



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104203273 B

(45)授权公告日 2017.08.22

(21)申请号 201380014180.2

(22)申请日 2013.03.15

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104203273 A

(43)申请公布日 2014.12.10

(30)优先权数据

61/614,141 2012.03.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/032096 2013.03.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/142329 EN 2013.09.26

(73)专利权人 弗劳恩霍费尔美国股份有限公司

地址 美国特拉华

(72)发明人 A·普罗奈夫斯基 V·尤什波夫

(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 11038

代理人 刘晓东

(51)Int.Cl.

A61K 39/145(2006.01)

C07K 14/005(2006.01)

C12N 7/00(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

(56)对比文件

WO 2008058396 A, 2008.05.22,

WO 2011035004 A1, 2011.03.24,

审查员 王超

权利要求书3页 说明书10页

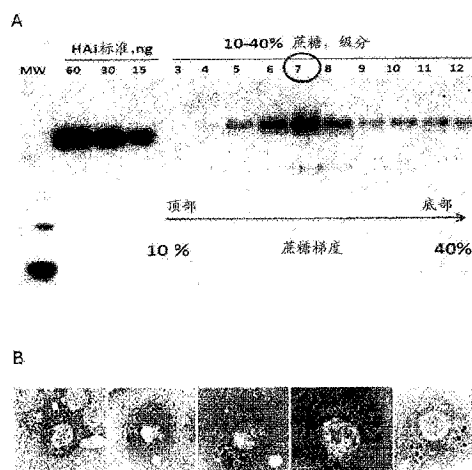
序列表6页 附图8页

(54)发明名称

包含来自植物包膜病毒的基质蛋白的病毒样颗粒及其用途

(57)摘要

本发明涉及包含来源于第一植物包膜病毒的基质蛋白和表面多肽的新型病毒样颗粒(VLP)。所述表面多肽包含(a)来源于靶多肽的暴露于表面的部分、来源于第二植物包膜病毒的跨膜蛋白(例如,糖蛋白)的(b)跨膜结构域和(c)胞质尾。所述靶多肽可以是抗原性的或治疗性的。所述第一和第二植物包膜病毒可以相同。两种植物包膜病毒中任一种都可以是植物弹状病毒。还提供了制备和使用VLP的方法。



1. 一种包含来源于第一植物包膜病毒的基质蛋白和表面多肽的病毒样颗粒,其中所述第一植物包膜病毒是植物弹状病毒,并且其中所述表面多肽包含:

- (a) 来源于靶多肽的暴露于表面的部分,
- (b) 跨膜结构域,和
- (c) 来源于第二植物包膜病毒的跨膜蛋白的胞质尾;

其中所述第一植物包膜病毒和所述第二植物包膜病毒相同。

2. 权利要求1的病毒样颗粒,其中在植物细胞、植物或植物的部分中产生所述病毒样颗粒。

3. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述植物弹状病毒选自莴苣坏死黄化病毒 (LNIV)、北方谷物花叶病毒 (NCMV)、苦苣菜病毒 (SonV) 和花椰菜坏死性黄化病毒 (BNIV)。

4. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述植物弹状病毒是莴苣坏死黄化病毒 (LNIV)。

5. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述靶多肽是来源于病原体的异源表面抗原。

6. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述靶多肽是来源于病毒的异源表面抗原。

7. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述表面多肽的暴露于表面的部分具有抗原性。

8. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述表面多肽的暴露于表面的部分是治疗性的。

9. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述靶多肽是天然表面多肽。

10. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述靶多肽是人工表面多肽。

11. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述跨膜结构域对于所述暴露于表面的部分是天然的或外来的。

12. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述跨膜结构域来源于所述跨膜蛋白。

13. 权利要求1的病毒样颗粒,其中所述跨膜结构域来源于细胞或病毒跨膜蛋白。

14. 一种用于在植物细胞、植物或植物的部分产生病毒样颗粒的方法,包括

(a) 将一种或多种核酸分子引入植物细胞、植物或植物的部分,其中所述一个或多个核酸分子包含编码来源于第一植物包膜病毒的基质蛋白的第一核苷酸序列和编码表面多肽的第二核苷酸序列,其中所述第一植物包膜病毒是植物弹状病毒,并且其中所述表面多肽包含

- (i) 来源于靶多肽的暴露于表面的部分,
- (i i) 跨膜结构域,和
- (i i i) 来源于第二植物包膜病毒的跨膜蛋白的胞质尾;

其中所述第一植物包膜病毒和所述第二植物包膜病毒相同;和

(b) 在允许所述基质蛋白和表面多肽共表达的条件下维持所述植物细胞、植物或植物的部分,由此产生病毒样颗粒。

15. 权利要求14的方法,其还包括 (c) 纯化所述病毒样颗粒。

16. 权利要求14的方法,其中通过渗入、颗粒轰击或接种将所述一种或多种核酸分子引入所述植物细胞、植物或植物的部分。

17. 权利要求14的方法,其中将所述一种或多种核酸分子瞬时地或稳定地引入植物细胞、植物或植物的部分。

18. 权利要求14的方法,其中所述植物弹状病毒选自莴苣坏死黄化病毒 (LNIV)、北方谷物花叶病毒 (NCMV)、苦苣菜病毒 (SonV) 和花椰菜坏死性黄化病毒 (BNIV)。

19. 权利要求14的方法,其中所述植物弹状病毒是莴苣坏死黄化病毒(LNYV)。
20. 权利要求14的方法,其中所述靶多肽是来源于病原体的异源表面抗原。
21. 权利要求14的方法,其中所述靶多肽是来源于病毒的异源表面抗原。
22. 权利要求14的方法,其中所述表面多肽的暴露于表面的部分具有抗原性。
23. 权利要求14的方法,其中所述表面多肽的暴露于表面的部分是治疗性的。
24. 权利要求14的方法,其中所述靶多肽是天然表面多肽。
25. 权利要求14的方法,其中所述靶多肽是人工表面多肽。
26. 权利要求14的方法,其中所述跨膜结构域对于所述暴露于表面的部分是天然的或外来的。
27. 权利要求14的方法,其中所述跨膜结构域来源于所述跨膜蛋白。
28. 权利要求14的方法,其中所述跨膜结构域来源于细胞或病毒跨膜蛋白。
29. 一种包含有效量的权利要求1-13中任一项所述病毒样颗粒的免疫原性组合物。
30. 一种包含有效量的由权利要求14-28中任一项所述方法产生的病毒样颗粒的免疫原性组合物。
31. 权利要求29或30的免疫原性组合物,其还包含佐剂或赋形剂。
32. 由权利要求14-28中任一项所述方法产生的病毒样颗粒在制备用于在受试者中诱导对病原体的保护性免疫反应的药物中的用途,其中所述靶多肽来源于所述病原体。
33. 一种用于生产包含一种或多种核酸分子的重组植物细胞、植物或植物部分的方法,其中所述一种或多种核酸分子包含编码来源于第一植物包膜病毒的基质蛋白的第一核苷酸序列和编码表面多肽的第二核苷酸序列,其中所述第一植物包膜病毒是植物弹状病毒,并且其中所述表面多肽包含
 - (a) 来源于靶多肽的暴露于表面的部分,
 - (b) 跨膜结构域,和
 - (c) 来源于第二植物包膜病毒的糖蛋白的胞质尾,其中所述第一植物包膜病毒和所述第二植物包膜病毒相同;其中所述方法包括:
将所述一种或多种核酸分子引入所述植物细胞、植物或植物部分。
34. 权利要求33的方法,其中所述一种或多种核酸分子是通过渗入、微粒轰击或接种引入的。
35. 权利要求33的方法,其中所述一种或多种核酸分子被瞬时地或稳定地引入所述植物细胞、植物或植物的部分。
36. 权利要求33的方法,其中所述植物弹状病毒选自莴苣坏死黄化病毒(LNYV)、北方谷物花叶病毒(NCMV)、苦苣菜病毒(SonV)和花椰菜坏死性黄化病毒(BNYV)。
37. 权利要求33的方法,其中所述植物弹状病毒是莴苣坏死黄化病毒(LNYV)。
38. 权利要求33的方法,其中所述靶多肽是来源于病原体的异源表面抗原。
39. 权利要求33的方法,其中所述靶多肽是来源于病毒的异源表面抗原。
40. 权利要求33的方法,其中所述表面多肽的暴露于表面的部分具有抗原性。
41. 权利要求33的方法,其中所述表面多肽的暴露于表面的部分是治疗性的。
42. 权利要求33的方法,其中所述靶多肽是天然表面多肽。

-
43. 权利要求33的方法,其中所述靶多肽是人工表面多肽。
44. 权利要求33的方法,其中所述跨膜结构域对于所述暴露于表面的部分是天然的或外来的。
45. 权利要求33的方法,其中所述跨膜结构域来源于所述跨膜蛋白。
46. 权利要求33的方法,其中所述跨膜结构域来源于细胞或病毒跨膜蛋白。

包含来自植物包膜病毒的基质蛋白的病毒样颗粒及其用途

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2012年3月22日提交的美国临时申请No.61/614,141的利益,为了所有目的将所述临时申请的内容通过引用整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明总地来说涉及优选在植物中产生的包膜病毒样颗粒(virus-like particle,VLP)以及用于产生和使用该VLP的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 病毒样颗粒(VLP)是通过自组装病毒蛋白形成的无病毒基因组存在的复合结构。VLP平台日益用于增强靶特异性免疫原性。可在几个表达系统,包括植物中产生VLP。在植物中产生VLP提供了额外有利方面,包括安全性和时间效率。然而,在植物中形成VLP是生理过程的部分并且导致不同尺寸和形状的颗粒形成,这使得商业生产和平滑调控路径极具挑战性。野生型流感病毒颗粒的尺寸取决于株系,并且在70与270nm之间变化(Nayak等人,2009,Virus Res143(2):147-161)。植物产生的流感病毒颗粒(VLP)具有不同形状和宽广的尺寸范围。例如,已报导包膜多形性流感VLP尺寸为100至150nm。(Vezina等人,2011,BioPharm International Supplements 24(5):s27-s30)。因此,仍然存在对适合疫苗开发的更均一的VLP的需要。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明的公开的主题涉及具有来源于包膜病毒的基质蛋白和表面多肽的新型病毒样颗粒(VLP)及其用途。这些VLP是包膜的,并且尺寸大体均一。

