,AVESTIN公司)。以离心(在4℃下以15,000xg离心30分钟)分离可溶性与不可溶性的重组病毒样颗粒蛋白,并以Western Blot法分析(未显示数据)。

[0195] 实施例4:VLP纯化与特征分析

[0196] 以蔗糖密度梯度和尺寸排阻色谱法来分析病毒样颗粒形成的特征。收集酵母细胞并再悬浮于冷的氯化钾缓冲液中,然后以法国压力机均质化。以离心法(在4℃下以15000xg离心30分钟)收集上清液,并作为尺寸排阻色谱法(Superose 6Increase 10/300GL,GE healthcare公司)以及10%-50%连续蔗糖梯度超高速离心(35,000rpm离心4小时;SW 41Ti转子,Optima™ L-100XP,Beckman公司)的粗萃物。病毒样颗粒形成是基于藉由Western Blot法分析尺寸排阻色谱法的空隙体积中,以及蔗糖梯度的20%-40%区段中,重组病毒样颗粒蛋白的出现来判断。

[0197] 针对SP-GG-VP1病毒样颗粒的纯化,在粗萃取物中的病毒样颗粒是藉由镍管柱色谱法(镍琼脂糖™6Fast Flow,GE Healthcare公司)进行纯化,并以考马斯蓝染色的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western Blot法分析蛋白。

[0198] 本发明的几个病毒样颗粒的构建的蔗糖梯度分析的结果示于图7。

[0199] 实施例5:穿透式电子显微镜(transmission electron microscopy,TEM)

[0200] 以穿透式电子显微镜(TEM)对病毒样颗粒的颗粒大小与形态进行特征分析。纯化的病毒样颗粒被吸附到弗姆瓦/碳-涂覆的铜网(Electron Microscope Science公司)上,并以1.5%乙酸双氧铀水溶液进行负染色。样本以JEOL JEM-1200EX II穿透式电子显微镜形成影像。

[0201] SP-GG-VP1和S-VP1-S病毒样颗粒的电子显微照片分别示于图8和图10。

[0202] 实施例6:细胞株与病毒株

[0203] 以含有10%FBS(Genedirex公司)、1%L-谷氨酰胺(Caisson公司)以及1%青霉素/链霉素(Caisson公司)的Dulbecco氏改良Eagle氏培养基-高葡萄糖(DMEM-HG,Caisson公司)在37℃以及5%CO₂的加湿环境下对人类横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RD)细胞进行继代培养。EV71病毒(B5基因型)获自台湾的CDC(CDC#2013-EV-00017),并在RD细胞中以2%FBS在MOI 0.01下增殖。感染三天后自上清液中收获病毒种库。为了估算病毒感染量(infectivity titers),将EV71进行10倍稀释,并在一个96孔培养盘上感染RD细胞。在4天的培养期后,使用倒置显微镜观察到细胞病变作用(CPE)。以Reed, L.J. 与Muench, H. 于1938年发表的方法计算EV71的50%组织培养感染剂量(TCID₅₀), Reed, L.J. 与Muench, H. (1938年) "A simple method of estimating fifty percent endpoints", The American Journal of Hygiene期刊,第27卷:第493-497页。

[0204] 以补充有10%FBS、1%L-谷氨酰胺,以及1%青霉素/链霉素的DMEM培养基在37℃

以及5%CO₂的加湿环境下对MDCK细胞进行继代培养。H1N1病毒(A/Taiwan/80813/2013)获自台湾的CDC,并在MDCK细胞中以补充有1 μ g/mL TPCK-蛋白酶(Sigma公司)的无血清DMEM培养基进行增殖。收集病毒上清液以作为病毒种库,并用于实验中。使用如前述的TCID₅₀以测定病毒量(virus titers)。

