



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103282378 B

(45) 授权公告日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201180058569. 8

(22) 申请日 2011. 10. 06

(30) 优先权数据

61/390, 591 2010. 10. 06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 06. 05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/055113 2011. 10. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/048115 EN 2012. 04. 12

(73) 专利权人 华盛顿大学商业中心

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 威廉·R·席夫 布鲁诺·E·科雷亚

戴维·贝克

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 张国梁

(51) Int. Cl.

C07K 14/435(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1668335 A, 2005. 09. 14, 全文.

WO 2009/079796 A1, 2009. 07. 02, 全文.

田慕贞等. 抗呼吸道合胞病毒 (RSV) 单克隆

抗体的制备及其对 RSV 制备及其对 RSV 病毒株抗原性的分析. 《中国病毒学》. 1992, 第 7 卷 (第 2 期), 第 181-185 页.

芦起. 呼吸道合胞病毒的蛋白特征及抗原变异. 《国外医学病毒学分册》. 2005, 第 12 卷 (第 3 期), 第 76-80 页.

Wu et al.. Development of Motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. 《Journal of molecular biology》. Academic press, United Kingdom, 2007, 第 368 卷 (第 3 期), 第 652-665 页.

审查员 皇甫洁琼

权利要求书1页 说明书24页

序列表18页 附图7页

(54) 发明名称

多肽及其在治疗和限制呼吸道合胞病毒感染中的用途

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗或限制呼吸道合胞病毒感染的多肽及其组合物, 以及用于设计这样的多肽的计算方法。

1. 一种分离的多肽,其包含选自由 SEQ ID NO :4-9 组成的组的氨基酸序列。
2. 权利要求 1 的分离的多肽,所述多肽包含根据 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列。
3. 权利要求 1 的分离的多肽,所述多肽由 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列组成。
4. 权利要求 1 的分离的多肽,其中所述多肽包含选自由 SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :9 组成的组的序列。
5. 权利要求 1 的分离的多肽,其中所述多肽包含选自由 SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :9 组成的组的序列。
6. 一种病毒样颗粒 (VLP),其包含权利要求 1-5 中的任一项的多肽。
7. 一种分离的核酸,其编码权利要求 1-5 中的任一项的多肽。
8. 一种重组表达载体,其包含与启动子可操作地连接的权利要求 7 的分离的核酸。
9. 一种重组宿主细胞,其包含权利要求 8 的重组表达载体。
10. 一种药物组合物,其包含权利要求 1-5 中的任一项的多肽或权利要求 6 的 VLP 和药学上可接受的载体。
11. 有效限制 RSV 感染发生的量的权利要求 1-5 中的任一项的多肽、权利要求 6 的 VLP 或权利要求 10 的药物组合物在制备用于限制 RSV 感染发生的药物中的应用,其中有效限制 RSV 感染发生的量的权利要求 1-5 中任一项的多肽、权利要求 6 的 VLP 或权利要求 10 的药物组合物用于给处于 RSV 感染风险的受试者施用。
12. 有效产生免疫应答的量的权利要求 1-5 中的任一项的多肽、权利要求 6 的 VLP 或权利要求 10 的药物组合物在制备用于在受试者中产生免疫应答的药物中的应用,其中有效产生免疫应答的量的权利要求 1-5 中任一项的多肽、权利要求 6 的 VLP 或权利要求 10 的药物组合物用于给受试者施用。
13. 一种药物组合物,其包含
 - (a) 权利要求 7 的分离的核酸、权利要求 8 的重组表达载体和 / 或权利要求 9 的重组宿主细胞 ;和
 - (b) 药学上可接受的载体。
14. 权利要求 1-5 中的任一项的多肽、权利要求 6 的 VLP 或权利要求 10 的药物组合物在制备用于监测受试者中 RSV 诱发的疾病和 / 或监测受试者对 RSV 疫苗免疫接种的应答的诊断剂中的应用,其中权利要求 1-5 中的任一项的多肽、权利要求 6 的 VLP 或权利要求 10 的药物组合物用于与来自受试者的体液接触,以检测所述受试者体液中的 RSV 结合抗体。
15. 权利要求 14 的应用,其中所述体液包括血清或全血。
16. 权利要求 1-5 中的任一项的多肽、权利要求 6 的 VLP 或权利要求 10 的药物组合物在制备用于检测 RSV 结合抗体的诊断剂中的应用,其中权利要求 1-5 中的任一项的多肽、权利要求 6 的 VLP 或权利要求 10 的药物组合物用于在适合 RSV 抗体与所述多肽、VLP 或组合物结合的条件下与包含候选 RSV 结合抗体的组合物接触以检测 RSV 抗体与所述多肽、VLP 或组合物的复合物。
17. 有效产生抗体应答的量的权利要求 1-5 中的任一项的多肽、权利要求 6 的 VLP 或权利要求 10 的药物组合物在制备用于产生 RSV 抗体的试剂中的应用,其中有效产生抗体应答的量的权利要求 1-5 中的任一项的多肽、权利要求 6 的 VLP 或权利要求 10 的药物组合物用于给受试者施用以分离由所述受试者产生的抗体。

多肽及其在治疗和限制呼吸道合胞病毒感染中的用途

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 10 月 6 日提交的美国临时申请系列号 61/390591 的优先权，其通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus, RSV) 是全世界婴儿的病毒性死亡的主要原因，也在老年人和免疫受损的人中造成疾病。目前用于预防 RSV 感染的方法是用帕利珠单抗 (Palivizumab, Pali) 被动免疫接种，所述帕利珠单抗是一种 FDA 许可的人源化单克隆抗体，其结合在 RSV 表面上的 F 蛋白。尽管可有效预防 RSV 感染，Pali 治疗在全球规模在经济上或逻辑上是不可行的。

发明内容

[0004] 在第一方面，本发明提供了分离的多肽，其包含根据 SEQ ID NO :1-9 中的任一个的氨基酸序列，其可以用于例如本发明的方法中。

[0005] 在另一个方面，本发明提供了病毒样颗粒，其包含本发明的多肽。

[0006] 在其它方面，本发明提供了：分离的核酸，其编码本发明的多肽；重组表达载体，其包含与启动子可操作地连接的本发明的分离的核酸；和重组宿主细胞，其包含本发明的重组表达载体。

[0007] 在另一个方面，本发明提供了药物组合物，其包含本发明的多肽和 / 或病毒样颗粒和药学上可接受的载体。

[0008] 在另一个方面，本发明提供了用于治疗 RSV 感染的方法，所述方法包括：给被 RSV 感染的受试者施用有效治疗所述感染的量的本发明的多肽、病毒样颗粒或药物组合物。

[0009] 在另一个方面，本发明提供了用于限制 RSV 感染发生的方法，所述方法包括：给处于 RSV 感染风险的受试者施用有效限制 RSV 感染发生的量的本发明的多肽、病毒样颗粒或药物组合物。

[0010] 在另一个方面，本发明提供了用于在受试者中产生免疫应答的方法，所述方法包括：给受试者施用有效产生免疫应答的量的本发明的多肽、病毒样颗粒或药物组合物。

[0011] 在另一个方面，本发明提供了药物组合物，其包含

[0012] (a) 本发明的分离的核酸、重组表达载体和 / 或重组宿主细胞；和

[0013] (b) 药学上可接受的载体。

[0014] 在另一个方面，本发明提供了用于监测受试者中 RSV 诱发的疾病和 / 或监测受试者对 RSV 疫苗的免疫接种的应答的方法，所述方法包括：使本发明的多肽、VLP 或药物组合物与得自所述受试者的体液接触，和检测所述受试者的体液中的 RSV 结合抗体。

[0015] 在另一个方面，本发明提供了用于检测 RSV 结合抗体的方法，所述方法包括

[0016] (a) 在适合 RSV 抗体与本发明的多肽、VLP 或组合物结合的条件下，使所述多肽、VLP 或组合物与包含候选 RSV 结合抗体的组合物接触；和

- [0017] (b) 检测 RSV 抗体与所述多肽、VLP 或组合物的复合物。
- [0018] 在另一个方面,本发明提供了用于产生 RSV 抗体的方法,所述方法包括
- [0019] (a) 给受试者施用有效产生抗体应答的量的本发明的多肽、VLP 和 / 或组合物 ;和
- [0020] (b) 分离由所述受试者产生的抗体。
- [0021] 在另一个方面,本发明提供了用于设计多肽支架的计算方法,所述方法包括
- [0022] (a) 定义要用作折叠核的多肽结构基序 ;
- [0023] (b) 定义 (i) 与所述多肽结构基序相容的多肽支架的靶标三维拓扑结构,和 (b) 要用所述多肽结构基序替换的靶标三维拓扑结构的区域 ;
- [0024] (c) 从所述多肽结构基序的原子坐标末端生长延长的多肽链 ;
- [0025] (d) 折叠所述延长的多肽链,同时保持所述多肽结构基序的主链双面角固定 ;和
- [0026] (e) 将满足用户定义的相对于靶标三维拓扑结构的多肽主链均方根差 (rmsd) 阈值的折叠多肽链鉴定为目标多肽支架。
- [0027] 在另一个方面,本发明提供了非瞬时性机器可读存储介质,其包含一组用于使计算装置执行本发明的计算方法的指令。

附图说明

[0028] 图 1 是计算过程从环折叠 (Fold From Loops) 的概要。所述过程产生将要用作折叠核的功能位点 (诸如显示的螺旋发夹),并在所述过程中始终保持固定的主链构象。提供靶标拓扑结构,并 (任选地) 从所述靶标拓扑结构结构衍生出距离约束,以引导折叠轨迹。从折叠核延长多肽链,然后折叠所述链。如果产生的模型偏离靶标拓扑结构超过截止均方根差 (rmsd) (例如 $5\text{\AA}$),则抛弃它们。否则,它们进入设计和全原子优化循环。该图描绘了 3 个迭代设计和优化循环作为合理的选择,但是循环的数目应当根据用户的判断来选择。

[0029] 图 2 显示了与它的得自 RSVF 蛋白的肽表位形成复合物的莫他珠单抗 (Motavizumab, Mota)。A) 复合物的侧视图。B) 复合物的后视图。C) 用杆显示在复合物的界面上的侧链。

[0030] 图 3 是不同支架的序列比对和用作靶标拓扑结构 (T93) 的蛋白的序列。通过故意维持支架的与靶标拓扑结构相同的表面,产生在许多位置中的相似性。

[0031] 图 4 显示了通过尺寸排阻色谱法和静态光散射对支架的寡聚状态的表征。所有分子显示出单一的单分散物质,且具有与单体物质的预期值接近的分子量 :大约 15kDa。得自尺寸排阻的紫外信号是在所有图中的上部轨迹线,光散射信号是下部轨迹线。

[0032] 图 5 显示了二级结构的圆二色性分析和 FFL 设计的热稳定性。设计的波长扫描 (左列) 显示了螺旋蛋白的典型双重最低点。热变性曲线 (右列) 指示大多数设计的合作解折叠,并表明,FFL_005 一直到 95°C 不解链。FFL_005 的高稳定性由在 95°C 的波长扫描 (左列) 来例证。解链温度给出在表 1 中。

[0033] 图 6 显示了通过 SPR 评估的支架与莫他珠单抗的结合。使支架与 biacore 芯片偶联,并将莫他珠单抗用作分析物。显示了数据和动力学拟合。动力学拟合参数给出在表 1 中。

[0034] 图 7 显示了通过 SPR 评估的 FFL_001 的 Mota 结合特异性。Mota IgG 是被在传感器芯片上的抗 - 人 IgG 捕获的配体,FFL_001 和 FFL_001 的表位点突变体 (FFL_001_K82E)

是在 22 μ M 浓度的分析物。所述点突变消除了在 FFL_001 和 Mota 之间的相互作用。

[0035] 图 8. 野生型 (左) 和赖氨酸官能化的 (右) HepBcAg 颗粒的负染色 TEM。比例条是 50nm。

具体实施方式

[0036] 引用的所有文献均通过引用全文并入本文中。在此申请书内,除非另有说明,否则所利用的技术可能在若干众所周知的文献中的任一篇中找到,诸如:Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, 等人, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, 第 185 卷, D. Goeddel 编, 1991. Academic Press, San Diego, CA), “Guide to Protein Purification” in Methods in Enzymology (M. P. Deutscher 编 (1990) Academic Press, Inc.) ;PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, 等人. 1990. Academic Press, San Diego, CA), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 第 2 版 (R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY), Gene Transfer and Expression Protocols, 第 109-128 页, E. J. Murray 编, The Humana Press Inc., Clifton, N. J.), 和 Ambion 1998 年目录 (Ambion, Austin, TX)

[0037] 本文使用的氨基酸残基缩写如下: 丙氨酸 (Ala ;A), 天冬酰胺 (Asn ;N), 天冬氨酸 (Asp ;D), 精氨酸 (Arg ;R), 半胱氨酸 (Cys ;C), 谷氨酸 (Glu ;E), 谷氨酰胺 (Gln ;Q), 甘氨酸 (Gly ;G), 组氨酸 (His ;H), 异亮氨酸 (Ile ;I), 亮氨酸 (Leu ;L), 赖氨酸 (Lys ;K), 甲硫氨酸 (Met ;M), 苯丙氨酸 (Phe ;F), 脯氨酸 (Pro ;P), 丝氨酸 (Ser ;S), 苏氨酸 (Thr ;T), 色氨酸 (Trp ;W), 酪氨酸 (Tyr ;Y), 和缬氨酸 (Val ;V)。

[0038] 本文使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指明。本文使用的“和”与“或”可互换使用,除非明确地另外声明。

[0039] 本发明的任意方面的所有实施方案可以组合使用,除非上下文另外清楚地指明。

[0040] 在第一方面,本发明提供了分离的多肽,其包含根据下述的氨基酸序列或由所述序列组成:

[0041] (-/G) (-/S) (M/L/R/F) SD (R/A/I/M/V/L) (R/M) KD (L/A/V) E (E/R/K/D) R (L/F/I/A) DK (L/F/A) (L/V/F/M) EA (A/V/F/I/L) KNK (E/M/L/F/W/V) DK (F/M/E/I/V) KAA (M/L/F/I) RK (R/E/G/D/Q) (G/D/P/W/E/Q) (Q/I/P/K/F) (R/Q/K/S/G/H) EER (M/K/R/A) KD (W/L/M/K) (A/M/K/F) K (I/F/L/E/K/D) (A/V/M/F/L) R (D/K/E/Y) E (F/V/A/R/M/L) EQ (F/L/A/V/M) R (K/R) A (V/M/I) RN (F/R/V/I/A/Y) (L/E/A) (S) (E) (A/L) (L) (S) K (I) (N) D (Y/M/L) (P) I (T) (N) (D) (D/Q/K) (K) (K) (L) (T/I/M/V/A) (S) (N) (D/K) (A/T/L/V/I) (K/L/I) K (F/Y/K/E/R/L) (D/A/V/M) (A) (E/I/R) (V/A/M/L) (A/E/K/F/M/W) KK (L/I/V) E (A/L) (F/M/L/E/I) (K/A/V/M/I/L) AD (A/V/I) E (E/R/D/K/I/A) (A/M/K/L/W) (A/F/V/K) TQ (-/G) (-/S) (-/W) (SEQ ID NO :1)。

[0042] 发明人已经设计了本发明的多肽来诱导产生中和抗体,所述中和抗体具有与帕利珠单抗或莫他珠单抗类似的特异性。帕利珠单抗是一种 FDA 许可的治疗性抗体,其通过结合在 RSV F 表面糖蛋白上的抗原位点 A (也被称作“位点 II”) 而有效中和呼吸道合胞病毒 (RSV)。莫他珠单抗是一种亲和力成熟的帕利珠单抗变体。因而,需要诱导产生与帕利珠单抗 (Pali) 或莫他珠单抗 (Mota) 类似的 RSV- 中和抗体的疫苗保护免于 RSV 感染。Pali 和 Mota 结合在 RSV F 蛋白上的构象表位。如本文公开的,发明人已经开发了一种计算方法来

从头设计蛋白支架,所述蛋白支架用于表位构象稳定化和呈递给免疫系统。将该方法应用于 Mota 表位来设计本发明的多肽,所述多肽被证实是单体,具有高热稳定性,且对 Mota 具有极高的结合亲和力,这表明,所述多肽具有成功地稳定化的期望的表位构象,如通过晶体结构分析所证实的。发明人还已经证实,落入该种类范围内的多肽可以诱导产生针对 RSV 的中和抗体。

[0043] 括弧代表多肽中的可变位置,列举的氨基酸残基作为在这些位置中的备选方案。

[0044] 在一个优选实施方案中,所述多肽包含根据下述的氨基酸序列或由所述序列组成:

[0045] (-/G) (-/S) (M/L/R/F) SD (R/A/I/M/V) RKD (L/A/V) E (E/R/K/D) R (L/F/I/A) DK (L/F/A) (L/V/F) EA (A/V/F/L) KNK (M/L/F/V) DK (F/M/E/I) KAA (M/L/F/I) RK (R/E/G/D) (G/D/P/W/Q) (Q/I/P/F) (R/Q/K/S/H) EER (M/K/R/A) KD (W/L/M/K) (A/M/K/F) K (I/F/L/E/K/D) (A/V/M/F/L) R (D/K/Y/E) E (F/V/A/R/M) EQ (F/L/A/V/M) R (K/R) A (V/M/I) RN (F/R/V/I/Y) (L/E/A) SE (A/L) LSKIND (Y/M/L) PITND (D/Q/K) KKL (T/I/M/V/A) SND (T/L/V/I) (K/L/I) K (F/Y/K/E/L) (D/A/V/M) A (E/I/R) (V/A/M/L) (E/K/F/W) KK (L/I/V) E (A/L) (F/M/L/E/I) (K/A/V/M/L) AD (A/V/I) E (E/R/D/K/I/A) (A/M/K/L/W) (A/F/V) TQ (-/G) (-/S) (-/W) (SEQ ID NO :2)。

