



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107441484 A

(43)申请公布日 2017. 12. 08

(21)申请号 201710660575.X

A61K 39/13(2006.01)

(22)申请日 2012.11.01

A61P 31/14(2006.01)

(30)优先权数据

PI2011005318 2011.11.03 MY

(62)分案原申请数据

201280066026.5 2012.11.01

(71)申请人 森提耐斯特治疗公司

地址 马来西亚槟城

(72)发明人 M·J·卡多萨 M·F·加米卢丁

S·B·哈密德

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

11127

代理人 庞东成 李栋修

(51)Int.Cl.

A61K 39/125(2006.01)

权利要求书1页 说明书30页

序列表2页 附图21页

(54)发明名称

针对人肠道病毒的抗原及疫苗

(57)摘要

本发明涉及针对人肠道病毒的抗原及疫苗。所述疫苗包含人肠道病毒C的病毒样颗粒,所述病毒样颗粒包括人肠道病毒C的VP0多肽、VP1多肽、VP2多肽、VP3多肽及VP4多肽,其中所述疫苗诱导针对人肠道病毒C的保护性免疫反应和/或中和免疫反应。

1. 一种疫苗,其包含人肠道病毒C的病毒样颗粒,
所述病毒样颗粒包括人肠道病毒C的VP0多肽、VP1多肽、VP2多肽、VP3多肽及VP4多肽,
其中所述疫苗诱导针对人肠道病毒C的保护性免疫反应和/或中和免疫反应。
2. 根据权利要求1所述的疫苗,其中,所述人肠道病毒C选自人脊髓灰质炎病毒1、人脊髓灰质炎病毒2及人脊髓灰质炎病毒3。
3. 一种表达盒,其包含与编码人肠道病毒C的P1多肽的核酸序列可操作地结合的启动子,其中所述编码人肠道病毒C的P1多肽的核酸序列与编码人肠道病毒C的内部核糖体进入位点(IRES)的核酸序列可操作地结合,其中编码所述内部核糖体进入位点(IRES)的核酸序列与编码人肠道病毒C的3CD蛋白酶的核酸序列可操作地结合,
其中所述人肠道病毒C的3CD蛋白酶处于所述内部核糖体进入位点(IRES)的翻译控制下。
4. 一种制造疫苗的方法,所述方法包括如下步骤:
将包含权利要求3所定义的表达盒的真核宿主细胞培养充分的时间,以生成人肠道病毒C的P1多肽和人肠道病毒C的3CD蛋白酶,并形成病毒样颗粒。
5. 根据权利要求4所述的方法,所述方法还包括如下步骤,即从所述真核宿主细胞和/或培养上清液回收所述病毒样颗粒。
6. 一种疫苗,其包含人肠道病毒C的病毒样颗粒,
所述病毒样颗粒包括人肠道病毒C的VP0多肽、VP1多肽、VP2多肽、VP3多肽及VP4多肽,
其根据权利要求4-5中任一项所定义的方法生成。
7. 权利要求1-2和6中任一项所述的疫苗在制备用于针对人肠道病毒C感染而对受试者进行免疫接种的药物中的应用。

针对人肠道病毒的抗原及疫苗

[0001] 本申请是分案申请,其原申请的国际申请号为PCT/IB2012/003114,中国国家申请号为201280066026.5,申请日为2012年11月1日,发明名称为“针对人肠道病毒的抗原及疫苗”。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种小核糖核酸病毒科的病毒,尤其涉及一种可有效地预防和治疗由该病毒引起的感染的抗原和疫苗。

背景技术

[0003] 小核糖核酸病毒是成为一些常见疾病的原因的各种病毒科的总称。在小核糖核酸病毒科中,肠道病毒属的病毒均具有密切的关系,所引发的常见疾病尤其多。

[0004] 每年全球有数百万人感染肠道病毒属的病毒,并且在受感染者的呼吸道分泌物(例如唾液、痰液或鼻涕等)和粪便中能够经常发现的肠道病毒感染肠道,但“肠道病毒(ENTEROVIRUS)”这个名称的词源出于“enteric(肠的)”。从历史上看,说起肠道病毒即脊髓灰质炎病毒所引起的最严重的疾病当属脊髓灰质炎。能够引发人类疾病的非脊髓灰质炎病毒有62种,其中23种为柯萨奇A病毒,6种为柯萨奇B病毒,28种为埃可病毒,5种为其他肠道病毒。脊髓灰质炎病毒与柯萨奇病毒和埃可病毒同样地,通过粪口途径传播。感染引起的症状范围广泛,包括轻微的呼吸道疾病(感冒),手足口病,急性出血性结膜炎,无菌性脑膜炎,心肌炎,严重的新生儿败血症样疾病,急性弛缓性麻痹等。

[0005] 在小核糖核酸病毒中,肠道病毒代表着作为基因组具有单股正链的RNA为特征的,多种多样的小RNA病毒群的属。由如下可知所有肠道病毒包含由约7500个碱基构成的基因组,并且因较低的复制保真度和频繁的重组而突变率非常高。感染宿主细胞后,基因组通过非帽依赖性翻译而被翻译成单一的多聚蛋白。该蛋白质通过由病毒编码的蛋白酶被切割成结构衣壳蛋白和非结构蛋白,这些蛋白质主要参与复制病毒。

[0006] 肠道病毒与多种人类疾病和哺乳动物的疾病有关。血清学的研究基于抗体中和试验,区分有66种人肠道病毒血清型。另外,基于变体菌株之间的减少交叉中或不可逆交叉中和(reduced or nonreciprocal cross-neutralization),在血清型中对抗原变体进行了追加性的定义。肠道病毒最初以人和动物的病因为基准分为脊髓灰质炎病毒、柯萨奇A病毒(CA)、柯萨奇B病毒(CB)及埃可病毒这4组,但很快就意识到属不同组的病毒的生物学特性显著地重叠。

[0007] 肠道病毒属包括以下十种:

[0008] ■牛肠道病毒

[0009] ■人肠道病毒A

[0010] ■人肠道病毒B

[0011] ■人肠道病毒C

[0012] ■人肠道病毒D

[0013] ■人鼻病毒A

[0014] ■人鼻病毒B

[0015] ■人鼻病毒C

[0016] ■猪肠道病毒B

[0017] ■猴肠道病毒A

[0018] 上述10种病毒具有多种血清型,例如:

[0019] 肠道病毒血清型的HEV71、EV-76、EV-89、EV-90、EV-91、EV-92及柯萨奇病毒A16是在人肠道病毒A中发现的。

[0020] 血清型柯萨奇病毒B1 (CV-B1)、CV-B2、CV-B3、CV-B4、CV-B5 (包括猪水泡病病毒[SVDV])、CV-B6、CV-A9、埃可病毒1 (E-1;包括E-8)、E-2、E-3、E-4、E-5、E-6、E-7、E-9 (包括CV-A23)、E-11、E-12、E-13、E-14、E-15、E-16、E-17、E-18、E-19、E-20、E-21、E-24、E-25、E-26、E-27、E-29、E-30、E-31、E-32、E-33、肠道病毒B69 (EV-B69)、EV-B73、EV-B74、EV-B75、EV-B77、EV-B78、EV-B79、EV-B80、EV-B81、EV-B82、EV-B83、EV-B84、EV-B85、EV-B86、EV-B87、EV-B88、EV-B93、EV-B97、EV-B98、EV-B100、EV-B101、EV-B106、EV-B107、EV-B110 (源自黑猩猩)及猴肠道病毒SA5是在人肠道病毒B中发现的。

[0021] 血清型EV-95、EV-96、EV-99、EV-102、EV-104、EV-105及EV-109是在人肠道病毒C中发现的。

[0022] 血清型EV-68、EV-70、EV-94是在人肠道病毒D中发现的。

[0023] 脊髓灰质炎病毒血清型的PV-1、PV-2、PV-3是在人肠道病毒C中发现的。

[0024] 肠道病毒感染引发的疾病包括脊髓灰质炎,其是因肠道病毒感染引发的疾病中最显著的疾病。然而,肠道病毒感染最常见的表现为非特异性发热性疾病。

[0025] 肠道病毒是儿童无菌性脑膜炎最常见的原因。在美国的30000至50000人的脑膜炎患者因肠道病毒而发病。脑炎作为肠道病毒感染的征候是一种罕见的事例,但发现当它发生时最频繁地引发脑炎的肠道病毒是埃可病毒9。

[0026] 由肠道病毒引起的胸膜痛的特点是伴有胸部和腹部的发热的阵发性剧烈疼痛,有时还伴有恶心、头痛及呕吐。

[0027] 心包炎和/或心肌炎通常是由肠道病毒引起的。还报告有心律不齐,心脏衰竭,心肌梗塞等症状。

[0028] 急性出血性结膜炎也是肠道病毒能够引发的疾病。

[0029] 手足口病是一种因感染柯萨奇病毒A或HEV71而引发的儿童疾病中最常见的疾病。

[0030] 2007年度的一项研究表明,肠道病毒相关的急性呼吸道或消化道感染可能成为慢性疲劳综合征的主要原因。

[0031] 包括HEV71、脊髓灰质炎病毒和柯萨奇病毒A16的肠道病毒属的成员均具有单链的正链RNA基因组。

[0032] 该RNA基因组具有编码多聚蛋白P1的单一的开放阅读框,多聚蛋白P1包括衣壳蛋白VP4、VP2、VP3、VP1及将多聚蛋白P1裂解成包括单独的衣壳蛋白VP1、VP3及VP0的病毒蛋白酶3C和3CD的非结构蛋白。VP0最终被裂解成VP2和VP4。衣壳蛋白可组装成病毒样颗粒(VLP)。

[0033] 人肠道病毒71 (HEV71) 和柯萨奇病毒A16是作为手足口病 (HFMD) 的主要病原体而

被广泛知晓的肠道病毒血清型。HEV71有时与各种中枢神经系统疾病有关。1969年在加利福尼亚州,以神经系统疾病的患者为对象进行的研究中,对HEV71进行分离及表征的案例首次获得成功。迄今为止,有关HEV71感染的宿主反应的分子机制还知之甚少,但一直被认为与编码趋化因子的mRNA、参与分解蛋白的蛋白质、补体蛋白质及促凋亡蛋白有关。

[0034] 手足口病(HFMD)是人柯萨奇病毒A16(CVA16)、柯萨奇病毒A10(CVA10)及人肠道病毒A71(HEV71)等人肠道病毒A群(小核糖核酸病毒科)造成的常见的自限性儿童疾病。虽然病毒排泄于粪便中,但在咽部分泌物中也能够检测出来。多以儿童之间的接触和环境污染为渠道而传染。该疾病以急性发热为特征,伴有手掌、脚掌、臀部和膝盖的皮疹或口腔粘膜的小水泡等。通常,症状经7~10天左右就会自然消失。患HFMD的儿童仅一小部分发展为严重疾病。

[0035] 表现为脑膜炎,脑炎,急性弛缓性麻痹,肺水肿和心力衰竭等综合征,主要与神经系统和心血管系统有关的重症疾病通常只以HEV71感染发病。在亚太地区最致命的神经系统综合征是脑干脑炎,其死亡率达40~80%。患重症HFMD的儿童需要几个月的时间来恢复,并且在某些情况下,神经损害可能是永久性的。目前,还没有针对HFMD的具体的抗病毒治疗方法和防止除小儿麻痹症以外的其他的肠道病毒感染的疫苗。

[0036] 1969年在加利福尼亚州,HEV71首次从因脑炎死亡的患儿分离成功,并于1974年首次报道。此后,虽然HEV71在全世界陆续被发现,但最近随着HEV71的致病形式在各地域出现,HFMD在亚洲区域性流行的可能性提高。死亡率很高的HFMD首次大量爆发是于1997年在马来西亚的沙捞越。与疫情相关的病毒则是HEV71。台湾在1998年发生流行性疾病时,曾出现129106例HFMD病症及405种重大疾病,并有78人死亡。新加坡于2000年~2001年期间报告有9000例的流行病发病。共有7人死亡。之后,新加坡每2~3年反复被流行性疾病的发生所困扰。2008年的头8个月间新加坡报道的HFMD的发病案例为19530例,一人死亡。从那时起不仅是新加坡,泰国、马来西亚、台湾、日本、韩国和越南也定期报道出大量HEV71疫情。

[0037] 中国于2007年报告了83344例的发病案例,并有17人死亡。2008年疫情从安徽省阜阳市爆发并蔓延至中国各地。新闻媒体对此次疫情进行了广泛报道,并着重报道了家长对子女健康问题的忧虑及卫生部门为了阻断传播链而关闭学校和托儿所等带来的社会混乱。此后,中国每年都有疫情爆发。

[0038] 关于属小核糖核酸病毒科的其他病毒造成的疾病,脊髓灰质炎自古以来就是仅在人类之间自然感染和流行而发生的传染性疾病。在发展中国家每年仍有很多人感染脊髓灰质炎。因此,根除脊髓灰质炎是一个持续的课题。

[0039] 脊髓灰质炎病毒在过去被分类为属小核糖核酸病毒科的肠道病毒属的种类。然而,现在脊髓灰质炎病毒种类已被肠道病毒属排除在外。脊髓灰质炎病毒被列入血清型,即分类为人脊髓灰质炎病毒1(PV-1)、人脊髓灰质炎病毒2(PV-2)以及人脊髓灰质炎病毒3(PV-3),并且,作为属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属的人肠道病毒C种的亚型所认知。2008年肠道病毒属中的模式种由脊髓灰质炎病毒变更为人肠道病毒C。

[0040] 人肠道病毒C种的亚型,即PV-1、PV-2、PV-3的特征为各自具有略微不同的衣壳蛋白。衣壳蛋白决定细胞受体特异性和病毒的抗原性。PV-1是自然界中最常见的形式,然而上述3亚型传染率均非常高,有可能成为影响脊髓而引发脊髓灰质炎的原因。

[0041] 人类肠道病毒C引起的感染一直被视为一个严重的问题。大规模预防接种时使用

灭活的全病毒疫苗且至今有效。能够通过索尔克 (Salk) 所开发的方法制造的灭活的脊髓灰质炎疫苗已获得良好的结果,并且在各方面进行了改善。通常,这种疫苗含有灭活脊髓灰质炎病毒的Mahoney、MEF1及Saukett菌株的混合物。

[0042] 尽管作为减毒口服脊髓灰质炎疫苗制造并使用减毒人肠道病毒C,但是减毒人肠道病毒C蕴藏着在接种对象的体内或通过病毒整体的接触而使致病性(瘫痪型神经毒力)复发的危险性。因此,需要开发一种彻底去除致病性的安全有效的脊髓灰质炎疫苗。

[0043] 与所有的其他肠道病毒一样,4种不同的人肠道病毒C的外壳多肽/衣壳多肽被指定为VP1、VP2、VP3及VP4。它们参与形成正二十面体病毒的衣壳。据说在通常情况下使用人肠道病毒C的各多肽进行免疫接种的结果,分离多肽无法在人类和动物的体内增加中和抗体(Meloen, et al., J. Gen. Virol., 45:761-763, 1979)。

[0044] 美国专利第4508708号指出,脊髓灰质炎病毒和手足口病病毒的各多肽,即VP1、VP2、VP3及VP4不具有在人和动物的体内增加中和抗体的功能,手足口病病毒的各多肽中仅VP1具备这种功能。另外,美国专利第4508708号明示,在人肠道病毒C2型MEF1病毒颗粒的VP1、VP2及VP3多肽中,只有VP3具有中和抗体的诱导功能,但抗体滴度较低。然而,发现VP1、VP2及VP3只能在使用相当于选择性地抑制小核糖核酸病毒的复制的大范围的抗病毒物质的阿立酮进行疫苗接种的情况下诱导中和抗体(Langford, et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy 28:578-580, 1985)。

[0045] 因此,要解决的问题是不使用抗病毒性化合物而制造一种提供针对人肠道病毒感染的保护性免疫的有效的疫苗的方法。作为需要保护性免疫的人肠道病毒,例如可以举出包括柯萨奇病毒A16及人肠道病毒71的人肠道病毒A;包括柯萨奇病毒B血清型、埃可病毒及肠道病毒血清型的人肠道病毒B;包括人脊髓灰质炎病毒1、人脊髓灰质炎病毒2及人脊髓灰质炎病毒3的人肠道病毒C;以及包括EV68的人肠道病毒D。

[0046] 为了实现本发明的目的,本领域技术人员将疫苗理解为包含由一个以上的病原性生物衍生的抗原,且施用于患者或动物时,对于来自所述或与其有关的病原性生物物的感染带来主动免疫和预防效果(即产生保护性免疫效果)的预防用物质或治疗用物质。

[0047] 此外,认为本领域技术人员对于保护性免疫应该非常了解,总之,保护性免疫至少是指使病毒中和的中和抗体和/或T细胞免疫反应的诱导或诱发。

[0048] 已知在疫苗领域中,有关病原体衍生的抗原是否会诱导保护性免疫的问题尚不明确。Ellis (Chapter 29 of Vaccines, Plotkin, et al. (eds) WB Saunders, Philadelphia, at page 571, 1998) 在“开发疫苗时的问题的关键在于特定本身可以诱导生成保护性抗体的病毒或微生物病原体的蛋白质成分,从而保护宿主不受病原体的攻击”中充分例证了这个问题。

[0049] 作为针对小核糖核酸病毒的疫苗的改进方法,尝试了能够诱导与由灭活全病毒疫苗生成的抗体同样的保护性抗体的,模拟病毒的衣壳结构或其组成要件的方法。这种方法从一开始就完全没有病原性复发的可能性,因此比死毒/灭活/减毒疫苗更加安全。

[0050] 所有小核糖核酸病毒共享包括P1基因内的4个结构基因,即VP1、VP2、VP3、VP4, VP4的相同的基因组结构。VP4和VP2一同被表达为VP0以及3C及3D基因中的病毒蛋白酶。裂解病毒蛋白酶P1基因,从而病毒组装成肠道病毒的病毒样颗粒(VLP),病毒衣壳粒、复合物和/或抗原。

[0051] 作为用于预防和治疗包括HEV71感染的肠道病毒感染的疫苗的基础,曾提出有使用包括作为肠道病毒的主要衣壳蛋白的VP1的亚单位疫苗的方法(Wu, et al., 2001),但成果一般。

[0052] 关于针对肠道病毒感染的预防方法,从据说能够诱导保护性抗体的死病毒疫苗的观点接近的方法是最容易想到的。然而,现状是由于病毒滴度过低,制造这种肠道病毒疫苗是接近冒险的行为。

[0053] 本发明涉及一种含有小核糖核酸病毒科的抗原性外壳蛋白/衣壳蛋白,且不具有有助于神经毒力的病毒RNA的疫苗。本发明的疫苗作为抗原能够相对于肠道病毒诱导中和抗体,且包括指定为多肽P1或VP0,或者VP1、VP2、VP3和/或VP4的衣壳蛋白(VP's),或者它们的免疫活性片段或生物活性片段。

[0054] 本发明涉及一种疫苗,其由小核糖核酸病毒抗原以1种以上的小核糖核酸病毒多肽,尤其是作为人肠道病毒多肽的VP2、VP3或VP0、其免疫原性片段和/或抗原决定簇的形式被表达。小核糖核酸病毒多肽可以通过使用人肠道病毒的氨基酸序列或核酸序列的DNA重组技术或化学合成来获得。

发明内容

[0055] 一种疫苗,其特征在于,所述疫苗包括由选自VP0、VP1、VP2、VP3、VP4及其免疫活性片段中的1种以上的人肠道病毒多肽构成的1种以上的免疫活性抗原。

[0056] 一种疫苗,其特征在于,例如所述疫苗诱导针对人肠道病毒的保护性免疫反应和/或中和免疫反应。

[0057] 一种疫苗,其特征在于,例如所述人肠道病毒选自人肠道病毒A、人肠道病毒B、人肠道病毒C及人肠道病毒D。

[0058] 一种疫苗,其特征在于,例如所述人肠道病毒A选自人肠道病毒71 (HEV71) 和柯萨奇病毒A16,所述人肠道病毒B选自柯萨奇病毒B和埃可病毒,所述人肠道病毒C选自人脊髓灰质炎病毒1、人脊髓灰质炎病毒2及人脊髓灰质炎病毒3,所述人肠道病毒D为EV68。

[0059] 一种疫苗,其特征在于,例如所述疫苗包括免疫活性肠道病毒VP0多肽。

[0060] 一种疫苗,其特征在于,例如所述疫苗包括免疫活性肠道病毒VP2多肽。

[0061] 一种疫苗,其特征在于,例如所述疫苗包括免疫活性肠道病毒VP3多肽。

[0062] 一种疫苗,其特征在于,例如所述疫苗包括免疫活性肠道病毒VP1多肽。

[0063] 一种疫苗,其特征在于,例如所述疫苗包括选自1种以上的肠道病毒种类或血清型的多肽。

[0064] 一种疫苗,其特征在于,例如所述肠道病毒种类或血清型可以是选自HEV71和柯萨奇病毒A16的人肠道病毒A。

[0065] 一种疫苗,其特征在于,例如所述肠道病毒种类或血清型可以是选自PV-1、PV-2及PV-3的人肠道病毒C。

[0066] 一种疫苗,其特征在于,例如1种以上的免疫活性抗原为病毒样颗粒、衣壳粒、复合物和/或聚集体的形式,所述1种以上的免疫活性抗原包括选自VP0、VP1、VP2、VP3、VP4及其免疫活性片段的1种以上的人肠道病毒多肽。

