



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102481359 B

(45) 授权公告日 2015.08.19

(21) 申请号 201080037770.3

(22) 申请日 2010.06.24

(30) 优先权数据

61/219,964 2009.06.24 US

61/334,568 2010.05.13 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.02.24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/059008 2010.06.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/149745 EN 2010.12.29

(73) 专利权人 葛兰素史密斯克莱生物公司

地址 比利时里克林萨斯

(72) 发明人 G·J·M·F·P·鲍杜克斯

N·布莱斯 S·L·西尔

P·雷奥尔特 J·L·鲁尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

(51) Int. Cl.

A61K 39/155(2006.01)

C07K 14/135(2006.01)

(56) 对比文件

J.-F. Valarcher et al.. "Bovine
respiratory syncytial virus lacking the

virokinin or with a mutation in furin
cleavage site RA (R/K) R109 induces
less pulmonary inflammation without
impeding the induction of protective
immunity in calves". 《Journal of General
Virology》. 2006, 第 87 卷 (第 6 期), 第
1659-1667 页.

Luis Gonzalez-Reyes et al.. "Cleavage
of the human respiratory syncytial virus
fusion protein at two distinct sites
is required for activation of membrane
fusion". 《Proceedings of the National
Academy of Sciences of the United States
of America》. 2001, 第 98 卷 (第 17 期), 第
9858-9864 页.

Hsien-Sheng yin et al.. "Structure of
the parainfluenza virus 5 F protein in
its metastable, prefusion conformation".
《Nature》. 2006, 第 439 卷 (第 7072 期), 第 38-44
页.

审查员 江涵

权利要求书1页 说明书43页
序列表32页 附图13页

(54) 发明名称

重组 RSV 抗原

(57) 摘要

本公开提供了重组呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗
原及其制备和使用方法, 包括用于治疗 and / 或防
止 RSV 感染的免疫原性组合物 (例如疫苗)。

1. 重组呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗原, 其包含含有 RSV F 蛋白多肽的 F₂ 结构域和 F₁ 结构域、但不包含 RSV F 蛋白的跨膜结构域的 RSV F 蛋白多肽, 其中所述 F 蛋白多肽包含使糖基化增加的修饰, 其中对应 SEQ ID NO:2 中位点 500-502 的氨基酸是 NGT, 其中所述 RSV 抗原选自:

a) 由 SEQ ID NO:17 编码的多肽; 和

b) 由 SEQ ID NO:21 编码多肽。

2. 权利要求 1 的重组 RSV 抗原, 其中所述 RSV 抗原包含多肽的三聚体。

3. 免疫原性组合物, 其包含权利要求 1 或 2 的重组 RSV 抗原, 和药物可接受赋形剂。

4. 免疫原性组合物, 其包含权利要求 1 或 2 的重组 RSV 抗原, 和药物可接受载体。

5. 权利要求 3 所述的免疫原性组合物, 还包含佐剂。

6. 权利要求 4 所述的免疫原性组合物, 还包含佐剂。

7. 重组核酸, 包含选自以下的多核苷酸序列:

a) 编码 SEQ ID NO:18 的多核苷酸; 和

b) 编码 SEQ ID NO:22 的多核苷酸序列。

8. 权利要求 1 或 2 的 RSV 抗原在制备预防 RSV 感染的药物中的用途。

重组 RSV 抗原

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 5 月 13 日提交的美国临时申请 61/334,568 和 2009 年 6 月 24 日提交的 61/219,964 的较早申请日的权利,所述申请的公开内容通过引用并入本文。

[0003] 依照 37C.F.R. § 1.71(E) 的版权通告

[0004] 本专利文件的部分公开内容含有受到版权保护的材料。版权所有人不反对专利文件或专利公开中使用的提交到 Patent and Trademark Office 的专利文件或记录中出现的任何复制件,但除此之外保留所有版权利。

[0005] 背景

[0006] 本公开涉及免疫学领域。更具体地说,本公开涉及用于引发对呼吸道合胞病毒(RSV)的特异免疫反应的组合物和方法。

[0007] 人呼吸道合胞病毒(RSV)是全球 6 个月以下婴儿和妊娠期短于或等于 35 周的早产儿中下呼吸道感染(LRI)的最常见病因。RSV 疾病的谱系包括多种呼吸道症状,从鼻炎和中耳炎到肺炎及毛细支气管炎,后两种疾病引起相当高的发病率和死亡率。人类是唯一已知的 RSV 贮主。被污染的鼻分泌物中的病毒通过大的呼吸道飞沫进行传播,因此传播需要与被感染个体或被污染表面的紧密接触。RSV 可以在玩具或其它物品上存活几个小时,这就解释了特别是在儿科病房中医院源性 RSV 感染的高发生率。

[0008] 每年全球 RSV 感染和死亡的数字据估计分别是 64million 和 160,000。仅在美国,估计 RSV 即造成每年 18,000 到 75,000 例住院和 90 到 1900 例死亡。在温带气候,大量记录表明 RSV 是造成每年冬天急性 LRI 流行病,包括毛细支气管炎和肺炎的原因。在美国,几乎所有儿童到两岁时均感染过 RSV。RSV 相关 LRI 在除此以外健康的儿童中的发生率据计算是两岁前每 1000 个儿童年龄有 37 例(小于 6 个月的婴儿中是每 1000 个儿童年龄有 45 例),住院风险是每 1000 个儿童年龄有 6 个(每 1000 个 6 个月以下儿童年龄)。在患有心肺疾病和早产的儿童中发生率更高,这些儿童构成了美国 RSV 相关入院的几乎一半。经历过 RSV 引起的更严重 LRI 的儿童以后发生儿童期哮喘的几率增加。这些研究展示了在工业化国家,由于对患有严重 LRI 及其后遗症的患者的护理成本极高,对 RSV 疫苗及其使用的广泛需求。RSV 还逐渐被认为是造成老年人中流感样疾病的重要原因。

[0009] 已尝试了各种方法希望产生安全有效的 RSV 疫苗,能够在健康和有风险的群体中引发持久和保护性的免疫反应。但是目前为止,评估过的候选物中没有一个被证明作为预防 RSV 感染和 / 或减少或预防 RSV 疾病,包括下呼吸道感染(LRIs)的疫苗是安全有效的。

[0010] 发明概述

[0011] 本公开涉及重组呼吸道合胞病毒(RSV)抗原。更具体地说,本公开涉及包含重组 F 蛋白的抗原,其中所述 F 蛋白经过修饰以便稳定三聚体融合前构象。公开的重组抗原表现出极佳的免疫原性,尤其适合作为抗 RSV 感染和 / 或疾病的免疫原性组合物(例如疫苗)的成分。还公开了编码所述重组抗原的核酸、含有抗原的免疫原性组合物,以及制备和使用抗原的方法。

[0012] 附图简述

[0013] 图 1A 是突出 RSV F 蛋白结构特点的示意图。图 1B 是示范性 RSV Prefusion F (PreF) 抗原的示意图。

[0014] 图 2 的线状图显示了 PreF 的非对称场流分离 (asymmetrical field flow fractionation) (AFF-MALS) 分析的代表性结果。

[0015] 图 3 的条形图显示了 PreF 抗原对人血清的中和抑制。

[0016] 图 4A 和 B 的条形图显示了小鼠应答 PreF 抗原引发的血清 IgG 效价。

[0017] 图 5A 和 B 的条形图显示了 PreF 抗原引发的 RSV 特异中和抗体的效价。

[0018] 图 6A 和 B 显示了 RSV PreF 抗原给小鼠提供的抗攻击保护作用。

[0019] 图 7 评估了免疫和攻击后的 BAL 白细胞。

[0020] 图 8 的条形图展示了用和水包油乳剂 (AS03) 稀释液一起成剂的 PreF 免疫后, 引发的血清 IgG。

[0021] 图 9 的条形图展示了用和水包油乳剂 (AS03) 稀释液一起成剂的 PreF 免疫后, 中和抗体的效价。

[0022] 图 10 的条形图展示了用和水包油乳剂 (AS03) 稀释液一起成剂的 PreF 免疫后, 抗攻击的保护作用。

[0023] 发明详述

[0024] 简介

[0025] 在 RSV 感染的发病机制中, 宿主免疫反应似乎参与其中, 这一事实使得开发预防 RSV 感染的疫苗复杂化。1960 年代的研究显示接种过福尔马林灭活的 RSV 疫苗的儿童在以后接触到病毒时比未接种的对照个体病情更严重。这些早期试验导致 80% 接种儿童入院和两例死亡。在动物模型中也发生疾病严重程度增加的现象, 被认为是由于血清中和抗体水平不够、缺乏局部免疫, 以及肺嗜酸粒细胞增多症 (pulmonary eosinophilia) 过度诱发 2 型辅助 T 细胞样 (Th2) 免疫反应和 IL-4 和 IL-5 细胞因子的产生增加。相反, 抗 RSV 感染的成功疫苗诱发的是 Th1 型免疫反应, 其特点在于产生 IL-2 和 γ -干扰素 (IFN)。

[0026] 本公开涉及重组呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗原, 所述重组抗原解决了以前疫苗中使用的 RSV 抗原遇到的问题, 改善了抗原的免疫学和制备性能。本文公开的重组 RSV 抗原涉及包含可溶性 F 蛋白多肽的 Fusion (F) 蛋白类似物, 其中所述 F 蛋白多肽经过改造以便稳定 G 蛋白的融合前构象, 即在与宿主细胞膜融合前, 成熟组织的 F 蛋白的构象。为了清楚简洁起见, 这些 F 蛋白类似物被命名为“PreF”或“PreF 抗原”。本文公开的 PreF 抗原是根据这样一个意外发现而预测的, 即经过引入异源三聚化结构域而被改造的可溶性 F 蛋白类似物表现出改进的免疫学特性, 并且体内给予受试对象时是安全并有极高保护性的。

[0027] 参照本领域广泛接受的术语和命名, 文中提供了 RSV F 蛋白的结构细节, 并在图 1A 中进行了图示。图 1B 提供了示范性 PreF 抗原的示意图。本领域技术人员理解, 根据本文提供的教导, 可以将任何 RSV F 蛋白通过修饰来稳定其融合前构象。因此, 为了促进对指导 PreF 抗原产生原理的理解, 根据示范性 F 蛋白来说明各个结构成分, SEQ ID NOs :1 和 2 分别给出了示范性 F 蛋白的多核苷酸和氨基酸序列。类似地, 适用的情况下, 参考示范性 G 蛋白来描述 G 蛋白抗原, SEQ ID NOs :3 和 4 分别提供了示范性 G 蛋白的多核苷酸和氨基酸序列。

[0028] 参考 F 蛋白多肽的一级氨基酸序列 (图 1A), 使用以下名词描述 PreF 抗原的结构

特征。

[0029] 名词 F0 是指全长翻译出来的 F 蛋白前体。F0 多肽可以划分为被中间的称为 pep27 的肽分隔开的 F2 结构域和 F1 结构域。在成熟过程中, F0 多肽在位于 F2 和 F1 之间并侧接 pep27 的两个弗林蛋白酶位点发生蛋白水解切割。为了以下讨论, F2 结构域包括 F 蛋白中氨基酸 1-109 的至少一部分和甚至全部, F1 结构域的可溶性部分包括氨基酸 137-526 的至少一部分和甚至全部。正如以上指出的, 这些氨基酸位点 (和文中之后指定的所有氨基酸位点) 是参考 SEQ ID NO :2 所示的示范性 F 蛋白前体多肽 (F0) 给出的。

[0030] 融合前 F (或“PreF”) 抗原是可溶性的 (即不是膜结合的) F 蛋白类似物, 其包含至少一个能够稳定 F 蛋白融合前构象的修饰, 这样 RSV 抗原可以保持 F 蛋白融合前构象的至少一个免疫优势表位。可溶性 F 蛋白多肽包含 RSVF 蛋白的 F2 结构域和 F1 结构域 (但不包含 RSV F 蛋白的跨膜结构域)。在示范性实施方案中, F2 结构域包括 F 蛋白的氨基酸 26-105, F1 结构域包括氨基酸 137-516。但也可以使用较小的部分, 只要能够维持稳定 PreF 抗原的三维构象。类似地, 也可以用包含其他结构成分的多肽 (例如, 融合多肽) 来代替示范性 F2 和 F1 结构域, 只要所述其他成分不会破坏三维构象, 或者以其他方式对抗原的稳定性、生产或加工有负面影响、或者降低免疫原性。F2 和 F1 结构域处于 N-端到 C-端的方向, 这种设计是为了使 F 蛋白类似物折叠和组装成熟融合前构象。为了增加产量, F2 结构域前面可以添加分泌信号肽, 比如天然 F 蛋白信号肽或者能够增强在表达重组 PreF 抗原的宿主细胞中生产和分泌的异源信号肽。

[0031] PreF 抗原通过引入一或多个修饰得以 (三聚体融合前构象) 稳定, 比如添加、缺失或替代一或多个氨基酸。一个这类稳定修饰是添加包含异源稳定结构域的氨基酸序列。在示范性实施方案中, 所述异源稳定结构域是蛋白多聚化结构域。所述蛋白多聚化结构域的一个特别合适的例子是卷曲螺旋 (coiled-coil) 结构域, 比如促进含有这类结构域的多个多肽三聚化的异亮氨酸拉锁结构域。示范性异亮氨酸拉锁结构域如 SEQ ID NO :11 所示。一般来说, 异源稳定结构域位于 F1 结构域的 C 端。

[0032] 任选地, 多聚化结构域经由短的氨基酸连接序列, 比如序列 GG 与 F1 结构域连在一起。连接肽还可以说较长的连接分子 (例如, 包含序列 GG 的连接肽, 比如氨基酸序列: GGS GSGSGS; SEQ ID NO :14)。本领域已知的许多构象上是中性的连接肽可以用于这种情况, 而不破坏 PreF 抗原的构象。

[0033] 另一种稳定修饰是去除位于天然 F0 蛋白中 F2 和 F1 结构域之间的弗林蛋白酶的识别和切割位点。通过缺失或者取代弗林酶识别位点中的一或多个氨基酸, 可以消除位于位点 105-109 和位点 133-136 的弗林酶识别位点中的一个或两者, 这样蛋白酶不能将 PreF 多肽切割成它的组成结构域。任选地, 还可以将之间的 pep27 肽除去或者用例如连接肽替代。此外或者任选地, 可以除去或取代靠近融合肽的非弗林酶切割位点 (例如, 位点 112-113 处的金属蛋白酶位点)。

[0034] 稳定突变的另一个例子是在 F 蛋白的疏水结构域中添加或取代亲水氨基酸。通常, 在疏水区域内添加带电荷的氨基酸 (比如赖氨酸) 或者用它取代中性残基 (比如亮氨酸)。例如, 在 F 蛋白胞外结构域的 HRB 卷曲螺旋结构域内添加亲水氨基酸或者用亲水氨基酸取代疏水或中性氨基酸。作为一个例子, 可以用带电荷的氨基酸残基, 比如赖氨酸取代 F 蛋白中位点 512 的亮氨酸。替代地或者此外, 可以在 F 蛋白的 HRA 结构域内添加亲水氨

氨酸,或者用亲水氨基酸取代疏水或中性氨基酸。例如,可以在 PreF 抗原位点 105-106 (例如对应参照序列 SEQ ID NO:2 中的残基 105 的氨基酸后面的,比如氨基酸 105 和 106 之间的位点) 或者附近加入一或多个带电荷的氨基酸,比如赖氨酸。任选地, HRA 和 HRB 结构域中都可以添加或取代亲水氨基酸。替代地,可以缺失一或多个疏水残基,只要 PreF 抗原整体构象不被损害。

[0035] 此外或者替代地,可以进行能够改变 PreF 抗原糖基化状态的一或多个修饰。例如,可以将天然 RSV F 蛋白中存在的糖基化位点的一或多个氨基酸 (例如在相对 SEQ ID NO:2 的氨基酸残基 500 处或者附近) 缺失或取代 (或者可以添加氨基酸使得糖基化位点被破坏),从而增加或减少 PreF 抗原的糖基化情况。例如,对应 SEQ ID NO:2 中位点 500-502 的氨基酸可以选自:NGS、NKS、NGT 和 NKT。因此,在某些实施方案中,PreF 抗原含有的可溶性 F 蛋白多肽包含 RSV F 蛋白多肽的 F2 结构域 (例如,对应 SEQ ID NO:2 中的氨基酸 26-105 of) 和 F1 结构域 (例如,对应 SEQ ID NO:2 中的氨基酸 137-516),其中引入了至少一个使糖基化改变的修饰。RSV PreF 抗原通常在 F2 结构域和 F1 结构域之间包含完整的融合肽。任选地,PreF 抗原包含信号肽。

[0036] 正如以上公开的,这些 F 蛋白多肽可以包含至少一个选自以下的修饰:(i) 添加包含异源三聚化结构域 (比如异亮氨酸拉锁结构域) 的氨基酸序列;(ii) 缺失至少一个弗林酶切割位点;(iii) 缺失至少一个非弗林酶切割位点;(iv) 缺失 pep27 结构域中的一或多个氨基酸;和 (v) 在 F 蛋白胞外结构域的疏水结构域中取代或添加至少一个亲水氨基酸。正如以上公开的,这类糖基化修饰过的 RSV PreF 抗原可以组装成多聚体,例如三聚体。

[0037] 在示范性实施方案中,糖基化修饰过的 PreF 抗原选自:a) 包含 SEQ ID NO:22 或由其构成的多肽;b) SEQ ID NO:21 或者与 SEQ ID NO:21 在严紧条件下几乎全长杂交的多核苷酸序列所编码的多肽;c) 与 SEQ ID NO:22 有至少 95% 序列同一性的多肽。

[0038] 任何和 / 或所有稳定修饰可以单独使用或者与本文公开的任何其他稳定修饰组合使用来产生 PreF 抗原。在示范性实施方案中,PreF 蛋白含有的多肽包含 F2 结构域和 F1 结构域,并且在 F2 结构域和 F1 结构域之间没有居中的弗林酶切割位点,还有位于 F1 结构域 C 端的异源稳定结构域 (例如三聚化结构域)。某些实施方案中,PreF 抗原在疏水 HRA 和 / 或 HRB 结构域中还包含一或多个亲水残基的添加和 / 或取代。任选地,PreF 抗原含有至少一个非弗林酶切割位点,比如金属蛋白酶位点的修饰。

[0039] PreF 抗原任选包含其他多肽成分,包括 RSV G 蛋白的至少免疫原性部分。即在某些实施方案中,PreF 抗原是既包含 F 蛋白也包含 G 蛋白成分的嵌合蛋白。F 蛋白成分可以是任何以上描述的 PreF 抗原,选中的 G 蛋白成分是 RSV G 蛋白的有免疫原活性的部分 (最多和 / 或包含全长 G 蛋白)。在示范性实施方案中,G 蛋白多肽包含 G 蛋白的氨基酸 149-229 (其中氨基酸位点参照 SEQ ID NO:4 所代表的 G 蛋白序列指定)。本领域技术人员理解,可以使用更小的 G 蛋白部分或片段,只要选中的部分保留了较大 G 蛋白片段的优势免疫特征。特别是选中的片段保留位于大约氨基酸位点 184-198 (例如氨基酸 180-200) 之间的免疫优势表位,并且长度足够折叠和组装成展示免疫优势表位的稳定构象。也可以使用更长的片段,例如从大约氨基酸 128 到大约氨基酸 229,甚至全长的 G 蛋白。只要在宿主细胞内重组产生时,选择的片段在嵌合蛋白中折叠成稳定构象,并且不干扰到蛋白的产生、加工或稳定性。任选地,G 蛋白成分经由短的氨基酸连接序列,例如序列 GG 与 F 蛋白成分连

接。连接肽还可以是较长的连接分子（比如氨基酸序列 :GGSGGSGGS :SEQ ID NO :14）。本领域已知的许多构象上是中性的连接肽可以用于这种情况，而不破坏 PreF 抗原的构象。

[0040] 任选地，G 蛋白成分可以包含一或多个氨基酸取代，所述取代能够减轻或防止 RSV 疾病动物模型中出现加重的病毒疾病。这就是说，G 蛋白可以包含氨基酸取代，当包含 PreF-G 嵌合抗原的免疫原性组合物被给予选自公认动物模型（例如 RSV 的小鼠模型）的受试对象时，与接受含有未修饰 G 蛋白的疫苗的对照动物相比，受试对象表现出的疫苗加重的病毒疾病（例如嗜酸粒细胞增多、嗜中性粒细胞增多）的症状减轻或者没有症状。当免疫原性组合物在没有佐剂的情况下给予时，这种疫苗加重的病毒疾病的减轻和 / 或防止可能很明显（但在抗原例如与强 Th1 诱发佐剂一起给予时，可能不明显）。此外，给予人受试对象时，氨基酸取代可以减轻或防止疫苗加重的病毒疾病。合适的氨基酸取代的例子是用丙氨酸代替位点 191 的天冬酰胺（氨基酸 191 的 Asn → Ala :N191A）。

[0041] 任选地，任何以上描述的 PreF 抗原可以包含协助纯化的其他序列。一个例子是多聚组氨酸标签。如果需要，可以从终产物中去除这种标签。

[0042] 被表达时，PreF 抗原进行分子内折叠并组装成包含多肽多聚体的成熟蛋白。有益的是 preF 抗原多肽组装成三聚体，所述三聚体效仿成熟加工后的 RSV F 蛋白的融合前构象。

[0043] 本文公开的任何 PreF 抗原（包括 PreF-G 抗原）适合用于免疫原性组合物中，以便引发抗 RSV 的保护性免疫反应。这种免疫原性组合物一般包含药物可接受载体和 / 或赋形剂，比如缓冲液。为了增强给药后产生的免疫反应，免疫原性组合物一般还包含佐剂。对用于引发抗 RSV 保护性免疫反应的免疫原性组合物（例如疫苗）的情况，组合物包含主要引发 Th1 型免疫反应的佐剂（Th1 型佐剂）是有利的。一般来说，佐剂要选择适合给予组合物所给予的目标群体。因此，根据应用，选择适合给予例如新生儿或老年人的佐剂。

[0044] 本文描述的免疫原性组合物适合作为疫苗用于减少或预防 RSV 感染，而不会在给药或接触 RSV 后诱发病理反应（比如疫苗加重的病毒疾病）。

[0045] 某些实施方案中，免疫原性组合物包含 PreF 抗原（比如 SEQ ID NO :6 所示的示范性实施方案）和包含 G 蛋白成分的第二多肽。G 蛋白成分通常至少包含 G 蛋白的氨基酸 149-229。虽然可以使用更小的 G 蛋白部分，所述片段应当最少包含氨基酸 184-198 的免疫优势表位。替代地，G 蛋白可以包含更大的 G 蛋白部分，比如氨基酸 128-229 或 130-230，任选是更大的蛋白（比如全长 G 蛋白或嵌合多肽）的元件。

[0046] 在其他实施方案中，免疫原性组合物包含的 PreF 抗原是嵌合蛋白，也包含 G 蛋白成分（比如 SEQ ID NOs :8 和 10 所展现的示范性实施方案）。这种嵌合 PreF（或 PreF-G）抗原的 G 蛋白成分一般至少包含 G 蛋白的氨基酸 149-229。正如以上指出的，也可以使用更小或更大的片段（比如氨基酸 129-229 或 130-230），只要保留免疫优势表位，并且 PreF-G 抗原的构象不受不利影响。

[0047] 任选地，免疫原性组合物还包含除 RSV 以外的病原生物体的至少一个其他抗原。例如，所述病原生物体是除 RSV 以外的病毒，比如副流感病毒（PIV）、麻疹、乙肝、脊髓灰质炎或流感病毒。替代地，病原生物体可以是细菌，比如白喉、破伤风、百日咳、流感嗜血杆菌和肺炎球菌。

[0048] 编码任何 PreF 抗原（包括 PreF-G 抗原）的重组核酸也是本公开的特点。某些实

施方案中,编码 PreF 抗原的核酸的多核苷酸序列经过优化以便在选定的宿主(比如 CHO 细胞,其他哺乳动物细胞或昆虫细胞)中进行表达。相应地,载体,包括表达载体(包括原核和真核表达载体)也是本公开的特点。类似地,包含这些核酸和载体的宿主细胞是本公开的特点。所述核酸还可以用于免疫原性组合物给予受试对象引发针对 RSV 的免疫反应。

[0049] PreF 抗原适合用于防止和/或治疗 RSV 感染。因此,本公开的另一个方面涉及引发抗 RSV 的免疫反应的方法。所述方法涉及将免疫有效量的含有 PreF 抗原的组合物给予受试对象(比如人或动物受试对象)。给予免疫有效量的组合物能够引发对 PreF 抗原呈递的表位特异的免疫反应。所述免疫反应可以包括 B 细胞反应(例如产生中和抗体)和/或 T 细胞反应(例如产生细胞因子)。优选地,由 PreF 抗原引发的免疫反应包含对 RSV F 蛋白融合前构象上呈递的至少一个构象表位特异的元素。可以将 PreF 抗原和组合物给予受试对象,而不加重他们与 RSV 接触后的病毒疾病。有利地,本文公开的 PreF 抗原和恰当配制的免疫原性组合物引发 Th1 型免疫反应,所述免疫反应能够减少或防止 RSV 感染,和/或减少或防止感染 RSV 后的病理反应。

[0050] 免疫原性组合物可以经由多种途径给药,包括诸如鼻内这样将 PreF 抗原与上呼吸道黏膜直接接触的途径。替代地,可以采用更传统的给药途径,比如肌内给药途径。

[0051] 因此,还考虑了任何公开的 RSV 抗原(或核酸)在制备治疗 RSV 感染(例如,预防性治疗或防止 RSV 感染)的药物中的用途。相应地,本公开提供了公开的重组 RSV 抗原或免疫原性组合物用于医药,以及它们预防或治疗 RSV 相关疾病的用途。

[0052] 以下描述和实施例中呈现了关于 PreF 抗原以及它们的使用方法的其他细节。

[0053] 名词

[0054] 为了协助对本公开各种实施方案的审核,特提供以下名词解释。根据本公开的语境可以给出其他名词和解释。

[0055] 除非另有说明,本文使用的所有科技名词与本公开所属领域的技术人员通常理解的意义相同。分子生物学常见名词的定义可以在 Benjamin Lewin, Genes V, Oxford University Press 出版,1994(ISBN 0-19-854287-9);Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd. 出版,1994(ISBN 0-632-02182-9);以及 Robert A. Meyers(ed.), Molecular Biology and Biotechnology :a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc. 出版,1995(ISBN 1-56081-569-8)中找到。

[0056] 除非上下文明确另有说明,单数名词“一个”(“a”、“an”和“the”)包括复数指示物。类似地,单词“或”意味着包含“和”,除非上下文明确另有说明。名词“复数”是指两个或以上。还应当明白,文中给出的核酸或多肽的所有碱基大小或氨基酸大小,以及所有分子量或分子质量数值都是近似值,仅用于描述目的。此外,就物质(比如抗原)浓度或水平给出的数值限制是近似的。因此,浓度被指明是至少(例如)200pg 的情况中,是指浓度应理解为至少接近(或者“大约”或“~”)200pg。

[0057] 虽然与本文描述的方法和材料类似或等同的那些方法和材料可以用于实践或测试本公开,以下描述了合适的方法和材料。名词“包含”意味着“包括”。因此,除非上下文另有要求,单词“包含”(“comprises”及其变形,比如“comprise”和“comprising”)理解为表示含有所陈述的化合物或组合物(例如核酸、多肽、抗原)或者步骤,或者一组化合物或步

骤;但不排除含有其他化合物、组合物、步骤或一组化合物、组合物或步骤。缩写“e. g.”来自拉丁文 *exempli gratia*, 用于本文表示非限制性的例子。因此, 缩写“e. g.”是名词“for example(例如)”的同义词。

[0058] 人呼吸道合胞病毒(RSV)是副粘病毒科、肺炎病毒亚科、肺病毒属的病原性病毒。RSV的基因组是编码11个蛋白的负链RNA分子。RNA基因组与病毒N蛋白紧密关联形成包裹在病毒包膜内的核衣壳。根据G糖蛋白的抗原性的不同, 已有A和B两组人RSV株被描述。迄今已分离到大量RSV株。GenBank和/或EMBL登录号所代表的示范性病毒株可以在W02008114149中找到, 为了公开PreF抗原(包括嵌合PreF-G抗原)中适合使用的和适合与PreF抗原组合的RSV F和G蛋白的核酸和多肽序列, 通过引用将该文献并入本文。还可能分离到其他RSV株, 也涵盖在RSV属内。类似地, RSV的属涵盖由遗传漂变天然发生(例如以前或者之后鉴定的株)的变体或者人工合成和/或重组产生的变体。