[0008] 根据本发明的一个方面,提供了病毒样颗粒(VLP)。VLP包含来源于第一植物包膜病毒的基质蛋白和表面多肽。表面多肽包含来源于靶多肽的暴露于表面的部分、跨膜结构域和胞质尾。胞质尾来源于第二植物包膜病毒的跨膜蛋白(例如糖蛋白)。VLP可在植物细胞、植物或植物的部分中产生。

[0009] 所述第一和第二植物包膜病毒可相同或不同,优选相同。其中任一植物包膜病毒可以是植物弹状病毒或非弹状病毒。优选地,第一植物包膜病毒是植物弹状病毒。植物弹状病毒可选自莴苣坏死黄化病毒(Lettuce Necrotic Yellows virus,LNYV)、北方谷物花叶病毒(Northern Cereal Mosaic virus,NCMV)、苦苣菜病毒(Sonhus Virus,SonV)和花椰菜坏死性黄化病毒(Broccoli necrotic yellows virus,BNYV)。优选植物弹状病毒是莴苣坏死黄化病毒(LNYV)。

[0010] 表面多肽的暴露于表达的部分可以是抗原性多肽,例如疫苗组分,或可以是治疗剂。治疗剂可以是治疗性多肽。

[0011] 靶多肽可来源于病原体。病原体可选自病毒、细菌、寄生虫和真菌。病毒可以是动物病毒。动物病毒可选自流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人乳头瘤病毒(HPV)、埃博拉病毒、黄热病毒、轮状病毒和水疱性口炎病毒(VSV)。

[0012] 靶多肽可以是天然表面多肽。天然表面多肽可以是流感病毒的血凝素。

[0013] 靶多肽可以是人工表面多肽。人工表面多肽可以是来自炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 的保护性抗原83 (PA83)、来自恶性疟原虫的Pfs25或其它可溶性蛋白或肽。

[0014] 流感病毒可选自甲型流感病毒和乙型流感病毒。流感病毒可选自甲型流感病毒印度尼西亚05/05株、甲型流感病毒加利福尼亚/04/2009 (H1N1) 株、甲型流感病毒/维多利亚/3/75 (H3N2) 株和乙型流感病毒香港/330/2001。

[0015] 靶多肽可以是治疗剂。治疗剂可以是治疗性多肽。

[0016] 跨膜结构域对于所述表面多肽的暴露于表面的部分可以是天然的或外来的。跨膜结构域可来源于细胞或病毒跨膜蛋白。病毒跨膜结构域可来源于胞质尾所源自的跨膜蛋白。

[0017] 根据本发明的另一个方面,提供了在植物细胞、植物或植物的部分中产生病毒样颗粒 (VLP) 的方法。该方法包括将一个或多个核酸分子引入植物细胞、植物或植物的部分。所述一个或多个核酸分子包含编码来源于第一植物包膜病毒的基质蛋白的第一核苷酸序列和编码表面多肽的第二核苷酸序列。表面多肽包含来源于靶多肽的暴露于表面的部分、跨膜结构域和胞质尾。胞质尾来源于第二植物包膜病毒的跨膜蛋白 (例如,糖蛋白)。第一和第二植物包膜病毒可以相同或不同,优选相同。两种病毒中任一种都可以是植物弹状病毒或非弹状病毒。优选,第一植物包膜病毒是植物弹状病毒。该方法还包括在允许共表达基质蛋白和表面多肽的条件下维持植物细胞、植物或植物的部分,以便产生VLP。VLP在尺寸上可以是大体上均一的。该方法还可包括从植物细胞、植物或植物的部分纯化VLP。

[0018] 可通过渗入、微粒轰击或接种将所述一种或多种核酸分子引入植物细胞、植物或植物的部分。可将一种或多种核酸分子瞬时或稳定地引入植物或其部分。

[0019] 提供各种免疫原性组合物。在一些实施方案中,免疫原性组合物包含有效量的本发明的VLP,所述VLP在尺寸上是大体上均一的。在其它实施方案中,免疫原性组合物包含有效量的通过本发明的方法产生的VLP,所述VLP在尺寸上是大体上均一的。免疫原性组合物还可包含佐剂和/或赋形剂。

[0020] 提供了在受试者中诱发针对靶多肽的免疫反应的方法。所述方法包括给受试者施用有效量的本发明的免疫原性组合物,其中VLP在尺寸上是大体上均一的。

[0021] 还提供了在受试者中诱发针对病原体的保护性免疫反应的方法。该方法包括给受试者施用有效量的本发明的免疫原性组合物,其中VLP在尺寸上是大体上均一的。所述靶多肽来源于病原体。病原体可以是流感病毒。靶多肽可来源于血凝素。

[0022] 还提供了包含一种或多种核酸分子的重组植物细胞。所述一种或多种核酸分子包含编码来源于第一植物包膜病毒的基质蛋白的第一核苷酸序列和编码表面多肽的第二核苷酸序列。所述表面多肽包含 (a) 来源于靶多肽的暴露于表面的部分, (b) 跨膜结构域,和 (c) 来源于第二植物包膜病毒的跨膜蛋白 (例如糖蛋白) 的胞质尾。第一和第二植物包膜病毒可以相同或不同,优选相同。两种病毒中任一种都可以是植物弹状病毒或非弹状病毒。优选,第一植物包膜病毒是植物弹状病毒。还提供了包含本发明的植物细胞的植物或其部分。

[0023] 附图概述

[0024] 图1显示植物弹状病毒的 (A) 电子显微镜图像和 (B) 组织。

[0025] 图2是举例说明用于两种靶蛋白即靶1和靶2 (各自有效地连接于调控区) 的共表达

的miniBYV载体的T-DNA区域的基因组组织的图示。L-Pro,木瓜蛋白酶样前导蛋白酶;Met、Hel和Pol,分别为甲基转移酶、RNA解旋酶、复制酶的RNA依赖性RNA聚合酶结构域;2Enx35S,来自花椰菜花叶病毒的具有双重增强子的35S启动子;NOS-胭脂碱合酶终止子;LB和RB,分别为T-DNA的左和右边界。

[0026] 图3是举例说明分别用于莴苣坏死黄化病毒(LNYV) (M_{LNYV}) 或北方谷物花叶病毒(NCMV) (M_{NCMV}) 的HAi-TM蛋白和基质蛋白的共表达的miniBYV-HAi-TM/M_{LNYV}或miniBYV-HAi-TM/M_{NCMV}载体的T-DNA区域的基因组组织的图示。L-Pro,木瓜蛋白酶样前导蛋白酶;Met、Hel和Pol,分别为甲基转移酶、RNA解旋酶、复制酶的RNA依赖性RNA聚合酶结构域;2Enx35S,来自花椰菜花叶病毒的具有双重增强子的35S启动子;NOS-胭脂碱合酶终止子;LB和RB,分别为T-DNA的左和右边界。

[0027] 图4是举例说明用于HAi-TM(G)_{LNYV}蛋白和M_{LNYV}蛋白的共表达的miniBYV-HAi-TM(G)/M_{LNYV}载体的T-DNA区域的基因组组织的图示。L-Pro,木瓜蛋白酶样前导蛋白酶;Met、Hel和Pol,分别为甲基转移酶、RNA解旋酶、复制酶的RNA依赖性RNA聚合酶结构域;2Enx35S,来自花椰菜花叶病毒的具有双重增强子的35S启动子;NOS-胭脂碱合酶终止子;LB和RB,分别为T-DNA的左和右边界。

[0028] 图5描述了渗入后通过抗-HAi 5G6第一单克隆抗体检测的HAi-TM表达的时间进程分析的代表性western印迹。以60、30或15ng的量存在的参照HAi用作定量的标准。泳道1和2,手工渗入的本萨明那烟草(N.benthamiana);3和4,真空渗入的本萨明那烟草。

[0029] 图6显示(A) HAi-TM VLP在10%-40%的蔗糖梯度上的分布和(B) 通过扫描电子显微镜检查(TEM) 负染色检测的来自(A) 的级分10的HAi-TMVLP的形态学。

[0030] 图7显示(A) HAi-TM/M1VLP在10-40%蔗糖梯度上的分布;和(B) 通过TEM负染色检测的来自(A) 的级分10的HAi-TM/M1VLP的形态学。

[0031] 图8显示(A) 甲型流感病毒/印度尼西亚/05/2005基质(M1) 蛋白在叶样品中的表达(泳道1-3,来自产生HAi-TM/M1VLP的渗入植物的不同重复);和(B) 来自HAi-TM/M1VLP的M1蛋白在如图7A上显示的10-40%的蔗糖梯度级分中不存在。Std,M1蛋白标准。

[0032] 图9显示(A) HAi-TM/M_{LNYV} VLP在10-40%蔗糖梯度上的分布和(B) 利用抗-HAi 5G6小鼠单克隆抗体对HAi-TM/M_{LNYV} VLP的免疫金标记。

[0033] 图10显示(A) HAi-TM(G)/M_{LNYV}VLP在10%-40%蔗糖梯度上的分布和(B) 利用抗-HAi 5G6小鼠单克隆抗体对来自(A) 的级分7的HAi-TM(G)-M_{LNYV}VLP的免疫金标记。

[0034] 图11显示具有PR1a烟草信号肽(加以下划线的)、HAi胞外结构域、HAi跨膜结构域(粗体) 和HAi胞质尾(斜体字标示的) 的H5N1禽流感病毒(A/印度尼西亚/05/2005) 的血凝素(HAi-TM) (SEQ ID NO:1), 和(B) 具有PR1a烟草信号肽(加以下划线的)、HAi胞外结构域、LNYV糖蛋白的跨膜结构域(粗体) 和LNYV糖蛋白的胞质尾(斜体字标示的) 的H5N1禽流感病毒(A/印度尼西亚/05/2005) 的血凝素的氨基酸序列。

[0035] 图12显示(A) LNYV(M_{LNYV}) 的基质蛋白(SEQ ID NO:3) 和(B) H5N1禽流感病毒(A/印度尼西亚/05/2005) 的基质蛋白(M1蛋白) (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明基于以下发现:可在植物中产生包含来源于植物包膜病毒的基质蛋白和表面多肽的新型病毒样颗粒(VLP)。这些VLP是被包膜的,并且在尺寸上是大体上一致的,可用