[0205] 实施例7:小鼠免疫试验

[0206] 以小鼠免疫试验进行疫苗效力分析。Balb/c小鼠购自BioLASCO公司(台北,台湾)。25 μ g的 Δ SP-GG-VP1-C病毒样颗粒以及相等摩尔量的VP1蛋白以KCl缓冲液稀释并与或不与作为佐剂的5ng LPS混合。以足垫注射方式分别将VLP(n=4)、VP1(n=3)、VLP+佐剂(n=4)以及VP1+佐剂(n=3)对八周龄雌性小鼠进行免疫,并在第7天进行二次免疫。在第0、7以及14天时以眼眶采样采集血清样本,以监测免疫反应。

[0207] 实施例8:血清学分析

[0208] 以Western Blot法与ELISA检验来自被免疫的小鼠的抗原特异性抗体。5 μ g的 Δ SP-GG-VP1-C病毒样颗粒以及VP1在被转移到一个PVDF膜(Bio-Rad公司)之前,先以10%SDS-PAGE进行分离,随后以抗血清(稀释1:500倍)侦测,接着与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗小鼠IgG抗体(H+L)(稀释1:20,000倍;50 μ l/孔,Jackson ImmunoResearch公司,型号115-035-044)共同培养。以西方化学发光HRP基质(ECL)(Millipore公司)对膜进行显影,并且暴露于X光片(FUJIFILM公司)。

[0209] 以ELISA测定血清中抗EV71、VLP1和VLP2的IgG抗体效价。培养盘上的每个孔皆以10ng的病毒样颗粒抗原(稀释于0.1M NaHCO₃)涂覆,并在4℃静置整夜。以PBST(0.1%Tween 20在PBS中)缓冲液清洗后,每个孔以200 μ l含有1%BSA的PBST在室温下进行阻隔作用60分钟。清洗后,对抗血清进行二倍系列稀释(稀释100-3,200倍),并加入孔中(50 μ l/孔)。培养盘在室温(RT)下静置60分钟后,在加入HRP缀合的山羊抗小鼠IgG抗体(稀释1:20,000倍;50 μ l/孔)前先清洗。加入100 μ l的TMB(Millipore公司)并显色5-15分钟。加入50 μ L的H₂SO₄(2N)以停止反应,并且以微量盘读取仪(TECAN公司)测量OD_{450/750}。

[0210] 图11例示获自在不同时间注射S-VP1-S病毒样颗粒的被免疫小鼠的抗血清的Western Blot法分析结果。

[0211] 另外,以25 μ g的 Δ SP-GG-VP1-C病毒样颗粒以及相等摩尔量的VP1蛋白,带有或没有5ng LPS作为佐剂,对雌性Balb/c小鼠进行免疫。在第0天(免疫前)和免疫后第14天收集血清。以ELISA测定抗病毒样颗粒IgG抗体效价。其结果示于下表中:

[0212]

抗原	免疫前	二次免疫	LPS (5 ng)	
			免疫前	二次免疫
VP1 (n=3)	<100	<100	<100	<100
VLP (n=4)	<100	200	<100	800

[0213] 实施例9:EV71的微量中和分析

[0214] 将在RD细胞中对EV71进行微量中和分析。简言之,将血清在56℃下进行热灭活30分钟,并在96孔培养盘中自1:10至1:1280的倍数进行二倍系列稀释,并与等量的EV71病毒(100TCID₅₀/50 μ l)混合。在37℃下进行病毒中和作用1小时后,该血清-病毒混合物将被加入

RD细胞中,并培养3-4天以观察细胞的细胞病变作用(cytopathic effects,CPE)或是培养39小时以进行ELISA试验以侦测病毒抗原。针对中和作用-ELISA(Nt-ELISA)试验,RD细胞以80%冷丙酮固定,并风干。风干后的培养盘将再以PBST水合,以检测EV71。抗EV71VP1蛋白的兔多株抗体被作为初级抗体(1:4000),且过氧化物酶缀合的山羊抗兔IgG抗体(1:20,000)(Jackson ImmunoResearch公司)则被作为二级抗体,其是以含3%BSA的PBST稀释。使用TMB显色,并在450nm波长下读取光学密度(ODs)。