[0059] 名词“F蛋白”或“Fusion蛋白”或“F蛋白多肽”或“Fusion蛋白多肽”是指具有RSV Fusion蛋白多肽的全部或部分氨基酸序列的多肽或蛋白质。类似地, 名词“G蛋白”或“G蛋白多肽”是指具有RSV Attachment蛋白多肽的全部或部分氨基酸序列的多肽或蛋白质。已有许多RSV Fusion和Attachment蛋白被描述, 是本领域技术人员已知的。W02008114149给出了示范性的F和G蛋白变体(例如, 天然变体), 至本公开提交日仍是公开的。

[0060] 当“变体”是指核酸或多肽(例如RSV F或G蛋白核酸或多肽, 或者PreF核酸或多肽)时, 它是与参照核酸或多肽不同的核酸或多肽。通常, 变体和参照核酸或多肽之间的差别与参照物相比, 是构成比例上很少的差别。

[0061] 多肽或蛋白的“结构域”是多肽或蛋白内结构明确的元件。例如, “三聚化结构域”是多肽内促进多肽组装成三聚体的氨基酸序列。例如, 三聚化结构域可以通过关联其他三聚化结构域(氨基酸序列相同或不同的其他多肽)促进三聚体的组装。该名词还指编码这类肽或多肽的多核苷酸。

[0062] 名词“天然”和“天然存在”是指其存在状态和在自然界中是一样的元件, 比如蛋白、多肽或核酸。即, 元件未被人工改造过。应当理解, 在本公开的语境中, 有许多从例如不同RSV的天然存在株或分离物中获得的RSV蛋白或多肽的天然/天然存在变体。

[0063] 名词“多肽”是指一种聚合物, 其中的单体是通过酰胺键连接起来的氨基酸残基。名词“多肽”或“蛋白”用于本文意图涵盖任何氨基酸序列, 并且包括修饰过的序列, 比如糖蛋白。名词“多肽”特别要包含天然存在的蛋白, 以及那些重组或合成产生的蛋白。提到多肽时的名词“片段”是指多肽的一部分(即亚序列)。名词“免疫原性片段”是指保留了全长参照蛋白或多肽的至少一个优势免疫原性表位的所有多肽片段。多肽内的方向通常按照N端到C端来叙述, 所述N端到C端的方向是由各个氨基酸的氨基和羧基部分的方向确定的。多肽的翻译是从N或氨基端向C或羧基端。

[0064] “信号肽”是这样的短氨基酸序列(例如大约18-25个氨基酸长), 这类序列能够将新合成的分泌蛋白或膜蛋白引导到或者引导着跨过例如内质网膜。信号肽常常但并不永远位于多肽的N端, 经常在蛋白跨膜后被信号肽酶切割下来。信号序列一般含有三个常见的结构特征: N-端极性碱性区(n区)、疏水中心和亲水c区)。

[0065] 名词“多核苷酸”和“核酸序列”是指至少10个碱基长的聚合物形式的核苷酸。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或者任何一种核苷酸的修饰形式。该名词包括单

链和双链形式的 DNA。“分离的多核苷酸”意味着所述多核苷酸和它所来源的生物体中天然存在的基因组中直接相接（一个在 5' 端，一个在 3' 端）的两个编码序列不再直接相接。在一个实施方案中，多核苷酸编码多肽。核酸的 5' 和 3' 方向参考各个核苷酸单元的连接而定义，并且按照脱氧核糖（或核糖）糖环的碳位置指定。多核苷酸序列的信息（编码）内容从 5' 向 3' 方向阅读。

[0066] “重组”核酸是这样的核酸，它含有不是天然存在的序列或者含有将两个本来分开的序列区段通过人工组合而制成的序列。这种人工组合可以通过化学合成，或者更常见的，通过对核酸分离区段借助例如基因工程技术进行人工操作而实现。“重组”蛋白是由被导入诸如细菌或真核细胞的宿主细胞的异源（例如重组）核酸所编码的蛋白。核酸可以被导入表达载体，所述载体含有能够表达被导入的核酸所编码的蛋白的信号；或者核酸可以整合到宿主细胞染色体中。

[0067] 名词“异源”就核酸、多肽或另一种细胞成分而言，表明该成分出现在自然界中通常找不到它的地方和 / 或它起源于不同的来源或物种。

[0068] 名词“纯化”（例如就病原体或者含有病原体的组合物而言）是指从组合物中除去那些不希望有的成分的过程。纯化是一个相对名词，不要求不需要的成分全部都被从组合物中除去。在疫苗生产的语境中，纯化包括诸如离心、透析、离子交换层析和大小排阻层析、亲和纯化或沉淀的过程。因此，名词“纯化的”不要求绝对纯；而是作为一个相对名词。因此，例如，纯化的核酸制品是指，指定蛋白比在其核酸的产生环境（例如在细胞内或者在生化反应室内）中更富集的核酸制品。基本纯的核酸或蛋白制品可以被纯化成为所需核酸代表制品中总核酸含量的至少 50%。在某些实施方案中，基本纯的核酸代表制品中总核酸或蛋白含量的至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 或以上。

[0069] “分离的”生物成分（比如核酸分子、蛋白或细胞器）已被与该成分天然存在的生物体的细胞内的其他生物成分（比如其他染色体和染色体外 DNA 和 RNA、蛋白和细胞器）分开或者纯化出来。被“分离的”核酸和蛋白包括通过标准纯化方法纯化得到的核酸和蛋白。该名词还包括通过在宿主细胞内重组表达而制备的核酸和蛋白以及化学合成的核酸和蛋白。

[0070] “抗原”是可以在动物内刺激抗体产生和 / 或 T 细胞反应的化合物、组合物或物质，包括通过注射、吸收或其他方式引入动物的组合物。名词“抗原”包括所有相关的抗原表位。名词“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上 B 和 / 或 T 细胞对其反应的位点。“优势抗原表位”或“优势表位”是那些对它们产生功能重要的宿主免疫反应（例如，抗体反应或 T 细胞反应）的表位。因此，就抗病原体的保护性免疫反应而言，优势抗原表位是这样的抗原部分，当它们被宿主免疫系统识别时导致对抗病原体引起的疾病的保护作用。名词“T 细胞表位”是指当结合合适的 MHC 分子时被 T 细胞（经由 T 细胞受体）特异结合的表位。“B 细胞表位”是被抗体（或 B 细胞受体分子）特异结合的表位。

[0071] “佐剂”是以非特异性方式增强免疫反应的产生的试剂。常见佐剂包括抗原吸附在上面的矿物质（明矾、氧化铝、磷酸铝）悬浮液；乳剂，包括油包水和水包油（及其变形，包括复乳剂和可逆乳剂）、脂糖、脂多糖、免疫刺激性核酸（比如 CpG 寡核苷酸）、脂质体、Toll 样受体激动剂（特别是 TLR2、TLR4、TLR7/8 和 TLR9 激动剂）和这些成分的各种组合。

[0072] “免疫原性组合物”是适合（在例如试验情景中）给予人或动物受试对象的物质组

合物,其能够引发例如抗病原体,比如 RSV 的特异性免疫反应。这样,免疫原性组合物包含一或多种抗原(例如多肽抗原)或抗原表位。免疫原性组合物还可以包含一或多种其他能够引发或增强免疫反应的成分,比如赋形剂、载体和 / 或佐剂。某些情况中,受试对象被给予免疫原性组合物以便引发免疫反应保护其抵抗病原体引起的症状或状况。某些情况中,在受试对象接触到病原体(例如 RSV)后,通过抑制病原体的复制来防止(或者减少或改善)病原体所导致的症状或疾病。在本公开的语境中,名词免疫原性组合物理解为涵盖这样的组合物,所述组合物是为了引发抗 RSV 的保护性或缓解性免疫反应的目的被给予受试对象或受试对象群体(即疫苗组合物或疫苗)。

[0073] “免疫反应”是免疫系统的细胞,比如 B 细胞、T 细胞或单核细胞对刺激的反应。免疫反应可以是导致产生特异抗体(比如抗原特异性中和抗体)的 B 细胞反应。免疫反应也可以是 T 细胞反应,比如 CD4⁺ 反应或 CD8⁺ 反应。某些情况中,反应对特定抗原是特异的(即,“抗原特异性反应”)。如果所述抗原来源于病原体,抗原特异性反应是“病原体特异性反应”。“保护性免疫反应”是抑制病原体的有害功能或活性、减少病原体感染或者减轻病原体感染所造成的症状(包括死亡)的免疫反应。保护性免疫反应可以通过噬斑减少试验或者 ELISA 中和分析法中病毒复制或噬斑形成受到的抑制来测量,或者通过体内测量对病原体攻击的抗性。

[0074] “Th1”型免疫反应特征在于存在产生 IL-2 和 IFN- γ 的 CD4⁺ 辅助 T 细胞,因此特征也在于 IL-2 和 IFN- γ 的分泌或存在。相反,“Th2”型免疫反应特征在于产生 IL-4、IL-5 和 IL-13 的占优势的 CD4⁺ 辅助细胞。

[0075] “免疫有效量”是组合物(一般是免疫原性组合物)的量,该量用于在受试对象中引发对组合物或组合物中的抗原的免疫反应。通常,希望的结果是产生能够保护或者协助受试对象抵抗病原体的抗原(例如病原体)-特异性免疫反应。但是,为了获得抵抗病原体的保护性免疫反应可能需要多次给予免疫原性组合物。因此,在本公开的语境中,名词免疫有效量涵盖与先前给药或者之后给药组合达到保护性免疫反应的部分剂量。

[0076] 形容词“药物可接受的”表明指示物适合给予受试对象(例如人或动物受试对象)。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E.W.Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition(1975) 描述了适用于治疗性和 / 或预防性组合物(包括免疫原性组合物)的药物递送的组合物和制剂(包括稀释剂)。

[0077] 在提及反应,比如免疫反应时,名词“调整”意味着改动或改变反应的开始、反应量、持续时间或特点。能够调整免疫反应的试剂在给药后,能够改变免疫反应的开始、反应量、持续时间或特点中的至少一项,或者与参照试剂相比,能够改变免疫反应的开始、反应量、持续时间或特点中的至少一项。

[0078] 名词“减轻”是一个相对名词,如果在给予试剂后,反应或者状况从量上缩小了;或者与参照试剂相比,给予试剂后,反应或状况从量上缩小了,则所述试剂能够减轻反应或状况。类似地,只要反应或状况的至少一个特征被消除了,名词“防止”不一定要求试剂彻底消除了反应或状况。因此减轻或防止感染或反应(比如病理反应,例如疫苗增强的病毒疾病)的免疫原性组合物可以,但不一定彻底消除了这类感染或反应,只要感染或反应比没有所述试剂情况下的感染或反应或者与参照试剂相比,测量到缩小了例如至少大约 50%,比如至少大约 70%或大约 80%或甚至大约 90%(即达到原来的 10%或更少)。

[0079] “受试对象”是活的多细胞脊椎动物生物体。在本公开的语境中，受试对象可以是试验对象，比如非人动物，例如小鼠、棉田鼠或非人的灵长动物。替代地，受试对象可以是人受试对象。

[0080] PreF 抗原

[0081] 自然界中，RSV F 蛋白表达为被称为 F0 的长 574 个氨基酸的单一多肽前体。在体内，F0 在内质网中寡聚化，被弗林蛋白酶在两个保守弗林酶共有序列（弗林酶切割位点）RARR¹⁰⁹(SEQ ID NO:15) 和 RKRR¹³⁶(SEQ IDNO:16) 处经蛋白水解加工形成由两个二硫键连接的片段构成的寡聚物。两个片段中的较小片段被称为 F2，其起源于 F0 前体的 N 端部分。本领域技术人员能够认识到缩写 F0、F1 和 F2 在科技文献中常被称为 F₀、F₁ 和 F₂。较大的 C 末端 F1 片段通过疏水氨基酸序列将 F 蛋白锚定在膜中，其中该疏水氨基酸序列邻接 24 个氨基酸的细胞质尾巴。三个 F2-F1 二聚体关联形成成熟的 F 蛋白，F 蛋白处于次稳定的融合发生前（“融合前”）构象，在接触到靶细胞膜时被引发进行构象改变。这一构象改变使被称为融合肽的一段疏水序列被暴露，该融合肽与宿主细胞膜联系促进病毒或者感染细胞的膜与靶细胞膜的融合。

[0082] F1 片段含有至少两个七肽重复结构域，命名为 HRA 和 HRB，分别位于融合肽和跨膜锚定结构域附近。在融合前构象中，F2-F1 二聚体形成球状头部和茎部结构，其中 HRA 结构域在球状头部中处于分节段（延伸）构象。相反，HRB 结构域形成从头部区域伸出的三链卷曲螺旋茎部。在从融合前到融合后构象的转换过程中，HRA 结构域瓦解并被带到 HRB 结构域附近形成反平行的 6 螺旋束。在融合后状态中，融合肽和跨膜结构域并列促进膜融合。

[0083] 虽然以上提供的构象描述是基于晶体学数据的分子模型，融合前和融合后构象的结构差异并不需要借助晶体学来进行监测。例如，可以按照 Calder et al., Virology, 271:122-131(2000) 和 Morton et al., Virology, 311:275-288 展示的，用电子显微镜来区分融合前和融合后（替代地称为融合发生前或融合）构象，为了其中的技术教导将所述文献通过引用并入本文。还可以通过如 Connolly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:17903-17908(2006) 描述的脂质体关联分析法来区分融合前构象和融合（融合后）构象，为了其中的技术教导将所述文献通过引用并入本文。此外，还可以利用抗体（例如单克隆抗体）区分融合前和融合构象，所述抗体特异识别 RSV F 蛋白的融合前或融合形式中一个上存在，而在另一种形式上不存在的构象表位。这种构象表位可能是由于分子表面上优先暴露的抗原决定簇。替代地，构象表位可以来自线性多肽中不相邻的氨基酸的排列。

[0084] 本文公开的 PreF 抗原是设计用于稳定和维持 RSV F 蛋白的融合前构象，这样在表达蛋白群中，相当一部分处于融合发生前（融合前）构象（例如结构和 / 或热力学模型预测的或者通过以上公开的一或多种方法评估的）。天然（或合成）F 蛋白（比如 SEQ ID NO:2 的示范性 RSV F 蛋白）中被引入稳定化修饰，这样 PreF 抗原被引入细胞或胞外环境（例如体内，例如给予受试对象后）后，能够保持 F 蛋白融合前构象中的主要免疫原表位。

[0085] 首先，可以将异源稳定结构域放置在构建体的 C 末端以便替代 F0 多肽的膜锚定结构域。所述稳定结构域预计能够补偿 HRB 的不稳定性，帮助稳定融合前构象。在示范性实施方案中，异源稳定结构域是蛋白多聚化结构域。这类蛋白多聚化结构域的一个特别优选的例子是三聚化结构域。示范性三聚化结构域折叠成卷曲螺旋，后者促进组装成含有该卷曲螺旋结构域的多个多肽的三聚体。三聚化结构域的一个优选例子是异亮氨酸拉锁。示

范性的异亮氨酸拉锁结构域是 Harbury et al. Science 262:1401-1407(1993) 所描述的基因工程化的酵母 GCN4 异亮氨酸变体。SEQ ID NO:15 代表了一个合适的异亮氨酸结构域的序列,当然该序列的那些保留形成卷曲螺旋稳定结构域能力的变体同样适合。替代的稳定卷曲螺旋三聚化结构域包括:TRAF2(GENBANK®登录号 Q12933[gi:23503103];氨基酸 299-348);血小板反应蛋白 1(登录号 P07996[gi:135717];氨基酸 291-314);Matrilin-4(登录号 095460[gi:14548117];氨基酸 594-618);CMP(matrilin-1)(登录号 NP_002370[gi:4505111];氨基酸 463-496);HSF1(登录号 AAX42211[gi:61362386];氨基酸 165-191);和 Cubilin(Accession No. NP_001072[gi:4557503];氨基酸 104-138)。预计合适的三聚化结构域可以导致表达蛋白的相当一部分组装成三聚体。例如,含有三聚化结构域的重组 PreF 多肽至少 50% 组装成三聚体(通过例如 AFF-MALS 估计的)。一般来说,表达多肽的至少 60%,更优选至少 70%,最希望至少 75%或以上以三聚体存在。

[0086] 为了进一步增强稳定性,位于 PreF 位点 512(相对天然 F0 蛋白)的亮氨酸残基可以取代为赖氨酸(SEQ ID NO:10 所示示范性 PreF 抗原多肽中 L482K)。这一取代提高了卷曲螺旋疏水残基的周期性。类似地,可以在位点 105 的氨基酸后面添加赖氨酸。

[0087] 其次,可以除去 pep27。分析融合前状态的 RSV F 蛋白的结构模型显示 pep27 在 F1 和 F2 之间形成一个大的不受约束的环。这个环对稳定融合前状态没有帮助,在天然蛋白被弗林蛋白酶切割后消除。

[0088] 第三,可以删除一个或者两个弗林酶切割基序。对于这种设计,融合肽没有被从 F2 切割下来,防止了它从融合前构象子的球状头部释放和与临近膜的接触。融合肽和膜界面之间的相互作用预计是融合前状态不稳定的一个主要问题。在融合过程中,融合肽和目标膜之间的相互作用导致融合肽从球状头部结构中暴露出来,提高了融合前状态的不稳定性和折叠成融合后构象子。这种构象改变使得膜融合过程得以实现。除去一个或者两个弗林酶切割位点预计会阻碍融合肽 N 端部分接近膜,从而稳定了融合前状态。因此,在本文公开的示范性实施方案中,去除弗林酶切割基序产生的 PreF 抗原含有完整的融合肽,该融合肽在加工和组装过程之中或者之后不会被弗林酶切割。

[0089] 任选地,还可以通过例如取代一或多个氨基酸来去除至少一个非弗林酶切割位点。例如,试验证据表明在容易被某些金属蛋白酶进行切割的条件下,PreF 抗原可以在氨基酸 110-118 附近被切割(例如,切割发生在 PreF 抗原的氨基酸 112 和 113 之间;在 SEQ ID NO:2 所示参照 F 蛋白多肽中位点 142 的亮氨酸和位点 143 的甘氨酸之间)。相应地,该区域内一或多个氨基酸的修饰会减少 PreF 抗原的切割。例如,位点 112 的亮氨酸可以取代为不同氨基酸,比如异亮氨酸、谷氨酰胺或色氨酸(如 SEQ ID NO:20 的示范性实施方案所示)。替代地或者另外地,位点 113 的甘氨酸可以取代为丝氨酸或丙氨酸。

[0090] 任选地,PreF 抗原可以包含一或多个改变糖基化模式或状态的修饰(例如通过提高或降低天然 F 蛋白多肽中存在的一或多个糖基化位点上被糖基化的分子比例)。例如,SEQ ID NO:2 的天然 F 蛋白多肽预计在氨基酸位点 27、70 和 500(对应 SEQ ID NO:6 的示范性 PreF 抗原的位点 27、70 和 470)被糖基化。一个实施方案中,位于氨基酸位点 500 的糖基化位点附近被引入修饰(指定为 N470)。例如,可以通过用诸如谷氨酰胺(Q)的氨基酸取代位点 500(参照序列的,通过序列比对对应示范性 PreF 抗原的位点 470)的天冬酰胺将糖基化位点除去。在糖基化位点引入能够提高糖基化效率的修饰是有利的。合适修饰的

例子包括在位点 500-502 的以下氨基酸序列:NGS、NKS、NGT、NKT。有趣的是,已发现导致该糖基化位点糖基化增加的修饰也会导致 PreF 的产生极大地提高。因此在某些实施方案中,PreF 抗原中对应参照 PreF 序列 (SEQ ID NO:2) 氨基酸 500 的位置 (例如在 SEQ ID NO:6 所示的 PreF 抗原的位点 470) 上带有修饰的糖基化位点。合适的修饰包括序列 NGS、NKS、NGT、NKT,它们所在的氨基酸对应参照 F 蛋白多肽序列中的位点 500-502。SEQ ID NO:18 提供了包含 NGT 修饰的示范性实施方案的氨基酸。本领域技术人员可以很容易地确定对应 NGS、NKS 和 NKT 修饰的类似修饰。这些修饰优选与本文公开的任何稳定突变 (例如异源卷曲螺旋,比如异亮氨酸拉锁结构域和 / 或疏水区内的修饰;和 / 或去除 pep27;和 / 或去除弗林酶切割位点;和 / 或去除非弗林酶切割位点) 组合使用。例如在一个特定实施方案中,PreF 抗原包含去除弗林酶切割位点的取代和提高糖基化的修饰。在一个特定实施方案中,PreF 抗原还包含位于氨基酸位点 500 的修饰的糖基化位点。SEQ ID NO:22 提供了示范性序列 (该示范性实施方案包含 NGT 修饰和位点 112 的亮氨酸被谷氨酰胺所取代)。

[0091] 更一般地说,本文公开的任何一种稳定修饰,例如优选在可溶性 PreF 抗原的 C 末端添加异源稳定结构域,比如卷曲螺旋 (例如,异亮氨酸拉锁结构域);残基的修饰,比如疏水 HRB 结构域中亮氨酸到赖氨酸;去除 pep27;去除一个或两个弗林酶切割基序;去除非弗林酶切割位点;和 / 或糖基化位点的修饰,可以与一种或多种 (或者以任何希望的组合的所有) 其他稳定修饰组合使用。例如,可以单独使用异源卷曲螺旋 (或其他异源稳定结构域),或者与下述中的任一种组合使用:疏水区内的修饰、和 / 或去除 pep27、和 / 或去除弗林酶切割位点、和 / 或去除非弗林酶切割位点。某些特定实施方案中,PreF 抗原包含 C-端卷曲螺旋 (异亮氨酸拉锁) 结构域、位于 HRB 疏水结构域的稳定取代,以及一或两个弗林酶切割位点的去除。这样的实施方案包含未被弗林酶切割所去掉的完整的融合肽。在一个特定实施方案中,PreF 抗原还包含位于氨基酸位点 500 的被修饰过的糖基化位点。

[0092] 天然 F 蛋白多肽可以选自 RSV A 或 RSV B 株的任何 F 蛋白,或者它们的变体 (如上文定义的)。在某些示范性实施方案中,F 蛋白多肽是 SEQ ID NO:2 所代表的 F 蛋白。为了方便对本公开的理解,不论来自哪个病毒株,所有氨基酸残基位点都是相对 (即氨基酸残基位点对应) 示范性 F 蛋白的氨基酸位点给出的。本领域技术人员利用现有的公知比对算法 (比如 BLAST,使用例如缺省参数),通过将所选 RSV 株的氨基酸序列与示范性序列进行序列比对可以容易地确定任何其他 RSV A 或 B 株的相当的氨基酸位点。W02008114149 (为了提供 FSV F 和 G 蛋白序列的其他例子,通过引用并入本文) 中公开了来自不同 RSV 株的 F 蛋白多肽的许多其他例子。其他变体可以来自遗传漂变,或者可能利用定点或随机突变人工制备,或者通过两个或多个已有变体的重组制备。就本文公开的 PreF (和 PreF-G) 抗原来说,这些额外的变体也是合适的。

[0093] 挑选 F 蛋白的 F2 和 F1 结构域时,本领域技术人员会认识到不必须包括完整的 F2 和 / 或 F1 结构域。一般来说,当选择 F2 结构域的亚序列 (或片段) 时,构象方面的考虑是重要的。因此,F2 结构域通常含有 F2 结构域中能够促进多肽组装和稳定性的那部分。在某些示范性变体中,F2 结构域包含氨基酸 26-105。但长度 (通过添加或缺失一或多个氨基酸) 略有改变的变体也是可能的。

[0094] 通常,选择或设计 F1 结构域的至少一个亚序列 (或片段) 来维持稳定的包含 F 蛋白免疫优势表位的构象。例如,通常希望选择 F1 多肽结构域中位于氨基酸

262-275(palivizumab neutralization) 和 423-436(Centocor's ch101FMAb) 的亚序列, 所述亚序列包含能够被中和抗体识别的表位。此外, 希望包含例如氨基酸 328-355 区域内的 T 细胞表位。最常见的, 是作为 F1 亚基的单一连续部分 (例如跨越氨基酸 262-436), 但表位也可以保留在合成序列中, 所述合成序列包含这些免疫优势表位, 在稳定构象中它们组装成不连续的元件。因此 F1 结构域多肽包含 RSV F 蛋白多肽的至少大约氨基酸 262-436。本文提供的一个非限制性实例中, F1 结构域包含天然 F 蛋白多肽的氨基酸 137-516。本领域技术人员会认识到, 实施者可以自己判断使用其他更短的亚序列。

[0095] 当选择 F2 或 F1 结构域 (或者如下文讨论的, 对某些 PreF-G 抗原的 G 蛋白成分而言) 的亚序列时, 除了构象学方面的考虑, 最好在包含其他免疫原性表位的基础上对序列 (例如变体、亚序列等) 进行选择。例如, 利用锚定基序或其他方法, 比如本领域已知的神经网络或多项式函数判定来鉴定其他 T 细胞表位, 参见例如 RANKPEP(mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html 提供); ProPredI(imtech.res.in/raghava/propredI/index.html 提供); Bimas(www-bimas.dcrt.nih.gov/molbi/hla_bind/index.html 提供); 和 SYFPEITH(syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm 提供)。例如, 利用算法确定肽的“结合阈值”, 挑选那些有使它们在一定亲和力有较高 MHC 或抗体结合概率的分数的肽。算法基于特定位点上特定氨基酸对 MHC 结合的影响、特定位点上特定氨基酸对抗体结合的影响, 或者含有基序的肽中特定取代对结合的影响。就免疫原性肽来说, “保守残基” 是肽中特定位点上出现频率比随机分布情况下预期的频率明显高的残基。锚定残基是提供与 MHC 分子的接触点的保守残基。通过这种预测方法鉴定到的 T 细胞表位可以通过测量它们与特异 MHC 蛋白的结合以及当呈递给 MHC 蛋白时它们刺激 T 细胞的能力来确认。

[0096] PreF 抗原 (包括以下讨论的 PreF-G 抗原) 包含与表达系统对应的信号肽是有利的, 例如, 包含哺乳动物或病毒信号肽, 比如 RSV F0 天然信号序列 (例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-25 或者 SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-25)。一般来说, 选择的信号肽与选中用于重组表达的细胞相容。例如, 信号肽 (比如杆状病毒信号肽, 或蜂素信号肽) 可以经取代用于在昆虫细胞内进行表达。如果优选植物表达系统, 合适的植物信号肽是本领域已知的。许多示范性信号肽是本领域已知的 (参见例如 Zhang&Henzel, Protein Sci., 13:2819-2824 (2004), 该文献描述了多种人信号肽), 并在例如 SPdb 信号肽数据库中罗列, 该数据库包括古细菌、原核生物和真核生物的信号序列 (<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/>)。任选地, 任何以上抗原可以包含其他序列或标签, 比如协助纯化的 His 标签。

[0097] 任选地, PreF 抗原可以包含其他免疫原性成分。某些特别有利的实施方案中, PreF 抗原包含 RSV G 蛋白抗原成分。示范性的含有 PreF 和 G 成分的嵌合蛋白包含以下 PreF_V1 (SEQ ID NOs:7 和 8 所代表) 和 PreF_V2 (SEQ ID NOs:9 和 10 所代表)。

[0098] 在 PreF-G 抗原中, 在构建体的 C 末端添加 G 蛋白的抗原部分 (例如, 截断的 G 蛋白, 比如氨基酸残基 149-229)。通常 G 蛋白成分通过柔性连接序列与 F 蛋白成分连在一起。例如, 在示范性 PreF_V1 设计中, G 蛋白通过 -GGSGGSGGS- 连接肽 (SEQ ID NO:14) 与 PreF 成分连在一起。在 PreF_V2 设计中, 连接肽更短。PreF_V2 含有两个甘氨酸 (-GG-) 作为连接分子, 而没有 -GGSGGSGGS- 连接肽 (SEQ ID NO:14)。

[0099] 如果有 G 蛋白多肽结构域, 其可以包含选自任何 RSV A 或 RSV B 株的 G 蛋白的全部

或部分。在某些示范性实施方案中,G 蛋白是 SEQ ID NO:4 所代表的 G 蛋白或者与它 95% 相同。合适的 G 蛋白序列的其他例子可以在 W02008114149 (通过引用并入本文) 中找到。