于设计和产生有效的人疫苗。

[0038] 本文中使用的术语“蛋白质”是指包含氨基酸残基的生物分子。蛋白质可包含一个或多个多肽。每一个多肽可以是蛋白质的亚单位。蛋白质可以以天然或修饰形式存在,并且当其多肽正确折叠或装配时可显示生物功能。

[0039] 本文中使用的术语“多肽”是指氨基酸残基的聚合物,在聚合物的最小长度方面没有限制。优选地,多肽具有至少4个氨基酸。多肽可以是全长蛋白质或其片段或变体。

[0040] 如本文中所用,术语蛋白质的“片段”是指具有与该蛋白质的氨基酸序列的部分(但非全部)相同的氨基酸序列的多肽。优选地,片段是保留与该蛋白质相同的功能的蛋白质功能性片段。

[0041] 本文中使用的术语蛋白质的“变体”是指除有至少一个被修饰(例如,分别地缺失、插入或置换)的氨基酸外具有与蛋白质的氨基酸序列相同的氨基酸序列的多肽。氨基酸置换可以是保守氨基酸置换(优选在蛋白质的非必需氨基酸残基上)。“保守氨基酸置换”是其中利用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的氨基酸置换。具有相似侧链的氨基酸残基的家族在本领域是已知的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -分枝侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。蛋白质的变体可具有与该蛋白质的氨基酸序列具有至少约80%、90%、95%或99%,优选至少约90%,更优选至少约95%同一性的氨基酸序列。优选地,变体是保持与所述蛋白质相同的功能的蛋白质功能性变体。

[0042] 本文中使用的术语“来源于”是指起源或来源,可包括天然存在的、重组的、未纯化的或纯化的分子。本发明的分子可来源于病毒或非病毒分子。来源于原始蛋白质或多肽的蛋白质或多肽可部分或完全地包含原始蛋白质或多肽,并且可以是原始蛋白质或多肽的片段或变体。

[0043] 本文中使用的术语“天然的”是指天然存在的分子(例如,蛋白质或多肽)。本文中使用的术语“人工的”是指非天然存在的,但人工地例如重组或化学地合成的分子(例如,蛋白质或多肽)。

[0044] 根据本发明的一个方面,提供了病毒样颗粒(VLP)。VLP包含基质蛋白和表面多肽。基质蛋白来源于第一植物包膜病毒,优选植物弹状病毒,更优选莴苣坏死黄化病毒。表面多肽包含来源于靶多肽的暴露于表面的部分、跨膜结构域和胞质尾。胞质尾来源于第二植物包膜病毒的跨膜蛋白(例如,糖蛋白)。例如,胞质尾可来源于弹状病毒糖蛋白。跨膜结构域和胞质尾可来源于相同或不同的植物包膜病毒,优选来自相同植物包膜病毒。在一个实施方案中,跨膜结构域来源于靶蛋白,而胞质尾来源于弹状病毒糖蛋白。在另一个实施方案中,跨膜结构域和胞质尾来源于相同植物弹状病毒糖蛋白。基质蛋白、跨膜结构域和胞质尾可来源于相同植物包膜病毒。

[0045] 可在植物细胞或其它细胞中产生VLP。植物细胞可以是植物、植物部分(例如,叶、茎、根、花组织、种子或柄)或细胞培养基中的细胞。植物可以是整个正在生长的植物。优选,植物细胞存在于植物叶中。细胞培养基可以是适合用于生长(优选以悬浮方式)植物细胞的

任何培养基。植物细胞优选适合用于VLP的表达。例如,植物细胞可存在于本萨明那烟草叶中。其它适当的植物包括克利夫兰烟 (*Nicotiana clevelandii*)、甜菜 (*Beta vulgaris*)、菠菜 (*Spinacia oleracea*)、芸苔属的某些种 (*Brassica* spp)、莴苣、豌豆 (*Pisum sativum*)、烟草、长叶车前 (*Plantago lanceolata*)、番杏 (*Tetragonia tetragonioides*)、*Montia perfoliata*、繁缕 (*Stellaria media*)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 和球花藜 (*Chenopodium foliosum*)。

[0046] VLP可包含膜。VLP的表面多肽可被整合入膜。膜可来源于其中装配、制造或产生VLP的细胞。

[0047] 基质蛋白可来源于任何植物包膜病毒的天然基质蛋白。基质蛋白可具有与对应天然基质蛋白的氨基酸序列具有至少约80%、85%、90%、95%或99%,优选至少约90%,更优选至少约95%,更优选至少约99%,最优选约100%的同一性的氨基酸序列。

[0048] 来源于靶多肽的暴露于表面的部分是VLP表面上的表面多肽的部分。表面多肽可以是抗原性多肽,例如疫苗组分,或可以是治疗剂。治疗剂可以是治疗性多肽。VLP中的或从VLP纯化的表面多肽可用于各种目的。例如,表面多肽可以是抗原性的,并且在被引入受试者时可用于诱导受试者的免疫反应。当给受试者施用,其还可用作治疗受试者的疾病或障碍的治疗剂。当用于测试来自怀疑具有疾病或障碍的受试者的样品时,其还可用作受试者的疾病或障碍的诊断的诊断剂。

[0049] 表面多肽可来源于抗原性靶多肽,当被引入受试者时能够诱导受试者的免疫反应,并且可用于形成或成为疫苗候选者。其可包含一个或多个能够刺激受试者的免疫系统产生体液和/或细胞抗原特异性免疫反应的表位(线性的和/或构象的)。体液免疫反应是指通过由B淋巴细胞或B细胞产生的抗体介导的免疫反应,而细胞免疫反应是指通过T淋巴细胞或T细胞和/或其它白细胞介导的免疫反应。一般而言,B细胞表位包含至少约5个氨基酸,但可以为3-4个氨基酸,而T细胞表位包括至少约7-9个氨基酸,辅助T细胞表位包括至少12-20个氨基酸。靶多肽可部分或整个地来源于病原性生物或病原体的天然蛋白(例如,表面蛋白或毒素亚单位)。靶多肽可包含与对应天然致病蛋白的氨基酸序列具有至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%,优选至少约90%,更优选至少约95%,进一步优选至少约99%,最优选约100%的同一性的氨基酸序列。病原体可以是细胞内或细胞外病原体。示例性病原体包括病毒、细菌、寄生虫和真菌。病毒可以是动物或植物病毒,优选动物病毒。动物病毒可选自流感病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人乳头瘤病毒(HPV)、埃博拉病毒、黄热病毒、轮状病毒和水疱性口炎病毒(VSV)。优选地,靶多肽来源于流感病毒。

[0050] 靶多肽可以是天然表面多肽或人工表面多肽。天然表面多肽可以是流感病毒的血凝素。人工表面多肽可以是保护性抗原83(PA83)、Pfs25或其它可溶性蛋白或肽。PA83来自炭疽菌(*Bacillus anthracis*)。Pfs25来自恶性疟原虫。

[0051] 流感病毒可选自甲型流感病毒和乙型流感病毒。流感病毒可选自甲型流感病毒印度尼西亚05/05株、甲型流感病毒加利福尼亚/04/2009(H1N1)株、甲型流感病毒/维多利亚/3/75(H3N2)株和乙型流感病毒香港/330/2001。

[0052] 表面多肽的跨膜结构域可以是天然蛋白或人工蛋白。跨膜结构域对于表面多肽或靶多肽的暴露于表面的部分可以是天然的或外来的。跨膜结构域可来源于跨膜蛋白,优选

与基质蛋白和胞质尾所源自的跨膜蛋白相同的跨膜蛋白。跨膜结构域可来源于细胞或病毒跨膜蛋白,或表面蛋白。跨膜结构域可来源于或可以不来源于靶多肽。病毒跨膜蛋白可以是来自植物病毒的跨膜蛋白。植物病毒可以是植物包膜病毒,优选基质蛋白和胞质尾所源自的植物包膜病毒。跨膜结构域可来源于病毒的糖蛋白,优选植物包膜病毒的糖蛋白,更优选基质蛋白和胞质尾所源自的植物包膜病毒的糖蛋白。

[0053] 植物包膜病毒具有脂质包膜。脂质包膜通常来源于病毒颗粒芽出的宿主细胞的膜。植物包膜病毒可以是植物弹状病毒或非弹状病毒。植物弹状病毒的实例包括莴苣坏死黄化病毒(LNYV)、北方谷物花叶病毒(NCMV)、苦苣菜病毒(SonV)、花椰菜坏死性黄化病毒(BNYV)和被国际病毒分类委员会(ICTV)承认的其它植物弹状病毒。优选地,植物包膜病毒为莴苣坏死黄化病毒(LNYV)。

[0054] LNYV和NCMV弹状病毒的特征在于单顺反子负义RNA,属于弹状病毒科质型弹状病毒属。植物弹状病毒的特征在于杆状形式结构(图1A),在长度上为约130–350,在宽度上为约40–100nm(Jackson等人,2005,Ann.Rev.Phytopathol.43:623–660)。该病毒对于杆状颗粒的装配至关重要的两种蛋白是基质蛋白(M蛋白)和糖蛋白(G蛋白)。M蛋白在病毒体的包膜内形成层,并且与G蛋白的胞质尾相互作用(图1B)。

[0055] 根据本发明的另一个方面,提供用于在植物细胞、植物或植物的部分中产生本发明的VLP的方法。该方法包括将一种或多种核酸分子引入植物细胞、植物或植物的部分。所述一种或多种核酸分子包含编码基质蛋白的第一核苷酸序列和编码表面多肽的第二核苷酸序列。基质蛋白来源于第一植物包膜病毒。表面多肽包含来源于靶多肽的暴露于表面的部分、跨膜结构域和胞质尾。胞质尾来源于第二植物包膜病毒的跨膜蛋白(例如,糖蛋白)。例如,胞质尾可来源于植物弹状病毒糖蛋白。跨膜结构域可来源于或可以不来源于靶多肽。第一和第二植物包膜病毒可以是相同的或不同的,优选相同的。两种病毒中任一种都可以是植物弹状病毒或非弹状病毒。优选地,第一包膜植物病毒是植物弹状病毒。该方法还包括在允许基质蛋白和表面多肽共表达的条件下维持植物细胞、植物或植物的部分,以便产生VLP。

