



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201629090 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：104125717

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 08 月 06 日

(51)Int. Cl. : C07K14/005 (2006.01)

C12N7/00 (2006.01)

A61K39/12 (2006.01)

(30)優先權：2014/08/07 美國

62/034,475

(71)申請人：基亞生物科技股份有限公司 (中華民國) MEDIGEN BIOTECHNOLOGY CORP.
(TW)

臺北市南港區園區街 3 號 14 樓 A 室 F 棟

(72)發明人：林陽生 LIN, YOUNG-SUN (TW)；鄭金益 CHENG, JINYI (TW)；江雅鈴 CHIANG, YA-LIN (TW)；陳明正 CHEN, MING-CHENG (TW)；賴癸太 LAI, KUEI-TAI A. (TW)；楊智雅 YANG, CHIH YA (TW)

(74)代理人：文少華；鄭志玲

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：12 共 88 頁

(54)名稱

類病毒顆粒疫苗

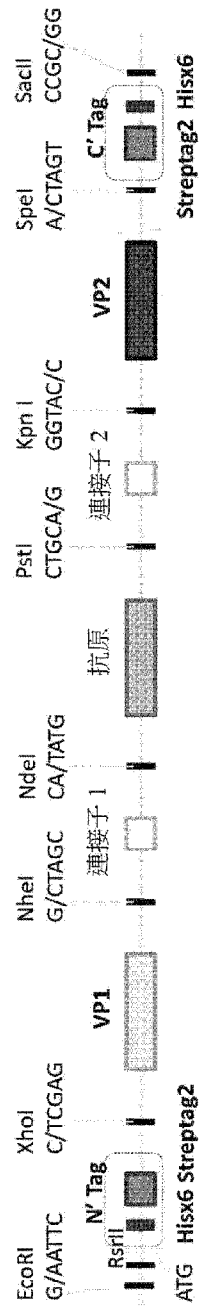
VIRUS LIKE PARTICLE VACCINES

(57)摘要

本發明涉及二聚體融合蛋白和包含此類二聚體融合蛋白的類病毒顆粒。這些二聚體融合蛋白係由兩個病毒結構蛋白或其片段及抗原或抗原片段所組成，其中抗原或抗原片段係位於兩個病毒結構蛋白之間，且該抗原或抗原片段與該病毒結構蛋白之間可置入或不置入連接子，以致相對於傳統的單體平台，該抗原或抗原片段與該病毒結構蛋白或其片段得以立體阻礙最小化的方式折疊。這種新穎的設計，提供了多價且免疫原性增強的疫苗。本發明還涉及編碼此種二聚體融合蛋白的核酸與含有此類核酸的宿主細胞。本發明進一步涉及包含本發明二聚體融合蛋白及/或類病毒顆粒的醫藥組合物，以及使用此種組合物的預防或治療方法。

The invention is directed to dimeric fusion proteins and virus-like particles comprising such dimeric fusion proteins. These dimeric fusion proteins comprise an antigen or antigenic fragment carried between two viral structural proteins or fragments thereof, with or without linkers, in a manner that, relative to traditional monomeric platforms, minimizes steric hindrance among the antigen or antigenic fragment and the viral structural proteins or fragments thereof. This novel design provides for multivalent vaccines and enhanced immunogenicity. The invention also relates to nucleic acids encoding such dimeric fusion proteins and host cells comprising such nucleic acids. The invention further relates to pharmaceutical compositions comprising the dimeric fusion proteins and/or virus-like particles of the invention, and methods of prevention or treatment using such compositions.

指定代表圖：



【圖1A】

链接子	名称	蛋白序列
弹性	G: (GGGS) ₃	GGGGSGGGGGGGGS (15 a.a.)
刚性	E: (EAAK) ₃	EAAKEAAAKEAAAK (15 a.a.)
随机螺旋	R: EV71 VP1 1-59	GDRVADVIESSIGDSVSRALTHALPAPITGQNTQVSSHR LDTGKVPALQAAEIGASSNAS (59 a.a.)

【圖 1B】

【發明說明書】

【中文發明名稱】 類病毒顆粒疫苗

【英文發明名稱】 VIRUS-LIKE PARTICLE VACCINES

【相關申請案交互參照】

【0001】 本案主張美國臨時申請案號62/034,475之優先權，其係於2014年8月7日提出申請，係以引用的方式併入本文。

【技術領域】

【0002】 本發明涉及病毒學、免疫學、微生物學、分子生物學、生物化學，和遺傳學的領域。具體而言，本發明涉及包含類病毒顆粒的免疫原性組合物，該類病毒顆粒包含融合蛋白，該融合蛋白包含病原體的抗原胜肽序列、病毒結構胜肽，以及，選擇性地，一或多個連接子，其中該病毒結構胜肽本身可能具備或不具免疫原性，若包含連接子，其係與該抗原或抗原片段以及該病毒結構蛋白相連結。本發明亦提供以本發明的融合蛋白引發免疫反應的方法。

【先前技術】

【0003】 疫苗一般包括減毒病毒，或其它減毒微生物，或其組合。儘管這種疫苗可能產生強烈的免疫反應，它們具有回復到可能會傷害病人的感染性形式的風險。包含重組抗原的現有疫苗具有較低的感染風險，但他們往往引發較弱的免疫反應。傳統的重組抗原疫苗之所以引發較弱的免疫反應，原因之一在於此類疫苗阻礙了重組抗原成為能夠引起接種疫苗者最佳免疫反應的構形。

【0004】 類病毒顆粒(Virus-like particles，VLPs)在形態和結構上類似於病毒，提供了一個平台，用於以高免疫原性的形式在類病毒顆粒的表面呈現蛋白

質。雖然類病毒顆粒包含病毒結構蛋白，但它們並不包含病毒基因組物質。

【0005】 相較於其他疫苗平台，類病毒顆粒具有幾個優點。首先，類病毒顆粒比活化疫苗或減毒疫苗更安全，因為類病毒顆粒缺乏感染性遺傳物質，可透過設計以排除具免疫抑制性的病毒蛋白，且不會回復到感染狀態。第二，類病毒顆粒在非哺乳類動物細胞株中容易產生，從而提高生產速度、規模可擴展性和成本效益。第三，即使不含佐劑，類病毒顆粒通常能夠誘導持續高含量的中和抗體產生，至少部分原因是它們高度有序的結構，這有利於呈現抗原決定位。第四，類病毒顆粒可以作為異源抗原的呈現平台。第五，類病毒顆粒往往可以打破B細胞耐受性並誘導自我調節的自生抗體。第六，類病毒顆粒可攜帶抗原性抗原決定位至第一類與第二類主要組織相容性複合體(MHC)兩種途徑。

【0006】 因為具備這些優點，類病毒顆粒已被用來作為用於附著或呈現外來抗原供免疫系統辨識的平台。然而，在傳統的方法中，抗原係與單一病毒結構蛋白相融合，且通常位於該病毒結構蛋白的一個圈環結構(loop structure)內。這樣的結構在本文中稱為「單體融合蛋白」。「單體融合蛋白」乙詞係指融合至單一病毒結構蛋白的N-或C-端的抗原或抗原片段，或是抗原或抗原片段置於單一病毒結構蛋白的一個圈環區域內的抗原或抗原片段。這種單體的配置會干擾抗原的折疊，特別是當抗原較大或其立體構形包含較複雜的折疊模式時，並且因為它們沒有充分保持原始抗原構型，因此多數單體融合蛋白並不成功。包含或類似於原始構形之抗原構形在免疫系統識別中扮演重要的角色，然而以單體融合蛋白呈現抗原或抗原片段時，許多抗原與抗原片段無法維持或足以類似於其原始構形。因此，有必要開發一種新的類病毒顆粒疫苗平台。

【發明內容】

【0007】 本發明不同於傳統的類病毒顆粒平台，因為它不是用一個單體融

合蛋白的設計。相反的，本發明包含非單體融合蛋白的設計，例如，一種二聚體融合蛋白的設計。「二聚體融合蛋白」乙詞係指一抗原或抗原片段的N-端，以連接子或不以連接子，融合於N-端病毒結構蛋白的C-端(亦即，一病毒結構蛋白係位於該抗原的N端)，且該抗原或抗原片段的C-端，以連接子或不以連接子，融合於C-端病毒結構蛋白的N-端(亦即，一病毒結構蛋白係位於該抗原的C端)。相較於現有技術的平台，本發明的融合蛋白所包含的抗原或抗原片段，其構形具有增強或以其他方式優化個體免疫反應的能力。在某些具體實施例中，該構形類似存在於原始或其它非重組情況下的抗原或抗原片段的構形。本發明提供的抗原呈現平台，藉由降低或以其他方式改變蛋白質折疊時的立體阻礙及其他阻礙因素，有助於使抗原或其片段折疊成包含或類似於其原始構形的構形。

【0008】 本發明亦不同於傳統的類病毒顆粒的平台，因為它不使用抗原或抗原片段置於病毒結構蛋白的圈環區域或融合到單一病毒結構蛋白末端的設計。相反地，本發明所包含的抗原係置於兩個病毒結構蛋白或其片段之間，且抗原與病毒結構蛋白之間可置入或不置入連接子，前揭配置方式使得該病毒結構蛋白和選擇性（optional）的連接子將不會受到該抗原存在的影響，同時病毒結構蛋白及連接子亦不會阻礙抗原折疊成包含或類似於原始構形的構形。在一些具體實施例中，病毒結構蛋白及/或選擇性的連接子將促進抗原折疊成包含或類似於原始構形的構形。

【0009】 本發明的設計使抗原更易於折疊成包含或類似的原始構形的構形，這有助於誘導個體的免疫反應。本發明之所以能達到此效果，至少部分是因為本發明的抗原和抗原片段，置於本融合蛋白及其所形成的類病毒顆粒中，較可能呈現出包含或類似於原始構形的構形。

【0010】 本發明的設計使具有抗原性的融合蛋白組合成為類病毒顆粒結構，且該類病毒顆粒結構所引起的免疫原性係超越傳統平台的效果。相較於現

有技術的設計，亦即抗原置於病毒結構蛋白的圈環區域，或抗原或抗原片段置於病毒結構蛋白的N-或C-端，本發明之所以能達到此效果，至少部分是因為本發明中的抗原或抗原片段比較不會阻礙病毒結構蛋白的折疊，或病毒結構蛋白比較不會阻礙抗原或抗原片段的折疊，或以上兩個原因都存在。

【0011】 本發明的融合蛋白，因為較可能折疊成包含或類似於原始構形的構形，使本發明也可用以製造多價疫苗，除了抗原蛋白，也可以使病毒結構蛋白具備較強的免疫原性。

【0012】 在本發明中，意外地在本新穎的平台中發現優化的免疫原性和更佳的多價疫苗潛力，該平台包含含有抗原的重組融合蛋白，其中該抗原的N-端，以連接子或不以連接子，融合於N-端病毒結構蛋白，而且該抗原的C-端，以連接子或不以連接子，融合於C-端病毒結構蛋白，且其中該病毒結構蛋白能單獨或共同形成類病毒顆粒。本發明的融合蛋白能夠形成新穎的類病毒顆粒平台，該平台可以將該抗原以包含或類似其原始構形之構形來呈現，並以穩定且重複的方式呈現，因而作為一種能夠有效產生T及/或B細胞介導的免疫力的疫苗。

【0013】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒。

【0014】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，以及V2是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒。

【0015】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2

是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒。

【0016】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1和V2是相同的。

【0017】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1和V2是相同的。

【0018】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中每個V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1和V2是相同的。

【0019】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1和V2是來自相同病毒的不同蛋白的片段。

【0020】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2是能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1和V2是來自相同病毒的不同蛋白的片段。

【0021】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1和V2都來自相同病毒的不同蛋白的片段。

【0022】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1和V2是來自不同病毒的蛋白的片段。

【0023】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1和V2是來自不同病毒的蛋白的片段。

【0024】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1和V2是來自不同病毒的蛋白的片段。

【0025】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且其中該片段是來自相同病毒結構蛋白的不同部分，且V1和V2的胺基酸序列長度總和小於該病毒結構蛋白的完整胺基酸序列長度。