[0100] 选择的 G 蛋白多肽成分要包含 G 蛋白的至少一个这样的亚序列 (或片段), 所述亚序列 (或片段) 保留了例如氨基酸 183-197 区域内的 T 细胞表位, 比如 G 蛋白的包含天然 G 蛋白氨基酸 151-229、149-229 或 128-229 的片段。在一个示范性实施方案中,G 蛋白多肽是天然 G 蛋白多肽中包含天然 G 蛋白多肽氨基酸残基 149-229 中全部或部分的片段。本领域技术人员容易理解, 也可以使用更长或更短的 G 蛋白部分, 只要选中的部分不会从构象上使得 PreF-G 抗原不稳定, 或者破坏它的表达、折叠或加工。任选地, G 蛋白结构域包含位点 191 处的氨基酸取代, 该位点以前曾被证实参与减轻和 / 或防止福尔马林灭活 RSV 疫苗引起的以嗜酸粒细胞增多为特征的病情加重。对天然和取代 (N191A) G 蛋白的特性的详尽描述可以在例如美国专利公开 2005/0042230 中找到, 该文献通过引用并入本文。

[0101] 例如, 对于挑选对应天然存在病毒株的序列, 一或多个结构域可以在序列上对应 RSV A 或 B 株, 比如常见的命名为 A2 或 Long 的实验室分离物, 或者任何其他天然存在株或分离物 (如以上提到的 W02008114149 中公开的)。除了这些天然发生的和分离的变体, PreF (包括 PreF-G) 抗原中还可以采用与上述序列有相似度的基因工程变体。本领域技术人员理解, PreF 抗原多肽 (和如下文描述的多核苷酸序列) 之间的相似度, 和对于多肽一样 (和一般来说的核苷酸序列), 可以表达为序列间的相似度, 另外也可称为序列同一性。序列同一性常常以百分比同一性 (或相似度) 来衡量, 百分比越高, 两个序列的一级结构越相似。一般, 两个氨基酸 (或多核苷酸) 序列的一级结构越相似, 由折叠和组装产生的更高结构越相似。PreF 多肽 (和多核苷酸) 序列的变体通常含有一个或少数几个氨基酸缺失、添加或取代, 但它们仍有高百分比的相同氨基酸 (以及一般来说多核苷酸)。更重要的是, 变体保持了本文公开的参照序列的结构上的因此也就是构象上的特性。

[0102] 确定序列同一性的方法是本领域公知的, 可以应用于 PreF 抗原多肽以及编码它们的核酸 (例如如下文描述的方法)。各种程序和序列比对算法在 Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Higgins and Sharp, Gene 73:237, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5:151, 1989; Corpet et al., Nucleic Acid Research 16:10881, 1988 和 Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988 中有描述。Altschul et al., Nature Genet. 6:119, 1994 提供了对序列比对方法和同源性计算的详细考虑。NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990) 可以从多个来源得到, 包括 National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) 和互联网, 可以与序列分析程序 blastp、blastn、blastx、tblastn 和 tblastx 联合使用。NCBI 网站提供了如何使用该程序确定序列同一性的描述。

[0103] 某些情况中, 相对它所来源的天然存在病毒株的氨基酸序列, PreF 抗原含有一或多个氨基酸修饰 (例如除了以上提到的稳定修饰)。这种差别可以是一或多个氨基酸的添加、缺失或取代。变体的差别通常不超过氨基酸残基的大约 1%, 或 2%, 或 5%, 或 10%, 或 15%, 或 20%。例如, 与 SEQ ID NO:6、8、10、18、20 和 / 或 22 的示范性 PreF 抗原多肽序列相比, 变体 PreF 抗原 (包括 PreF-G) 多肽序列可以包含 1 个或 2 个, 或最多 5 个, 或最多大约 10 个, 或最多大约 15 个, 或最多大约 50 个, 或最多大约 100 个氨基酸的差异。因此, 就

RSV F 或 G 蛋白或者 PreF 抗原（包括 PreF-G 抗原）而言的变体一般与参照序列（例如 SEQ ID NO :2、4、6、8、10、18、20 和 / 或 22 所显示的参照序列），或者本文公开的任何示范性 PreF 抗原具有至少 80%、或 85%，更常见的至少大约 90%或以上，比如 95%，或者甚至 98%或 99%的序列同一性。包含在本公开中作为特点之一的其他变体是 PreF 抗原（包括 PreF-G 抗原），所述 PreF 抗原包含选自 W02008114149 中公开的天然存在变体的全部或部分核苷酸或氨基酸序列。其他变体可以来自遗传漂变，或者可能利用定点或随机突变人工制备，或者通过两个或多个已有变体的重组制备。这些额外的变体就本文公开的 PreF（和 PreF-G）抗原来说，也是合适的。例如，修饰可以是不改变所得 PreF 抗原的构象或免疫原性表位的一或多个氨基酸（比如 2 个氨基酸、3 个氨基酸、4 个氨基酸、5 个氨基酸，最多大约 10 个氨基酸或者更多）的取代。

[0104] 替代地或者另外地，修饰可以包括一或多个氨基酸的缺失和 / 或一或多个氨基酸的添加。的确，如果需要的话，一或多个多肽结构域可以是合成多肽，所述合成多肽不对应任何单一病毒株，而是包含来自多个病毒株的亚序列成分，或者甚至来自通过比对多个 RSV 病毒株的多肽推测的共有序列。在某些实施方案中，一或多个多肽结构域通过添加构成标签的氨基酸序列被修饰，所述标签能够协助后续的加工或纯化。这类标签可以是抗原或表位标签、酶标签或多聚组氨酸标签。标签一般位于蛋白的一端或者另一端，比如抗原或融合蛋白的 C 末端或 N 末端。

[0105] 编码 PREF 抗原的核酸

[0106] 本公开的另一个方面涉及编码以上描述的 PreF 抗原的重组核酸。更明确地说，所述核酸编码包含可溶性 F 蛋白多肽抗原的多肽，其中所述 F 蛋白多肽抗原包含 RSV F 蛋白多肽的 F2 结构域和 F1 结构域，核酸所编码的多肽包含选自以下的至少一个修饰：(i) 添加包含异源三聚化结构域的氨基酸序列；(ii) 缺失至少一个弗林酶切割位点；(iii) 缺失至少一个非弗林酶切割位点；(iv) 缺失 pep27 结构域的一或多个氨基酸；和 (v) 在 F 蛋白胞外结构域的疏水结构域中取代或添加至少一个亲水氨基酸。任选地，所述多核苷酸编码糖基化位点带有修饰的 PreF 抗原。这类多肽的性质和结构细节已在上文详细公开。本领域技术人员根据本文的教导，可以容易地确定编码所述多肽中任一个和所有多肽的核苷酸序列，包括序列表中提供的示范性序列和以其他方式包括在本公开的序列（例如通过引用并入的）。

[0107] 在某些实施方案中，重组核酸经过密码子优化以便在选中的原核或真核宿主细胞内表达。例如，SEQ ID NOs :5、12、17、19 和 21 是编码 PreF 抗原的序列的不同非限制性例子，这些序列经密码子优化用于在哺乳动物（例如 CHO）细胞中表达。为了协助其复制和表达，可以将核酸并入载体，比如原核或真核表达载体。包含重组 PreF 抗原编码核酸的宿主细胞也是本公开的特点。适合的宿主细胞包括原核（即细菌）宿主细胞，比如大肠杆菌；和大量的真核宿主细胞，包括真菌（例如酵母）细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞（比如 CHO、VERO 和 HEK293 细胞）。

[0108] 为了促进其复制和表达，可以将核酸并入载体，比如原核或真核表达载体。虽然本文公开的核酸可以包含到各种载体（包括例如，细菌质粒；噬菌体 DNA；杆状病毒；酵母质粒；由质粒和噬菌体 DNA 的组合衍生的载体；病毒 DNA，比如痘苗病毒、腺病毒、鸡痘病毒、假狂犬病病毒、腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒和许多其他病毒）中的任一种，载体常常是

适合产生多肽表达产物的表达载体。在表达载体中,编码 PreF 抗原的核酸通常被安排在引导 mRNA 合成的合适转录调控序列(启动子和任选地一或多个增强子)的附近和同一方向。即,目标多核苷酸序列可操纵地连接着合适的转录调控序列。这类启动子的例子包括:CMV 的立即早期启动子、LTR 或 SV40 启动子、杆状病毒的多角体蛋白(polyhedron)启动子、大肠杆菌 lac 或 trp 启动子、噬菌体 T7 和 λ P_L 启动子,以及其他已知能够调控基因在原核或真核细胞或者它们的病毒中的表达的启动子。表达载体一般还含有用于起始翻译的核糖体结合位点和转录终止子。载体任选包含合适的序列以便扩增表达。此外,表达载体任选包含一或多个可选择的标记物基因从而提供选择转化宿主细胞的表现型特征,比如对于真核细胞培养物,二氢叶酸还原酶或新霉素抗性;或者在大肠杆菌中比如卡那霉素、四环素或氨苄青霉素抗性。

[0109] 表达载体还可以包含其他表达元件来提高例如翻译效率。这些信号包括例如 ATG 起始密码子和相邻的序列。某些情况中,例如将翻译起始密码子和相关序列元件与目的多核苷酸序列(例如天然起始密码子)同时插入合适的表达载体中。这种情况下不需要额外的翻译调控信号。但对于只插入了多肽编码序列或它的一部分的情况,要给编码 PreF 抗原的核酸的翻译提供外源翻译调控信号,包括 ATG 起始密码子。起始密码子的放置使它处于正确的阅读框中以确保目的多核苷酸序列的翻译。外源转录元件和起始密码子可以来自各种来源,可以是天然的也可以是合成的。如果需要,可以通过包含适合所用细胞系统的增强子来进一步提高表达效率(Scharf et al. (1994) Results Probl Cell Differ 20: 125-62; Bitter et al. (1987) Methods in Enzymol 153: 516-544)。

[0110] 某些情况中,编码 PreF 抗原的核酸(比如载体)包含一或多个其他序列元件,所述选中的序列元件用于提高和/或优化 PreF 编码核酸在导入宿主细胞时的表达。例如,在某些实施方案中,编码 PreF 抗原的核酸包含内含子序列,比如人疱疹病毒 5 内含子序列(参见例如 SEQ ID NO:13)。内含子已被反复证明当它被恰当地置于重组构建体时,能够增强同源和异源核酸的表达。另一类表达增强序列包括超基因元件,比如核基质附着区(Matrix Attachment Region, 或 MAR) 或类似的超基因元件,例如 STAR 元件(例如,比如 Otte et al., Biotechnol. Prog. 23: 801-807, 2007 中公开的那些 STAR 元件)。不受任何理论约束, MARs 被认为能够介导靶 DNA 序列锚定到核基质上,产生从异染色质核心延伸出来的染色质环结构域。虽然 MARs 不含有任何明显的共有序列或可识别的序列,它们最一致的特点似乎是整体的高 A/T 含量, C 碱基在一条链上占优势。这些区域形成弯二级结构,所述弯二级结构易于发生链分离,可能含有作为链分离成核点的核心解旋元件(CUE)。已发现与 MAR 序列关联的几个富含 AT 的简单序列基序:例如 A-box、T-box、DNA 解旋基序、SATB1 结合位点(H-box, A/T/C25) 和对于脊椎动物或果蝇的共有拓扑异构酶 II 位点。示范性 MAR 序列在已公开的美国专利申请 20070178469 和国际专利申请 W002/074969(文献通过引用并入本文)中有描述。可用于增强 PreF 抗原编码核酸的表达的其他 MAR 序列包括 Girod et al., Nature Methods, 4: 747-753, 2007 中描述的鸡溶菌酶 MAR、MARp1-42、MARp1-6、MARp1-68 和 MARpx-29(分别在 GenBank 以登录号 EA423306、DI107030、DI106196、DI107561 和 DI106512 公开)。技术人员能够理解,可以通过选择产生中等增强水平的 MAR, 比如报导过的 MAR 1-9 来进一步调控表达。如果需要,可以例如利用诸如 MAR-Finder(在 futuresoft.org/MarFinder 网站提供)、SMARTest(genomatix.de 网站提供)或 SMARScan

I(Levitsky et al., Bioinformatics 15:582-592, 1999) 的软件通过检索序列数据库鉴定替代的 MAR 序列来提高 PreF 抗原的表达。在某些实施方案中, MAR 与 PreF 抗原编码序列在相同核酸(例如载体)上被导入(例如转染)宿主细胞。在替代的实施方案中, MAR 被放在另外的核酸上(例如反式)导入, 任选其与 PreF 抗原编码多核苷酸序列共整合。

[0111] 足够指导本领域普通技术人员生成重组 PreF 抗原核酸的示范性程序可以在 Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1992(和 2003 年的补充); 以及 Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 4th ed., Wiley & Sons, 1999 中找到。

[0112] SEQ ID NOs: 5、7、9、12、13、17、19 和 21 代表了编码 PreF 抗原多肽的示范性核酸。包含糖基化位点修饰的变体, 例如在对应 SEQ ID NO: 2 中位点 500 的氨基酸带有修饰的变体, 可以通过改变(例如突变)(与例如 SEQ ID NO: 12 的多核苷酸序列相比的)位点 1408-1414 附近的核苷酸来产生。编码糖基化变体(例如糖基化效率提高的)的合适核苷酸序列包括: aacgggt、aacaagt、aacggga 和 aacaaga。也可能使用替代的序列, 比如消除糖基化位点的 cagcagt。通过将选自任何已知或随后发现的 RSV 株的类似 F 和 G 蛋白多肽序列进行组装可以产生其他变体, 例如象 W02008114149 中公开的。本领域技术人员可以制备与示范性变体有同一性的其他序列变体。一般来说, 核酸变体编码的多肽的氨基酸残基差别不超过 1%、或 2%、或 5%、或 10%、或 15%、或 20%。这就是说, 所编码的多肽有至少 80%、或 85%, 或更常见的有至少大约 90% 或以上, 比如 95% 或者甚至 98% 或 99% 的序列同一性。本领域技术人员立即可以明白, 编码 PreF 多肽的多核苷酸序列本身由于遗传密码的冗余性可能序列同一性小一些。某些情况中, 相对它所来源的天然存在病毒株的氨基酸序列, PreF 抗原含有一或多个氨基酸修饰(例如除了以上提到的稳定修饰)。这种不同可以分别是一或多个核苷酸或氨基酸的添加、缺失或取代。变体的差别通常不超过大约 1%、或 2%、或 5%、或 10%、或 15%、或 20% 的核苷酸残基。例如, 与 SEQ ID NO: 5、7、9、12、13、17、19 和 / 或 21 的示范性 PreF 抗原核酸相比, 变体 PreF 抗原(包括 PreF-G)核酸可以包含 1、或 2、或最多 5 个、或最多大约 10 个、或最多大约 15 个、或最多大约 50 个、或最多大约 100 个核苷酸的差别。因此, 就 RSV F 或 G 蛋白或 PreF 抗原(包括 PreF-G 抗原)核酸而言的变体通常与参照序列, 例如 SEQ ID NO: 5、7、9、12、13、17、19 和 / 或 21 所展示的参照序列相比, 或者与本文公开的任何其他示范性 PreF 抗原核酸相比有至少 80%、或 85%, 更常见的是有至少大约 90% 或以上, 比如 95% 或者甚至 98% 或 99% 的序列同一性。包含在本公开中作为特点之一的其他变体是 PreF 抗原(包括 PreF-G 抗原), 所述 PreF 抗原包含选自 W02008114149 中公开的天然存在变体的全部或部分核苷酸序列。其他变体可以来自遗传漂变, 或者可能利用定点或随机突变人工制备, 或者通过两个或多个已有变体的重组制备。这些额外的变体就本文公开的 PreF(和 PreF-G)抗原来说, 也是合适的。

[0113] 除了先前描述的变体核酸, 与 SEQ ID NOs: 1、3、5、7、9、12、13、17、19 和 / 或 21 所代表的示范性核酸中的一或多个杂交的核酸也可以作为编码 PreF 抗原的核酸使用。本领域技术人员理解, 除了以上讨论的 % 序列同一性衡量标准, 两个核酸之间序列相似性的另

一个指标是相互杂交的能力。两个核酸的序列越相似,它们能够在越严紧的条件下杂交。杂交条件的严紧程度是序列依赖性的,在不同环境参数下不同。因此,造成特定严紧程度的杂交条件根据所选杂交方法和杂交核酸序列的组成及长度而变化。通常,杂交温度和杂交缓冲液的离子强度(特别是 Na^+ 和/或 Mg^{++} 浓度)决定了杂交的严紧度,尽管清洗时间也会对严紧度有影响。一般选择的严紧条件比特定序列在限定离子强度和pH下的热变性温度(T_m)低大约 5°C – 20°C 。其中 T_m 是靶序列有50%与完全匹配的探针发生杂交时的温度(在限定离子强度和pH情况下)。核酸杂交的条件以及严紧度计算方法可以在例如 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Tijssen, *Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I: Theory and Nucleic Acid Preparation*, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993 和 Ausubel et al. *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999 中找到。

[0114] 为了本公开的目的,“严紧条件”涵盖这样的条件,在所述条件下只有当杂交分子与靶序列之间的错配低于25%,杂交才会发生。为了更准确的定义,可以将“严紧条件”分成更具体的严紧水平。因此,用于本文“温和严紧”条件是在该条件下有25%以上序列错配的分子不发生杂交的条件;“中等严紧”条件是在该条件下有15%以上错配的分子不发生杂交的条件,“高度严紧”条件是在该条件下有10%以上错配的序列不发生杂交的条件。“超严紧”条件是在该条件下有6%以上错配的序列不发生杂交的条件。相反,在“低严紧”条件下杂交的核酸包括那些序列同一性低得多的核酸,或者只在核酸的非常短亚序列有序列同一性的核酸。因此,应当明白本公开涵盖的各种核酸变体能够与 SEQ ID NOs: 1、3、5、7、9、12、13、17、19 和/或 21 中的至少一个几乎全长杂交。

[0115] 制备 RSV 抗原性多肽的方法

[0116] 本文公开的 PreF 抗原(包括 PreF-G 抗原,和适用的情况中的 G 抗原)是利用重组蛋白表达和纯化的成熟操作过程产生的。足够指导本领域技术人员的程序可在以下参考文献中找到: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 200; 和 Ausubel et al. *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999。其他具体细节在下文提供。

[0117] 将编码 PreF 抗原的重组核酸通过各种公知程序导入宿主细胞,所述程序根据选定的载体和宿主细胞,包括比如电穿孔、脂质体介导的转染(例如利用商品脂质体转染剂,比如 LIPOFECTAMINE™2000 或 TRANSFECTIN™)、磷酸钙沉淀、感染、转染等。SEQ ID NOs: 5、7、9、12、13、17、19 和 21 提供了编码 PreF 抗原(包括 PreF-G 抗原)的示范性核酸。本领域技术人员可以理解,SEQ ID NOs: 5、7、9、12、13、17、19 和 21 仅用于说明,并非用于限制。例如,与 SEQ ID NOs: 5、7 和 9 编码的蛋白(例如 SEQ ID NOs: 6、8 和 10 代表的)相同,但只有遗传密码冗余不同(比如象 SEQ ID NO: 12 中显示的,替代的密码子优化产生的)的多核苷酸序列,可以代替 SEQ ID NOs: 5、7 和 9 的示范性序列使用。对 SEQ ID NOs: 17、19 和 21 也是这样。类似地,可以采用 SEQ ID NO: 13 所显示的包含表达增强元件的多核苷酸序列,所述表达增强元件是比如固有内含子(或通过添加启动子、增强子、内含子或其他类似元件)。本领域技术人员可以认识到,这些修饰的组合也是合适的。类似地,选自任何 RSV

A 或 RSV B 株的同源序列,和 / 或有相当大序列同一性的其他序列也可以用于表达 PreF 抗原。的确,以前公开的任何变体核酸都适合导入宿主细胞,用于产生 PreF 抗原(包括 PreF-G 抗原)和适用的情况下产生 G 多肽。

[0118] 例如,某些情况中,变体核酸经过修饰改变了糖基化模式,例如象上文描述的通过取代氨基酸位点 500(相对 SEQ ID NO:2 而言,例如 SEQ ID NO:17)附近的一或多个氨基酸。已经发现改变糖基化模式,结合例如修饰切割识别位点能够提高 PreF 抗原在细胞培养中的产量。这种情况下,下文描述的表达和分离重组 PreF 抗原的方法提供了增加 PreF 抗原生产的过程,所述过程通过取代糖基化位点的一或多个氨基酸来改变 PreF 抗原的糖基化模式,任选与如上所述修饰一或多个切割位点(比如非弗林酶或弗林酶切割识别位点)组合使用。

[0119] 因此,包含重组 PreF 抗原编码核酸的宿主细胞也是本公开的一个特征。适合的宿主细胞包括原核(即细菌)宿主细胞,比如大肠杆菌;和无数真核宿主细胞,包括真菌(例如酵母,比如酿酒酵母和巴斯德毕赤酵母)细胞、昆虫细胞、植物细胞和哺乳动物细胞(比如 CHO 和 HEK293 细胞)。重组 PreF 抗原核酸例如经由载体(比如表达载体)被导入(例如转导、转化或转染)宿主细胞。正如上文描述过的,载体最一般是质粒,但这类载体也可以是例如,病毒颗粒、噬菌体等。合适的表达宿主的例子包括:细菌细胞,比如大肠杆菌、链霉菌和伤寒沙门氏菌;真菌细胞,比如酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母和粗糙脉孢菌;昆虫细胞,比如果蝇和草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*);哺乳动物细胞,比如 3T3、COS、CHO、BHK、HEK 293 或 Bowes 黑素瘤;植物细胞,包括藻细胞等。某些情况中,瞬时转染细胞可以用于产生重组 PreF 抗原。某些实施方案中,挑选带有稳定整合的 PreF 核酸的细胞(例如克隆)并用于产生重组 PreF 抗原。

[0120] 宿主细胞可以培养在常规营养培养基中,所述培养基根据启动子的激活、挑选转化子或扩增插入的多核苷酸序列等需要进行了改进。诸如温度、pH 等的培养条件一般就是以前给表达选择的宿主细胞使用的条件,对本领域技术人员是显而易见的,可参见本文引用的参考文献,包括例如 Freshney(1994)Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York 和该书引用的参考文献。任选地,宿主细胞培养在无血清和 / 或无动物制品的培养基中。

[0121] 本发明所述核酸对应的表达产物还可以在非动物细胞中产生,比如植物、酵母、真菌、细菌等。除了 Sambrook、Berger 和 Ausubel,关于细胞培养的详细描述可以在 Payne et al. (1992)Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley&Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips(eds) (1995)Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag(Berlin Heidelberg New York) 和 Atlas and Parks(eds)The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL 中找到。

[0122] 在细菌系统中,根据表达产物的预期用途,有大量表达载体可供选择。例如,当需要大量多肽或其片段用于产生抗体时,优选采用能够引导高水平表达易于纯化的融合蛋白的载体。这类载体包括,但不限于多功能大肠杆菌克隆和表达载体,比如 BLUESCRIPT(Stratagene),该载体中目的编码序列(例如以上描述的本发明的多核苷酸)可以连接到载体内与编码氨基端启动翻译的甲硫氨酸和随后的 7 个 β -半乳糖苷酶

残基的序列读框一致,从而产生有催化活性的 β -半乳糖苷酶融合蛋白;pIN 载体 (Van Heeke&Schuster(1989) *J Biol Chem* 264 :5503-5509)。某些实例中,核酸经由适合在原核细胞(例如大肠杆菌细胞)内导入和表达的载体被引入细胞。例如,包含编码 PreF 抗原的多核苷酸序列的核酸可以导入多种商品或专有载体中的任何一种,比如 pET 系列的表达载体(例如 pET9b 和 pET2d)。IPTG 诱导编码序列的表达,造成高水平的蛋白表达。编码 PreF 抗原的多核苷酸序列在噬菌体 T7 启动子的引导下转录。替代的载体,比如包含热诱导 λ pL 启动子的 pURV22 也是合适的。

[0123] 然后将表达载体导入(例如通过电穿孔)合适的细菌宿主。有许多合适的大肠杆菌株可供本领域技术人员选择(例如, Rosetta 和 BL21 (DE3) 株已被证明适用于含有 PreF 抗原编码多核苷酸序列的重组载体的表达)。

[0124] 类似地,在酵母(比如酿酒酵母)中,含有组成型或诱导型启动子(比如 α 因子、乙醇氧化酶和 PGH) 的许多载体可以用于所需表达产物的生产。综述参见 Berger、Ausubel 和例如 Grant et al. (1987; *Methods in Enzymology* 153 :516-544)。在哺乳动物宿主细胞中,有许多表达系统,包括基于质粒和病毒的系统可供使用。

[0125] 另一个例子中,利用杆状病毒表达载体系统 (BEVS),将编码 PreF 抗原的多核苷酸序列导入昆虫细胞。能够感染昆虫细胞的重组杆状病毒可以利用商品载体、试剂盒和 / 或系统来制备,比如来自 BD BioScience 的 BD BaculoGold 系统。简单来说,将编码抗原的多核苷酸序列插入到 pAcSG2 转移载体中。然后,宿主细胞 SF9(草地贪夜蛾)用 pAcSG2 嵌合质粒和 BDBaculoGold 共转染,其中所述 BD BaculoGold 含有杆状病毒-苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, (AcNPV)) 的线性基因组 DNA。转染后, pAcSG2 质粒和杆状病毒基因组之间发生同源重组因而产生重组病毒。在一个例子中,PreF 抗原在多角体蛋白启动子 (pH) 的调控下表达。类似的转移载体可以利用其他启动子,比如 Basic (Ba) 和 p10 启动子来产生。类似地,可以采用替代的昆虫细胞,比如与 Sf9 密切相关的 SF21 和来源于粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 的 High Five 细胞系。

[0126] 更典型地,编码 PreF 抗原的多核苷酸被引入适合在真核(例如昆虫或哺乳动物细胞)中导入和表达的载体。为了利于在选中的载体 / 宿主细胞中进行表达,这些核酸经过密码子优化(例如, SEQ ID NOs :5、7、9、12、13、17、19 和 21 显示的序列是为了在 CHO 细胞中表达经过密码子优化的)。在一个示范性实施方案中,编码 PreF 抗原的多核苷酸序列被引入载体,比如 Lonza Biologicals 公司开发的 pEE14 载体。多肽在组成型启动子,比如立即早期 CMV(巨细胞病毒)启动子的引导下表达。挑选表达所述多肽的稳定转染细胞是根据转染细胞在没有谷氨酰胺来源的情况下能够生长进行的。被成功引入 pEE14 的细胞能够在没有外源谷氨酰胺的情况下生长,因为 pEE14 载体表达 GS(谷氨酰胺合成酶)酶。选中的细胞可以经克隆扩增并对所需 PreF 多肽的表达进行研究。

[0127] 任选宿主细胞是根据其对插入序列的表达的调控能力或者宿主细胞以预期方式加工表达蛋白的能力来进行挑选的。所述蛋白修饰包括,但不限于糖基化(以及例如乙酰化、羧化、磷酸化、脂化和酰基化)。任选在宿主细胞中进行翻译后加工,例如(由弗林蛋白酶)将蛋白的前体形式切割为成熟形式。不同的宿主细胞,比如 3T3、COS、CHO、HeLa、BHK、MDCK、293、WI38 等有特定的细胞机器和特征性机制进行这类翻译后活动,可供选择以确保导入的外来蛋白的正确修饰和加工。

[0128] 为了长期高产量的生产本文公开的重组 PreF 抗原,一般使用稳定表达系统。例如,利用表达载体将稳定表达 PreF 抗原多肽的细胞系导入宿主细胞,所述表达载体含有病毒复制原点或内源表达元件以及选择性标记基因。导入载体后,细胞在营养培养基中生长 1-2 天,然后转移到选择性培养基中。选择性标记的目的是赋予抗性以便进行挑选,它的存在保证那些能够成功表达导入序列的细胞的生长和回收。例如,稳定转化细胞的抗性组或菌落可以利用适合该细胞类型的组织培养技术进行增殖。任选在适合编码蛋白的表达并从培养物中回收的条件下培养转化了 PreF 抗原编码核酸的宿主细胞。正如以上指出的,如果需要,可以将宿主细胞培养在无血清(和/或无动物产物)的培养基中。

[0129] 在转导合适的宿主细胞系并且宿主细胞生长至合适的细胞密度后,通过适当的手段(例如温度变化或化学诱导)对所选的启动子进行诱导,并将细胞继续培养一段时间。任选地,培养基包含能够减少蛋白酶对表达蛋白的降解的成分和/或添加物。例如,用于培养产生 PreF 抗原的细胞的培养基可以包含蛋白酶抑制剂,比如螯合剂或小分子抑制剂(例如 AZ11557272、AS111793 等),以便减少或消除细胞内或细胞外(例如基质)蛋白酶的不希望的切割。

[0130] 然后从培养基中回收分泌的多肽产物。替代地,可以通过离心收集细胞,经物理或化学手段破碎,并保留得到的粗提取物进一步纯化。蛋白表达所采用的真核或微生物细胞可以通过任何方便的方法破碎,包括反复冻融、超声波、机械破碎或利用细胞裂解剂或本领域技术人员已知的其他方法。