[0046] 根据该种类的多肽是存在于表现出最好活性范围(如在下面的实施例中所证实)的那些多肽中的多肽。

[0047] 在另一个优选的实施方案中,所述多肽包含根据下述的氨基酸序列或由所述序列组成:

[0048] (-/G) (-/S) (M/L/R/F) SD (I/M) RKD (L/A) E (E/R/D) R (F/A) DK (L/F/A) (V/F) EA (A/V/L) KNK (L/F/W) DK (F/M/I) KAA (L/F/I) RK (E/G/D) (G/D/W/Q) (Q/I/P/F) (Q/K/S/H) EER (M/R/A) KD (W/L/M) (M/K/F) K (F/L/K/D) (A/M/L) R (Y/K) E (V/A/M) EQ (L/A/M) R (K/R) A (V/M/I) RN (F/R/I/Y) (L/E/A) SE (A/L) LSKIND (M/L) PITND (D/Q) KKL (I/M/A) SND (L/V/I) (K/L/I) K (F/Y/E/L) (D/A/V/M) A (E/I/R) (V/A/L) (E/F/W) KK (L/I) EA (M/L/I) (K/A/M/L) AD (A/V/I) E (R/D/I/A) (M/K/L/W) (A/F/V) TQ (-/G) (-/S) (-/W) (SEQ ID NO :3)。

[0049] 根据该种类的多肽是已经被发明人示例性证实诱导产生针对 RSV 的中和抗体的那些。

[0050] 在另一个优选的实施方案中,所述多肽包含选自下述的氨基酸序列或由所述序列组成:

[0051] > FFL_001

[0052] GSRSDMRKDAERRFDKFVEAAKNKFDKFKAALRKGDIKEERRKDMKKLARKEA

[0053] EQARRAVRNRLSELLSKINDMPITNDQKKLMSNDVLKFAAEAEKKIEALAADAED

[0054] KFTQGSW (SEQ ID NO :4) ;

[0055] > FFL_002

[0056] GSLSDVRKDVEKRIDKALEAFKNKMDKEKAAFRKDPPEERRKDKKKEFREERE

[0057] QVRKAIRNVLSEALSKINDLPITNDKKKLVSNDVIKKVAEMKKKVELEVADVEKK

[0058] VTQGSW (SEQ ID NO :5) ;

[0059] > FFL_004

[0060] GSMSDARKDLEERLDKLLAAKNKMDKFKAAMRKRGRQREERKKDWAKIVRDEF

[0061] EQFRKAVRNFLSEALSKINDYPITNDDKKLTSNDTKKFAAEVEKKLEAFKADVEE
[0062] AATQ
[0063] (SEQ ID NO :6) ;
[0064] > FFL_005
[0065] GSMSDIRKDLERFDKLVEALKNKVDKMKAAFRKQFHEERMKDWFKDLRKEV
[0066] EQMRRAVRNYASEALSKINDLPITNDDKKLASNDVLKLVAEVWKKLEAILADVE
[0067] AWFTQ (SEQ ID NO :7) ;
[0068] > FFL_006
[0069] GSFSDIRKDAEDRADKAFAEAAKNKFDKIKAAIRKDWPSSEERAKDLMKKARYEME
[0070] QARRAIRNIESEALSKINDLPITNDQKKLASNDIIEKEMARLFKKLEALMADIEILVT
[0071] Q (SEQ ID NO :8) ;和
[0072] > FFL_007
[0073] GSLSDIRKDAERRFDKLVEAVKNKLDKMKAAALRKEGQQEERMKDLMKFMRKEV
[0074] EQLRKAMRNFLSEALSKINDMPITNDDKKLISNDLKKYDAIAEKKLEAMKADVER
[0075] MATQGSW (SEQ ID NO :9) 。

[0076] 这些多肽中的每一种都在下面的实施例中证实是单体,具有高热稳定性,且对 Mota 具有极高的结合亲和力,这表明,所述多肽具有成功地稳定化的期望的表位构象,并且许多这样的多肽已经被证实诱导产生针对 RSV 的中和抗体。

[0077] 在另一个优选的实施方案中,所述多肽包含选自下述的序列或由所述序列组成: SEQ ID NO :4 (FFL_001)、SEQ ID NO :5 (FFL_002)、SEQ ID NO :7 (FFL_005)、SEQ ID NO :8 (FFL_006) 和 SEQ ID NO :9 (FFL_007)。在一个更优选的实施方案中,所述多肽包含选自下述的序列或由所述序列组成:SEQ ID NO :4 (FFL_001)、SEQ ID NO :5 (FFL_002)、SEQ ID NO :7 (FFL_005) 和 SEQ ID NO :9 (FFL_007)。在一个更优选的实施方案中,所述多肽包含选自下述的序列或由所述序列组成:SEQ ID NO :4 (FFL_001)、SEQ ID NO :7 (FFL_005) 和 SEQ ID NO :9 (FFL_007)。

[0078] 在另一个实施方案中,所述多肽包括列出的序列的任何表面重塑形式 (resurfaced version),述及表面重塑为如在 Correia 等人 J. Mol Biol 2011 中所述,或表面重塑概念的任何相关应用。

[0079] 在另一个实施方案中,所述多肽包括通过添加一个或多个二硫键得到的列出的序列的任何变体。

[0080] 如本文公开的,发明人已经开发了一种计算方法来设计蛋白支架,所述蛋白支架用于表位构象稳定和呈递给免疫系统。将该方法应用于 Mota 表位来设计本发明的多肽,所述多肽被证实是单体,具有高热稳定性,且对 Mota 具有极高的结合亲和力。

[0081] 贯穿本申请使用的术语“多肽”以它的最广含义用于表示亚基氨基酸的序列。本发明的多肽可以包含 L-氨基酸、D-氨基酸 (其在体内耐受 L-氨基酸-特异性的蛋白酶) 或 D-和 L-氨基酸的组合。可以化学合成或重组表达本文所述的多肽。所述多肽可以含有用于任何所需用途的任何合适的接头等,诸如用于便利多肽纯化的肽标签,或用于增强期望的免疫应答的 T-辅助表位。例如,下面讨论的示例多肽中的 2 种包括 C-端“GSW”以便利确定蛋白浓度,因为那些多肽不包括任何其它“W”残基。

[0082] 所述多肽可以连接至其它化合物,以促进体内半衰期增加,诸如通过聚乙二醇化、羟乙基淀粉化 (HESylation)、PAS 化 (PASylation)、糖基化,或可以生产为 Fc- 融合体或去免疫化的变体。如本领域技术人员所理解的,这样的连接可以是共价或非共价的。

[0083] 在另一个实施方案中,本发明的任意实施方案的多肽可以另外包含标签,诸如可检测的部分或治疗剂。所述标签可以通过共价键合连接至多肽,所述共价键合包括、但不限于,二硫键合、氢键合、静电键合、重组融合和构象键合。可替换地,所述标签可以借助于一种或多种连接化合物连接至多肽。用于使标签与多肽缀合的技术是技术人员众所周知的。可以使用包含可检测标签的多肽,例如,作为探针来分离对在所述多肽中存在的表位特异性的 B 细胞。但是,它们也可以用于其它检测和 / 或分析目的。可以使用任何合适的检测标签,包括、但不限于酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性材料、发射正电子的金属和非放射性的顺磁金属离子。使用的标签将取决于使用的具体检测 / 分析技术和 / 或方法,诸如流式细胞计数检测、扫描激光细胞计数检测、荧光免疫测定法、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、放射免疫测定法 (RIA)、生物测定法 (例如,中和测定)、蛋白质印迹法应用等。当本发明的多肽用于流式细胞计数检测、扫描激光细胞计数检测或荧光免疫测定法时,所述标签可以包含例如荧光团。多种可用于荧光地标记本发明的多肽的荧光团是技术人员已知的。当所述多肽用于体内诊断应用时,所述标签可以包含,例如,磁共振成像 (MRI) 造影剂,诸如二 -1,2- 亚乙基三胺五乙酸钆,连接至超声造影剂或连接至 X- 射线造影剂,或通过放射性同位素标记。

[0084] 本发明的多肽还可以包含标签,诸如接头 (包括、但不限于氨基酸接头诸如半胱氨酸或赖氨酸),其用于结合至颗粒,诸如病毒样颗粒。作为另一个实例,本发明的多肽可以有用地连接至用于 ELISA 的微孔滴定板的表面。本发明的多肽可以与标志物序列融合以便利纯化,如在下面的实施例中所述。例子包括但不限于六组氨酸标签、myc 标签或 flag 标签。

[0085] 在另一个实施方案中,多个多肽可以与树枝状聚合物形成复合物。树枝状聚合物是三维的、高度有序的寡聚的和 / 或聚合的化合物,其通常通过添加寡聚体和 / 或聚合物和提供外表面的反复反应序列形成在核心分子或指定的引发剂上。合适的树枝状聚合物包括,但不限于“星暴 (starburst)”树枝状聚合物和各种树枝状聚合物聚阳离子。制备和使用树枝状聚合物的方法是本领域技术人员众所周知的。

[0086] 在另一个实施方案中,所述多肽可以经由它们的 N- 端、C- 端、或 N- 端和 C- 端二者与寡聚化结构域融合 (通过重组或化学方式)。可以使用任何合适的寡聚化结构域。在一个非限制性实施方案中,所述多肽与形成三聚体的 GCN4 变体融合 (因此可以展示融合的多肽的三聚体或六聚体)。在另一个非限制性的实施方案中,所述多肽与形成三聚体的 fibritin foldon 结构域融合。在其它非限制性的实施方案中,所述寡聚化结构域可以是装配进颗粒中的任何蛋白,所述颗粒包括、但不限于由 (非病毒) 2,4- 二氧四氢蝶啶合酶蛋白制成的颗粒和由 (非病毒) 铁蛋白或铁蛋白 - 样蛋白制成的颗粒。

[0087] 在另一个实施方案中,所述多肽可以化学缀合至脂质体。在一个非限制性实施方案中,所述脂质体含有聚乙二醇化的脂质部分,其中 PEG 基团被官能化成携带反应基团,且所述多肽化学连接至在 PEG 上的反应基团。在另一个非限制性的实施方案中,在脂质体内 (在脂质层内或在内部) 包括额外的免疫刺激化合物。在另一个非限制性的实施方案中,在

脂质体表面上包括特异性的细胞靶向分子,包括、但不限于结合在树突细胞表面上的蛋白的分子。

[0088] 在另一个实施方案中,多个(即:2个或更多个;优选至少5个、10个、15个、20个、25个、50个、75个、90个或更多个拷贝)多肽可以存在于病毒样颗粒(VLP)中,以进一步增强所述多肽向免疫系统的呈递。本文使用的“病毒样颗粒”表示这样的结构:其在至少一种属性上类似于病毒,但是其尚未被证实是传染性的。根据本发明的病毒样颗粒不携带编码病毒样颗粒蛋白的遗传信息。一般而言,病毒样颗粒缺少病毒基因组,且因此是非传染性的。另外,病毒样颗粒经常可以通过异源表达来大量生产,且可以容易地纯化。在一个优选的实施方案中,所述VLP包含可能发生自发性自我装配的病毒蛋白,包括、但不限于腺伴随病毒、轮状病毒的重组蛋白、诺瓦克病毒的重组蛋白、甲病毒属的重组蛋白、口蹄疫病毒的重组蛋白、逆转录病毒的重组蛋白、乙型肝炎病毒的重组蛋白、烟草花叶病毒的重组蛋白、兽棚病毒(flock house virus)的重组蛋白、和人乳头状瘤病毒的重组蛋白、和Q β 噬菌体颗粒。在一个优选实施方案中,所述病毒蛋白包含乙型肝炎核心抗原颗粒。在另一个实施方案中,所述VLP得自脂质包膜病毒,且包括脂质以及任何合适的病毒蛋白,包括、但不限于得自基孔肯雅病毒的蛋白或乙型肝炎表面抗原蛋白。关于得自几种病毒的VLP,已经描述了用于生产和表征重组生产的VLP的方法,综述参见US20110236408;也参见US 7, 229, 624。如在下面的实施例中所说,在VLP的背景下,免疫接种大约75个拷贝的缀合在乙型肝炎(HepB)核心抗原颗粒上的FFL_001多肽(SEQ ID NO:4),导致对所述多肽的免疫应答的增加。

[0089] 本发明的VLP可以用作疫苗或抗原制剂,用于治疗或限制本文讨论的RSV感染。在某些实施方案中,所述VLP可以另外包含其它支架,所述支架呈递得自RSV或RSVG蛋白的其它表位。在其它实施方案中,所述VLP可以另外包含这样的支架:其呈递得自其它RSV蛋白的表位,诸如M、N、G和/或SH。

[0090] 在另一个实施方案中,所述多肽可以存在于非天然的核心颗粒(诸如合成的聚合物、脂质胶束或金属)上。这样的核心颗粒可以用于组织多个本发明的多肽来递送给受试者,从而导致增强的免疫应答。作为例子,在美国专利号5,770,380中描述了合成的聚合物或金属核心颗粒,该专利公开了杯芳烃有机支架(多个肽环与其相连)在“抗体模仿物”的制备中的应用,美国专利号5,334,394描述了用作病毒诱饵的纳米晶颗粒,其由多种无机材料组成,包括金属或陶瓷制品。在该实施方案中优选的金属包括铬、铷、铁、锌、硒、镍、金、银、铂。在该实施方案中优选的陶瓷材料包括二氧化硅、二氧化钛、氧化铝、氧化钨和氧化锡。该实施方案的核心颗粒可以由包括碳(金刚石)在内的有机材料制成。优选的聚合物包括聚苯乙烯、尼龙和硝酸纤维素。就这类纳米晶颗粒而言,由氧化锡、二氧化钛或碳(金刚石)制成的颗粒是特别优选的。通过本领域已知的任何方式,可以制备脂质胶束。参见US 7, 229, 624和其中公开的参考文献。

[0091] 在第二方面,本发明提供了分离的核酸,其编码本发明的多肽。分离的核酸序列可以包含RNA或DNA。本文使用的“分离的核酸”是已从基因组中或cDNA序列中它们的正常周围核酸中取出的那些核酸。这样的分离的核酸序列可能包含可用于促进所编码蛋白的表达和/或纯化的额外序列,包括但不限于聚腺苷酸序列、经修饰的Kozak序列、以及编码附加表位、输出信号和分泌信号、核定位信号和质膜定位信号的序列。本领域技术人员基于本

文的教导显而易见何种核酸序列将编码本发明的多肽。

[0092] 在第三方面,本发明提供了重组表达载体,其包含与合适的控制序列可操作地连接的本发明任一方面的分离的核酸。“重组表达载体”包括将核酸编码区或基因与能实现基因产物表达的任意控制序列可操作地连接的载体。与本发明的核酸序列可操作地连接的“控制序列”是能够实现核酸分子的表达的核酸序列。所述控制序列不需要与所述核酸序列邻接,只要它们起指导所述核酸序列的表达的功能即可。因而,例如,插入的不翻译的、但是仍然转录的序列可以存在于启动子序列和核酸序列之间,所述启动子序列仍然可以视作与编码序列“可操作地连接”。其它这样的控制序列包括,但不限于:多腺苷酸化信号、终止信号和核糖体结合位点。这样的表达载体可以属于本领域已知的任意类型,包括但不限于质粒和基于病毒的表达载体。用于驱动公开的核酸序列在哺乳动物系统中表达的控制序列可能是组成型的(由多种启动子中的任一种驱动,包括、但不限于,CMV、SV40、RSV、肌动蛋白、EF)或可诱导的(由许多诱导型启动子中的任一种驱动,包括、但不限于,四环素、蜕皮激素、类固醇反应性的)。用于转染原核细胞的表达载体的构建也是本领域众所周知的,并因此可通过标准技术来完成(参见,例如,Sambrook,Fritsch,和Maniatis,见:Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989;Gene Transfer and Expression Protocols,第109-128页,E. J. Murray 编, The Humana Press Inc., Clifton, N. J.), 和 Ambion 1998 年目录(Ambion, Austin, TX)。表达载体必须是在宿主生物体内可复制的:或者作为附加体,或者通过整合入宿主染色体DNA中。在一个优选的实施方案中,表达载体包含质粒。但是,本发明意图包括发挥同等功能的其它表达载体,诸如病毒载体。

[0093] 在第四方面,本发明提供了已被本文所公开的重组表达载体转染的宿主细胞,其中所述宿主细胞可以是原核的或真核的。所述细胞可以被瞬时或稳定转染。如此将表达载体转染入原核和真核细胞,可通过本领域已知的任何技术完成,包括但不限于标准的细菌转化、磷酸钙共沉淀、电穿孔、或者脂质体介导的、DEAE 葡聚糖介导的、聚阳离子介导的、或病毒介导的转染(参见,例如,Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, 等人, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 第2版(R. I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY)。生产根据本发明的多肽的方法是本发明的另一部分。所述方法包括下述步骤:(a) 在有助于表达所述多肽的条件下,培养根据本发明的该方面的宿主,和(b) 任选地,回收表达的多肽。表达的多肽可以从无细胞提取物中回收,但是优选地,它们从培养基中回收。从无细胞提取物或培养基中回收多肽的方法是本领域技术人员众所周知的。