[0215] 图12例示透过使用S-VP1-S病毒样颗粒对EV71进行微量中和分析的结果。

[0216] 实施例10:H1N1的微量中和分析

[0217] 将在MDCK细胞中对H1N1进行微量中和分析。简言之,将血清在56℃下进行热灭活30分钟,并在96孔培养盘中自1:10至1:1280的倍数进行二倍系列稀释,并与等量的H1N1病毒(100TCID₅₀/50μl)混合。在37℃下进行病毒中和作用1小时后,该血清-病毒混合物将被加入MDCK细胞中,并培养39小时。培养后,MDCK细胞将以80%冷丙酮固定,并风干。风干后的培养盘将再以PBST水合,以检测H1N1。抗H1N1核蛋白(NP)的生物素化的单克隆抗体将作为初级抗体(1:2000)(Millipore公司),且过氧化物酶缀合的链霉亲和素(1:75,000)将被作为二级抗体,其是以含1%BSA的PBST稀释。使用TMB显色,并在450nm波长下读取光学密度(ODs)。

[0218] 实施例11:额外的构建

[0219] 以下实施例11-1至11-xx的重组蛋白将透过使用该病毒样颗粒模板而产生,并以上述方式测试。例如,名为SHBs-GG-VP1的病毒样颗粒将透过使用XhoI+NheI将诺罗病毒VP1蛋白的S结构域克隆至模板中,使用NheI+NdeI将N-端柔性接头(GGGGS)₃克隆至该模板中,使用NdeI+PstI将VP1抗原克隆至该模板中,使用PstI+KpnI将C-端柔性接头(GGGGS)₃克隆至该模板中,使用KpnI+SpeI将BHV-衍生的微小表面抗原克隆至该模板中而被创造出来。

[0220]

实施例	名称	VP1	L1	Ag	L2	VP2
11-1	SHBs-GG-VP1	S	G	VP1	G	HBs
11-2	SHBs-GE-VP1	S	G	VP1	E	HBs
11-3	SHBs-GR-VP1	S	G	VP1	R	HBs
11-4	SHBs-EG-VP1	S	E	VP1	G	HBs
11-5	SHBs-EE-VP1	S	E	VP1	E	HBs
11-6	SHBs-ER-VP1	S	E	VP1	R	HBs
11-7	SHBs-RG-VP1	S	R	VP1	G	HBs
11-8	SHBs-RE-VP1	S	R	VP1	E	HBs

[0221]

实施例	名称	VP1	L1	Ag	L2	VP2
11-9	SHBs-RR-VP1	S	R	VP1	R	HBs
11-10	SHBs-GG-HA1	S	G	HA1	G	HBs
11-11	SHBs-GE-HA1	S	G	HA1	E	HBs
11-12	SHBs-GR-HA1	S	G	HA1	R	HBs
11-13	SHBs-EG-HA1	S	E	HA1	G	HBs
11-14	SHBs-EE-HA1	S	E	HA1	E	HBs
11-15	SHBs-ER-HA1	S	E	HA1	R	HBs
11-16	SHBs-RG-HA1	S	R	HA1	G	HBs
11-17	SHBs-RE-HA1	S	R	HA1	E	HBs
11-18	SHBs-RR-HA1	S	R	HA1	R	HBs
11-19	S-HBs-GG-M2	S	G	M2	G	HBs
11-20	S-HBs-GE-M2	S	G	M2	E	HBs
11-21	S-HBs-GR-M2	S	G	M2	R	HBs
11-22	S-HBs-EG-M2	S	E	M2	G	HBs
11-23	S-HBs-EE-M2	S	E	M2	E	HBs
11-24	S-HBs-ER-M2	S	E	M2	R	HBs
11-25	S-HBs-RG-M2	S	R	M2	G	HBs
11-26	S-HBs-RE-M2	S	R	M2	E	HBs
11-27	S-HBs-RR-M2	S	R	M2	R	HBs
11-28	HBsHBs-GG-VP1	HBs	G	VP1	G	HBs
11-29	HBsHBs-GE-VP1	HBs	G	VP1	E	HBs
11-30	HBsHBs-GR-VP1	HBs	G	VP1	R	HBs
11-31	HBsHBs-EG-VP1	HBs	E	VP1	G	HBs
11-32	HBsHBs-EE-VP1	HBs	E	VP1	E	HBs
11-33	HBsHBs-ER-VP1	HBs	E	VP1	R	HBs
11-34	HBsHBs-RG-VP1	HBs	R	VP1	G	HBs
11-35	HBsHBs-RE-VP1	HBs	R	VP1	E	HBs
11-36	HBsHBs-RR-VP1	HBs	R	VP1	R	HBs