[0131] 表达的 PreF 抗原可以通过本领域已知的许多方法中的任何一种从重组细胞培养物中回收和纯化,所述方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、过滤、超滤、离心、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析(例如利用本文提到的任何一种标签系统)、羟磷灰石层析和凝集素层析。如果需要可以利用蛋白重折叠步骤来完成成熟蛋白的构型。最后,在纯化终末步骤中可以采用高效液相层析(HPLC)。除了以上提到的参考文献,许多纯化方法是本领域熟知的,包括例如下述文献中列举的:Sandana(1997)Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.;和 Bollag et al.(1996)Protein Methods, 2nd Edition Wiley-Liss, NY;Walker(1996)The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris and Angal(1990)Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, U.K.;Scopes(1993)Protein Purification: Principles and Practice 3rd Edition Springer Verlag, NY;Janson and Ryden(1998)Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, NY;以及 Walker(1998)Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ.。

[0132] 在一个示范性实施方案中,按照以下纯化方案从细胞中回收 PreF 蛋白。编码 PreF 多肽的重组核酸被导入宿主 CHO 细胞后,将包含被导入多核苷酸序列的瞬时转染宿主细胞或经过扩增的稳定细胞群生长在培养基中,生长条件适合细胞生长到对所需目的来说可以接受的规模(例如象 Freshney(1994)Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York 和其中引用的参考文献中描述的)。一般来说,细胞于 37℃ 生长在摇瓶或生物反应器中的无血清培养基中,以 2-3 天的间隔进行传代。由在这些条件下扩增的细胞建立起来的新培养物通常在生物反应器中的无血清培养

基中于 27℃温育 5-7 天, pO₂ 维持在 20%, 从而产生 PreF 抗原。

[0133] 为了回收重组 PreF 抗原, 将细胞培养物离心, 细胞培养物上清液保存在零下 70℃ 以备后用。培养物上清液融化后, 上清液用 MilliQ 水 2x 稀释, 并用 HCl 调节到 pH 6.0。将稀释后的上清液以 75cm/h 上样到装在 BPG140/500 柱子中的 3L CM Ceramic HyperD FF 树脂中, 柱子已用 20mM 磷酸盐 (pH 6.0) 平衡。上样后, 用平衡缓冲液过柱以便回到 UV 基线。用 5 个柱体积 (CV) 的 25mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 清洗后, 用含有 0.1M NaCl 的 50mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 进行洗脱。

[0134] CM Hyper D 洗脱级分用 20mM 磷酸盐 (pH 7.0) 3.3x 稀释, 在 270ml 羟磷灰石 II 型柱子 (装在 XK 50 中) 上进行处理, 柱子已用 20mM PO₄(Na) 缓冲液 (pH 7.0) 以 50mL/min 平衡。柱子用平衡缓冲液 (~3CV) 洗后, 用含有 0.5M NaCl 的 20mM PO₄(Na) (pH 7.0) 进行洗脱。

[0135] HA 洗脱级分以 15mL/min (与树脂有 10 分钟接触时间) 上样到 150mL Capto Adhere 柱子 (装在 XK 26 中) 上进行处理, 柱子已用 20mM 磷酸盐 (pH 7.0) 平衡。用 5CV 含有 0.1M 精氨酸缓冲液的 10mM 磷酸盐 (pH 7.0) 清洗后, 用含有 0.6M 精氨酸的 10mM 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 进行洗脱。

[0136] 然后将 Capto Adhere 洗脱级分浓缩大约 10x 以便在制备性大小排阻层析 (SEC) 柱上处理。浓缩用 50kD Pellicon 聚醚砜膜进行。在 SEC 柱子上处理之前, 材料经 PLANOVA 20N 100cm² 滤器过滤, 作为清除病毒的步骤。该纳米过滤步骤可以安排在 Pellicon 膜浓缩之前或者之后进行。

[0137] 然后用 500mL Superdex S200 柱子进行制备 SEC, 10mM 磷酸盐 (Na/K₂)、160mM NaCl 缓冲液 (pH 6.5, 对应最终缓冲液) 作为流动相。将等同 5% SEC 柱体积的浓缩 PreF 以 ~2.6mL/min 上样到树脂中。通常收集每份 10mL 的级分。如果需要, 将级分汇合在一起通过银染和抗 HCP (宿主细胞蛋白) Western 印迹在 SDS 胶上分析以便优化产量同时减少 HCP 水平。

[0138] 在 0.22 μm Millex 滤器 (替代地可以使用 Sterivex 滤器) 上过滤后获得纯化好的批次。如果需要, 纯化的 PreF 抗原制品在使用前可以保存在 -70℃。

[0139] 替代地, PreF 蛋白可以包含多聚组氨酸 (例如 6 组氨酸) 标签, 所述标签可以用于协助纯化。对于这种带组氨酸标签的 PreF 多肽, 可以采用以下纯化方案。在用固定化金属离子亲和层析 (IMAC) 进行纯化之前, 细胞培养物上清液在缓冲液 A (20mM Bicine, pH 8.5) 中稀释两倍, pH 调节至 8.5。得到的溶液上样到已用缓冲液 A 平衡好的柱体积 23ml 的 Q sepharose FF 柱子 (GE Healthcare) 上。PreF 蛋白与某些宿主细胞杂质一起被捕获到柱子上。可能对 IMAC 纯化步骤造成干扰的培养基成分没有滞留, 而是清除到穿流液中。蛋白通过 200mM、400mM、600mM、800mM 和 1M NaCl 逐步洗脱被分开和洗脱。目的 PreF 蛋白在 200mM NaCl 的第一个步骤中洗脱。任选地, 利用 SDS PAGE 和 Western 印迹 (用抗 His 标签的抗体检测带标签的 PreF 蛋白) 可以监测蛋白回收情况。在继续纯化前可以将级分汇合。

[0140] (汇合的) 含 PreF 蛋白的洗脱级分在缓冲液 B (20mM Bicine、500mM NaCl、pH 8.3) 中稀释 3 倍, pH 被调节到 8.3。得到的溶液上样到加载氯化镍 (GE Healthcare) 的例如柱体积 5ml 的已用缓冲液 B 平衡好的 IMAC sepharose FF 树脂上。PreF 结合到树脂上, 大部分宿主细胞杂质被洗脱到穿流液中。柱子用 20mM 咪唑清洗以便除去弱结合的杂质。PreF 蛋

白经 250mM 咪唑一步洗脱。可以进行考马斯亮蓝染色的 SDS PAGE 和抗 His 标签 Western 印迹来鉴定阳性级分。

[0141] 由 IMAC 得到的集合然后可以利用 Centricon 浓缩装置 (Millipore) 浓缩到至少 150 μ g/ml 的浓度, 蛋白在补充有 500mM L- 精氨酸的 PBS 缓冲液中透析。得到的蛋白用 RCDC 蛋白检测法 (BioRad) 定量, 并保存在 -70 或 -80°C 待用。

[0142] 免疫原性组合物和方法

[0143] 还提供了免疫原性组合物, 所述组合物包含任何以上公开的 PreF 抗原 (比如 SEQ ID NOs :6、8、10、18、20 和 22 所示范的那些) 和药物可接受载体或赋形剂。

[0144] 在某些实施方案中, 通常即 PreF 抗原不包含 G 蛋白成分的实施方案中 (比如 SEQ ID NO :6), 免疫原性组合物可以包含分离的、重组的和 / 或纯化的 G 蛋白。现有技术已描述过许多合适的 G 蛋白, 包括全长重组 G 蛋白, 和由 G 蛋白的一部分 (比如氨基酸 128-229 或 130-230) 与融合伙伴 (比如硫氧还蛋白) 或者信号和 / 或前导序列 (协助表达和 / 或纯化) 组成的嵌合蛋白。与 PreF 抗原混合使用的示范性 G 蛋白可以在 W02008114149、美国专利 5, 149, 650、美国专利 6, 113, 911、美国已公开申请 20080300382 和美国专利 7, 368, 537 中找到, 这些文献均通过引用并入本文。正如对嵌合 PreF-G 蛋白已指出的, 更小的 G 蛋白片段, 比如氨基酸 149-229 之间的部分, 或者大约 128 到大约 229 之间的部分适合于包括 PreF (没有 G) 和 G 的混合物中。正如以上讨论过的, 重要的考虑是免疫优势表位的存在, 例如在氨基酸 183-197 区域内包含的表位。替代地, 这种组合物中可以采用全长 G 蛋白。

[0145] 药物可接受载体和赋形剂是公知的, 可以由本领域技术人员选择。例如, 载体或赋形剂可以有利地包含缓冲液。任选地, 载体或赋形剂还含有至少一种稳定溶解度和 / 或稳定性的成分。助溶 / 稳定剂的例子包括去污剂, 例如月桂肌氨酸和 / 或 Tween。替代的助溶 / 稳定剂包括精氨酸和玻璃形成多元醇 (比如蔗糖、海藻糖等)。大量药物可接受载体和 / 或药物可接受赋形剂是本领域已知的, 在例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5th Edition (975) 中有描述。

[0146] 相应地, 本领域技术人员可以选择合适的赋形剂和载体来制备适合通过所选给药途径递送给受试对象的制剂。

[0147] 合适的赋形剂包括, 但不限于: 甘油、聚乙二醇 (PEG)、山梨醇、海藻糖、N- 月桂酰肌氨酸钠盐、L- 脯氨酸、非去污的甜菜碱磺酸、盐酸胍、脲、氧化三甲胺、KCl、Ca²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺ 和其他二价阳离子相关盐、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇和 β - 巯基乙醇。其他赋形剂可以是去污剂 (包括: Tween80、Tween20、Triton X-00、NP-40、Empigen BB、辛基葡萄糖苷、月桂酰麦芽糖苷、Zwittergent 3-08、Zwittergent 3-0、Zwittergent 3-2、Zwittergent3-4、Zwittergent 3-6、CHAPS、脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠、溴化十六烷基三甲胺)。

[0148] 任选地, 免疫原性组合物还包含佐剂。就适合给予受试对象以便引发抗 RSV 的保护性免疫反应的免疫原性组合物而言, 佐剂的选择要能够引发特征在于产生干扰素- γ (IFN- γ) 的 Th1 型或 Th1/Th2 平衡型免疫反应。

[0149] 通常挑选佐剂以便增强被给予组合物的受试对象或受试对象群体中的 Th1 型免疫反应 (或者 Th1/Th2 平衡型免疫反应), 所述免疫反应特征在于 IFN- γ 的产生和分泌。例如, 当免疫原性组合物是要给予对 RSV 感染易感 (或风险增加) 的特定年龄组受试对象时, 要挑选对受试对象或受试对象群体安全并有效的佐剂。因此, 当配制含有 RSV PreF 抗

原的免疫原性组合物用于老年受试对象（比如超过 65 岁的受试对象）给药时，挑选在老年受试对象中安全有效的佐剂。类似地，当含有 PreF 抗原的免疫原性组合物是要给予新生儿或婴儿受试对象（比如出生到两岁的受试对象）时，挑选在新生儿和婴儿中安全有效的佐剂。对于挑选在新生儿和婴儿中安全有效的佐剂的情况，佐剂剂量可以选择是通常给予成年受试对象的剂量的稀释液（或分剂量）。

[0150] 此外，一般挑选经免疫原性组合物的给药途径给予时能够增强 Th1 免疫反应的佐剂。例如，当配制用于经鼻给药的含有 PreF 抗原的免疫原性组合物时，蛋白酶体和 protollin 是合适的 Th1 偏向型佐剂。相反，当免疫原性组合物配制用于肌肉给药时，适合挑选包含 3D-MPL、角鲨烯（例如 QS21）、脂质体、和 / 或油和水乳剂中的一种或多种的佐剂。

[0151] 适合与 PreF 抗原组合使用的一种佐剂是无毒的细菌脂多糖衍生物。合适的脂质 A 无毒衍生物的例子是单磷酸脂质 A 或更具体地说是 3- 脱酰基单磷酸脂质 A (3D-MPL)。3D-MPL 由 GlaxoSmithKline Biologicals N. A. 以 MPL 的名字销售，在本文件中称为 MPL 或 3D-MPL。参见例如，美国专利 4, 436, 727、4, 877, 611、4, 866, 034 和 4, 912, 094。3D-MPL 主要促进有 IFN- γ (Th1) 表现型的 CD4+T 细胞反应。3D-MPL 可以根据 GB2220211A 中公开的方法生产。从化学上来说，它是带有 3、4、5 或 6 个酰基化链的 3- 脱酰基单磷酸脂质 A 的混合物。在本发明的组合物中，可以使用小颗粒 3D-MPL。小颗粒 3D-MPL 的颗粒大小使它能够通过 0.22 μm 过滤器过滤除菌。WO94/21292 中描述了这种制剂。

[0152] 脂多糖，比如 3D-MPL，在每个人类剂量的免疫原性组合物中可以使用 1-50 μg 。这种 3D-MPL 可以按大约 25 μg 的水平使用，例如 20-30 μg ，合适的是 21-29 μg 或 22-28 μg 或 23-27 μg 或 24-26 μg ，或者 25 μg 。另一个实施方案中，人类剂量的免疫原性组合物中包含大约 10 μg 水平的 3D-MPL，例如 5-15 μg ，合适的是 6-14 μg ，例如 7-13 μg 或 8-12 μg 或 9-11 μg ，或者 10 μg 。再一个实施方案中，人类剂量的免疫原性组合物中包含大约 5 μg 水平的 3D-MPL，例如 1-9 μg ，或 2-8 μg ，或者合适的是 3-7 μg 或 4- μg ，或者 5 μg 。

[0153] 在其他实施方案中，脂多糖可以是如美国专利 6, 005, 099 和欧洲专利 0729473B1 中描述的 β (1-6) 葡萄糖胺二糖。本领域技术人员根据这些文献中的教导，很容易制备出各种脂多糖，比如 3D-MPL。这些文献均通过引用并入本文。除了以上提到的免疫刺激剂（与 LPS 或 MPL 或 3D-MPL 结构相似的），是以上 MPL 结构一部分的酰基化单糖和二糖衍生物也是合适的佐剂。在其他实施方案中，佐剂是脂质 A 的合成衍生物，其中的某些被描述为 TLR-4 激动剂，包括但不限于：OM174(2- 脱氧 -6- α -[2- 脱氧 -2-[(R)-3- 十二酰氧四氢 - 癸酰氨]-4- α - 磷酸基 - β -D- 吡喃葡萄糖基]-2-[(R)-3- 羟基十四酰氨]- α -D- 吡喃葡萄糖基二氢磷酸酯)，(WO 95/14026)；OM 294DP(3S, 9R)-3-[[(R)- 十二酰氧十四酰氨]-4- 氧 -5- 氮杂 -9(R)-[(R)-3- 羟基十四酰氨] 癸烷 -1, 10- 二醇 1, 10- 双 (二氢磷酸酯) (WO 99/64301 和 WO 00/0462)；和 OM 197MP-Ac DP(3S-, 9R)-3-[(R)- 十二酰氧十四酰氨]-4- 氧 -5- 氮杂 -9-[(R)-3- 羟基十四酰氨] 癸烷 -1, 10- 二醇, 1- 二氢磷酸盐 10-(6- 氨基己酸酯) (WO 01/46127)。

[0154] 其他可以使用的 TLR4 配体是烷基葡萄糖胺磷酸酯 (AGPs)，比如 WO98/50399 或美国专利 6, 303, 347（还公开了 AGPs 的制备过程）中公开的那些，合适的是 RC527 或 RC529 或者美国专利 6, 764, 840 中公开的 AGPs 的药物可接受盐。某些 AGPs 是 TLR4 激动剂，某些是 TLR4 拮抗剂。两种都被认为可以作为佐剂使用。

[0155] 其他能够经由 TLR-4 引起信号传导反应 (Sabroe et al, JI 2003 p1630-5) 的合适的 TLR-4 配体是例如, 来自革兰氏阴性细菌的脂多糖及其衍生物或者它们的片段, 特别是 LPS 的无毒衍生物 (比如 3D-MPL)。其他合适的 TLR 激动剂是: 热震惊蛋白 (HSP) 10、60、65、70、75 或 90; 表面活性蛋白 A、透明质酸寡糖、硫酸肝素片段、纤连蛋白片段、纤维蛋白原肽和 b- 防御素 -2 以及胞壁酰二肽 (MDP)。在一个实施方案中, TLR 激动剂是 HSP 60、70 或 90。其他合适的 TLR-4 配体在 WO 2003/011223 和 WO 2003/099195 中有描述, 比如 WO2003/011223 的 4-5 页或者 WO2003/099195 的 3-4 页公开的化合物 I、化合物 II 和化合物 III, 特别是 WO2003/011223 中公开为 ER803022、ER803058、ER803732、ER804053、ER804057、ER804058、ER804059、ER804442、ER804680 和 ER804764 的那些化合物。例如一个合适的 TLR-4 配体是 ER804057。

[0156] 其他 TLR 激动剂也可以作为佐剂使用。名词“TLR 激动剂”是指这样的试剂, 所述试剂能够直接作为配体或者通过产生内源或外源配体间接引起经由 TLR 信号传导途径的信号传导反应。这些天然或合成 TLR 激动剂可以作为替代的或额外的佐剂使用。Kaisho&Akira, Biochimica et Biophysica Acta 1589:1-13, 2002 中提供了 TLRs 作为佐剂受体的简短综述。这些潜在的佐剂包括, 但不限于 TLR2、TLR3、TLR7、TLR8 和 TLR9 的激动剂。相应地, 在一个实施方案中, 佐剂和免疫原性组合物还包含选自 TLR-1 激动剂、TLR-2 激动剂、TLR-3 激动剂、TLR-4 激动剂、TLR-5 激动剂、TLR-6 激动剂、TLR-7 激动剂、TLR-8 激动剂、TLR-9 激动剂或它们的组合的佐剂。

[0157] 在本发明的一个实施方案中, 使用了能够经由 TLR-1 引起信号传导反应的 TLR 激动剂。能够经由 TLR-1 引起信号传导反应的合适的 TLR 激动剂选自: 三酰基化脂肽 (LPs); 酚溶性 modulin; 结核分枝杆菌 LP; 模拟细菌脂蛋白乙酰化氨基端的 S-(2, 3-双(棕榈酰氧基)-(2-RS)-丙基)-N-棕榈酰-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, 三盐酸 (Pam3Cys) LP; 和来自伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 的 OspA LP。

[0158] 在替代实施方案中, 使用了能够经由 TLR-2 引起信号传导反应的 TLR 激动剂。能够经由 TLR-2 引起信号传导反应的合适的 TLR 激动剂是来自结核分枝杆菌、伯氏疏螺旋体或苍白螺旋体的脂蛋白、肽聚糖、细菌脂肽; 来自包括金黄色葡萄球菌的种的肽聚糖; 脂磷壁酸、甘露糖醛酸、奈瑟氏菌孔蛋白、细菌纤毛、耶尔森氏菌毒力因子、CMV 毒粒、麻疹病毒血凝素以及来自酵母的酵母聚糖中的一种或多种。

[0159] 在替代实施方案中, 使用了能够经由 TLR-3 引起信号传导反应的 TLR 激动剂。能够经由 TLR-3 引起信号传导反应的合适的 TLR 激动剂是双链 RNA (dsRNA) 或聚肌胞苷酸 (Poly IC), 后者是与病毒感染相关联的分子核酸形式。

[0160] 在替代实施方案中, 使用了能够经由 TLR-5 引起信号传导反应的 TLR 激动剂。能够经由 TLR-5 引起信号传导反应的合适的 TLR 激动剂是细菌鞭毛蛋白。

[0161] 在替代实施方案中, 使用了能够经由 TLR-6 引起信号传导反应的 TLR 激动剂。能够经由 TLR-6 引起信号传导反应的合适的 TLR 激动剂是分枝杆菌脂蛋白、二酰基化 LP 和酚溶性 modulin。其他 TLR6 激动剂在 WO2003/043572 中有描述。

[0162] 在替代实施方案中, 使用了能够经由 TLR-7 引起信号传导反应的 TLR 激动剂。能够经由 TLR-7 引起信号传导反应的合适的 TLR 激动剂是单链 RNA (ssRNA)、洛索立宾 (loxoribine, 位点 N7 和 C8 的鸟嘌呤核苷类似物) 或咪唑喹啉化合物或其衍生物。在一个

实施方案中,TLR 激动剂是咪喹莫特 (imiquimod)。其他 TLR7 激动剂在 WO 2002/085905 中有描述。

[0163] 在替代实施方案中,使用了能够经由 TLR-8 引起信号传导反应的 TLR 激动剂。能够经由 TLR-8 引起信号传导反应的合适的 TLR 激动剂是单链 RNA (ssRNA)、具有抗病毒活性的咪唑喹啉分子,例如雷西莫特 (resiquimod, R848)。雷西莫特也能被 TLR-7 识别。其他可以使用的 TLR-8 激动剂包括 WO 2004/071459 中描述的那些。

[0164] 在替代实施方案中,使用了能够经由 TLR-9 引起信号传导反应的 TLR 激动剂。在一个实施方案中,能够经由 TLR-9 引起信号传导反应的合适的 TLR 激动剂是 HSP90。替代地,能够经由 TLR-9 引起信号传导反应的 TLR 激动剂是细菌或病毒 DNA,含有未甲基化的 CpG 核苷酸的 DNA,在特定序列语境中被称为 CpG 基序。含有 CpG 的寡核苷酸诱发占优势的 Th1 反应。这些寡核苷酸是公知的,在例如 WO 96/02555、WO 99/33488 以及美国专利 6,008,200 和 5,856,462 中有描述。合适的 CpG 核苷酸是 CpG 寡核苷酸。用于本发明的免疫原性组合物中的合适寡核苷酸是含有 CpG 的寡核苷酸,任选含有被至少 3 个,合适的是至少 6 个或更多个核苷酸隔开的两个或更多个二核苷酸 CpG 基序。CpG 基序是胞嘧啶核苷酸和后面的鸟嘌呤核苷酸。本发明的 CpG 寡核苷酸通常是脱氧核苷酸。在特定实施方案中,寡核苷酸中的核苷酸间键合是二硫代磷酸酯,或者合适的是硫代磷酸酯键,虽然磷酸二酯和其他核苷酸间键也在发明的范围内。还包含在本发明范围内的是带有混合的核苷酸间键合的寡核苷酸。生产硫代磷酸寡核苷酸或二硫代磷酸酯的方法在美国专利 5,666,153、5,278,302 和 WO 95/26204 中有描述。

[0165] 可以与 PreF 抗原一起用于免疫原性组合物的其他佐剂,例如单独或者与 3D-MPL 或本文描述的另一种佐剂组合使用的佐剂是皂苷,比如 QS21。

[0166] Lacaille-Dubois, M and Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2pp 363-386) 提供了关于皂苷的教导。皂苷是广泛分布在植物和海洋动物界的类固醇或三萜甙。皂苷的特点是在水中形成摇动时发泡的胶态溶液并能沉淀胆固醇。当皂苷靠近细胞膜时,它们能够在膜上产生孔样结构导致膜破裂。红细胞溶血即是该现象的一个例子,这是某些但并非全部皂苷的属性。

[0167] 皂苷已知可以作为用于系统给药的疫苗中的佐剂。各种皂苷的佐剂和溶血活性已有广泛研究 (Lacaille-Dubois and Wagner, 同前)。例如, Quil A (来源于的树皮南美树种莫利那肥皂草皂树 (*Quillaja Saponaria* Molina)) 及其组分在 US 5,057,540 和 “Saponins as vaccine adjuvants”, Kensil, C.R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12(1-2):1-55; 以及 EP 0 362 279B1 中有描述。包含 QuilA 部分的颗粒结构,被称为免疫刺激复合物 (Immune Stimulating Complexes, ISCOMS) 是溶血性的,已被用于疫苗制备 (Morein, B., EP 0 109942B1; WO 96/11711; WO 96/33739)。溶血皂苷 QS21 和 QS17 (Quil A 的 HPLC 纯化组分) 被描述为强力的系统佐剂,它们的生产方法在美国专利 5,057,540 和 EP 0 362 279B1 中公开,所述专利通过引用并入本文。被用于系统疫苗接种研究的其他皂苷包括来源于其他植物物种,比如丝石竹属 (*Gypsophila*) 和肥皂草属 (*Saponaria*) 的皂苷 (Bomford et al., *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992)。

[0168] QS21 是来源于莫利那肥皂草皂树皮的 HPLC 纯化的无毒组分。美国专利 5,057,540

中公开了生产 QS21A 的方法。含有 QS21 的非反应性佐剂制剂在 WO 96/33739 中有描述。以上提到的文献通过引用并入本文。所述免疫活性皂苷, 比如 QS21, 在每个免疫原性组合物人类剂量中可以按照 1 到 50 μg 之间的量使用。有益的是 QS21 以大约 25 μg 的水平使用, 例如 20–30 μg 之间, 合适的是 21–29 μg 之间或 22–28 μg 之间或 23–27 μg 之间或 24–26 μg 之间, 或者是 25 μg 。另一个实施方案中, 免疫原性组合物的人类剂量中包含大约 10 μg 水平的 QS21, 例如 5 和 15 μg 之间, 合适的是 6–14 μg 之间, 例如 7–13 μg 之间或 8–12 μg 之间或 9–11 μg 之间, 或者是 10 μg 。再一个实施方案中, 免疫原性组合物的人类剂量中包含大约 5 μg 水平的 QS21, 例如 1–9 μg 之间或 2–8 μg 之间, 或者合适的是 3–7 μg 或 4–6 μg 之间, 或者是 5 μg 。这种包含 QS21 和胆固醇的制剂已被证实当与抗原一起成剂时是成功的 Th1 刺激佐剂。因此, 例如, PreF 多肽适合与包含 QS21 和胆固醇组合的佐剂一起用于免疫原性组合物中。

[0169] 任选地, 佐剂还可以包含矿物盐, 比如铝或钙盐, 特别是氢氧化铝、磷酸铝和磷酸钙。例如, 含有 3D-MPL 和铝盐 (例如氢氧化铝或“明矾”) 联用的佐剂适合用于配制给予人受试对象的含有 PreF 抗原的免疫原性组合物。

[0170] 另一类适合用于含 PreF 抗原的制剂的 Th1 型佐剂包括基于 OMP 的免疫刺激组合物。基于 OMP 的免疫刺激组合物尤其适合作为粘膜佐剂, 例如用于鼻内给药。基于 OMP 的免疫刺激组合物是一类来自革兰氏阴性细菌 (包括, 但不限于奈瑟氏菌) 的外膜蛋白 (OMPs, 包括某些孔蛋白) 制品 (参见例如 Lowell et al., J. Exp. Med. 167 :658, 1988 ;Lowell et al., Science 240 :800, 1988 ;Lynch et al., Biophys. J. 45 :104, 1984 ;Lowell, in " New Generation Vaccines" 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, page 193, 1997 ;美国专利 5, 726, 292 ;美国专利 4, 707, 543), 可以作为载体来用或用在免疫原 (比如细菌或病毒抗原) 组合物中。某些基于 OMP 的免疫刺激组合物可以称为“蛋白体 (Proteosomes)”, 它们是疏水的并且人可以安全使用。所述蛋白体有能力自动组装成大约 20nm 到大约 800nm 的囊泡或囊泡样 OMP 簇, 并与蛋白抗原 (Ags), 特别是含有疏水部分的抗原非共价地合并、协作、关联 (例如静电地或者疏水地), 或以其他方式合作。任何产生处于囊泡或囊泡样形式中的外膜蛋白成分的制备方法, 包括多分子膜结构或者一或多个 OMPs 构成的熔融球状 OM 组合物, 都包含在蛋白体的定义中。蛋白体可以按照例如现有技术 (参见例如美国专利 5, 726, 292 或美国专利 5, 985, 284) 的描述制备。蛋白体还可以含有来自制备 OMP 孔蛋白的细菌 (例如奈瑟氏菌) 的内源脂多糖或脂肪寡糖 (分别是 LPS 或 LOS), 其中脂多糖或脂肪寡糖只占整个 OMP 制品的 2% 以下。

[0171] 蛋白体主要由化学提取的脑膜炎奈瑟氏菌的外膜蛋白 (OMPs) (主要是孔蛋白 A 和 B 以及 4 型 OMP) 组成, 利用去污剂保持在溶液中 (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. In :Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York :Marcel Dekker, Inc. 1997 ;193–206)。蛋白体可以与多种抗原通过例如渗滤或常规透析过程成剂, 所述抗原是例如来自病毒来源的纯化或重组蛋白, 包括本文公开的 PreF 多肽。逐渐去除去污剂使得形成直径大约 100–200nm 的颗粒状疏水复合物 (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. In :Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, eds, New Generation Vaccines. New York :Marcel Dekker, Inc. 1997 ;193–206)。