【0026】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且其中該片段來自相同病毒結構蛋白的不同部分，且V1和V2的胺基酸序列長度總和小於該病毒結構蛋白的完整胺基酸序列長度。

【0027】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且其中該片段是來自相同病毒結構蛋白的不同部分，且該V1和V2的胺基酸序列長度總和小於該病毒結構蛋白的完整胺基酸序列長度。

【0028】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，L1是一N-端連接子，Ag是一種病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V2是V1的片段。

【0029】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1是V2的片段。

【0030】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V2為V1的片段。

【0031】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或

V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1是V2的片段。

【0032】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V2是V1的片段。

【0033】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1是V2的片段。

【0034】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V2為來自與V1相同病毒的不同蛋白的片段。

【0035】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且其V1是來自與V2相同病毒的不同蛋白的片段。

【0036】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，L1是一N-端連接子，

Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且其V2為來自與V1相同病毒的不同蛋白的片段。

【0037】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1是來自與V2相同病毒的不同蛋白的片段。

【0038】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V2為來自與V1相同病毒的不同蛋白的片段。

【0039】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1是來自與V2相同病毒的不同蛋白的片段。

【0040】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V2為來自與V1不同病毒的蛋白的片段。

【0041】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白，

且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1為來自與V2不同病毒的蛋白的片段。

【0042】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V2是來自與V1不同病毒的蛋白的片段。

【0043】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-L1-Ag-V2或V1-Ag-L2-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，L1是一N-端連接子，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，L2是一C-端連接子，而V2是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1是來自與V2不同病毒的蛋白的片段。

【0044】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2是一C-端病毒結構蛋白的片段，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V2是來自與V1不同病毒的蛋白的片段。

【0045】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種包含V1-Ag-V2的融合蛋白，其中V1是一N-端病毒結構蛋白的片段，Ag是一病原體的抗原或抗原片段，而V2是一C-端病毒結構蛋白，且其中V1和V2能夠單獨或共同形成類病毒顆粒，且V1是來自與V2不同病毒的蛋白的片段。

【0046】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中Ag係選自於下列組成之群組：(a) 來自一病毒病原體之一抗原胜肽、多胜肽，或蛋白，(b) 來自一細菌病原體之一抗原胜肽、多胜肽，或蛋白，(c) 來自一寄生病原體之一抗原胜肽、多胜肽，或蛋白，(d) 來自真菌病原體之一抗原胜肽、多胜

肽，或蛋白，以及(e) 來自感染性蛋白顆粒之一抗原胜肽、多胜肽，或蛋白。

【0047】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中V1和V2是來自於以下的病毒結構蛋白：

- a. 腺病毒科的成員(包括，例如，鳥類腺病毒屬、禽類腺病毒屬、魚類腺病毒屬、美洲白鱒腺病毒屬，和唾液酸酶腺病毒屬的成員)；
- b. 指環病毒科的成員(包括，例如，甲型細環病毒屬的成員)；
- c. 沙狀病毒科的成員(包括，例如，沙狀病毒屬的成員)；
- d. 動脈炎病毒科的成員(包括，例如，動脈炎病毒屬的成員)；
- e. 星狀病毒科的成員(包括，例如，禽腎炎病毒屬、牛星狀病毒屬、獐鹿星狀病毒屬、雞星狀病毒屬、鴨星狀病毒屬、貓星狀病毒屬、人類星狀病毒屬、哺乳動物星狀病毒屬、水貂星狀病毒屬、綿羊星狀病毒屬、豬星狀病毒屬，和土雞星狀病毒屬的成員)；
- f. 玻那病毒科的成員(包括，例如，玻那病毒屬的成員)；
- g. 布尼亞病毒科的成員(包括，例如，漢他病毒屬、奈洛病毒屬、布尼亞病毒屬、白蛉熱病毒屬，和番茄斑萎病毒屬的成員)；
- h. 杯狀病毒科的成員(包括，例如，兔類病毒屬、諾博病毒屬、諾羅病毒屬、沙波病毒屬，和囊泡狀病毒屬的成員)；
- i. 冠狀病毒科的成員(包括，例如，甲型冠狀病毒屬、乙型冠狀病毒屬、丁型冠狀病毒屬，和丙型冠狀病毒屬的成員)；
- j. 絲狀病毒科的成員(包括，例如，奎瓦病毒屬、伊波拉病毒屬，和馬爾堡病毒屬的成員)；
- k. 黃病毒科的成員(包括，例如，肝炎病毒屬、黃病毒屬、佩基病毒屬，和瘟疫病毒屬的成員)；
- l. 肝病毒科的成員(包括，例如，禽肝病毒屬和正肝病毒屬的成員)；

m. 肝炎病毒科的成員(包括，例如，正肝炎病毒屬和魚肝炎病毒屬的成員)；

n. 疱疹病毒科的成員(包括，例如，巨細胞病毒屬、傳染性喉氣管炎病毒屬、淋巴隱伏病毒屬、馬卡病毒屬、馬立克病毒屬、老鼠細胞巨大型病毒屬、馬疱疹病毒屬、長鼻動物病毒屬、猴病毒屬、玫瑰疹病毒屬、盾病毒屬、單純疱疹病毒屬，和水痘病毒屬的成員)；

o. 正黏液病毒科的成員(包括，例如，A 型流感病毒屬、B 型流感病毒屬、C 型流感病毒屬、傳染性鮭魚貧血病毒屬、夸蘭菲病毒屬，和托高土病毒屬的成員)；

p. 乳頭瘤病毒科的成員(包括，例如，甲型乳頭瘤病毒屬、乙型乳頭瘤病毒屬、丙型乳頭瘤病毒屬、丁型乳頭瘤病毒屬、戊型乳頭瘤病毒屬、庚型乳頭瘤病毒屬、壬型乳頭瘤病毒屬、癸型乳頭瘤病毒屬、子型乳頭瘤病毒屬、丑型乳頭瘤病毒屬、寅型乳頭瘤病毒屬、辰型乳頭瘤病毒屬、巳型乳頭瘤病毒屬、辛型乳頭瘤病毒屬、戌型乳頭瘤病毒屬，和己型乳頭瘤病毒屬的成員)；

q. 副黏液病毒科的成員(包括，例如，水副黏液病毒屬、禽副黏病毒屬、法拉病毒屬、立百病毒屬、偏肺病毒屬、麻疹病毒屬、肺病毒屬、呼吸道病毒屬、腮腺炎病毒屬，和類 TPMV 病毒屬的成員)；

r. 小 DNA 病毒科的成員(包括，例如，周圍濃稠病毒屬、貂阿留申小 DNA 病毒屬、平均小 DNA 病毒屬、牛科小 DNA 病毒屬、短濃稠病毒屬、科比小 DNA 病毒屬、依賴小 DNA 病毒屬、紅小 DNA 病毒屬、黑盆濃稠病毒屬、重複小 DNA 病毒屬、潘使代濃稠病毒屬、原小 DNA 病毒屬、四小 DNA 病毒屬的成員)；

s. 小 RNA 病毒科的成員(包括，例如，口蹄疫病毒屬、阿葵瑪病毒屬、禽肝炎病毒屬、艾維西病毒屬、心病毒屬、柯沙病毒屬、戴西皮病毒屬、腸

病毒屬、馬鼻病毒屬、吉力病毒屬、肝病毒屬、哈尼病毒屬、嶺病毒屬、關山崎病毒屬、馬格利病毒屬、密司奇病毒屬、馬沙病毒屬、奧西病毒屬、雙埃柯病毒屬、帕西病毒屬、帕西里病毒屬、玫瑰病毒屬、沙卡布病毒屬、沙力病毒屬、扎幌病毒屬、塞內卡病毒屬、西卡內病毒屬、捷申病毒屬和震顫病毒屬的成員)；

t. 多瘤病毒科的成員(包括，例如，多瘤病毒屬、禽多瘤病毒屬、正多瘤病毒屬，和烏齊多瘤病毒屬的成員)；

u. 痘病毒科的成員(包括，例如，甲型昆蟲痘病毒屬、禽痘病毒屬、乙型昆蟲痘病毒屬、山羊痘病毒屬、鹿痘病毒屬、鱷痘病毒屬、丙型昆蟲痘病毒屬、野兔痘病毒屬、軟疣痘病毒屬、正痘病毒屬、副痘病毒屬、豬痘病毒屬，和亞塔痘病毒屬的成員)；

v. 呼腸孤病毒科的成員(包括，例如，水生動物呼腸孤病毒屬、心呼腸孤病毒屬、科羅拉多壁蝨熱病毒屬、質型多角體病毒屬、迪諾維病毒屬、斐濟病毒屬、昆蟲非包裹呼腸孤病毒屬、原生生物微胞藻呼腸孤病毒屬、真菌呼腸孤病毒屬、環狀病毒、正呼腸孤病毒屬、水稻病毒屬、植物呼腸孤病毒屬、輪狀病毒，和東南亞十二 RNA 病毒屬的成員)；

w. 彈狀病毒科的成員(包括，例如，細胞質彈狀病毒屬、短暫熱病毒屬、狂犬病病毒屬、非毒粒蛋白彈狀病毒屬、細胞核彈狀病毒屬、佩彈狀病毒屬、西格馬病毒屬、使力維病毒屬、蒂布魯病毒屬、突臥病毒屬，和水泡性病毒屬的成員)；和

x. 披膜病毒科的成員(包括，例如，甲病毒屬和風疹病毒屬的成員)。

【0048】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中 V1和V2是選自以下形成類病毒顆粒的病毒多肽，但不限於：(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) 諾羅病毒殼蛋白VP1

的S結構域，(d) 諾羅病毒殼蛋白VP1的P結構域，(e) 人類輪狀病毒VP2，(f) 人類輪狀病毒VP6，(g) 人類乳突病毒的L1主要殼蛋白，(h) 人類多瘤性病毒(polyomavirus)的VP1，(i) 人類JC(John Cunningham)病毒的VP1，(j) 人類第二型腺相關病毒(Adeno-associated virus)的VP2，(k) 人類第二型腺相關病毒(Adeno-associated virus)的VP3，(l) E型肝炎病毒殼蛋白VP1的S與P1結構域，以及(m) E型肝炎病毒殼蛋白VP1的P2結構域。

【0049】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中每個V1及V2係選自於下列組成之群組：病毒套膜蛋白與病毒殼蛋白。例如，諾羅病毒的P結構域、諾羅病毒的S結構域，及HBc都是殼蛋白，而HBs則是病毒套膜蛋白。在一個具體實施例中，V1和V2都是病毒殼蛋白。在一個具體實施例中，V1和V2均為套膜蛋白。在一個具體實施例中，V1和V2之一為病毒殼蛋白，且V1和V2的另一是病毒套膜蛋白。

【0050】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中，除非另外指明，V1和V2是相同的病毒結構蛋白。

【0051】 在一個具體實施例中，本發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結構蛋白。

【0052】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中，除非另外指明，V1和V2是不同病毒的病毒結構蛋白。

【0053】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中V1及V2至少一者在該融合蛋白、該類病毒顆粒、或該融合蛋白以及該類病毒顆粒中具有免疫原性。

【0054】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中V1及V2在該融合蛋白、該類病毒顆粒、或該融合蛋白以及該類病毒顆粒中皆具有免疫原性。

【0055】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中L1及L2中至少一者係選自於下列組成之群組：彈性連接子、可切割連接子、剛性連接子，以及非結構的隨機螺旋胜肽。

【0056】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中L1和L2是相同的連接子。

【0057】 在一個具體實施例中，本發明提供了任何上述的融合蛋白，其中L1和L2是不同的連接子。

【0058】 在一個具體實施例中，本發明提供了包含編碼任何上述的融合蛋白的多核苷酸的重組核酸表現載體。

【0059】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種宿主細胞，其包含含有編碼上述任意的融合蛋白的多核苷酸的重組核酸表現載體。

【0060】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種類病毒顆粒，其包含任何上述的融合蛋白。

【0061】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種醫藥組合物，其包含一類病毒顆粒，該類病毒顆粒包含任何上述的融合蛋白和一醫藥上可接受的載劑。