[0056] 通过根据本发明的方法产生的VLP可具有任何尺寸。例如,VLP可具有在约5–350nm,包括约40–60nm的范围内的直径。优选地,VLP在尺寸上大体上均一。本文中使用的术语“尺寸上大体上均一”意指至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%,优选至少约80%,更优选至少约90%,最优选至少约95%的VLP的直径与全部VLP的平均直径相差小于约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%,优选小于约30%,更优选小于约20%,最优选小于约10%以内。VLP的直径可以是VLP的直径的一个或多个测量的平均值或均值。VLP的直径可通过本领域已知的常规技术,例如通过使用电子显微镜的观察、蔗糖梯度分级分离、尺寸排阻层析和动态光散射来测定。VLP的直径值可使用各种软件例如ImageJ软件(NIH,Bethesda,MD)和其它商购可得的软件来分析。

[0057] 所述一种或多种核酸分子还可包含有效地连接于第一或第二核苷酸序列的调控区。调控区可在植物细胞中被激活以表达由第一或第二核苷酸序列编码的蛋白质。调控区可包括启动子,例如植物病毒启动子。优选地,第一和第二核苷酸序列存在于相同核酸分子中,但连接于分开的调控区。所述一种或多种核酸分子还可包含编码另外的表面多肽的第三核苷酸序列。

[0058] 对于每一个核酸分子,提供了包含该核酸分子的核苷酸序列的载体。载体可在任一末端上包含位于细菌转移DNA中的边界序列以允许将核酸递送入植物细胞。具体地,载体可包含一个或多个来源于二元载体的Ti质粒的核酸序列,还可包含植物病毒序列。这样的载体,包括Ti质粒和病毒载体的元件,也称为投放载体 (launch vector)。该载体还可用于共表达目标蛋白质或多肽 (例如,基质蛋白和/或表面多肽) 与蛋白质例如沉默抑制蛋白或翻译后修饰酶例如PNGaseF,以通过例如促进蛋白质的成熟或积累来修饰,影响目标蛋白的表达和/或增加其产量。

[0059] 可使用本领域已知的技术将每一个核酸分子引入植物细胞、植物或植物的部分 (例如,叶、茎、根、花组织、种子或柄)。例如,所述核酸分子可通过渗入、微粒轰击或接种来进行递送。核酸分子可用作被例如化学剂、光或热休克激活的可诱导系统的部分。优选地,通过渗入将核酸分子引入植物细胞。可瞬时地或稳定地引入核酸分子。

[0060] 提供了包含一种或多种核酸分子的重组植物细胞。所述一种或多种核酸分子包含编码基质蛋白的第一核苷酸序列和编码表面多肽的第二核苷酸序列。优选地,所述第一和第二核苷酸序列存在于一个核酸分子中。基质蛋白来源于第一植物包膜病毒。表面多肽包含来源于靶多肽的暴露于表面的部分、跨膜结构域和胞质尾。胞质尾来源于第二植物包膜病毒的跨膜蛋白 (例如,糖蛋白)。第一和第二植物包膜病毒可以相同或不同,优选相同。两种病毒中任一种都可以是植物弹状病毒或非弹状病毒。优选地,第一植物包膜病毒是植物弹状病毒。跨膜结构域可以来源于或不来源于靶多肽。胞质尾可来源于植物包膜病毒的糖蛋白。例如,胞质尾可来源于弹状病毒糖蛋白。所述第一或第二核苷酸序列可分别有效地连接于能够在植物细胞中被激活的启动子,以共表达基质蛋白或表面多肽。还提供了包含本发明的植物细胞的植物或其部分。

[0061] 为了产生本发明的VLP,可在允许基质蛋白和表面多肽共表达的条件下维持植物细胞或植物或其部分,从而导致VLP的产生。这样的条件包括适当的温度、湿度、压力、光/暗周期和照明。优选地,基质蛋白和表面多肽在相同植物细胞中共表达。

[0062] 生产方法还可包括纯化VLP。可使用本领域已知的常规纯化技术。例如,使用能够结合表面多肽的抗体或受体从植物细胞纯化VLP。纯化过程可包括使用提取缓冲液从植物细胞提取VLP。在低速离心后,可通过过滤澄清上清液,将其用于层析。纯化的VLP可具有至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%,优选至少约50%,更优选至少约75%,最优选至少约95%的纯度。可使用粗制植物提取物中的VLP。

[0063] 提供了免疫原性组合物。组合物包含有效量的本发明的VLP。优选地,VLP在尺寸上是大体上均一的。有效量的VLP是足以使组合物具有免疫原性 (即,当被引入受试者时能够诱发免疫反应) 的VLP的量。组合物还可包含佐剂和/或赋形剂。免疫原性组合物可用于诱导受试者的免疫反应。提供了几个诱导免疫反应的方法。

[0064] 提供了诱导受试者针对靶多肽的免疫反应的方法。该方法包括给受试者施用有效量的本发明的免疫原性组合物。优选地,VLP在尺寸上是大体上均一的。可以以适当数目的剂量施用免疫原性组合物。

[0065] 还提供了在受试者中诱导针对病原体的保护性免疫反应的方法。该方法包括给受试者施用有效量的本发明的免疫原性组合物。优选地,VLP在尺寸上是大体上均一的。靶多肽来源于病原体。例如,靶多肽可以是血凝素,病原体是流感病毒。

[0066] 受试者可以是动物,包括哺乳动物,例如人、小鼠、牛、马、鸡、狗、猫和兔。动物可以是农业动物(例如,马、牛和鸡)或宠物(例如,狗和猫)。受试者优选为人或小鼠,更优选人。受试者可以是男性或女性。受试者还可以是新生儿、儿童或成年人。受试者可以已患有疾病或医学病况或对所述疾病或病况易感,所述疾病或病况由病原体引起或与之相关。

[0067] 可配制免疫原性组合物用于口服、舌下、鼻内、眼内、直肠、经皮肤、粘膜、局部或胃肠外施用。胃肠外施用可包括真皮内、皮下(s.c.、s.q.、sub-Q、Hypo)、鼻内、肌肉(i.m.)、静脉内(i.v.)、腹膜内(i.p.)、动脉内、脊髓内、心内、关节内(关节)、滑膜内(关节液区域)、颅内、脊柱内和鞘内(脑脊髓液)施用。适合用于组合物胃肠外注射或输注的任何装置可用于这样的施用。

[0068] 术语“有效量”是指足以实现所述目的的量,其可随所述目的和其它因素变化而变化。例如,免疫原性组合物中的VLP的有效量或包含VLP的免疫原性组合物的有效量可随受试者的体格特征、VLP需求的性质和严重度、相关或不相关医学病况的存在、VLP的性质和给受试者施用VLP的装置和施用途径的变化而变化。用于给定受试者的具体剂量通常可通过医生的判断来确定。可以以一个或多个剂量给受试者施用免疫原性组合物。

[0069] 提供了包含本发明的VLP的各种药物。VLP优选在尺寸上是大体上均一的。药物可包含适当的佐剂。在一些实施方案中,药物可用于在受试者中诱导针对靶多肽的免疫反应,并且包含有效量的本发明的VLP。在一些其它实施方案中,药物可用于在受试者中诱导针对病原体的保护性免疫反应,并且包含有效量的本发明的VLP,其中靶多肽来源于所述病原体。例如,靶多肽可以是血凝素,病原体是流感病毒。

[0070] 对于本发明的每一种药物,提供了用于制备药物的方法。制备方法包括将本发明的VLP与药学上可接受的载体和/或赋形剂混合。VLP优选在尺寸上是大体上均一的。

[0071] 如本文中所用,当指可测量的值例如量、百分比等时,术语“约”意指包括与指定值相比有 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$,更优选 $\pm 5\%$,更优选 $\pm 1\%$,更优选 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这样的变化是适当的。

[0072] 实施例1.mini-BYV载体的构建

[0073] 为了证明使用来自不同植物包膜蛋白的基质蛋白(M蛋白)、装配VLP的可行性,将弹状病毒M蛋白和包含LNYV糖蛋白(G蛋白)的跨膜结构域和胞质尾的靶抗原工程化以在植物细胞中进行共表达。为了共表达这些蛋白质,使用miniBYV载体(图2)。miniBYV载体包含来源于长线型病毒科病毒(例如,甜菜根黄病毒)的微复制子,其包含仅编码长线型病毒科病毒复制所需的蛋白质的核酸序列。具体地,将来自LNYV或NCMV的M蛋白与来自H5N1禽流感病毒(A/印度尼西亚/05/2005)的血凝素(HAi)共表达。

[0074] 简而言之,将编码具有其天然TM结构域的HAi蛋白(HAi-TM)的基因克隆进入miniBYV载体以产生miniBYV-HAi-TM质粒。HAi-TM蛋白(SEQ ID NO:1)包括PR1a烟草信号肽(加以下划线的)、HAi胞外结构域、HAi天然跨膜结构域(粗体)和HAi天然胞质尾(以斜体字标示的)(图11A)。随后,将编码LNYV(M_{LNYV} 蛋白)或NCMV(M_{NCMV} 蛋白)的M蛋白的基因在长线形病毒异源衣壳蛋白(CP)启动子的控制之下引入miniBYV-HAi-TM质粒以产生miniBYV-HAi-TM/ M_{LNYV} 或miniBYV-HAi-TM/ M_{NCMV} 质粒(图3)。为了评价VLP,将阳性克隆转化入根癌农杆菌菌株系GV3101,随后将其引入本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)植物以产生VLP。

[0075] 平行地,修饰HAi基因以编码重组血凝素蛋白(HAi-TM(G)),其中HAi的天然TM和胞

质尾分别被来自LNYV的糖蛋白的跨膜结构域和胞质尾替代。将编码HAi-TM(G) 蛋白 (SEQ ID NO:2) (包括PR1a烟草信号肽(加以下划线的)、HAi胞外结构域、LNYV糖蛋白跨膜结构域(粗体)和LNYV糖蛋白胞质尾(以斜体字标示的))的核苷酸序列(图11B)引入包含编码LNYV的M蛋白(M_{LNYV}蛋白)的核苷酸序列(SEQ ID NO:3)的miniBYV载体(图12A)。对所得的构建体miniBYV-HAi-TM(G)/M_{LNYV}(图4)进行测序,将阳性克隆转化进入根癌农杆菌,随后引入本氏烟草植物以产生HAi-TM(G)-M_{LNYV}VLP。