[0067] 一种疫苗,其特征在于,例如所述病毒样颗粒包括免疫活性肠道病毒VP0多肽。

- [0068] 一种疫苗,其特征在于,例如所述病毒样颗粒包括免疫活性肠道病毒VP2多肽。
- [0069] 一种疫苗,其特征在于,例如所述病毒样颗粒包括免疫活性肠道病毒VP3多肽。
- [0070] 一种疫苗,其特征在于,例如所述病毒样颗粒包括免疫活性肠道病毒VP1多肽。
- [0071] 一种针对肠道病毒感染对受试者实施疫苗接种的方法,其特征在于,所述方法包括对所述受试者施用有效量的由包括选自VP0、VP1、VP2、VP3、VP4及其免疫活性片段的1种以上的人肠道病毒多肽的1种以上的免疫活性抗原构成的疫苗,所述有效量是对所述受试者施用疫苗时能够有效地诱导针对人肠道病毒的保护性免疫反应和/或中和免疫反应的程度量。
- [0072] 一种方法,其特征在于,例如所述疫苗包括免疫活性肠道病毒VP0多肽。
- [0073] 一种方法,其特征在于,例如所述疫苗包括免疫活性肠道病毒VP1多肽。
- [0074] 一种方法,其特征在于,例如所述疫苗包括免疫活性肠道病毒VP3多肽。
- [0075] 一种方法,其特征在于,例如所述疫苗包括免疫活性肠道病毒VP2多肽。
- [0076] 一种方法,其特征在于,例如1种以上的免疫活性抗原为病毒样颗粒、衣壳粒、复合物和/或聚集体的形式,所述1种以上的免疫活性抗原包括选自VP0、VP1、VP2、VP3、VP4及其免疫活性片段的1种以上的人肠道病毒多肽。
- [0077] 一种方法,其特征在于,例如所述病毒样颗粒包括免疫活性肠道病毒VP0多肽。
- [0078] 一种方法,其特征在于,例如所述病毒样颗粒包括免疫活性肠道病毒VP2多肽。
- [0079] 一种方法,其特征在于,例如所述病毒样颗粒包括免疫活性肠道病毒VP3多肽。
- [0080] 一种方法,其特征在于,例如所述病毒样颗粒包括免疫活性肠道病毒VP1多肽。
- [0081] 一种方法,其特征在于,例如所述疫苗包括选自1种以上的肠道病毒种类或血清型的多肽。
- [0082] 一种方法,其特征在于,例如肠道病毒的所述种类或血清型可以是选自HEV71和柯萨奇病毒A16的人肠道病毒A。
- [0083] 一种方法,其特征在于,例如肠道病毒的所述种类或血清型可以是选自PV-1、PV-2及PV-3的人肠道病毒C。
- [0084] 一种表达盒,其特征在于,包括与编码人肠道病毒P1多肽的核酸可操作地结合的启动子、内部核糖体进入位点(IRES)、和编码人肠道病毒3CD蛋白酶的核酸。
- [0085] 一种表达盒,其特征在于,例如所述多肽是人肠道病毒P1。
- [0086] 一种表达盒,其特征在于,例如所述人肠道病毒3CD蛋白酶对所述人肠道病毒P1多肽进行处理。
- [0087] 一种表达盒,其特征在于,例如经处理的所述人肠道病毒P1多肽协助形成病毒样颗粒、衣壳粒、复合物和/或聚集体。
- [0088] 一种表达盒,其特征在于,例如所述人肠道病毒P1多肽包括选自VP0、VP1、VP2、VP3、VP4及其免疫活性片段的多肽的组合。
- [0089] 一种表达盒,其特征在于,例如所述人肠道病毒选自人肠道病毒A和人肠道病毒C。
- [0090] 一种表达盒,其特征在于,例如所述人肠道病毒A选自HEV71和柯萨奇病毒A16。
- [0091] 一种表达盒,其特征在于,例如所述人肠道病毒C选自人脊髓灰质炎病毒1(PV-1)、人脊髓灰质炎病毒2(PV-2)及人脊髓灰质炎病毒3(PV-3)。
- [0092] 一种表达盒,其特征在于,例如所述IRES是由脑心肌炎病毒(EMCV)衍生的。

- [0093] 一种表达盒,其特征在于,例如所述脑心肌炎病毒(EMCV)衍生的所述IRES已进行基因改造,IRES活性已降低。
- [0094] 一种表达盒,其特征在于,例如所述EMCV衍生的所述IRES通过向JK区段A6的分支环加入一个核苷酸(A7)来进行基因改造。
- [0095] 一种表达盒,其特征在于,例如所述IRES是由人肠道病毒衍生的。
- [0096] 一种表达盒,其特征在于,例如所述启动子为真核生物启动子。
- [0097] 一种表达盒,其特征在于,例如所述真核生物启动子是多角体蛋白启动子。
- [0098] 一种表达盒,其特征在于,例如所述启动子与编码人肠道病毒A的P1多肽、EMCV IRES及人肠道病毒A的3CD蛋白酶的核酸可操作地结合。
- [0099] 一种表达盒,其特征在于,例如所述EMCV IRES通过突变降低IRES活性。
- [0100] 一种表达盒,其特征在于,例如所述启动子与编码人肠道病毒A的P1多肽、HEV71 IRES及人肠道病毒A的3CD蛋白酶的核酸可操作地结合。
- [0101] 一种表达盒,其特征在于,例如所述启动子与对人肠道病毒A的P1多肽、人肠道病毒C IRES及人肠道病毒A的3CD蛋白酶进行编码的核酸可操作地结合。
- [0102] 一种表达盒,其特征在于,例如所述启动子与编码人肠道病毒C的P1多肽、人肠道病毒C IRES及人肠道病毒C的3CD蛋白酶的核酸可操作地结合。
- [0103] 一种表达盒,其特征在于,例如所述启动子与编码人肠道病毒C的P1多肽、HEV71 IRES及人肠道病毒C的3CD蛋白酶的核酸可操作地结合。
- [0104] 一种表达盒,其特征在于,例如所述启动子与编码人肠道病毒C的P1多肽、EMCV IRES及人肠道病毒C的3CD蛋白酶的核酸可操作地结合。
- [0105] 一种疫苗的制造方法,其特征在于,将VLP表达盒导入宿主细胞,在能够生成所述表达盒的多肽的期间,培养所述宿主细胞,通过所述宿主细胞和/或培养上清液回收人肠道病毒多肽。
- [0106] 一种方法,其特征在于,例如所述宿主细胞是真核细胞。
- [0107] 一种方法,其特征在于,例如所述真核细胞选自昆虫细胞,哺乳动物细胞株及酵母细胞。
- [0108] 一种方法,其特征在于,例如所述昆虫细胞选自草地夜蛾、粉纹夜蛾、果蝇及源自白纹伊蚊的蚊子细胞。
- [0109] 一种方法,其特征在于,例如所述哺乳动物细胞株选自CHO、HEK293、COS-1、HeLa、Vero及NIH3T3。

附图说明

- [0110] 图1表示HEV71的VLP表达盒[P1+IRES+3CD]及pSN01质粒。
- [0111] 图2表示HEV71的VLP表达盒[P1+IRES+3C]及pSN03质粒。
- [0112] 图3表示在SN07感染Sf9细胞的上清液中的VP1的表达。
- [0113] 图4表示在上清液和裂解液这两者中的已处理的VP1。
- [0114] 图5表示基于100kDa的截留分子量(MWCO)膜的超滤后的滞留物中的VP1及VP0。
- [0115] 图6表示生成中和抗体的免疫接种方案。
- [0116] 图7表示在3个取出后的经过时间中,从VP0(箭头)的多克隆兔抗血清探测的免疫

印迹。

[0117] 图8表示从以SN07感染Sf9细胞的上清液中的低聚抗原接受免疫接种的小鼠取出的混合中和血清。在ELISA法中对于重组VP2显示出了高滴度。

[0118] 图9表示从以SN07感染Sf9细胞的上清液中的低聚抗原接受免疫接种的小鼠取出的混合中和血清。与VP1相比,与VP2和VP0更牢固地结合。

[0119] 图10表示EMCV基因组的EMCV IRES区域(SEQ ID NO:1)。

[0120] 图11表示EMCV起始密码子与3CD蛋白酶编码序列的输出帧:天然IRES序列(SEQ ID NO:2)与突变IRES序列(SEQ ID NO:3)的比较。

[0121] 图12表示质粒pSN01-M1。

[0122] 图13表示质粒pSN01-M2。

[0123] 图14表示质粒pSN01-M3。

[0124] 图15表示用于HEV71 VLP的表达的不同设计的重组杆状病毒的表达的比较。

[0125] 图16表示质粒pFastBacTM HT。

[0126] 图17表示对人肠道病毒A及人肠道病毒C的抗原融合蛋白的原核表达构建体。

[0127] 图18表示来自从以SN07余量接受免疫接种的小鼠取出的混合中和血清的抗体。与HEV71 VLP的所有组成要件结合。

[0128] 图19表示HEV71 VLP的表征,是来自培养上清液的HEV71 VLP的沉降。

[0129] 图20表示亲和柱(AFC)的纯化HEV71 VLP的分析。

[0130] 图21表示AFC纯化HEV71 VLP的电子显微镜照片。

[0131] 图22表示人肠道病毒C(脊髓灰质炎病毒-PV)的VLP表达。

[0132] 图23表示脊髓灰质炎病毒的VLP VP3-VP1的ELISA。

[0133] 图24表示具有HEV71-IRES及HEV71 3CD蛋白酶的HEV71 VLP表达盒。

[0134] 图25表示具有PV-IRES及HEV71 3CD蛋白酶的HEV71 VLP表达盒。

具体实施方式

[0135] 本发明提供一种病毒,该病毒为从用于防止和/或治疗小核糖核酸病毒感染的免疫原性组合物和/或作为疫苗从小核糖核酸病毒科的病毒获得的,抗原的病毒样颗粒(VLP)、病毒衣壳粒、聚集体及复合物。代表性的例子包括肠道病毒,柯萨奇病毒和脊髓灰质炎病毒等。

[0136] 本发明的另一方式提供一种诱导中和抗体的病毒蛋白质,例如P1蛋白或小核糖核酸病毒的VP0蛋白、VP1蛋白、VP2蛋白、VP3蛋白和/或VP4蛋白的组合,或其免疫活性片段或生物活性片段。本发明还包括由上述病毒蛋白质和/或其片段构成的融合蛋白,该融合蛋白为诱导具有保护性免疫的中和抗体的生成的,免疫活性或生物活性蛋白。

[0137] 在实施方式中,肠道病毒的抗原可以是肠道病毒的外壳蛋白/衣壳蛋白的组合,或其免疫活性片段。该病毒的外壳蛋白/衣壳蛋白可以是VP0、VP1、VP2、VP3和/或VP4蛋白中的任一组合,也可以采取病毒样颗粒(VLP)、衣壳粒、复合物和/或聚集体中的任一形式。该组合可以以融合蛋白的形式存在。

[0138] 本发明的又一方式,包括生成小核糖核酸病毒科的病毒样颗粒(VLP)、衣壳粒、复合物和/或聚集体的方法。该方法包括以下步骤:(i)构建一种与启动子可操作地结合的表

达盒,该启动子由对小核糖核酸病毒的蛋白质,例如P1蛋白或小核糖核酸病毒的VP0蛋白、VP1蛋白、VP2蛋白、VP3蛋白和/或VP4蛋白的组合分别进行编码的1种以上的核酸构成,所述蛋白质与内部核糖体进入位点(IRES)可操作地结合,该IRES与3C或3CD蛋白酶可操作地结合的步骤,(ii)以该表达盒对适合的宿主细胞进行转染或转化的步骤,(iii)表达表达盒所包含的核酸后,在通过细胞在生成病毒样颗粒(VLP)和/或衣壳粒和/或抗原的条件下培养该宿主细胞的步骤。

[0139] 得到核酸或重组DNA分子,并由此可以将编码柯萨奇病毒A16、HEV71、人肠道病毒C(人脊髓灰质炎病毒PV1、PV2和/或PV3)、EV68或任何其他小核糖核酸病毒的蛋白质及蛋白酶的开放阅读框,通过使用补充柯萨奇病毒A16、HEV71、人肠道病毒C或任何其他小核糖核酸病毒的核酸序列的适当设计的引物的PCR扩增来进行扩增。合适的引物可以使用以往的技术根据能够从包括柯萨奇病毒A16、HEV71、人肠道病毒C或任何其他小核糖核酸病毒的肠道病毒得到的核酸序列进行设计。完整的基因组序列能够从GenBank得到,另外,可访问美国国立生物技术信息中心(NCBI)。

[0140] 在实施方式中,小核糖核酸病毒P1蛋白或其他肠道病毒P1蛋白表达为多肽。接着,该多肽由3C或3CD蛋白酶裂解成VP0、VP1及VP3病毒蛋白或其免疫活性片段或生物活性片段。肠道病毒蛋白诱导针对肠道病毒的中和抗体。该VP0蛋白可进一步裂解成诱导针对肠道病毒的中和抗体的VP2蛋白和VP4蛋白或其免疫活性片段或生物活性片段。也可使病毒蛋白质自组装成肠道病毒蛋白质的VLP、衣壳粒和/或聚集体。另外,该蛋白酶基因可被包括在VLP表达盒的相同的DNA重组分子或不同的DNA重组分子中,和/或可以从不同的启动子或翻译元件表达。

[0141] 构建VLP表达盒的重组DNA分子及核酸,由此,可以将编码小核糖核酸的结构蛋白或蛋白酶的开放阅读框通过使用补充柯萨奇病毒的核酸序列的适当设计的引物的PCR扩增来进行扩增。

[0142] 在另一实施方式中,该重组DNA分子可编码具有至少2种肠道病毒的结构蛋白或其一部分的融合蛋白。该蛋白质表达为单一多肽抗原。

[0143] 本发明包括提供肠道病毒的结构蛋白(P1区域)和针对蛋白酶(3CD)的基因序列的VLP表达盒。该遗传序列是为了将P1蛋白切割成病毒外壳的蛋白质所必须的。通过切割使肠道病毒VLP进行自组装。该表达盒是双顺反子载体,其使用位于针对肠道病毒的P1蛋白的核酸编码序列的上游的启动子。在编码P1蛋白质的顺反子的下游具有内部核糖体进入位点(IRES)序列,接着是包含编码3CD蛋白酶的核苷酸序列的顺反子。

[0144] P1区域和3CD蛋白酶的表达从单一双顺反子信使进行,其中,3CD蛋白酶基因在IRES的控制下实施帽非依赖方式翻译。蛋白酶3CD的表达稍有毒性,因此有可能导致宿主细胞的过早死亡。由此,降低了肠道病毒衣壳蛋白和VLP的产率。也可以以高水平维持来自表达盒的P1蛋白的表达式的同时,降低蛋白酶的活性。通过将包括突变型的各种IRES和IRES序列插入表达盒,从而以能够无细胞毒性地,适当地切割P1的方式,控制3CD蛋白酶的表达式/活性,并特定有效的IRES。为了高效生产VLP,对在来自不同的病毒种或血清型的IRES的控制下表达的具有完整P1编码序列和完整3CD蛋白酶编码序列的重组杆状病毒进行了测试。

[0145] 例如,本发明的表达盒可包含启动子,该启动子与编码人肠道病毒A的P1多肽、EMCV IRES及人肠道病毒A的3CD蛋白酶的核酸可操作地结合。

[0146] 本发明的表达盒可包含启动子,该启动子与编码人肠道病毒A的P1多肽、人肠道病毒C IRES及人肠道病毒A的3CD蛋白酶的核酸可操作地结合。

[0147] 本发明的表达盒可包含启动子,该启动子与编码人肠道病毒C的P1多肽、HEV71 IRES及人肠道病毒C的3CD蛋白酶的核酸可操作地结合。

[0148] 此外,本发明的表达盒可包含启动子,该启动子与编码人肠道病毒C的P1多肽、EMCV IRES及人肠道病毒C的3CD蛋白酶的核酸可操作地结合。

[0149] 此外,通过包含有效IRES的表达盒中的3CD蛋白酶的截断及突变,能够实现VLP的最大产量。例如,作为GenBank登录号DQ341362.1的氨基酸1671号的HEV71的3C蛋白酶的甘氨酸,通过针对突变HEV71 3C的表达的位点定点诱变和后续的HEV71 P1多肽的切割来转换为丙氨酸。

[0150] 与将来自表达盒的蛋白质的表达及活性提高至高水平的目标相关的本领域的一般性知识相反,实施方式中,本发明成功降低蛋白质的活性来实现了最高蛋白质产量。降低活性的IRES或3C蛋白酶核酸的突变意外地增加了肠道病毒的衣壳蛋白和VLP的产量。

[0151] 表达盒可以被克隆到合适的载体中,并转染/转化为与预防由包括肠道病毒的小核糖核酸病毒引起的感染的疫苗用抗原的表达/纯化有关的适合的宿主细胞。

[0152] 编码小核糖核酸病毒抗原的表达盒可包括能够转染到真核宿主细胞,并可以在适合的生长条件下表达的质粒。适合的真核表达系统是本领域技术人员已知的,并且包括诱导型表达系统和适合的真核宿主细胞。

[0153] 包含本发明的表达盒的哺乳动物细胞表达载体包括可被瞬时转染到宿主细胞及细胞株的载体。另外,哺乳动物细胞表达载体可以是以转染后的宿主细胞内稳定地维持的载体。

[0154] 并且,哺乳动物细胞的表达载体可包括稳定地或瞬时转染到哺乳动物宿主细胞或细胞株的载体。其中,作为试验对象的蛋白质的表达通过在培养基中添加诱导剂来诱导。哺乳动物宿主细胞和细胞株包括,例如CHO、HEK 293、COS-1、HeLa、Vero及NIH3T3细胞。另外,作为其他的真核宿主细胞也可以包括酵母细胞或其他哺乳动物细胞株。

[0155] 表达盒可以包含在可转染到宿主细胞的重组病毒中。能够用于这一目的适合的病毒包括杆状病毒、牛痘、辛德毕斯病毒、SV40、仙台病毒、逆转录病毒和腺病毒。适合的宿主细胞可以包括与上述病毒具有相容性的宿主细胞,可以包括例如草地夜蛾(例如Sf9细胞)、粉纹夜蛾、CHO细胞、鸡胚成纤维细胞、BHK细胞、人SW13细胞、果蝇及源自白纹伊蚊的蚊子细胞等昆虫细胞。

[0156] 包括肠道病毒核酸的表达盒可以通过本领域技术人员已知的方法引入到适合的宿主细胞中。宿主细胞在允许肠道病毒的基因及蛋白质的表达的条件下被生长和培养。

[0157] 编码诱导针对肠道病毒的中和抗体的肠道病毒的VP2蛋白或其免疫活性片段或生物活性片段的基因可被插入在含有合适的启动子的质粒中,并表达于宿主细胞中。为了用作疫苗或用于诊断用途,根据免疫原性组合物分离/利用所生成的肠道病毒的VP2蛋白。

[0158] 编码诱导针对肠道病毒的中和抗体的肠道病毒的VP4蛋白或其免疫活性片段或生物活性片段的基因可被插入在含有合适的启动子的质粒中,并表达于宿主细胞中。为了用作疫苗或用于诊断用途,根据免疫原性组合物分离/利用所生成的肠道病毒的VP4蛋白。

[0159] 编码诱导针对肠道病毒的中和抗体的肠道病毒的VP0蛋白或其免疫活性片段或生

物活性片段的基因可被插入在含有合适的启动子的质粒中,并表达于宿主细胞中。为了用作疫苗或用于诊断用途,根据免疫原性组合物分离/利用所生成的肠道病毒的VP0蛋白。

[0160] 编码肠道病毒的VP0蛋白的基因可以与合适的启动子可操作地结合,并插入到质粒中。该质粒表达结合有合适的启动子的肠道病毒蛋白酶以提供双重的重组质粒。该双重重组质粒可以最终表达在真核细胞表达系统或原核细胞表达系统中。

[0161] 用于肠道病毒多肽抗原的表达及对基因克隆的合适的载体包括粘粒或质粒。合适的表达系统包括本领域技术人员已知的包括原核生物表达系统和大肠杆菌,通过用于表达原核细胞内的蛋白质的粘粒或质粒进行转化的原核宿主细胞。