【0062】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種醫藥組合物，其包含任何上述的融合蛋白和一醫藥上可接受的載劑。

【0063】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種在哺乳類動物個體中誘導免疫反應的方法，包含向該個體施用一種醫藥組合物，其包含類病毒顆粒，該類病毒顆粒包含任何上述的融合蛋白和醫藥上可接受的載劑，其含量達到足以在個體體內產生免疫反應。

【0064】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種在哺乳類動物個體中誘導免疫反應的方法，包含向該個體施用一種醫藥組合物，其包含任何上述的融合蛋白和醫藥上可接受的載劑，其含量達到足以在個體體內產生免疫反應。

【0065】 在一個具體實施例中，本發明提供了一種製備類病毒顆粒的方法，其包含在允許該融合蛋白表現的條件下培養宿主細胞，該宿主細胞包含含有編碼任何上述的融合蛋白的多核苷酸的重組核酸表現載體，以及組裝該融合蛋白以形成該類病毒顆粒。

【0066】 在一個具體實施例中，本發明提供如本文所述之融合蛋白或類病毒顆粒在製備一種用以在哺乳類動物個體體內誘導免疫反應的藥物的用途。

【圖式簡單說明】

【0067】 前面的概述，以及本發明以下的詳細描述，在結合附圖一起閱讀時將可以被更好地理解。為了說明本發明，所附圖式示出一些，但不是所有的，可替代的具體實施例。然而，應該理解的是，本發明並不限於所示的精確安排和手段。這些圖式，其被併入並構成說明書的一部分，有助於解釋本發明的原理。

【0068】 圖1例示實施例中所使用的類病毒顆粒(VLP)模板的示意結構。如圖1A所示，VLP模板包含一或多個N-或C-端標籤、二個病毒結構蛋白(VP1和VP2)、一抗原，以及連接該病毒結構蛋白與該抗原的连接子。圖1B描繪了在該實施例中所使用的连接子系統。

【0069】 圖2例示以下的重組VLP蛋白的表現：SP-GG、SP-GE、SP-GR、SP-EG、SP-EE、SP-ER、SP-RG、SP-RE和SP-RR。重組類病毒顆粒蛋白係於畢赤酵母菌GS115中表現，經過1%甲醇的誘導。24小時後，以法國壓力機(20,000 psi，一次)收集並均質化細胞沉澱物。分別取10 μ L的全部均質物(T)、上清液(S)或沉澱物(P)以西方墨點法、使用抗His標籤初級抗體進行分析。

【0070】 圖3例示帶有C-端標記的VP1的表現(圖3A)和以下帶有C-端標記的VLP重組蛋白(圖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。該重組蛋白係於畢赤酵母菌GS115中表現，經過1%甲醇的誘導。24小時後，以法國壓力機(20,000 psi，一次)收集並均質化細胞沉澱物。分別取10 μ L的全部均質物(T)、上清液(S)或沉澱物(P)以西方墨點法、使用抗EV71 VP1初級抗體進行分析。

【0071】 圖4 例示N-端標記的HA1(圖4A)和SP-EE-HA1重組VLP蛋白(圖4B)的表現。該重組蛋白係於畢赤酵母菌GS115中表現，經過1%甲醇的誘導。24小時後，以法國壓力機(20,000 psi，一次)收集並均質化細胞沉澱物。分別取10 μ L的全部均質物(T)、上清液(S)或沉澱物(P)以西方墨點法、使用抗His標籤初級抗體進行分析。

【0072】 圖5 例示SP-RE-M2e重組VLP蛋白的表現。重組VLP蛋白係於畢赤酵母菌GS115中表現，經過1%甲醇的誘導。24小時後，以法國壓力機(20,000 psi，一次)收集並均質化細胞沉澱物。分別取10 μ L的全部均質物(T)、上清液(S)或沉澱物(P)以西方墨點法、使用抗His標籤初級抗體進行分析。N = 甲醇誘導的GS115。

【0073】 圖6例示了SH-GR-VP1重組VLP蛋白的表現。重組VLP蛋白係於畢赤酵母菌GS115中表現，經過1%甲醇的誘導。24小時後，以法國壓力機(20,000 psi，一次)收集並均質化細胞沉澱物。分別取10 μ L的全部均質物(T)、上清液(S)或沉澱物(P)以西方墨點法、使用抗VP1初級抗體進行分析。

【0074】 圖7A例示以下重組VLP蛋白產生的類病毒顆粒以蔗糖梯度(Sucrose gradient)分析的結果：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。圖7B顯示SP-EE-HA1重組VLP蛋白產生的類

病毒顆粒以蔗糖梯度分析的結果。圖7C顯示SP-RE-M2e重組VLP蛋白產生的類病毒顆粒以蔗糖梯度分析的結果。圖7D顯示SH-GR-VP1重組VLP蛋白產生的類病毒顆粒以蔗糖梯度分析的結果。酵母均質物上清液中的類病毒顆粒是以10-50%的蔗糖梯度(35,000 rpm 離心4小時)進行分析。從上到下收集十一個餾分物，每個1mL。以西方墨點法、使用抗His標籤或抗VP1初級抗體分析重組VLP蛋白的分佈，如圖所示。IP = 輸入。SP-(3×3)、SP-(3×3)-HA1、SP-(3×3)-M2e、和SH-(3×3)-VP1是具有N-端標記的構築體。ΔSP-(3×3)-VP1-C是具有C-端標籤的構築體。

【0075】 圖8例示SP-GG-VP1類病毒顆粒的電子顯微鏡照片(0.5 μg/μL Δ-SP-GG-VP1-C進行3分鐘，1% UA處理30秒)。蛋白質樣品吸附在碳-弗姆瓦-塗覆的銅網上，並以1%乙酸雙氧鈾水溶液進行負染色。在80 kV和100 kV的條件下以JEM-1230電子顯微鏡(JEOL有限公司，東京，日本)檢查網格。

【0076】 圖9例示實施例中使用的類病毒S-VP1-S顆粒(VLP)模板的示意結構。該VLP模板包含，從N-端到C-端為：N-端標籤、諾羅病毒S結構域、(G₄S)₂彈性連接子、EV71 VP1、(G₄S)₂彈性連接子、諾羅病毒S結構域、(G₄S)₂彈性連接子。

【0077】 圖10例示S-VP1-S類病毒顆粒的透射電子顯微照片。8 μg的S-VP1-S類病毒顆粒被吸附到銅網格(300目)在室溫下進行3分鐘。該網格是用濾紙緩慢的乾燥。在以1%乙酸雙氧鈾水溶液染色30秒後，移除過量的液體。在80 kV的條件下以JEM-1400電子顯微鏡檢查網格。

【0078】 圖11例示對獲自以S-VP1-S類病毒顆粒免疫的小鼠的抗血清的西方墨點法分析。使用來自EV71-感染的RD細胞裂解物所製備的20 μg蛋白質作為起始材料，並使用稀釋1：500與1：1000倍的來自以10 μg的S-VP1-S類病毒顆粒進行初次免疫(第一次)、促進一次免疫(第二次)以及促進二次免疫(第三次)的小

鼠的抗血清來進行西方墨點分析。使用稀釋1：1000倍的抗VP1單株抗體(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，Abonova公司，型號MAB1255-M05)作為對照組。

【0079】 圖12例示表示在接種S-VP1-S類病毒顆粒的小鼠體內的EV71 B4中和抗體力價的圖形。50 μL 的100 TCID₅₀的EV71 B4與50 μL 的來自只免疫VP1、S-S、和S-VP1-S蛋白的小鼠的2倍系列稀釋的血清混合。病毒-血清混合物在37°C下培養2小時，然後加入到2x10⁴細胞/孔的Vero細胞。經過4天的培養，以100 μL /孔的3.7%甲醛(用1×PBS稀釋)固定細胞。在室溫(RT)1小時後，以結晶紫溶液對細胞染色。在這樣的稀釋條件中，以超過50%的保護率來決定中和力價。

【實施方式】

【0080】 應當理解的是，前述一般描述和下面的詳細描述都是示例性和說明性的，但並非用以限制本發明所請之權利。本發明的一個或多個具體實施例的某些細節闡述於以下說明中。從以下代表性實施例的非窮舉的列表中，亦從所附的權利要求中，本發明的其它特徵或優點將是顯而易見的。

【0081】 如上所述，傳統的類病毒顆粒的平台係將抗原連接至單一病毒結構蛋白，且通常是置於在一圈環結構內。但這樣的構形通常阻礙了該抗原的折疊並導致免疫原性降低。本發明不採用典型單體融合蛋白的設計，即包含非單體融合蛋白設計，且令人驚訝地，相較於傳統設計，其允許更好的抗原折疊和提升抗原免疫原性，並提供可選擇的多價性，例如，透過選用一個或多個具免疫原性的病毒結構蛋白。

【0082】 本發明是基於關於融合蛋白的數個發現，其能夠組合成類病毒顆粒，並且包含至少兩個病毒結構蛋白，至少一抗原或抗原片段，以及選擇性的一個或多個連接子。首先，本發明是基於以下發現：該融合蛋白呈現抗原或抗原性片段的方式，相較於許多其他呈現抗原的類病毒顆粒，能促使抗原或抗原

片段折疊成為具免疫原性的構形。第二，本發明是基於以下發現：該融合蛋白可選擇性地包含具有免疫原性的病毒結構蛋白，在至少一些情況下，免疫原性係單獨來自於該融合蛋白，與抗原或抗原片段的免疫原性無關。

【0083】 除非另有定義，本文使用的所有技術和科學術語具有與本發明所屬領域中的技術人員所通常理解相同的含義。

【0084】 如本文所用，冠詞「一」、「一個」和「任何」是指一個或多於一個(即至少一個)的物品的文法受詞。例如，「一元件」意指一個元件或多於一個元件。

【0085】 如本文所用，「佐劑」乙詞是指一種試劑，若施用到已經施用、同時施用、或將會施用本發明的組合物的個體，其能夠有助於改變在未施用佐劑時將會產生的免疫反應。佐劑通常用於增強疫苗的效力。經由依賴佐劑的變化，這樣的增強可發生於：細胞毒性T淋巴細胞反應的免疫調節、呈現、標的、囤積產生、誘導，或其組合。為了促進改變的免疫反應，佐劑不一定需要(i)經由相同的方式施用；(ii)施用到相同位置或標的組織；或(iii)在施用本發明的組合物之前、同時，或任何其他時間順序關係。佐劑的類型可包括，但不限於，鋁鹽、細菌毒素、碳水化合物聚合物、細胞因子、衍生化多醣體、免疫刺激複合物、脂質A、脂質體、胞壁醯二肽衍生物、奈米-及微米顆粒、非離子型阻斷共聚物、非顆粒佐劑、水包油乳劑、顆粒佐劑、皂甙、油包水乳劑，或其組合。

【0086】 如本文所用，「抗原」乙詞是指能夠被抗體或，若是由MHC分子呈現的話，被T-細胞受體(TCR)結合的分子。如本文所用之「抗原」乙詞，也包括T細胞抗原決定位。抗原另外也具有一或多個以下的特性：被免疫系統識別；誘導體液免疫反應；及/或誘導細胞免疫反應。然而，至少在某些情況下，抗原可能需要包含或與一個T細胞抗原決定位結合，及/或給與額外的一佐劑，但不一定有任何特定時間順序關係。抗原可以具有一個或多個抗原決定位(B和T抗

原決定位)。上面提到的特異性反應是指用以指示該抗原將有可能發生反應，通常是以一個高度選擇性的方式，與其相應的抗體或TCR，而不與眾多可由其它抗原誘發的其它抗體或TCR。抗原如本文所用也可以是一個以上的個別的抗原或抗原片段的混合物。