[0094] 在第五方面,本发明提供了药物组合物(诸如疫苗),其包含一种或多种本发明的多肽、VLP、核酸、重组表达载体、或宿主细胞和药学上可接受的载体。本发明的药物组合物可以用于,例如,下述的本发明的方法中。所述药物组合物除了包含本发明的多肽以外,还可以包含:(a) 冷冻保护剂;(b) 表面活性剂;(c) 填充剂;(d) 张度调节剂;(e) 稳定剂;(f) 防腐剂和/或(g) 缓冲剂。

[0095] 在某些实施方案中,所述药物组合物中的缓冲剂是 Tris 缓冲剂、组氨酸缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂或乙酸盐缓冲剂。所述药物组合物还可以包括冷冻保护剂,例如蔗糖、山梨醇或海藻糖。在某些实施方案中,所述药物组合物包括防腐剂例如苯扎氯

铵、苄索氯铵、氯己定、苯酚、间甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、三氯叔丁醇、邻甲酚、对甲酚、氯甲酚、硝酸苯汞、硫柳汞、苯甲酸和它们的各种混合物。在其它实施方案中,所述药物组合物包括填充剂,如甘氨酸。在其它实施方案中,所述药物组合物包括表面活性剂,例如,聚山梨酯-20、聚山梨酯-40、聚山梨酯-60、聚山梨酯-65、聚山梨酯-80、聚山梨酯-85、泊洛沙姆-188、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、脱水山梨糖醇单棕榈酸酯、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、脱水山梨糖醇单油酸酯、脱水山梨糖醇三月桂酸酯、脱水山梨糖醇三硬脂酸酯、脱水山梨糖醇三油酸酯或它们的组合。所述药物组合物还可以包括张度调节剂,例如,使制剂与人血液基本上等张或等渗的化合物。示例性的张度调节剂包括蔗糖、山梨醇、甘氨酸、甲硫氨酸、甘露醇、葡萄糖、肌醇、氯化钠、精氨酸和盐酸精氨酸。在其它实施方案中,所述药物组合物另外包括稳定剂,例如,这样的分子:当与目标蛋白组合时,其基本上阻止或减少处于低压冻干或液体形式的目标蛋白的化学和/或物理不稳定性。示例性的稳定剂包括蔗糖、山梨醇、甘氨酸、肌醇、氯化钠、甲硫氨酸、精氨酸和盐酸精氨酸。

[0096] 所述多肽可以是药物组合物中的唯一活性剂,或者所述组合物可以另外包含一种或多种适用于预期用途的其它试剂,包括、但不限于佐剂,以刺激一般的免疫系统和改善总免疫应答。可以使用任何合适的佐剂。术语“佐剂”表示,增强对抗原的免疫应答的化合物或混合物。示例性的佐剂包括,但不限于:Adju-Phos、Adjumer™、清蛋白-肝素微粒、藻类葡聚糖 (Algal Glucan)、Algammulin、明矾 (Alum)、抗原制剂 (Antigen Formulation)、AS-2 佐剂、自体树突细胞、自体 PBMC、Avridine™、B7-2、BAK、BAYR1005、布比卡因 (Bupivacaine)、盐酸布比卡因 (Bupivacaine-HCl)、BWZL、骨化三醇、磷酸钙凝胶、CCR5 肽、CFA、霍乱全毒素 (CT) 和霍乱毒素 B 亚基 (CTB)、霍乱毒素 A1-亚基-蛋白 AD-片段融合蛋白、CpG、CRL1005、含有细胞因子的脂质体、D-Murapalmitine、DDA、DHEA、白喉类毒素、DL-PGL、DMPC、DMPG、DOC/明矾复合物、鸡痘、弗氏完全佐剂、 γ 菊糖、Gerbu 佐剂、GM-CSF、GMDP、hGM-CSF、hIL-12 (N222L)、hTNF- α 、IFA、在 pcDNA3 中的 IFN- γ 、IL-12DNA、IL-12 质粒、IL-12/GMCSF 质粒 (Sykes)、在 pcDNA3 中的 IL-2、IL-2/Ig 质粒、IL-2/Ig 蛋白、IL-4、在 pcDNA3 中的 IL-4、咪喹莫德 (Imiquimod)、ImmTher™、含有针对共刺激分子的抗体的免疫脂质体、干扰素- γ 、白介素-1 β 、白介素-12、白介素-2、白介素-7、ISCOM(s)™、Iscoprep 7.0.3™、钥孔蠍血蓝蛋白、基于脂质的佐剂、脂质体、洛索立宾 (Loxoribine)、LT (R192G)、LT-OA 或 LT 口服佐剂、LT-R192G、LTK63、LTK72、MF59、MONTANIDE ISA 51、MONTANIDE ISA 720、MPL. TM.、MPL-SE、MTP-PE、MTP-PE 脂质体、Murametide、Murapalmitine、NAGO、nCT 天然霍乱毒素、非离子型表面活性剂囊泡、霍乱毒素 mCT-E112K 的无毒突变体 E112K、对羟基苯甲酸甲酯、pCIL-10、pCIL12、pCMVmCAT1、pCMVN、Peptomer-NP、Pleuram、PLG、PLGA、PGA 和 PLA、Pluronic L121、PMMA、PODDS™、聚 rA: 聚 rU、聚山梨酯 80、螺旋蛋白 (Protein Cochleates)、QS-21、Quadri A 皂苷、Quil-A、Rehydragel HPA、Rehydragel LV、RIBI、Ribilike 佐剂系统 (MPL, TMD, CWS)、S-28463、SAF-1、Sclavo 肽、Sendai 脂蛋白体、含有 Sendai 的脂质基质、Span 85、Specol、角鲨烷 1、角鲨烯 2、硬脂酰酪氨酸、破伤风类毒素 (TT)、Theramide™、苏氨酸基胞壁酰二肽 (TMDP)、Ty 颗粒和 Walter Reed 脂质体。佐剂的选择取决于要接种疫苗的受试者。优选地,使用药学上可接受的佐剂。

[0097] 包含多肽的组合物可以以任何标准形式保存,包括,例如,水溶液或低压冻干的饼。当施用给细胞或受试者时,这样的组合物通常是无菌的。通过穿过无菌过滤膜进行过

滤,可以容易地实现水溶液的灭菌。如果以低压冻干形式保存组合物,可以在低压冻干和重构之前或之后过滤组合物。

[0098] 在第六方面,本发明提供了用于治疗 and / 或限制 RSV 感染的方法,所述方法包括:给有此需要的受试者施用治疗有效量的一种或多种本发明的多肽、其盐、其缀合物、其 VLP 或其药物组合物,以治疗和 / 或限制 RSV 感染。在另一个实施方案中,所述方法包括:在具有 RSV 感染或处于 RSV 感染风险的个体中诱导产生免疫应答,所述方法包括:给有此需要的受试者施用治疗有效量的一种或多种本发明的多肽、其盐、其缀合物、其 VLP 或其药物组合物,以产生免疫应答。

[0099] “呼吸道合胞病毒”和“RSV”表示副粘病毒科中的一种负义单链 RNA 病毒,其造成呼吸系统疾病,特别是在儿童中。

[0100] 当所述方法包括治疗 RSV 感染时,将一种或多种多肽、VLP 或组合物施用给受试者,所述受试者已经被 RSV 感染,和 / 或其遭受指示所述受试者可能已经被 RSV 感染的症状(包括、但不限于下呼吸道感染、上呼吸道感染、细支气管炎、肺炎、发热、倦怠、食欲减少、复发性哮喘和哮喘)。本文使用的“治疗”是指实现下述的一项或多项:(a) 减少受试者中的 RSV 滴度;(b) 限制受试者中的 RSV 滴度的任何增加;(c) 减轻 RSV 症状的严重程度;(d) 限制或阻止感染后 RSV 症状的发展;(e) 抑制 RSV 症状的恶化;(f) 限制或阻止 RSV 症状在以前具有 RSV 感染征候的受试者中的复发。在一个实施方案中,使用方法、多肽、VLP 或组合物作为“治疗性疫苗”来改善现有感染和 / 或提供针对其它 RSV 病毒感染的预防。

[0101] 当所述方法包括限制 RSV 感染时,将一种或多种多肽、VLP 或组合物预防性地施用给未知被感染、但是可能处于 RSV 暴露风险的受试者。本文使用的“限制”是指,限制处于 RSV 感染风险的受试者的 RSV 感染。处于特别高风险的群体包括 18 岁以下的儿童(特别是 3 岁或以下的婴儿)、超过 65 岁的成年人、和遭受任何类型的免疫缺陷的个体。在该方法中,将多肽、VLP 或组合物用作疫苗。

[0102] 本文使用的“治疗有效量”表示,有效治疗和 / 或限制 RSV 感染的多肽的量。所述多肽通常配制为药物组合物,诸如上面公开的那些,且可以以含有常规药学上可接受的载体、佐剂和媒介物的剂量单位制剂的形式经由任何合适的途径来施用,所述途径包括口服、肠胃外、通过吸入喷雾、直肠地或局部地。本文使用的术语“肠胃外”包括皮下的、静脉内的、动脉内的、肌肉内的、胸骨内的、腱内的、椎管内的、颅内的、胸腔内的、输注技术或腹膜内地。多肽组合物也可以经由微球、脂质体、免疫刺激复合物 (ISCOM) 或其它微粒递送系统或引入适当组织(诸如血液)中的持续释放制剂来施用。可以调节剂量方案,以提供最适的所需应答(例如,治疗性或预防性应答)。合适的剂量范围可以是,例如,0.1ug/kg-100mg/kg 体重;可替换地,它可以是 0.5ug/kg 至 50mg/kg、1ug/kg 至 25mg/kg、或 5ug/kg 至 10mg/kg 体重。所述多肽可以在单次推注中递送,或者可以施用超过 1 次(例如,2 次、3 次、4 次、5 次或更多次),这由主治医师确定。

[0103] 在某些实施方案中,本发明的多肽中和 RSV 侵染性,如在下面的实施例中所证实的。在不同的实施方案中,与在没有所述多肽存在下 RSV 对宿主细胞的感染相比,本发明的多肽使 RSV 对宿主细胞的感染减少至少 99%、至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60%、至少 50%、至少 45%、至少 40%、至少 35%、至少 30%、至少 25%、至少 20% 或至少 10%。使用本领域的标准技术,可以测量中和。

[0104] 在另一个方面,本发明提供了药物组合物,其包含

[0105] (a) 本发明的分离的核酸、重组表达载体和 / 或重组宿主细胞 ;和

[0106] (b) 药学上可接受的载体。在该方面,本发明的核酸、表达载体和宿主细胞可以用作基于多核苷酸的免疫原性组合物,以在受试者体内表达编码的多肽,由此诱导产生针对编码的多肽的免疫应答。可利用多种方法将多核苷酸施用进动物中。适合用于将特定多核苷酸引入动物中的方法的选择,是在本领域的技能水平内。通过本领域已知的其它方法,也可以将本发明的多核苷酸引入受试者中,所述方法例如转染、电穿孔、显微注射、转导、细胞融合、DEAE 葡聚糖、磷酸钙沉淀、脂转染 (溶酶体融合) 或 DNA 载体转运蛋白 (参见,例如, Wu 等人 . (1992) J. Biol. Chem. 267 :963-967) 。

[0107] 通过给受试者接种本发明的免疫原性组合物一次或多次,可以产生针对本发明的多肽、VLP 或组合物的免疫应答。第一次接种被称作“初次接种”,随后的免疫接种被称作“增强接种”。增强接种通常增强免疫应答,并且包括至少 1 次增强接种的免疫接种方案是优选的。本发明的任何多肽、VLP 或组合物可以用于初次或增强免疫接种。可以如下确定选择的疫苗接种参数 (例如,制剂、剂量、方案等) 的适当性 : 在免疫接种计划过程中,从受试者获取血清的等分试样,并测定抗体滴度。可替换地,可以通过常规方法监测 T 细胞群。另外,可以针对期望的效应来监测受试者的临床状况,所述效应例如限制 RSV 感染、疾病状况的改善 (例如,病毒载量的减少) 等。如果这样的检测指示疫苗接种是亚最佳的,可以用额外剂量的组合物增强受试者,并且可以以预期增强免疫应答的方式修改疫苗接种参数。因而,例如,可以增加多肽、VLP 或组合物和 / 或佐剂的剂量,或者可以改变给药途径。

[0108] 在另一个方面,本发明提供了用于监测受试者中 RSV 诱发的疾病和 / 或监测受试者对 RSV 疫苗的免疫接种的应答的方法,所述方法包括 : 使本发明的多肽、VLP 或药物组合物与得自所述受试者的体液接触,和检测所述受试者的体液中的 RSV 结合抗体。“RSV 诱发的疾病”是指由 RSV 直接地或间接地造成的任何疾病。所述方法包括 : 使本发明的多肽、VLP 或组合物与一定量的得自受试者的体液 (诸如血清、全血等) 接触 ; 和检测所述受试者的体液中的 RSV 结合抗体。所述 RSV 结合抗体的检测允许监测受试者中的 RSV 疾病。另外,RSV 结合抗体的检测也允许监测受试者对 RSV 疫苗的免疫接种的应答。在其它方法中,测定 RSV 结合抗体的效价。可以使用任何合适的检测测定,包括、但不限于同质和异质结合免疫测定法,诸如放射免疫测定法 (RIA)、ELISA、免疫荧光、免疫组织化学、FACS、BIACORE 和蛋白质印迹分析。所述方法可以在溶液中进行,或者本发明的多肽可以结合或连接至载体或基质,例如,微孔滴定板 (例如 : 用于 ELISA)、膜和珠子等载体或可以由玻璃、塑料 (例如,聚苯乙烯)、多糖、尼龙、硝酸纤维素或特氟隆等制成的基质。这样的载体的表面可以是实体或多孔的,且具有任何方便的形状。用于该方面的本发明的多肽可以包含上面公开的缀合物,以提供标签,所述标签可用于适合给定的测定的任何检测技术。

[0109] 在另一个方面,本发明提供了用于检测 RSV 结合抗体的方法,所述方法包括

[0110] (a) 在适合 RSV 抗体与多肽、VLP 或组合物结合的条件下,使本发明的多肽、VLP 或组合物与组合物接触,所述组合物包含候选 RSV 结合抗体 ; 和

[0111] (b) 检测 RSV 抗体与所述多肽、VLP 或组合物的复合物。在该方面,执行所述方法,以确定候选 RSV 结合抗体是否识别存在于本发明的多肽中的 RSV F 表位。可以使用任何合适的组合物,包括、但不限于得自合适的受试者 (诸如已经被 RSV 感染的受试者) 的体液样

品（诸如血清、全血等）、首次用于实验的（naive）文库、修改文库和从表现出 RSV- 特异性的免疫应答的人供体直接制备的文库。在适合促进针对所述多肽的抗体的结合的条件下，进行所述测定；这样的条件可以由本领域技术人员基于本文的教导来确定。可以使用任何合适的检测测定，包括、但不限于同质和异质结合免疫测定法，诸如放射免疫测定法（RIA）、ELISA、免疫荧光、免疫组织化学、FACS、BIACORE 和蛋白质印迹分析。所述方法可以在溶液中进行，或者本发明的多肽可以结合或连接至载体或基质，例如，微孔滴定板（例如：用于 ELISA）、膜和珠子等载体或可以由玻璃、塑料（例如，聚苯乙烯）、多糖、尼龙、硝酸纤维素或特氟隆等制成的基质。这样的载体的表面可以是实体或多孔的，且具有任何方便的形状。用于该方面的本发明的多肽可以包含上面公开的缀合物，以提供标签，所述标签可用于适合给定的测定的任何检测技术。在另一个实施方案中，使用标准规程来分离 RSV F 结合抗体。在一个实施方案中，所述方法可以包括：使用本领域的标准技术（参见，例如，Science DOI:10.1126/science.1187659），通过荧光激活细胞分选（FACS）来分离多肽特异性的记忆 B 细胞。

[0112] 在另一个方面，本发明提供了用于生产 RSV 抗体的方法，所述方法包括

[0113] (a) 给受试者施用有效产生抗体应答的量的本发明的多肽、VLP 和 / 或组合物；和

[0114] (b) 分离由所述受试者产生的抗体。

[0115] 本发明的多肽也可以用于制备识别本发明的多肽的抗体。所述方法包括：给受试者施用本发明的多肽、VLP 或组合物。这样的抗体可以用于例如 RSV 研究中。在该实施方案中采用的受试者是通常用于抗体生产的受试者，包括、但不限于哺乳动物，例如，啮齿类动物、兔、山羊、绵羊等。产生的抗体可以是多克隆或单克隆抗体。通过将抗原多肽注射（例如皮下或肌肉内注射）进合适的动物（例如，小鼠或兔）中，产生多克隆抗体。然后从取自所述动物的血液样品得到抗体。用于生产多克隆抗体的技术在文献中有广泛描述。可以进一步纯化由受试者生产的多克隆抗体，例如，通过结合至基质和从基质洗脱，所述基质结合有所述抗体所针对的多肽。本领域技术人员将知晓多种用于纯化和 / 或浓缩多克隆抗体以及单克隆抗体的标准技术。还可以使用本领域已知的技术来制备单克隆抗体。