[0162] 另外,合适的表达系统包括本领域技术人员已知的真核表达系统和通过用于表达各种真核宿主细胞及细胞系中的蛋白质的质粒进行转化的真核宿主细胞。

[0163] 此外,肠道病毒的多肽抗原可通过那些本领域技术人员已知的方法从宿主细胞或培养物上清液中获得。

[0164] 肠道病毒VLP、衣壳粒、抗原及其免疫活性要件和/或其聚集体可通过本领域技术人员已知的适合的纯化方法,从转染和/或转化的宿主细胞或宿主细胞培养基、上清液及裂解液获得。释放到培养基中的蛋白质的分离是获得肠道病毒VLP、衣壳粒、抗原和/或聚集体的一种简便的方法。肠道病毒VLP、衣壳粒、抗原及其免疫活性要件和/或聚集体可通过本领域技术人员已知的方法进一步进行浓缩/纯化。

[0165] 本发明的另一方式包括一种含有小核糖核酸抗原的疫苗,该疫苗包括肠道病毒的抗原、VLP和/或衣壳粒与抗原性佐剂(adjuvant)的组合等。可将小核糖核酸病毒的抗原、其免疫活性片段、VLP和/或衣壳粒与改良型痘苗病毒、免疫刺激复合物(ISCOMS)、明矾、氢氧化铝、磷酸铝、弗氏不完全或完全佐剂、Quil A及其它皂苷或作为Vanselow(1987) S.Vet.Bull.57 881-896的实施例中记载的其他抗原性佐剂等适合的抗原性佐剂组合来使用。

[0166] 本说明书中使用的术语“磷酸铝”及“氢氧化铝”包括适合作为疫苗的佐剂的氢氧化铝或磷酸铝的所有形式。

[0167] 此外,小核糖核酸病毒的抗原可通过基于能够得到人脊髓灰质炎病毒的核酸或蛋白质序列的多肽化学合成或化学合成来制备。

[0168] 在一方式中,本发明提供包含1种以上的人肠道病毒C抗原的疫苗。如本说明书中引用的“脊髓灰质炎病毒抗原”或“人肠道病毒C抗原”这种表达是指能够刺激针对人肠道病毒C的中和抗体的任何抗原。病毒抗原可以包括外壳蛋白/衣壳蛋白或其片段、抗原决定簇和/或其他人肠道病毒C的蛋白质。

[0169] 本发明的另一方式涉及包括将单人肠道病毒C的外壳蛋白/衣壳蛋白作为抗原的,人肠道病毒C的亚单位疫苗。更具体地而言,本发明涉及一种疫苗,该疫苗作为抗原包括人肠道病毒C的VP2外壳蛋白/衣壳蛋白,或其免疫原性片段。

[0170] 本发明的另一方式包括一种疫苗,该疫苗包括包含人肠道病毒C的VP1、VP2、VP3和/或VP4或VP0蛋白的人肠道病毒C的病毒样颗粒(VLP)、衣壳粒、复合物和/或聚集体。

[0171] 获得重组DNA分子,由此可以通过使用补充人肠道病毒C的核酸序列的适当设计的引物的PCR扩增获得包含编码人肠道病毒C的结构蛋白或蛋白酶的开放阅读框的核酸。合适的引物可以根据从人肠道病毒的C得到的核酸序列,例如其完整的基因组序列,使用以往的

技术进行设计。完整的基因组序列可在GenBank中获得,此外,可以访问美国国立生物技术信息中心(NCBI)。针对人肠道病毒C的完整基因组、脊髓灰质炎病毒I型基因组的登录号为V01149和V01150。

[0172] 本发明的表达盒可以包括编码人肠道病毒C的P1多肽的核酸。P1多肽通过在表达盒的IRES的控制下被翻译的3CD蛋白酶被切割,并生成VP1、VP3和/或VP0多肽。VP0、VP1和VP3的组合自组装成病毒样颗粒。

[0173] 人肠道病毒C的多肽抗原可以包括作为进一步切割VP0而获得的生成物的人肠道病毒C的外壳VP2蛋白/衣壳蛋白VP2与其他脊髓灰质炎病毒VP0、VP1、VP3和/或VP4外壳蛋白/衣壳蛋白的组合。人肠道病毒C的外壳蛋白/衣壳蛋白的组合可采取病毒样颗粒(VLP)、衣壳粒、复合物和/或聚集体的形式。

[0174] 编码人肠道病毒C的外壳蛋白/衣壳蛋白VP2的基因可被插入到含有合适的启动子的质粒中,并表达在宿主细胞中。由于该蛋白质用作疫苗,因此基于免疫原性组合物被分离。此外,编码人脊髓灰质炎病毒的VP2蛋白的基因可被插入到含有合适的启动子的质粒中,并表达在宿主细胞中,由于该蛋白质用作疫苗,因此基于免疫原性组合物被分离/利用。

[0175] 编码人肠道病毒C的外壳蛋白/衣壳蛋白VP4的基因可被插入到含有合适的启动子的质粒中,并表达在宿主细胞中。由于该蛋白质用作疫苗,因此基于免疫原性组合物被分离。此外,编码人脊髓灰质炎病毒的VP4蛋白的基因可被插入到含有合适的启动子的质粒中,并表达在宿主细胞中,由于该蛋白质用作疫苗,因此基于免疫原性组合物被分离/利用。

[0176] 编码人肠道病毒C的外壳蛋白/衣壳蛋白VP0基因可被插入到含有合适的启动子的质粒中,并表达在宿主细胞中。由于该蛋白质用作疫苗,因此基于免疫原性组合物被分离。此外,编码人脊髓灰质炎病毒的VP0蛋白的基因可被插入到含有合适的启动子的质粒中,并表达在宿主细胞中,由于该蛋白质用作疫苗,因此基于免疫原性组合物被分离/利用。

[0177] 本发明包括包含由人肠道病毒C的VP0、VP1、VP2、VP3、VP4多肽及免疫活性片段中的1个以上构成的1种以上的免疫活性抗原的疫苗。该疫苗诱发针对人的肠道病毒的保护性免疫反应和/或中和免疫反应。

[0178] 在实施方案中,表达盒主要由编码人肠道病毒C的P1多蛋白的核酸、IRES及IRES的翻译控制下的肠道病毒的3CD蛋白酶构成。该蛋白酶将人肠道病毒C的P1多蛋白裂解成结构衣壳蛋白。

[0179] 在另一方式中,本发明提供一种疫苗,该疫苗包括从包含VP2、VP4和/或VP0蛋白,和/或生物活性片段或免疫活性片段的P1多蛋白衍生的人肠道病毒A抗原。人肠道病毒A抗原可源自HEV71和/或柯萨奇病毒A16。HEV71抗原可以是单人肠道病毒外壳蛋白/衣壳蛋白。尤其,HEV71抗原可以通过对人施用来诱导免疫反应的HEV71的P1多蛋白、VP4、VP2或VP0多肽,或其片段。

[0180] 在实施方案中,人肠道病毒A抗原可以是人肠道病毒A的外壳蛋白/衣壳蛋白,或其免疫活性片段的组合。例如,人肠道病毒A抗原可包括脊髓灰质炎病毒的VP2蛋白与选自VP1、VP3和/或VP4多肽的其他脊髓灰质炎病毒的外壳蛋白/衣壳蛋白的组合。VP2多肽与其他脊髓灰质炎病毒的外壳蛋白/衣壳蛋白的组合可以采取病毒样颗粒(VLP)、衣壳粒、复合物和/或聚集体的形式。另外,该组合也可以以融合蛋白的形式存在。

[0181] 更具体而言,本发明涉及一种疫苗,该疫苗包括人肠道病毒A的VP2外壳蛋白/衣壳

蛋白,或其免疫原性片段来作为抗原。

[0182] 本发明的另一方式包括一种疫苗,该疫苗包含由人肠道病毒A的VP1、VP2、VP3和/或VP4,或VP0蛋白构成的人肠道病毒A的病毒样颗粒(VLP)和/或衣壳粒。

[0183] 获得重组DNA分子,由此能够通过使用补充人肠道病毒A的核酸序列的适当设计的引物的PCR扩增来对所得编码人肠道病毒A的结构蛋白和/或蛋白酶的开放阅读框进行扩增。合适的引物根据能够从HEV71获得的核酸序列,使用以往的技术进行设计。针对HEV71的完整基因组序列的登录号为DQ341362,AB204852,AF302996和AY465356。

[0184] 获得重组DNA分子,由此能够通过使用补充人肠道病毒A的核酸序列的适当设计的引物的PCR扩增来对编码人肠道病毒A的P1、VP1、VP2、VP3和/或VP4或VP0蛋白和免疫活性片段及蛋白酶的开放阅读框进行扩增。

[0185] 本发明的一方式中,人肠道病毒A的P1蛋白被表达并形成多聚蛋白或多肽,接着多聚蛋白或多肽由3C或3CD蛋白酶裂解成VP0、VP1和VP3蛋白。VP0蛋白可进一步裂解成VP2及VP4蛋白。可使肠道病毒的蛋白质自组装成肠道病毒的蛋白质的VLP、衣壳粒、复合物和/或聚集体。另外,非结构基因和蛋白酶基因可被包含在相同的DNA重组分子或不同的DNA重组分子中和/或根据不同的启动子和翻译元件来表达。

[0186] 本发明的表达盒可以包括编码人肠道病毒A的P1多肽的核酸。P1多肽由在表达盒的IRES的控制下被翻译的3CD蛋白酶切割(裂解),并生成VP1、VP3及VP0多肽及其免疫活性片段。VP0、VP1及VP3多肽的组合可以自组装成病毒样颗粒。

[0187] 编码人肠道病毒A的VP2蛋白或其免疫活性片段的基因可被插入到含有合适的启动子的质粒中,并表达在宿主细胞中。由于HEV71的VP2蛋白用作疫苗或用于诊断用途,因此可基于免疫原性组合物被分离/利用。

[0188] 编码人肠道病毒A的VP4蛋白或其免疫活性片段的基因可被插入到含有合适的启动子的质粒中,并表达在宿主细胞中。由于被分离的VP4蛋白用作疫苗或用于诊断用途,因此可基于免疫原性组合物被分离/利用。

[0189] 编码人肠道病毒A的VP0蛋白或其免疫活性片段的基因可被插入到含有合适的启动子的质粒中,并表达在宿主细胞中。由于被分离的VP0蛋白用作疫苗或用于诊断用途,因此可基于免疫原性组合物被分离/利用。

[0190] 编码人肠道病毒A的VP0蛋白或其免疫活性片段的基因可与合适的启动子可操作结合并插入到质粒中。该质粒表示与合适的启动子结合的人肠道病毒A的蛋白酶,并提供双重的重组质粒。该双重重组质粒最终可以被表达在真核细胞表达系统或原核细胞表达系统中。

[0191] 包含在表达盒中的人肠道病毒A的基因及核酸可以通过本领域技术人员已知的方法被引入到适合的宿主细胞中。宿主细胞在允许人肠道病毒A基因及蛋白质的表达的条件下被生长培养。

[0192] 本发明包括包含由人肠道病毒A的VP0、VP1、VP2、VP3、VP4多肽及其免疫活性片段中的1个以上构成的1种以上的免疫活性抗原的疫苗。该疫苗诱发针对人的肠道病毒的保护性免疫反应和/或中和免疫反应。

[0193] 在一实施方案中,表达盒主要由编码人肠道病毒A的P1多蛋白的核酸、IRES及IRES的翻译控制下的肠道病毒的3CD蛋白酶构成。该蛋白酶将肠道病毒的P1多蛋白切割成肠道

病毒的结构衣壳蛋白。该结构蛋白可采取VLP、衣壳粒、复合物和/或聚集体的形式。

[0194] 实际上,本说明书所述的1种以上的肠道病毒的蛋白质的表达提供一种诱导抗体的抗原。该抗体为功能性抗体,且能够以高滴度中和选自HEV71、柯萨奇病毒A16、人肠道病毒C或其它小核糖核酸病毒的肠道病毒。

[0195] 1种以上的肠道病毒的蛋白质的表达表示VP2和/或VP0多肽含有通过中和抗血清识别的表位。

[0196] 这些功能性抗体意外地比起肠道病毒VP1多肽,与VP2及VP0多肽更牢固地结合。VP1多肽在本领域中已知为主要用于生成中和抗体的衣壳蛋白,因此VP2多肽在用于生产针对HEV71感染的中和抗体时起到重要的作用,这是出乎意料的。

[0197] 因此,令人惊讶的是,在肠道病毒的衣壳蛋白中,VP2多肽在生成针对肠道病毒感染的中和抗体时,起到显性表位或抗原决定簇的功能。HEV71的VP2多肽单独或与其它HEV71的衣壳蛋白,例如VP0多肽组合,作为诱导针对HEV71的中和抗体的主要抗原发挥作用。

[0198] 在本发明的一方式中,以预防肠道病毒感染为目的的预防性疫苗接种期待使用如下疫苗,即将人肠道病毒的VP0和/或VP2结构蛋白引入免疫原性组合物中的疫苗。免疫原性组合物或疫苗可以包含包括HEV71及柯萨奇病毒A16的从人肠道病毒A衍生的VP0或VP2结构蛋白或其组合。免疫原性组合物可施用于受试者,以诱导针对人肠道病毒的中和抗体。免疫原性组合物可被包括在为了预防由HEV71和/或柯萨奇病毒A16等人肠道病毒A引起的手足口病而施用于受试者的疫苗中。

[0199] 在本发明的另一方式中,以以下目的提供了治疗性疫苗,即预防和/或缓解HEV71和/或柯萨奇病毒A16感染引起的并发症,例如表现为脑膜炎,脑炎,急性弛缓性麻痹,肺水肿和心脏衰竭等综合征的神经系统或心血管并发症。

[0200] 在本发明的一方式中,以预防肠道病毒感染为目的的预防性疫苗接种期待使用如下疫苗,即包括人肠道病毒C的VP0或VP2结构蛋白,例如PV1、PV2、PV3结构蛋白或它们的组合,或者其生物活性片段或免疫活性片段进行组合的疫苗。免疫原性组合物可包括在为了预防由包含PV1、PV2、PV3的人肠道病毒C引发的脊髓灰质炎而施用于受试者的疫苗中。

[0201] 此外,免疫原性组合物或疫苗可以包括由人肠道病毒C和人肠道病毒A这两者衍生的抗原的组合。

[0202] 参考附图中的图示对本发明的各实施方式进行说明。在这些实施方式中,例示举出肠道病毒的VLP、衣壳粒、抗原及聚集体以及DNA重组分子的特定构建体。

[0203] 能够得出生成中和抗体时肠道病毒的VP2多肽非常重要的结论。可以说VP2多肽足以制作应对由人肠道病毒A的HEV71及柯萨奇病毒A16;人肠道病毒C的1型、2型、3型;及人肠道病毒D的EV68等的小核糖核酸病毒感染的疫苗。

[0204] 在本发明的一方式中,以预防小核糖核酸病毒感染为目的的预防性疫苗接种期待用于将病毒的至少VP0和/或VP2及VP4结构蛋白引入免疫原性组合物中的疫苗中。免疫原性组合物可以施用于受试者,以诱导针对小核糖核酸病毒的中和抗体。免疫原性组合物可以被包括在施用于受试者的预防小核糖核酸病毒感染为目的的疫苗中。

[0205] 在本发明的另一方式中,提供一种治疗性疫苗:以预防和/或缓解小核糖核酸病毒感染引发的并发症,例如,表现为脑膜炎、脑炎、急性弛缓性麻痹、肺水肿和心脏衰竭等综合征的神经系统或心血管系统的并发症。

[0206] 在本发明的又一方式中,提供一种作为药物来使用的基于本发明的疫苗组合物。

[0207] 在又一方式中,本发明提供一种包含肠道病毒VP0和/或VP2和/或VP4抗原的2价疫苗或多价疫苗。例如,可结合人肠道病毒A的VP0和/或VP2和/或VP4抗原。此外,从不同的血清型获得的人肠道病毒A的上述抗原,即可将从柯萨奇病毒A16及HEV71衍生的抗原与例如针对人手足口病的疫苗进行组合。

[0208] 能够由本说明书中记载的表达盒生成2价疫苗或多价疫苗的肠道病毒抗原。肠道病毒抗原可以为病毒样颗粒、衣壳粒、复合物和/或聚集体的形式。

[0209] 在又一方式中,本发明提供了一种包含肠道病毒抗原的2价疫苗或多价疫苗。该抗原在白喉(D)、破伤风(T)、百日咳(P)、b型流感嗜血杆菌(Hib)、A型肝炎(HA)、B型肝炎(HB)及人肠道病毒71型等病原体中的1个以上的病原体提供免疫力。

[0210] 在儿科疫苗中,也可包括具有兼容性的其他抗原,例如,已知有效预防B型脑膜炎、A型脑膜炎、C型脑膜炎及中耳炎的抗原。

[0211] 小核糖核酸病毒抗原在各疫苗的剂量中的量应选择能够诱发免疫保护反应,而不会伴有在接种疫苗的受试者中经常出现的不良副作用的量。所述量根据被采用的免疫原而变化。在特定疫苗中的最佳量可通过包括观察受试者的抗体滴度及其它反应的一系列的标准研究来确定。在最初的疫苗接种中,为了提供免疫保护反应,可间隔最佳时间间隔而施用2~3个剂量的疫苗。

[0212] 因此,本发明提供一种预防人感染小核糖核酸病毒的方法。该方法包括:以基于上述的本发明的方式中的1个方式的疫苗的免疫有效剂量对有需要的受试者实施治疗的方法。

[0213] 在本说明书和权利要求中,下述术语视为具有如下含义。

[0214] “抗体”是指生成具有由抗原(免疫原)在人或其它动物的体内诱发的特定的氨基酸序列的B淋巴样细胞的免疫球蛋白分子。该分子的特征为与抗原进行具体反应。

[0215] “抗体反应”或“体液免疫反应”是指一种由B淋巴样细胞生成的抗体根据抗原刺激分泌到血液和/或淋巴液中的类型的免疫反应。在正常发挥功能的免疫反应中,抗体在细胞(例如病原体)的表面上与抗原特异性结合,且标记为由吞噬细胞和/或补体介导机制所破坏的细胞。

[0216] “抗原”是指与适合的细胞接触的结果,诱发敏感性反应和/或免疫反应,在致敏受试者的体内或体外与抗体和/或免疫细胞明显反应的物质。

[0217] “表位”是指复合物抗原分子上的抗原决定簇的最简单的一种形式。这相当于通过免疫球蛋白或T细胞受体被识别的抗原的特定部位。

[0218] “融合蛋白”是指通过组合由不同的肠道病毒的结构蛋白衍生的2个以上的基因序列制成的多肽的表达而形成的蛋白质抗原。

[0219] “免疫活性片段”或“生物活性片段”是指诱导针对肠道病毒的中和抗体的肠道病毒的结构蛋白的片段。因此,在本发明的上下文中,为了实现特异性免疫反应,免疫活性片段更优选为了诱导呈现在生物体的免疫系统中,并预防性保护有机体免受肠道病毒的感染。

[0220] 中和抗体的免疫反应是指识别免疫系统的特异性细胞呈现异源蛋白、多肽或表位,并开始特异性免疫反应。

[0221] 在实施方式中,根据本发明的疫苗抗原可诱导保护性免疫反应。本说明书中使用的“保护性免疫反应”和/或“中和免疫反应”等术语是指疫苗受试者抵抗或保护自身免受作为接种疫苗的原因的基于致病因子的感染的方法。

[0222] “细胞反应”或“细胞宿主反应”是指一种以特定的辅助性和杀伤性T细胞为介质进行的,能够直接排除病毒感染或癌细胞的免疫反应。

[0223] “抗原呈递细胞”是指主要负责处理抗原及呈递至淋巴细胞的抗原诱导事件的辅助细胞。抗原呈递细胞(APC)与抗原的相互作用在淋巴细胞遭遇抗原分子并对其进行识别激活这一点在免疫诱导中是一个非常重要的步骤。作为APC可以举出巨噬细胞、郎格罕氏-树突状细胞、滤泡树突细胞及B细胞。

[0224] “B细胞”是指一种生成与抗原相互作用的免疫球蛋白或抗体的淋巴细胞。

[0225] “细胞毒性T淋巴细胞”是指一种生成病毒抗原,且能够破坏感染了外来细胞和传染性病原体的宿主细胞的特殊的淋巴细胞。

[0226] “主要包括”是指除必不可少的成分外,组合物内还可以存在其它成分,但即使存在其他成分,组合物的本质性的,基本的和/或新的特性也不会因该存在而受到影响。

[0227] “可操作地结合”是指所记载的成分彼此具有能够相互发挥预期的功能的关系。例如,启动子以能够生成单顺反子信使RNA、单个双顺反子信使RNA或单个多顺反子信使RNA(mRNA)的方式组合,该启动子与顺反子的,或1个以上的顺反子的核酸“可操作地结合”。信使RNA的蛋白质表达可以根据核酸序列的转录元件/翻译元件来调整。IRES序列在比顺反子更靠上游(5')侧的方向被插入到表达盒中是指,即,顺反子的核酸与IRES序列结合,以使顺反子mRNA的翻译在IRES的控制下被调整。