【0087】 「融合蛋白」乙詞是指包含通過胜肽鍵連接的胺基酸的非天然存在的序列的蛋白質。融合蛋白不會在天然情況下，但會在人為操作下產生。如本文所用，「融合蛋白」乙詞是指至少一種病毒結構蛋白融合到至少一個抗原或抗原片段，以及選擇性地，一個或多個連接子。例如，融合蛋白可以包含抗原，其中該抗原的N-或C-端，帶有或不帶有連接子，融合於病毒結構蛋白的C-或N-端。在另一實例中，融合蛋白可以包含具有圈環區域的病毒結構蛋白，其中該圈環區域的胺基酸序列已被修改為在該圈環區域內編碼一或多個抗原或抗原片段，以及選擇性地，一或多個連接子。在另一實例中，融合蛋白可包含一個抗原，其中該抗原的N-端，帶有或不帶有連接子，融合於一N-端病毒結構蛋白，且該抗原的C-端，帶有或不帶有連接子，融合於一C-端病毒結構蛋白。組成融合蛋白的病毒結構蛋白能夠單獨或共同組合為大分子結構，如，例如，類病毒顆粒。

【0088】 在本申請案中，當用於與病毒結構蛋白或連接子有關時，「N-端」乙詞是指病毒結構蛋白或連接子位於該融合蛋白的抗原或抗原片段的N-端。同樣地，當用於與病毒結構蛋白或連接子有關時，「C-端」是指病毒結構蛋白或連接子位於該融合蛋白的抗原或抗原片段的C-端。

【0089】 如本文所用，「宿主細胞」乙詞是指單細胞的原核或真核生物體，包括但不限於：放線菌、古細菌、細菌和酵母菌。宿主細胞還可以是單細胞，包括但不限於培養細胞-來自高階生物體如植物和動物，包括但不限於脊椎動物，如哺乳動物和無脊椎動物如昆蟲。

【0090】 如本文所用，「免疫反應」乙詞是指體液免疫反應和細胞免疫反應的至少一種，導致B淋巴細胞、T淋巴細胞，及/或抗原呈現細胞之至少一種的活化或增殖。在一些情況下，免疫反應可能具有低強度及/或僅當除了但不一定必要在任何特定的時間順序關係，施用融合蛋白及/或本發明的類病毒顆粒，以及施用至少一種佐劑時可能變得可被檢測的。「免疫原」意指刺激免疫系統的試劑，使得免疫系統的至少一個功能是直接被該免疫原所改變。免疫原可以包括但不限於，例如，引起體液免疫反應和細胞免疫反應至少一種的免疫原性蛋白質，無論單獨或與載體一起，以及佐劑的存在與否。抗原呈現細胞被活化是可能的。相對於未施用該試劑的免疫反應，施用該免疫原試劑在任何方面具有有益的改變時，則免疫反應被「強化」。例如，分泌的細胞因子或誘導的抗體的量或類型可以被改變。

【0091】 如本文所用，「連接子」乙詞意指至少一個胺基酸殘基，連接抗原與病毒結構蛋白或以其他方式使兩者相連接。連接子的胺基酸殘基可能是由天然存在的胺基酸或本領域中已知的非天然胺基酸，全L型或全D型，或其組合所組成。「連接子」乙詞不應被解釋為是指該連接子僅僅由胺基酸殘基所組成，即使這樣的連接子被包含在本發明的一個特定備選的具體實施例中。本發明還包括不具有任何的胺基酸殘基或具有至少一個胺基酸殘基的連接子，其包含具有巰基或半胱胺酸殘基的分子。這樣的分子可能包含C1-C6烷基-環烷基(C5，C6)、芳基或雜芳基部分。該連接子與抗原和病毒結構蛋白質中的至少一種之間，可能是通過至少一個共價鍵的方式，並可能通過至少一個胜肽鍵的方式連接。此外，本發明包括彈性連接子、剛性連接子、可切割連接子、非結構的隨機螺旋胜肽，或其組合。彈性連接子可以，但不一定，包含至少一個小胺基酸，無論是極性或非極性。它們可以提供增強的與實體相關聯的彈性和移動性。至少一種其它胺基酸殘基的併入，包括但不限於絲胺酸或蘇胺酸，有助於在含水

條件下維持該連接子的穩定性，可能但不必要是透過與水分子形成氫鍵以及減少連接子和相關的實體之間不利的交互作用來達成。剛性連接子可以，但不一定，包含至少一種 α 螺旋結構、富含脯胺酸的序列，或其組合。它們可以提供相關的實體之間的固定距離，有助於防止阻礙，例如，功能的阻礙。切割連接子可以但不一定，包含至少一個雙硫鍵、凝血酶敏感序列、蛋白酶敏感序列，或其組合。非結構的隨機螺旋胜肽連接子可以但不一定，包含富含甘胺酸的區域、顯著的任何長度的未折疊特徵，或其組合。

【0092】 如本文所用，「核苷酸」乙詞意指包含連接到糖磷酸鹽的氮鹼基的單體，該糖磷酸鹽包含糖，如核糖或2'-去氧核糖，連接到一個或多個磷酸基。「多核苷酸」和「核酸」意指包含超過一個的核苷酸單體的聚合物，其中該單體通常被糖-磷酸主鏈的糖-磷酸鍵所連接。多核苷酸不必只包含一個類型的核苷酸單體。例如，包含一個給定的多核苷酸的核苷酸可以僅為核糖核苷酸、僅為2'-去氧核糖核苷酸，或核糖核苷酸和2'-去氧核糖核苷酸二者的組合。多核苷酸包括天然存在的核酸，例如去氧核糖核酸(「DNA」)和核糖核酸(「RNA」)，以及包含一種或多種非天然存在的單體的核酸類似物。多核苷酸可以被合成，例如，使用自動化DNA合成儀。「核酸」乙詞通常是指大的多核苷酸。將會理解的是，當核苷酸序列由DNA序列(即A、T、G、C)所表示，這還包括RNA序列(即A、U、G、C)，其中「U」取代「T」。「cDNA」乙詞意指一種與一mRNA互補或相同的DNA，不論是以單股或雙股形式，但在其中的「T」取代「U」。「重組核酸」乙詞意指具有非天然接合在一起的序列的多核苷酸或核酸。重組核酸可以存在於載體的形式。

【0093】 如本文所用，「病原體」乙詞意指一種寄生物或其它微生物，或者可能是一個病原性蛋白顆粒，其能夠造成在活生物體的免疫反應。這樣的寄生物和微生物可以包括但不限於：病毒、細菌、古細菌、原生動物、真菌、藻

類、輪蟲，和蠕蟲。這樣病原性蛋白顆粒可能包括與疾病狀態相關的異常折疊的蛋白質，該疾病狀態包括但不限於，傳染性海綿狀腦病變，如牛海綿狀腦病變、克雅氏病，和綿羊搔癢病。

【0094】 如本文所用，「醫藥組合物」乙詞是指任何製劑，其中本發明的該融合蛋白或類病毒顆粒，或其組合，可以被配製、存儲、保存、改變、施用、或其組合。如下所述，該製劑可以包含它們的任何醫藥上可接受的稀釋劑、佐劑、緩衝劑、賦形劑、載體或其組合。在一般情況下，該製劑的組成分係基於施用的方式和途徑，以及標準藥學實行而被選擇的。如本文所用，「醫藥用載體」乙詞是指任何物質或其組合與本發明的融合蛋白或類病毒顆粒可以是物理或化學地混合、溶解、懸浮，或以其它方式組合以產生本發明的醫藥組合物。

【0095】 如本文所用，「醫藥有效量」乙詞意指能夠或足以維持或產生所期望的生理結果的量，包括但不限於，治療、減輕、消除、基本上防止或預防，或其組合、疾病、病症，或其組合。醫藥有效量可以包含依序地或同時地施用一個或多個劑量。本發明技術領域的技術人員將知道調節本發明的劑量，以考慮到各種類型的製劑，包括但不限於緩釋製劑，用於影響其他能夠影響免疫反應的組合物，用於佐劑，或用於其組合。如本文所用，「預防」乙詞意指能基本上防止或預防疾病、病症，或其組合的任何方面的組合物。如本文所用，「治療的」乙詞意指能夠治療、減少、停止進展、減緩進展、有利地改變、消除、或其組合，疾病、病症的任何方面，或其組合的組合物。

【0096】 如本文所用，「蛋白質」乙詞是指一種分子，其包含通過胜肽鏈線性連接的胺基酸。「蛋白質」的這種定義特定包括多胜肽、寡胜肽、三胜肽，和二胜肽。蛋白質可以以任何方式產生，包括化學合成，並且不必從一特定的核酸分子轉譯。蛋白質包括具有或不具有表現後修飾如糖基化、乙醯化，和磷酸化的分子。「片段」乙詞意指包含一胺基酸序列的蛋白質，該序列被另一個

特定蛋白質所包含，但含有比該另一特定蛋白質較少的殘基。例如，包含胺基酸序列丙胺酸-白胺酸-甘胺酸的蛋白質的可能的片段為丙胺酸-白胺酸；白胺酸-甘胺酸；丙胺酸；白胺酸；和甘胺酸。

【0097】 如本文所用，「個體」乙詞意指任何施用本發明的個體。個體可以是，例如，哺乳動物。個體可以是人或獸醫動物，不考慮性別、年齡、或它們的任意組合，並且包括胎兒。個體可以選擇性地受特定疾病、病症或其組合的影響，或具有風險，或其組合。

【0098】 如本文所用，「疫苗」乙詞意指一種製劑，其包含本發明的一種或多種融合蛋白、本發明的類病毒顆粒，或其組合，以在能夠對個體施用的形式，亦即能夠影響個體的免疫反應。在個體體內，疫苗可以是治療及/或預防特定疾病、病症或其組合。疫苗通常，但不一定，包含製劑的醫藥有效量。疫苗通常，但不一定，影響在給定的個體內的免疫反應。

【0099】 如本文所用，「載體」乙詞意指一種藉由核酸可以被引入宿主細胞，以轉型該宿主細胞，並促進該核酸的表現的手段。載體可包含給定的標的核苷酸序列以及調節序列。載體可被用於表現該給定核苷酸序列或維持該給定的核苷酸序列，以複製它、操縱它、改變它、截斷它、擴展它，及/或在不同的位置之間轉移它(例如，在不同的生物體或宿主細胞或其組合之間)。

【0100】 如本文所用，「病毒結構蛋白」乙詞意指，有助於病毒的殼蛋白或該蛋白核心的結構的任何蛋白，或在病毒或病毒顆粒中扮演結構的角色，包括但不限於組裝、折疊，或其組合。「病毒結構蛋白」乙詞包括天然病毒蛋白質的序列，以及突變體和保留組合為類病毒顆粒能力的這樣的天然蛋白質的變體。本發明的病毒結構蛋白本身可具有免疫原性。病毒結構蛋白可以包括套膜蛋白或核心蛋白。例如，諾羅病毒P結構域、諾羅病毒S結構域，和HBc都是殼蛋白，而HBs則是一種病毒套膜蛋白。在一個具體實施例中，病毒結構蛋白二者

都是病毒殼蛋白。在一個具體實施例中，病毒結構蛋白二者均為套膜蛋白。在一個具體實施例中，病毒結構蛋白中的一個是病毒殼蛋白，而另一個是病毒套膜蛋白。

【0101】 如本文所用，「類病毒顆粒」(或「VLP」)乙詞意指一種類似於病毒顆粒的結構。按照本發明的類病毒顆粒是非複製性和非感染性的，因為它缺乏全部或部分的病毒基因組，具體而言是缺乏病毒基因組具複製能力和感染性的部分。按照本發明的類病毒顆粒可能含有與病毒基因組不同的核酸殘基。傳統的類病毒顆粒包含單體融合蛋白，其包含抗原和病毒結構蛋白，而本發明的類病毒顆粒包含非單體融合蛋白，如二聚體融合蛋白，其包含至少一抗原或抗原性片段、至少兩個病毒結構蛋白或其片段，以及選擇性的一個或多個連接子。該包含類病毒顆粒的融合蛋白通常形成具有固有重複組織的結構，以及，典型地，球形或管形的形狀。按照本發明的類病毒顆粒的一個可能的具體實施例是病毒殼蛋白，如相應病毒、噬菌體，或RNA噬菌體的病毒殼蛋白。例如，RNA噬菌體或HBcAgs的殼蛋白具有二十面體對稱的球形形式。如本文所用，「類殼蛋白結構」乙詞意指由病毒結構蛋白次單位所組成的巨大分子組合物，其類似於在上述定義的意義上的殼蛋白形態，但是不同於典型對稱組合且維持足夠程度的順序和重複性。為了形成本發明的類病毒顆粒，本發明的融合蛋白可以通過共價方式、非共價方式，或其組合而連結。非共價的連結可以包含，例如，疏水力、靜電力、圓周力、凡德瓦力，或其組合。