[0116] 在第七方面，本发明提供了用于设计多肽支架的计算方法。这样的方法可以包括：

[0117] (a) 定义要用作折叠核的多肽结构基序；

[0118] (b) 定义 (i) 与所述多肽结构基序相容的多肽支架的靶标三维拓扑结构，和 (ii) 要用所述多肽结构基序替换的靶标三维拓扑结构的区域；

[0119] (c) 从所述多肽结构基序的原子坐标末端生长延长的多肽链；

[0120] (d) 折叠所述延长的多肽链，同时保持所述多肽结构基序的主链双面角固定；和

[0121] (e) 将满足用户定义的相对于靶标三维拓扑结构的多肽主链均方根差（rmsd）阈值的折叠多肽链鉴定为目标多肽支架。

[0122] 公开的计算方法可以由任何合适的计算装置来实现，包括、但不限于例如服务器计算机、个人计算机和 / 或移动计算机。

[0123] 通过公开的计算方法设计的多肽支架可以用于，例如，促进表位构象稳定化和呈递给免疫系统。所述方法学（在本文中被称作从环折叠（Fold From Loops, FFL））的起点是，负责将功能赋予蛋白的结构基序和在功能基序周围的要折叠的靶标拓扑结构（图 1）。

FFL 方案的实际进步是双重的：(1) 计算机环境 (in silico) 折叠阶段将允许优化整个支架结构和序列以稳定功能基序的精确构象；和 (2) 就靶标拓扑结构而言，该策略能够利用天然存在的折叠或在自然界中尚未观察到的折叠。所述方法可以应用于折叠，并设计在 RSV 广泛中和表位周围的三螺旋束拓扑结构，如在下面更详细地讨论的。

[0124] 所述多肽结构基序可以是任何功能性多肽区段或结构域，包括、但不限于蛋白结合位点、酶活性部位、小分子结合位点、DNA 或 RNA 结合位点等。类似地，所述结构基序可以是用作折叠核的连续结构基序（单个氨基酸区段），或可以包含多个（即，2 个或更多个）要以特定三维几何形状显示的不连续区段。

[0125] 定义要用作折叠核的多肽结构基序的特征可以呈多种形式。在一个实例中，计算机装置可以基于下述数据来定义所述多肽结构基序：用户的数据输入、从局部和 / 或远程数据存储器恢复的数据、和 / 或从其它计算装置接收的数据。其它实例也是可能的。

[0126] 定义与所述多肽结构基序相容的多肽支架的靶标三维拓扑结构和要用所述多肽结构基序替换的靶标三维拓扑结构的区域的特征也可以呈多种形式。在一个实例中，计算机装置可以基于下述数据来定义靶标三维拓扑结构和要替换的区域：用户的数据输入、从局部和 / 或远程数据存储器恢复的数据、和 / 或从其它计算装置接收的数据。作为靶标三维拓扑结构基础的数据又可以呈多种形式。例如，该数据可以指示用于预期用途的任何合适的特征，包括、但不限于 (i) 以原子坐标的方式与结构基序的预先存在的三维相似性，(ii) 以二级结构的方式与结构基序的预先存在的相似性，和 / 或 (iii) 基序末端之间的距离与拓扑结构中意图用类似距离隔开的残基之间的距离的对比。其它实例也是可能的。

[0127] 在定义靶标三维拓扑结构中，计算装置也可以考虑不同的约束 (constraint)。例如，计算装置可以考虑得自蛋白或已知结构的模型的结构片段，其包括主链双面角信息，且根据序列和 / 或二级结构相似性选择成与靶标拓扑结构相一致。具体地，计算装置可以将在这些片段中包括的双面角集合随机地应用于多肽链。作为另一个实例，计算装置可以使用从低或高分辨率三维结构收集到的距离限制来引导 FFL 折叠阶段，其中积极地处罚这样的多肽构象，特定残基对在所述构象上的距离不在靶标拓扑结构的对应距离 $\pm$ 用户定义的标准差内。其它实例也是可能的。

[0128] 要用所述多肽结构基序替换的靶标三维拓扑结构的确定区域可以呈不同的形式。在一个实施方案中，所述区域是连续的结构基序（单个氨基酸区段）。在另一个实施方案中，所述区域包含多个（即，2 个或更多个）不连续的区段。

[0129] 在一个实施方案中，所述方法另外包括：在生长延长的多肽链之前，从靶标三维拓扑结构确定一种或多种约束。这些约束可以呈不同的形式，包括、但不限于 C_{α} 距离约束、对涉及 C_{α} 或其它坐标的角或双面角的约束、基于二硫键或金属结合部位（认为其对稳定拓扑结构是重要的）的几何约束、对特定二级结构元件之间的相互作用的约束（例如，如果拓扑结构具有几个螺旋，关于哪个螺旋应当与哪个另外的螺旋配对的约束，或者如果在拓扑结构中存在 β 折叠，关于 β 折叠中的哪个 β 链应当与另外的 β 链配对的约束）、和 / 或关于哪个残基应当埋入和哪个残基应当暴露的约束（例如，通过在折叠过程中估测 C_{β} 领域的数目，或更精确地通过可接近的表面积）。在一个实施方案中，所述约束可以包含：从靶标三维拓扑结构确定 C_{α} 距离约束。在一个非限制性实例中，收集的序列分离大于 6 的残基的 C_{α} 原子之间的距离在要插入结合位点的范围之外。

[0130] 从所述多肽结构基序的原子坐标的末端生长延长的多肽链的特征可以进一步呈不同的形式。例如,计算装置可以使用所述多肽结构基序的主链坐标来充当“折叠核”,最初从其末端生长延长的链,随后折叠。在这方面,所述基序的确切主链原子坐标优选地在所述方法中是保守的。计算装置也可以使用靶标三维拓扑结构作为模板来提取 C_{α} 距离,其然后可以用作限制来引导折叠阶段。在一个非限制性实施方案中,计算装置可以从结合位点原子坐标的末端生长延长的多肽链,这可以产生形心结构,其中所述多肽结构基序含有它的原始主链双面角,但是所有剩余的残基是在延长的构象中。其它实例也是可能的。

[0131] 折叠所述延长的多肽链并同时保持所述多肽结构基序的主链双面角固定的特征也可以呈不同的形式。具体地,计算装置可以使用任何合适的折叠方案来实现该特征,包括、但不限于在 ROSETTATM 软件包 (Bradley P, Baker D. Proteins. 2006 Dec 1 ;65 (4) : 922-9 ;Simons KT, Kooperberg C, Huang E, Baker D. J Mol Biol. 1997 年 4 月 25 日 ; 268 (1) :209-25. ;Rohl CA, Strauss CE, Misura KM, Baker D. Methods Enzymol. 2004 ;383 : 66-93.) 中可得到的方案。例如,计算装置可以使用 ROSETTATM 从头开始 (abinitio) 方案,该方案依赖于片段插入来检索通过低分辨率能量函数评价的低能构象。任选地,计算装置可以使用基于距离限制的折叠方案。就 FFL 方案而言,根据序列相似性和二级结构预测来选择得自现有蛋白的结构片段。从靶标拓扑结构和输入结构基序获取在 FFL 中分配给低分辨率模型的序列。

[0132] 在折叠所述延长的多肽链时,计算装置保持结构基序的主链双面角固定以充当“折叠核”。尽管从靶标拓扑结构收集的 $C-\alpha$ 距离可以用于限制构象采样,可以松弛基于 C_{α} 距离的约束,例如,通过在 Gaussian 罚分函数中允许更大的标准差。

[0133] 由于所述方法可以与具有 2 个或更多个不连续区段的不连续结构基序一起使用,除了保持所述多肽结构基序内的主链双面角固定以外,所述方法可以另外包括:保持所述结构基序中的区段的空间排列固定。

[0134] 将满足用户定义的相对于靶标三维拓扑结构的多肽主链 rmsd 阈值的延长的多肽链鉴定为目标多肽支架的特征也可以呈不同的形式。例如,计算装置可以鉴定相对于靶标拓扑结构的主链 rmsd 小于用户定义的阈值的结构,可以将其选择用于随后的全原子设计阶段。在这方面,所述用户定义的阈值可以是例如 5 埃。其它实例也是可能的。

[0135] 在一个优选的实施方案中,所述方法另外包括:在结构基序内恢复原始侧链构象,和执行几个(至少 1 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个或更多个)迭代折叠设计循环。在该实施方案中,在迭代设计和全原子优化的整个轮次中,恢复结构基序的原始侧链构象的一部分或全部,并将其保持固定。可以允许在结构基序上的某些位置将残基变成其它氨基酸。例如,在一个实施方案中,如果原始侧链不直接促成功能(例如不直接接触结合配偶体诸如抗体或小分子或 DNA 或 RNA 等,且不催化化学反应),且如果在那些位置处的其它侧链可以直接接触折叠的支架的其它部分,并以此方式可以促进结构基序的构象稳定性和支架的热稳定性,则允许在结构基序上的位置将残基变成 20 种氨基酸中的任一种。在折叠步骤中产生的模型通常进行几轮与整个结构中的局部主链优化配对的序列设计。允许在结构基序之外的残基变成 20 种氨基酸中的任一种,尽管用户可能限制在某些位置处允许的氨基酸,这是蛋白设计领域的技术人员所常见的和熟知的。例如,如果设计的蛋白意图用于氧化环境诸如细胞外环境中,用户可以选择来不允许包括半胱氨酸残基。在一个实施

方案中, FFL 设计方法的用户可以决定应当建立多少全原子设计。例如, 合理的数目是 10000 ;但是, 更小或更大的设计数目可能是适当的。所述方法可以另外包括 :采用一种或多种评分过滤器 (诸如全原子评分、包装、埋入的不满足的极性的原子或其它过滤器), 和选择所需的 (例如, 基于指定的标准) 设计用于手工检查。用于检查的设计的数目可以由用户决定。例如, 用户可以检查 50 个设计 ;但是, 本领域普通技术人员会认识到, 用户检查的设计的数目可以小于或大于 50 个设计。

[0136] 在另一个实施方案中, 所述方法还可以包括 :根据一种或多种结构特征进一步过滤设计, 所述特征包括、但不一定限于 ROSETTA™ 能量、Ramachandran 评分、埋入的不满足的主链原子的数目和核心包装。在该实施方案中, 过滤设计的模型的最终集合 (通常是 10000), 并根据这些结构标准进行排序。

[0137] 在另一个实施方案中, 所述方法可以另外包括 :重新设计最初拓扑结构的表面残基 (不是靶标结合位点), 例如, 以消除疏水残基 (如果存在的话) 的簇。所述方法还可以另外包括重新设计在蛋白核心中的选定位置处的结构, 例如, 以突变过度表现的残基、改善包装和 / 或消除埋入的极性氨基酸。在一个实施方案中, 所述重新设计步骤可以继之以全原子优化步骤。在某些实施方案中, 所述方法可以包括基于能量、包装和目检的额外过滤步骤。所述方法可以另外包括 :使在结构基序之外的支架的表面上的一些或全部氨基酸维持与在靶标拓扑结构中相同, 这可能在多肽设计之间产生氨基酸位置的相似性。

[0138] 在另一个实施方案中, 所述方法可以另外包括存储数据, 所述数据代表例如确定的多肽结构基序、确定的靶标三维拓扑结构、确定的靶标三维拓扑结构区域、鉴定的延长的多肽链、一种或多种约束和 / 或本文讨论的其它特征中的任一种。另外, 所述方法可以包括显示数据, 所述数据代表例如确定的多肽结构基序、确定的靶标三维拓扑结构、确定的靶标三维拓扑结构区域和 / 或鉴定的折叠的多肽链。此外, 所述方法可以包括向其它计算装置发送数据, 所述数据代表例如确定的多肽结构基序、确定的靶标三维拓扑结构、确定的靶标三维拓扑结构区域和 / 或鉴定的折叠的多肽链。

[0139] 实现公开的方法的计算装置可以呈不同的形式。一个示例性的计算装置可以包括用户界面、通信接口、处理器和数据存储器, 它们都通过系统总线、网络或其它连接机构连接在一起。计算装置还可以包括其它部件。

[0140] 用户界面可以构造成便利用户与计算装置交互作用。这样, 用户界面可以包括或提供与便利用户交互作用的不同部件的连接性。例如, 用户界面可以包括或提供与输入部件的连接性, 所述输入部件例如键盘、鼠标、触摸屏和 / 或麦克风。作为另一个实例, 用户界面可以包括或提供与输出部件的连接性, 所述输出部件例如显示屏和 / 或扬声器。作为另一个实例, 用户界面可以包括信号处理部件, 诸如模拟 - 数字转换 (A-D) 和 / 或数字 - 模拟转换 (D-A) 电路。其它构造也是可能的。

[0141] 通信接口可以构造成便利与其它计算装置通信。为了便利该通信, 通信接口可以呈不同的形式。例如, 通信接口可以呈下述形式 :以太网接口、串行总线接口 (例如, 火线、USB 2.0 等)、芯片组、和所需方案适合便利无线通信的天线、和 / 或提供与其它计算装置的有线和 / 或无线通信的任何其它接口。通信接口还可以包括不同接口类型的某种组合。其它构型也是可能的。

[0142] 处理器可以包含一个或多个处理器部件, 诸如通用处理器 (例如, 微处理器)、专

用处理器（例如，ASIC 或 DSP）、可编程逻辑器件（例如，FPGA）或现在已知的或以后开发的其它处理器部件。数据存储器又可以包含一种或多种非瞬时性计算机可读的存储介质，诸如易失性数据存储介质（例如，RAM）寄存器和 / 或高速缓存）和 / 或非易失性数据存储介质（例如，ROM、硬盘驱动器、固态驱动器、闪存存储器、光存储设备和 / 或软盘）。某些存储介质可以与处理器整体地或部分地集成。此外，某些存储介质可以在计算装置的外部和 / 或可从计算装置除去，在该情况下，这样的存储介质可以以多种方式（例如，经由外部接口和 / 或通信接口）与计算装置接口。数据存储器可以含有：(i) 程序逻辑，和 (ii) 程序数据，其可以单独地或一起维持在数据存储器内。

[0143] 程序逻辑优选地包含机器语言指令，所述机器语言指令是处理器（诸如处理器）可执行的和 / 或可翻译的，以实现根据公开的方法设计多肽支架的功能。程序数据又可以含有这样的数据：其可以被处理器与设计多肽支架的公开方法结合使用，诸如代表例如确定的多肽结构基序、确定的靶标三维拓扑结构、确定的靶标三维拓扑结构区域、鉴定的折叠的多肽链、一种或多种约束和 / 或用户定义的阈值的数据。

[0144] 所述方法可以另外包括：重新设计最初拓扑结构的表面残基（不是靶标结合位点），例如，以消除疏水残基（如果存在的话）的簇。所述方法还可以另外包括重新设计在蛋白核心中的选定位置处的结构，例如，以突变过度表现的残基、改善包装和 / 或消除埋入的极性氨基酸。在一个实施方案中，所述重新设计步骤可以继之以全原子优化步骤。在某些实施方案中，所述方法可以包括基于能量、包装和目检的额外过滤步骤。

[0145] 在另一个方面，本发明提供了一种非瞬时性机器可读存储介质，其包含一组用于造成计算装置执行本发明的计算方法的指令。在该方面，本发明提供了一种机器可读的存储介质，其包含用于造成处理器执行设计多肽支架的自动化计算方法步骤的指令。本文使用的术语“计算机可读的存储介质”包括磁盘、光盘、有机存储器和 CPU 可读的任何其它易失性（例如，随机存取存储器（“RAM”））或非易失性（例如，只读存储器（“ROM”））大容量存储系统。计算机可读介质包括协作或互联计算机可读介质，其排它地存在于处理系统上，或分布在多个互联的处理系统中，后者可以在处理系统当地或远程。

[0146] 在本文中引用的所有参考文献通过引用并入。如果必要的话，可以修改公开内容的方面以采用上述参考文献和申请的系统、功能和概念，以提供公开内容的其它实施方案。考虑到详细描述，可以对公开内容做出这些和其它变化。

[0147] 公开内容的实施方案的描述无意成为穷尽性的或将公开内容限制为公开的精确形式。尽管为了例证目的在本文中描述了公开内容的具体实施方案和实施例，相关领域的技术人员会认识到，在公开内容的范围内，各种等效修改是可能的。

[0148] 任意前述实施方案的具体要素可以组合，或者替换在其它实施方案中的要素。此外，尽管已经在这些实施方案的背景下描述了与公开内容的某些实施方案有关的优点，其它的实施方案也可能表现出这样的优点，并且并非所有实施方案都一定需要表现出这样的优点才能落入公开内容的范围内。

[0149] 实施例 1

[0150] 从环折叠 (Fold From Loops)

[0151] 在 ROSETTA™软件包中执行 FFL 方案。FFL 方案需要结构基序和要折叠的靶标拓扑结构的 pdb 文件作为起始输入（图 1）。在这里，输入结构基序是 RSV 肽 - 表位，其已经以与

莫他珠单抗的 Fab 部分的复合物的形式结晶 (PDBId 3IXT)。基于下述标准,选择 3-螺旋束靶标拓扑结构:螺旋-转角-螺旋基序在螺旋束中的存在;用作模板靶标拓扑结构的蛋白的高热稳定性。FFL 方案可以分成 2 个主要阶段:I) 具有大构象采样的低分辨率阶段;II) 具有序列设计和受限制的构象采样的迭代的全原子阶段。

[0152] 低分辨率构象采样

[0153] 将延长的多肽链附加在输入基序的末端,使得残基的总数与模板拓扑结构的总数匹配。通过环文件定义拓扑结构的在其上面插入输入基序的残基;输入基序的位置决定了要附加的多肽链的长度。在该低分辨率阶段,多肽链的表示是粗糙的;仅主链的原子被明确地表示,侧链被表示为球。

[0154] 用 Rosetta™从头开始型方案,执行在该阶段进行的构象采样。所述从头开始方案依赖于从已知蛋白结构的大型集合提取的片段的插入。用程序 NNMAKE™收集使用的片段,其根据提供的序列和它的二级结构预测构建片段文库。就这里描述的设计工作而言,所述片段源自模板序列。