[0222]

实施例	名称	VP1	L1	Ag	L2	VP2
11-37	HBsHBs-GG-HA1	HBs	G	HA1	G	HBs
11-38	HBsHBs-GE-HA1	HBs	G	HA1	E	HBs
11-39	HBsHBs-GR-HA1	HBs	G	HA1	R	HBs
11-40	HBsHBs-EG-HA1	HBs	E	HA1	G	HBs
11-41	HBsHBs-EE-HA1	HBs	E	HA1	E	HBs
11-42	HBsHBs-ER-HA1	HBs	E	HA1	R	HBs
11-43	HBsHBs-RG-HA1	HBs	R	HA1	G	HBs
11-44	HBsHBs-RE-HA1	HBs	R	HA1	E	HBs
11-45	HBsHBs-RR-HA1	HBs	R	HA1	R	HBs
11-46	HBsHBs-GG-M2	HBs	G	M2	G	HBs
11-47	HBsHBs-GE-M2	HBs	G	M2	E	HBs
11-48	HBsHBs-GR-M2	HBs	G	M2	R	HBs
11-49	HBsHBs-EG-M2	HBs	E	M2	G	HBs
11-50	HBsHBs-EE-M2	HBs	E	M2	E	HBs
11-51	HBsHBs-ER-M2	HBs	E	M2	R	HBs
11-52	HBsHBs-RG-M2	HBs	R	M2	G	HBs
11-53	HBsHBs-RE-M2	HBs	R	M2	E	HBs
11-54	HBsHBs-RR-M2	HBs	R	M2	R	HBs

[0223] 尽管本发明已经在特定的实例以及具体实施例的内容中被描述,本领域的技术人员将同意等同的具体实施例也包括在权利要求的范围内。

序列表

<110> 基亚生物科技股份有限公司

<120> 病毒样颗粒疫苗

<130> 170337 PCCN

<150> US62/034,475

<151> 2014-08-07

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 46

<212> 人工序列

<213>

<400> 1

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala

20 25 30

Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

35 40 45

<210> 2

<211> 5

<212> 人工序列

<213>

<400> 2

Pro Ala Pro Ala Pro

1 5

<210> 3

<211> 12

<212> 人工序列

<213>

<400> 3

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> 人工序列

<213>

<400> 4

Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro
1 5 10 15
Asp Val
<210> 5
<211> 7
<212> 人工序列
<213>
<400> 5
Pro Leu Gly Leu Trp Ala Cys
1 5
<210> 6
<211> 5
<212> 人工序列
<213>
<400> 6
Arg Val Leu Ala Glu
1 5
<210> 7
<211> 10
<212> 人工序列
<213>
<400> 7
Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr
1 5 10
<210> 8
<211> 8
<212> 人工序列
<213>
<400> 8
Gly Gly Ile Glu Gly Arg Gly Ser
1 5
<210> 9
<211> 10
<212> 人工序列
<213>
<400> 9
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
1 5 10
<210> 10

<211> 10

<212> 人工序列

<213>

<400> 10

Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly

1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> 人工序列

<213>

<400> 11

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> 人工序列

<213>

<400> 12

Gly Gly Ser Gly Gly His Met Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 13

<211> 8

<212> 人工序列

<213>

<400> 13

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 14

<211> 11

<212> 人工序列

<213>

<400> 14

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10

<210> 15

<211> 8

<212> 人工序列

<213>

<400> 15

Ser Gly Gly Gly Ser Ser His Ser

1 5

<210> 16

<211> 10

<212> 人工序列

<213>

<400> 16

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser His Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 13