[0076] 作为对照,将编码H5N1禽流感病毒(A/印度尼西亚/05/2005)的基质蛋白(M1蛋白)的基因(SEQ ID NO:4)(图12B)在长线性病毒衣壳蛋白(CP)启动子的控制下引入miniBYV-HAi-TM质粒以产生质粒miniBYV-HAi-TM/M1。如上所述,PR1a用作信号肽。将阳性克隆转化进入根癌农杆菌,随后引入本氏烟草植物以产生HAi-TM/M1VLP。

[0077] 实施例2.优化渗入法以表达HAi

[0078] 为了评价HAi的表达水平和发展真空渗入条件,使用无土栽培生长的本氏烟草植物。为了分析HAi-TM的表达,使用相同的缓冲液进行miniBYV-HAi-TM的手工渗入和真空渗入。将在蛤壳中的石棉中生长的5周龄本氏烟草植物用于真空和手工渗入。将农杆菌生长在LB培养基中,所述培养基补充有50ng/ml卡那霉素和50ng/ml潮霉素。在28℃,在220rpm摇动的情况下生长1升过夜培养物,进行18-24小时。

[0079] 通过测量每一个培养物的OD₆₀₀测定过夜浓度。通过在4℃以4000g旋转15min来沉淀农杆菌。将细菌沉淀物重悬浮于100ml新鲜MMA培养基(10mM MgCl₂;10mM MES,pH 5.85;和20μM乙酰丁香酮)。在室温摇动2小时后,记录每一个培养物的终浓度。将包含miniBYV和P1/HcPro沉默抑制蛋白(miniBYV需要使用沉默抑制蛋白来实现良好的靶表达水平)的培养物混合至1.0:0.2的OD₆₀₀比率。为了进行真空渗入,用包含miniBYV:P1/HcPro的农杆菌浸润蛤壳。给经渗入的植物喂饲50ppm水溶胶,将其在生长室中放置5-8天。

[0080] 为了进行手工渗入,使用10cc无针注射器手工地渗入无土栽培生长的本氏烟草的3-5片叶子。给植物喂饲50ppm水溶胶,将其保持在渗入后室中进行5-8天。

[0081] HAi-TM的表达水平基于在Western印迹分析中通过抗-HAi 5G6单克隆抗体检测的HAi-TM蛋白的量来测定(图5)。HAi-TM的表达在渗入后(dpi)6天和7dpi在真空渗入的叶中相较于手工渗入叶中的水平更高(表1)。例如,在6dpi,HAi-TM蛋白以249mg/kg在真空渗入的叶中表达,相较于手工渗入的叶有43%的表达增加。

[0082] 表1.HAi-TM的表达水平时间进程

[0083]

渗入后天数	手工渗入 (mg/kg)	真空渗入 (mg/kg)
5	73	46
6	174	249
7	120	123
8	180	105

[0084] 实施例3.植物产生的HAi-TM VLP

[0085] 为了表征VLP形成,使用PacI/NheI限制位点将HAi-TM克隆入miniBYV载体。将所得的质粒miniBYV HAi-TM转化入GV3101农杆菌株系。在渗入后7天收获本氏烟草的渗入叶,纯化VLP。通过抗-HAi 5G6小鼠单克隆抗体(由Immunology group at Fraunhofer-USA

Center for Molecular Biotechnology开发的) 利用峰值级分9和10检测无任何基质蛋白的HAI-TM VLP在10%-40%蔗糖梯度上的分布(图6A)。为了评价级分10中的HAI-VLP的形态学,使用扫描电子显微镜(TEM),通过负染色分析来自该级分的VLP。观察到具有不同尺寸和形状的HAI-TMVLP(图6B)。

[0086] 使用实施例2中描述的真空渗入,通过在植物中表达miniBYV-HAI-TM/M1来产生具有HAI蛋白(其天然跨膜结构域和胞质尾与甲型流感病毒/印度尼西亚/05/05的M1共表达)的HAI-TM/M1VLP。使用蔗糖梯度纯化HAI-TM/M1VLP,使用抗-HAI 5G6小鼠单克隆抗体通过Western印迹分析和电子显微镜表征,发现其分布在10%-40%的蔗糖梯度中,峰值级分为9和10(图7A)。使用来自Meredian Life science, Inc, USA的多克隆山羊抗-M1抗体在10-40%的蔗糖梯度中在相同的HAI-TM/M1VLP中未检测到M1蛋白掺入(图8A)。同时,使用山羊抗-M1蛋白多克隆抗体,通过western印迹确认M1蛋白的表达(图8B)。在共表达HAI-TM和流感病毒基质M1蛋白后,未检测到均一的VLP(图7B)。

[0087] 实施例4. 植物产生的HAI-TM/MLNYV VLP

[0088] 使用实施例2中描述的真空渗入法,通过在植物中表达miniBYV-HAI-TM/MLNYV来产生具有HAI-TM蛋白(即,具有其天然跨膜结构域和胞质尾的HAI蛋白)和LNYV M蛋白(MLNYV蛋白)的HAI-TM/MLNYV VLP。使用10%-40%的蔗糖梯度纯化HAI-TM/MLNYV VLP,通过SDS-PAGE、Western印迹分析和电子显微镜表征。使用抗-HAI 5G6小鼠单克隆抗体通过免疫金标记确认在这些VLP表面上HAI免疫决定簇的存在(图9B)。同样地,该抗体还用于检测VLP在10-40%的蔗糖梯度中的分布,在级分10中具有峰值(图9A)。HAI-TM/MLNYV VLP的分布与对于HAI-TM/M1VLP观察到的分布相似(图7A和9A)。在VLP形态学(例如,形状和尺寸)上不存在明显的差异(图7B和9B)。

[0089] 实施例5. 植物产生的均一的HAI-TM(G)/MLNYV VLP

[0090] 使用实施例2中描述的真空渗入法,通过在植物中表达miniBYV-HAI-TM(G)/MLNYV来产生具有HAI-TM(G)蛋白(即,具有来自弹状病毒糖蛋白(G)蛋白的跨膜结构域和胞质尾的HAI蛋白)和LNYV M蛋白(MLNYV蛋白)的HAI-TM(G)/MLNYV VLP。在通过10%-40%的蔗糖梯度分离HAI-TM(G)/MLNYV VLP后,收集1ml级分,使用抗-HAI 5G6单克隆抗体,通过Western印迹分析。观察到靶收集峰值的偏移。与HAI-TM/MLNYV VLP不同,在级分6、7和8中检测到HAI-TM(G)/MLNYV VLP,在级分7中具有尖锐峰。TEM后的免疫金标记显示圆形的HAI-TM(G)/MLNYV VLP(图10B)。通过ImageJ软件(NIH, Bethesda, MD)测定的HAI-TM(G)/MLNYV VLP的尺寸为 50.5 ± 15 nm。HAI-TM(G)-MLNYV VLP在尺寸和形状上大体上是均一的。

[0091] 将本文中引用的所有文献、书籍、手册、论文、专利、公布的专利申请、指导方针、摘要和其它参考资料通过引用整体并入本文。根据本文中公开的本发明的说明书或实践,本发明的其它实施方案对于本领域技术人员来说是显然的。本说明书和实施例意欲仅被当作举例说明性的,本发明的真实范围和精神由下列权利要求指定。

序列表

<110> Fraunhofer USA, Inc.

<120> 包膜病毒样颗粒及其用途

<130> FCMB-106W0

<150> US 61/614,141

<151> 2012-03-22

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 581

<212> PRT

<213> 禽流感病毒

<400> 1

Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu Leu Val Ser
1 5 10 15

Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg Ala Asp Gln
20 25 30

Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val Asp Thr
35 40 45

Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile Leu Glu
50 55 60

[0001]

Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu
65 70 75 80

Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met
85 90 95

Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys
100 105 110

Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Asp Tyr
115 120 125

Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile
130 135 140

Leu Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser Ser Gly
145 150 155 160

Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe Arg Asn
165 170 175

Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile Lys Lys
180 185 190

Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile
195 200 205

His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Arg Leu Tyr Gln Asn Pro Thr
210 215 220

	Thr	Tyr	Ile	Ser	Ile	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg	Leu	Val	Pro
	225					230					235					240
	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly	Arg	Met	Glu
					245					250					255	
	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn	Phe	Glu	Ser
				260					265					270		
	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile	Val	Lys	Lys
		275						280					285			
	Gly	Asp	Ser	Ala	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Tyr	Gly	Asn	Cys	Asn
	290						295					300				
	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Met	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser	Met	Pro	Phe
	305					310					315					320
	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys	Tyr	Val	Lys
				325						330					335	
	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser	Pro	Gln	Arg
				340					345					350		
	Glu	Ser	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe
			355					360					365			
[0002]	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Tyr	His
	370					375						380				
	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser	Thr
	385					390					395					400
	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	Ile	Ile	Asp
				405					410						415	
	Lys	Met	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Phe	Asn	Asn	Leu
				420					425					430		
	Glu	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Lys	Met	Glu	Asp	Gly	Phe	Leu
		435					440					445				
	Asp	Val	Trp	Thr	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Glu	Asn	Glu
		450				455						460				
	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His	Asp	Ser	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Tyr	Asp	Lys
	465					470					475					480
	Val	Arg	Leu	Gln	Leu	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly	Asn	Gly	Cys
				485					490					495		
	Phe	Glu	Phe	Tyr	His	Lys	Cys	Asp	Asn	Glu	Cys	Met	Glu	Ser	Ile	Arg
			500						505				510			
	Asn	Gly	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Pro	Gln	Tyr	Ser	Glu	Glu	Ala	Arg	Leu	Lys
		515					520						525			

Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr Gln
530 535 540

Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ile
545 550 555 560

Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser Leu Gln
565 570 575

Cys Arg Ile Cys Ile
580

<210> 2

<211> 594

<212> PRT

<213> 禽流感病毒

<400> 2

Met Gly Phe Val Leu Phe Ser Gln Leu Pro Ser Phe Leu Leu Val Ser
I 5 10 15

Thr Leu Leu Leu Phe Leu Val Ile Ser His Ser Cys Arg Ala Asp Gln
20 25 30

Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val Asp Thr
35 40 45

[0003]

Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile Leu Glu
50 55 60

Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys Pro Leu
65 70 75 80

Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met
85 90 95

Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys
100 105 110

Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn Asp Tyr
115 120 125

Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile
130 135 140

Leu Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser Ser Gly
145 150 155 160

Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe Arg Asn
165 170 175

Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile Lys Lys
180 185 190

Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp Gly Ile
195 200 205

His 210	His 210	Pro	Asn	Asp	Ala	Ala 215	Glu	Gln	Thr	Arg	Leu 220	Tyr	Gln	Asn	Pro
Thr 225	Thr	Tyr	Ile	Ser	Ile 230	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu 235	Asn	Gln	Arg	Leu	Val 240
Pro	Lys	Ile	Ala	Thr 245	Arg	Ser	Lys	Val	Asn 250	Gly	Gln	Ser	Gly	Arg 255	Met
Glu	Phe	Phe	Trp 260	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro 265	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn 270	Phe	Glu
Ser	Asn	Gly 275	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro 280	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys 285	Ile	Val	Lys
Lys 290	Gly	Asp	Ser	Ala	Ile 295	Met	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu 300	Tyr	Gly	Asn	Cys
Asn 305	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr 310	Pro	Met	Gly	Ala	Ile 315	Asn	Ser	Ser	Met	Pro 320
Phe	His	Asn	Ile	His 325	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly 330	Glu	Cys	Pro	Lys	Tyr 335	Val
Lys	Ser	Asn 340	Arg	Leu	Val	Leu	Ala 345	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn 350	Ser	Pro	Gln
Arg	Glu	Ser 355	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg 360	Gly	Leu	Phe	Gly 365	Ala	Ile	Ala	Gly
Phe 370	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln 375	Gly	Met	Val	Asp	Gly 380	Trp	Tyr	Gly	Tyr
His 385	His	Ser	Asn	Glu	Gln 390	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala 395	Ala	Asp	Lys	Glu	Ser 400
Thr	Gln	Lys	Ala	Ile 405	Asp	Gly	Val	Thr	Asn 410	Lys	Val	Asn	Ser	Ile 415	Ile
Asp	Lys	Met 420	Asn	Thr	Gln	Phe	Glu 425	Ala	Val	Gly	Arg	Glu	Phe 430	Asn	Asn
Leu	Glu	Arg 435	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu 440	Asn	Lys	Lys	Met 445	Glu	Asp	Gly	Phe
Leu	Asp 450	Val	Trp	Thr	Tyr	Asn 455	Ala	Glu	Leu	Leu	Val 460	Leu	Met	Glu	Asn
Glu 465	Arg	Thr	Leu	Asp	Phe	His 470	Asp	Ser	Asn	Val 475	Lys	Asn	Leu	Tyr	Asp 480
Lys	Val	Arg	Leu	Gln 485	Leu	Arg	Asp	Asn	Ala 490	Lys	Glu	Leu	Gly	Asn 495	Gly
Cys	Phe	Glu	Phe 500	Tyr	His	Lys	Cys	Asp 505	Asn	Glu	Cys	Met 510	Glu	Ser	Ile

Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg Leu
515 520 525

Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr Tyr
530 535 540

Gln Ile Val Thr Leu Trp Ala Thr Val Phe Leu Thr Leu Gly Ala Leu
545 550 555 560

Val Ala Gly Ala Lys Val Trp Glu Ile Met Arg Lys Ala Asn Arg Lys
565 570 575

Ser Gln Tyr Lys Arg Thr Asn Thr Glu Pro His Asp Ser Gln Ala Thr
580 585 590

Trp Ile

<210> 3

<211> 176

<212> PRT

<213> 莴苣坏死黄化病毒

<400> 3

Ser Ala Lys Leu Asn Trp Tyr Arg Ile Thr Phe Asn Asp Thr Val Trp
1 5 10 15

[0005]

Arg Phe Asp Thr Ala Arg Gly Pro Lys Asp Gly Glu Thr Cys Pro Leu
20 25 30

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

Val Thr Ser Phe Ser Glu Ile Leu Arg Asn Met Glu Ser Arg Gly Tyr
50 55 60

Ile Thr Asn Ile Thr Leu Arg Ala Asp Ser Asp Ile Leu Gly Pro Gly
65 70 75 80

Ala Leu Arg Cys Glu Phe Leu Phe Pro Ser Glu Val Phe Ile Pro Thr
85 90 95

Ser His Thr Leu Lys Met Gly Arg Ser Ser Leu Ile Leu Glu Pro His
100 105 110

Leu Val Val Leu Lys Glu Cys Lys Tyr Ile Ser Ser Gly Lys Leu Asp
115 120 125

Ile Gly Ile Ser Ser Ile Glu Ala Thr Ser Val Ala Val Leu Arg Arg
130 135 140

Val Lys Gly Pro Ala Phe Ile Gly Cys Met Asp Asp Asn Pro Phe Gly
145 150 155 160

Val Leu Thr Lys Lys Pro Ser Asp Glu Lys Asn Val Leu Ala Ser Lys
165 170 175

<210> 4
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 禽流感病毒

<400> 4

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Val Pro
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp Val Phe
 20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
 35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
 50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
 65 70 75 80

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
 85 90 95

Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
 100 105 110

[0006]

Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
 115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
 130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
 145 150 155 160

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

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
 180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Ser Gln
 195 200 205

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

Ser Ser Ala Gly Leu Lys Asp Asn Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
 225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
 245 250