[0172] “蛋白体:LPS或Proto1lin”用于本文是指混合蛋白体制品,例如通过外源添加至少一种脂多糖来提供OMP-LPS组合物(可以作为免疫刺激组合物)。因此OMP-LPS组合物可以由Proto1lin的两种基本成分组成,所述组合物包含(1)由革兰氏阴性菌,比如脑膜炎奈瑟氏菌制备的蛋白体的外膜蛋白制品(例如Projuvant),和(2)一或多种脂多糖的制品。脂肪寡糖可以是内源的(例如OMP蛋白体制品天然含有的),可以与来自外源制备的脂肪寡糖(例如由与OMP制品来源不同的培养物或微生物制备的)的OMP制品混合或组合,或者可以是它们的组合。这些外源加入的LPS可以与OMP制品来自相同的革兰氏阴性细菌,或者来自不同的革兰氏阴性细菌。Proto1lin也应被理解为任选包含脂质、糖脂、糖蛋白、小分子等,以及它们的组合。Proto1lin可以按照例如美国专利申请公开2003/0044425中的描述进行制备。

[0173] 不同佐剂的组合,比如以上提到的佐剂的组合,也可以与PreF抗原一起用于组合物。例如,正如已经提到的,QS21可以与3D-MPL一起成剂。QS21:3D-MPL的比率一般在1:10到10:1的水平;比如1:5到5:1,常常基本是1:1。通常,比率在2.5:1到1:13D-MPL:QS21的范围内。另一个组合佐剂制品包含3D-MPL和铝盐,比如氢氧化铝。当组合配制时,这种组合可以增强抗原特异性Th1免疫反应。

[0174] 某些情况中,佐剂制品包含诸如钙或铝盐的矿物质盐,例如磷酸钙、磷酸铝或氢氧化铝。存在铝的情况下,例如与3D-MPL组合的情况,其量一般在每剂大约100 μ g和1mg之间,比如从大约100 μ g或大约200 μ g到大约750 μ g,比如大约500 μ g。

[0175] 某些实施方案中,佐剂包含油和水乳剂,例如水包油乳剂。水包油乳剂的一个例子是在水性载体中包含可代谢油,比如角鲨烯;母生育酚,比如生育酚,例如 α -生育酚;和表面活性剂,比如山梨醇三油酸酯(Span 85TM)或聚环氧乙烷山梨醇单油酸酯(Tween 80TM)。在某些实施方案中,水包油乳剂不含有任何其他免疫刺激剂(特别是不含有无毒脂质A衍生物,比如3D-MPL;或皂苷,比如QS21)。水性载体可以是例如磷酸盐缓冲液。此外,水包油乳剂可以含有span 85和/或卵磷脂和/或三辛酸甘油酯。

[0176] 本发明的另一个实施方案中,提供了疫苗组合物。所述疫苗组合物包含抗原或抗原组合物,和包含水包油乳剂的佐剂组合物,以及任选的一或多种其他免疫刺激剂,其中所述水包油乳剂包含0.5-10mg可代谢油(合适的有角鲨烯)、0.5-11mg母生育酚(合适的有生育酚,比如 α -生育酚)和0.4-4mg乳化剂。

[0177] 在一个特定实施方案中,佐剂制品包含制备成乳剂,比如水包油乳剂形式的3D-MPL。某些情况中,乳剂颗粒的直径大小如W0 94/21292中公开的低于0.2 μ m。例如,3D-MPL颗粒小到可以经0.22 μ m膜过滤除菌(如欧洲专利0 689 454中描述的)。替代地,3D-MPL可以制备成脂质体制剂。任选地,含有3D-MPL(或其衍生物)的佐剂还包含其他免疫刺激成分。

[0178] 选择的佐剂在免疫原性组合物要给予的群体中是安全有效的。对于成年和老年群体,制剂含有的佐剂成分通常比婴儿制剂中的多。在使用水包油乳剂的特定制剂中,所述乳剂可以包含其他成分,例如象胆固醇、角鲨烯、 α -生育酚;和/或去污剂,比如Tween 80或Span85。在示范性制剂中,这些成分存在的量如下:大约1-50mg胆固醇、2-10%角鲨烯、2-10% α -生育酚和0.3-3% Tween 80。一般来说,角鲨烯: α -生育酚的比率等于或小于1,这样能够提供更稳定的乳剂。某些情况中,制剂还可以含有稳定剂。

[0179] 当含有 PreF 多肽抗原的免疫原性组合物是配制用于婴儿给药时,要确定佐剂的剂量在婴儿受试对象中是有效并且相对没有反应性的。通常,婴儿制剂中的佐剂剂量比为成年人(例如 65 岁及以上的成年人)设计的制剂中使用的量少(例如剂量可能是给予成年人的制剂中提供的剂量的一部分)。例如,3D-MPL 在每剂中的量通常在 $1\text{ }\mu\text{g}$ - $200\text{ }\mu\text{g}$ 的范围,比如 $10\text{ }\mu\text{g}$ - $100\text{ }\mu\text{g}$ 或者 $10\text{ }\mu\text{g}$ - $50\text{ }\mu\text{g}$ 。婴儿剂量一般在该范围的较低一端,例如大约 $1\text{ }\mu\text{g}$ -大约 $50\text{ }\mu\text{g}$,比如从大约 $2\text{ }\mu\text{g}$,或大约 $5\text{ }\mu\text{g}$,或大约 $10\text{ }\mu\text{g}$ 到大约 $25\text{ }\mu\text{g}$ 或大约 $50\text{ }\mu\text{g}$ 。通常,对于制剂中使用了 QS21 的情况,范围是相当的(并且符合以上指出的比率)。对于油和水乳剂(例如水包油乳剂)的情况,提供给儿童或婴儿的佐剂剂量可以是给予成年人受试对象的剂量的一部分。实施例 9 提供了免疫原性组合物效力的证明,所述组合物含有 PreF 抗原组合了不同剂量的示范性水包油佐剂。

[0180] 免疫原性组合物一般含有免疫保护量(或其分剂量)的抗原,并且可以通过常规技术制备。免疫原性组合物,包括要给予人受试对象的那些,它们的制备概括描述于 Pharmaceutical Biotechnology, Vol.61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995 和 New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U. S. A. 1978。在脂质体内的包封由例如 Fullerton(美国专利 4, 235, 877) 描述过。蛋白与大分子的偶联在 Likhite 的美国专利 4, 372, 945 和 Armor 等的美国专利 4, 474, 757 中有公开。

[0181] 一般来说,每剂免疫原性组合物中的蛋白量选择能够在典型受试对象中诱发免疫保护反应,但没有明显有害副作用的量。这一语境下的免疫保护不一定意味着完全抗感染;它意味着抗某些症状或疾病,特别是抗与病毒关联的严重疾病的保护作用。根据所采用的具体免疫原,抗原的量可能不同。通常,每个人类剂量可以预期包含 $1\text{ }\mu\text{g}$ - $1000\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白,比如大约 $1\text{ }\mu\text{g}$ -大约 $100\text{ }\mu\text{g}$,例如,大约 $1\text{ }\mu\text{g}$ -大约 $50\text{ }\mu\text{g}$,比如大约 $1\text{ }\mu\text{g}$ 、大约 $2\text{ }\mu\text{g}$ 、大约 $5\text{ }\mu\text{g}$ 、大约 $10\text{ }\mu\text{g}$ 、大约 $15\text{ }\mu\text{g}$ 、大约 $20\text{ }\mu\text{g}$ 、大约 $25\text{ }\mu\text{g}$ 、大约 $30\text{ }\mu\text{g}$ 、大约 $40\text{ }\mu\text{g}$ 或大约 $50\text{ }\mu\text{g}$ 。免疫原性组合物中使用的量根据受试对象群体(例如婴儿或老年人)来选择。通过标准研究,包括观察受试对象中的抗体效价和其他反应,可以给特定组合物确定最佳用量。在接受初始疫苗接种后,受试对象可以在大约 4 周后接受加强剂。

[0182] 应当指出,无论选择了何种佐剂,其在最终制剂中的浓度经计算对目标群体是安全有效的。例如,用于在人中引发抗 RSV 的免疫反应的免疫原性组合物适合给予婴儿(例如从出生到 1 岁的婴儿,比如首次给药时年龄为 0-6 个月)。引发抗 RSV 的免疫反应的免疫原性组合物也适合给予老年人(例如单独,或者与流感抗原和/或其他 COPD 相关病原体的抗原联合给药)。可以理解,这些不同应用中可以选择不同佐剂,每种情况的最佳佐剂及其浓度可以由本领域技术人员根据经验决定。

[0183] 在某些实施方案中,免疫原性组合物是能够减少或防止感染 RSV 的疫苗。某些实施方案中,免疫原性组合物是减少或防止感染 RSV 后的病理反应的疫苗。任选地,含有 PreF 抗原的免疫原性组合物与至少一种来自 RSV 之外的病原生物体的其他抗原一起成剂。例如,所述病原生物体可以是呼吸道病原体(比如引起呼吸道感染的病毒或细菌)。某些情况中,免疫原性组合物含有来自 RSV 之外的病原病毒的抗原,所述病毒是比如引起呼吸道感染的病毒,比如流感或副流感病毒。其他实施方案中,可以选择额外的抗原来协助给药或者

减少给受试对象提供抗多种感染性生物体的保护作用所需的接种次数。例如,可以使用来源于流感、乙肝、白喉、破伤风、百日咳、流感嗜血杆菌、脊髓灰质炎、链球菌或肺炎球菌等中的任何一种或多种的抗原。

[0184] 相应地, PreF 抗原或其编码核酸在制备药物中的用途也是本公开的特征之一, 其中所述药物用于接触或感染了 RSV (之后治疗性的或者之前预防性的) 的治疗。类似地, 在受试对象中引发抗 RSV 的免疫反应的方法也是本公开的特征之一。所述方法包括将免疫有效量的包含 PreF 抗原的组合物给予受试对象, 比如人受试对象。组合物常常包含能够引发 Th1 型免疫反应的佐剂。组合物被配制用于引发针对 RSV 的特异性免疫反应, 而不会在接触 RSV 后加重病毒疾病。这就是说, 组合物被配制并且导致 Th1 型免疫反应, 该免疫反应减少或防止感染 RSV, 和 / 或减少或防止感染 RSV 后的病理反应。虽然组合物可以通过多种不同途径进行给药, 最经常地, 免疫原性组合物经由肌内或鼻内给药途径递送。

[0185] 免疫原性组合物一般含有免疫保护量 (或其分剂量) 的抗原, 并且可以通过常规技术制备。免疫原性组合物, 包括要给予人受试对象的那些, 它们的制备概括描述于 Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design—the subunit and adjuvant approach, edited by Powell and Newman, Plenum Press, 1995 和 New Trends and Developments in Vaccines, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U. S. A. 1978。在脂质体内的包封由例如 Fullerton (美国专利 4, 235, 877) 描述过。蛋白与大分子的偶联在 Likhite 的美国专利 4, 372, 945 和 Armor 等的美国专利 4, 474, 757 中有公开。

[0186] 一般来说, 每剂免疫原性组合物中的蛋白量选择能够在典型受试对象中诱发免疫保护反应, 但没有明显有害副作用的量。这一语境下的免疫保护不一定意味着完全抗感染; 它意味着抗某些症状或疾病, 特别是抗与病毒关联的严重疾病的保护作用。根据所采用的具体免疫原, 抗原的量可能不同。通常, 每个人类剂量可以预期包含 1–1000 μg 蛋白, 比如大约 1 μg –大约 100 μg , 例如, 大约 1 μg –大约 50 μg , 比如大约 1 μg 、大约 2 μg 、大约 5 μg 、大约 10 μg 、大约 15 μg 、大约 20 μg 、大约 25 μg 、大约 30 μg 、大约 40 μg 或大约 50 μg 。免疫原性组合物中使用的量根据受试对象群体 (例如婴儿或老年人) 来选择。通过标准研究, 包括观察受试对象中的抗体效价和其他反应, 可以给特定组合物确定最佳用量。在接受初始疫苗接种后, 受试对象可以在大约 4–12 周后接受加强剂。例如, 在将含有 PreF 抗原的免疫原性组合物给予婴儿个体时, 初始和后续的接种可以与同时期要给予的其他疫苗一起给予。

[0187] 以下实施例仅供阐明某些特定特征和 / 或实施方案。这些实施例不应被理解为使发明限于所描述的特定特征或实施方案。

实施例

[0188] 实施例 1: 示范性 PreF 抗原

[0189] 基于这样一个预测, 即针对 F 蛋白的融合前构象产生的免疫反应优先包含的抗体能够防止膜融合所涉及的结合、构象转换和 / 或其他事件, 从而提高了保护性反应的效力, 因此为了将蛋白稳定在它的融合前构象, 对 PreF 抗原相对天然 RSV F 蛋白进行了修饰。

[0190] 图 1A 和 B 示意了 RSV F0 和示范性 PreF 重组抗原的特性。图 1A 代表了 RSV F0

蛋白。F0 是由 574 个氨基酸组成的前蛋白。F0 前蛋白在翻译后被蛋白水解加工和糖基化。信号肽（后来被信号肽酶去除）将 F0 前蛋白的翻译定靶到内质网（RE）上进行。RE 中的新生肽然后在多个位点（以三角形代表）被 N-糖基化。弗林蛋白酶对 F0 的切割产生 F2 和 F1 肽结构域，它们折叠并一起组装成 F2-F1 异质二聚体的三聚体（即，3 份 F2-F1）。在天然状态下，F 蛋白通过其 C 端区域内的跨膜螺旋锚定在膜上。F0 多肽的其他特性包括 15 个半胱氨酸、4 个已被研究的中和表位、2 个卷曲螺旋区和脂化基序。图 1B 显示了示范性 PreF 抗原的特性。为了构建 PreF 抗原，对 F0 多肽进行了修饰以便稳定 F 蛋白的融合前构象，从而保留 F 蛋白的优势免疫原表位，所述优势免疫原表位即是 RSV 病毒在与宿主细胞结合并融合前呈递的表位。相对 F0 多肽，向 PreF 抗原中引入了以下稳定突变。首先，在 F0 多肽胞外结构域的 C 末端放置一个稳定卷曲螺旋结构域来代替 F0 的膜锚定结构域。其次，去除 pep27 肽（在天然蛋白中位于 F2 和 F1 结构域之间）。第三，将两个弗林蛋白酶基序都除去。在替代的实施方案（命名为 PreF_V1 和 PreF_V2）中，给 C 端结构域添加了 RSV G 蛋白的免疫活性部分（例如氨基酸 149-229）。

[0191] 其他实施方案中，引入修饰来改变糖基化和 / 或减少弗林蛋白酶之外的蛋白酶的切割。

[0192] 实施例 2：从 CHO 细胞产生和纯化 PreF 重组蛋白

[0193] 编码示范性 PreF 抗原的重组多核苷酸序列被导入宿主 CHO 细胞进行 PreF 抗原的产生。将包含被导入多核苷酸序列的瞬时转染宿主细胞或经过扩增的稳定细胞群生长在培养基中，生长条件适合细胞生长到对所需目的来说可以接受的规模（例如象 Freshney(1994)Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York 及其中引用的参考文献概括描述的）。一般来说，细胞于 37℃、5% CO₂ 下生长在摇瓶中的无血清培养基中，以 2-3 天的间隔进行传代，或者在生物反应器中于 29℃ 生长，pO₂ 维持在 20%。

[0194] 为了回收重组 PreF 抗原，将细胞培养物离心，细胞培养物的上清保存在大约 -80℃ 待用。对于进一步分析，取两升细胞培养物上清液用纯化水 2x 稀释，用 NaOH 调节 pH 9.5。上清液以 14ml/min 的速度上样到已用 20mM 哌嗪 (pH 9.5) 平衡过的 Q Sepharose FF 离子交换柱 (60ml, 11.3cm) 中。柱子用出发缓冲液洗后，用 20 柱体积的 NaCl 进行洗脱，NaCl 梯度在 0-0.5M (级分大小 10ml)。级分在 SDS PAGE 胶上通过银染和 Western 印迹分析。然后将含有 PreF 蛋白的级分汇合做进一步处理。

[0195] 汇合的 Q 步骤洗脱级分 (~130mls) 用 Millipore 的带有 Pellicon XL PESBiomax 100 (MWCO 10,000Da) 膜盒的 TFF 系统经缓冲液交换到 10mM 硫酸盐 (pH 7.0) 中。得到的材料 pH 为 7.0，电导率为 1.8mS/cm。取 100ml 该样品以 5ml/min 上样到用 10mM PO₄(Na) 缓冲液 (pH 7.0) 平衡好的 10ml 羟基磷灰石 II 型 (HA TII) 胶 (XK 16, 高度 = 5cm) 中。柱子用出发缓冲液洗后，以 20 柱体积的 10mM 到 200mM PO₄(Na) (pH 7.0) 进行梯度洗脱。再次在 SDS PAGE 上通过银染和考马斯亮蓝分析级分，合并阳性的级分。

[0196] 亲和层析后，用 Vivaspin 20 浓缩单元，10,000Da MWCO 将合并的级分浓缩并将缓冲液交换为 DPBS (pH ~ 7.4)。终产物大约 13ml。蛋白浓度经 Lowry 分析法检测为 195 μg/ml。纯度大于 95%。该纯化的 PreF 抗原制品经过滤除菌，保存在 -20℃ 待用。

[0197] 实施例 3：CHO 细胞中产生的 PreF 重组蛋白的表征

[0198] 在 CHO 细胞中产生的 PreF 重组蛋白通过非对称场流分离 (AFF-MALS) 分析并与包含 RSV F 和 G 蛋白成分的嵌合抗原进行比较。AFF-MALS 允许在最小的基质相互作用情况下,根据分子大小将液流中的蛋白种类分开,并通过多角度光散射进一步分析确定分子量。图 2A 显示纯化的 FG 物质在最终的 PBS 缓冲液中 65% 以上处于高分子量寡聚物 (1000-100000KDa),只有 3% 保持单体形式。

[0199] 图 2B 显示纯化的 PreF 蛋白在 PBS 缓冲液中 73% 折叠成三聚体形式。物质的 10% 处于 1000 到 20000KDa 的寡聚物。这些结果表明 CHO 细胞中表达的重组 PreF 蛋白和天然状态预期的一样折叠成三聚体。

[0200] 纯化的 PreF 蛋白还与戊二醛交联,其双重目的是确认蛋白在磷酸缓冲液中的溶解性和形成与 FG 蛋白进行体内评估比较的凝聚物 (见以下实施例 7)。已知戊二醛交联能够很好地评估蛋白质的四级结构,在 *Biochemistry*, 36 :10230-10239 (1997) 和 *Eur. J. Biochem.*, 271 :4284-4292 (2004) 中有描述。

[0201] 蛋白与 1%、2% 和 5% 戊二醛交联剂于 4℃ 温育 4 小时,加入 NaBH₄ 阻断反应。过多的戊二醛通过 PBS 缓冲液脱盐柱去除。得到的蛋白经 280nm 的吸光度定量,通过变性还原条件下的 SDS PAGE 评估。确认大部分纯化重组 PreF 在 PBS 溶液中以三聚体迁移。SDS PAGE 证实需要将温育温度提高到 23℃,才能将大部分三聚体蛋白转化为高分子量的凝聚物。

[0202] 实施例 4 :PreF 抗原引起的体外中和抑制

[0203] 通过 ELISA 筛选来自志愿者的人血清的抗 RSV A 反应性,用于中和抑制 (NI) 检验法,血清的相对稀释度是根据以前给每个血清样品建立的可能 RSV 中和滴度确定的。简单来说,血清与浓度为 25 μg/ml 的抑制蛋白 (PreF 或对照蛋白,后者基本对应美国专利 5,194,595 中公开的命名为 RixFG 的嵌合 FG) 在含有 50% 199-H 培养基、0.5% FBS、2mM 谷氨酰胺、50 μg/ml genamycin (全部购自 Invitrogen) 的 DMEM 中混合,于 37℃ 在回转轮上温育 1.5 到 2 小时。取 20 μl 血清和蛋白的梯度稀释液在圆底 96 孔板中与 RSV A 混合,为了优化每个血清样品的抑制范围所述 RSV A 已进行了滴定。得到的混合液于 33℃ 在 5% CO₂ (为了维持 pH) 下温育 20 分钟。

[0204] 然后将血清-抑制剂-病毒混合液移入预先接种了 Vero 细胞的平底 96 孔板,于 33℃ 温育 2 小时,然后加入 160 μl 培养基。培养板继续在 33℃,5% CO₂ 下温育 5-6 天,直至进行 NI 滴度检测的免疫荧光试验。用溶于磷酸缓冲液 (PBS) 的 1% 仲甲醛固定 1 小时后,培养板用 2% 牛奶 /PBS 和封闭缓冲液封闭。每孔加入山羊抗 RSV 抗体 (Bioscience International; 1 : 400),不经清洗于室温 (RT) 温育 2 小时。样品用 PBS 洗 2 次,向孔中加入溶于封闭缓冲液的抗山羊 IgG-FITC (Sigma; 1 : 400)。培养板再在 RT 温育 2 小时,同上洗 2 次,然后读数。检测到 ≥ 1 的荧光合胞体时,孔被认为是阳性的。利用 Spearman-Kärber (SK) 方法计算 50% 组织培养感染剂量 (TCID₅₀),NI 百分比计算为: $[(0 \mu\text{g/ml 抑制蛋白的中和效价} - 25 \mu\text{g/ml 抑制蛋白的中和效价}) / 0 \mu\text{g/ml 抑制蛋白的中和效价}] \times 100$ 。图 3 显示的示范性结果表明在测试的 21 个供体中,16 个 PreF 的 NI 比 FG 的高。

[0205] 实施例 5 :PreF 抗原是具有免疫原性的

[0206] 为了证实 PreF 抗原的免疫原性,小鼠间隔两周 IM 免疫两次,免疫使用 preF (6.5、3.1、0.63、0.13 和 0.025 μg/ml) 和 1/20 人剂量的含有 3D MPL 和 QS21 的 Th1 佐剂

(“AS01E”),或者 preF(1、0.2 和 0.04 $\mu\text{g/ml}$) 和 1/10 人剂量的含有 3D MPL 和铝的 Th1 佐剂 (“AS04C”),三周后收集血清。

[0207] 根据标准程序,通过 ELISA 对汇合的血清样品确定抗原特异性 IgG 抗体效价。简单来说,96 孔板包埋纯化的灭活 RSV A、RSV B 和同源 preF 蛋白,并于 4°C 温育过夜。血清样品在封闭缓冲液中梯度稀释,开始是原始浓度的 1 : 50,还有出发浓度为 200ng/ml 的纯化的小鼠 IgG (Sigma, ON),室温温育 2 小时。用偶联辣根过氧化物酶 (HRP) 的抗小鼠 IgG (Sigma, ON) 检测结合的抗体。3,3A,5,5A- 四甲基联苯胺 (TMB, BD Opt EIATM, BD Biosciences, ON) 用作 HRP 的底物。每孔加入 50 μl 1M H_2SO_4 来终止反应。每孔 450nm 处的吸光值用 Molecular Devices 微量培养板读板仪 (Molecular Devices, USA) 检测。

[0208] 图 4A 和 4B 描述的代表性结果显示用 preF 抗原免疫后,引发了抗 RSV A 和 RSV B 的强效价。

[0209] 实施例 6 :PreF 引发中和抗体

[0210] 评估了小鼠血清样品中中和抗体的存在和量,所述小鼠按照以上实施例 5 中的描述免疫。来自免疫动物的汇合血清从 1 : 8 的出发稀释度开始在 96 孔板的 RSV 培养基中梯度稀释 (20 $\mu\text{l}/\text{well}$)。对照孔仅含有 RSV 培养基,或者 1 : 50 的山羊抗 RSV 抗体 (Biodesign international)。代表性 RSV A 或 B 株的 500-1000 感染剂量加到孔中,培养板在 33°C, 5% CO_2 温育 20 分钟,然后将混合液转移到预先接种了 1×10^5 细胞 /mL Vero 细胞的 96 孔平底培养板中。细胞在 33°C, 5% CO_2 温育大约 2 小时,补充培养基,然后在相同的温度下温育 5-6 天。除去上清液,培养板用 PBS 清洗,用 1% 溶于 PBS 的仲甲醛将附着的细胞固定 1 小时,然后进行间接免疫荧光 (IFA) 分析,用山羊抗 RSV 一抗和抗山羊 IgG-FITC 检测。

[0211] 图 5A 和 5B 分别显示的代表性结果表明在用 preF 免疫过的动物的血清中检测到了抗两种 RSV 株的显著中和抗体。

[0212] 实施例 7 :PreF 提供抗 RSV 攻击的保护

[0213] 小鼠如上所述以两周间隔 1M 免疫两次,第二次注射三周后用 RSV A 攻击。通过测量攻击后肺中存在的病毒来评价抗 RSV 的保护作用。简单来说,麻醉后无菌取出免疫动物的肺,在 15ml 管中用两个体积的 10ml/ 肺的 RSV 培养基中洗。然后将肺称重,各用自动 Potter 匀浆仪 (Fisher, Nepean ON) 在 RSV 培养基中匀浆,于 4°C 以 2655xg 离心 2 分钟。上清液中存在的病毒通过梯度稀释 (8 个重复,从 1 : 10 开始) 到 96 孔板中预先接种的 Vero 细胞 (ATCC#CCL-81) 单层上并温育 6 天来测定滴度。在 1% 仲甲醛 /PBS (pH7.2) 中固定后,用山羊抗 RSV 一抗和标记 FITC 的抗山羊 IgG 二抗通过间接 IFA 检测 RSV。

[0214] 图 6A 和 B 显示的代表性结果表明在有佐剂的情况下,给予等于或高于 0.04 μg 的剂量引发了抗 RSV 的强保护作用。

[0215] 实施例 8 :PreF 不会诱发攻击后肺嗜酸性粒细胞的募集

[0216] 为了评估 PreF 抗原在进行免疫和之后的攻击后激发加重的疾病的可能性,小鼠组 (5 只小鼠 / 组) 各用 (a) 10 μg 戊二醛处理的 preF、(b) 10 μg preF 或 (c) 10 μg 不含佐剂的 FG 免疫两次。加强剂后 3 周用 RSV A 攻击小鼠,攻击后的第 4 天进行支气管肺泡灌洗 (BAL)。根据巨噬细胞 / 单核细胞、中性粒细胞、嗜酸粒细胞和淋巴细胞的细胞形态,进行了每个小鼠 BAL 中总的白血病浸润枚举以及差异枚举 (300 个细胞)。

[0217] 给每只动物总细胞数量乘上嗜酸粒细胞的差异百分比。代表的是每组的几何平均

值,置信界限为 95%。图 7 显示的代表性结果表明 preF 免疫和攻击后,嗜酸粒细胞没有被募集到肺中。此外,这些结果表明 preF 抗原的可溶性质,与特意使之凝集的 preF 形式(戊二醛处理)或 FG 抗原(天然凝聚的)相比,并不更偏爱嗜酸粒细胞。

[0218] 实施例 9:与水包油乳剂佐剂稀释液一起成剂的 PreF 抗原的免疫原性

[0219] 小鼠接受与示范性水包油佐剂一起成剂的 250ng preF,所述佐剂是人“完全”剂量(AS03A,10.70mg 角鲨烯、11.88mg DL- α -生育酚、4.85mg 聚山梨醇酯 80)的 1/10(AS03A)、1/2 剂量(AS03B)、1/4 剂量(AS03C)或没有佐剂。对照小鼠只接受 AS03A 或 PBS。小鼠在第 0 和第 14 天被免疫。第 39 天(第 2 剂后 15 天)进行血液、肾细胞采集和攻击。攻击后 4 天将肺匀浆进行 RSV 滴定。

[0220] 抗原特异性 IgG 抗体效价通过 ELISA 给各个血清样品确定。简单来说,96 孔板用纯化的灭活 RSV A 包埋,于 4℃温育过夜。血清样品从 1 : 200 开始在封闭缓冲液中梯度稀释,和出发浓度为 200ng/ml 的纯化小鼠 IgG(Sigma,ON)一起,于 37℃温育 2 小时。用偶联辣根过氧化物酶(HRP)的抗小鼠 IgG(Sigma,ON)检测结合的抗体。3,3A,5,5A-四甲基联苯胺(TMB,BDopt EIATM,BD Biosciences,ON)用作 HRP 的底物。每孔加入 50 μ l 1MH₂SO₄来终止反应。每孔 450nm 处的吸光值用 Molecular Devices 微量培养板读板仪(Molecular Devices,USA)检测。结果如图 8 所示。在来自用 preF 组合 AS03A、AS03B 或 AS03C 免疫的小鼠的血清中,观察到浓度大约 250,000ng/mL 的抗 RSV IgG,而在来自只用 preF 免疫的小鼠的血清中观察到很少(1828ng/ml)。