<212> 人工序列

<213>

<400> 17

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser His Ser

1 5 10

<210> 18

<211> 5

<212> 人工序列

<213>

<400> 18

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5

<210> 19

<211> 16

<212> 人工序列

<213>

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 20

<211> 18

<212> 人工序列

<213>

<400> 20

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly

1 5 10 15

<210> 21

<211> 8

<212> 人工序列

<213>

<400> 21

Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> 人工序列

<213>

<400> 22

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 5

<212> 人工序列

<213>

<400> 23

Gly Gly Ser Ser Gly

1 5

<210> 24

<211> 11

<212> 人工序列

<213>

<400> 24

Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10

<210> 25

<211> 15

<212> 人工序列

<213>

<400> 25

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> 人工序列

<213>

<400> 26

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1	5	10	15
<210> 27			
<211> 59			
<212> 人工序列			
<213>			
<400> 27			
Ser Asp Arg Val Ala Asp Val Ile Glu Ser Ser Ile Gly Asp Ser Val			
1	5	10	15
Ser Arg Ala Leu Thr His Ala Leu Pro Ala Pro Thr Gly Gln Asn Thr			
	20	25	30
Gln Val Ser Ser His Arg Leu Asp Thr Gly Lys Val Pro Ala Leu Gln			
	35	40	45
Ala Ala Glu Ile Gly Ala Ser Ser Asn Ala Ser			
	50	55	
<210> 28			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> 引物			
<400> 28			
gactggttcc aattgacaag c			21
<210> 29			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> 引物			
<400> 29			
gcaaattggca tctgacatcc			21

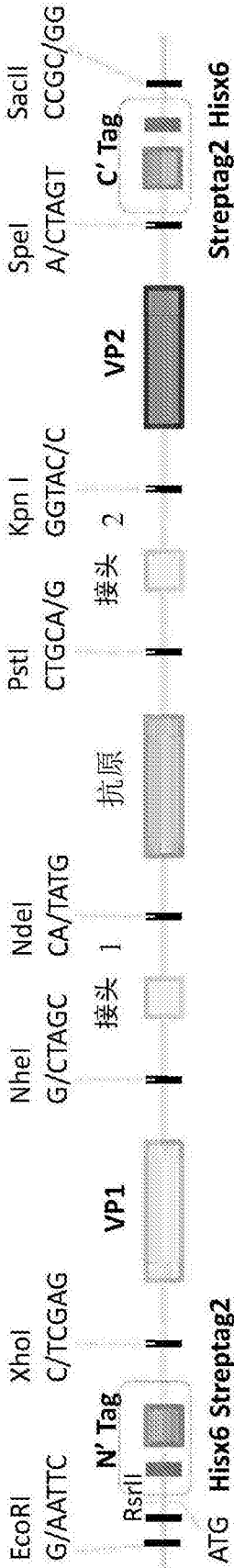


图1A

连接位	名称	蛋白序列
柔性	G: (GGGG) ₃	GGGGGGGGGGGGGS (15 a.a.)
刚性	E: (EAAAK) ₃	EAAAKEAAAKEAAAK (15 a.a.)
随机螺旋	R: EV71 VP1 1-59	GDRVADVIESSIGDSVSRALTHALPAPTQNTQVSSHR LDTGKVPALQAAEIGASSNAS (59 a.a.)