[0228] 如附图所示对本发明的各种实施方式进行说明。在这些实施方式中,例示举出小核糖核酸病毒的VLP、衣壳粒、抗原及聚集体以及DNA重组分子的特异性构建体。

[0229] 实施例1.有关HEV71的VLP表达盒及载体的说明。

[0230] 可以通过本领域周知的方法来构建表达盒。

[0231] 1.1HEV71的VLP表达盒[P1+IRES+3CD]

[0232] 特征:

[0233] 盒尺寸:5172bp

[0234] prPS:痘病毒合成的强早期/晚期启动子,43bp

[0235] P1:来自EV71-SB12736-SAR-03的P1蛋白的编码序列

[0236] 添加(GenBank登录号:DQ341362)终止密码子

[0237] 2588bp

[0238] IRES:内部核糖体进入位点,585bp

[0239] 3CD:来自EV71-SB12736-SAR-03的,C及D的P3蛋白的编码序列

[0240] 添加(GenBank登录号:DQ341362)ATG

[0241] 起始密码子和终止密码子,1940bp

[0242] Pac I:稀有切割限制酶(Rare cutters)、使盒被克隆到pSNX01

[0243] (MVA del 3整合载体)

[0244] 盒被克隆到pDONR221网关条目载体(Invitrogen公司),以生成pSN01。

[0245] 有关表达盒和pSN01质粒的示意图参考图1。

- [0246] 1.2HEV71的VLP表达盒[P1+IRES+3C]
- [0247] 特征:
- [0248] 盒尺寸:3773bp
- [0249] prPS:痘病毒合成的强早期/晚期启动子,43bp
- [0250] P1:来自EV71-SB12736-SAR-03的P1蛋白的编码序列
- [0251] 添加(GenBank登录号:DQ341362)终止密码子
- [0252] 2588bp
- [0253] IRES:内部核糖体进入位点,585bp
- [0254] 3CD:来自EV71-SB12736-SAR-03的,C的P3蛋白的编码序列
- [0255] 添加(GenBank登录号:DQ341362)ATG
- [0256] 起始密码子和终止密码子,551bp
- [0257] Pac I:稀有切割限制酶(Rare cutters)、使盒被克隆到pSNX01
- [0258] (MVA del 3整合载体)
- [0259] 盒被克隆到pDONR221网关条目载体(Invitrogen公司),以生成pSN03。
- [0260] 有关表达盒和pSN03质粒的示意图参考图2。
- [0261] 1.3包括插入HEV71[P1+IRES+3CD]或[P1+IRES+3C]的获得重组杆状病毒的方法
- [0262] HEV71的P1+3CD的源材料是pSN01,P1+3C是pSN03。其目的是按照Invitrogen公司BAC-TO-BAC®手册(2009)的指示,通过使用了LRCLONASE®的attL/aaR体外重组,将HEV71-VLP盒从pSN01及pSN03(输入向量)引进杆状病毒表达质粒pDEST8(目标载体)。
- [0263] 由此,构成两个重组反应。
- [0264] 生成pSN01(EV71-P1+3CD) × pDEST8:pSN07
- [0265] 生成pSN03(EV71-P1+3C) × pDEST8:pSN08
- [0266] 使用pSN07和pSN08,通过DH10bac的转化,以如Invitrogen公司BAC-TO-BAC®手册所记载的方式生成重组杆状病毒bacSN07和bacSN08。通过对重组杆粒进行向Sf9细胞的转染来拯救重组杆状病毒的SN07和SN08。重组杆状病毒的SN07和SN08被用于进一步进入于6个孔板中的感染Sf9细胞来评估被切割的衣壳蛋白的表达。对VP1使用特异的多克隆兔抗血清,在从感染了重组杆状病毒的Sf9细胞获得的裂解液及上清液的免疫印迹中特定VP1蛋白。
- [0267] 1.4感染了SN07的Sf9细胞的上清液中的VP1的表达
- [0268] 感染Sf9细胞的上清液为从感染后的第3天到第7天每日采取的上清液。将蛋白质分解在12%的SDS-PAGE,并转移至硝酸纤维素膜之后,将其用多克隆兔抗VP1抗血清(1:4000稀释率)检查一夜,然后以HRP偶联兔抗(1:1000稀释率)在室温下检查1小时。接着使用TMB实施免疫印迹法。将其结果示于图3。可知HEV71的VP1被切割,从感染后的第3天及第4天的上清液可以观察到蛋白质的表达,之后,VP1的表达量逐渐减少。通过感染Sf9细胞,重组杆状病毒的SN07生成能够在上清液中发现的抗原。
- [0269] 实施例2.上清液和裂解液这两者中切割完成的VP1。
- [0270] 用包括SN07、SN08、对照组的控制杆状病毒bacGUS及模拟感染的不同的重组杆状病毒株,使Sf9细胞以感染复数(MOI)10被感染。感染后的第3天和第4天获得上清液和裂解液,并使用兔抗VP1抗血清(1:4000稀释),通过免疫印迹法评估蛋白质的表达,并对由SN07

及SN08生成的蛋白质的产量进行比较。如图4所示,在感染后的第3天和第4天这两天,在上清液及裂解液这两者中,表达构建体SN07产生比表达构建体SN08更多的裂解VP1。

[0271] 实施例3.VP1和VP0存在于基于100kD的截留分子量(MWC0)膜的超滤后的滞留物中。

[0272] 将来自在感染后的第3天感染SN07的Sf9细胞的上清液净化,并使其与100kDa的MWC0一同通过AMICON®过滤器(Millipore公司)。对滞留物进行测试,并确认已切割的VP1和VP0的存在。VP1的分子量为约33kDa、VP0的分子量为约36KDa,因此认为这些蛋白质只能以低聚物的形式残留于滞留物中。如图5所示,这些抗原残留在通过100kDa的MWC0超滤器的上清液的滞留物中。这表明该抗原与低聚形式相关联。因此,能够得出如下结论,即VP1和VP0被切割,且与其他衣壳蛋白低聚关联。

[0273] 实施例4.当对小鼠接种该滞留物时,诱导针对HEV71的较强的中和抗体。

[0274] 将感染实施例3中制造的SN07的Sf9的上清浓缩物对2组远交小白鼠进行接种。所用的免疫接种方案示于图6。

[0275] 如表1所示,经免疫接种所有小鼠产生了中和HEV71的抗体。对小鼠进行接种时使用的滞留物诱导了针对HEV71的强中和抗体。

[0276] 表1.针对HEV71的中和抗体

[0277]	小鼠 ID	中和倒数滴度 (neut reciprocal titre)
	m1-1	160
	m1-2	640
	m1-3	≥2560
	m1-4	640
	m2-1	80
	m2-2	640
	m2-3	640
	m2-4	160
	对照 1	<10
	对照 2	<10

[0278] 因此,可以得出如下结论,即低聚型蛋白质能够诱导小鼠诱导中和抗体。

[0279] 低聚蛋白质可以用于免疫原性组合物和/或可包含在用于预防肠道病毒感染而施用的疫苗中。

[0280] 实施例5.VP0表达在感染SN07的Sf9细胞的裂解液中。

[0281] 使Sf9细胞被SN07感染,并获得在第72小时、第96小时及第120小时的裂解液。通过免疫印迹法探测针对EV71的VP0的兔多克隆抗血清。其结果,可知VP0在感染后第72小时被表达。如图7所示,VP0的一部分成为从感染后第96小时被裂解的VP2。因此,VP0和VP2这两者存在于SN07感染细胞的裂解液中。

[0282] 实施例6.从用感染SN07的Sf9细胞的上清液中的低聚抗原接受预防接种的小鼠取出的混合的血清。在ELISA法中对重组VP2显示出高滴度。

[0283] 以等量的重组VP1和VP2包覆ELISA板,并用于混合中和小鼠抗血清的测试。图8中示出接种由上清滞留物制造的抗原的小鼠比VP1更好地与VP2结合的情况。因此,可以得出以下结论,即该抗体为功能性抗体,且以高滴度中和HEV71。

[0284] 实施例7. 从用感染SN07的Sf9细胞的上清液中的低聚抗原接受预防接种的小鼠取出的混合中和血清。与VP1相比, 可与VP2和VP0更牢固地结合。

[0285] 图9所示的免疫印迹中, 混合中和小鼠抗血清即使在各孔中添加相同总量的蛋白质时, 也会比VP1更牢固地与VP2和VP0结合。这表明VP2和VP0含有通过中和抗血清识别的表位。

[0286] 这些功能性抗体比VP1更牢固地与VP2和VP0结合, 因此被认为VP2和VP0才是生成中和抗体所需的主要衣壳蛋白。实际上, 认为VP2在生成中和抗体时起到重要的作用。

[0287] 认为正是疫苗制剂中的VP2的存在, 在中和抗体的形成中是非常重要的。VP2在制造针对以下任一种病毒的疫苗时都具有很高的可能性, 该病毒包括HEV71、柯萨奇病毒A16、埃可病毒30及脊髓灰质炎病毒1型、2型及3型等的人肠道病毒A、B、C中的任一种。

[0288] 本发明包括生成针对脊髓灰质炎病毒的直接性免疫反应的方法, 该方法包括在本发明的范围内施用包含脊髓灰质炎病毒抗原的疫苗的有效量的步骤。

[0289] 实施例8. 中和抗体的水平的比较。

[0290] 包括HEV71的VP1的免疫原性组合物用于小鼠的预防免疫接种。同样地, 包含HEV71的VP2和/或VP0的免疫原性组合物也可用于小鼠的预防免疫接种。将通过HEV71的VP2和/或VP0接受预防接种的小鼠的中和抗体水平, 与通过HEV71的VP1接受预防接种的小鼠的中和抗体水平进行比较。通过HEV71的VP2和/或VP0接受预防接种的小鼠的中和抗体水平明显比通过HEV71的VP1接受预防接种的小鼠的中和抗体水平高。

[0291] 实施例9. 构建来自单一的双顺反子信使的, 针对人肠道病毒C的P1区域及蛋白酶3CD的表达的重组杆状病毒载体。

[0292] 本实施例提供一种方法, 其减少蛋白酶3CD介导的杆状病毒感染细胞的破坏, 由此有效地生成人肠道病毒C(脊髓灰质炎)的VLP。

[0293] 构建来自单一双顺反子信使的, 针对P1区域及蛋白酶3CD的表达的重组杆状病毒载体, 例如, 如图1所示。3CD蛋白酶基因是在EMCV IRES的控制下通过非帽依赖性翻译而被翻译的。该系统能够利用于调整蛋白酶3CD的表达。即, 评估突变的IRES序列, 找出与P1蛋白质相比生成少量的蛋白酶的最弱的IRES。

[0294] 双顺反子载体的构建中, 含有质粒位于相对于P1的编码序列的上游的多角体蛋白启动子。在编码P1的顺反子的下游具有脑心肌炎病毒(EMCV)的内部核糖体进入位点(IRES)序列(GenBank登录号: AF113968.2; 核苷酸1666~2251), 其次是含有编码蛋白酶3CD的核苷酸序列的顺反子。编码人肠道病毒C的P1及3CD的源材料可以访问美国模式培养物集存库(ATCC), 也可由周知的人肠道病毒C序列(能够经美国国立生物技术信息中心(NCBI)从GenBank获得)合成。

[0295] 重组杆状病毒按照制造商的说明使用BAC-TO-BAC®系统生成(Invitrogen公司)。简单地说, 使用LRCLONASE®通过attL/aaR体外重组将人肠道病毒C的VLP盒引入杆状病毒表达质粒pDEST8(使用目标载体)。在25℃下进行1小时的LRCLONASE®反应, 接着, 孵育(incubation)蛋白酶K。对LRCLONASE®反应混合物实施向库效率(Library Efficiency) DH5α感受态细胞的转化, 并得到表达克隆。从所得的菌落中分离DNA, 并通过限制酶分析确认人肠道病毒C盒的存在。通过T7换位重组, 将表达盒引入DH10bac细胞内的杆状病毒基因组中, 并构建重组杆粒。可由补充了50μg/ml的卡那霉素、7μg/ml的庆大霉素、10

μg/ml的四环素、100μg/ml的X-gal及40μg/ml的IPTG的LB琼脂培养基上的白色表型验证该重组杆粒。使用PureLink HiPure质粒DNA的小量制备试剂盒 (Invitrogen公司) 来纯化比DH10Bac大肠杆菌更高质量的杆粒DNA。使用来自插入物的M13正向引物、M13逆向引物及内部引物来确认人肠道病毒C盒的存在。使用EFFECTENE®转染试剂 (Qiagen), 通过将DNA转染成Sf9昆虫细胞来拯救重组杆状病毒。简单地说, 每个T25烧瓶中播种2百万的Sf9细胞, 并在28℃下通过培养6小时来粘着。使1微克的重组杆粒DNA再悬浮于150μl的DNA浓缩缓冲液中, 混合8μl的增强剂溶液并在室温下培养5分钟。接着, 将25μl的EFFECTENE®试剂加入到DNA混合物中, 并在室温下培养10分钟。将1ml培养基加入到含有转染复合物的管中, 并转移到细胞培养瓶中, 使其均匀地分布。在第3天, 通过离心分离5分钟来收获500g的上清液。接着进行转染, 获得高滴度的病毒原液。只要获得高滴度病毒原液, 就能够用于确定表达目标蛋白质的最佳时间。

[0296] 实施例10. 生成减少蛋白酶3CD介导的杆状病毒感染细胞的破坏的HEV71以及人肠道病毒C的VLP。

[0297] 本实验涉及针对来自单一双顺反子信使的P1区域及蛋白酶3CD的表达的重组杆状病毒载体的构建。蛋白酶基因3CD在EMCV IRES的控制下, 通过帽非依赖性翻译被翻译。示于图10。该系统能够利用于调整蛋白酶3CD的表达。即, 评估突变的IRES序列, 找出与P1蛋白质相比产生少量的蛋白酶的最弱的IRES。

[0298] 双顺反子载体的构建中, 含有质粒位于相对于P1的编码序列的上游的多角体蛋白启动子。在编码P1的顺反子的下游具有脑心肌炎病毒 (EMCV) 的内部核糖体进入位点 (IRES) 的序列, 其次是含有编码蛋白酶3CD的核苷酸序列的顺反子。参考图1。用于实施例1中的IRES包含天然EMCV IRES序列, 还存在变异型。图10中的天然EMCV IRES序列表示JK区段A6的分支环。通过添加1个核苷酸, 例如腺嘌呤 (A7), 从而能够减少表达。另外, 在实施例1中使用的构建体中, 3CD蛋白酶在氨基末端与脑心肌炎病毒的IRES融合。重要的是, EMCV的起始密码子与3CD蛋白酶编码序列的组框需大大减少下游基因的表达。参考图11。将两者的重组纳入pSN01的EMCV IRES序列, 并如图12所示命名为pSN01-M1。接着, 由DNA2.0进行合成。

[0299] 以表征从pSN01-M1的突变EMCV IRES表达的VLP的方式进行实验设计。重组杆状病毒按照制造商的说明使用BAC-TO-BAC®系统生成 (Invitrogen公司)。简单地说, 使用LR CLONASE®通过attL/aaR体外重组将HEV71的VLP盒引入杆状病毒表达质粒pDEST8 (使用目标载体) 中。在25℃下进行1小时的LRCLONASE®反应, 接着, 实施基于蛋白酶K的保温培养。对LRCLONASE®反应混合物实施向库效率 (Library Efficiency) DH5α感受态细胞的转化, 并得到表达克隆。从所得的菌落中分离DNA, 并通过限制酶分析确认HEV71/脊髓灰质炎病毒盒的存在。通过T7换位重组, 将pSN07-M1的表达盒引入DH10bac细胞内的杆状病毒基因组中, 并构建重组杆粒来获得bacSN07-M1。可由补充了50μg/ml的卡那霉素、7μg/ml的庆大霉素、10μg/ml的四环素、100μg/ml的X-gal及40μg/ml的IPTG的LB琼脂培养基上的白色表型验证该重组杆粒。使用PureLink HiPure质粒DNA的小量制备试剂盒 (Invitrogen公司) 来纯化比DH10Bac大肠杆菌更高质量的杆粒DNA。使用来自插入物的M13正向引物、M13逆向引物及内部引物来确认HEV71/脊髓灰质炎病毒盒的存在。使用EFFECTENE®转染试剂 (Qiagen), 通过将DNA转染成Sf9昆虫细胞来拯救重组杆状病毒。简单地说, 每个T25烧瓶中播种2百万的Sf9细胞, 并在28℃下通过培养6小时来粘着。使1微克的重组杆粒DNA再悬浮于

150 μ l的DNA浓缩缓冲液中,混合8 μ l的增强剂溶液并在室温下培养5分钟。接着,将25 μ l的EFFECTENE®试剂加入到DNA混合物中,并在室温下培养10分钟。将1ml培养基加入到含有转染复合物的管中,并转移到细胞培养瓶中,使其均匀地分布。在第3天,通过离心分离5分钟来收获500g的上清液。接着进行转染,获得高滴度的病毒原液。只要获得高滴度病毒原液,就能够用于确定表达目标蛋白质的最佳时间。为了对作为研究对象的蛋白质进行分析,在10%的Grace昆虫细胞培养基(Invitrogen公司)中使生长的Sf9细胞再悬浮于1%FBS的Sf900-II SFM培养基(Invitrogen公司)中而得到单细胞,并以每1ml百万的密度播种在烧瓶内之后,在28℃下培养4小时。将病毒原液以10MOI加入到PBS洗涤细胞中,轻轻摇动1小时。用PBS洗涤3次受感染的细胞,细胞在Sf900 II-SFM中以不同的时间点生长。将烧杯在室温下摇动30分钟来使细胞裂解于低渗douncing缓冲液(hypotonic douncing buffer) 1% TRITON®X-100 (TX-100) (1.5mM的MgCl₂, 50mM的KCl, 20mM的HEPES, 1%TX-100) 中,通过将从烧瓶回收的裂解细胞在4℃的温度下以7000rpm离心分离30分钟,获得细胞裂解液。将细胞裂解液和上清液的成分用特异性抗体通过免疫印迹法和ELISA法进行分析。

[0300] 实施例11.有效生成减少蛋白酶3CD介导的杆状病毒感染细胞的破坏的HEV71以及人肠道病毒C(脊髓灰质炎病毒)的VLP。

[0301] 来自单一双顺反子信使的针对P1区域及蛋白酶3CD的表达的重组杆状病毒载体的构建,例如在图1中示出。蛋白酶基因3CD在EMCV IRES的控制下,通过帽非依赖性翻译被翻译。示于图10。该系统能够利用于调整蛋白酶3CD的表达。即,评估突变IRES序列,找出与P1蛋白质相比产生少量的蛋白酶的最弱的IRES。

[0302] 双顺反子载体的构建中,含有质粒位于相对于P1的编码序列的上游的多角体蛋白启动子。在编码P1的顺反子的下游具有脑心肌炎病毒(EMCV)的内部核糖体进入位点(IRES)序列,其次是含有编码蛋白酶3CD的核苷酸序列的顺反子。参考图1。用于实施例1的IRES包含天然EMCV IRES序列,还存在变异型。天然EMCV IRES序列表示JK区段A6的分支环,能够通过添加1个核苷酸(A7)来减少表达。参考图10。A6分支环在EMCV IRES序列的pSN01变异成A7并命名为pSN01-M2,参考图13。接着,由DNA2.0进行合成。

[0303] 探测了从pSN01-M2的突变EMCV IRES表达的VLP的特征。重组杆状病毒按照制造商的说明使用BAC-TO-BAC®系统生成(Invitrogen公司)。简单地说,使用LRCLONASE®通过attL/aaR体外重组将HEV71的VLP引入杆状病毒表达质粒pDEST8(使用目标载体)。在25℃下进行1小时的LRCLONASE®反应,接着,实施基于蛋白酶K的保温培养。对LRCLONASE®反应混合物实施向库效率(Library Efficiency) DH5 α 感受态细胞的转化,并得到表达克隆。从所得的菌落中分离DNA,并通过限制酶分析确认HEV71/脊髓灰质炎病毒盒的存在。通过T7换位重组,将pSN07-M2的表达盒引入DH10bac细胞内的杆状病毒基因组中,并构建重组杆粒来获得bacSN07-M2。可由补充了50 μ g/ml的卡那霉素、7 μ g/ml的庆大霉素、10 μ g/ml的四环素、100 μ g/ml的X-gal及40 μ g/ml的IPTG的LB琼脂培养基上的白色表型验证该重组杆粒。使用PureLink HiPure质粒DNA的小量制备试剂盒(Invitrogen公司)来纯化比DH10Bac大肠杆菌更高质量的杆粒DNA。使用来自插入物的M13正向引物、M13逆向引物及内部引物来确认HEV71/脊髓灰质炎病毒盒的存在。使用EFFECTENE®转染试剂(Qiagen),通过将DNA转染成Sf9昆虫细胞来拯救重组杆状病毒。简单地说,每个T25烧瓶中播种2百万的Sf9细胞,并在28℃下通过培养6小时来粘着。使1微克的重组杆粒DNA再悬浮于150 μ l的DNA浓缩缓冲液中,