[0221] 来自免疫动物的汇合血清从 1 : 8 的稀释度开始在 96 孔板 RSV 培养基中梯度稀释(20 μ l/孔)。对照孔仅含有 RSV 培养基或者 1 : 50 的山羊抗 RSV 抗体(Biodesign international)。加入 RSV Long 株,培养板在 33℃温育 20 分钟,混合液转移到预先接种 1x10⁵细胞/mL Vero 细胞的 96 孔平底板中。相同温度温育 5-6 天后,移去上清液;培养板用 PBS 洗,附着的细胞用溶于 PBS 的 1% 仲甲醛固定 1 小时,然后进行间接免疫荧光(IFA)。图 9 显示,无论与 preF 联合给予的 AS03 的量是多少,RSV 中和抗体效价保持一致($\sim 11\log_2$),而免疫没有用 AS03 的小鼠中 RSV 中和抗体效价显著低($\sim 6\log_2$)。

[0222] 将免疫动物麻醉后无菌取肺,在 2 个体积 10ml/肺的 RSV 培养基在 15ml 管中洗。然后将它们称重,用自动 Potter 匀浆仪(Fisher,Nepean ON)在 RSV 培养基中分别匀浆,于 4℃在 2655xg 离心 2 分钟。滴定上清液中存在的病毒。简单来说,肺匀浆以 8 个重复从 1 : 10 开始梯度稀释到 96 孔板中预先接种的 Vero 细胞(ATCC#CCL-81)单层上,温育 5-6 天。RSV 通过间接 IFA 检测。图 10 显示的结果表明,用 preF 组合 AS03A、AS03B 或 AS03C 免疫的小鼠中观察到的保护作用没有差别,而免疫没有使用 AS03 的小鼠中观察到的保护作用较少。

[0223] 这些结果显示 PreF 抗原可以与浓度范围很广的佐剂共同配制产生能够引发抗 RSV 的免疫反应的组合物。

[0224] 序列表

[0225] SEQ ID NO:1

[0226] 编码 RSV 参照融合蛋白的核苷酸序列

[0227] A2 株 GenBank 登录号 U50362

[0228] atggagtttgctaatacctcaagcaaatgcaattaccacaatcctcactgcagtcacatttgttttgctt

ctgggtcaaaacatcactgaagaattttatcaatcaacatgcagtgtagcaaaggctatcttagtgctctgagaa
ctgggttggtataccagtggtataactatagattaagtaatatcaaggaaaataagtgtaatggaacagatgctaagg
taaaattgataaacaagaattagataaatataaaaaatgctgtaacagaattgcagttgctcatgcaaagcaccagc
aacaacaatecgagccagaagagaactaccaaggtttatgaattatacactcaaaatgccaaaaaaccaatgtaac
attaagcaagaaaaggaaaagaagatttcttggtttttgtaggtgttgatctgcaatgccagtggtgctgtgt
atctaaggctctgcacctgaaggggaagtgaacaagatcaaaagtgtctactatccacaaacaaggctgtagtcag
ttatcaaattggagttagtgcttaaccagcaaagtgttagacctcaaaaactatatagaaaacaattgttacctatt
gtgaacaagcaaagctgcagcatatcaaatatagcaactgtatagagttccaacaaaagaacaacagactactagag
attaccagggaatttagtggttaagcaggtgtaactacacctgtaagcacttacatgttaactaatagtgaattattg
tcattatcaatgatatgcctataacaaatgatcagaaaaagttaatgtccaacaatgttcaaattgttagacagcaaa
gttactctatcatgtccataataaaaagaggaagtccttagcatatgtgtacaattaccactatatggtgttatagata
caccctgttggaactacacacatccccctatgtacaaccaacacaaaagaagggtccaacatctgtttaacaagaa
ctgacagaggtggtactgtgacaatgcaggatcagtatctttctccacaagctgaaacatgtaaagtcaatcaaa
tcgagtattttgtgacacaatgaacagtttaacattaccaagtgaagtaaactctgcaatgttgacatatccaacc
caaatatgattgtaaaattatgacttcaaaaacgatgtaagcagctccgttatcacatctctaggagccattgtgtc
atgctatggcaaaacaaatgtacagcatccaataaaaaatcgtggaatcataaagacattttctaacgggtgcgatat
gtatcaaataaaggggtggacactgtgtctgtaggtaacacattatattatgtaaaaagcaagaaggtaaaagtctc
tatgtaaaaggtgaaccaataataaatttctatgacccttagtattccccctctgatgaatttgatgcatcaatatct
caagtcaacgagaagattaacagagcctagcattttatcgtaaatccgatgaattattacataatgtaaatgctggt
aatccaccataaatatcatgataactactataattatagtattatagtaaatattgttatcttaattgctgttgac
tgctcttatactgtaaggccagaagcacaccagtcacactaagaaagatcaactgagtggtataaataatttgcat
ttagtaactaa

[0229] SEQ ID NO :2

[0230] RSV 参照 F 蛋白前体 F0 的氨基酸序列

[0231] A2 株 GenBank 登录号 AAB86664

[0232] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARELPRFMNYTLNNAKKTNTLSKKRKRRLGLLGVGS
AIASGVAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNKAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIATVIEF
QQKNNRLLLEITREFSVNAGVTTTPVSTYMLTNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYV
VQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLP
EVNLCNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFNGCDYVSNKGVDTVSVGN
TLYYVNVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDELLHNVNAGKSTINIMITTII
IVIIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTLSKDQLSGINNIASFN

[0233] SEQ ID NO :3

[0234] 编码 RSV 参照 G 蛋白的核苷酸序列

[0235] Long 株

[0236] Atgtccaaaaacaaggaccaacgcaccgctaagacactagaaaagacctgggacactctcaatcattta
ttattcatatcatcggttatataagttaaattcttaattctatagcaaatcacattatccattctggcaatgat
aatctcaacttcaattataattacagccatcatattcatagcctcggaaccacaaagtcacactaacaactgcaa

tcatacaagatgcaacaagccagatcaagaacacaacccaacatacctcactcaggatcctcagcttggaatcage
ttctccaatctgtctgaaattacatcacaaccaccaccatactagcttcaacaacaccaggagtcaagtc aaacct
gcaaccacacacagtc aagactaaaaacacaacaacccaacacacaccagcaagccactacaaaacaacgcc
aaaacaacaccaccaaaacaacccaataatgattttcacttcgaagtgtttaactttgtaccctgcagcatatgcage
aacaatccaacctgctgggctatctgcaaaagaatacacaacaaaaaccaggaaagaaaaccaccaccaagcctac
aaaaaaaccaaccttcaagacaacaaaaaagatctcaaacctcaaaccactaaaccaaaggaagtaccaccacca
agcccacagaagagccaaccatcaacaccaccaaacaacatcacactacactgctcaccaacaacaccacagga
aatccaaaactcacaagtc aaatggaaaccttccactcaacctcctccgaaggcaatctaagcccttctcaagtcctc
cacaacatccgagcaccatcacaacctcctcctccaccaacacacacgccagtag

[0237] SEQ ID NO :4

[0238] RSV 参照 G 蛋白的氨基酸序列

[0239] MSKNKDQRTAKTLEKTWDTLNHLFISSGLYKLNLSIAQITLSILAMIISTSLIITAIIFIASANKV
TLTTAIIQDATSQIKNTTPYLTQDPQLGISFSNLSEITSQTTTILASTTPGVKSNLQPTTVKTKNTTTTQTQPSKP
TTKQRQNKPPNKPNDHFHEVFNFVPCSI CSNNPTCWAICKRIPNKKPGKKTTKPTKKPTFKTTKKDLKPQTTKPK
EVPTTKPTEPTINTTKNITTTLLTNNTTGNPKLTSQMETFHSTSSEGNLSPSQVSTTSEHPSQPSSPPNTRQ

[0240] Seq ID NO :5

[0241] 针对 CHO 优化了的 PreF 类似物的核苷酸序列

[0242] aagcttgccaccatggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacgccatcctggccgcctgacc
ctgtgcttgcctcctcccagaacatcacccaggaggttctaccagtccacctgctccgccgtgtccaagggtacct
gtccgccctgcggaaccggtggtacacctccgtgatcccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacg
gcaccgacgccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctg
atgcagtcacccctgccaccaacaacaagtttctgggcttccgtgctgggctgggctccgccatcgccctccggcat
cgccgtgagcaaggtgctgcacctggaggggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccg
tggtgtccctgtccaacggcggtgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctg
ctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccg
gctgctggagatcacccgcgagttctccgtgaacgccggcggtgaccacctgtgtccacctacatgctgaccaact
ccgagctgctgtccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatc
gtgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctggcctacgtgggtgcagctgcctctgta
cggcgtgatcgacaccttctgctggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaaca
tctgcctgacccggaccgacccggggtggtactgcgacaacgccggctccgtgtccttcttccctctggccgagacc
tgcaaggtgcagtcacaacgggtgttctgcgacaccatgaactccctgacctgccttccaggtgaacctgtgcaa
catcgacatcttcaacccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacct
ccctgggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagacc
ttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcggtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaa
taagcaggagggaagagcctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacgacctctgggtgttcccttccg
acgagttcgacgcctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagtccttggccttccatccggaagtccgacgag
aagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccgat
caagaagctgatcggcgaggcctgataatctaga

[0243] SEQIDNO :6

[0244] PreF 类似物的氨基酸序列

[0245] MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLLGVGSALIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNK
AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPPVSTYMLT
NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS
NICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMSNLTPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP
SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

[0246] Seq ID NO :7

[0247] 针对 CHO 优化了的 PreFG_V1 编码核苷酸序列

[0248] aagcttgccaccatggagctgctgaccccaagaccaacgccatcacccgcatcctggccgctgacc
ctgtgcttcgcctcctcccagaacatcacccaagagttctaccagtcacccgctgctccgctggtccaagggtacct
gtccgcccgtgcggaccggtggtacacctccgtgacccatcgagctgtccaacatcaaagaaaacaagtgaacg
gcaccgacgccaaggtcaagctgatcaagcaggaactggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctg
atgcagtcacccctgccaccaacaacaagaagtttctgggcttcctgctgggctgggctccgccatcgccctccg
catcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaagg
ccgtggtgtccctgtccaacggcggtgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcag
ctgctgcctatcgtaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaa
ccggctgctggagatcacccgcgagttctccgtgaacgccggcggtgaccacctgtgtccacctacatgctgacaa
actccgagctgctctccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgacaaaaaaagctgatgtccaacaacgtgcag
atcgtgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaagtcctggcctacgtcgtgcagctgcctct
gtacggcgctgatcgacaccccttctgtggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaaagggtcca
acatctgcctgacccggaccgaccggggctggtactgcgacaacgccggctccgtgtccttcttccctctggccgag
acctgaaggtgcagtcacaacgggtgttctgcgacacatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtg
caacatcgacatcttcaaccccaagtagcactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatca
cctccctggggcgccatcgctgtcctgctacggcaagaccaagtgaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaag
accttctccaacgggtgcgactacgtgtccaataaggcgctggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgt
gaataagcaggaaggcaagagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgttccctt
ccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccagtcctggccttcacccggaagtccgac
gagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccc
gatcaagaagctgatcggcgaggtggcggtcttgccggcagcgggctccaagcagcggcagaacaagcctccta
acaagcccaacaacgacttccacttcgaggtgttcaacttcgtgccttgcctcatctgctccaacaaccctacctgc
tgggcatctgcaagagaatcccccaacaagaagcctggcaagaaaaccaccaccaagcctaccaagaagcctacctt
caagaccaccaagaaggaccacaagcctcagaccacaaagcctaaggaagtgccaccaccaagcaccaccaccatc
accactgataatcta

[0249] Seq ID NO :8

[0250] 针对 CHO 的 PreFG_V1 肽

[0251] MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLLGVGSALIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTN

KAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYML
TNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEG
SNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV
ITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVF
PSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEAGSGSGSGSKQRQKNP
PNKPNDFHFEVFNFPVPCISCSNNPTCWAICKRIPNKKPGKKTTPKTKPTFKTTKKDHPQTTPKEVPTTK

[0252] Seq ID NO :9

[0253] 针对 CHO 的 PreFG_V2 编码核苷酸序列

[0254] aagcttgccaccatggagctgctgaccccaagaccaacgccatcacccgccatcctggccgcctgacc
ctgtgcttcgcctcctcccagaacatcacccgaagagtctaccagtcacactgctccgccgtgtccaagggctacct
gtccgccctgcggaaccggtggtacacctccgtgacccatcgagctgtccaacatcaaagaaaacaagtgaacg
gcaccgacgccaaggtcaagctgatcaagcaggaactggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctg
atgcagtcacccctgccaccaacaacaagaagtttctgggcttcctgctgggctgggctccgccatcgccctccg
catcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaagg
ccgtggtgtccctgtccaacggcggtgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcag
ctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaa
ccggctgctggagatcacccgcgagttctccgtgaacgccggcggtgaccacccctgtgtccacctacatgctgacaa
actccgagctgctctccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccaaaaaaagctgatgtccaacaacgtgcag
atcgtgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaagtccctggcctacgtcgtgcagctgcctct
gtacggcggtgatcgacaccccttctgtggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaaaggggctcca
acatctgcctgacccggaccgaccggggctggtactgcgacaacgccggctccgtgtccttcttccctctggccgag
acctgcaaggtgcagtcacaaccgggtgttctgcgacacatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtg
caacatcgacatcttcaaccccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatca
cctccctggggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgctccaacaagaaccggggaatcatcaag
accttctccaacgggtgcgactacgtgtccaataaggcggtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgt
gaataagcaggaaggcaagagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgttccctt
ccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccagtcctggccttcacccggaagtccgac
gagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccc
gatcaagaagctgatcgggcaggctggcggaagcagcggcagaacaagcctcctaacaagcccaacaacgacttcc
acttcgaggtgttcaacttcgtgccttgcctccatctgctccaacaacctacctgctgggccatctgcaagagaatc
cccaacaagaagcctggcaagaaaaccaccaccaagcctaccaagaagcctacettcaagaccaccaagaaggacca
caagcctcagaccacaaagcctaaggaagtgccaccaccaagcaccaccaccatcaccactgataatcta

[0255] Seq ID NO :10

[0256] 针对 CHO 的 PreFG_V2 肽

[0257] MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKKFLGFLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTN
KAVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYML
TNSSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEG
SNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLCNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSV

ITSLGAIVSCYGTKCTASNKNRGIIKTFNSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVF
PSDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEAGGKQRQNKPPNKPND
FHFEVFNFPVPCISCSNNPTCWAICKRIPNKKPGKKTITTKPTKKPTFKTTKDKHPQTTKPKEVPPTK

[0258] SEQ ID NO:11

[0259] 示范性卷曲螺旋（异亮氨酸拉锁）

[0260] EDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGE

[0261] SEQ ID NO:12

[0262] PreF 抗原多核苷酸 CH02

[0263] atggagctgcccattcctgaagaccaacgccatcaccaccatcctcgccgccgtgaccctgtgcttcgcc
agcagccagaacatcacggaggagtctaccagagcacgtgcagcgccgtgagcaagggctacctgagcgcgctgcg
cacgggctggtacacgagcgtgatcacgatcgagctgagcaacatcaaggagaacaagtgaacggcacggacgcga
aggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcggtgacggagctgcagctgctgatgcagagcacg
ccggcgacgaacaacaagttcctcggttctctgctgggcgtgggcagcgcgatcgcgagcggcatcgccgtgagcaa
ggtgctgcacctggaggggcgaggtgaacaagatcaagtcgcgctgctgagcacgaacaaggcggctcgtgagcctga
gcaacggcgtgagcgtgctgacgagcaaggtgctcgacctgaagaactacatcgacaagcagctgctgccgatcgtg
aacaagcagagctgcagcatcagcaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccgcctgctggagat
cacgcgggagttctccgtgaacgcaggcgtgacgacgcccgtgtctacgtacatgctgacgaacagcgagctgctca
gcctgatcaacgacatgccgatcacgaacgaccagaagaagctgatgagcaacaacgtgcagatcgtgcgccagcag
agctacagcatcatgagcatcatcaaggaggaggtgctggcatacgtgggtgcagctgccgctgtacggcgtcatcga
cacgccctgctggaagctgcacacgagcccgtgtgcacgaccaacacgaaggagggcagcaacatctgcctgacgc
ggacggaccggggctggtactgcgacaacgcgggcagcgtgagcttcttcccgtcgcggagacgtgcaaggtgcag
agcaaccgcgtcttctgacgacacgatgaacagcctgacgctgccgagcgaggtgaacctgtgcaacatcgacatctt
caaccgaagtacgactgcaagatcatgacgagcaagaccgatgtcagcagcagcgtgatcacgagcctcggcgcga
tcgtgagctgctacggcaagacgaagtgacggcgagcaacaagaaccgcggcatcatcaagacgttcagcaacggc
tgcgactatgtgagcaacaagggcgtggacactgtgagcgtcggcaacacgctgtactacgtgaacaagcaggaggg
caagagcctgtacgtgaagggcgagccgatcatcaacttctacgaccgctcgtgttcccagcgacgagttcgacg
cgagcatcagccaagtgaacgagaagatcaaccagagcctggcgttcatccgcaagagcgacgagaagctgcacaac
gtggaggacaagatcgaggagatcctgagcaagatctaccacatcgagaacgagatcgcgcgcatcaagaagctgat
cggcgaggcgcacatcaccatcaccattga

[0264] SEQ ID NO:13

[0265] 带有内含子的 PreF 抗原多核苷酸

[0266] atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacggccatcctggccgccgtgaccctgtgcttcgcc
tctcccagaacatcacggaggagtctaccagtcacactgctccgccgtgtccaagggctacctgtccgccctgcg
gaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcacccgacgcc
aggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctgatgcagtcaccc
cctgccaccaacaacaagtttctgggcttctctgctgggcgtgggctccgccatcgccctccggcatcgccgtgagcaa
ggtacgtgtcgggacttgtgttcccccttttttaataaaaagtattatcttttaattgttatatacatatttctgtat
gtgatccatgtgcttatgactttgtttatcatgtgttaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaaga
gcgccctgctgtccaccaacaaggccgtgggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaaggtgctggat

ctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgatgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgt
gatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcacccgcgagttctccgtgaacgccggcgatgaccaccc
ctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaa
aaactgatgtccaacaacgtgcagatcgctgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgct
ggcctacgtggtgcagctgcctctgtacggcgatcgacaccccttgctggaagctgcacacctccccctgtgca
ccaccaacaccaaggagggtccaacatctgcctgacccggaccgacggggctggtactgcgacaacgccggctcc
gtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagtccaaccgggtgttctgcgacaccatgaactccctgac
cctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccccaagtagactgcaagatcatgaccagcaaga
ccgacgtgtcctccagctgatcacctccctgggcgccatcggtgtcctgtacggcaagaccaagtgcaccgcctcc
aacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgatggacaccgtgtc
cgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggagggaagagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaact
tctacgacctctgtgtgttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagttcc
ctggccttcatccggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatcta
ccacatcgagaacgagatcgccccgatcaagaagctgatcggcgaggccggaggtcaccaccaccatcaccactga

[0267] SEQ ID NO:14

[0268] 合成连接序列

[0269] GSGSGSGS

[0270] SEQ ID NO:15

[0271] 弗林蛋白酶切割位点

[0272] RARR

[0273] SEQ ID NO:16

[0274] 弗林蛋白酶切割位点

[0275] RKRR

[0276] SEQ ID NO:17

[0277] 编码 PreF_NGTL 的核苷酸序列

[0278] atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcacccgcatcctggccgccgtgacctgtgcttcgcc
tcctcccagaacatcacccgaggagttctaccagttccacctgctccgccgtgtccaagggtacctgtccgccctgcg
gaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcaccgacgcca
aggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctgatgcagtccacc
cctgccaccaacaacaagtttctgggcttctgtgtggcgctgggtccgccatcgctccggcatcgccgtgagcaa
ggtgctgcacctggaggggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgt
ccaacggcgctgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgat
aacaagcagtcctgtccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagat
cacccgcgagttctccgtgaacgccggcgatgaccacccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgt
ccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgctgcggcagcag
tcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgtggcctacgtggtgcagctgcctctgtacggcgatcgac
caccccttgctggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgcctgaccc
ggaccgacgggggtggtactgcgacaacgccggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcag
tccaaccgggtgttctgcgacaccatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatctt

caaccccaagtagcactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctgggcgcca
tcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggc
tgcgactacgtgtccaataagggcggtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggaggg
caagagcctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgttcccttccgacgagttcgacg
cctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccgggacctggccttcacccggaagtccgacgagaagctgcataac
gtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccgatcaagaagctgat
cggcgaggcc

[0279] SEQ ID NO :18

[0280] PreF_NGTL 的氨基酸序列

[0281] MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGLLGVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNK
AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLLEITREFSVNAGVTPVSTYMLT
NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS
NICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
TSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP
SDEFDASISQVNEKINGTLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

[0282] SEQ ID NO :19

[0283] 编码 PreF_L112Q 的核苷酸序列

[0284] atggagctgctgatacctgaaaaccaacgccatcacccgcatcctggccgctgacacctgtgcttcgcc
tcctcccagaacatcacccgaggagtctaccagtcacacctgctccgctgttccaagggtacacctgtccgacctgacg
gacctgggtacacctccgtgataccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcaccgacgcca
aggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtagaagagcgccgtgacccaactccagctgctgatgcagtcaccc
cctgccaccaacaacaagtttctgggcttcctgcagggcggtgggtccgcatcgccctccggcatcgccgtgagcaa
gggtgtgcacctggaggggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtgggtgtccctgt
ccaacggcggtgtccgtgctgacctccaaggtgtggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgctg
aacaagcagtcctgtccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagat
cacccgcgagttctccgtgaacgcggcggtgaccacctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgt
ccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgctgcggcagcag
tcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgtggcctacgtgggtgcagctgcctctgtacggcggtgatcga
caccccttgctggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgcctgaccc
ggaccgaccggggctggtagctgcgacaacgcggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcag
tccaaccgggtgttctgcgacaccatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatctt
caaccccaagtagcactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctgggcgcca
tcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggc
tgcgactacgtgtccaataagggcggtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggaggg
caagagcctgtacgtgaagggcgagcctatcatcaacttctacgacctctggtgttcccttccgacgagttcgacg
cctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagtcctggccttcacccggaagtccgacgagaagctgcataac
gtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccgatcaagaagctgat
cggcgaggcc

[0285] SEQ ID NO :20

[0286] PreF_L112Q 的氨基酸序列

[0287] MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLQGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNK
AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLT
NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS
NICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI
TSLGAIVSCYGKTKCTASKNRGI IKTFSSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVVKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP
SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

[0288] SEQ ID NO :21

[0289] 编码 PreF_NGTL_L112Q 的核苷酸序列

[0290] atggagctgctgatacctgaaaaccaacgccatcaccgccatcctggcgcgcgtgaccctgtgcttcgcc
tcctcccagaacatcaccgaggagtctaccagtcacactgctccgcgcgtgtccaagggtacactgtccgcctgcg
gaccggctggtacacctccgtgatacaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgcacggcaccgacgcca
aggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaactccagctgctgatgcagtccacc
cctgccaccaacaacaagtttctgggcttcctgcagggcgctgggctccgccatcgccctccggcatcgccgtgagcaa
gggtgctgcacctggaggggcgaggtgaacaagatcaagagcgccctgctgtccaccaacaaggccgtgggtgtccctgt
ccaacggcgctgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtg
aacaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagat
caccgcgagttctccgtgaacgcggcgctgaccacccctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgt
ccctgatcaacgacatgcctatcaccaacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcag
tcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctggcctacgtgggtgcagctgcctctgtacggcgctgatcga
cacccttgctggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgcctgaccc
ggaccgaccggggctggtactgcgacaacgcggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcag
tccaaccgggtgttctgcgacaccatgaactccctgaccctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatctt
caaccccaagtagactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctgggcgcca
tcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggc
tgcgactacgtgtccaataagggcgctggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggaggg
caagagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctgggtgttcccttccgacgagttcgacg
cctccatcagccaggtgaacgagaagatcaacgggaccctggccttcatccggaagtccgacgagaagctgcataac
gtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccgatcaagaagctgat
cggcgaggcc

[0291] SEQ ID NO :22

[0292] PreF_NGTL_L112Q 的氨基酸序列

[0293] MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNITEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKC
NGTDAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLQGVSIAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKSALLSTNK
AVVSLSNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVINKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLT
NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGS
NICLTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNLNIDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVI

TSLGAIIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP
SDEFDASISQVNEKINGTLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA

[0001]

序列表

<110> 葛兰素史密斯克莱生物公司 (GlaxoSmithKline Biologicals S.A.)
魁北克益得生物医学公司 (ID Biomedical Corporation of Quebec)
BAUDOUX, Guy J-M
BLAIS, Normand
Rheault, Patrick
RUELLE, Jean-Louis
CYR, Sonya

<120> 重组 RSV 抗原

<130> VU62788-1 PCT

<150> 61/219,964
<151> 2009-06-24

<150> 61/334,568
<151> 2010-05-13

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1697
<212> DNA
<213> 呼吸道合胞病毒

<400> 1
atggagttgc taatcctcaa agcaaatgca attaccacaa tcctcactgc agtcacattt 60
gttttgcttc tggtaaaac atcactgaag aattttatca atcaacatgc agtgcagtag 120
caaaggctat cttagtgtc tgagaactgg ttggtatacc agtggtataa ctatagatta 180
agtaatatca aggaaaataa gtgtaatgga acagatgcta aggtaaaatt gataaacaag 240
aattagataa atataaaaat gctgtaacag aattgcagtt gctcatgcaa agcaccacagc 300
aacaacaat cgagccagaa gagaactacc aaggtttatg aattatacac tcaaaatgcc 360
aaaaaaacca atgtaacatt aagcaagaaa aggaaaagaa gatttcttgg tttttgttag 420
gigtgtgatc tgcaatgcc agtggcggtt ctgtatctaa ggtcctgcac ctgaagggga 480
agtgaacaag atcaaaagt ctctactatc cacaacaag gctgtagtca gttatcaaat 540
ggagllagtg tcllaaccag caaagtglla gacctcaaaa acatatalaga aaacaatlgt 600
tacctattgt gaacaagcaa agctgcagca tatcaaata agcaactgta tagagttcca 660
acaaaagaac aacagactac tagagattac cagggaattt agtgtaaagc aggtgtaact 720
acacctgtaa gcatttacat gttaactaat agtgaattat tgcattatc aatgatatgc 780
ctataacaaa tgatcagaaa aagttaatgt ccaacaatgt tcaaatgtta gacagcaaag 840

[0002]

ttactctatc atgtccataa taaaagagga agtcttagca tatgtgtaca attaccacta	900
tatgggtgta tagatacacc ctgttggaac ctacacacat cccctatgt acaaccaaca	960
caaaagaagg glccaacatc lgtttaacaa gaactgacag aggtgggact glgacaatgc	1020
aggatcagta tctttcttcc cacaagctga aacatgtaaa gtcaatcaaa tcgagtattt	1080
tgtgacacaa tgaacagttt aacattacca agtgaagtaa actctgcaat gttgacatat	1140
tcaaccccaa atatgattgt aaaattatga cttcaaaaac gatgtaagca gctccgttat	1200
cacatctcta ggagccattg tgtcatgcta tggcaaaaca aatgtacagc atccaataaa	1260
aatcgtggaa tcataaagac attttctaac ggggtgcgata tgtatcaaat aaaggggtgg	1320
acactgtgtc tgtaggtaac acattatatt atgtaaaaag caagaaggta aaagtctcta	1380
tgtaaaaggt gaaccaataa taaatttcta tgacccttag tattcccctc tgatgaattt	1440
gatgcatcaa tatctcaagt caacgagaag attaacagag cctagcattt attcgtaaat	1500
ccgatgaatt attacataat gtaaattgtg gtaatccacc ataaatatca tgataactac	1560
tataattata gtgattatag taatatgtt atcttaattg ctgttggaact gctcttatac	1620
tgtaaggcca gaagcacacc agtcacacta agaaagatca actgagtggg ataaataata	1680
ttgcatttag taactaa	1697

<210> 2

<211> 574

<212> PRT

<213> 呼吸道合胞病毒

<400> 2

Met	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	Ile	Thr	Thr	Ile	Leu	Thr
1			5					10						15	

Ala	Val	Thr	Phe	Cys	Phe	Ala	Ser	Gly	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe
		20						25					30		

Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu
		35					40					45			

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

Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys
65					70					75				80	

[0003]