【0102】 因此，本發明提供了一種重組融合蛋白，其包含至少一種抗原或抗原片段，其中該抗原或抗原片段的每個N-端和C-端，具有或不具有連接子，融合到病毒結構蛋白。該病毒結構蛋白能夠單獨或共同組成本發明的類病毒顆粒。本發明的類病毒顆粒能夠呈現抗原或抗原片段，該抗原或抗原片段包含或類似於其原始構形的構形，通常形成一種穩定和重複的方式，從而可作為產

生一種T-及/或B-細胞介導的免疫反應的有效疫苗。

【0103】 如上所討論，本發明不同於傳統的疫苗平台，甚至不同於傳統的類病毒顆粒的平台。具體而言，本發明包含在兩個病毒結構蛋白或其片段之間置入抗原，病毒結構蛋白與抗原之間置入或不置入連接子，使得該結構蛋白不受或相對不受抗原存在的影響，同時抗原亦不受結構蛋白存在的影響。這使得本發明可以產生多價疫苗和增強免疫原性。

【0104】 在一些具體實施例中，在融合蛋白中的抗原可以來自哺乳動物的病毒性病原體的多胜肽，包括但不限於：腸病毒71型的VP1蛋白、流感病毒的HA蛋白、豬流行性腹瀉病毒(PEDV)、輪狀病毒的VP8蛋白、H1N1病毒的M2蛋白、H7N9的F蛋白、馬廐疹病毒第1型的糖蛋白14、卡波西肉瘤相關病毒的糖蛋白M、人類廐疹病毒第1型的殼蛋白、分枝桿菌15預測的8.2Kd蛋白、呼腸孤病毒第1型的 σ -1蛋白、仙台病毒的C'蛋白質、三葉草黃色葉脈病毒的多蛋白、豬腺病毒第3型的六鄰體蛋白(病毒粒子組分ii)，和人腺病毒第34型的六鄰體蛋白。

【0105】 在其他具體實施例中，融合蛋白的抗原可以是來自哺乳動物的細菌病原體的多胜肽，包括但不限於：假單胞菌物種鐵氧還蛋白還原酶組分、大腸桿菌雙官能青黴素結合蛋白、伯克霍爾德物種水合酶/醛縮酶PhnE、腦膜炎奈瑟氏球菌推定噬菌體病毒粒子蛋白質、甲烷氧化菌物種甲烷單加氧酶 α 次單位、集胞藻屬物種多磷酸外切酶gb、糞產鹼菌菲降解基因簇、集胞藻屬PCC6803多磷酸激酶、空腸彎曲菌脂多醣生物合成的蛋白質wlaK、不動桿菌屬終端烷烴羧化酶、橙色滑柱菌甲基轉移酶HgiDIM、結核桿菌假想蛋白Rv0235c、結核分枝桿菌假想蛋白Rv3629c、天藍色鏈黴菌A3(2)鄰胺基苯甲酸合酶、堅強芽孢桿菌msyB基因、大腸桿菌URF、集胞藻屬PCC6803細胞色素C氧化酶次單位I、大腸桿菌49kd蛋白質，和結核分枝桿菌可能的氧化還原酶。

【0106】 在其他具體實施例中，融合蛋白的抗原可以來自哺乳動物的一個

寄生病原體的多胜肽，包括但不限於：瘧原蟲物種的HRP II、瘧原蟲物種的pLDH，和瘧原蟲物種的pAldo。

【0107】 在其他具體實施例中，融合蛋白的抗原可以是來自哺乳動物的真菌病原體的多胜肽，包括但不限於：雜色麴菌AVS、雜色麴菌AVL、雜色麴菌AveX、黃麴菌Asp f11、煙麴菌Asp f1、煙麴菌Asp f2、煙麴菌Asp f3、煙麴菌Asp f4、煙麴菌Asp f5、煙麴菌Asp f6、煙麴菌Asp f7、煙麴菌Asp f8、煙麴菌Asp f9、煙麴菌Asp f10、煙麴菌Asp f11、煙麴菌Asp f12、煙麴菌Asp f13、煙麴菌Asp f15、煙麴菌Asp f16、煙麴菌Asp f17、煙麴菌Asp f18、煙麴菌Asp f25W、煙麴菌Asp f23、煙麴菌Asp f27、煙麴菌Asp f28、煙麴菌Asp f29、黑麴菌Asp n14、黑麴菌Asp n18、黑麴菌Asp n25、黑麴菌Asp n、黑麴菌Asp o13，和黑麴菌Asp o21。

【0108】 在其他具體實施例中，融合蛋白的抗原可以是來自病原性蛋白顆粒的多胜肽，包括但不限於那些與疾病或病症狀態有關，包括但不限於傳染性海綿狀腦病變，如牛海綿狀腦病變、克雅氏相關疾病，和綿羊搔癢病。

【0109】 在一些具體實施例中，融合蛋白中的V1和V2的至少一個可以是來自一群組，包括，但不限於：(a) B型肝炎病毒的HBc，(b) 該B型肝炎病毒衍生的小型表面抗原(HBsAg)，(c) 諾羅病毒殼蛋白VP1的S結構域，(d) 諾羅病毒殼蛋白VP1的P結構域，(e) 人類輪狀病毒VP2，(f) 人類輪狀病毒VP6，(g) 人類乳突病毒的L1主要殼蛋白，(h) 人類多瘤性病毒的VP1，(i) 人類JC病毒的VP1，(j) 人類第二型腺相關病毒的VP2，(k) 人類第二型腺相關病毒的VP3，(l) E型肝炎病毒殼蛋白VP1的S與P1結構域，以及(m) E型肝炎病毒殼蛋白VP1的P2結構域。

【0110】 在一些具體實施例中，V1是透過N端的連接子連接到該抗原，或者V2是透過C端的連接子連接到該抗原。在其他具體實施例中，V1是透過N端的連接子連接到該抗原且V2是透過C端的連接子連接到該抗原，而且和該N-端連

接子和C-端連接子可以是相同或不同的，選自下列群組，包括但不限於：從EV71的VP1的前面59個胺基酸；小於200個胺基酸的任何非結構的隨機螺旋胜肽； $(GGGGS)_n$ ； $(Gly)_n$ ； $(EAAAK)_n$ ； $A(EAAAK)_4ALEA(EAAAK)_4A$ (SEQ ID NO: 1)；PAPAP (SEQ ID NO: 2)；AEAAAKEAAKA (SEQ ID NO: 3)； $(X-P)_n$ ，其中X為任何胺基酸，例如丙胺酸、離胺酸，或麩胺酸；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)；RRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 11)；GFLG；LE； $(GS)_n$ ；GGSGGHMGSGG (SEQ ID NO: 12)；GGSGGGGG (SEQ ID NO: 13)；GT；GGSGGSGGSGG (SEQ ID NO: 14)；SGGGSSHS (SEQ ID NO: 15)；SGSGGSSHS (SEQ ID NO: 16)；SGSGGSGGSSHS (SEQ ID NO: 17)；GGSGG (SEQ ID NO: 18)；GGGSLVPRSGGGGS (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)。

【0111】 本領域技術人員將理解，至少在某些本發明的具體實施例涉及重組核酸技術，包括，但不限於，選殖、聚合酶連鎖反應、純化DNA和RNA、限制酶消化、連接反應，以及在原核或真核細胞中表現重組蛋白。這些程序的基本實驗室技術被充分地在各種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。

【0112】 例如，本發明提供了包含編碼本發明的融合蛋白的核苷酸序列的重組核酸，其包含病毒結構蛋白、至少一種抗原或抗原片段，以及選擇性的，一或多個連接子。該核酸序列可操作地被連接，以便它們可以被轉錄和翻譯以產生一種具有組合為類病毒顆粒能力的融合蛋白。

【0113】 編碼本發明的融合蛋白的核酸可包含以在許多公知形式的RNA或DNA，包括但不限於單股或雙股的實體和載體。任何上述核酸可以使用任何本領域已知的適合的方法來構築，例如於Ralph Rapley所著的THE NUCLEIC ACID PROTOCOLS HANDBOOK，2000年，中所描述的方法。

【0114】 編碼本發明的融合蛋白的重組構築體可以在合適的載體，如表現載體，並使用常規且本領域中公知的方法製備。重組構築體，例如表現載體，包含核酸，其編碼本發明的至少一種融合蛋白。重組構築體可包含以單股或雙股形式的RNA或DNA。對重組蛋白合適的表現載體乃是常規且本領域中所公知的。合適的載體可以，但不一定，包含，例如：複製起點；一或多個選擇性標記基因；一或多種表現控制元件，例如像啟動子、增強子、終止子，和一或多個轉譯信號的轉錄控制元件；用於標的的信號序列或前導序列，例如，在宿主細胞的分泌途徑；或其組合。合適的載體可以，但不一定，包含一或多種可檢測的標記物，如，例如，賦予對一或多種抗生素具有抗性的蛋白質。合適的載體可以包含，但不一定，一個載體表現系統，例如自我複製的核酸。

【0115】 可使用編碼本發明的融合蛋白的任何合適的核酸序列或其組合。可使用在那些在本領域中公知的適合的方法，如PCR，來擴增核酸。本領域的普通技術人員將知道使用引子來進行PCR，例如，設計包含一個前導序列、限制酶切位，以及編碼目標蛋白的特定的核酸。在PCR擴增後，本領域的普通技術人員將知道純化所得的擴增子。也會知道如何然後分別以限制酶消化擴增子和表現載體，然後執行接合反應以將擴增子插入載體中，並再次純化連接產物。具有產生載體，其包含編碼本發明的融合蛋白的插入序列，本領域的普通技術人員將知道如何接著轉型或轉染特定宿主細胞和培養該宿主細胞以誘導表現。再次地，示例性技術描述在，例如，Ralph Rapley所著的THE NUCLEIC ACID PROTOCOLS HANDBOOK，2000年。

【0116】 製造本發明的融合蛋白的方法可以，但不一定需要，包含培養已轉型或轉染編碼本發明的融合蛋白的重組核酸的宿主細胞，在適合表現核酸的條件下，並有可能在適合於類病毒顆粒形成的條件下。這樣的條件是本領域技術人員所熟知。例如，參見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頁，和其中的參考文獻。這樣的方法可選擇性的包括一個或多個步驟，以分離類病毒顆粒，純化類病毒顆粒，或其組合。這樣的方法還可以提供用於生產多價的類病毒顆粒。

【0117】 本發明還提供了一種方法，以從宿主細胞中、培養介質，或其組合分離或純化類病毒顆粒。類病毒顆粒可能直接從條件培養基中，如宿主細胞培養基，分離或純化。此外，宿主細胞可以被回收，可以形成宿主細胞均質物或溶解物，並分離類病毒顆粒。裂解細胞而不破壞類病毒顆粒的適當方法是本領域熟知的，且描述在，例如，Kirnbauer等人所著的「Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles」，*J Virol*期刊，1993年，第67卷第12期：第6929-36頁。用於從培養基或宿主細胞中分離類病毒顆粒的合適的方法也是公知的現有技術，並描述在，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頁；Yamschchikov, 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頁；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頁；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頁；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頁。這樣的方法可以包括密度梯度離心，如蔗糖梯度、團塊，和PEG沉澱法，且它們還可以包括，例如離子交換和凝膠過濾層析等標準的純化技術。

【0118】 在蔗糖梯度或緩衝離心是自細胞成分中分離類病毒顆粒的一種可能手段，至少有一項研究表明超速離心後，未組裝的蛋白質集中在上部的分層，其具有相對低的蔗糖濃度，而組裝的類病毒顆粒則集中在較低的分層，其具有相對高的蔗糖濃度。參見，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頁。上述技術可能是單獨、相繼，或當加入到更大的系統後有用的。