[0155] 任选地,为了使朝向类似结构的折叠轨迹偏向靶标拓扑结构,从靶标拓扑结构提取了 C α 限制 [Rohl 等人, Methods in Enzymology 383(2004)],并作为评分项引入总评分函数中。Rohl 等人以前已经描述了包含距离限制的 Rosetta™折叠方案。如果序列分离大于 6,和如果两个残基是在包括上游和下游 5 个残基的功能位点的范围之外,则收集残基之间的距离。就这里描述的设计而言,允许提取自模板蛋白的每个 C α -C α 距离的 3Å 标准差。

[0156] 一般而言,贯穿采样阶段,未触及输入基序的主链双面角;尽管如此,算法实现允许设置基序的末端作为可动的。在输入基序内允许这些自由度的原理是,有利于输入基序和剩余蛋白之间的光滑结构转变。

[0157] 全原子序列设计和结构优化

[0158] 在其中采用大构象空间的低分辨率阶段以后,根据它们相对于天然拓扑结构坐标的 RMSD,过滤产生的模型。在这里,使用 5Å 的 RMSD 阈值,使得在靶标拓扑结构的结构附近的模型将被保持至序列设计阶段,如果模型高于确定的阈值,它被自动地抛弃。从输入基序恢复原始侧链构象,并在全原子阶段中保持固定。

[0159] 通过默认,在序列设计阶段,在不包括输入功能基序的模型的每个残基中允许 19 种氨基酸(不包括半胱氨酸)。不要求半胱氨酸的排除。通常,半胱氨酸不用于免疫原设计,除非要设计二硫键,因为免疫原预期用于氧化性的细胞外环境,因此未配对的半胱氨酸在细胞外环境中将倾向于通过与其它半胱氨酸配对来形成二硫键。就与细胞内应用有关的蛋白设计而言,未配对的半胱氨酸是完全可接受的。也在该阶段,实现额外的选择,用于更精细地控制在特定残基位置中允许的氨基酸身份。在这里描述的 FFL 设计中,输入基序的某些位置不是抗体接触表面的一部分,并因此构成蛋白核心的一部分;在某些模拟中,允许非接触侧链变化。

[0160] 在每个序列设计步骤以后,进行全原子精制(松弛)步骤,从而确保局部构象空间被利用。松弛方案由几个循环组成:小主链扰动;侧链重新包装;和能量最小化。

[0161] 将迭代序列设计和结构最小化的循环重复 3 次。用户可以调节循环的数目。

[0162] 设计选择

[0163] 质量过滤器

[0164] 通常,每次 FFL 运行产生 10,000 个设计,施加的第一过滤器是基于 Rosetta™全原子能量,并进一步考虑通过 Rosetta 能量™选出的最好的 50 个设计。接着,施加复合过滤器来选择具有最好结构特征的设计。考虑的结构特征是:在 Rosetta™中实现的 Ramachandran 评分;未涉入氢键的埋藏的极性原子的计数;和根据 RosettaHoles™算法的核心包装评估。根据所述 3 个特征在前 25 名内的设计模型用于下一阶段。

[0165] 根据模型的几何性能,尤其是螺旋的弯曲角,选择一些设计。用软件 Helanal™,收集组成螺旋束的每个螺旋的弯曲角的统计数据。选择具有最低平均弯曲角的束用于下一阶段。

[0166] FFL 后设计

[0167] 众所周知,Rosetta™能量函数的鉴定出的长缺陷(culprit)不能准确地设计溶剂暴露的残基;可能的原因之一与适当的静电参数化的缺乏有关。为了防止该已知的缺陷,FFL 后设计的第一步是,强加在溶剂暴露的位置中的相同残基作为用作模板拓扑结构的蛋白的那些残基。

[0168] 接着,采用手工设计和全原子精制步骤来校正核心包装缺陷和从所述核心除去极性的氨基酸。进行手工设计,以:校正极性残基(尤其是组氨酸)在设计的核心中的出现;和从与模板拓扑结构相比具有过表达的丙氨酸和低表达的缬氨酸的自动化阶段直接设计。丙氨酸的高频率可能与能量项有关,后者代表在给定的主链双面角下发现某种氨基酸的可能性(Ramachandran 项),鉴于大多数螺旋的 FFL 蛋白,Ramachandran 项将有利于丙氨酸的存在且不利于缬氨酸或具有 β 支链侧链的氨基酸;另一种潜在影响因素是螺旋的近端排列,其在某些位置可能不允许配合比丙氨酸更大的氨基酸。

[0169] 鉴于迭代设计操作的性质,产生的模型对核心中的突变是非常无法忍受的。结果,在手工设计阶段,突变会引入空间碰撞,并且对于全原子能量的准确评价而言,精制步骤是必要的。精制也用作对进行的手工突变的过滤步骤,因为只有在下述情况下给定的突变或突变集合才被接受:全原子能量显著恢复,而不造成螺旋局部结构的重大变形。为实验表征选择的设计之一(FFL_001)是直接 FFL 设计,在核心中不进行手工变化。该多肽是热力学稳定的,并以高亲和力结合目标抗体。

[0170] 为实验表征选择的设计相对于彼此相差 6-48 个突变。与原始模板的序列相比,所述设计表现出 51-59 个突变。FFL 设计的序列比对和原始模板的序列显示在图 3 中。

[0171] 在设计模型内的主链 rmsds 是 0.53-3.06Å,当所述设计与最初模板的坐标相比时,在 1.83-2.91 之间。

[0172] 设计最小化

[0173] 为了进一步减小 FFL 设计的大小,消除了不接触 mota 表位的蛋白区段。

[0174] 实验方法

[0175] 表达和纯化

[0176] 未标记的蛋白

[0177] 用优化的密码子选择和 RNA 结构合成了编码支架构建体的 DNA 区段(Codon Devices, Genscript Corp.),亚克隆进 pET29(EMD Biosciences)中,并转化进 Arctic Express™大肠杆菌(Invitrogen)中。在 10mL Luria Broth (LB)+卡那霉素(100mg/ml)

中在 37℃培养单个菌落过夜。将种子培养物倒入 1L LB+ 卡那霉素中,并在 37℃温育;当细胞达到对数期时,将 250 μ M IPTG 加入培养物中以诱导蛋白表达,然后将细胞在 12℃温育过夜。然后沉淀培养物,并再悬浮于启动缓冲液(160mM 咪唑,4M 氯化钠,160mM 磷酸钠)中,加入一片蛋白酶抑制剂(Novagen),并将细胞悬浮液在 -20℃冷冻。

[0178] 融化细胞悬浮液,并加入 10ml 10X Bugbuster™(Novagen)、50 μ L Benzonase 核酸酶和 1.7 μ L rLysozyme(Novagen) 来裂解细胞;然后将细胞悬浮液在定轨摇床中轻轻振荡 20 分钟。沉淀裂解的细胞,并穿过 0.22 μ m 过滤器(Millipore)过滤上清液。将上清液与 5mL Ni++Sepharose 6 Fast Flow(GE Healthcare)一起在 4℃振荡 1 小时。用 30mL 洗涤缓冲液(50mM 咪唑、500mM 氯化钠和 160mM 磷酸钠)洗涤树脂 3 次,并用 20mL 洗脱缓冲液(250mM 咪唑、500mM 氯化钠和 20mM 磷酸钠)洗脱。合并含有目标构建体的级分,并通过在 Superdex 75 16/60(GE Healthcare)上的制备型尺寸排阻色谱法(SEC)在室温在 HBS 中进一步纯化。在 4-12% SDS 变性凝胶(Invitrogen)上分析收集的级分,合并阳性级分,并通过超滤(Vivaspin, Bioexpress)进行浓缩。通过在 280nm 测量紫外吸收信号(Nanodrop™),确定蛋白浓度,并从理论消光系数计算。为了便利快速且准确的蛋白定量,将序列 GSW 加入在它们的基本序列中不含有色氨酸的所有设计中。

[0179] 低内毒素蛋白

[0180] 为了制备用于免疫接种研究的低内毒素蛋白,将细菌沉淀物交替地再悬浮于去污剂缓冲液(50mM NaH_2PO_4 , 500mM NaCl, 10mM 咪唑, 0.5mg/ml 溶菌酶, 0.01mg/ml DNA 酶, 0.1% Triton X₁₁₄)中,并在交替地在 10mM 咪唑、50mM NaH_2PO_4 、500mM NaCl、0.1% Triton X₁₁₄中洗涤 Ni++ 树脂。

[0181] N15- 标记的蛋白

[0182] 在补充了 1g/L 的 ^{15}N 氯化铵的最小 MOPS 培养基中培养 FFL_001、FFL_005、FFL_006 和 FFL_007 的同位素标记的样品。将种子培养物倒入 1L MOPS 中,并在 37℃温育过夜;加入 3ml 40% ^{15}N 葡萄糖以继续生长,在达到 $\text{OD}_{\lambda=600}$ 后,将 250 μ M IPTG 加给培养物来诱导蛋白表达,然后在 16℃温育细胞过夜。

[0183] 光散射

[0184] 通过与静态光散射装置(miniDAWN TREOS, Wyatt)线内联接的 HPLC(Agilent, 1200 系列),进一步评估纯化的蛋白的单分散性和分子量。使用 100 μ L 1-2mg/mL 的蛋白样品,并用 ASTRA™软件(Wyatt)分析收集的数据。

[0185] 圆二色性

[0186] 在 Aviv 62A DS 波谱仪上,通过圆二色性(CD)确定溶液热稳定性(T_m)。在 1mm 路径长度比色皿中收集 15-25 μ M 蛋白的远紫外波长扫描(190-260nm)。温度诱导的蛋白变性之后发生在 210nm 的平均残基椭圆率的变化。以每 3 分钟 2℃增值,在 1-99℃的温度范围内进行实验,并将得到的数据转化成平均残基椭圆率,并与双态模型拟合。

[0187] NMR

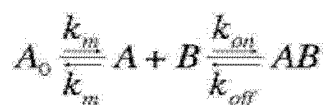
[0188] 以 500 μ M 的浓度,在 25mM 磷酸钠、150mM NaCl、pH 7.0 和 90% H_2O /10% D_2O 中制备 NMR 样品。在配有主动屏蔽的 z- 梯度三重共振冷冻-探头(cryo-probe)的 Bruker Avance™ 600MHz NMR 谱仪上,记录 FFL_001、FFL_005、FFL_006 和 FFL_007 的 HSQC 波谱。在 25℃记录所有波谱。使用 NMRPipe™和 NMRView™(1,2) 处理波谱。

[0189] 表面等离子体共振

[0190] 用 HBSEP (0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA 和 0.005% (v/v) 表面活性剂 P20) (GE Healthcare) 作为运行缓冲液, 在 Biacore 2000 (GE Healthcare) 上在 25℃ 进行所有实验。就结合分析而言, 在含有 8000-9000RU 的胺连接的小鼠抗-人 IgG 的 CM5 传感器芯片 (Human Antibody Capture 试剂盒, GE Healthcare) 上, 捕获 200-500 反应单位 (RU) 的莫他珠单抗 IgG。以 50-100 μ l/min 的流速, 将不同蛋白浓度的样品一式两份地注射在该表面上。如果必要的话, 通过 2 次 60 秒的 3M $MgCl_2$ 注射进行表面再生, 流速为 10 μ l/min。1 个流动池仅含有抗-人 IgG, 它与分析物的相互作用用作参照。可替换地, 使用另一种形式, 其中表位是与传感器芯片联接的胺, 并以与上述相同的流速注射 Mota Fab。

[0191] 使用 Scrubber 2.0 (BioLogic Software) 进行数据准备和分析。对于动力学分析, 使生物传感器数据总体上拟合质量传输限制的简单双分子结合模型:

[0192]



[0193] 其中 A_0 代表注射的分析物。

[0194] 实施例 1 的结果

[0195] 与莫他珠单抗结合的 RSV F 位点 A 肽的结构用作支架的靶标结合位点 (图 2)。该肽结构 (在 PDBID:3IXT 中的链 P) 是螺旋-转角-螺旋基序, 且引导我们选择 3-螺旋束作为这些支架的靶标拓扑结构。PDBID:3LHP 的结构, 链 S 选择为特定 3-螺旋束。FFL 设计的操作细节显示在表 1 中。总结了在 FFL 模拟中使用的不同的参数和过滤标准。还总结了手工干预阶段, 其关于: 进行的核心突变的数目、设计的最初 Rosetta 能量和突变和全原子精制步骤以后的 Rosetta 能量。

[0196]

设计	计算算法		过滤		手工干预		
	SD (Å) ^a	BS 设计 ^b	能量 + 复合过滤器	螺旋弯曲 ^c	Rosetta 能量	突变	Rosetta 能量 (松弛后) ^d
FFL_001	1.5	×	✓	×	-	-	-
FFL_002	3.0	✓	✓	×	-289	10	-276
FFL_003	3.0	✓	✓	×	-286	4	-293
FFL_004	3.0	✓	✓	×	-285	7	-291
FFL_005	1.5	✓	×	✓	-292	11	-287
FFL_006	3.0	✓	✓	×	-291	3	-290
FFL_007	1.5	✓	×	✓	-293	11	-285
FFL_008	1.5	✓	×	✓	-293	8	-286

[0197] 表 1

[0198] ^aSD- 允许从靶标拓扑结构衍生出的约束的标准差

[0199] ^bBS- 没有与抗体直接接触的位置的结合位点设计

[0200] ^c基于在 Helanal 中实现的螺旋弯曲角的过滤标准

[0201] ^d在已经执行突变和全原子优化步骤以后的 Rosetta 能量

[0202] 使用从环折叠 (Fold From Loops) 方法, 设计了 7 个支架 (表 2), 它们的序列与“T93”的序列一起显示在图 3 中, 所述“T93”是得自 3LHP 的模板 3- 螺旋束。

[0203] 表 2 :RSV F 蛋白位点 A 表位的蛋白支架

[0204]

蛋白支架	参考编号
RSVF_ 位点 A_001	FFL 001 (SEQ ID NO :4)
RSVF_ 位点 A_002	FFL 002 (SEQ ID NO :5)
RSVF_ 位点 A_003	FFL 003 (SEQ ID NO :10)
RSVF_ 位点 A_004	FFL 004 (SEQ ID NO :6)
RSVF_ 位点 A_005	FFL 005 (SEQ ID NO :7)
RSVF_ 位点 A_006	FFL 006 (SEQ ID NO :8)
RSVF_ 位点 A_007	FFL 007 (SEQ ID NO :9)
RSVF_ 位点 A_008	FFL 008 (SEQ ID NO :12)

[0205] 设计的序列彼此相差 8-42 个突变。计算模型的结构多样性彼此相差 0.53Å 至 3.06Å。

[0206] 为了评估表达和溶解度, 在大肠杆菌中表达重组蛋白, 这 7 种设计的变体是可溶性的, 且可通过金属亲和色谱法 (Ni++) 和尺寸排阻色谱法 (SEC) 的步骤来纯化, 表达的产量范围为 3-5mg L⁻¹。为了评估在溶液中的寡聚化状态, 通过 SEC 和静态光散射分析了所述 7 种可溶性设计 (图 4)。6 种设计是单分散的, 并表现出与单体蛋白相对应的表观分子量 (≈ 15 kDa)。为了评价设计的分子的折叠和热稳定性, 我们进行了圆二色性光谱法 (CD) (图 5)。6 种单体设计表现出适当折叠的螺旋蛋白的典型 CD 波谱。温度诱导的变性之后进行 CD, 表明所述设计的稳定性范围为 48°C 至超过 100°C (表 3)。为了检验功能位点 (mota 表位) 是否具有保真度地重建, 通过表面等离子体共振 (SPR) 实验评估了结合亲和力 (图 6)。结合常数 (K_D) 是在 30-652pM 范围内 (参见表 3) 将支架与 biacore 芯片偶联, 并使用莫他珠单抗作为分析物。表位区域中的点突变 (K28E) 可容易地阻断结合相互作用, 据以前的报道, 所述点突变 (K28E) 对 RSV 背景具有相同的作用, 因此表明结合特异性针对该表位 (图 7)。

[0207] 由最佳 FFL 设计表现出的亲和力表明与以前公开的肽 - 表位的 K_D (200nM) 相比提高了大约 7000 倍。近年来, 侧链嫁接策略被用于将 RSV 表位移植给其它异源支架 (McLellan

等人, J. Mol. Biol. (2011) 409, 853–866)。在该工作中, 最高亲和力设计表现出的对 mota 抗体的 K_D 为 60nM。因此, FFL 设计具有比 McLellan 等人的结果提高了大约 2000 倍的 K_D 。

[0208] 为了得到设计的分子的溶液行为和结构性能的正交表征, 收集了 ^{15}N - ^1H 异核单量子相干性 (HSQC) 波谱。这些波谱表明具有非常确定的球形折叠的蛋白的典型良好峰分散 (未显示)。为了进一步评价我们的计算设计的准确度, 分析了 FFL_005 的 x-射线结构。FFL_005 的计算模型和晶体结构 (未显示) 紧密一致 (在主链原子相上, 1.7Årmsd), 从而证实了所述计算方法用于设计具有所需的结构基序和三维结构的多肽的有效性。此外, 在 FFL_005 的晶体结构内的 Mota 表位的构象与得自 PDB:3ixt 的 Mota- 结合的肽的构象匹配, 具有 0.5Å 的 rmsd, 从而支持了下述声明: FFL 方法可以稳定用作折叠核的结构基序的构象。