混合8 μ l的增强剂溶液并在室温下培养5分钟。接着,将25 μ l的EFFECTENE®试剂加入到DNA混合物中,并在室温下培养10分钟。将1ml培养基加入到含有转染复合物的管中,并转移到细胞培养瓶中,使其均匀地分布。在第3天,通过离心分离5分钟来收获500g的上清液。接着进行转染,获得高滴度的病毒原液。只要获得高滴度病毒原液,就能够用于确定表达目标蛋白质的最佳时间。为了对作为研究对象的蛋白质进行分析,在10%的Grace昆虫细胞培养基(Invitrogen公司)中使生长的Sf9细胞再悬浮于1%FBS的Sf900-II SFM培养基(Invitrogen公司)中而得到单细胞,并以每1ml百万的密度播种在烧瓶内之后,在28℃下培养4小时。将病毒原液以10MOI加入到PBS洗涤细胞中,轻轻摇动1小时。用PBS洗涤3次受感染的细胞,细胞在Sf900 II-SFM中以不同的时间点生长。将烧杯在室温下摇动30分钟来使细胞裂解于低渗douncing缓冲液1%TRITON®X-100 (TX-100) (1.5mM的MgCl₂,50mM的KCl,20mM的HEPES,1%TX-100)中,通过将从烧瓶回收的裂解细胞在4℃的温度下以7000rpm离心分离30分钟,获得细胞裂解液。将细胞裂解液和上清液的成分用特异性抗体通过免疫印迹法和ELISA法进行分析。

[0304] 实施例12.有效生成减少蛋白酶3CD介导的杆状病毒感染细胞的破坏的HEV71以及人肠道病毒C(脊髓灰质炎病毒)的VLP。

[0305] 来自单一双顺反子信使的针对P1区域及蛋白酶3CD的表达的重组杆状病毒载体的构建,例如在图1中示出。蛋白酶基因3CD在EMCV IRES的控制下,通过帽非依赖性翻译被翻译。参考图10。该系统能够利用于调整蛋白酶3CD的表达。即,评估突变的IRES序列,找出与P1蛋白质相比生成少量的蛋白酶的最弱的IRES。

[0306] 双顺反子载体的构建中,含有质粒位于相对于P1的编码序列的上游的多角体蛋白启动子。在编码P1的顺反子的下游具有脑心肌炎病毒(EMCV)的内部核糖体进入位点(IRES)序列,其次是含有编码蛋白酶3CD的核苷酸序列的顺反子。参考图1。用于实施例1的IRES包含天然EMCV IRES序列,存在变异型。在pSN01中,在3CD蛋白酶在氨基末端与脑心肌炎病毒融合。重要的是,EMCV的起始密码子与3CD蛋白酶编码序列的组帧需大大减少下游基因的表达。参考图11。重组纳入pSN01的EMCV IRES序列,并命名为pSN01-M3。参考图14。接着,由DNA2.0进行合成。

[0307] 探测了从pSN01-M3的突变EMCV IRES表达的VLP的特征。重组杆状病毒按照制造商的说明使用BAC-TO-BAC®系统生成(Invitrogen公司)。简单地说,使用LRCLONASE®通过attL/aaR体外重组将HEV71的VLP引入杆状病毒表达质粒pDEST8(使用目标载体)。在25℃下进行1小时的LRCLONASE®反应,接着,实施基于蛋白酶K的培养。对LRCLONASE®反应混合物实施向库效率(Library Efficiency) DH5 α 感受态细胞的转化,并得到表达克隆。从所得的菌落中分离DNA,并通过限制酶分析确认HEV71/脊髓灰质炎病毒盒的存在。通过T7换位重组,将pSN01-M3的表达盒引入DH10bac细胞内的杆状病毒基因组中,并构建重组杆粒来获得bacSN07-M3。可由补充了50 μ g/ml的卡那霉素、7 μ g/ml的庆大霉素、10 μ g/ml的四环素、100 μ g/ml的X-gal及40 μ g/ml的IPTG的LB琼脂培养基上的白色表型验证该重组杆粒。使用PureLink HiPure质粒DNA的小量制备试剂盒(Invitrogen公司)来纯化比DH10Bac大肠杆菌更高质量的杆粒DNA。使用来自插入物的M13正向引物、M13逆向引物及内部引物来确认HEV71/脊髓灰质炎病毒盒的存在。使用EFFECTENE®转染试剂(Qiagen),通过将DNA转染成Sf9昆虫细胞来拯救重组杆状病毒。简单地说,每个T25烧瓶中播种2百万的Sf9细胞,并在

28℃下通过培养6小时来粘着。使1微克的重组杆粒DNA再悬浮于150μl的DNA浓缩缓冲液中,混合8μl的增强剂溶液并在室温下培养5分钟。接着,将25μl的EFFECTENE®试剂加入到DNA混合物中,并在室温下培养10分钟。将1ml培养基加入到含有转染复合物的管中,并转移到细胞培养瓶中,使其均匀地分布。在第3天,通过离心分离5分钟来收获500g的上清液。接着进行转染,获得高滴度的病毒原液。只要获得高滴度病毒原液,就能够用于确定表达目标蛋白质的最佳时间。

[0308] 为了对作为研究对象的蛋白质进行分析,在10%的Grace昆虫细胞培养基(Invitrogen公司)中使生长的Sf9细胞再悬浮于1%FBS的Sf900-II SFM培养基(Invitrogen公司)中而得到单细胞,并以每1ml一百万的密度播种在烧瓶内之后,在28℃下培养4小时。将病毒原液以10MOI加入到PBS洗涤细胞中,轻轻摇动1小时。用PBS洗涤3次受感染的细胞,细胞在Sf900 II-SFM中以不同的时间点生长。将烧杯在室温下摇动30分钟来使细胞裂解于低渗douncing缓冲液1% TRITON®X-100 (TX-100) (1.5mM的MgCl₂, 50mM的KCl, 20mM的HEPES, 1%TX-100)中,通过将从烧瓶回收的裂解细胞在4℃的温度下以7000rpm离心分离30分钟,获得细胞裂解液。将细胞裂解液和上清液的成分用特异性抗体通过免疫印迹法和ELISA法进行分析。

[0309] 实施例13. 突变IRES构建体M2在上清液中表达高水平的VP1。

[0310] 将在野生型或突变型EMCV IRES的控制下表达HEV71衣壳蛋白的重组杆状病毒相对于来自EMCV IRES的HEV71的衣壳蛋白的表达水平进行评估。杆状病毒生成在来自实施例1的SN07的野生型EMCV IRES及3个突变型的IRES,即来自实施例10、11、12的M1、M2、M3的控制下表达的VLP,并基于HEV71衣壳蛋白的杆状病毒表达水平对该VLP进行评估。在该试验中还包括在不同的启动子下表达P1及3CD的重组杆状病毒(F)及表达bacGUS的控制重组杆状病毒(G)。如实施例10~12所述,以5MOI感染Sf9细胞,在第3天获得裂解液和上清液这两者。以抗VP1抗体探测裂解液和上清液,并检测HEV71的衣壳蛋白的表达。

[0311] 如图15的免疫印迹所示,当以抗体探测裂解液的VP1时,突变型M1及M2比被突变型的M3和2个启动子驱动的构建体表达更高水平的VP1。然而,突变型M2在上清液中生成更多的VP1。将这些数据示于上部面板上。

[0312] 图15的下部面板示出了在相对于杆状病毒的外壳蛋白的抗gp64抗体的控制下进行探测时的印迹。根据免疫印迹,各试样生成等量的杆状病毒。

[0313] 实施例14. 使用了杆状病毒表达系统的亚单位疫苗的克隆、表达及纯化。

[0314] 本发明涉及用于生成在作为单一免疫原融合并接受预防接种的个体中诱导保护性免疫反应的重组HEV71和脊髓灰质炎病毒的结构蛋白。本发明一般涉及制备重组HEV71和/或脊髓灰质炎病毒的亚单位蛋白,或其免疫原性片段及包含与重组HEV71和/或脊髓灰质炎病毒的亚单位融合蛋白仅组合的抗原性佐剂的由重组HEV71和/或脊髓灰质炎病毒衍生的融合蛋白疫苗组合物。HEV71及脊髓灰质炎病毒的亚单位融合蛋白可以包括选自VP1、VP2、VP3、VP4和它们的组合及它们的免疫原性片段的组合的衣壳蛋白。在本实施方式的一种方式中,重组HEV71和/或脊髓灰质炎病毒的融合蛋白包含HEV71或脊髓灰质炎病毒的亚单位蛋白及与HEV71或脊髓灰质炎病毒的亚单位蛋白遗传性关联的一种融合伴侣蛋白。本发明还期待提供如下方法,即生成在大肠杆菌中不仅表达杆状病毒,还表达VP0、VP4-VP2-VP3融合物、VP2-VP3-VP1融合物等亚单位疫苗的构建体的方法。

[0315] 为了从编码VP0、VP4-VP2-VP3融合物、VP2-VP3-VP1融合物的HEV71和/或脊髓灰质炎病毒生成cDNA,使用纯化的基因组病毒RNA进行反转录聚合酶链反应(高纯度核酸试剂盒、Roche公司)。根据基因的5'末端和3'末端制造正向引物和反向引物,且该引物包括起始密码子和终止密码子。扩增的PCR产物通过EcoRI和NotI限制性内切酶被消化,如图16所示,克隆到pFastBac HT载体(Invitrogen公司)。市售有来自Invitrogen公司的BAC-TO-BAC®表达系统,根据制造商的说明进行使用。融合基因被克隆到pFastBac HT供体质粒,重组蛋白质的生成基于BAC-TO-BAC®的杆状病毒表达系统(Invitrogen公司)。携带融合基因的pFastBac HT供体质粒实施利用基于T7换位重组的位点特异性重组向杆状病毒穿梭载体(杆粒)的转化。其结果,获得大肠杆菌菌株DH10Bac。DH10Bac细胞包括杆粒,杆粒赋予卡那霉素抵抗力和辅助质粒,辅助质粒编码转位并对四环素赋予抵抗力。具有所需基因的重组pFastBac HT质粒通过转位实现向DH10Bac细胞的转化,并生成重组杆粒。转化的细胞依次被稀释,各稀释液可附着在补充了50μg/ml的卡那霉素、7μg/ml的庆大霉素、10μg/ml的四环素、100μg/ml的X-gal及40μg/ml的IPTG的LB琼脂培养基上,并在37℃下培养至少48小时。取下白色的菌落并重新划线而确认到白色的表型。利用PureLink HiPure质粒DNA的小量制备试剂盒(Invitrogen公司)分离重组杆粒,并将DNA试样裂解于40μl的TE (10mM的Tris-HCl:pH8,1mM的EDTA)中,并用于转染。

[0316] 将分离的杆粒DNA通过PCR筛选,并找出插入所需基因。使用EFFECTENE®转染试剂(Qiagen),通过将DNA转染到Sf9昆虫细胞来拯救重组杆状病毒。简单地说,每个T25烧瓶中播种2百万的Sf9细胞,并在28℃下通过培养6小时来粘结。使1微克的重组杆粒DNA再悬浮于150μl的DNA浓缩缓冲液中,混合8μl的增强剂溶液并在室温下培养5分钟。接着,将25μl的EFFECTENE®试剂加入到DNA混合物中,并在室温下培养10分钟。将1ml培养基加入到含有转染复合物的管中,并转移到细胞培养瓶中,使其均匀地分布。在第3天,通过离心分离5分钟来收获500g的上清液。接着进行转染,获得高滴度的病毒原液。只要获得高滴度病毒原液,就能够用于确定表达目标蛋白质的最佳时间。为了对作为研究对象的蛋白质进行分,使在10%的Grace昆虫细胞培养基(Invitrogen公司)中生长的Sf9细胞再悬浮于1%FBS的Sf900-II SFM培养基(Invitrogen公司)中而得到单细胞,并以每1ml一百万的密度播种在烧瓶内之后,在28℃下培养4小时。将病毒原液以10MOI加入到PBS洗涤细胞中,轻轻摇动1小时。用PBS洗涤3次受感染的细胞,细胞在Sf900 II-SFM中以不同的时间点生长。将烧瓶在室温下摇动30分钟来使细胞裂解于低渗douncing缓冲液1%TRITON®X-100 (TX-100) (1.5mM的MgCl₂,50mM的KCl,20mM的HEPES,1%TX-100)中,通过将烧瓶回收的裂解细胞在4℃的温度下以7000rpm离心分离30分钟,获得细胞裂解液。在细胞中的异源蛋白质的表达,通过将SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和His Probe-HRP抗体(Thermo Scientific)作为探针的免疫印迹确认。只要确认杆状病毒的生成和蛋白质的表达,则病毒原液被扩增,生成携带所需基因的杆状病毒的浓缩原液。进一步确定感染昆虫细胞的病毒的最佳浓度及生成所希望的蛋白质的最佳时期。为了在变性状态下进行纯化,将细胞裂解于100mM的NaH₂PO₄、10mM的Tris、300mM的NaCl、10mM的咪唑含有6M的用胍盐-HCl的裂解缓冲液(pH值8.0)中。将悬浮液以1分/每脉冲,5个脉冲和60瓦的功率设定在冰上通过超声波分解,并在室温下混合1小时。将裂解液以27Kg离心分离30分钟,并消除细胞碎片。通过裂解缓冲液上样到成为预平衡状态的HisTrap (GE医疗保健生命科学)柱。上样之后,通过100mM的NaH₂PO₄、10mM的

Tris、300mM的NaCl及40mM的咪唑含有6M的尿素的溶液(pH值8.0,洗涤缓冲液1) 20柱体积对柱进一步进行洗涤。接着,通过100mM的NaH₂PO₄、10mM的Tris、300mM的NaCl及40mM的咪唑含有8M的尿素的溶液(pH值8.0,洗涤缓冲液2) 20柱体积对柱进一步进行洗涤。将结合蛋白质通过含8M尿素,100mM的NaH₂PO₄、10mM的Tris、300mM的NaCl、250mM的咪唑的缓冲液(pH值8.0,洗脱缓冲溶液2)洗脱。将含有蛋白质的组分在4℃下放置一晚,并对PBS进行混合和透析。使用TEV蛋白酶去除组氨酸标签,根据制造商的说明纯化蛋白质。

[0317] 实施例15. 大肠杆菌中进行人肠道病毒A及人肠道病毒C(脊髓灰质炎病毒)的亚单位疫苗的表达及纯化。

[0318] Champion™ pETSUMO表达系统(Invitrogen公司)在大肠杆菌中生成最高水平的可溶性蛋白质。具有小泛素相关修饰物(SUMO)融合物来提高表达融合蛋白的溶解性。表达后,能够将11kD的SUMO部分由具有高度特异性和活性的SUMO (ULP-1) 蛋白酶在羧基末端裂解。另外,包括用于检测和纯化蛋白质的N-末端6×His标签。

[0319] 如图17所示,用于HEV71及脊髓灰质炎病毒的抗原融合蛋白的pET SUMO-VP0、pET SUMO-VP4-VP2-VP3、pET SUMO-VP2-VP3-VP1的表达载体的构建如下述。VP0、VP4-VP2-VP3融合物、VP2-VP3-VP1融合物的片段用作HEV71和脊髓灰质炎病毒的亚单位疫苗用的抗原。SUMO主题和6×His标签与融合物的N末端偶联,分别辅助蛋白质的增溶和纯化。抗原融合蛋白通过包括将编码各蛋白质的cDNA序列克隆到表达载体中而形成pET SUMO-VP0、pET SUMO-VP0、pET SUMO-VP4-VP2-VP3和pET SUMO-VP2-VP3-VP1的表达载体的步骤的基因克隆技术而生成。在编码融合配偶体的DNA片段中使用包括正向引物和反向引物中的起始密码子和终止密码子的特异性引物来扩增PCR。PCR生成物的连结反应如下进行。添加新鲜的PCR生成物、10×连结反应缓冲液、pET SUMO载体(25ng/μl) 2μl及无菌水并设为总体积9μl,并添加1μl的T4DNA连接酶(4.0魏斯单位),并且将连结反应物在15℃中培养一晚之后,进行向OneShot® Mach1™-T1R(Invitrogen公司)感受态细胞的转化。选择10个菌落,并使用PureLink™ HQ迷你质粒纯化试剂盒(Invitrogen公司)来从菌落分离质粒DNA。通过限制性分析来分析该质粒,以确认插入物的存在和正确的方向。从重组体如上述分离质粒DNA,在质粒中实施向BL21(DE3) OneShot®细胞(Invitrogen公司)的转化。使转化细胞生长并进行多次的基于IPTG的表达来确定表达的最佳时间。在每个时间点,从诱导培养基和未诱导培养基移除500μl,使各细胞沉淀物再悬浮于80μl的SDS-PAGE试样缓冲液中。将煮沸的样品离心分离之后,将10μl的各样品上样到SDS-PAGE凝胶中并进行电泳。

[0320] 为了使用HisTrap镍柱(GE医疗集团生命科学)来扩展重组融合蛋白的纯化,导入以下程序。将过夜培养物(5%)接种到100~300ml的LB+50μg/ml的卡那霉素,并在2小时后用1mM的IPTG诱导。2小时后,以3000g离心分离10分钟来获得细胞。使沉淀物再悬浮于10%(培养物的总体积)的结合缓冲液(20mM的磷酸钠、0.5M的NaCl、20mM的咪唑、pH7.4)中。用Misonic UltraSonicate液体处理器,在冰桶每间隔1分钟,对细胞实施5次超声波分解。将超声波分解的试样在4℃下以4000rpm离心分离1小时,分离成可溶性和不溶性。使不溶性组分再悬浮于含6M的尿素的结合缓冲液中。将可溶性组分和不溶性组分这两者均在4℃下以4000rpm离心分离1小时,之后,使用0.22μm的过滤器单元过滤。使用结合缓冲液使HisTrap柱处于平衡状态,并将所过滤的试样上样到柱上。接着,用结合缓冲液和40mM的咪唑洗涤柱,并利用含有0.5M的咪唑(相对于不溶性组分为6M的尿素)的结合缓冲液洗脱重组蛋白

质。相对于所回收的试样,使用蛋白质用考马斯亮蓝染色协议进行测试。使用Tris-HCl缓冲液和Merck管对含有洗脱组分的纯的重组蛋白质进行透析。透析后,用Bradford试剂评估蛋白质的浓度。使用SUMO蛋白酶生成天然蛋白质,并按照制造商的说明来切割成包含SUMO和6×His标签的N末端肽。

[0321] 实施例16. 来自从以SN07滞留物接受预防接种的小鼠取出的混合中和血清的抗体。与HEV71 VLP的所有构成要件结合。

[0322] 将VP1、VP2及VP0的编码序列分别克隆到实施例15中所述的pET SUMO载体中。个别的衣壳蛋白在大肠杆菌中表达,并如实施例15中所述被纯化。在纯化的蛋白质的VP0、VP1、VP2、VP3中实施免疫印迹法,通过实施例4中使用的混合中和血清以1:1000稀释来进行探测。实施例4中所用的对照组的小鼠血清也使用于本实验中。

[0323] 根据图18中的免疫印迹法的结果可知,从以低聚抗原接受预防接种的小鼠取出的混合中和血清在感染SN07的Sf9细胞的上清液中与VLP的所有构成要件,即VP0、VP1、VP2及VP3结合。

[0324] 实施例17. HEV71 VLP的表征来自培养上清液的HEV71 VLP的沉降。

[0325] 将感染重组杆状病毒SN07的细胞获得的20ml的上清液与10ml的单克隆性抗体(EV18/4/D6-1/F1/G9)进行混合,并在室温下放置1小时。经由用PBS成为预平衡状态的MabSelect SuRe™(GE Health Care公司)重组蛋白质A的1ml柱(琼脂糖珠的尺寸:85μm)逐渐上样混合物,之后,用20ml的PBS洗涤并以0.5ml的0.1M甘氨酸-HCl (pH值3.0)洗脱。以30μl的Tris-HCl (pH值8.8)中和组分。对洗脱的组分依次进行SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色及脱色。

[0326] 根据图19,能够观察到通过考马斯蓝染色的SDS-PAGE凝胶中的VLP的构成要件(VP0、VP1及VP3)。

[0327] 实施例18. 亲和柱(AFC)纯化HEV71 VLP的分析。

[0328] 通过使用杆状病毒SN07的上清滞留物生成的单克隆中和抗体(EV18/4/D6-1/F1/G9)准备亲和柱(AFC)。对利用免疫印迹法洗脱的组分进行分析,将其结果示于图20。使用抗VP1抗体探测道1和道2的洗脱组分的结果可知,AFC纯化VLP中存在VP1。使用抗VP2抗体探测道3和道4的洗脱组分的结果可知,AFC纯化VLP中还存在VP2。使用抗VP2单克隆抗体探测道5和道6的洗脱组分的结果可知,AFC纯化VLP中存在VP2。

[0329] 实施例19. AFC纯化HEV71 VLP的电子显微镜照片。

[0330] 实施例18中,使用电子显微镜评估从亲和柱(AFC)洗脱的组分。将AFC纯化VLP的电子显微镜照片示于图21。用电子显微镜评估的结果可知,HEV71结构蛋白组装于VLP。