【0119】 儘管對於實踐本發明來說不是必需的，電子顯微鏡提供用於確認類病毒顆粒的組裝的手段。例如，在超速離心後，從下部分層而來的樣本，其假定包含組裝的類病毒顆粒，可以經由電子顯微鏡檢查。合適的技術對於以本領域技術人員而言是眾所周知的，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頁。

【0120】 抗原性的確認可以透過在分析血液血清的中和活性之前，對嚙齒動物施用本發明的融合蛋白及/或類病毒顆粒來實現。參見，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 VP2 EF Loop」，Theranostics期刊，2014年，第4卷第5期：第498-513頁。另外，中

和反應可以藍色非變性PAGE進行測定。合適的BN-PAGE技術對於以本領域技術人員而言是眾所周知的，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頁。抗原性的這種測試還可以包含在體外比較傳統的類病毒顆粒平台和本發明的類病毒顆粒平台之間的免疫原性。

【0121】 本發明的融合蛋白質、本發明的類病毒顆粒，或其組合，可以通過任何合適的方式施用，腸內、腸胃外，或以其他方式，並且包括，但不限於，口腔內、皮內、肌肉內、腹膜內、靜脈內、膀胱內、鞘內、經眼、經口、直腸、皮下、舌下、局部，或其組合，依次或同時進行。

【0122】 適用於本發明施用的製劑可包含，可能在本領域技術人員公知的其他事情之中：水性和非水性溶液；抗氧化劑；抑菌劑；緩衝液；影響等滲性的溶質；防腐劑；增溶劑；穩定劑；懸浮劑；增稠劑；或其組合。

【0123】 此外或在替代方案中，適用於本發明施用的製劑可以包含，可能在本領域技術人員公知的其他事情之中：凝膠；PEG如PEG 400；丙二醇；鹽水；香囊；水；本領域中已知的其他適當的液體；或其組合。

【0124】 此外或在替代方案中，適用於本發明施用的製劑可以包含，可能在本領域技術人員公知的其他事情之中：黏合劑；緩衝劑；磷酸鈣；纖維素；膠體，如膠體二氧化矽；著色劑；稀釋劑；崩解劑；染料；填料；調味劑；明膠；乳糖；硬脂酸鎂；甘露醇；微晶明膠；潤濕劑；石蠟烴；錠劑；聚乙二醇；防腐劑；山梨糖醇；澱粉，如玉米澱粉、馬鈴薯澱粉，或其組合；硬脂酸；蔗糖；滑石；甘油三酯；或其組合。

【0125】 此外或在替代方案中，適用於本發明施用的製劑可以包含，可能在本領域技術人員公知的其他事情之中：醇，如苯甲醇或乙醇；苯扎氯銨；緩衝劑如磷酸鹽緩衝劑、乙酸鹽緩衝劑、檸檬酸鹽緩衝劑，或其組合；羧甲基纖

維素或微晶纖維素；膽固醇；葡萄糖；果汁，如柚子汁；牛奶；磷脂如卵磷脂；油如植物、魚，或礦物油，或其組合；本領域中已知的其它醫藥上相容的載體；或其組合。

【0126】 此外或在替代方案中，適用於本發明施用的製劑可以包含，可能在本領域技術人員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，其它實體的降解產物可以迅速地從一個生物系統，或其組合被清除。

【0127】 製劑的降解性，例如，在緩釋製劑中-可以通過那些本領域技術人員已知的技術調整。參見，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.與Langer, R.編輯，1990年，Marcel Dekker出版社：紐約。

【0128】 本發明的製劑可以單位劑量形式、多劑量形式，或其組合方式來施用。它們可以被包裝在單位劑量容器中、多劑量容器，或其組合。本發明可能存在於安瓿；小膠囊；膠囊；顆粒；含片；粉；片；小瓶；乳劑，包括但不限於阿拉伯膠乳劑；懸浮液；或其組合。

【0129】 免疫原性組合物可包含本發明的融合蛋白、本發明的類病毒顆粒、編碼本發明融合蛋白，或其組合的核酸。一個或多個這樣的組合物，相同的、不同的，或其組合，可使用相同或不同的製劑施用。這樣的免疫原性組合物可以預防性施用、治療性施用，或其組合，並且可以施用一次或多次，給一個給定的個體。例如，多次施用到一個給定的個體可以包含初次施用，並接著加強施用，以測試或優化所需的免疫反應或缺乏之。重複施用到一個給定的個體不一定包含相同的免疫原性組合物。免疫原性組合物可包含，但不一定要包含，適當的核酸遞送系統，例如，但不限於，乳液、顆粒、載體、病毒顆粒、

脂質體、脂質複合物、複製子，或其組合。

【0130】 本發明的融合蛋白、本發明的類病毒顆粒，及其組合可選擇性地依序地或同時與一種或多種佐劑施用，如以上所討論。佐劑可以修飾細胞因子的活性，例如，通過整個免疫系統的廣泛向上調節、通過特定的細胞因子的向上調節、通過特定細胞因子的向下調節，或其任意組合。可替代地或另外地，佐劑可以幫助將本發明的一個給定的抗原或抗原片段，以包含或類似於其原始構形的構形，呈現給免疫效應細胞。可替代地或另外地，佐劑可以幫助將本發明的抗原或抗原片段遞送到免疫效應細胞。可替代地或另外地，佐劑可將本發明給定的抗原或抗原片段困在注射部位，可能，例如，以幫助延長給藥、以防止降解，或其組合。可替代地或另外地，佐劑可以幫助誘導C8+細胞毒性T淋巴細胞的反應。

【0131】 佐劑，如果選擇性地使用，可以選自一以下的群組，包括但不限於：氫氧化鋁；磷酸鋁；明礬；由界面活性劑穩定的水的微滴，如二縮甘露醇單油酸酯，在連續的油相，例如礦物油、角鯊烯、或角鯊烷；弗氏不完全佐劑；油的微滴，如角鯊烯或角鯊烷，由界面活性劑穩定，如Tween 80或Span 85，在連續的水相；免疫刺激複合物；脂質體；奈米微粒；粒狀佐劑，如鈣鹽、蛋白酶體、病毒顆粒、硬脂酪胺酸、 γ -菊粉、明礬菊粉、非顆粒的佐劑；胞壁醯二肽和其衍生物，包括N-乙醯基胞壁醯-L-丙胺醯-D-異谷胺醯胺、蘇胺醯基MDP、莫拉丁酯、N-乙醯葡萄糖胺-MDP、GMDP、目拉美肽(murametide)和去甲MDP，和MTP-PE；非離子型嵌段共聚物，如CRL 1005；皂甙，包括三萜類、皂苷、奎爾A、Spikoside、QS21和ISCOPREP™ 703的混合物；脂質A；4'單磷酸脂質A (MPL)；細胞壁骨架；細胞因子；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、二乙胺基葡聚糖；細菌毒素，包括霍亂毒素、CTB五聚體、大腸桿菌不穩定毒素、LTB，或突變或其他衍生物；其他非顆

粒佐劑，如脫氫表雄酮、維生素D3、海藻糖二黴菌酸酯、P₃CSS、Poly I:C、Poly ICLC、Poly A:U，或其組合。

【0132】 為了揭露與描述方法與組合物的目的，其可能被用於製造或使用本發明，本文提及的所有的出版物和其他參考文獻在此透過引用的方式被全然的併入。

【0133】 本發明通過下列的實施例進一步說明，其提供了用於示範而非限制的目的。本領域中的技術人員應，在根據本公開內容，應當理解，許多變化可以在所公開的特定具體實施例中產生，且仍然獲得相同或類似的結果而不脫離本發明的精神和範圍。

【0134】 實施例

【0135】 在以下的實施例中，沒有定義的縮寫具有其通常被接受的含義，且以下的縮寫具有下列含義：

【0136】 HBc與H係指來自B型肝炎病毒的核心抗原的次結構域。

【0137】 S係指諾羅病毒VP1蛋白的S結構域。

【0138】 P係指諾羅病毒VP1蛋白的P結構域。

【0139】 EV71是腸病毒第71型。

【0140】 VP1是EV71的殼蛋白。

【0141】 VP8是來自輪狀病毒的VP8結構域。

【0142】 M2是H1N1病毒的跨膜蛋白。

【0143】 M2e是M2的胞外結構域。

【0144】 HA1是A型流感病毒血球凝集素1蛋白。

【0145】 CVB3 VP1是科薩奇病毒B3的VP1殼蛋白。

【0146】 Sp₁是E型肝炎病毒的S結構域+P1結構域。

【0147】 P₂是E型肝炎病毒的P結構域。

【0148】 HBs是HBV衍生的小型表面抗原。

【0149】 G是具有以下序列的彈性連接子：(GGGGS)₃，即，GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 25)。

【0150】 E是具有以下序列的剛性連接子：(EAAAK)₃，即，EAAAKEAAAKEAAAK (SEQ ID NO: 26)。

【0151】 R是具有該EV71 VP1蛋白的前面59個胺基酸(胺基酸1-59)的胺基酸序列的隨機螺旋連接子(即，SDRVADVIESSIGDSVSRALTHALPAPTQGNTQVSSHRLDTGKVPALQAAEIGASSNAS (SEQ ID NO: 27))。

【0152】 在這些實施例中所描述的類病毒顆粒(VLPs)的命名如下：V1V2-L1L2-Ag。例如，名為SP-GG-VP1的類病毒顆粒包含一個N-端的SP病毒結構蛋白、一個N-端(GGGGS)₃彈性連接子、一個VP1抗原，一個C-端(GGGGS)₃彈性連接子，以及一個C-端SP病毒結構蛋白。

【0153】 實施例1：類病毒顆粒模板的構築

【0154】 以GenScript在質體pUC57中合成該類病毒顆粒模板(圖1)，並將序列進行適合酵母菌的密碼子優化。使用*EcoRI* (5'-端)與*SacII* (3'-端)切位將該類病毒顆粒模板的片段次選殖到酵母菌表現質體載體pPICZ A，並且使用甲醇誘導的AOX1啟動子調節表現。使用在5'與3'端的*XhoI*+*NheI*配對的限制酶切位，將編碼該N-端病毒結構蛋白(VP1)的序列選殖到該模板中。使用在5'與3'端的*NheI*+*NdeI*配對的限制酶切位，將編碼該N-端連接子(連接子1)的序列選殖到該模板中。使用在5'與3'端的*NdeI*+*PstI*配對的限制酶切位，將編碼該抗原的序列選殖到該模板中。使用在5'與3'端的*PstI*+*KpnI*配對的限制酶切位，將編碼該C-端連接子(連接子2)的序列選殖到該模板中。使用在5'與3'端的*KpnI*+*SpeI*配對的限制酶切位，將編碼該C-端病毒結構蛋白(VP2)的序列選殖到該模板中。

【0155】 例如，在名為SP-GG-VP1的類病毒顆粒中，使用*XhoI*+*NheI*將該諾羅病毒VP1蛋白的S結構域選殖到該模板中，使用*NheI*+*NdeI*將該N-端彈性連接子(GGGGS)₃選殖到該模板中，使用*NdeI*+*PstI*將該VP1抗原選殖到該模板中，使用*PstI*+*KpnI*將該C-端彈性連接子(GGGGS)₃選殖到該模板中，以及使用*KpnI*+*SpeI*將該諾羅病毒VP1蛋白的P結構域選殖到該模板中。

【0156】 以下實施例1-1至1-108的重組蛋白係使用該類病毒顆粒模板來產生：

實施例	名稱	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
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

實施例	名稱	VP1	L1	Ag	L2	VP2
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
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

實施例	名稱	VP1	L1	Ag	L2	VP2
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
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
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

【0157】 實施例1A：S-VP1-S的構築

【0158】 以GenScript在質體pUC57中合成S-VP1-S的編碼區域(參見圖

9)，並將序列進行適合*E. coli*宿主的密碼子優化。以PCR將類病毒顆粒模板的片段次選殖到質體載體pCRT7NT (Invitrogen公司)，並以IPTG誘導的T7啟動子調節表現。這種技術被用來生產在上表中的實施例1-109的重組蛋白。