[0209] 这些研究证实, 通过将计算机环境折叠过程和序列设计偶联以同时优化分子的功能部分和热力学稳定性, 成功地建立新颖的功能性蛋白。描述的计算策略是通用的和灵活的, 使得靶标拓扑结构不需要是天然存在的蛋白, 并且外壳拓扑结构的逆推还可以用于设计功能化的蛋白。关于功能位点的结构复杂性, FFL 算法适合处理由多个主链区段组成的不连续基序, 所述基序通常在天然存在的蛋白的功能位点中需要。这些结果在功能性蛋白的计算设计和现有蛋白结构作为潜在模板的应用中具有广泛的意义。

[0210] 表 3. FFL 设计的 Mota 结合亲和力 and 热稳定性。通过 SPR 评估结合亲和力, 并通过 CD 光谱法评估热稳定性。

分子	T _m (°C)	SPR		
		k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (s ⁻¹)	k _{off} /k _{on} (pM)
FFL_001	75	3.99 x 10 ⁶	1.19 x 10 ⁻⁴	29.98
FFL_002	48	1.56 x 10 ⁶	7.34 x 10 ⁻⁴	469.9
FFL_004	>85	1.05 x 10 ⁶	8.32 x 10 ⁻⁴	795
FFL_005	>100	2.97 x 10 ⁶	2.09 x 10 ⁻⁴	70.3
FFL_006	>85	3.57 x 10 ⁶	2.32 x 10 ⁻⁴	651.9
FFL_007	>85	1.45 x 10 ⁶	1.36 x 10 ⁻⁴	94.1

[0212] 实施例 2

[0213] 将 FFL_001 支架缀合至 HepBcAg 颗粒的表面, 以改善对表位的免疫应答。通过在表位相对末端处的支架中的经工程改造的半胱氨酸和在 HepBcAg 的主要免疫显性区域的尖部上的经工程改造的赖氨酸之间的异源双功能交联剂, 缀合支架。这使得所述支架的方向为所述表位暴露在缀合的颗粒的径向外部的方向。

[0214] 在大肠杆菌中表达得自 HBcAg 残基 1-149 的颗粒, 所述 HBcAg 残基 1-149 是导致在细菌中的更高表达和具有 240 个 HepBcAg 单体的更大的 $T = 4$ 颗粒的优势的构建体 (Zlotnick 等人, 1996; Wynne 等人, 1999), 并通过标准蔗糖梯度进行纯化。对于单体 FFL 免疫原的化学偶联, 使用标准技术表达和纯化纯的赖氨酸官能化的 HBcAg (1-149) 颗粒, 其中将赖氨酸残基工程改造进每个亚基的免疫显性峰的尖部。HBcAg (1-149) WT 和赖氨酸官能化的颗粒都是完整大小 (30nm)。(图 8)

[0215] 在标准条件下, 使用 10% 蔗糖和 1% CHAPS, 进行 FFL_001 支架和 HepBcAG 的缀合, 根据对得自蔗糖梯度超速离心的纯化级分进行的 SDS-PAGE 凝胶的密度测定分析, 产生大约 75 个与每个 HepB 颗粒连接的 FFL_001 支架。如下通过 SPR 评价 Mota 与 FFL_001- 缀

合的颗粒的结合：将 Mota IgG 捕获在传感器芯片上，然后使 FFL_001- 颗粒结合至 Mota IgG- 包被的表面；随后，使用 Mota Fab 作为分析物，并评价 Mota Fab 与 Mota-IgG- 捕获的 -FFL_001- 颗粒的结结合的动力学；以此方式，可以证实，FFL_001- 缀合的 - 颗粒与 Mota 结合的亲和力与 FFL_001 单体类似（数据未显示）。

[0216] 表 4 总结了用 FFL 支架单体和 FFL_001- 缀合的 -HepBcAg- 颗粒对猕猴免疫接种实验的结果。免疫原是标记为“001”、“005”和“007”的支架单体和标记为“001- 颗粒”的 FFL_001- 缀合的 -HepBcAg- 颗粒。在 0、1 和 2 个月，通过肌肉内途径免疫恒河猴（4 只动物 / 免疫原）。给动物注射 1mL 总体积的与 Adjuvlex™佐剂混合的抗原，将 0.5mL 注射进每只臂中。第一次免疫接种包括共 200ug 支架；后续免疫接种包括共 100ug 支架。在第 0 天，在第一次免疫接种之前，从每只动物采集“首次用于实验”的血清。在第 3 次免疫接种以后 2 周，从每只动物采集“Imm3”血清。在标准斑减少测定中，以 1 : 20 的血清稀释度，评价“首次用于实验”和“Imm3”血清的中和。每个样品一式两份地运行（2 个单独运行的计数显示为“首次用于实验 1”、“首次用于实验 2”、“Imm3_1”和“Imm3_2”）。从 2 次运行计算出平均斑计数“首次用于实验_ave”和“Imm3_ave”。将斑减少百分比计算为（首次用于实验_ave-Imm3_ave）/ 首次用于实验_ave。还试验了血清与重组 RSVF 蛋白的 ELISA 反应性。给出了每只动物的终点滴度。斑减少百分比数目表明与 ELISA 滴度的适当线性相关，Pearson 系数为 0.58。

[0217] 这些数据证实，用 FFL 支架单体或在 HepBcAg 颗粒上呈现的 FFL 支架免疫接种猕猴，可以导致 RSVF 结合抗体和 RSV 中和抗体的产生。就颗粒展示的支架而言，中和百分比（斑减少百分比）高达 88%，单体支架的中和百分比（斑减少百分比）高达 72%。VLP 呈现的支架的平均斑减少百分比是 $51 \pm 25\%$ ，这高于任何单体样品的平均值，单体样品的最高斑减少百分比为 $33 \pm 11\%$ （FFL_001 单体）。颗粒 -001 相对于单体 -001 的平均斑减少百分比的差异不是统计上显著的。与最高滴度的单体样品（FFL_001 的 79000 ± 66000 ）相比，颗粒 -001 样品（ 94000 ± 20000 ）的平均 RSVF ELISA 滴度也更高，但是差异仍然不是统计上显著的。

[0218] 表 4

[0219]

免疫原	NHP id	% 斑减少	RSVF ELISA 滴度	首次用于 实验 ave	首次用于 实验 1	首次用于 实验 2	Imm3_av e	Imm3_ 1	Imm3_ 2
001- 颗粒	D03 9	0.8757	12000 0	84.5	83	86	10.5	13	8
007	D03 0	0.717	11000 0	79.5	80	79	22.5	21	24
005	D18 0	0.5924	22000	78.5	72	85	32	35	29
001	C01 2	0.4536	17000 0	91.5	89	94	50	46	54
001- 颗粒	C00 4	0.4491	93000	83.5	74	93	46	50	42
001- 颗粒	D13 0	0.4207	91000	72.5	68	77	42	43	41
007	D22 7	0.3716	23000	91.5	84	99	57.5	57	58
007	C01 0	0.3709	36000	75.5	70	81	47.5	44	51
001	D02 7	0.3642	12000	75.5	81	70	48	46	50
001	D05 2	0.3243	65000	92.5	89	96	62.5	63	62
001- 颗粒	D18 4	0.3038	72000	79	72	86	55	52	58
005	D10 4	0.2	8500	67.5	64	71	54	54	54
001	D17 2	0.1954	69000	87	88	86	70	65	75
005	D19 0	0.1931	4800	72.5	68	77	58.5	50	67
005	D03 2	0.1243	9500	88.5	85	92	77.5	78	77
007	D08 7	0.047	15000	74.5	73	76	71	70	72

[0001]

序列表

- <110> Schief, William
Correia, Bruno
Baker, David
- <120> 多肽及其在治疗和限制呼吸道合胞病毒感染中的用途
- <130> 11-1225-PCT
- <150> 61/390591
<151> 2010-10-06
- <160> 12
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> X是G或可选地是不存在的
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2).. (2)
<223> X是S或可选地是不存在的
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3).. (3)
<223> X是M, L, R或F
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6).. (6)
<223> X是R, A, I, M, V或L
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> X是R或M
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10).. (10)
<223> X是L, A或V
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)
<223> X是E, R, K或D
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14).. (14)
<223> X是L, F, I或A
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17).. (17)
<223> X是I, F或A
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18).. (18)
<223> X是L, V, F或M
- <220>

[0002]

<221> MISC FEATURE
<222> (21).. (21)
<223> X是A, V, F, I或L

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (25).. (25)
<223> X是E, M, L, F, W或V

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (28).. (28)
<223> X是E, M, L, F, I或V

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (32).. (32)
<223> X是M, L, F或I

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (35).. (35)
<223> X是R, E, G, D或Q

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (36).. (36)
<223> X是G, D, P, W, E或Q

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (37).. (37)
<223> X是Q, I, P, K或F

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (38).. (38)
<223> X是R, Q, K, S, G或H

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (42).. (42)
<223> X是M, K, R或A

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (45).. (45)
<223> X是W, L, M或K

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (46).. (46)
<223> X是A, M, K或F

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (48).. (48)
<223> X是I, F, L, E, K或D

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (49).. (49)
<223> X是A, V, M, F或L

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (51).. (51)
<223> X是D, K, E或Y

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (53).. (53)
<223> X是F, V, A, R, M或L

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (56).. (56)

[0003]

<223> X是F, L, A, V或M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58).. (58)
<223> X是K或R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60).. (60)
<223> X是V, M或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (63).. (63)
<223> X是F, R, V, I, A或Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (64).. (64)
<223> X是L, E或A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (65).. (65)
<223> X是S或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (66).. (66)
<223> X是E或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (67).. (67)
<223> X是A或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (68).. (68)
<223> X是L或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (69).. (69)
<223> X是S或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (71).. (71)
<223> X是I或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (72).. (72)
<223> X是N或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (74).. (74)
<223> X是Y, M或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (75).. (75)
<223> X是P或可选地是不存在的

<220>
<221> misc_feature
<222> (77).. (77)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (78).. (78)
<223> X是N或可选地是不存在的

[0004]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79).. (79)
<223> X是D或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (80).. (80)
<223> X是D, Q或K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (81).. (82)
<223> X是K或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (83).. (83)
<223> X是L或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (84).. (84)
<223> X是T, I, M, V或A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (85).. (85)
<223> X是S或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (86).. (86)
<223> X是N或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87).. (87)
<223> X是D或K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (88).. (88)
<223> X是A, T, L, V或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89).. (89)
<223> X是K, L 或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (91).. (91)
<223> X是F, Y, K, E, R或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (92).. (92)
<223> X是D, A, V或M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93).. (93)
<223> X是 A或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94).. (94)
<223> X是E, I或R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (95).. (95)
<223> X是V, A, M或L

<220>
<221> MISC_FEATURE

[0005]

<222> (96)..(96)
 <223> X是A, E, K, F, M或W

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (99)..(99)
 <223> X是L, I或V

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (101)..(101)
 <223> X是A或L

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (102)..(102)
 <223> X是F, M, L, E或I

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (103)..(103)
 <223> X是K, A, V, M, I或L

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (106)..(106)
 <223> X是A, V或I

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (108)..(108)
 <223> X是E, R, D, K, I或A

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (109)..(109)
 <223> X是A, M, K, L或W

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (110)..(110)
 <223> X是A, F, V或K

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (113)..(113)
 <223> X是G或可选地是不存在的

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (114)..(114)
 <223> X是S或可选地是不存在的

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (115)..(115)
 <223> X是W或可选地是不存在的

 <400> 1

 Xaa Xaa Xaa Ser Asp Xaa Xaa Lys Asp Xaa Glu Xaa Arg Xaa Asp Lys
 1 5 10 15

 Xaa Xaa Glu Ala Xaa Lys Asn Lys Xaa Asp Lys Xaa Lys Ala Ala Xaa
 20 25 30

 Arg Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Glu Arg Xaa Lys Asp Xaa Xaa Lys Xaa
 35 40 45

 Xaa Arg Xaa Glu Xaa Glu Gln Xaa Arg Xaa Ala Xaa Arg Asn Xaa Xaa
 50 55 60

 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Xaa

[0006]

65	70	75	80
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa	Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa		
85	90	95	
Lys Lys Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Ala Asp Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Thr Gln			
100	105	110	
Xaa Xaa Xaa			
115			
<210>	2		
<211>	115		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(1).. (1)		
<223>	X是G或可选地是不存在的		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(2).. (2)		
<223>	X是S或可选地是不存在的		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(3).. (3)		
<223>	X是M, L, R或F		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(6).. (6)		
<223>	X是R, A, I, M或V		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(10).. (10)		
<223>	X是L, A或V		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(12).. (12)		
<223>	X是E, R, K或D		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(14).. (14)		
<223>	X是L, F, I或A		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(17).. (17)		
<223>	X是L, F或A		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(18).. (18)		
<223>	X是L, V或F		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(21).. (21)		
<223>	X是A, V, F或L		
<220>			
<221>	MISC_FEATURE		
<222>	(25).. (25)		

[0007]

<223> X是M, L, F或V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28).. (28)
<223> X是F, M, E或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32).. (32)
<223> X是M, L, F或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35).. (35)
<223> X是R, E, G或D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36).. (36)
<223> X是G, D, P, W或Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37).. (37)
<223> X是Q, I, P或F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38).. (38)
<223> X是R, Q, K, S或H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (42).. (42)
<223> X是M, K, R或A

<220>
<221> misc_feature
<222> (45).. (45)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (46).. (46)
<223> X是A, M, F或K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48).. (48)
<223> X是I, F, L, E, K或D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49).. (49)
<223> X是A, V, M, F或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51).. (51)
<223> X是D, K, Y或E

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (53).. (53)
<223> X是F, V, A, R或M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (56).. (56)
<223> X是F, L, A, V或M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58).. (58)
<223> X是K或R

[0008]

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (60)... (60)
<223> X是V, M或I

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (63)... (63)
<223> X是F, R, V, I或Y

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (64)... (64)
<223> X是L, E或A

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (67)... (67)
<223> X是A或L

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (74)... (74)
<223> X是Y, M或L

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (80)... (80)
<223> X是D, Q或K

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (84)... (84)
<223> X是T, I, M, V或A

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (88)... (88)
<223> X是T, L, V 或I

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (89)... (89)
<223> X是K, L或I

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (91)... (91)
<223> X是F, Y, K, E或L

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (92)... (92)
<223> X是D, A, V或M

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (94)... (94)
<223> X是E, I或R

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (95)... (95)
<223> X是V, A, M或L

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (96)... (96)
<223> X是E, K, F或W

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (99)... (99)
<223> X是L, I或V

<220>
<221> MISC FEATURE

[0009]

<222> (101)... (101)
 <223> X是A或L

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (102)... (102)
 <223> X是F, M, L, E或I

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (103)... (103)
 <223> X是K, A, V, M或L

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (106)... (106)
 <223> X是A, V或I

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (108)... (108)
 <223> X是F, R, D, K, A或I

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (109)... (109)
 <223> X是A, M, K, L或W

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (110)... (110)
 <223> X是A, F或V

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (113)... (113)
 <223> X是G或可选地是不存在的

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (114)... (114)
 <223> X是S或可选地是不存在的

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (115)... (115)
 <223> X是W或可选地是不存在的

 <400> 2

 Xaa Xaa Xaa Ser Asp Xaa Arg Lys Asp Xaa Glu Xaa Arg Xaa Asp Lys
 1 5 10 15

 Xaa Xaa Glu Ala Xaa Lys Asn Lys Xaa Asp Lys Xaa Lys Ala Ala Xaa
 20 25 30

 Arg Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Glu Arg Xaa Lys Asp Xaa Xaa Lys Xaa
 35 40 45

 Xaa Arg Xaa Glu Xaa Glu Gln Xaa Arg Xaa Ala Xaa Arg Asn Xaa Xaa
 50 55 60

 Ser Glu Xaa Leu Ser Lys Ile Asn Asp Xaa Pro Ile Thr Asn Asp Xaa
 65 70 75 80

 Lys Lys Leu Xaa Ser Asn Asp Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

 Lys Lys Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Ala Asp Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Thr Gln
 100 105 110

[0010]

Xaa Xaa Xaa
115

<210> 3
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X是G或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> X是S或可选地是不存在的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X是M, L, R或F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X是I或M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> X是L或A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> X是E, R或D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> X是F或A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> X是L, F或A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (18)..(18)
<223> X是F或V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> X是A, V或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(25)
<223> X是L, F或W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> X是F, M或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)

[0011]

<223> X是L, F或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35).. (35)
<223> X是E, G或D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (36).. (36)
<223> X是G, D, W或Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37).. (37)
<223> X是Q, I, P或F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38).. (38)
<223> X是Q, K, S或H

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (42).. (42)
<223> X是M, R或A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45).. (45)
<223> X是W, L或M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (46).. (46)
<223> X是M, K或F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48).. (48)
<223> X是F, L, K或D

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (49).. (49)
<223> X是A, M或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51).. (51)
<223> X是Y或K

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (53).. (53)
<223> X是V, A或M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (56).. (56)
<223> X是L, A或M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58).. (58)
<223> X是K或R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60).. (60)
<223> X是V, M或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (63).. (63)
<223> X是F, R, I或Y

[0012]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (64).. (64)
<223> X是L, E或A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (67).. (67)
<223> X是A或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (74).. (74)
<223> X是M或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (80).. (80)
<223> X是D或Q

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (84).. (84)
<223> X是I, M或A

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (88).. (88)
<223> X是L, V或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89).. (89)
<223> X是K, L或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (91).. (91)
<223> X是F, Y, E或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (92).. (92)
<223> X是D, A, V或M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94).. (94)
<223> X是F, I或R

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (95).. (95)
<223> X是V, A或L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (96).. (96)
<223> X是E, F或W

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99).. (99)
<223> X是L或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (102).. (102)
<223> X是M, L或I