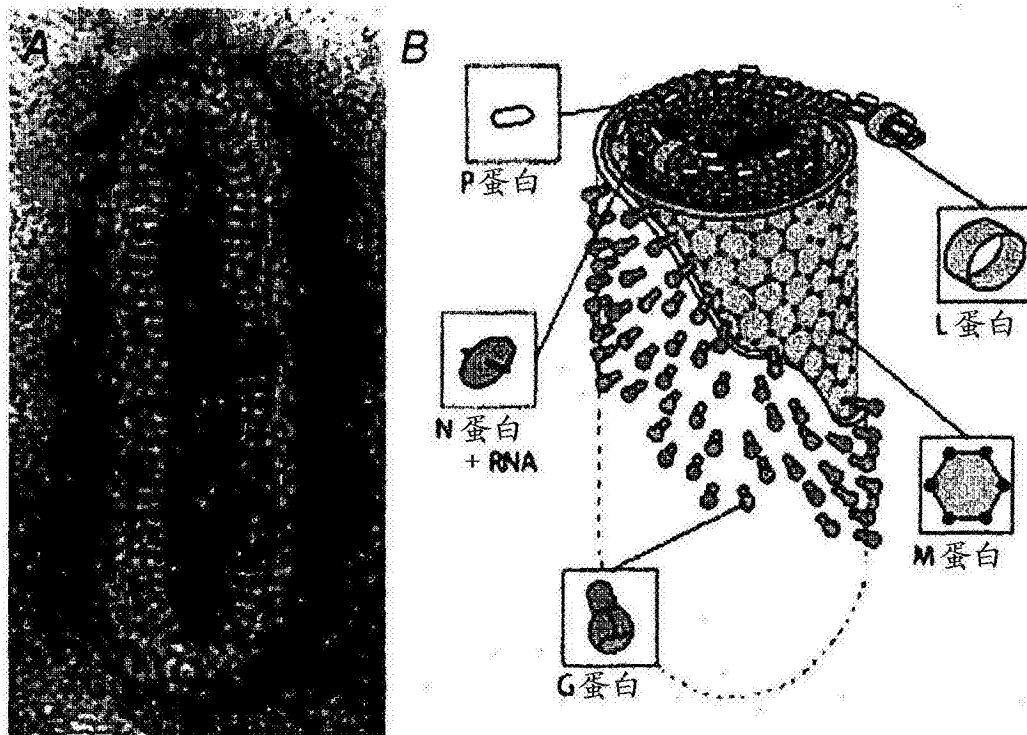


图1

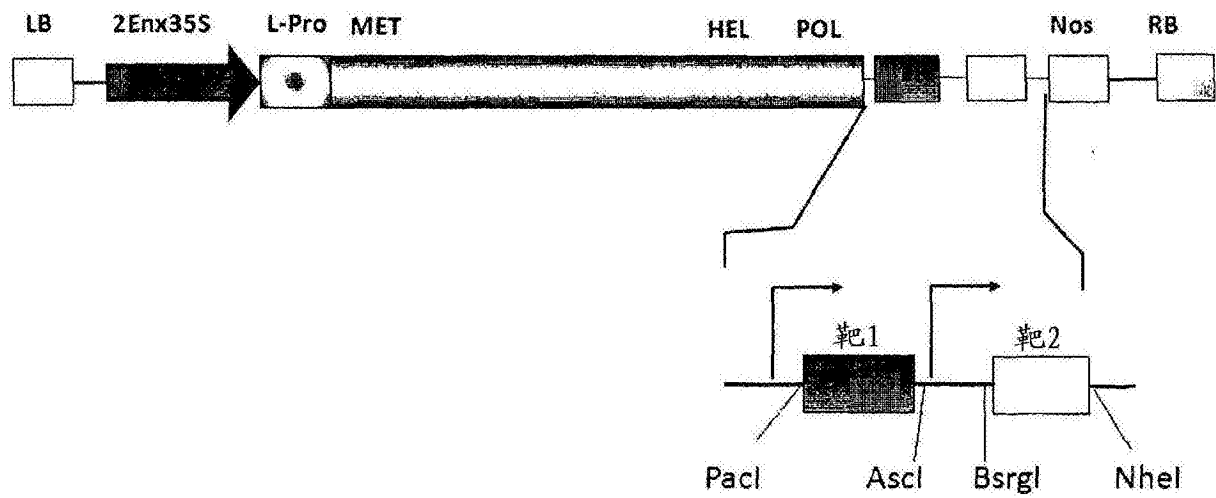


图2

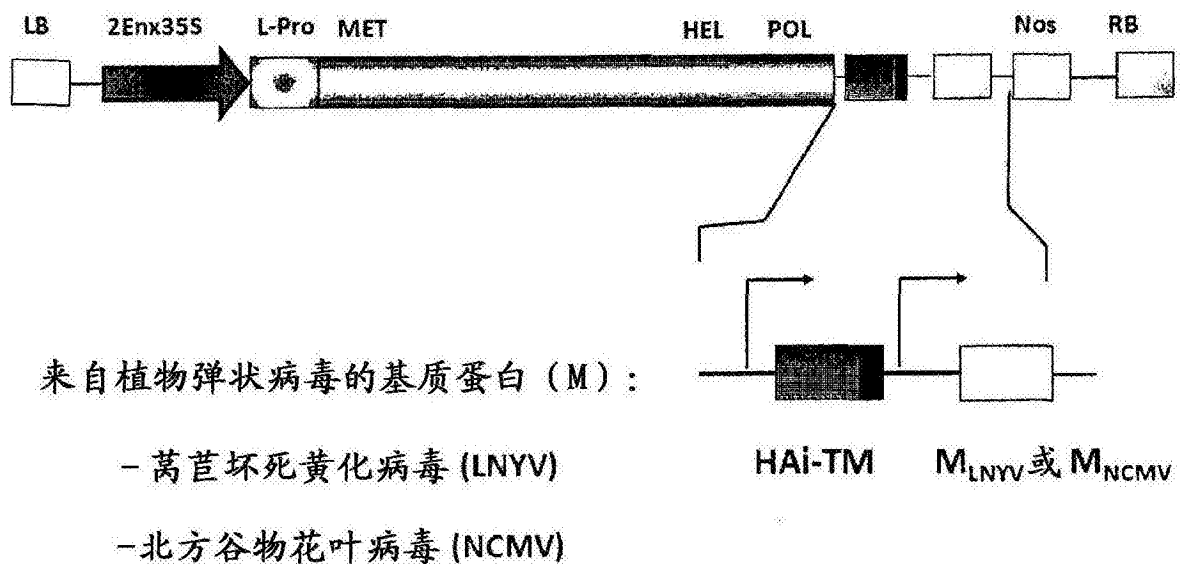


图3

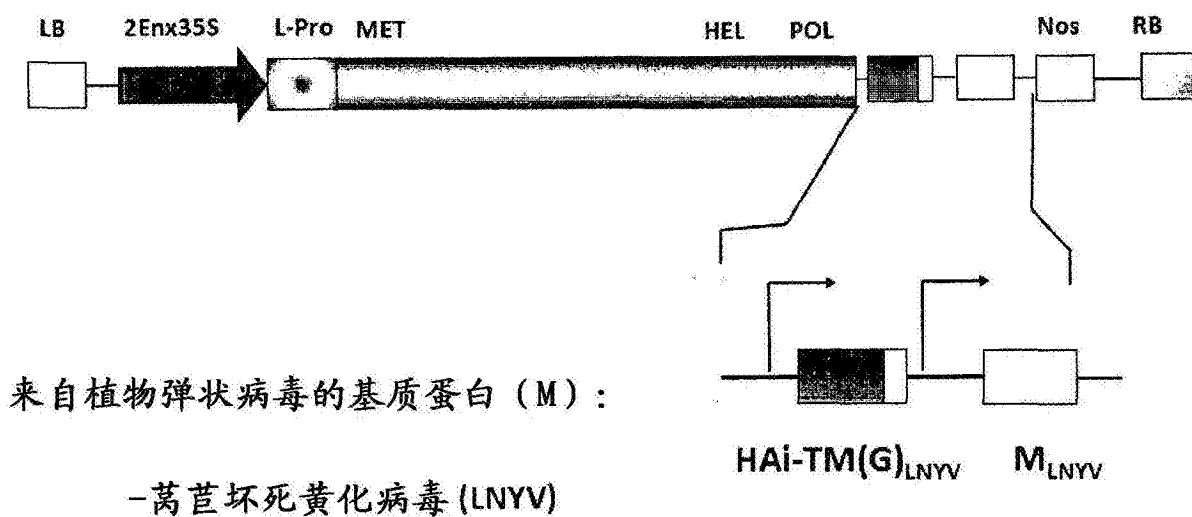


图4

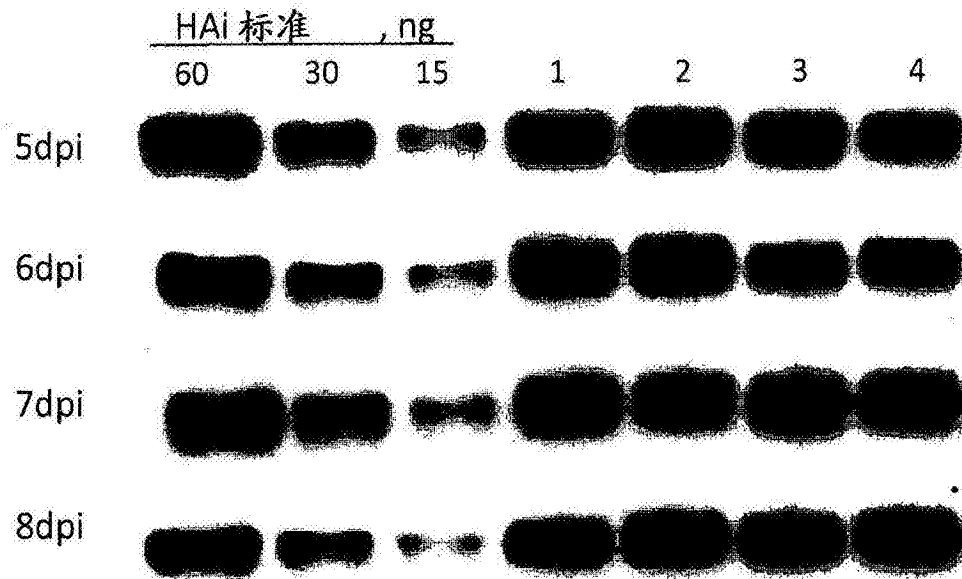
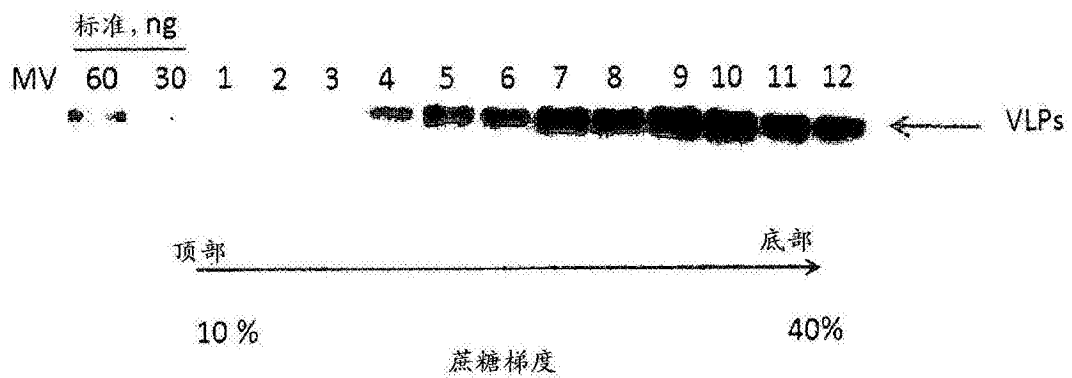