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu	85	90	95
Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro	100	105	110
Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr	115	120	125
Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val	130	135	140
Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu	145	150	155
Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys	165	170	175
Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val	180	185	190
Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn	195	200	205
Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Ala Thr Val Ile Glu Phe Gln	210	215	220
Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn	225	230	235
Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu	245	250	255
Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys	260	265	270
Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile	275	280	285
Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro	290	295	300
Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro	305	310	315
			320

[0004]

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Ile Asn Ile Met Ile Thr
515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
530 535 540

[0005]

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
565 570

<210> 3
<211> 897
<212> DNA
<213> 呼吸道合胞病毒

<400> 3
atgtccaaaa acaaggacca acgcaccgct aagacactag aaaagaccig ggacactctc 60
aatcatttat tattcatatc atcgggctta tataagttaa atcttaaate tatagcacia 120
atcacattat ccattctggc aatgataatc tcaacttcac ttataattac agccatcata 180
ttcatagcct cggcaaacca caaagtcaca ctaacaactg caatcataca agatgcaaca 240
agccagatca agaacacaac cccaacatac ctactcagg atcctcagct tggaatcagc 300
tttcccaatc tgtctgaaat tacatcacia accaccacca tactagcttc aacaacacca 360
ggagtcaggt caaacctgca acccacaaca gtcaagacta aaaacacaac aacaacccaa 420
acacaaccca gcaagcccac taaaaaaca cgccaaaaca aaccacaaa caaacccaat 480
aatgatcttc acttcgaagt gtttaacttt gtaccctgca gcatatgcag caacaatcca 540
acctgctggg ctatctgcaa aagaatacca aacaaaaaac caggaaagaa aaccaccacc 600
aagcctacia aaaaaccaac ctccaagaca accaaaaaag atctcaaacc tcaaaccact 660
aaaccaaagg aagtaccac caccaagccc acagaagagc caacctcaa caccacaaa 720
acaaacatca caactacact gctcaccaac aacaccacag gaaatccaaa actcacaagt 780
caaatgaaa ccttcactc aacctctcc gaaggcaatc taagcccttc tcaagtctcc 840
acaacatccg agcaccatc acaacctca tctccacca acacaacag ccagtag 897

<210> 4
<211> 298
<212> PRT
<213> 呼吸道合胞病毒

<400> 4

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Lys Thr
1 5 10 15

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Gly Leu Tyr Lys
20 25 30

[0006]

Leu Asn Leu Lys Ser Ile Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
35 40 45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Thr Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
50 55 60

Ala Asn His Lys Val Thr Leu Thr Thr Ala Ile Ile Gln Asp Ala Thr
65 70 75 80

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asp Pro Gln
85 90 95

Leu Gly Ile Ser Phe Ser Asn Leu Ser Glu Ile Thr Ser Gln Thr Thr
100 105 110

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Asn Leu Gln Pro
115 120 125

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn
145 150 155 160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe
195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Leu Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu
210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
225 230 235 240

Thr Asn Ile Thr Thr Thr Leu Leu Thr Asn Asn Thr Thr Gly Asn Pro
245 250 255

[0007]

Lys Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly
260 265 270

Asn Leu Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu His Pro Ser Gln
275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Thr Arg Gln
290 295

<210> 5

<211> 1566

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 重组 PreF 多核苷酸

<400> 5

aagcttgcca ccatggagct gctgatccig aaaaccaacg ccatcaccgc catcctggcc	60
gccgtgaccc tgtgtcttcgc ctctctccag aacatcaccg aggagtctta ccagtcacc	120
tgtctccgccc tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccggttggtta cacctccgtg	180
atcaccatcg agctgtccaa catcaaggaa aacaagtga acggcaccga cgccaagggtg	240
aagctgatca agcaggagct ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg	300
atgcagtcca cccctgccac caacaacaag tttctgggct tcctgtctggg cgtgggctcc	360
gccatcgccct ccggcatcgc cgtgagcaag gtgtgtcacc tggaggcgga ggtgaacaag	420
atcaagagcg cctgtctgtc caccaacaag gccgtgggtgt cctgtgtccaa cggcgtgtcc	480
gtgtgtgacct ccaagggtgt ggatctgaag aactacatcg acaagcagct gctgcctatc	540
gtgaacaagc agtccgtgtc catctccaac atcgagaccg tgatcgagtt ccagcagaag	600
aacaaccggc tgtctggagat caccgcgag ttctccgtga acgccggcgt gaccaccct	660
gtgtccacct acatgtgtac caactccgag ctgtgttccc tgatcaacga catgcctatc	720
accaacgacc agaaaaaact gatgtccaac aacgtgcaga tcgtgcggca gcagtcctac	780
agcatcatga gcatcatcaa ggaagagggt ctggcctacg tgggtgcagct gcctctgtac	840
ggcglgatcg acaccccttg ctggaagctg cacacclecc ccttgtgcac caccaacacc	900
aaggagggct ccaacatctg cctgacccgg accgaccggg gctggtactg cgacaacgcc	960
ggctccgtgt ccttcttccc tetggccgag acctgcaagg tgcagtccaa ccgggtgttc	1020
tgcgacacca tgaactccct gaccctgcct tccgaggta acctgtgcaa catcgacatc	1080
ttcaacccca agtacgactg caagatcatg accagcaaga ccgacgtgtc ctccagcgtg	1140

[0008]

atcacctccc tgggcgccat cgtgtcctgc tacggcaaga ccaagtgcac cgctccaac 1200
aagaaccggg gaatcatcaa gaccttctcc aacggctgcg actacgtgic caataagggc 1260
gtggacaccg tgtccgtggg caacacactg tactacgtga ataagcagga gggcaagagc 1320
ctgtacgtga agggcgagcc tatcatcaac ttctacgacc ctctggtgtt cccttcgac 1380
gagttcgacg cctccatcag ccaggigaac gagaagatca accagtcctt ggccttcac 1440
cggaagtccg acgagaagct gcataacgtg gaggacaaga tcgaggagat cctgtccaaa 1500
atctaccaca tcgagaacga gatcgcccgg atcaagaagc tgatcggcga ggcctgataa 1560
tctaga 1566

<210> 6
<211> 514
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重组 PreF 抗原

<400> 6

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Thr Asn Ala Ile Thr Ala Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

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

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu
100 105 110

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
115 120 125

[0009]

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
130 135 140

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
145 150 155 160

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
180 185 190

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
195 200 205

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
210 215 220

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
225 230 235 240

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
245 250 255

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
260 265 270

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
275 280 285

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
290 295 300

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
305 310 315 320

Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
325 330 335

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
340 345 350

[0010]

Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
355 360 365

Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
370 375 380

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
385 390 395 400

Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly
405 410 415

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
435 440 445

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
500 505 510

Glu Ala

<210> 7

<211> 1855

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合 PreF-G 抗原多核苷酸序列

<400> 7

aagcttgcca ccatggagct getgatcctc aagaccaacg ccatcaccgc catcctggcc 60

gccgtgaccc tgtgtcttcg ctctctccag aacatcaccg aagagttcta ccagtcacc 120

tgctccgccc tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccggctggta cacctccgtg 180

[0011]

atcaccatcg agctgtccaa catcaaagaa aacaagtgc accggcaccga cgccaaggtc	240
aagctgatca agcaggaact ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg	300
atgcagtcca cccctgccac caacaacaag aagtttctgg gcttcctgct gggcgtgggc	360
tccgcatcg cctccggcat cggcgtgagc aaggtgctgc acctggaggg cgaggtgaac	420
aagatcaaga ggcacctgct gtccaccaac aaggccgtgg tgtccctgtc caacggcgtg	480
tccgtgctga cctccaaggt gctggatctg aagaactaca tcgacaagca gctgctgcct	540
atcgtgaaca agcagtcctg ctccatctcc aacatcgaga ccgtgatcga gtccagcag	600
aagaacaacc ggctgctgga gatcacccgc gagttctccg tgaacgcgg cgtgaccacc	660
ccgtgtgtcca cctacatgct gacaaactcc gagctgctct cctgatcaa cgacatgcct	720
atcaccaacg accaaaaaaaa gctgatgtcc aacaacgtgc agatcgtgcg gcagcagtcc	780
tacagcatca tgagcatcat caaggaagaa gtccctggcct acgtcgtgca gctgcctctg	840
tacggcgtga tcgacacccc ttgctggaag ctgcacacct cccccctgtg caccaccaac	900
accaaagagg gctccaacat ctgcctgacc cggaccgacc ggggctggta ctgcgacaac	960
gccggctccg tgtccttctt cctcttgcc gagacctgca aggtgcagtc caaccgggtg	1020
ttctgcgaca ccatgaactc cctgacctg ccttcgagg tgaacctgtg caacatcgac	1080
atcttcaacc ccaagtacga ctgcaagatc atgaccagca agaccgacgt gtccctccagc	1140
gtgatcacct cctggggcgc catcgtgtcc tgctacggca agaccaagtg caccgcctcc	1200
aacaagaacc ggggaatcat caagacctt tccaacggct gcgactacgt gtccaataag	1260
ggcgtggaca ccgtgtccgt gggcaacaca ctgtactacg tgaataagca ggaaggcaag	1320
agcctgtacg tgaaggcgga gcctatcatc aacttctacg accctctggt gtcccttcc	1380
gacgagttcg acgcctccat cagccaggtc aacgagaaga tcaaccagtc cctggccttc	1440
atccggaagt ccgacgagaa gctgcataac gtggaggaca agatcgaaga gatcctgtcc	1500
aaaatctacc acatcgagaa cgagatcgcc cggatcaaga agctgatcgg cgaggctggc	1560
ggctctggcg gcagcggcgg ctccaagcag cggcagaaca agcctcctaa caagcccaac	1620
aacgacttcc acttcgaggt gtccaacttc gtgccttgct ccatctgctc caacaacct	1680
acctgctggg ccatctgcaa gagaatcccc aacaagaagc ctggcaagaa aaccaccacc	1740
aagcctacca agaagcctac ctcaagacc accaagaagg accacaagcc tcagaccaca	1800
aagcctaagg aagtgccaac caccaagcac caccaccatc accactgata atcta	1855

[0012]

<210> 8
<211> 605
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 PreF-G 多肽

<400> 8

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Thr Asn Ala Ile Thr Ala Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

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

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Lys Phe Leu Gly Phe Leu
100 105 110

Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val
115 120 125

Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser
130 135 140

Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr
145 150 155 160

Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro
165 170 175

Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile
180 185 190

[0013]

Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe		
195	200	205
Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr		
210	215	220
Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp		
225	230	235 240
Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser		
245	250	255
Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val		
260	265	270
Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His		
275	280	285
Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys		
290	295	300
Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val		
305	310	315 320
Ser Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val		
325	330	335
Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu		
340	345	350
Cys Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr		
355	360	365
Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile		
370	375	380
Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg		
385	390	395 400
Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys		
405	410	415
Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys		
420	425	430

[0014]

Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe
435 440 445

Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser
450 455 460

Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser
465 470 475 480

Asp Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser
485 490 495

Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile
500 505 510

Gly Glu Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Lys Gln Arg Gln
515 520 525

Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe
530 535 540

Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala
545 550 555 560

Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr
565 570 575

Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys
580 585 590

Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys
595 600 605

<210> 9

<211> 1834

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合 PreF-G 多核苷酸

<400> 9

aagcttgcca ccatggagct gctgacctc aagaccaacg ccatcaccgc catcctggcc 60

gccgtgaccc tgtgcttcgc ctctcccag aacatcaccg aagagttcta ccagtcacc 120

[0015]

tgctccgceg tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga ccggctggta cacctccgtg	180
atcaccatcg agctgtccaa catcaaagaa aacaagtga acggcaccga cgccaaggtc	240
aagctgatca agcaggaact ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg	300
atgcagtcca cccctgccac caacaacaag aagtttctgg gcttcctgct gggcgtgggc	360
tccgccatcg cctccggcat cgccgigagc aaggtgctgc acctggaggg cgaggtgaac	420
aagatcaaga ggcacctgct gtccaccaac aaggccgtgg tgtccctgtc caacggcgtg	480
tccgtgctga cctccaaggt gctggatctg aagaactaca tcgacaagca gctgctgcct	540
atcgtgaaca agcagtcctg ctccatctcc aacatcgaga ccgtgatcga gttccagcag	600
aagaacaacc ggctgctgga gatcacccgc gagtttctcg tgaacgccgg cgtgaccacc	660
cctgtgtcca cctacatgct gacaaactcc gagctgctct ccctgatcaa cgacatgcct	720
atcaccaacg accaaaaaaa gctgatgtcc aacaacgtgc agatcgtgcg gcagcagtc	780
tacagcatca tgagcatcat caaggaagaa gtcctggcct acgtcgtgca gctgcctctg	840
tacggcgtga tcgacacccc ttgctggaag ctgcacacct cccccctgtg caccaccaac	900
accaaagagg gctccaacat ctgccctgacc cggaccgacc ggggctggta ctgcgacaac	960
gccggctccg tgtccttctt ccctctggcc gagacctgca aggtgcagtc caaccgggtg	1020
ttctgcgaca ccatgaactc cctgaccctg ccttccgagg tgaacctgtg caacatcgac	1080
atcttcaacc ccaagtacga ctgcaagatc atgaccagca agaccgacgt gtcctccagc	1140
gtgatcacct ccctgggcgc catcgtgtcc tgctacggca agaccaagtg caccgcctcc	1200
aacaagaacc ggggaatcat caagaccttc tccaacggct gcgactacgt gtccaataag	1260
ggcgtggaca ccgtgtccgt gggcaacaca ctgtactacg tgaataagca ggaaggcaag	1320
agccgtgacg tgaaggcgca gccatcaltc aacttctacg accctctggc gtcccttcc	1380
gacgagttcg acgcttccat cagccaggtc aacgagaaga tcaaccagtc cctggccttc	1440
atccggaagt ccgacgagaa gctgcataac gtggaggaca agatcgaaga gatcctgtcc	1500
aaaatctacc acatcgagaa cgagatcgcc cggatcaaga agctgatcgg cgaggctggc	1560
ggcaagcagc ggcagaacaa gcctcciaac aagcccaaca acgacttcca cttcgagggtg	1620
ttcaacttcg tgccttgctc catctgtctc aacaacccta cctgttgggc catctgcaag	1680
agaatcccca acaagaagcc tggcaagaaa accaccacca agcctacca gaagcctacc	1740
ttcaagacca ccaagaagga ccacaagcct cagaccacaa agcctaagga agtgccaacc	1800
accaagcacc accaccatca ccactgataa tcta	1834

[0016]

<210> 10
<211> 598
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 PreF-G 多肽

<400> 10

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Thr Asn Ala Ile Thr Ala Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

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

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Lys Phe Leu Gly Phe Leu
100 105 110

Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val
115 120 125

Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser
130 135 140

Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr
145 150 155 160

Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro
165 170 175

Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile
180 185 190

[0017]

Glu	Phe	Gln	Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Arg	Glu	Phe	195	200	205	
Ser	Val	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	Met	Leu	Thr	210	215	220	
Asn	Ser	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp	225	230	235	240
Gln	Lys	Lys	Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	245	250	255	
Tyr	Ser	Ile	Met	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	260	265	270	
Gln	Leu	Pro	Leu	Tyr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	Lys	Leu	His	275	280	285	
Thr	Ser	Pro	Leu	Cys	Thr	Thr	Asn	Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	Asn	Ile	Cys	290	295	300	
Leu	Thr	Arg	Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Tyr	Cys	Asp	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	305	310	315	320
Ser	Phe	Phe	Pro	Leu	Ala	Glu	Thr	Cys	Lys	Val	Gln	Ser	Asn	Arg	Val	325	330	335	
Phe	Cys	Asp	Thr	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	Val	Asn	Leu	340	345	350	
Cys	Asn	Ile	Asp	Ile	Phe	Asn	Pro	Lys	Tyr	Asp	Cys	Lys	Ile	Met	Thr	355	360	365	
Ser	Lys	Thr	Asp	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala	Ile	370	375	380	
Val	Ser	Cys	Tyr	Gly	Lys	Thr	Lys	Cys	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Asn	Arg	385	390	395	400
Gly	Ile	Ile	Lys	Thr	Phe	Ser	Asn	Gly	Cys	Asp	Tyr	Val	Ser	Asn	Lys	405	410	415	

[0018]

Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys
420 425 430

Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe
435 440 445

Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser
450 455 460

Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser
465 470 475 480

Asp Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser
485 490 495

Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile
500 505 510

Gly Glu Ala Gly Gly Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro
515 520 525

Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile
530 535 540

Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn
545 550 555 560

Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr
565 570 575

Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys
580 585 590

Glu Val Pro Thr Thr Lys
595

<210> 11

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 异亮氨酸取代的 GCN4 亮氨酸拉链

<400> 11

[0019]

Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn
1 5 10 15

Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ala
20 25

<210> 12

<211> 1563

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 密码子优化的 PreF 核苷酸序列

<400> 12

```

atggagctgc ccatcctgaa gaccaacgcc atcaccacca tcctcgccgc cgtgaccctg      60
tgcttcgcca gcagccagaa catcacggag gagttctacc agagcacgtg cagcgccgtg      120
agcaagggct acctgagcgc gctgcgcacg ggctggtaga cgagcgtgat cacgacgag      180
ctgagcaaca tcaaggagaa caagtgcac ggccacggac cgaaggtaga gctgatcaag      240
caggagctgg acaagtacaa gagcgcgggtg acggagctgc agctgctgat gcagagcacg      300
ccggcgacga acaacaagtt cctcggcttc ctgctgggag tgggcagcgc gatcgcgagc      360
ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagtccgcg      420
ctgctgagca cgaacaaggc ggtcgtgagc ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgacgagc      480
aagggtgctc acctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgccgatcgt gaacaagcag      540
agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg atcgagttcc agcagaagaa caaccgcctg      600
ctggagatca cgcgggagtt ctccgtgaac gcaggcgtga cgacgcccgt gtctacgtac      660
atgctgacga acagcgagct gctcagcctg atcaacgaca tgccgatcac gaacgaccag      720
aagaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc gtgcgccagc agagctacag catcatgagc      780
atcatcaagg aggaggtgct ggcatacgtg gtgcagctgc cgtgtacgg cgtcatcgac      840
acgccctgct ggaagctgca cagcagcccg ctgtgcacga ccaacacgaa ggagggcagc      900
aacatctgcc tgacgcggac ggaccggggc tggtagctgc acaacgcggg cagcgtgagc      960
ttcttccgcg tcgaggagac gtgcaaggta cagagcaacc gcgtcttctg cgacacgatg     1020
aacagcctga cgctgccgag cgaggtagaa ctgtgcaaca tcgacatctt caaccggaag     1080
tacgactgca agatcatgac gagcaagacc gatgtcagca gcagcgtgat cagcagcctc     1140
ggcgcgatcg tgagctgcta cggcaagacg aagtgcacgg cgagcaacaa gaaccgcggc     1200
atcatcaaga cgttcagcaa cggctgcgac tatgtgagca acaaggcgct ggacactgtg     1260

```

[0020]

agcgtcggca acacgctgta ctacgtgaac aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag	1320
ggcgagccga tcatcaactt ctacgacccg ctcggtgtcc cgagcgacga gttcgacgcg	1380
agcatcagcc aagtgaacga gaagatcaac cagagccctgg cgttcacccg caagagcgac	1440
gagaagctgc acaacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgagcaagat ctaccacatc	1500
gagaacgaga tcgcgcgcat caagaagctg atcggcgagg cgcacatca ccatcaccat	1560
tga	1563

<210> 13

<211> 1685

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PreF 多核苷酸序列, 有内含子

<400> 13

atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccgcca tcttggccgc cgtgaccctg	60
tgcctcgccct cctcccagaa catcaccgag gagttctacc agtccacctg ctccgccgtg	120
tccaagggct acctgtccgc cctgcggacc ggctggtaga cctccgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgaac ggaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag	240
caggagctgg acaagtacaa gagcgccgtg accgaactcc agctgctgat gcagtcacc	300
cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgctgggcg tgggctccgc catcgccctc	360
ggcatcgccg tgagcaaggt acgtgtcggg acttgtgttc cccttttttt aataaaaagt	420
tatatcttta atgttatata catatttcct gtatgtgata catgtgctta tgactttgtt	480
tatcatgtgt ttaggtgtctg cacctggagg gcgaggtaga caagatcaag agcgccctgc	540
tgaccaccaa caaggccgtg gtlgcccgt ccaacggcgt glccgtgtctg accccaag	600
tgttggtatc gaagaactac atcgacaagc agctgtgtcc tatcgtgaac aagcagtcct	660
gctccatctc caacatcgag accgtgatcg agttccagca gaagaacaac cggctgtgtg	720
agatcacccg cgagttctcc gtgaacgccg gcgtgaccac cctgtgttcc acctacatgc	780
tgaccaactc cgagctgtctg tccctgatca acgacatgcc tatcaccaac gaccagaaaa	840
aactgatgtc caacaacgtg cagatcgtgc ggacgagtc ctacagcatc atgagcatca	900
tcaaggaaga ggtgtgtgcc tacgtgtgtc agctgcctct gtacggcgtg atcgacaccc	960
cttgtgtgaa gctgcacacc tccccctgt gcaccaccaa caccaaggag ggctccaaca	1020
tctgcctgac ccggaccgac cggggcttgt actgcgacaa cgccggctcc gtgtccttct	1080

[0021]

tccctctggc cgagacctgc aaggtgcagt ccaaccgggt gttctgcgac accatgaact 1140
ccctgaccct gccttccgag gtgaacctgt gcaacatcga catcttcaac cccaagtaac 1200
actgcaagat catgaccagc aagaccgacg tgtcctccag cgtgatacc tccctgggcg 1260
ccatcgtgtc ctgctacggc aagaccaagt gcaccgcctc caacaagaac cggggaatca 1320
tcaagacctt ctccaacggc tgcgactacg tgtccaataa gggcgtggac accgtgtccg 1380
tgggcaacac actgtactac gtgaataagc aggagggcaa gagcctgtac gtgaagggcg 1440
agcctatcat caacttctac gaccctctgg tgttcccttc cgacgagttc gacgcctcca 1500
tcagccaggc gaacgagaag atcaaccagt ccttggcctt catccggaag tccgacgaga 1560
agctgcataa cgtggaggac aagatcgagg agatcctgtc caaaatctac cacatcgaga 1620
acgagatcgc ccggatcaag aagctgatcg gcgaggccgg aggtcaccac caccatcacc 1680
actga 1685

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的连接肽

<400> 14

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 弗林蛋白酶切割的共有基序

<400> 15

Arg Ala Arg Arg
1

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0022]

<223> 弗林蛋白酶切割的共有基序

<400> 16

Arg Lys Arg Arg
1

<210> 17

<211> 1542

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 PreF 多核苷酸

<400> 17

atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcaccgcca tcctggccgc cgtgaccctg	60
tgcttcgcct cctcccagaa cateaccgag gagttctacc agtccaccig ctccgccgtg	120
tccaagggtt acctgtccgc cctgcggacc ggctgtgata cctccgtgat caccatcgag	180
ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgcac gccaccgacg ccaaggtgaa gctgatcaag	240
caggagctgg acaagtacaa gagcgccgtg accgaactcc agctgtgat gcagtcacc	300
cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgctgggag tgggtccgc catgcctcc	360
ggcatgcgcg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc	420
ctgctgtcca ccaacaaggc cgtgggtgtc ctgtccaacg gcgtgtccgt gctgacctcc	480
aagggtgctg atctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgcctatcgt gaacaagcag	540
tcctgtcca tctccaacat cgagaccgtg atcgagtcc agcagaagaa caaccggctg	600
ctggagaica ccgcgagtt ctccgtgaac gccggcgtag ccaacctgt glccacctac	660
atgtgacca actccgagct gctgtccctg atcaacgaca tgcctatcac caacgaccag	720
aaaaaactga tgtccaacaa cgtgcagatc gtgcggcagc agtcctacag catcatgac	780
atcatcaagg aagaggtgct ggcctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac	840
acctctgct ggaagctgca cactccccc ctgtgcacca ccaacacaa ggagggtcc	900
aacatctgcc tgaccggac cgaccgggac tgggtactgc acaacgccg ctccgtgtcc	960
ttcttccctc tgcccgagac ctgcaagggt cagtccaacc ggggtgtctg cgacaccatg	1020
aactccctga cctgtccttc cgaggtagac ctgtgcaaca tcgacatct caaccccaag	1080
tacgactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagcgtgat cactccctg	1140
ggcgccatcg tgtctgtcta cggcaagacc aagtgcaccg cctccaacaa gaaccgggga	1200
atcatcaaga ccttctccaa cggctgcgac tacgtgtcca ataaggcggt ggacaccgtg	1260

[0023]

tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct giacgtgaag 1320
ggcgagccta tcatcaactt ctacgaccct ctggtgttcc cttecgacga gttecgacgc 1380
tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac gggaccctgg ccttcatccg gaagtcggac 1440
gagaagctgc ataacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgtccaaaat ctaccacatc 1500
gagaacgaga tcgcccggat caagaagctg atcggcgagg cc 1542

<210> 18
<211> 514
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 PreF 多肽

<400> 18

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Thr Asn Ala Ile Thr Ala Ile Leu Ala
1 5 10 15

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35 40 45

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

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65 70 75 80

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu
100 105 110

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
115 120 125

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
130 135 140

[0024]

Asn	Lys	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser	145	150	155	160
Lys	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile	165	170	175	
Val	Asn	Lys	Gln	Ser	Cys	Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	Thr	Val	Ile	Glu	180	185	190	
Phe	Gln	Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Arg	Glu	Phe	Ser	195	200	205	
Val	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	Met	Leu	Thr	Asn	210	215	220	
Ser	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	225	230	235	240
Lys	Lys	Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Tyr	245	250	255	
Ser	Ile	Met	Ser	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Gln	260	265	270	
Leu	Pro	Leu	Tyr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Pro	Cys	Trp	Lys	Leu	His	Thr	275	280	285	
Ser	Pro	Leu	Cys	Thr	Thr	Asn	Thr	Lys	Glu	Gly	Ser	Asn	Ile	Cys	Leu	290	295	300	
Thr	Arg	Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Tyr	Cys	Asp	Asn	Ala	Gly	Ser	Val	Ser	305	310	315	320
Phe	Phe	Pro	Leu	Ala	Glu	Thr	Cys	Lys	Val	Gln	Ser	Asn	Arg	Val	Phe	325	330	335	
Cys	Asp	Thr	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser	Glu	Val	Asn	Leu	Cys	340	345	350	
Asn	Ile	Asp	Ile	Phe	Asn	Pro	Lys	Tyr	Asp	Cys	Lys	Ile	Met	Thr	Ser	355	360	365	
Lys	Thr	Asp	Val	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala	Ile	Val	370	375	380	

[0025]

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
385 390 395 400

Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly
405 410 415

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
435 440 445

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gly Thr Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
500 505 510

Glu Ala

<210> 19

<211> 1542

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 PreF 多核苷酸

<400> 19

atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcacgccca tctggccgc cgtgacctg 60

tgcttcgcct cctccagaa catcaccgag gagttctacc agtccacctg ctccgccgtg 120

tccaagggtc acctgtccgc cctgcggacc ggctgtgata cctccgtgat caccatcgag 180

ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaagggtgaa gctgatcaag 240

caggagctgg acaagtacaa gagcgccgtg accgaactcc agctgctgat gcagtccacc 300

cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgcagggcg tgggctccgc catgcctcc 360

[0026]

ggcatcgccg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc	420
ctgtctgtcca ccaacaaggc cgtgggtgtcc ctgtccaacg gcgtgtccgt gctgacctcc	480
aagggtgctgg atctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgcctatcgt gaacaagcag	540
tcctgtctcca tctccaacat cgagaccgtg atcgagtcc agcagaagaa caaccggctg	600
ctggagatca cccgcgagtt ctccgigaac gccggcgiga ccacccctgt gtccacctac	660
atgttgacca actccgagct gctgtccctg atcaacgaca tgcctatcac caacgaccag	720
aaaaaactga tgtccaacaa cgtgcagatc gtgcggcagc agtcctacag catcatgagc	780
atcatcaagg aagagggtgt ggcctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac	840
accccttgct ggaagctgca cacctcccc ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggtcc	900
aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc tgggtactgcg acaacgccg ctccgtgtcc	960
ttcttcctc tggccgagac ctgcaaggtg cagtccaacc ggggtttctg cgacaccatg	1020
aactccctga ccttccttc cgaggigaac ctgtgcaaca tcgacatctt caacccaag	1080
tacgactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagcgtgat caccitccctg	1140
ggcgccatcg tgtcttgcta cggcaagacc aagtgcaccg cctccaacaa gaaccgggga	1200
atcatcaaga ccttctccaa cggctgcgac tacgtgtcca ataagggcgt ggacaccgtg	1260
tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag	1320
ggcgagccta tcatcaactt ctacgacct ctggtgttcc ctccgacga gttcgacgcc	1380
tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac cagtccctgg ccttcacccg gaagtcgac	1440
gagaagctgc ataacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgtccaaaat ctaccacatc	1500
gagaacgaga tcgcccggat caagaagctg atcggcgagg cc	1542