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (103).. (103)
<223> X是K, M, A或L

<220>
<221> MISC_FEATURE

[0013]

<222> (106)... (106)
 <223> X是A, V或I

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (108)... (108)
 <223> X是R, D, I或A

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (109)... (109)
 <223> X是M, K, L或W

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (110)... (110)
 <223> X是A, F或V

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (113)... (113)
 <223> X是G或可选地是不存在的

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (114)... (114)
 <223> X是S或可选地是不存在的

 <220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (115)... (115)
 <223> X是W或可选地是不存在的

 <400> 3

 Xaa Xaa Xaa Ser Asp Xaa Arg Lys Asp Xaa Glu Xaa Arg Xaa Asp Lys
 1 5 10 15

 Xaa Xaa Glu Ala Xaa Lys Asn Lys Xaa Asp Lys Xaa Lys Ala Ala Xaa
 20 25 30

 Arg Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Glu Arg Xaa Lys Asp Xaa Xaa Lys Xaa
 35 40 45

 Xaa Arg Xaa Glu Xaa Glu Gln Xaa Arg Xaa Ala Xaa Arg Asn Xaa Xaa
 50 55 60

 Ser Glu Xaa Leu Ser Lys Ile Asn Asp Xaa Pro Ile Thr Asn Asp Xaa
 65 70 75 80

 Lys Lys Leu Xaa Ser Asn Asp Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

 Lys Lys Xaa Glu Ala Xaa Xaa Ala Asp Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Thr Gln
 100 105 110

 Xaa Xaa Xaa
 115

 <210> 4
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成的

 <400> 4

[0014]

Gly Ser Arg Ser Asp Met Arg Lys Asp Ala Glu Arg Arg Phe Asp Lys
 1 5 10 15
 Phe Val Glu Ala Ala Lys Asn Lys Phe Asp Lys Phe Lys Ala Ala Leu
 20 25 30
 Arg Lys Gly Asp Ile Lys Glu Glu Arg Arg Lys Asp Met Lys Lys Leu
 35 40 45
 Ala Arg Lys Glu Ala Glu Gln Ala Arg Arg Ala Val Arg Asn Arg Leu
 50 55 60
 Ser Glu Leu Leu Ser Lys Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
 65 70 75 80
 Lys Lys Leu Met Ser Asn Asp Val Leu Lys Phe Ala Ala Glu Ala Glu
 85 90 95
 Lys Lys Ile Glu Ala Leu Ala Ala Asp Ala Glu Asp Lys Phe Thr Gln
 100 105 110
 Gly Ser Trp
 115
 <210> 5
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成的
 <400> 5
 Gly Ser Leu Ser Asp Val Arg Lys Asp Val Glu Lys Arg Ile Asp Lys
 1 5 10 15
 Ala Leu Glu Ala Phe Lys Asn Lys Met Asp Lys Glu Lys Ala Ala Phe
 20 25 30
 Arg Lys Asp Pro Pro Ser Glu Glu Arg Arg Lys Asp Lys Lys Lys Glu
 35 40 45
 Phe Arg Glu Glu Arg Glu Gln Val Arg Lys Ala Ile Arg Asn Val Leu
 50 55 60
 Ser Glu Ala Leu Ser Lys Ile Asn Asp Leu Pro Ile Thr Asn Asp Lys
 65 70 75 80
 Lys Lys Leu Val Ser Asn Asp Val Ile Lys Lys Val Ala Glu Met Lys
 85 90 95
 Lys Lys Val Glu Leu Glu Val Ala Asp Val Glu Lys Lys Val Thr Gln
 100 105 110
 Gly Ser Trp
 115
 <210> 6
 <211> 112
 <212> PRT

[0015]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 6

Gly Ser Met Ser Asp Ala Arg Lys Asp Leu Glu Glu Arg Leu Asp Lys
1 5 10 15

Leu Leu Glu Ala Ala Lys Asn Lys Met Asp Lys Phe Lys Ala Ala Met
20 25 30

Arg Lys Arg Gly Gln Arg Glu Glu Arg Lys Lys Asp Trp Ala Lys Ile
35 40 45

Val Arg Asp Glu Phe Glu Gln Phe Arg Lys Ala Val Arg Asn Phe Leu
50 55 60

Ser Glu Ala Leu Ser Lys Ile Asn Asp Tyr Pro Ile Thr Asn Asp Asp
65 70 75 80

Lys Lys Leu Thr Ser Asn Asp Thr Lys Lys Phe Ala Ala Glu Val Glu
85 90 95

Lys Lys Leu Glu Ala Phe Lys Ala Asp Val Glu Glu Ala Ala Thr Gln
100 105 110

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 7

Gly Ser Met Ser Asp Ile Arg Lys Asp Leu Glu Glu Arg Phe Asp Lys
1 5 10 15

Leu Val Glu Ala Leu Lys Asn Lys Val Asp Lys Met Lys Ala Ala Phe
20 25 30

Arg Lys Asp Gln Phe His Glu Glu Arg Met Lys Asp Trp Phe Lys Asp
35 40 45

Leu Arg Lys Glu Val Glu Gln Met Arg Arg Ala Val Arg Asn Tyr Ala
50 55 60

Ser Glu Ala Leu Ser Lys Ile Asn Asp Leu Pro Ile Thr Asn Asp Asp
65 70 75 80

Lys Lys Leu Ala Ser Asn Asp Val Leu Lys Leu Val Ala Glu Val Trp
85 90 95

Lys Lys Leu Glu Ala Ile Leu Ala Asp Val Glu Ala Trp Phe Thr Gln
100 105 110

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

[0016]

<220>

<223> 合成的

<400> 8

Gly Ser Phe Ser Asp Ile Arg Lys Asp Ala Glu Asp Arg Ala Asp Lys
1 5 10 15

Ala Phe Glu Ala Ala Lys Asn Lys Phe Asp Lys Ile Lys Ala Ala Ile
20 25 30

Arg Lys Asp Trp Pro Ser Glu Glu Arg Ala Lys Asp Leu Met Lys Lys
35 40 45

Ala Arg Tyr Glu Met Glu Gln Ala Arg Arg Ala Ile Arg Asn Ile Glu
50 55 60

Ser Glu Ala Leu Ser Lys Ile Asn Asp Leu Pro Ile Thr Asn Asp Gln
65 70 75 80

Lys Lys Leu Ala Ser Asn Asp Ile Ile Lys Glu Met Ala Arg Leu Phe
85 90 95

Lys Lys Leu Glu Ala Leu Met Ala Asp Ile Glu Ile Leu Val Thr Gln
100 105 110

<210> 9

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 9

Gly Ser Leu Ser Asp Ile Arg Lys Asp Ala Glu Arg Arg Phe Asp Lys
1 5 10 15

Leu Val Glu Ala Val Lys Asn Lys Leu Asp Lys Met Lys Ala Ala Leu
20 25 30

Arg Lys Glu Gly Gln Gln Glu Glu Arg Met Lys Asp Leu Met Lys Phe
35 40 45

Met Arg Lys Glu Val Glu Gln Leu Arg Lys Ala Met Arg Asn Phe Leu
50 55 60

Ser Glu Ala Leu Ser Lys Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Asp
65 70 75 80

Lys Lys Leu Ile Ser Asn Asp Leu Lys Lys Tyr Asp Ala Ile Ala Glu
85 90 95

Lys Lys Leu Glu Ala Met Lys Ala Asp Val Glu Arg Met Ala Thr Gln
100 105 110

Gly Ser Trp
115

<210> 10

[0017]

<211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 10

Gly Ser Met Ser Asp Arg Arg Lys Asp Leu Glu Glu Arg Leu Asp Lys
 1 5 10 15

Leu Leu Glu Ala Ala Lys Asn Lys Glu Asp Lys Phe Lys Ala Ala Met
 20 25 30

Arg Lys Arg Gly Gln Arg Glu Glu Arg Met Lys Asp Trp Ala Lys Ile
 35 40 45

Ala Arg Asp Glu Phe Glu Gln Phe Arg Lys Ala Val Arg Asn Phe Leu
 50 55 60

Ser Glu Ala Leu Ser Lys Ile Asn Asp Tyr Pro Ile Thr Asn Asp Asp
 65 70 75 80

Lys Lys Leu Thr Ser Asn Asp Ala Lys Lys Phe Asp Ala Glu Val Ala
 85 90 95

Lys Lys Leu Glu Ala Phe Lys Ala Asp Ala Glu Glu Ala Ala Thr Gln
 100 105 110

<210> 11
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 11

Gly Ser Ile Ser Asp Ile Arg Lys Asp Ala Glu Val Arg Met Asp Lys
 1 5 10 15

Ala Val Glu Ala Phe Lys Asn Lys Leu Asp Lys Phe Lys Ala Ala Val
 20 25 30

Arg Lys Val Phe Pro Thr Glu Glu Arg Ile Lys Asp Trp Leu Lys Ile
 35 40 45

Val Arg Gly Glu Ala Glu Gln Ala Arg Val Ala Val Arg Asn Val Gly
 50 55 60

Arg Asp Ala Asn Asp Lys Ala Ala Ala Leu Gly Lys Asp Lys Glu Ile
 65 70 75 80

Asn Trp Phe Asp Ile Ser Gln Ser Leu Trp Asp Val Gln Lys Leu Thr
 85 90 95

Asp Ala Ala Ile Lys Lys Ile Glu Ala Ala Leu Ala Asp Met Glu Ala
 100 105 110

Trp Leu Thr Gln
 115

[0018]

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 12

Gly Ser Leu Ser Asp Leu Met Lys Asp Leu Glu Lys Arg Phe Asp Lys
1 5 10 15

Phe Met Glu Ala Ile Lys Asn Lys Trp Asp Lys Val Lys Ala Ala Phe
20 25 30

Arg Lys Gln Glu Lys Gly Glu Glu Arg Ala Lys Asp Met Phe Lys Ile
35 40 45

Phe Arg Glu Glu Leu Glu Gln Leu Arg Lys Ala Ile Arg Asn Ala Leu
50 55 60

Ser Glu Ala Leu Ser Lys Ile Asn Asp Leu Pro Ile Thr Asn Asp Asp
65 70 75 80

Lys Lys Leu Ala Ser Asn Lys Ala Lys Lys Arg Ala Ala Arg Val Met
85 90 95

Lys Lys Val Glu Ala Phe Ile Ala Asp Val Glu Ala Trp Lys Thr Gln
100 105 110

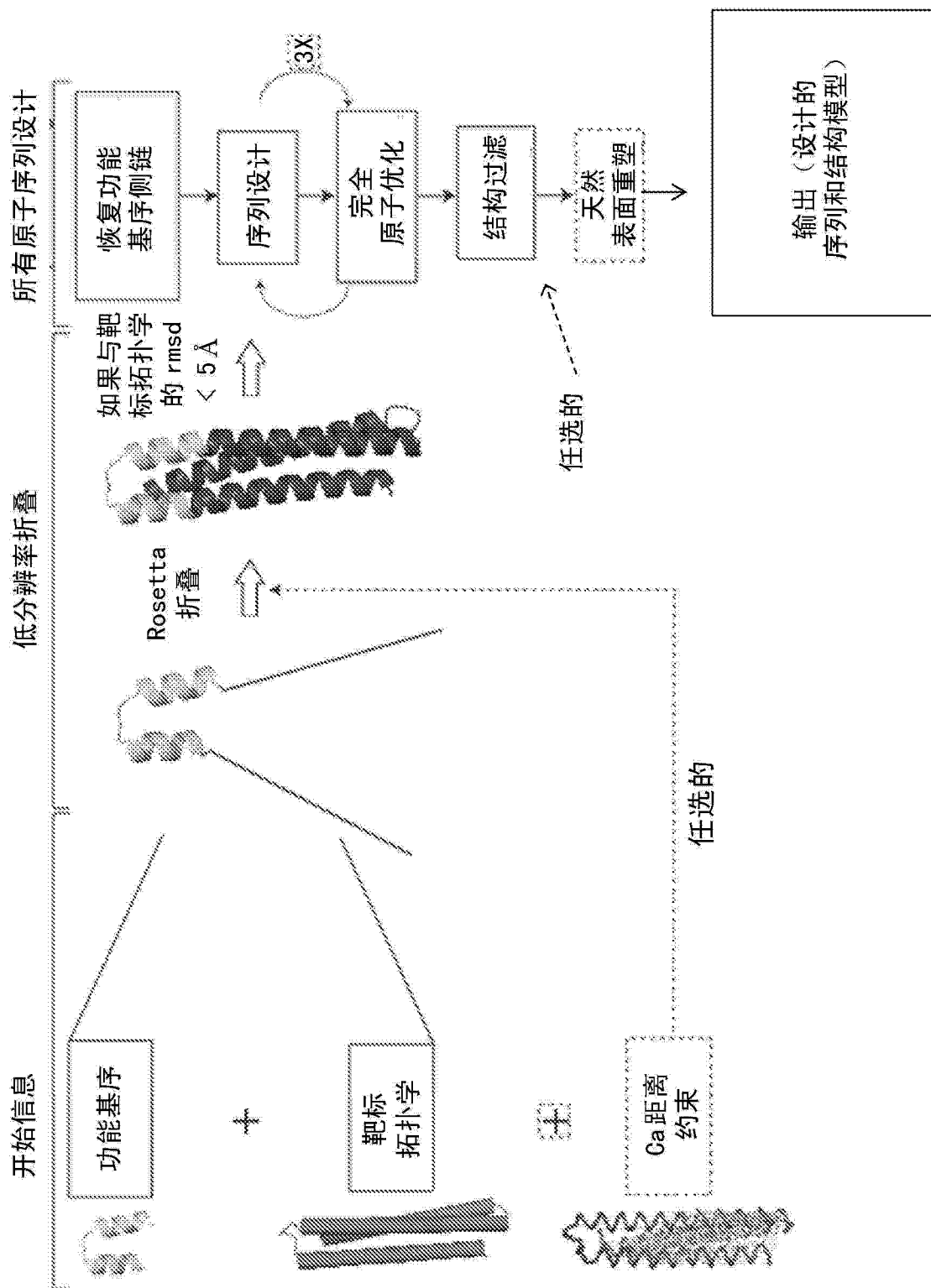


图 1

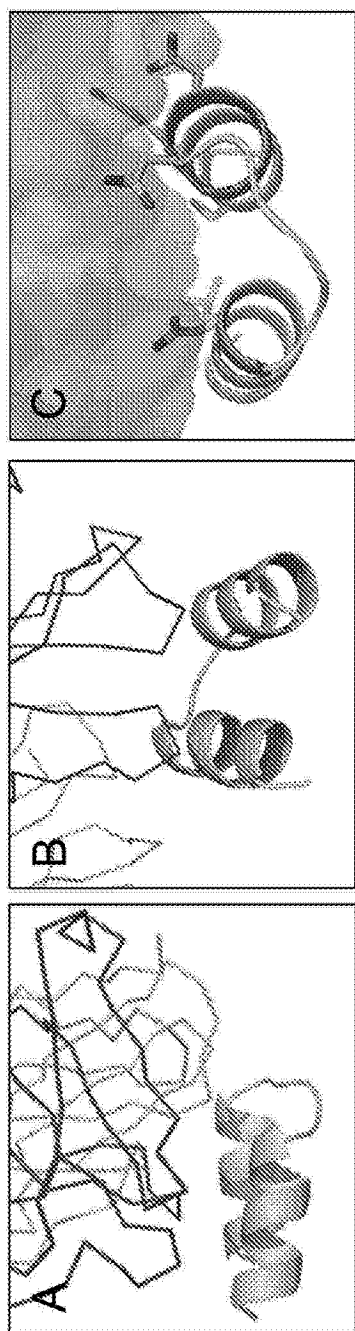


图 2

```

GSM5DRKDLERLKLLEAAKNKDKFKAAWRKRGQREERMKDWAIRDEFEQFRKAV 60 FFL_003
GSM5DARKDLERLKLLEAAKNKMDFFKAAMRRKRGQREERKKDWAKIVRDEFEQFRKAV 60 FFL_004
GSLSDIRKDAERRFDKLVEAVNKLDKMKAAALRKEGQOEERMKDLMKFMKVEQEOLRKAM 60 FFL_007
GSRSDMRKDAERRFDKFVFAAKNKFDFKKAALRKGDIKEERRKDMKKLARKEAEQARRAV 60 FFL_001
GSLSDVRKDVEXRIDKALEAFKNMKDKKAAPRKDPPESEERRKDKKKEFREEREQVRKAI 60 FFL_002
GGSFSDIRKDAERADRAKFAEAAKNKFDKIKAAIRKDPWSEERAKNDLMKNNAFYEMEQARRAI 60 FFL_006
GGSFSDLMKDLKRFDKFMKMEALKNKWDVKVKAAPRKQEKQSEERAKNDMFKIFREELEQLRKAI 60 FFL_008
GSM5DIRKDLERFDKLVEALKNNVDKMKAAAPRKDQFHEERMKDWFKDLRKEVEQEOMRRAV 60 FFL_005
GSI5DIRKDAEVRMDKAVEAPKNKLDKFKAAVRKVFPFTEERIKDMLKIVRGEAEQARRAV 60 T93
*** ** * * * * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
RNFLSEALSKIN-----DYPITNDDKKLTSNDAKKFDAEVAKKLEAFKADAEAAATQ--- 112 FFL_003
RNFLSEALSKIN-----DYPITNDDKKLTSNDTKKFAAEVEKKKLEAFKADVEEAAATQ--- 112 FFL_004
RNFLSEALSKIN-----DMPITNDDKKLISNDLKYYDAIAEKKLEAMKADVERMATOGSW 115 FFL_007
RNRLSELLSKIN-----DMPITNDQKKLMSNDVLKFAAAEAEKKIEALADAEDCKFTOGSW 115 FFL_001
RNVLSEALSKIN-----DLPITNDDKKLVSNDDVIKKVAEMKKKKVELEVADVEKKVTOGSW 115 FFL_002
RNVIESEALSKIN-----DLPITNDQKKKLASNDTIKEMARLFKKKLEALMADIEILVTQ--- 112 FFL_006
RARNLSEALSKIN-----DLPITNDDKKLASNKAKKRNAAVRVKKKLEAEFIADVEAWKTO--- 112 FFL_008
RNVYASEALSKIN-----DLPITNDDKKLASNDVLKLVAEVWKKKLEAILADVEAWKTO--- 112 FFL_005
RNVVGRDANDKAAALGKDKREINWFDISQSLMDVQKLTDAAIKKIEAALADMEAWLTQ--- 116 T93