[0331] 实施例20. 使用了滞留物的小鼠的预防接种的研究。

[0332] 所用的抗原为如上述重组杆状病毒SN07的20倍浓缩粗质截留物。在交配后的早晨使用指示妊娠的阴栓,并视为胎生第0.5天。将100μl的滞留物混合于IMJECT®(明矾)的2次分量的剂量施用于胎生第3.5天的母畜的腹腔内。通过测量体重确认怀孕,并对胎生第17.5天的母畜施用2次分量。在初次施用疫苗之前,从各小鼠收集初始血液试样。自小鼠幼崽受到病毒攻击直到经过14天为止,每天收集试样。Balb/c小鼠分为3组,对20只进行预防接种并加以病毒攻击。对20只进行模拟免疫接种(mock immunized)并加以病毒攻击。对5只不进行接种且未加以病毒攻击。用50μl的含100×HD50的MP-26M的MP-26M病毒使出生5天的

小鼠幼崽被感染。每天观察2次被感染的动物直到自接种经过14天为止,观察疾病的临床症状。出现了包括生长迟缓、体重减少、侏儒综合征、脾胃虚弱、嗜睡、歪头、驼背、皱皮、脱水、体温过低、四肢麻痹的异常症状。麻痹根据以下标准计分:

[0333] 0:正常

[0334] 1:四肢无力,但仍然可以活动四肢

[0335] 2:无法活动患肢

[0336] 3:四肢麻痹,即完全无法活动四肢

[0337] 对患3级麻痹的动物进行麻醉,并使下颈椎脱位(HD₅₀)而使其安乐死。对于从靶器官切开的部位进行病理组织学检查。

[0338] 将保护免疫试验的结果示于下述表2中。

[0339] 表2. 保护被动感染时,显示83%的保护力

[0340]

疫苗	交配的小鼠数量	妊娠的小鼠数量	各母畜产下的幼崽数量	幼崽的总数	存活的幼崽数量	存活率	平均存活时间(天)
滞留物	20	2	1,5	6	5*	83%	14
明矾/PBS	20	2	5,7	12	0	0%	5
无疫苗/ 无病毒攻击	5+5	2+1	5,7,6	18	18	100%	14

[0341] 以VLP接受预防接种的小鼠中的2只产下幼崽。一只产下5只幼崽,并表现出母性且细心照料幼崽。另一只母畜产下的一只幼崽非常虚弱,母鼠也并没有细心照料幼崽。

[0342] 其结果可以得出以下结论,即接受预防接种的母体产下的幼崽中的83%对病毒攻击显示出了免疫力。

[0343]

在表 3 中示出病理组织学观察结果。

表 3. 病理组织学观察摘要 (N=无异常)

疫苗	年龄	P 1 天	小鼠	症状	脾	肝脏	心脏	骨骼肌	脊髓	脑
VLP	1 9	1 4	V 8 7 P 4	无感染的临床症状	N	N (1)	N	0. 5	N	N
	1 9	1 4	V 8 7 P 5	无感染的临床症状	N	N (1)	N	0. 5	N	N
	1 9	1 4	V 8 7 P 6	无感染的临床症状	N	N (1)	N	N	N	N
明矾/P BS	1 0	5	DC 4	3 级麻痹	N	N (2)	N	3	N	N
			DC 5	3 级麻痹	N	N (2)	N	3	N	N
			DC 6	3 级麻痹	N	N (2)	N	0 3	N	N
无疫苗	1 9	N I	V 1 1 6 P 4	无感染的临床症状	N	N (0. 5)	N	N	N	N
			V 1 1 6 P 5	无感染的临床症状	N	N (0. 5)	N	N	N	N

[0344] 5只小鼠产下幼崽,并纳入疫苗的保护免疫试验(妊娠率11%)。通过Reed-Muench法(1938年)计算出的人道终点(HD₅₀)被定为2.0×10²TCID₅₀的MP-26M。接受预防接种的母畜

产下的幼崽中有83%对病毒攻击显示出了免疫力。

[0345] 根据病理组织学发现,属于HEV71-VLP预防接种组的母鼠产下的3只幼崽虽然受到了HEV71病毒的攻击,但完全没有表现出感染的临床症状。

[0346] 然而,属于模拟免疫接种组(明矾/PBS)的母鼠产下的3只幼崽受到HEV71病毒的攻击并感染了病毒。属于未接种无疫苗的一组的母鼠产下的2只幼崽未表现出感染的临床症状。

[0347] VLP疫苗成功保护同母所生的幼鼠免受基因型B3的HEV71的小鼠适应株的致命攻击(接受预防接种的母鼠的6只幼崽中的5只/接受模拟预防接种的母鼠的12只幼崽中的0只)。

[0348] 实施例21.人肠道病毒C(脊髓灰质炎病毒-PV)的VLP表达。

[0349] 构建各种脊髓灰质炎病毒的表达盒,并生成脊髓灰质炎病毒VLP。表达盒包括所有的脊髓灰质炎病毒的P1多肽,但分别具有不同的IRES。IRES有助于诱导脊髓灰质炎病毒的3CD蛋白酶的表达。成为(PV-P1+HEV71-IRES+PV-3CD)、(PV-P1+EMCV-IRES+PV-3CD)及(PV-P1+PV-IRES+PV-3CD)的组合。对具有脊髓灰质炎病毒的VLP表达盒的重组杆状病毒进行测试。感染后第3天从杆状病毒感染细胞获得裂解液,并使用兔抗PVP3抗体(1:2000)评估脊髓灰质炎病毒VP3的表达。

[0350] 只有含PV-IRES构建体生成了所期望的尺寸的VP-3蛋白。当3CD蛋白酶在HEV71-IRES或EMCV-RES的控制下时,不同于PV-IRES构建体,脊髓灰质炎病毒VP3蛋白未被适当地切割,其结果,对脊髓灰质炎病毒VLP的生成产生不利影响。因此,具有PV-IRES的脊髓灰质炎病毒PV-VLP表达盒对生成脊髓灰质炎病毒VLP非常有效。

[0351] 实施例22.证明了基于ELISA法的脊髓灰质炎病毒PV-VLP组装。

[0352] 为了证明来自PV-VLP表达盒的脊髓灰质炎病毒VLP的生成,使用来自携带PV-VLP表达盒的重组杆状病毒的裂解液及上清液,实施双表位ELISA法。PV-3CD蛋白酶处于脊髓灰质炎病毒IRES的控制下。Sf9细胞被携带包括PV-IRES的PV-VLP表达盒的重组杆状病毒所感染。在感染后的第3天获得裂解液和上清液。使用双表位ELISA法对脊髓灰质炎病毒VLP的形成进行评估。

[0353] 双表位ELISA法中,通过准备被蛋白质A纯化的兔抗脊髓灰质炎病毒VP3抗体作为捕捉抗体,在涂料缓冲液,即pH9.6的0.05M碳酸氢盐缓冲液中稀释至50 μ g/mL。使100 μ l/孔的抗体分散于NUNC免疫板(immunoplate),并在4 $^{\circ}$ C中保存过夜。用PBST(0.05%)洗涤后,将免疫板用200 μ l/孔的封闭缓冲液,即裂解1%的酪蛋白的PBS,在室温下封闭2小时。来自携带PV-VLP表达盒的重组杆状病毒的裂解液及上清液的试样(PV-3CD蛋白酶在脊髓灰质炎病毒IRES的控制下)被稀释剂,即裂解0.2%酪蛋白的PBS稀释,并以100 μ l/孔被分散,在室温下孵育1小时之后,用PBST(0.05%)洗涤。

[0354] 为了检测VLP,用在PBS中稀释0.2%的酪蛋白的稀释剂以1:250的稀释比例稀释小鼠单克隆抗体,即抗VP1(克隆5-D8/1;Dako公司)来制备。将稀释的检测用的单克隆抗体以100 μ l/孔进行分散,在室温下孵育1小时。通过在PBS中裂解0.2%的酪蛋白的稀释剂以1:1000的稀释比例稀释抗鼠HRP偶联2 $^{\circ}$ 抗体来制备。用PBST(0.05%)洗涤板之后,使100 μ l/孔稀释的2 $^{\circ}$ 抗体分散,将板在室温下孵育1小时。以洗涤缓冲液的PBST(0.05%)洗涤板。将SureBlueTMTMB 1(KPL)成分微孔过氧化物酶底物以100 μ l/孔分散,并在室温下培养10分钟

使其成长。添加100 μ l/孔的终止液,即5mM的NaOH,并使反应终止。以650nm的光密度读取各孔的吸光度。

[0355] 根据如图23所示的双表位ELISA法的结果可知,VP1蛋白和VP3蛋白显示VLP实际上由PV-VLP表达盒形成的相互关联。

[0356] 实施例23.具有HEV71 IRES (P1+HEV71 IRES+3CD)的HEV71 VLP表达盒的构建体。

[0357] 具有HEV71-IRES的HEV71的HEV71 VLP盒的概略结构示于图24。除了3CD蛋白酶的表达是基于HEV71 IRES,而不是EMCV IRES这一点外,该表达盒类似于实施例1所示的构建体(pSN01)。能够在GenBank中查找HEV71 IRES序列(登录号DQ341362.1;核苷酸1~747)。按照Invitrogen公司的BAC-TO-BAC®手册(2009)的说明,通过使用LRCLONASE®的attL/aaR体外重组将含有载体的HEV71表达盒引入到杆状病毒表达质粒pDEST8(目标载体)中。入门载体和pDEST8之间的重组生成表达克隆。表达克隆如Invitrogen公司的BAC-TO-BAC®手册中所记载,通过DH10bac的转化生成重组杆粒。向Sf9细胞的重组杆粒的转染拯救携带具有P1、HEV71 IRES及3CD的表达盒的重组杆状病毒。

[0358] 使Sf9细胞进一步被感染,在6孔板中能够以所拯救的重组杆状病毒评估已切割的衣壳蛋白的表达。对VP1、VP0及VP3是特异性的多克隆兔抗血清对来自感染重组杆状病毒的Sf9细胞的裂解液和上清液实施免疫印迹法,从而特定组装的VLP。

[0359] 实施例24.具有PV-IRES (P1+PV-IRES+3CD)的HEV71 VLP表达盒的构建体。

[0360] 除了3CD蛋白酶的表达是基于脊髓灰质炎病毒IRES (PV-IRES),而不是HEV71-IRES这一点外,该表达盒类似于实施例24所示的表达盒。能够在GenBank中查找脊髓灰质炎病毒IRES序列(登录号V01150.12;核苷酸1~628)。

[0361] 按照Invitrogen公司的BAC-TO-BAC®手册(2009)的说明,通过使用LRCLONASE®的attL/aaR体外重组将含有载体的HEV71表达盒引入到杆状病毒表达质粒pDEST8(目标载体)中。入门载体和pDEST8之间的重组反应生成表达克隆。表达克隆如Invitrogen公司的BAC-TO-BAC®手册中所记载,通过DH10bac的转化生成重组杆粒。向Sf9细胞的重组杆粒的转染拯救携带具有P1、PV IRES及3CD的表达盒的重组杆状病毒。

[0362] 使Sf9细胞进一步被感染,在6孔板中能够以所拯救的重组杆状病毒评估已切割的衣壳蛋白的表达。对VP1、VP0及VP3是特异性的多克隆兔抗血清对来自感染重组杆状病毒的Sf9细胞的裂解液和上清液实施免疫印迹法,从而特定组装的VLP。

序列表

<110> Cardoso, Mary Jane

Jamiludden, Mohamad

Hamid, Sharifah Binti

<120> 针对人肠道病毒的抗原及疫苗

<130> 3IPSN1.0001W0

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 586

<212> RNA

<213> 脑心肌炎病毒

<220>

<221> misc_feature

<223> 内部核糖体进入位点

<400> 1

gccccucucc ccccccccc ccuaacguua cuggccgaag ccgcuuggaa uaaggccggu 60
guguguuugu cuauauguga uuuuccacca uauugccguc uuuuggcaau gugaggggccc 120
ggaaaccugg ccugucuuuc uugacgagca uuccuagggg ucuuuccccu cucgccaaag 180
gaaugcaagg ucuguugaau gucgugaagg aagcaguucc ucuggaagcu ucuugaagac 240
aaacaacguc uguagcgacc cuuugcaggc agcggaaccc cccaccuggc gacaggugcc 300
ucugcggcca aaagccacgu guauaagaua caccugcaaa ggcggcacia ccccagugcc 360
acguugugag uuggauaguu guggaaagag ucaaauggcu cuccucaagc guagucaaca 420
aggggcugaa ggaugcccag aagguacccc auuguauggg aaucugaucu ggggccucgg 480
ugcacaugcu uuacaugugu uuagucgagg uuaaaaaagc ucuaggcccc ccgaaccacg 540
gggacguggu uuuccuuuga aaaacacgau gauaagcuug ccacia 586

<210> 2

<211> 38

<212> RNA

<213> 脑心肌炎病毒

<400> 2

augauaaau gacuucgaaa guuuauauc cagaacaa 38

<210> 3

<211> 49

<212> RNA

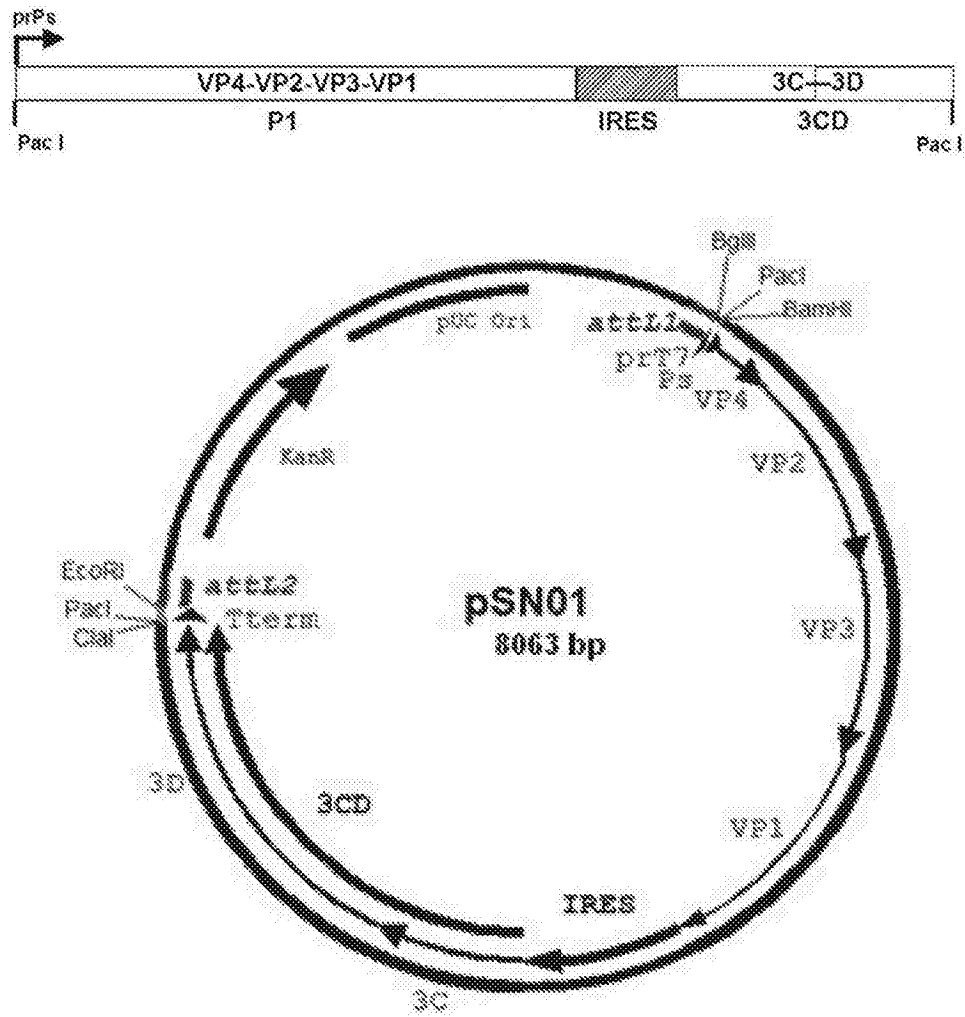
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成突变

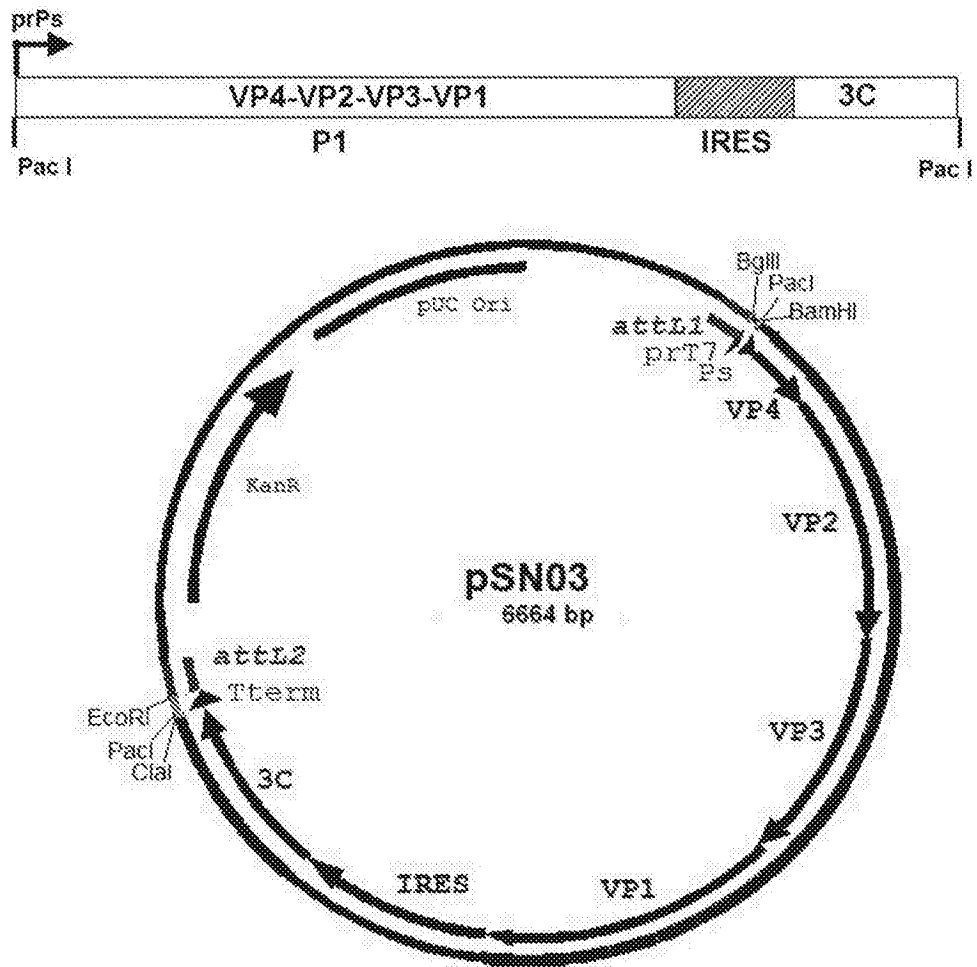
<400> 3

augauaagcu ugccacaacc cgggauccuc uagagucgac augacuucg 49



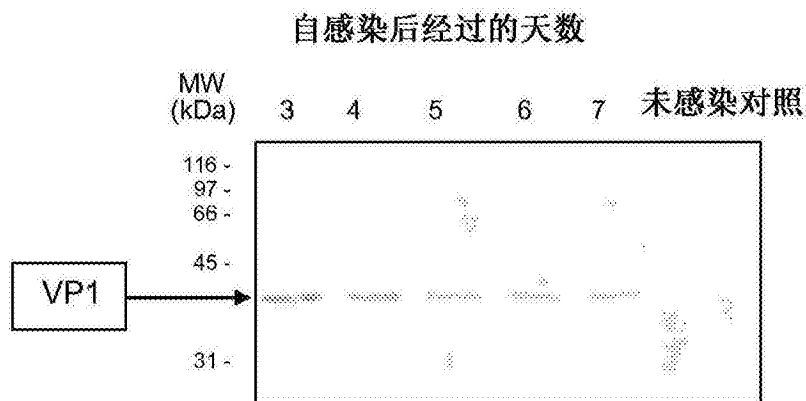
HEV71的VLP表达盒[P1+IRES+3CD]及pSN01质粒

图1



HEV71的VLP表达盒[P1+IRES+3CD]及pSN03质粒

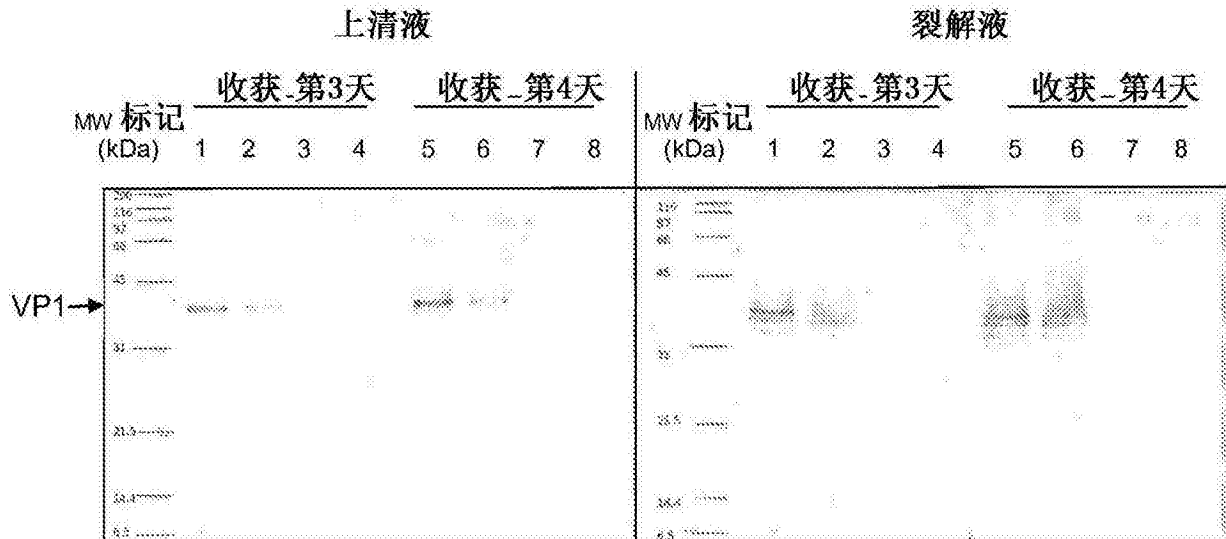
图2



感染SN07的Sf9细胞的上清液中的VP1的表达

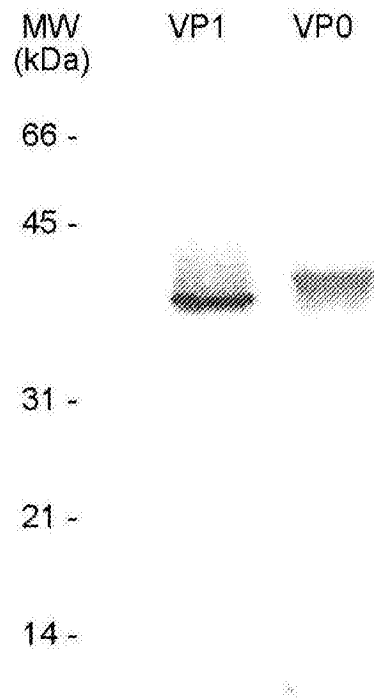
图3

道1和5: bacSN07p3
 道2和6: bacSN08p3
 道3和7: bacGUSd2
 道4和8: Sf9 (对照)