图1B

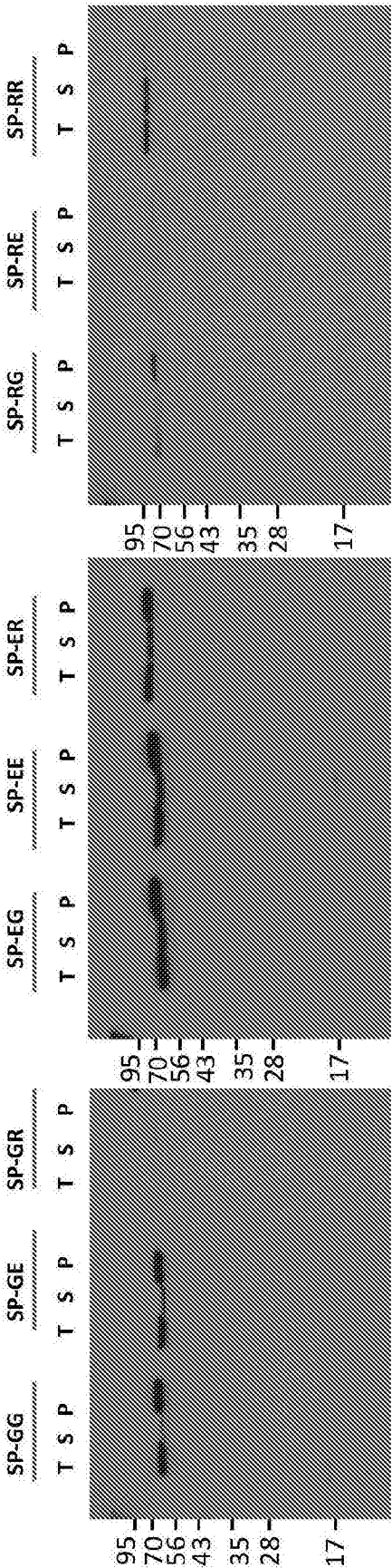


图2

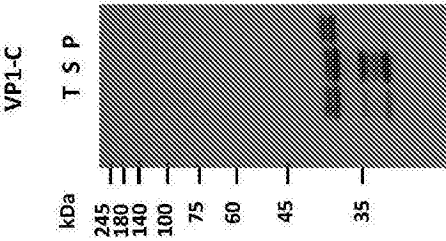


图3A

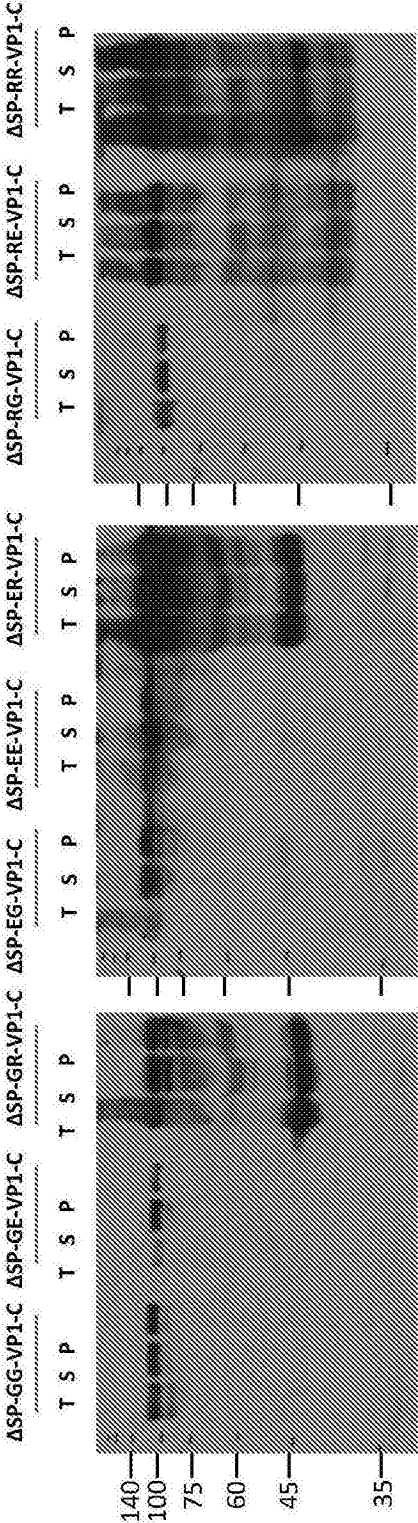


图3B