```

图 3

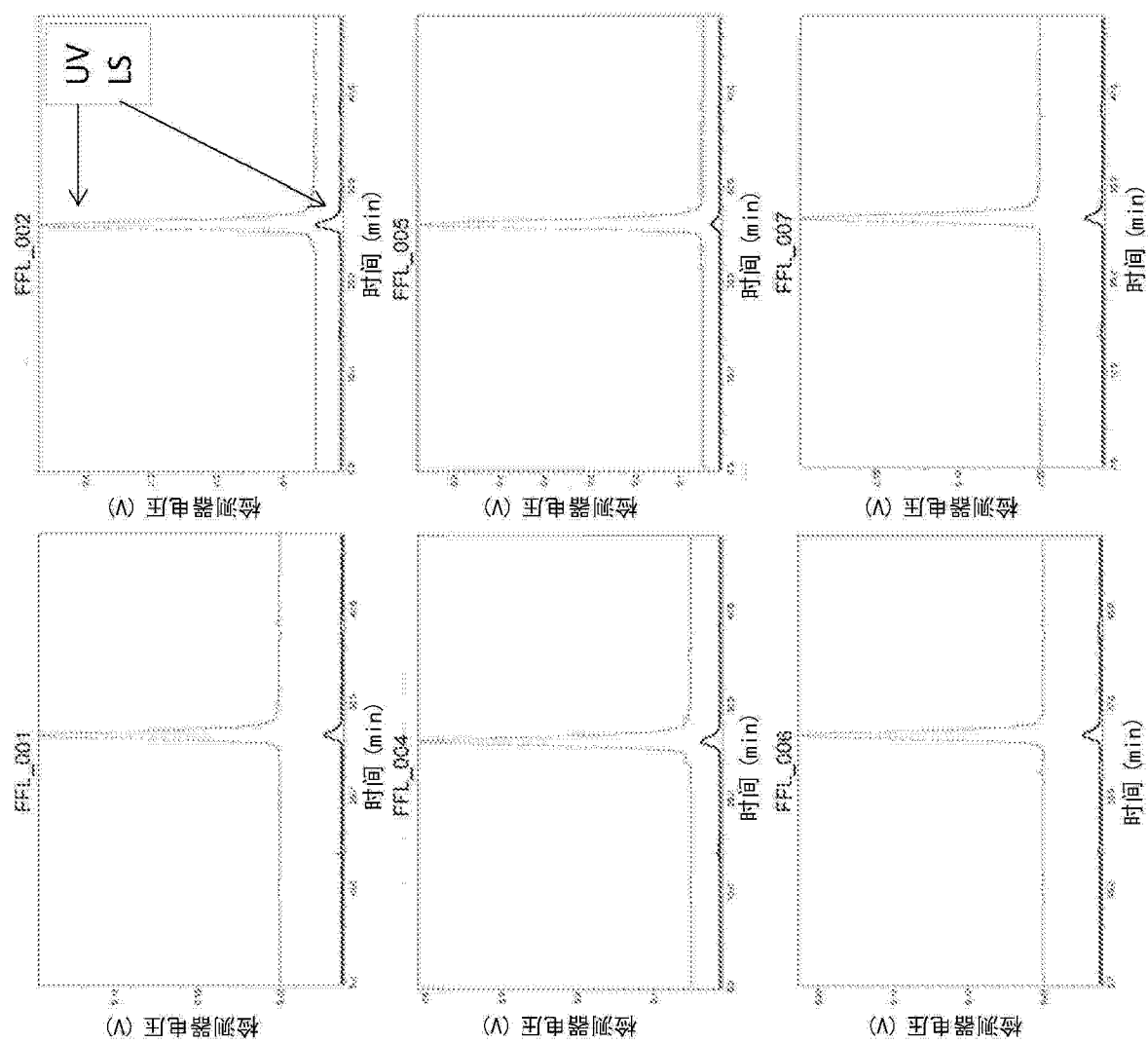


图 4

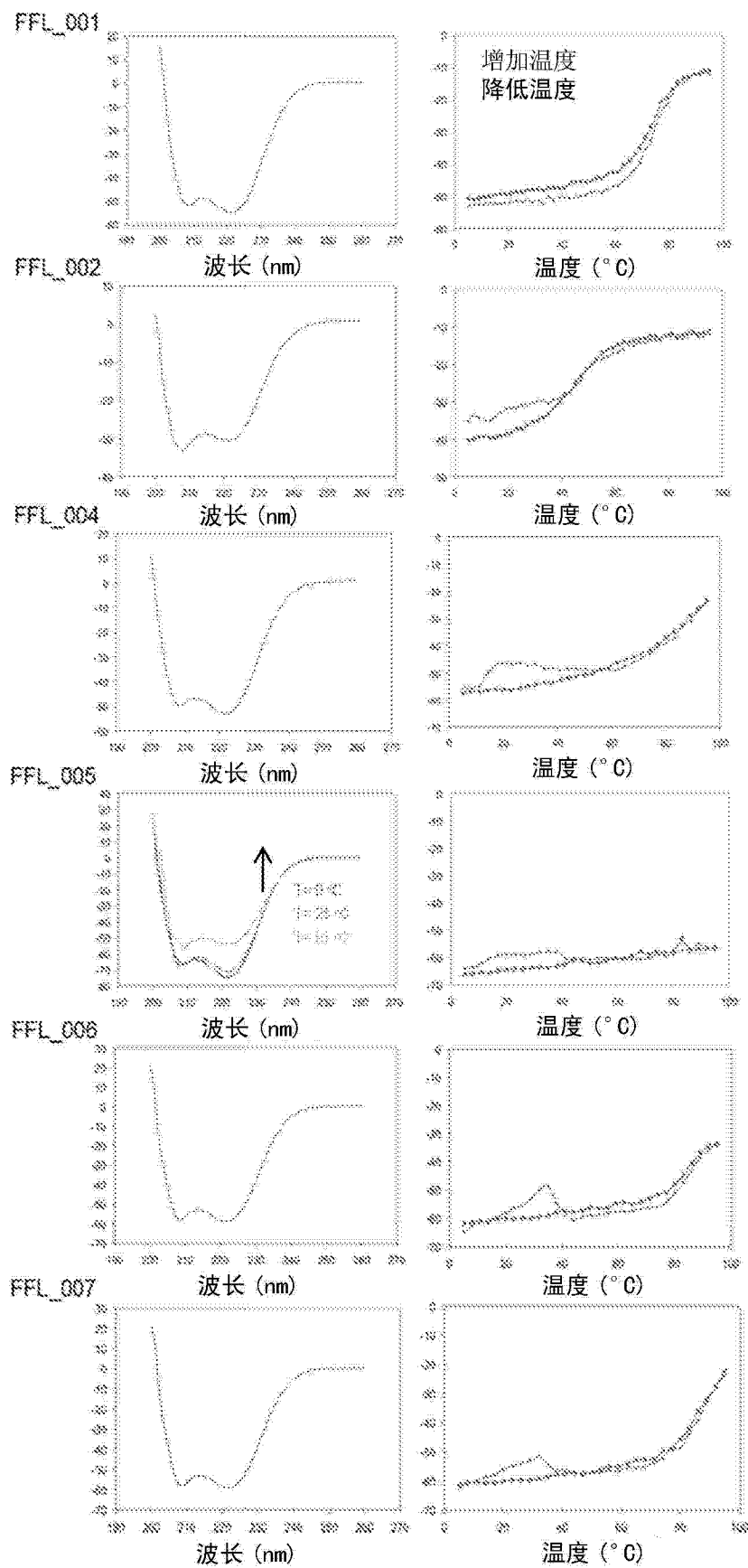


图 5

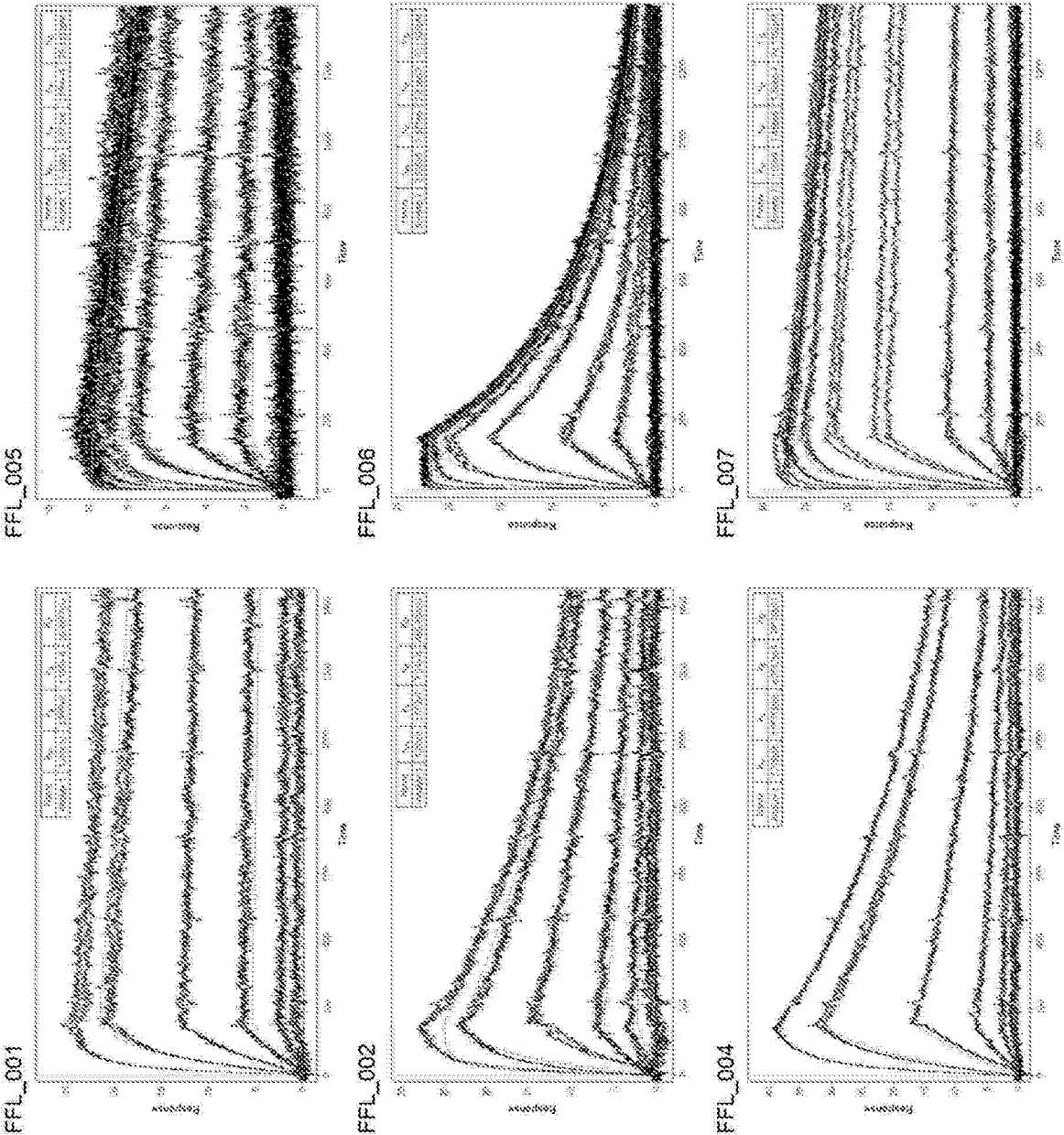


图 6

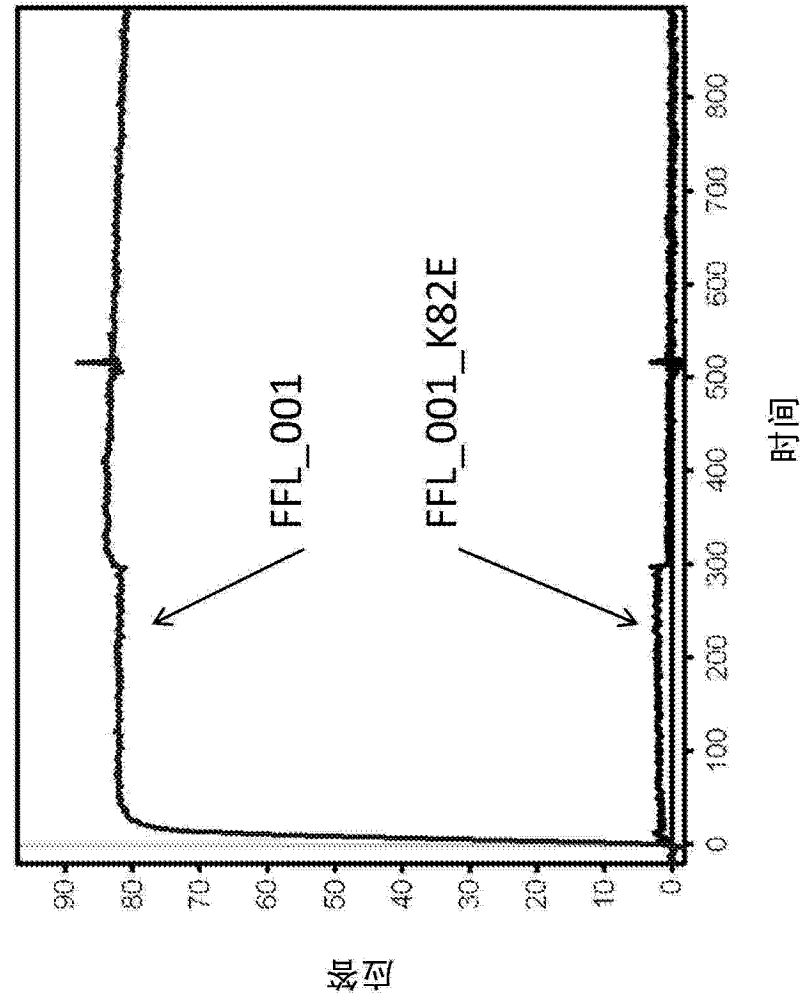


图 7

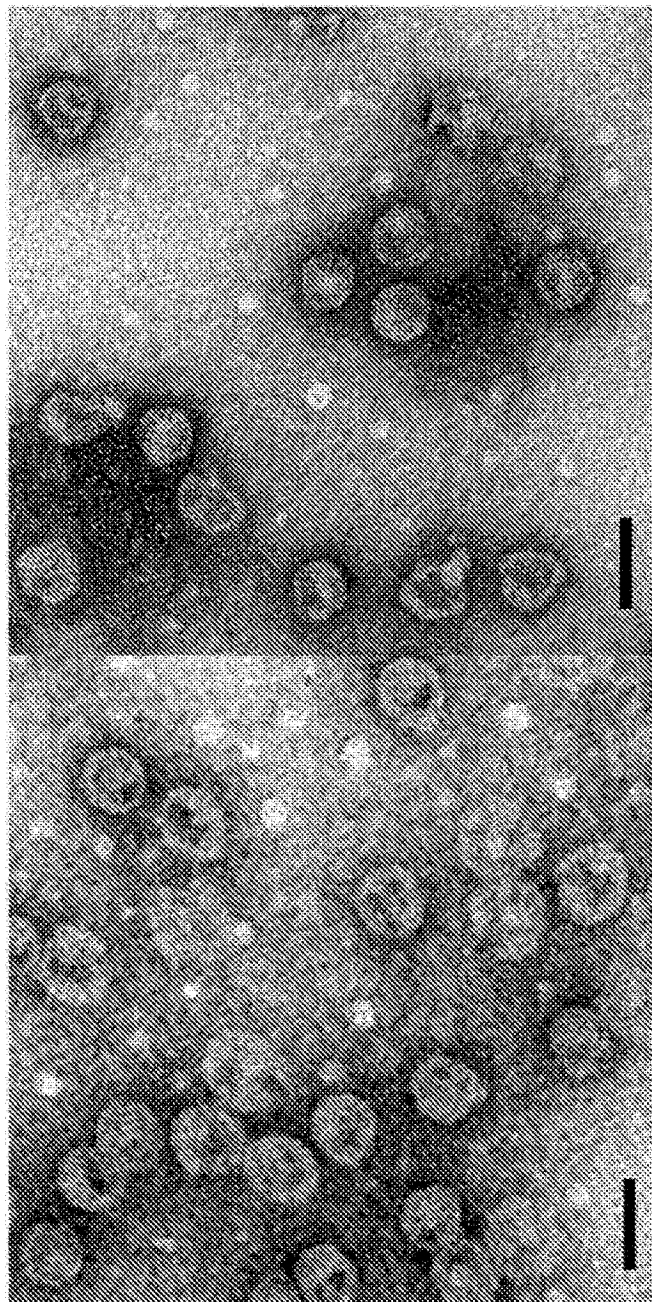


图 8