完成在上清液和裂解液这两者中的处理的VP1

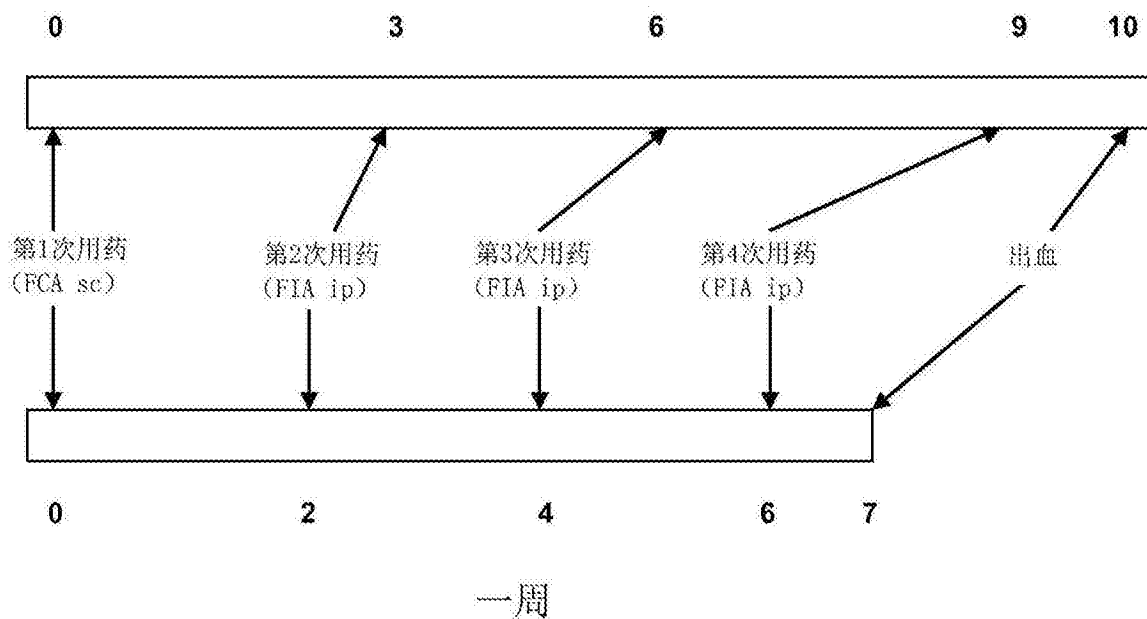
图4



基于100kDa的截留分子量 (MWCO) 膜的超滤后的
滞留物中的VP1及VP0

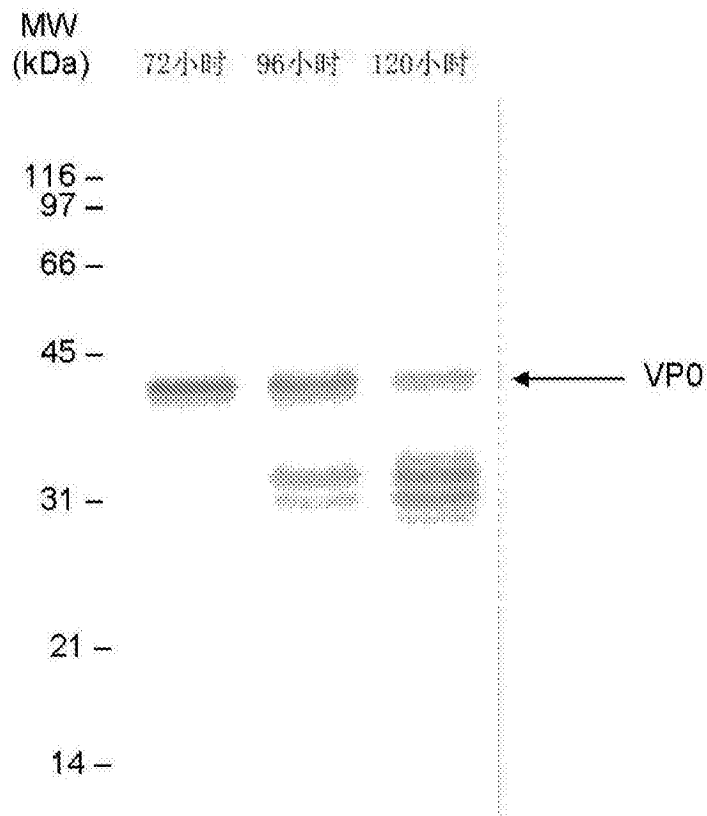
图5

均准备完全弗氏佐剂 (FCA) 或不完全弗氏佐剂 (FIA)，通过皮下注射 (sc) 或腹膜内注射 (ip) 施用免疫原。



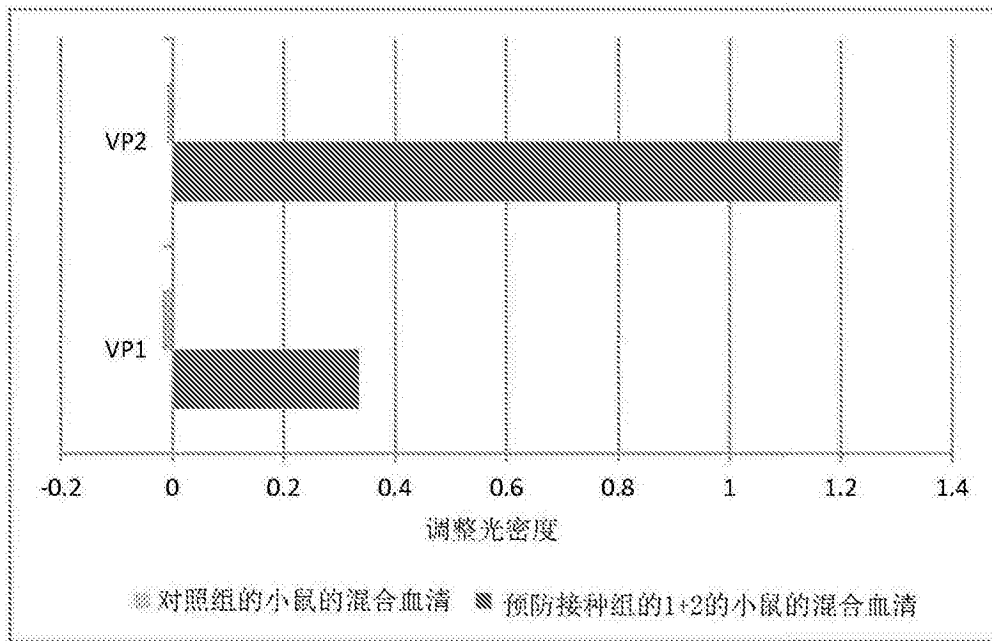
证明发明人等的设想的第1证据：两种类型的免疫方案
(每组由4只小鼠构成)

图6



3个取出后的经过时间中，从VP0（箭头）的多克隆兔抗血清探测的免疫印迹

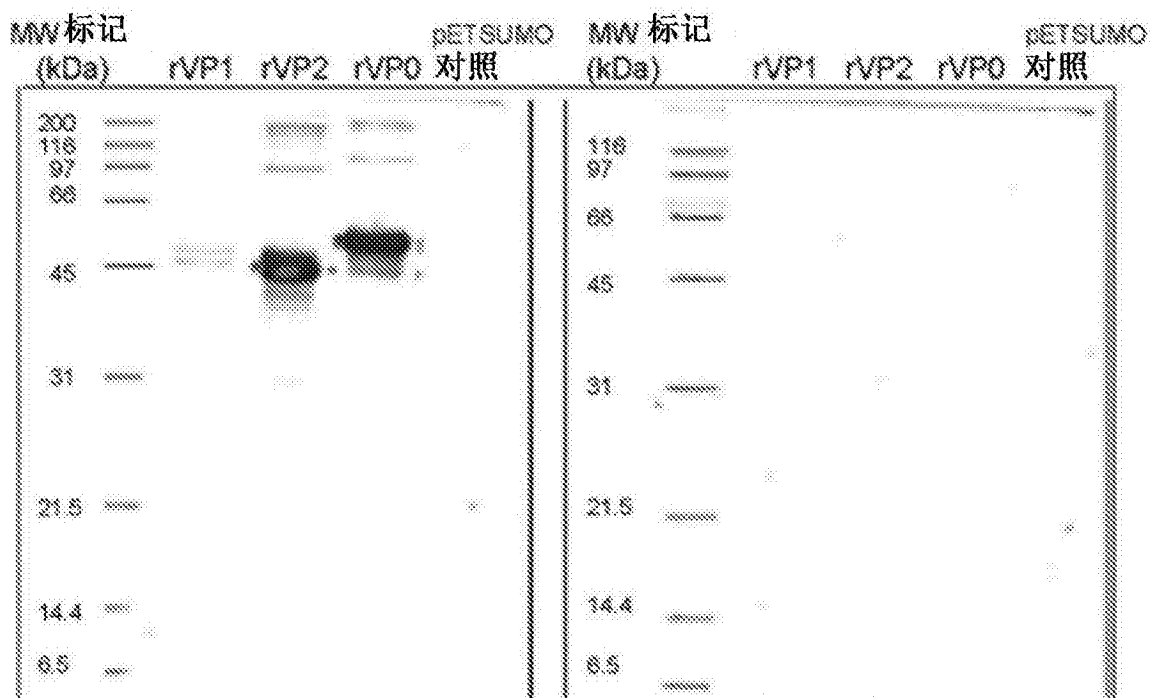
图7



从以感染SN07的Sf9细胞的上清液中的低聚抗原接受预防接种的小鼠取出的混合中和血清。在ELISA法中对VP2的重组显示出高滴度。

图8

AB

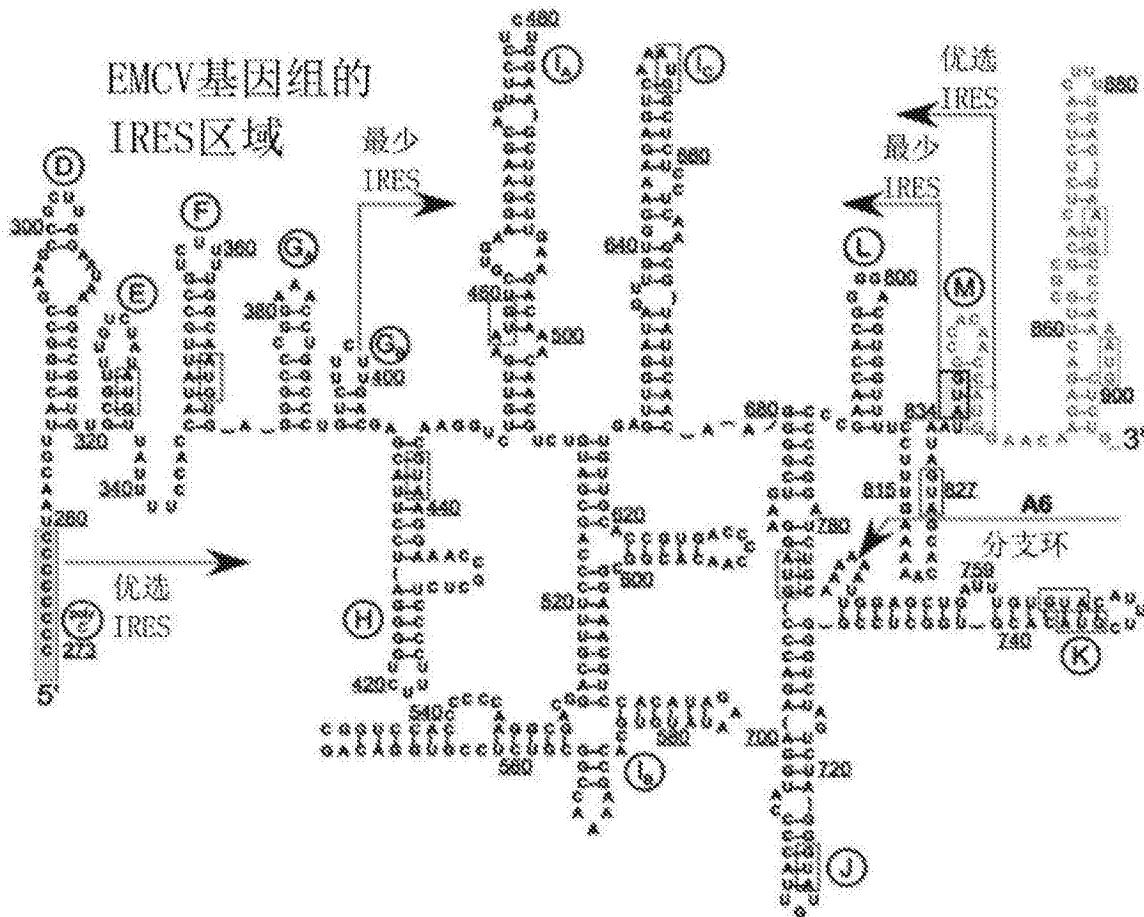


A. 以抗bacSN07p3 VLP小鼠血清（1/2000稀释）进行探测

B. 以抗Sf9对照组细胞小鼠血清（1/500稀释）进行探测

从以感染SN07的Sf9细胞的上清液中的低聚抗原接受预防接种的小鼠取出的混合中和血清。相较于VP1，与VP2及VP0更牢固地结合。

图9



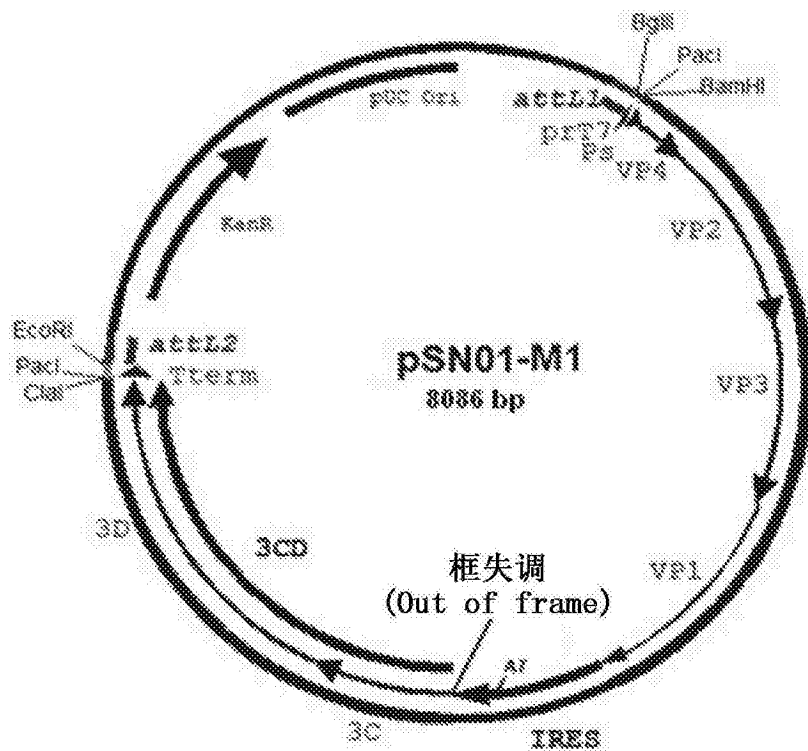
EMCV基因组的IRES区域 (SEQ ID NO: 1)。IRES区域代表 GenBank 登录号 AF113968. 2；核苷酸 1666~2251 的 EMCV 基因组序列。

图10

天然 AUGAUAAU---**AUG** aCu uCg Aaa gUu uAu gAu cca gaa caa
 突变 AUGAUAAgcuugccacaacccgggauccucuagagucgac**AUG** acu ucg

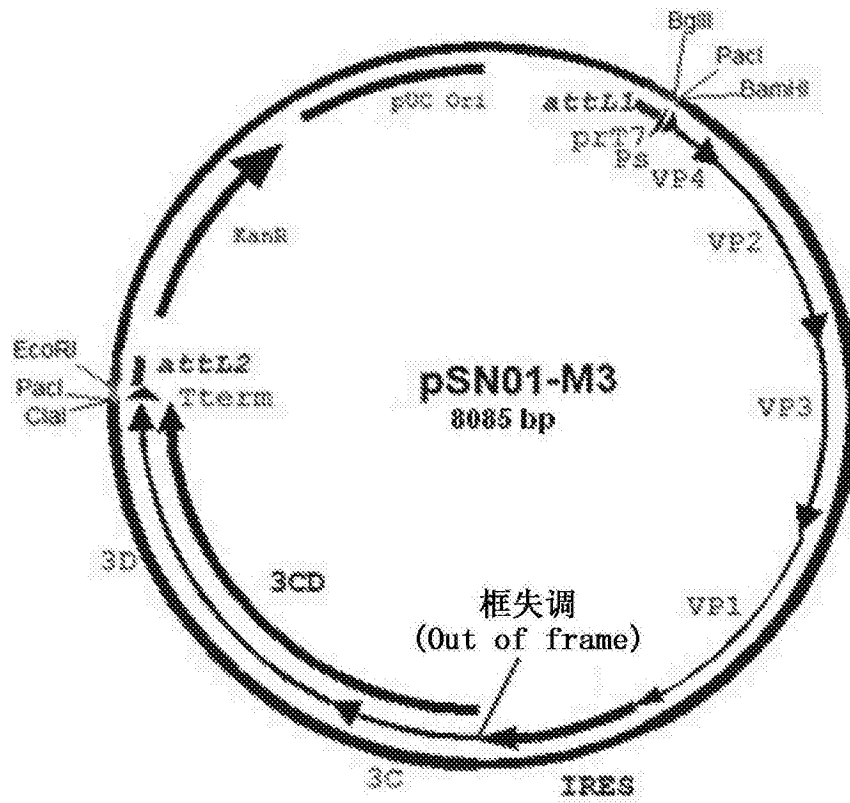
EMCV起始密码子和3CD蛋白酶编码序列的组帧：天然EMCV IRES编码序列 (SEQ ID NO: 2) 与突变EMCV IRES编码序列 (SEQ ID NO: 3) 的比较