图5

A



B



图6

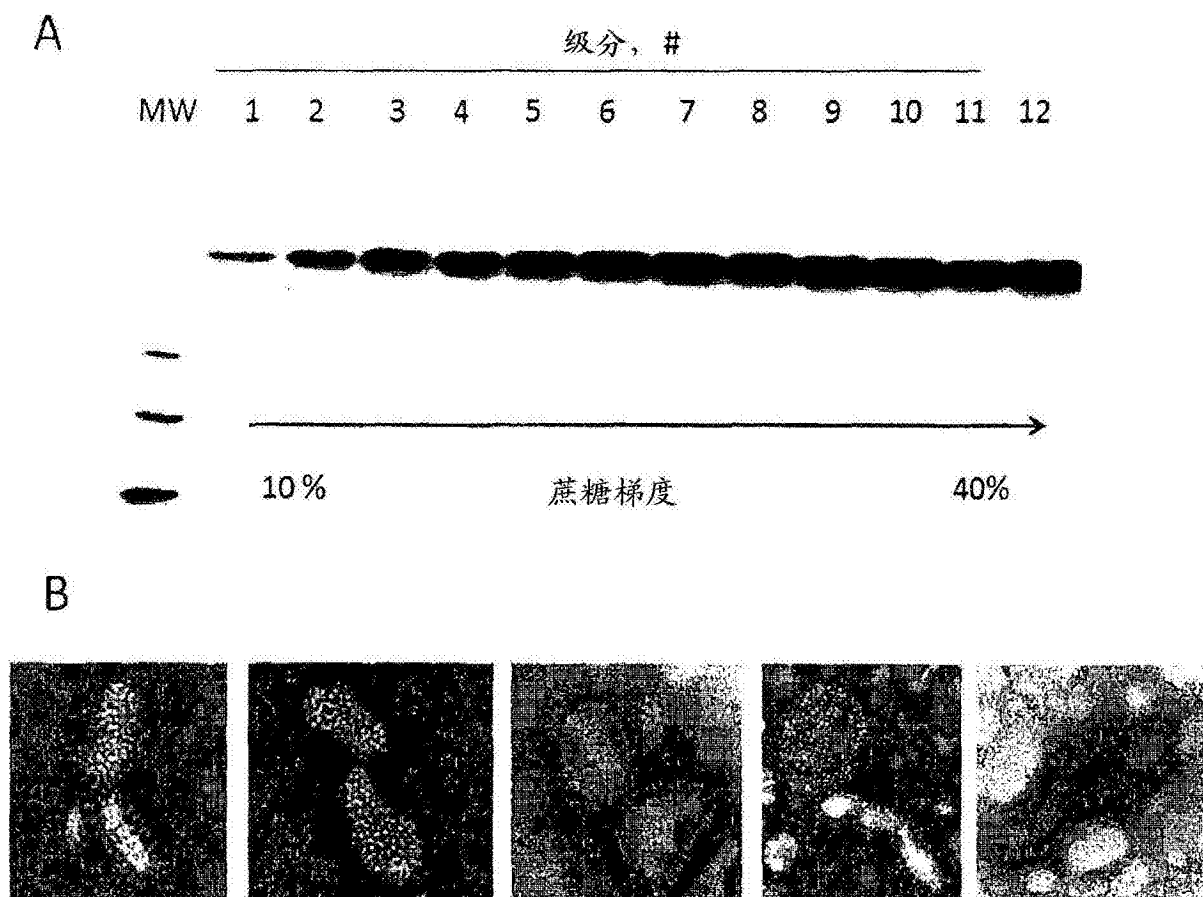


图7

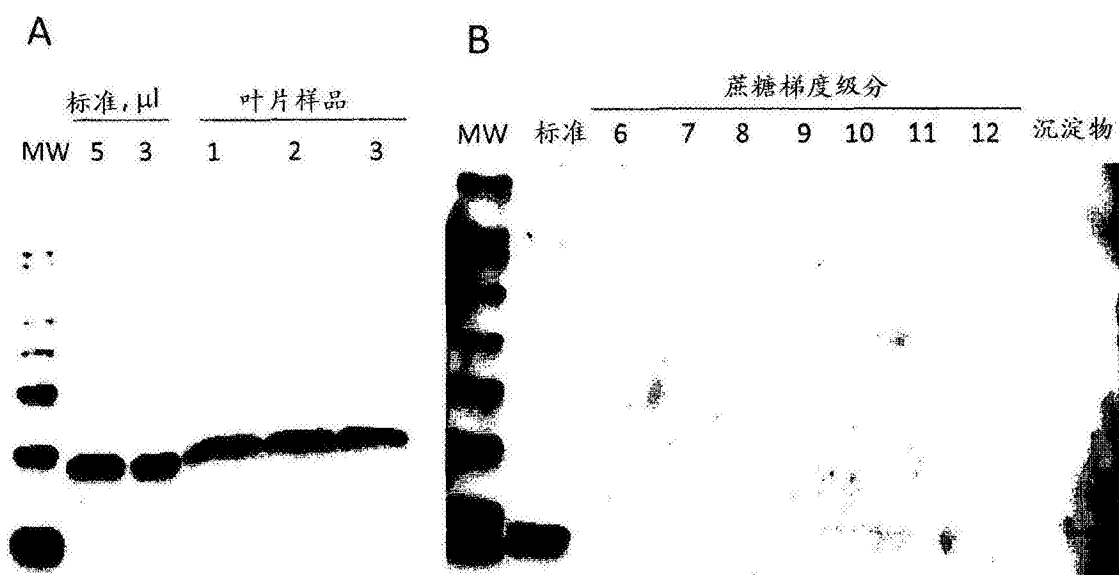


图8

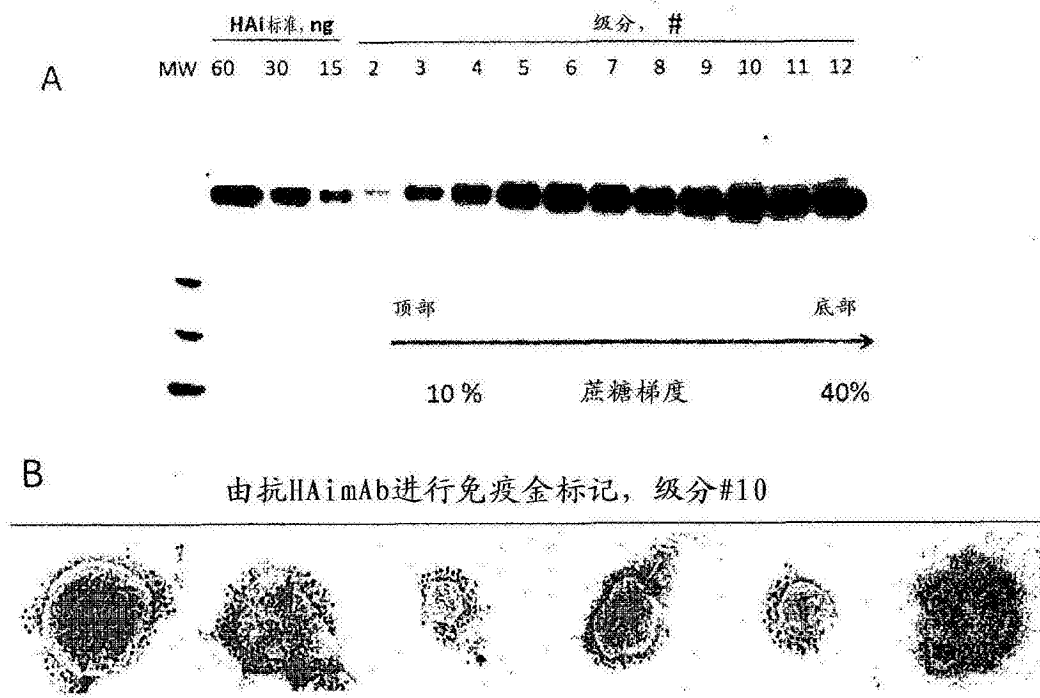


图9

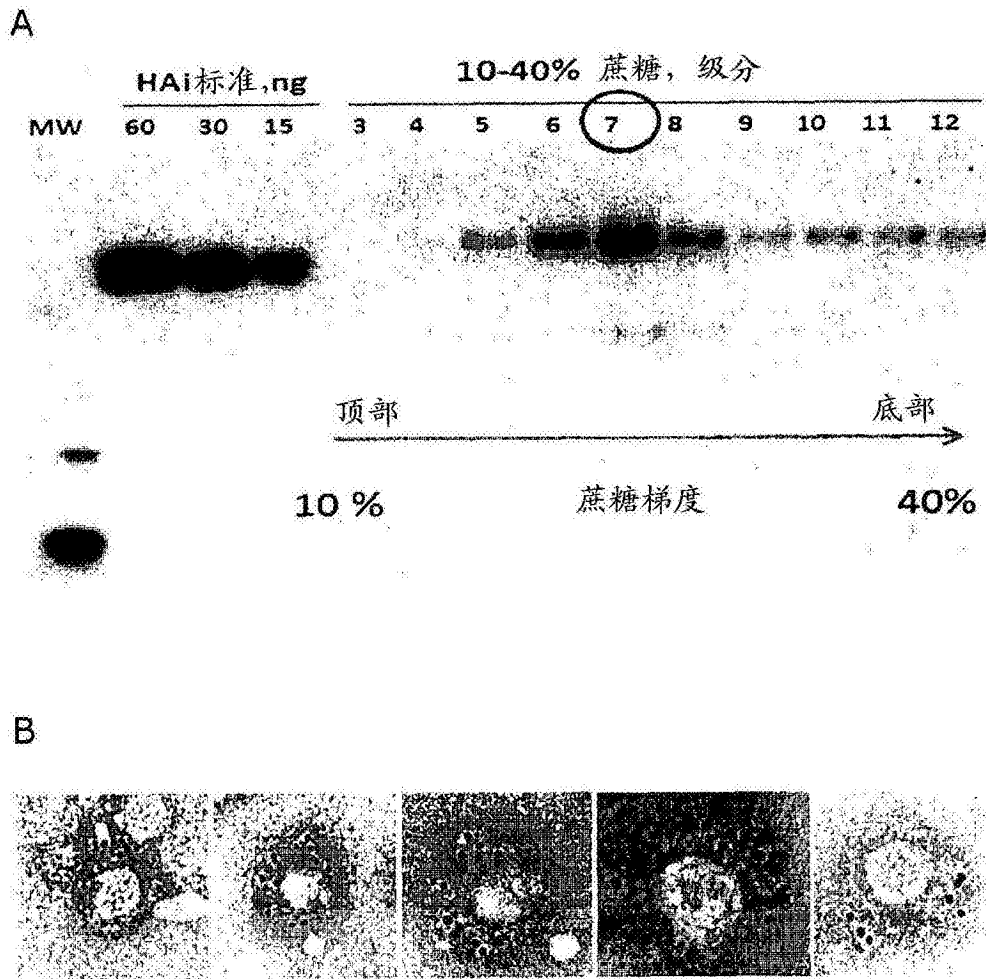


图10

A. HAI-TM (SEQ ID NO: 1)

MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRADQICIGYHANNSTEQVDTI
MEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPM
CDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLLSRINHFEEKIL
IIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKKS
YNNTNQEDLLVLWGIHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVPK
IATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKG
DSAIMKSELEYGNCNTKQCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS
NRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGY
HHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGVTNKNVNSIIDKMNTQFEAVGREF
NNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKN
LYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSE
EARLKREEISGVKLESIGTYQ**ILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWM**
*CSNGSLQCRICI**

B. HAI-TM(G)_{LNyV} (SEQ ID NO: 2)

MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRADQICIGYHANNSTEQVDTI
MEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKPLILRDCSVAGWLLGNPM
CDEFINVPEWSYIVEKANPTNDLCYPGSFNDYEELKHLLSRINHFEEKIL
IIPKSSWSDHEASSGVSSACPYLGSPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKKS
YNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIGTSTLNQRLVP
KIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKK
GDSAIMKSELEYGNCNTKQCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVK
SNRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYG
YHHSNEQGSGYAADKESTQKAIDGVTNKNVNSIIDKMNTQFEAVGREF
NNLERRIENLNKKMEDGFLDVWTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKN
LYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESIRNGTYNYPQYSE
EARLKREEISGVKLESIGTYQ**IVTLWATVFLTLGALVAGAKVWEIM**
*RKANRKSQYKRTNTEPHDSQATWI**

图11

A. M_{LNyV} (SEQ ID NO: 3)

SAKLNWYRITFNDTVWRFDTARGPKDGETCPLIASSELFSSGLSEVFKS
VTSFSEILRNMESRGYITNITLRADSDILGPGALRCEFLFPSEVFIPTSH
TLKMGRSSLILEPHLVVLKECKYISSGKLDIGISSIEATSVAVLRRVKGP
AFIGCMDNDNPFGLTKKPSDEKNVLASK*

B. M1 protein (SEQ ID NO: 4)

MSLLTEVETYVLSIVPSGPLKAEIAQRLEDVFAGKNTDLEALMEWLKTR
PILSPLTKGILGFVFTLTVPSEGLQRRRFVQNALNGNGDPNNMDRAV
KLYKKLKRITFHGAKEVALSYSTGALASCMGLIYNRMGTVTTEVAFG
LVCATCEQIADSQHRSHRQMATTNPLIRHENRMVLA STTAKAMEQM
AGSSEQAAEAMEVASQARQMVQAMRTIGTHPSSSAGLKDNLLNLQ
AYQKRMGVQMQRFK*

图12