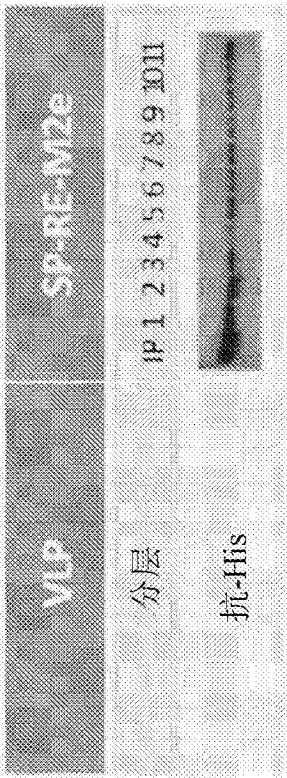


图7C

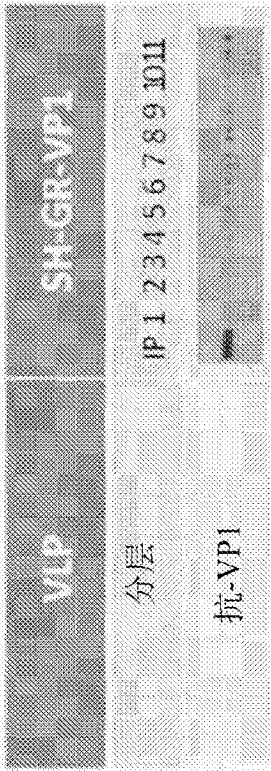


图7D

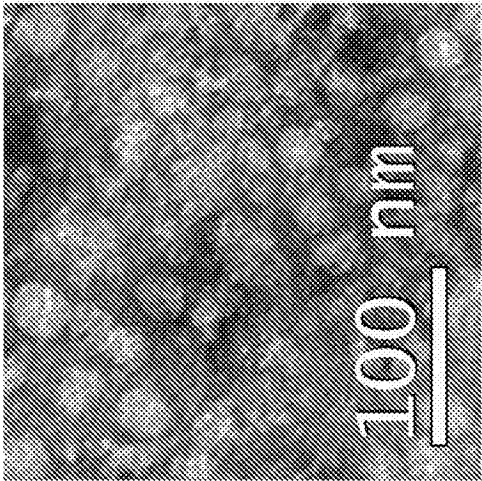


图8

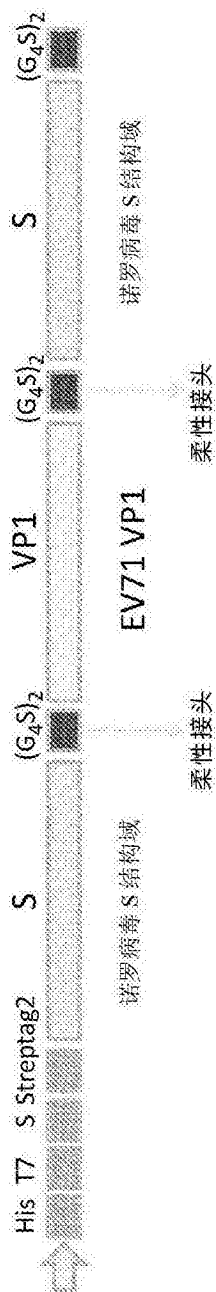