【0159】 實施例2：酵母轉型作用

【0160】 以*PmeI*限制酶(NEB公司)對重組質體DNA進行線性化，並以NucleoSpin® (Macherey-Nagel公司)清理該重組質體，以進行接續的轉型作用。藉由氯化鋰的方法並根據EasySelect™畢赤表現套組(Invitrogen公司)的操作手冊，將5-10 µg的線性化質體DNA轉型至畢赤酵母菌宿主菌株GS115中。將轉型物接種於含有50µg/ml博來黴素(Invivogen公司)的YPDS平板培養基上(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)瓊脂)。篩選對博來黴素有抗性的菌落，並以菌落PCR確認插入物，PCR係使用以下引子：5' AOX1引子：5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'(SEQ ID NO: 28)；3' AOX1引子：5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'(SEQ ID NO: 29)。

【0161】 實施例3：蛋白表現

【0162】 所有構築體的重組蛋白的表現是以甲醇誘導，但S-VP1-S除外。在250 mL的燒瓶中將單一菌落接種於40 mL的YPD培養基(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°C下將培養物置於一個軌道搖動的培養箱中(250 rpm)生長，直到細胞在指數期生長(OD_{600} =1.3-1.8)。將細胞在室溫(RT)下以1500xg離心5分鐘後收穫。倒出上清液，並以YP培養基(1% (w/v)酵母萃取物以及2% (w/v)胰蛋白胨)與0.5%(v/v)甲醇將細胞沉澱物重新懸浮至 OD_{600} 為1.0。24小時後，以離心法收集細胞沉澱物，並儲存於-80°C下直到準備分析。以冷的氯化鉀緩衝液(100mM KCl、20mM HEPES、1mM EDTA和1mM的PMSF，pH 8.0)重新懸浮細胞沉澱物，然後以法國壓力機均質化(20,000 psi；EmulsiFlex-B15，AVESTIN公司)。以離心(在4°C下以15000xg離心30分鐘)分離

可溶性與不可溶性的重組類病毒顆粒蛋白，並以西方墨點法分析(圖2-圖6)。

【0163】 如圖4所示，單獨表現的HA1抗原大多是不可溶的(圖4A)。但是，一旦該HA1抗原被置入到本發明的類病毒顆粒構築體中，其溶解度得到改善(圖4B)。這顯示本發明的類病毒顆粒設計有助於HA1抗原的折疊。

【0164】 實施例3A：S-VP1-S蛋白表現

【0165】 以1 mM IPTG誘導S-VP1-S的重組蛋白表現。在一個250 mL的燒瓶中將單一菌落接種於10 mL的LB培養基(1% (w/v)胰蛋白胨、0.5% (w/v)酵母萃取物及1% (w/v)氯化鈉)。在37°C下將培養物置於一個軌道搖動的培養箱中(250 rpm)生長，直到細胞在指數期生長($OD_{600}=0.6-0.8$)。將細胞在室溫下以8000xg離心10分鐘後收穫。以離心法收集細胞沉澱物，並儲存於-80°C下直到準備分析。以冷的氯化鉀緩衝液(100mM KCl、20mM HEPES、1mM EDTA和1mM的PMSF，pH 8.0)重新懸浮細胞沉澱物，然後以法國壓力機均質化(20,000 psi；EmulsiFlex-B15，AVESTIN公司)。以離心(在4°C下以15,000xg離心30分鐘)分離可溶性與不可溶性的重組類病毒顆粒蛋白，並以西方墨點法分析(未顯示數據)。

【0166】 實施例4：VLP純化與特徵分析

【0167】 以蔗糖密度梯度和尺寸排阻色層分析法來分析類病毒顆粒形成的特徵。收集酵母細胞並再懸浮於冷的氯化鉀緩衝液中，然後以法國壓力機均質化。以離心法(在4°C下以15000xg離心30分鐘)收集上清液，並作為尺寸排阻色層分析法(Superose 6 Increase 10/300 GL，GE healthcare公司)以及10%-50%連續蔗糖梯度超高速離心(35,000 rpm離心4小時；SW 41 Ti轉子，Optima™ L-100 XP，Beckman公司)的粗萃取物。類病毒顆粒形成是基於藉由西方墨點法分析尺寸排阻色層分析法的空隙體積中，以及蔗糖梯度的20%-40%區段中，重組類病毒顆粒蛋白的出現來判斷。

【0168】 針對SP-GG-VP1類病毒顆粒的純化，在粗萃取物中的類病毒顆粒

是藉由鎳管柱色層分析法(鎳瓊脂糖™6 Fast Flow, GE Healthcare公司)進行純化,並以考馬斯藍染色的SDS聚丙烯醯胺凝膠電泳和西方墨點法分析蛋白。

【0169】 本發明的幾個類病毒顆粒的構築的蔗糖梯度分析的結果示於圖7。

【0170】 實施例5：穿透式電子顯微鏡(transmission electron microscopy, TEM)

【0171】 以穿透式電子顯微鏡(TEM)對類病毒顆粒的顆粒大小與形態進行特徵分析。純化的類病毒顆粒被吸附到弗姆瓦/碳-塗覆的銅網(Electron Microscope Science公司)上,並以1.5%乙酸雙氧鉀水溶液進行負染色。樣本以JEOL JEM-1200EX II穿透式電子顯微鏡形成影像。

【0172】 SP-GG-VP1和S-VP1-S類病毒顆粒的電子顯微照片分別示於圖8和圖10。

【0173】 實施例6：細胞株與病毒株

【0174】 以含有10% FBS (Genedirex公司)、1% L-麩醯胺酸 (Caisson公司)以及1%青黴素/鏈黴素(Caisson公司)的Dulbecco氏改良Eagle氏培養基-高葡萄糖(DMEM-HG, Caisson公司)在37°C以及5% CO₂的加濕環境下對人類橫紋肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RD)細胞進行繼代培養。EV71病毒 (B5基因型)獲自台灣的CDC (CDC # 2013-EV-00017),並在RD細胞中以2 %FBS在MOI 0.01下增殖。感染三天後自上清液中收獲病毒種庫。為了估算病毒感染量(infectivity titers),將EV71進行10倍稀釋,並在一個96孔培養盤上感染RD細胞。在4天的培養期後,使用倒置顯微鏡觀察到細胞病變作用(CPE)。以Reed, L.J.與Muench, H.於1938年發表的方法計算EV71的50%組織培養感染劑量(TCID₅₀),Reed, L.J.與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頁。

【0175】 以補充有10% FBS、1% L-麩醯胺酸，以及1%青黴素/鏈黴素的DMEM培養基在37°C以及5% CO₂的加濕環境下對MDCK細胞進行繼代培養。H1N1病毒(A/Taiwan/80813/2013)獲自台灣的CDC，並在MDCK細胞中以補充有1ug/mL TPCK-蛋白酶(Sigma公司)的無血清DMEM培養基進行增殖。收集病毒上清液以作為病毒種庫，並用於實驗中。使用如前述之TCID₅₀以測定病毒量(virus titers)。

【0176】 實施例7：小鼠免疫試驗

【0177】 以小鼠免疫試驗進行疫苗效力分析。Balb/c小鼠購自BioLASCO公司(台北，台灣)。25 µg的ΔSP-GG-VP1-C類病毒顆粒以及相等莫耳量的VP1蛋白以KCl緩衝液稀釋並與或不與作為佐劑的5 ng LPS混合。以足墊注射方式分別將VLP (n=4)、VP1 (n=3)、VLP + 佐劑 (n=4)以及 VP1 + 佐劑 (n=3)對八週齡雌性小鼠進行免疫，並在第7天進行二次免疫。在第0、7以及14天時以眼眶採樣採集血清樣本，以監測免疫反應。

【0178】 實施例8：血清學分析

【0179】 以西方墨點法與ELISA檢驗來自被免疫的小鼠的抗原特異性抗體。5 µg的ΔSP-GG-VP1-C類病毒顆粒以及VP1在被轉移到一個PVDF膜(Bio-Rad公司)之前，先以10% SDS-PAGE進行分離，隨後以抗血清(稀釋1:500倍)偵測，接著與辣根過氧化物酶(HRP)綴合的山羊抗小鼠IgG抗體(H+L)(稀釋1：20,000倍；50 µl/孔，Jackson ImmunoResearch公司，型號115-035-044)共同培養。以西方化學發光HRP基質(ECL)(Millipore公司)對膜進行顯影，並且暴露於X光片(FUJIFILM公司)。

【0180】 以ELISA測定血清中抗EV71、VLP1和VLP2的IgG抗體力價。培養盤上的每個孔皆以10 ng的類病毒顆粒抗原(稀釋於0.1M NaHCO₃)塗覆，並在4°C靜置整夜。以PBST (0.1% Tween 20在PBS中)緩衝液清洗後，每個孔以200 µl

含有1% BSA的PBST在室溫下進行阻隔作用60分鐘。清洗後，對抗血清進行二倍系列稀釋(稀釋100-3,200倍)，並加入孔中(50 μ l/孔)。培養盤在室溫(RT)下靜置60分鐘後，在加入HRP綴合的山羊抗小鼠IgG抗體(稀釋1:20,000倍；50 μ l/孔)前先清洗。加入100 μ l的TMB (Millipore公司)並顯色5-15分鐘。加入50 μ L的H₂SO₄ (2 N)以停止反應，並且以微量盤讀取儀(TECAN公司)測量OD_{450/750}。

【0181】 圖11例示獲自在不同時間注射S-VP1-S類病毒顆粒的被免疫小鼠的抗血清的西方墨點法分析結果。

【0182】 另外，以25 μ g的 Δ SP-GG-VP1-C類病毒顆粒以及相等莫耳量的VP1蛋白，帶有或沒有5 ng LPS作為佐劑，對雌性Balb/c小鼠進行免疫。在第0天(免疫前)和免疫後第14天收集血清。以ELISA測定抗類病毒顆粒IgG抗體力價。其結果示於下表中：

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

【0183】 實施例9：EV71的微量中和分析

【0184】 將在RD細胞中對EV71進行微量中和分析。簡言之，將血清在56°C下進行熱滅活30分鐘，並在96孔培養盤中自1:10至1：1280的倍數進行二倍系列稀釋，並與等量的EV71病毒(100 TCID₅₀/50 μ l)混合。在37°C下進行病毒中和作用1小時後，該血清-病毒混合物將被加入RD細胞中，並培養3-4天以觀察細胞的細胞病變作用(cytopathic effects，CPE)或是培養39小時以進行ELISA試驗以偵測病毒抗原。針對中和作用-ELISA (Nt-ELISA)試驗，RD細胞以80%冷丙酮固定，並風乾。風乾後的培養盤將再以PBST水合，以檢測EV71。抗EV71 VP1蛋白的兔多株抗體被作為初級抗體(1：4000)，且過氧化物酶綴合的山羊抗兔IgG抗體(1：20,000)(Jackson ImmunoResearch公司)則被作為二級抗體，其係以含3% BSA

的PBST稀釋。使用TMB顯色，並在450nm波長下讀取光學密度(ODs)。

【0185】 圖12例示透過使用S-VP1-S類病毒顆粒對EV71進行微量中和分析的結果。

【0186】 實施例10：H1N1的微量中和分析

【0187】 將在MDCK細胞中對H1N1進行微量中和分析。簡言之，將血清在56°C下進行熱滅活30分鐘，並在96孔培養盤中自1:10至1：1280的倍數進行二倍系列稀釋，並與等量的H1N1病毒(100 TCID₅₀/50 µl)混合。在37°C下進行病毒中和作用1小時後，該血清-病毒混合物將被加入MDCK細胞中，並培養39小時。培養後，MDCK細胞將以80%冷丙酮固定，並風乾。風乾後的培養盤將再以PBST水合，以檢測H1N1。抗H1N1核蛋白(NP)的生物素化的單株抗體將作為初級抗體(1：2000)(Millipore公司)，且過氧化物酶綴合的鏈黴親和素(1：75,000)將被作為二級抗體，其係以含1% BSA的PBST稀釋。使用TMB顯色，並在450nm波長下讀取光學密度(ODs)。