图11



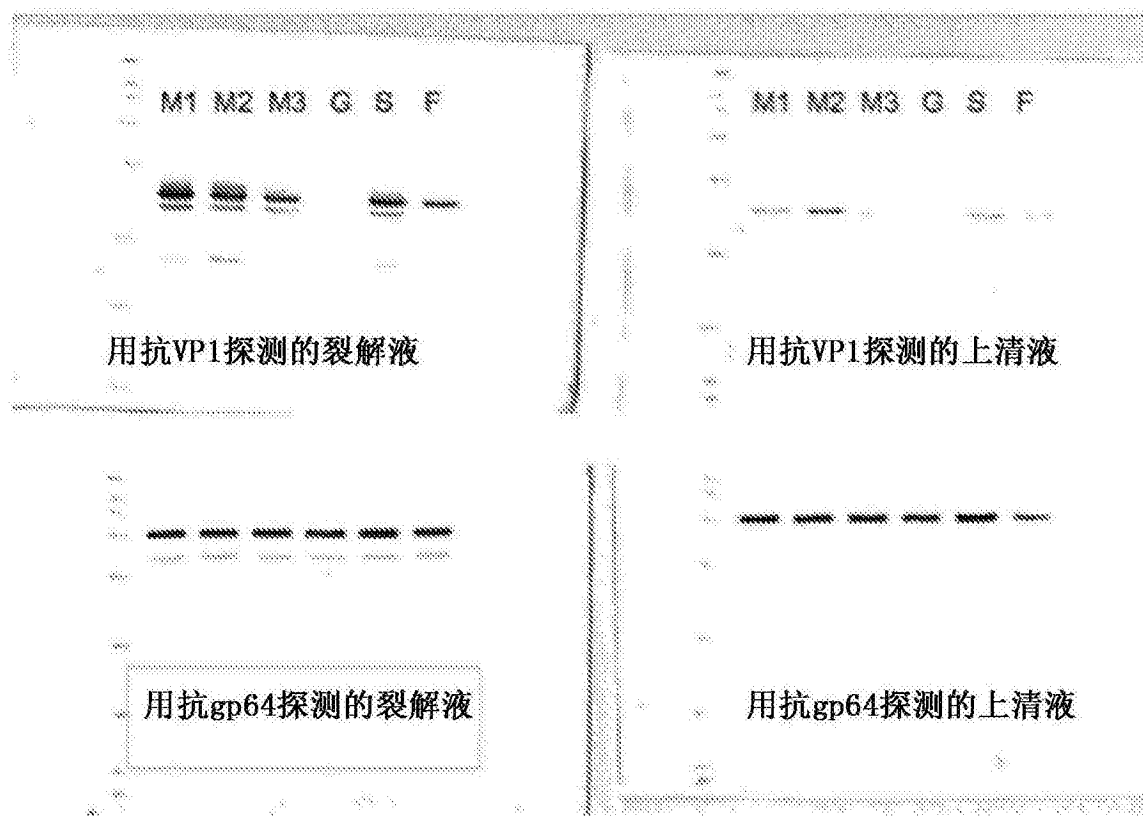
质粒pSN01-M1

图12



质粒pSN01-M3

图14



用于HEV71 VLP的表达的，不同设计的重组杆状病毒的表达的比较。

图15

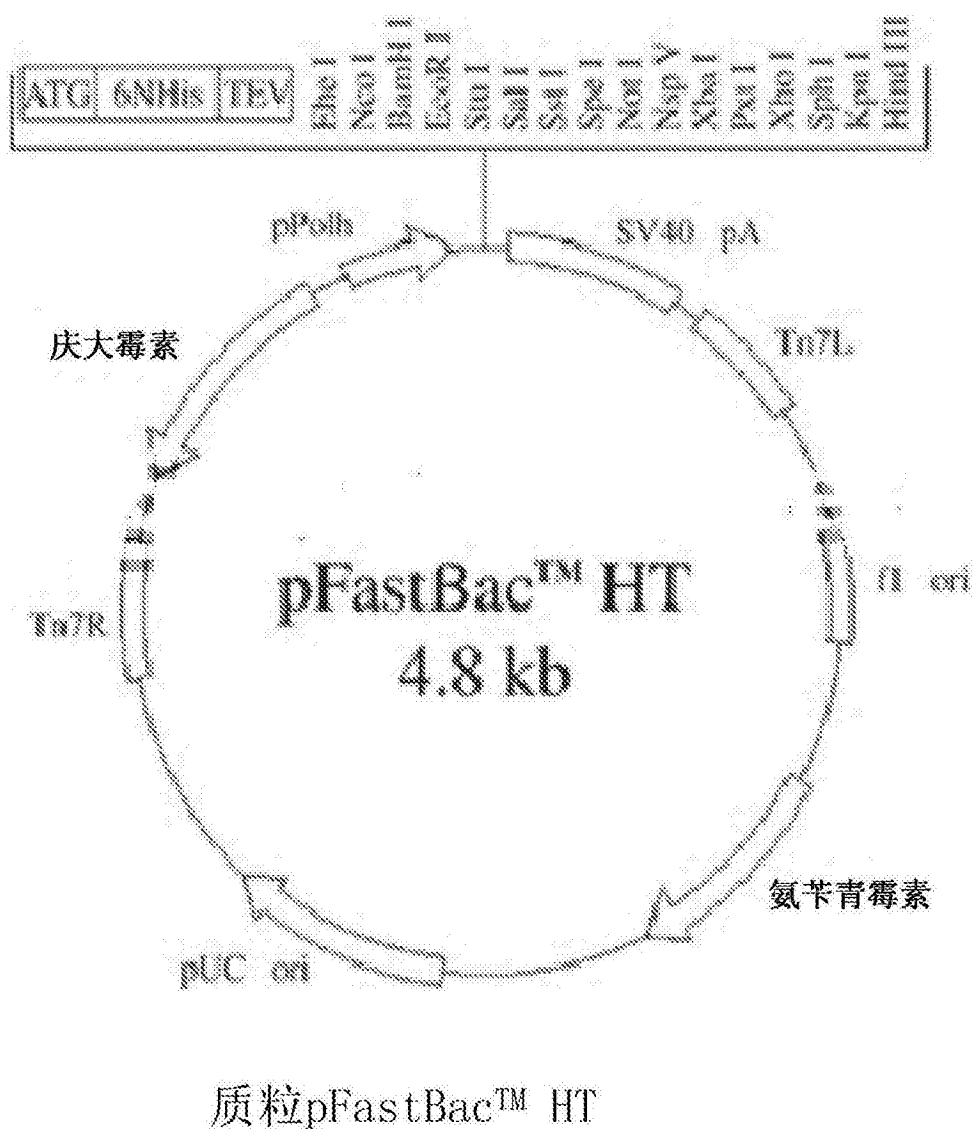
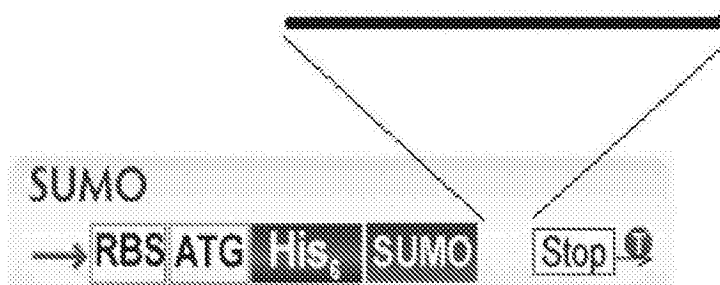


图16

EV71与脊髓灰质炎病毒的抗原性融合蛋白



对人肠道病毒A及人肠道病毒C的抗原融合蛋白的原核表达构建体

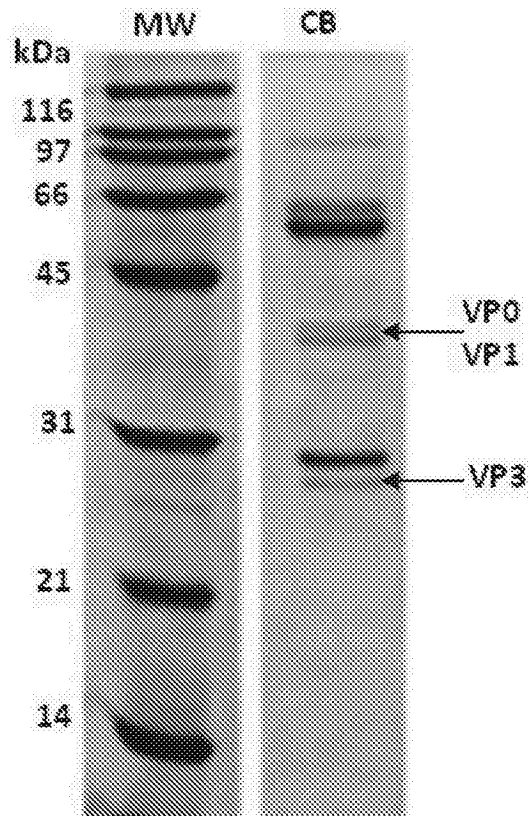
图17

1. rEV71-VP0 1 μ g
2. rEV71-VP1 1 μ g
3. rEV71-VP2 1 μ g
4. rEV71-VP3 1 μ g

kDa 1 2 3 4 kDa 1 2 3 4

来自从以SN07余量接受预防接种的小鼠取出的混合中和血清的抗体。与HEV71 VLP的所有组成要件结合

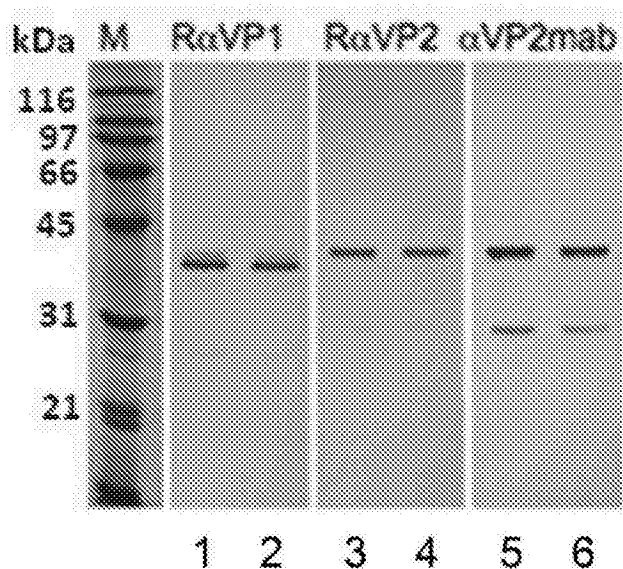
图18



HEV71 VLP的表征。来自培养上清液的HEV71 VLP的沉降。
被考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE凝胶中可见VLP的构成要件
(VP0、VP1、VP3)。(MW: 分子量标记, CB: 考马斯亮蓝染色)

图19

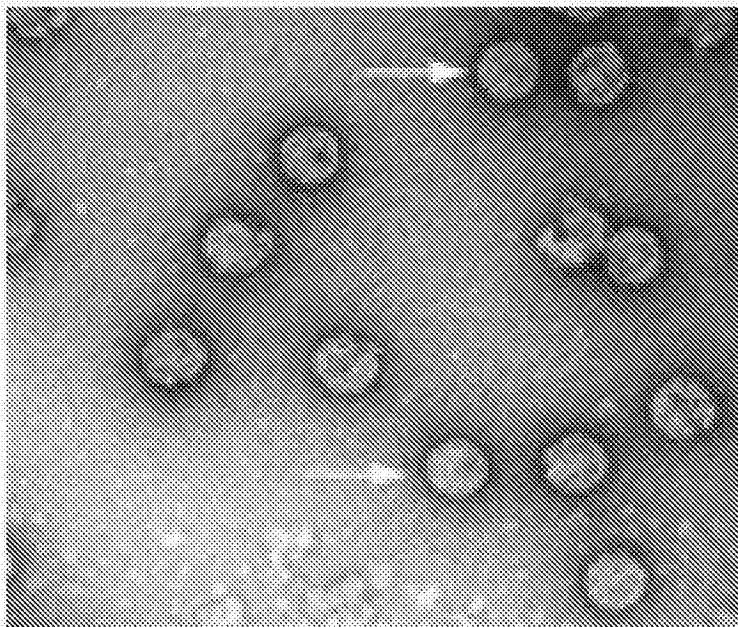
以使用SN07的浓缩液培养的单克隆中和抗体（EV18/4/D6-1/F1/G9）准备AFC。通过免疫印迹法分析洗脱组分。使用抗VP1抗体探测道1和道2的洗脱组分的结果可知，AFC纯化VLP中存在VP1。使用抗VP2抗体探测道3和道4的洗脱组分的结果可知，AFC纯化VLP中也存在VP2。使用抗VP2单克隆抗体探测道5和道6的洗脱组分的结果可知，AFC纯化VLP中存在VP2。



亲和柱（AFC）的纯化HEV71 VLP分析。

图20

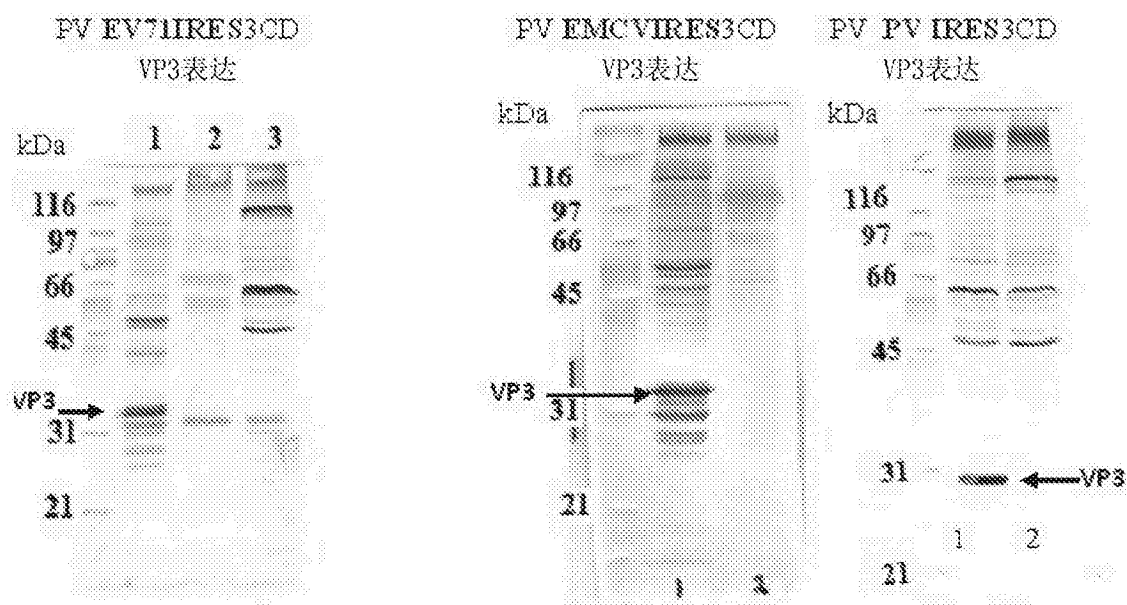
以SN07的浓缩液培养的单克隆中和抗体（EV18/4/D6-1/F1/G9）准备AFC。通过免疫印迹法（图20）及电子显微镜分析洗脱组分。箭头指向病毒样颗粒。



AFC纯化HEV71的VLP的电子显微镜照片

图21

构建3个不同的表达盒，并生成脊髓灰质炎病毒VLP。各表达盒包括脊髓灰质炎病毒P1多肽，然而，具有分别不同的IRES。IRES有助于诱导脊髓灰质炎病毒的3CD蛋白酶的表达。对具有脊髓灰质炎病毒的VLP表达盒的重组杆状病毒进行测试。在感染后的第3天从杆状病毒感染细胞获得裂解液，并使用兔抗PVP3抗体（1:2000）评估脊髓灰质炎病毒VP3的表达。



1. HEV71 IRES裂解液
2. HEV71 IRES上清液
3. bacGus裂解液

1. EMCV IRES裂解液
2. bacGus裂解液

1. PV IRES裂解液
2. bacGus裂解液

人肠道病毒C（脊髓灰质炎病毒-PV）的VLP表达

图22

为了证明生成脊髓灰质炎病毒的VLP，使用来自携带PV-VLP表达盒的重组杆状病毒的裂解液和上清液，并实施双表位ELISA法。PV-3CD蛋白酶处于脊髓灰质炎病毒IRES的控制下。将纯化兔抗脊髓灰质炎病毒VP3抗体用作捕捉抗体。使用鼠抗VP1单克隆抗体检测脊髓灰质炎病毒VLP。

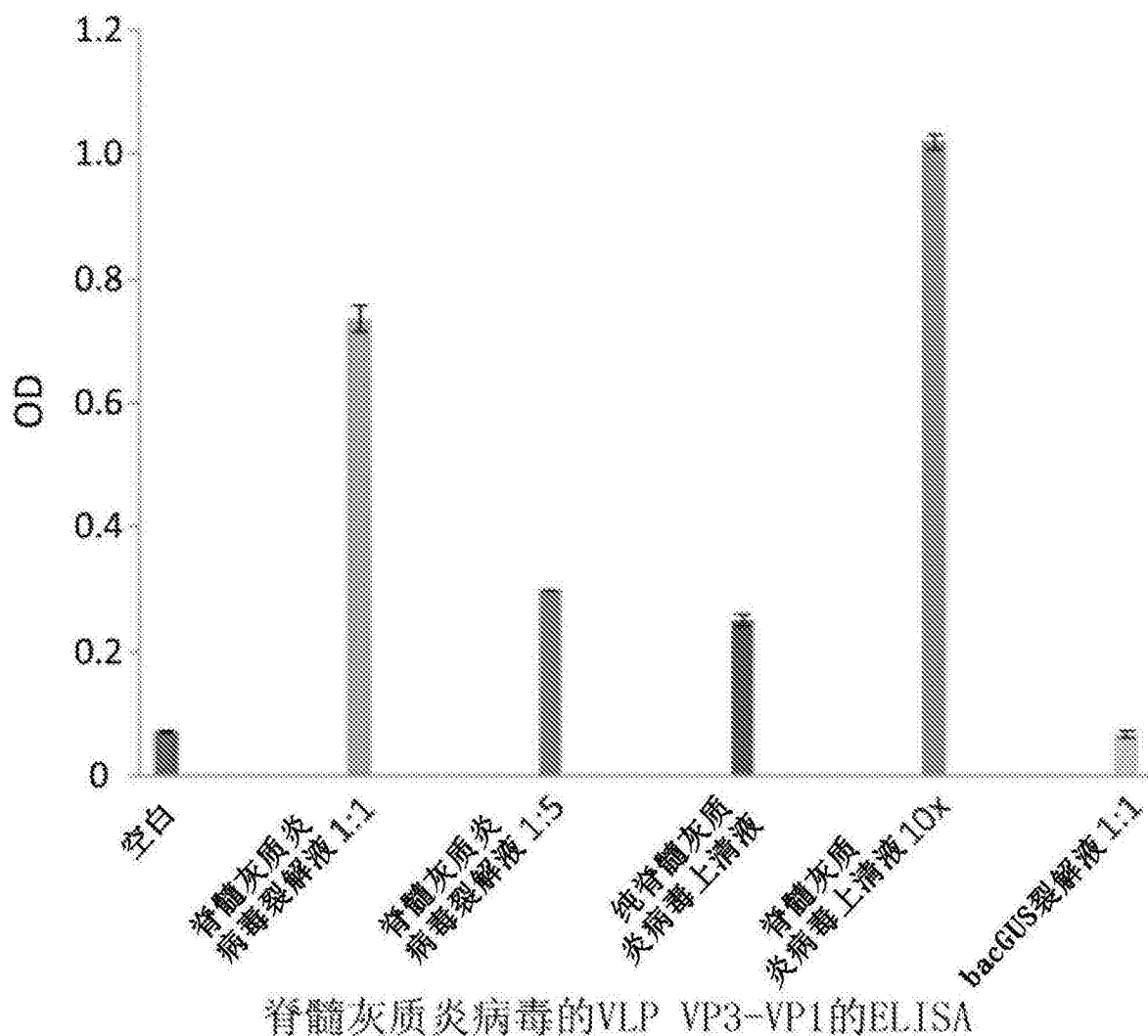
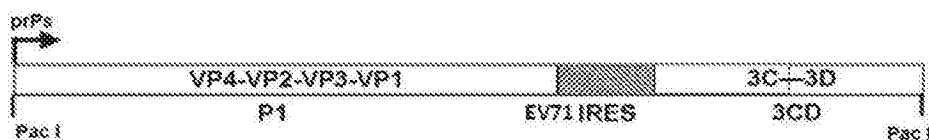
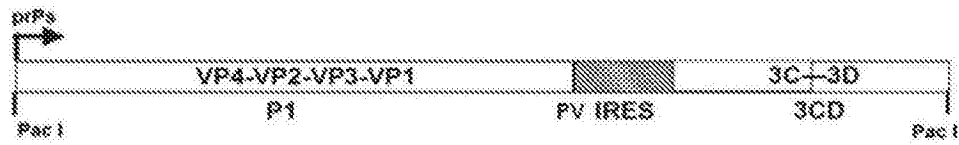


图23



具有HEV71-IRES的HEV71 VLP表达盒 (P1
+HEV71 IRES+3CD)

图24



具有 PV-IRES的HEV71 VLP表达盒 (P1+PV
IRES+3CD)

图25