图9

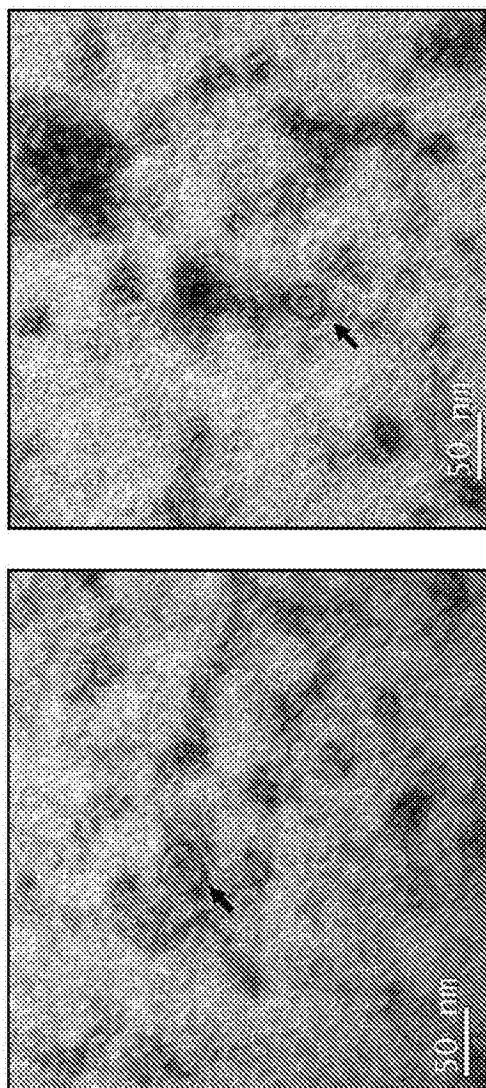


图10

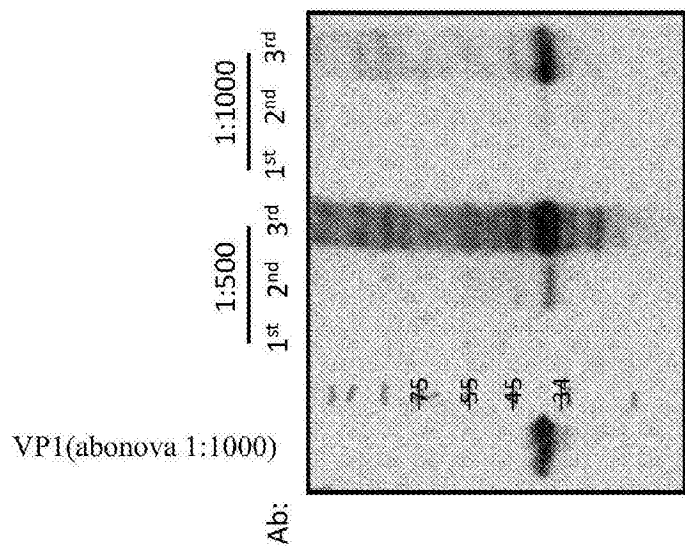


图11

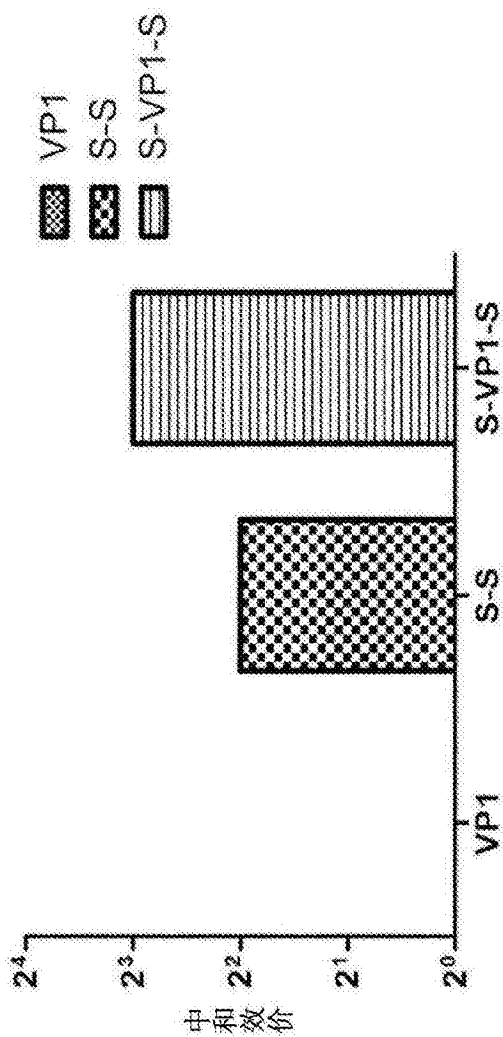


图12