【0188】 實施例11：額外的構築

【0189】 以下實施例11-1至11-xx的重組蛋白將透過使用該類病毒顆粒模板而產生，並以上述方式測試。例如，名為SHBs-GG-VP1的類病毒顆粒將透過使用*XhoI*+*NheI*將諾羅病毒VP1蛋白的S結構域選殖至模板中，使用*NheI*+*NdeI*將N-端彈性連接子(GGGGS)₃選殖至該模板中，使用*NdeI*+*PstI*將VP1抗原選殖至該模板中，使用*PstI*+*KpnI*將C-端彈性連接子(GGGGS)₃選殖至該模板中，使用*KpnI*+*SpeI*將BHV-衍生的微小表面抗原選殖至該模板中而被創造出來。

實施例	名稱	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

實施例	名稱	VP1	L1	Ag	L2	VP2
11-7	SHBs-RG-VP1	S	R	VP1	G	HBs
11-8	SHBs-RE-VP1	S	R	VP1	E	HBs
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
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

實施例	名稱	VP1	L1	Ag	L2	VP2
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

【0190】 儘管本發明已經在特定的實例以及具體實施例的內容中被描述，本領域的技術人員將同意等同的具體實施例也包括在下列申請專利範圍的範圍內。

【符號說明】

【0191】 無

【生物材料寄存】

【0192】 無

序列表

<110> 基亞生物科技股份有限公司

<120> 類病毒顆粒疫苗

<130> IM0044/MDG0005WO

<150> US62/034,475

<151> 2014-08-07

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 46

<212> 蛋白質

<213> 人工序列

<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> 蛋白質

<213> 人工序列

<400> 2

Pro Ala Pro Ala Pro
1 5

<210> 3

<211> 12

<212> 蛋白質

<213> 人工序列

<400> 3

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
1 5 10

<210> 4

<211> 17

<212> 蛋白質

<213> 人工序列

<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> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 5
Pro Leu Gly Leu Trp Ala Cys
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 6
Arg Val Leu Ala Glu
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 7
Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr
1 5 10

<210> 8
<211> 8
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 8
Gly Gly Ile Glu Gly Arg Gly Ser
1 5

<210> 9
<211> 10
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 9
Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
1 5 10

<210> 10
<211> 10
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 10

Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly
1 5 10

<210> 11
<211> 9
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 11
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 12
<211> 11
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 12
Gly Gly Ser Gly Gly His Met Gly Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 13
<211> 8
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 13
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 14
<211> 11
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 14
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 15
<211> 8
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 15
Ser Gly Gly Gly Ser Ser His Ser
1 5

<210> 16
<211> 10
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 16
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser His Ser
1 5 10

<210> 17
<211> 13
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 17
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser His Ser
1 5 10

<210> 18
<211> 5
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 18
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 19
<211> 16
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<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> 蛋白質
<213> 人工序列

<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> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 21
Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Ala
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> 蛋白質



<213> 人工序列

<400> 22
Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 23
Gly Gly Ser Ser Gly
1 5

<210> 24
<211> 11
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<400> 24
Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10

<210> 25
<211> 15
<212> 蛋白質
<213> 人工序列

<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> 蛋白質
<213> 人工序列

<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> 蛋白質
<213> 人工序列

<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
第5頁

	50		55	
<210>	28			.
<211>	21			
<212>	DNA			.
<213>	引子			.
<400>	28			
gactggttcc aattgacaag c			21	.
<210>	29			
<211>	21			
<212>	DNA			
<213>	引子			
<400>	29			
gcaaatggc atctgacatc c			21	

201629090

【發明摘要】

【中文發明名稱】 類病毒顆粒疫苗

【英文發明名稱】 VIRUS-LIKE PARTICLE VACCINES

【中文】

本發明涉及二聚體融合蛋白和包含此類二聚體融合蛋白的類病毒顆粒。這些二聚體融合蛋白係由兩個病毒結構蛋白或其片段及抗原或抗原片段所組成，其中抗原或抗原片段係位於兩個病毒結構蛋白之間，且該抗原或抗原片段與該病毒結構蛋白之間可置入或不置入連接子，以致相對於傳統的單體平台，該抗原或抗原片段與該病毒結構蛋白或其片段得以立體阻礙最小化的方式折疊。這種新穎的設計，提供了多價且免疫原性增強的疫苗。本發明還涉及編碼此種二聚體融合蛋白的核酸與含有此類核酸的宿主細胞。本發明進一步涉及包含本發明二聚體融合蛋白及/或類病毒顆粒的醫藥組合物，以及使用此種組合物的預防或治療方法。

【英文】

The invention is directed to dimeric fusion proteins and virus-like particles comprising such dimeric fusion proteins. These dimeric fusion proteins comprise an antigen or antigenic fragment carried between two viral structural proteins or fragments thereof, with or without linkers, in a manner that, relative to traditional monomeric platforms, minimizes steric hindrance among the antigen or antigenic fragment and the viral structural proteins or fragments thereof. This novel design

provides for multivalent vaccines and enhanced immunogenicity. The invention also relates to nucleic acids encoding such dimeric fusion proteins and host cells comprising such nucleic acids. The invention further relates to pharmaceutical compositions comprising the dimeric fusion proteins and/or virus-like particles of the invention, and methods of prevention or treatment using such compositions.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種融合蛋白，包含：

(a) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒；

(b) V1-L1-Ag-V2 或 V1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒；

(c) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒；

(d) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且 V1 及 V2 是相同的；

(e) V1-L1-Ag-V2 或 V1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且 V1 及 V2 是相同的；

(f) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且 V1 及 V2 是相同的；

(g) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且 V1 及 V2 是來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 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且 V1 及 V2 是來自相同病毒的不同蛋白；

(i) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V1 及 V2 是來自相同病毒的不同蛋白；

(j) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V1 及 V2 是來自不同病毒的蛋白；

(k) V1-L1-Ag-V2 或 V1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V1 及 V2 是來自不同病毒的蛋白；

(l) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V1 及 V2 是來自不同病毒的蛋白；

(m) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

其中該片段是來自相同病毒結構蛋白的不同部分，且

V1 及 V2 的胺基酸序列長度總和少於該病毒結構蛋白的完整胺基酸序列長度；

(n) V1-L1-Ag-V2 或 V1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

其中該片段是來自相同病毒結構蛋白的不同部分，且

V1 及 V2 的胺基酸序列長度總和少於該病毒結構蛋白的完整胺基酸序列長度；

(o) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

其中該片段是來自相同病毒結構蛋白的不同部分，且 V1 及 V2 的胺基酸序列長度總和少於該病毒結構蛋白的完整胺基酸序列長度；

(p) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

且 V2 是 V1 的片段；

(q) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V1 是 V2 的片段；

(r) V1-L1-Ag-V2 或 V1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V2 是 V1 的片段；

(s) V1-L1-Ag-V2 或 V1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V1 是 V2 的片段；

(t) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V2 是 V1 的片段；

(u) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

且 V1 是 V2 的片段；

(v) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

且 V2 是來自與 V1 相同病毒的不同蛋白之片段；

(w) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

且 V1 是來自與 V2 相同病毒的不同蛋白之片段；

(x) V1-L1-Ag-V2 或 V1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

且 V2 是來自與 V1 相同病毒的不同蛋白之片段；

(y) V1-L1-Ag-V2 或 V1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

且 V1 及 V2 是來自相同病毒的不同蛋白；

(z) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

且 V2 是來自與 V1 相同病毒的不同蛋白之片段；

(aa) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V1 是來自與 V2 相同病毒的不同蛋白之片段；

(bb) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V2 是來自與 V1 不同病毒的蛋白之片段；

(cc) V1-L1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

且 V1 是來自與 V2 不同病毒的蛋白之片段；

(dd) V1-L1-Ag-V2 或 V1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

且 V2 是來自與 V1 不同病毒的蛋白之片段；

(ee) V1-L1-Ag-V2 或 V1-Ag-L2-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

L1 是一 N 端連接子，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，

L2 是一 C 端連接子，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，

且 V1 是來自與 V2 不同病毒的蛋白之片段；

(ff) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及

V2 是一 C 端病毒結構蛋白之一片段，

其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，且

V2 是來自與 V1 不同病毒的蛋白之片段；或

(gg) V1-Ag-V2，其中

V1 是一 N 端病毒結構蛋白之一片段，

Ag 是一病原體的抗原或抗原片段，以及
 V2 是一 C 端病毒結構蛋白，
 其中 V1 及 V2 能夠單獨或共同形成一類病毒顆粒，
 且 V1 是來自與 V2 不同病毒的蛋白之片段。

【第2項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中Ag係選自於下列組成之群組：

- (a)來自一病毒病原體之一抗原胜肽、多胜肽或蛋白，
- (b)來自一細菌病原體之一抗原胜肽、多胜肽或蛋白，
- (c)來自一寄生病原體之一抗原胜肽、多胜肽或蛋白，
- (d)來自一真菌病原體之一抗原胜肽、多胜肽或蛋白，以及
- (e)來自一感染性蛋白顆粒之一抗原胜肽、多胜肽，或蛋白。

【第3項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中V1及V2係選自於下列組成之群組：病毒殼蛋白與病毒套膜蛋白。

【第4項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中V1及V2係選自於下列組成之群組：

- (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) 諾羅病毒殼蛋白 VP1 的 S 結構域，
- (d) 諾羅病毒殼蛋白 VP1 的 P 結構域，
- (e) 人類輪狀病毒 VP2，
- (f) 人類輪狀病毒 VP6，
- (g) 人類乳突病毒的 L1 主要殼蛋白，

- (h) 人類多瘤性病毒的 VP1，
- (i) 人類 JC 病毒的 VP1，
- (j) 人類第二型腺相關病毒的 VP2，
- (k) 人類第二型腺相關病毒的 VP3，
- (l) E 型肝炎病毒殼蛋白 VP1 的 S 與 P1 結構域，以及
- (m) E 型肝炎病毒殼蛋白 VP1 的 P2 結構域。

【第5項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中(a)、(b)或(c)的V1及V2是相同的病毒結構蛋白。

【第6項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中(a)、(b)或(c)的V1及V2是相同病毒的不同病毒結構蛋白。

【第7項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中(a)、(b)或(c)的V1及V2是不同病毒的病毒結構蛋白。

【第8項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中V1及V2至少一者在該融合蛋白、該類病毒顆粒、或該融合蛋白以及該類病毒顆粒中具有免疫原性。

【第9項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中V1及V2在該融合蛋白、該類病毒顆粒、或該融合蛋白以及該類病毒顆粒中皆具有免疫原性。

【第10項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中(a)、(b)、(d)、(e)、(g)、(h)、(j)、(k)、(m)、(n)、(p)-(s)、(v)-(y)或(bb)-(ee)的L1及L2中至少一者係選自於下列組成之群組：彈性連接子、可切割連接子、剛性連接子，以及非結構的隨機螺旋胜肽。

【第11項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中(a)、(d)、(g)、(j)、(m)、(p)、(q)、(v)、(w)、(bb)或(cc)的L1及L2是相同的連接子。

【第12項】 如申請專利範圍第1項之融合蛋白，其中(a)、(d)、(g)、(j)、(m)、(p)、(q)、(v)、(w)、(bb)或(cc)的L1及L2是不同的連接子。

【第13項】 一種重組核酸表現載體，包含編碼如申請專利範圍第1項的融合蛋白的多核苷酸。

【第14項】 一種宿主細胞，包含如申請專利範圍第13項的重組核酸表現載體。

【第15項】 一種類病毒顆粒，包含如申請專利範圍第1項的融合蛋白。

【第16項】 一種醫藥組合物，包含如申請專利範圍第15項的類病毒顆粒與一醫藥上可接受的載劑。

【第17項】 一種醫藥組合物，包含如申請專利範圍第1項的融合蛋白與一醫藥上可接受的載劑。

【第18項】 一種製備類病毒顆粒的方法，該方法包含在允許該融合蛋白表現的條件下培養如申請專利範圍第14項的宿主細胞，以及組裝該融合蛋白以形成該類病毒顆粒。

【第19項】 一種如申請專利範圍第1項的融合蛋白在製造用以在哺乳類動物個體體內誘導免疫反應的藥物的用途。

【第20項】 一種如申請專利範圍第15項的類病毒顆粒在製造用以在哺乳類動物個體體內誘導免疫反應的藥物的用途。