<210> 20

<211> 514

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 PreF 多肽

<400> 20

Met	Glu	Leu	Leu	Ile	Leu	Lys	Thr	Asn	Ala	Ile	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala
1					5				10					15	

Ala	Val	Thr	Leu	Cys	Phe	Ala	Ser	Ser	Gln	Asn	Ile	Thr	Glu	Glu	Phe
			20					25					30		

[0027]

Tyr	Gln	Ser	Thr	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu
		35					40					45			
Arg	Thr	Gly	Trp	Tyr	Thr	Ser	Val	Ile	Thr	Ile	Glu	Leu	Ser	Asn	Ile
		50				55					60				
Lys	Glu	Asn	Lys	Cys	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Lys	Val	Lys	Leu	Ile	Lys
65					70					75					80
Gln	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Lys	Ser	Ala	Val	Thr	Glu	Leu	Gln	Leu	Leu
				85					90					95	
Met	Gln	Ser	Thr	Pro	Ala	Thr	Asn	Asn	Lys	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln
			100					105					110		
Gly	Val	Gly	Ser	Ala	Ile	Ala	Ser	Gly	Ile	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Leu
		115					120					125			
His	Leu	Glu	Gly	Glu	Val	Asn	Lys	Ile	Lys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Thr
	130						135				140				
Asn	Lys	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Ser
145						150				155					160
Lys	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Tyr	Ile	Asp	Lys	Gln	Leu	Leu	Pro	Ile
				165					170					175	
Val	Asn	Lys	Gln	Ser	Cys	Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Glu	Thr	Val	Ile	Glu
			180						185					190	
Phe	Gln	Gln	Lys	Asn	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Ile	Thr	Arg	Glu	Phe	Ser
		195					200					205			
Val	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Pro	Val	Ser	Thr	Tyr	Met	Leu	Thr	Asn
	210						215				220				
Ser	Glu	Leu	Leu	Ser	Leu	Ile	Asn	Asp	Met	Pro	Ile	Thr	Asn	Asp	Gln
225					230					235					240
Lys	Lys	Leu	Met	Ser	Asn	Asn	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Gln	Gln	Ser	Tyr
				245					250					255	

[0028]

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

[0029]

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
500 505 510

Glu Ala

<210> 21
<211> 1542
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 PreF 多核苷酸

<400> 21
atggagctgc tgatcctgaa aaccaacgcc atcacgccca tctggccgc cgtgacctg 60
tgcttcgcct cctcccagaa catcacgag gagttctacc agtccacctg ctccgccgtg 120
tccaagggt accgtgccgc cctgcggacc ggctggtaca cctccgtgat caccatcgag 180
ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgaac ggaccgacg ccaagggtgaa gctgatcaag 240
caggagctgg acaagtacaa gagcgccgtg accgaactcc agctgctgat gcagtccacc 300
cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgcagggcg tgggtccgc catgcctcc 360
ggcatgcgcg tgagcaaggt gctgcacctg gagggcgagg tgaacaagat caagagcgcc 420
ctgtgttcca ccaacaaggc cgtgggtgtc ctgtccaacg gcgtgtccgt gctgacctcc 480
aagggtgtgg atctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgcctatcgt gaacaagcag 540
tcctgttcca tctccaacat cgagaccgtg atcgagtcc agcagaagaa caaccggctg 600
ctggagatca cccgcgagtt ctccgigaac gccggcgiga ccacccctgt gtcacctac 660
atgttgacca actccgagct gctgtccctg atcaacgaca tgcctatcac caacgaccag 720
aaaaaactga tgtccaacaa cgtgcagatc gtgcggcagc agtccctacag catcatgagc 780
atcatcaagg aagaggtgct ggcctacgtg gtgcagctgc ctctgtacgg cgtgatcgac 840
accccttgct ggaagctgca caccctcccc ctgtgcacca ccaacaccaa ggagggtcc 900
aacatctgcc tgaccgggac cgaccggggc tgggtactgcg acaacgccgg ctccgtgtcc 960
ttcttccctc tggccgagac ctgcaagggt cagtccaacc ggggtttctg cgacaccatg 1020
aactccctga cctgccttc cgaggtgaac ctgtgcaaca tcgacatctt caacccaag 1080
tacgactgca agatcatgac cagcaagacc gacgtgtcct ccagcgtgat caccctccctg 1140
ggcgccatcg tgtcctgcta cggcaagacc aagtgcaccg cctccaacaa gaaccgggga 1200

[0030]

```

atcatcaaga ccttctccaa cggctgcgac tacgtgtcca ataagggcgt ggacaccgtg      1260
tccgtgggca acacactgta ctacgtgaat aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaag      1320
ggcgagccta tcatcaactt ctacgaccct ctgggtgttc cttccgacga gttcgacgcc      1380
tccatcagcc aggtgaacga gaagatcaac gggaccctgg cttcatccg gaagtccgac      1440
gagaagctgc ataacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgtccaaaat ctaccacatc      1500
gagaacgaga tcgcccggat caagaagctg atcggcgagg cc                          1542

```

<210> 22
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的 PreF 多肽

<400> 22

```

Met Glu Leu Leu Ile Leu Lys Thr Asn Ala Ile Thr Ala Ile Leu Ala
1                               10                          15

```

```

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
                20                      25                  30

```

```

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
          35                40                  45

```

```

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

```

```

Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys
65                      70                  75                  80

```

```

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
          85                90                  95

```

```

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Gln
          100                105                110

```

```

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu
          115                120                125

```

```

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
          130                135                140

```

[0031]

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
145 150 155 160

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
180 185 190

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
195 200 205

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
210 215 220

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
225 230 235 240

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
245 250 255

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
260 265 270

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
275 280 285

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
290 295 300

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
305 310 315 320

Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
325 330 335

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
340 345 350

Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
355 360 365

[0032]

Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
370 375 380

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
385 390 395 400

Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly
405 410 415

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
435 440 445

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gly Thr Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
500 505 510

Glu Ala

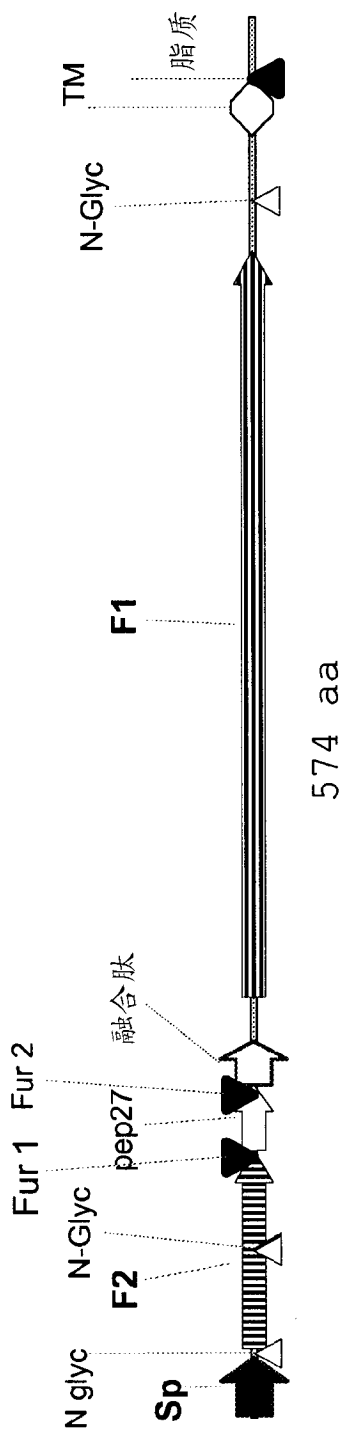


图 1A

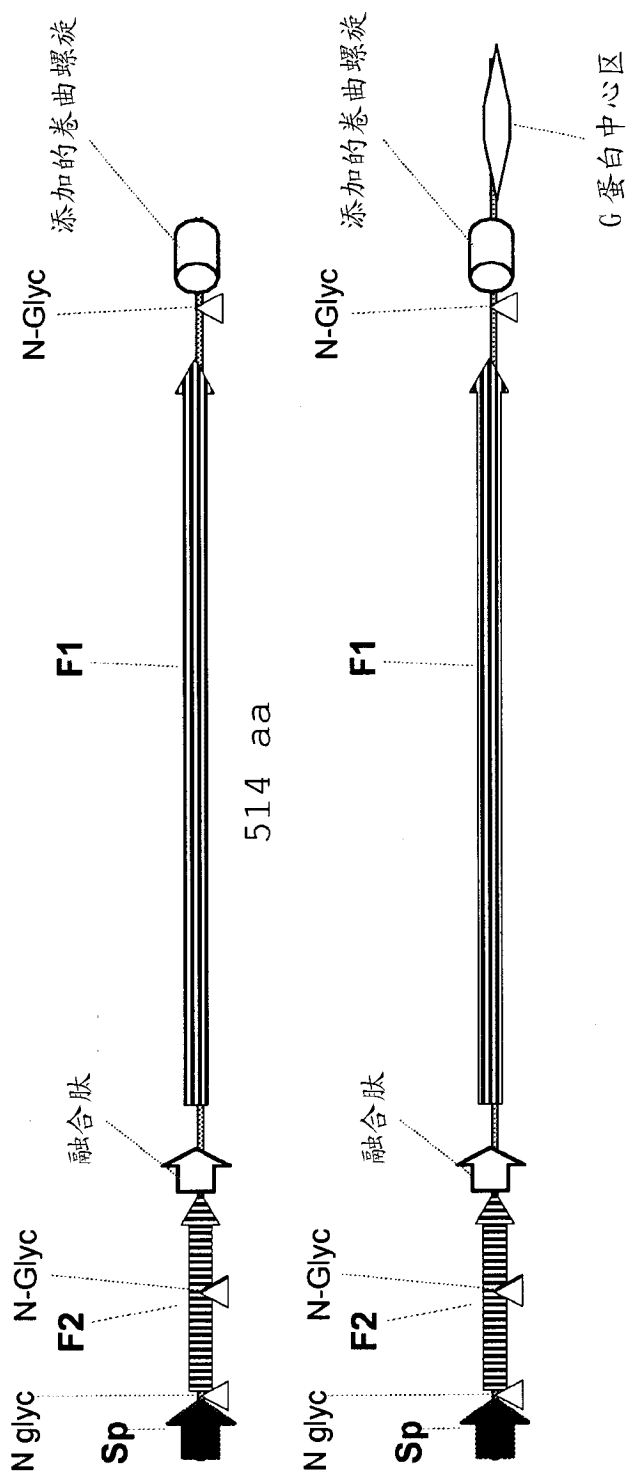
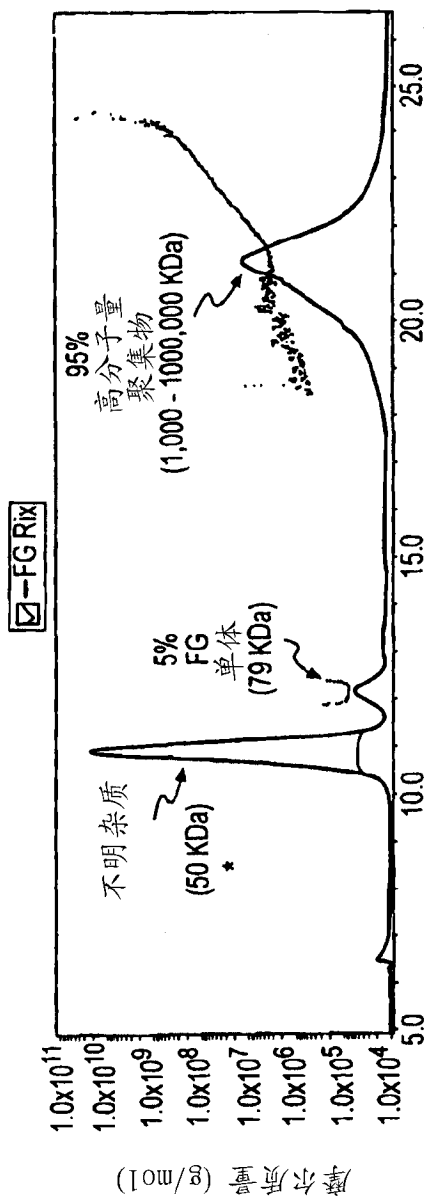


图 1B

PreF 和 FG 的流体力学鉴定
通过 FFF-MALLS 注射 100 mcI 缓冲液; 1X PBS, pH7.4 进行 FG Rix 洗脱



通过 FFF-MALLS 注射 100 mcI 缓冲液; 1X PBS, pH7.4 进行 PreF ABio 洗脱

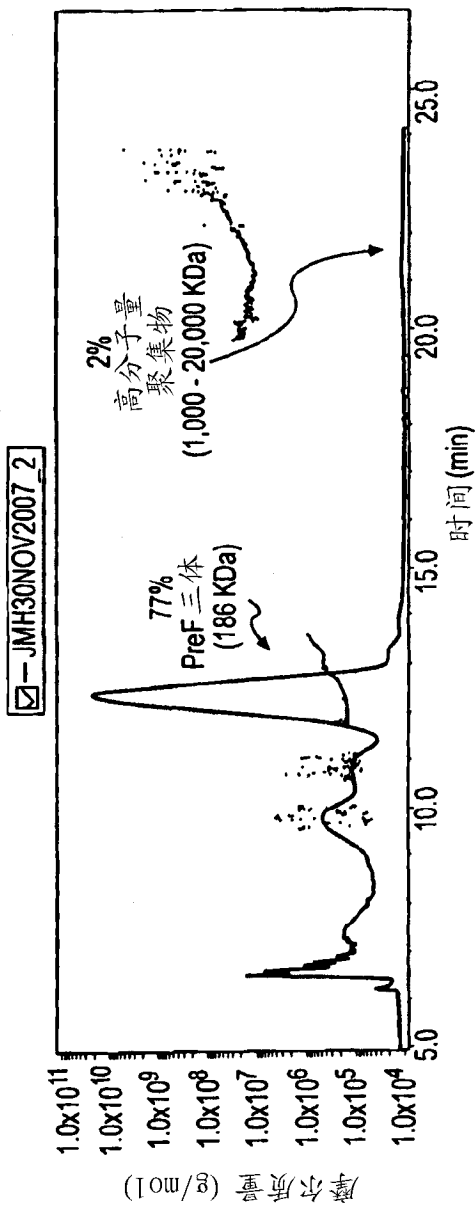


图 2

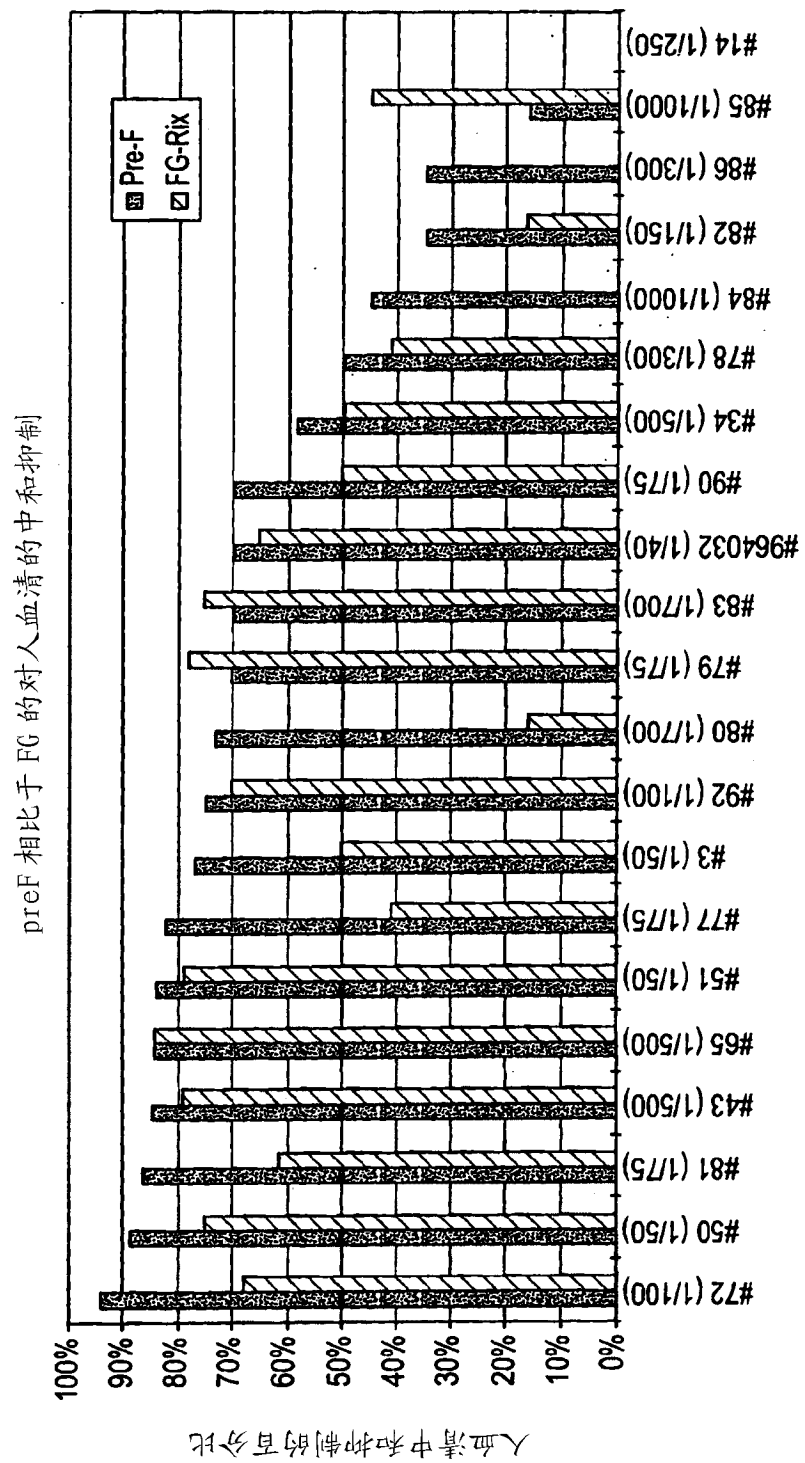


图 3

经免疫的小鼠 CHO-preF 中的血清学

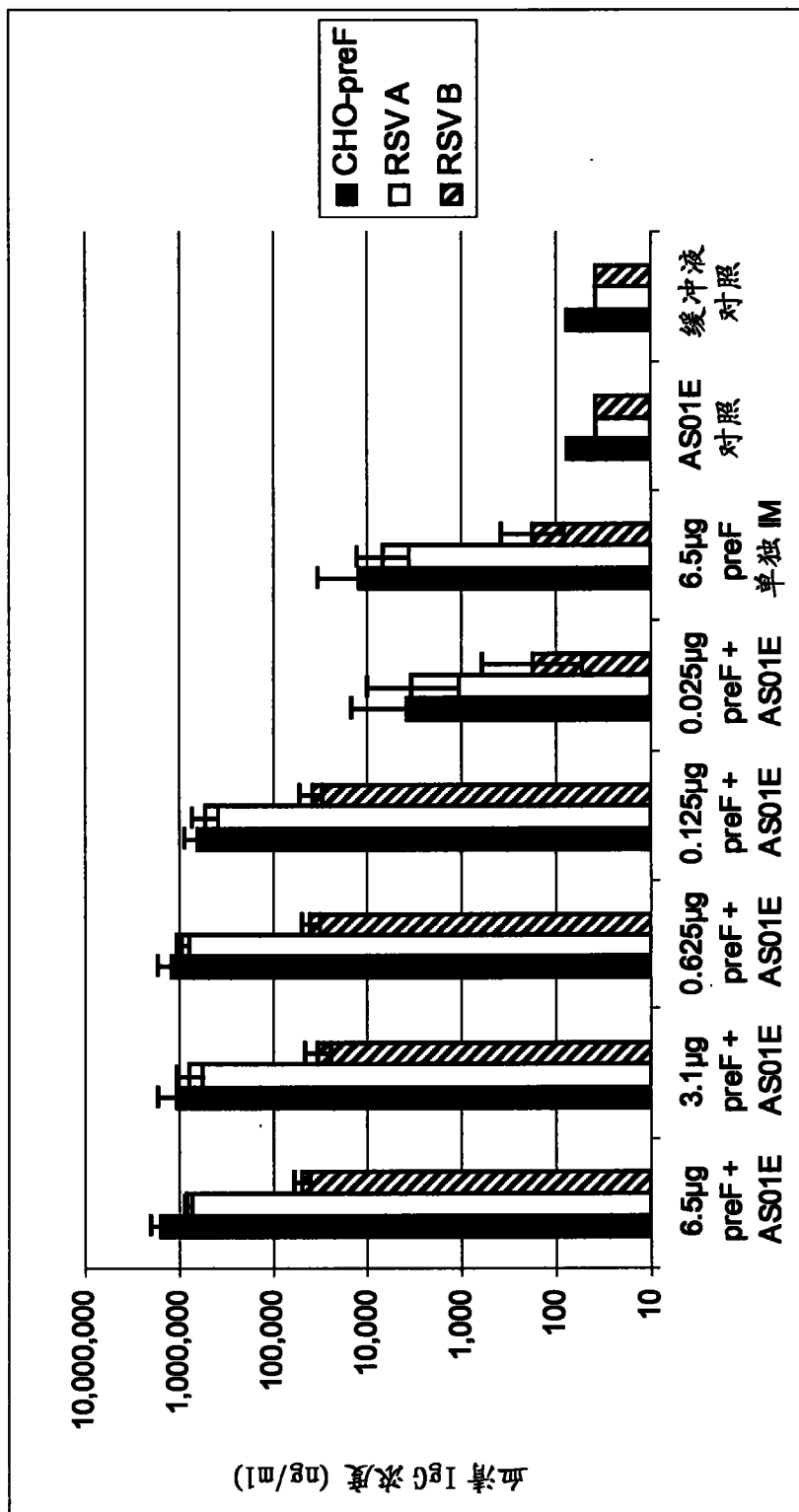


图 4A

经免疫的小鼠 CHO-preF 中的血清学

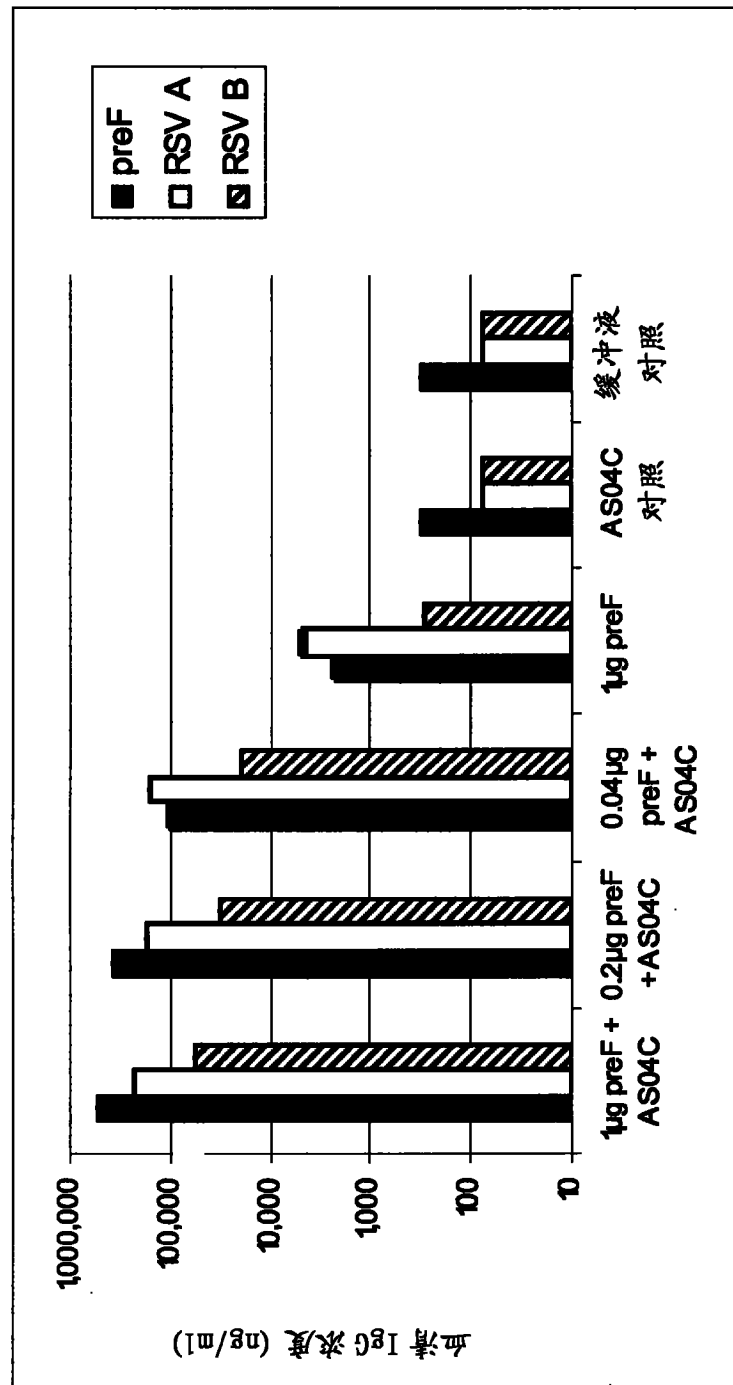
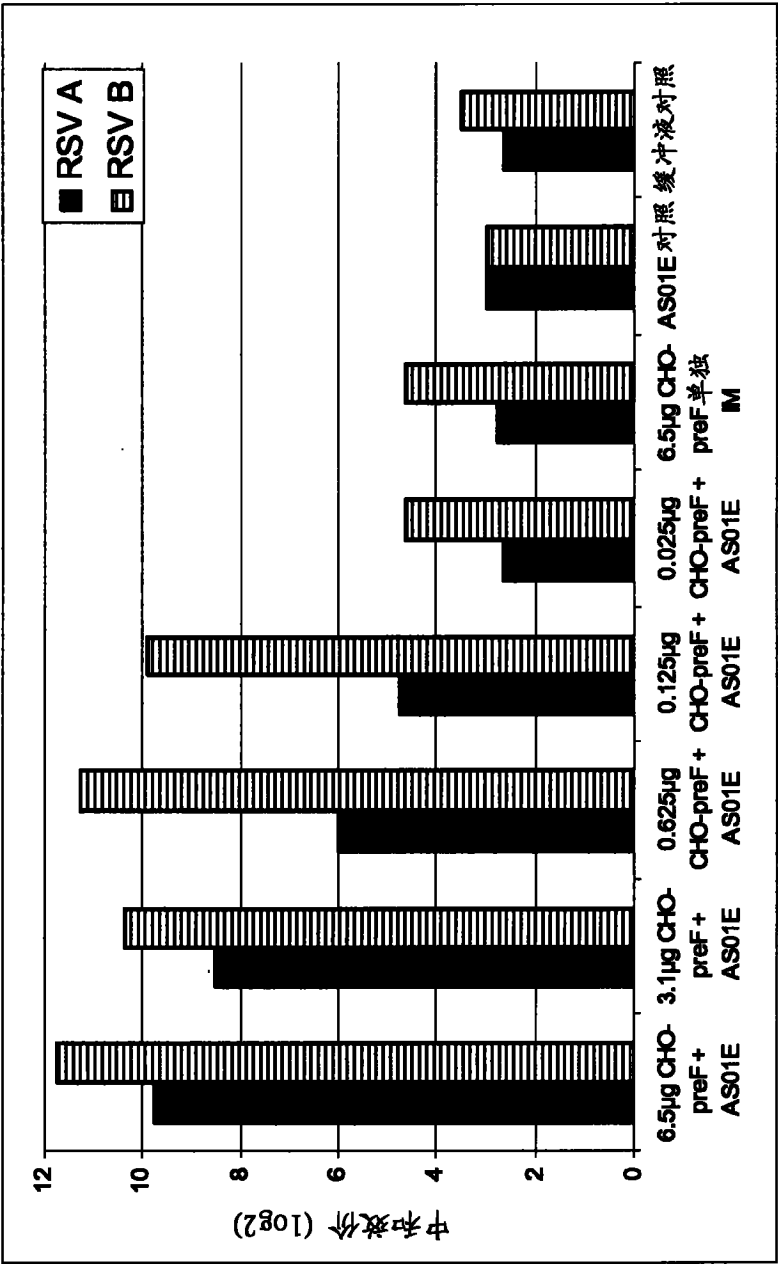


图 4B

CHO-preF 体内中和效价的评估



* 相同的试验，从不同动物取血清

图 5A

CHO-preF 体内中和效价的评估

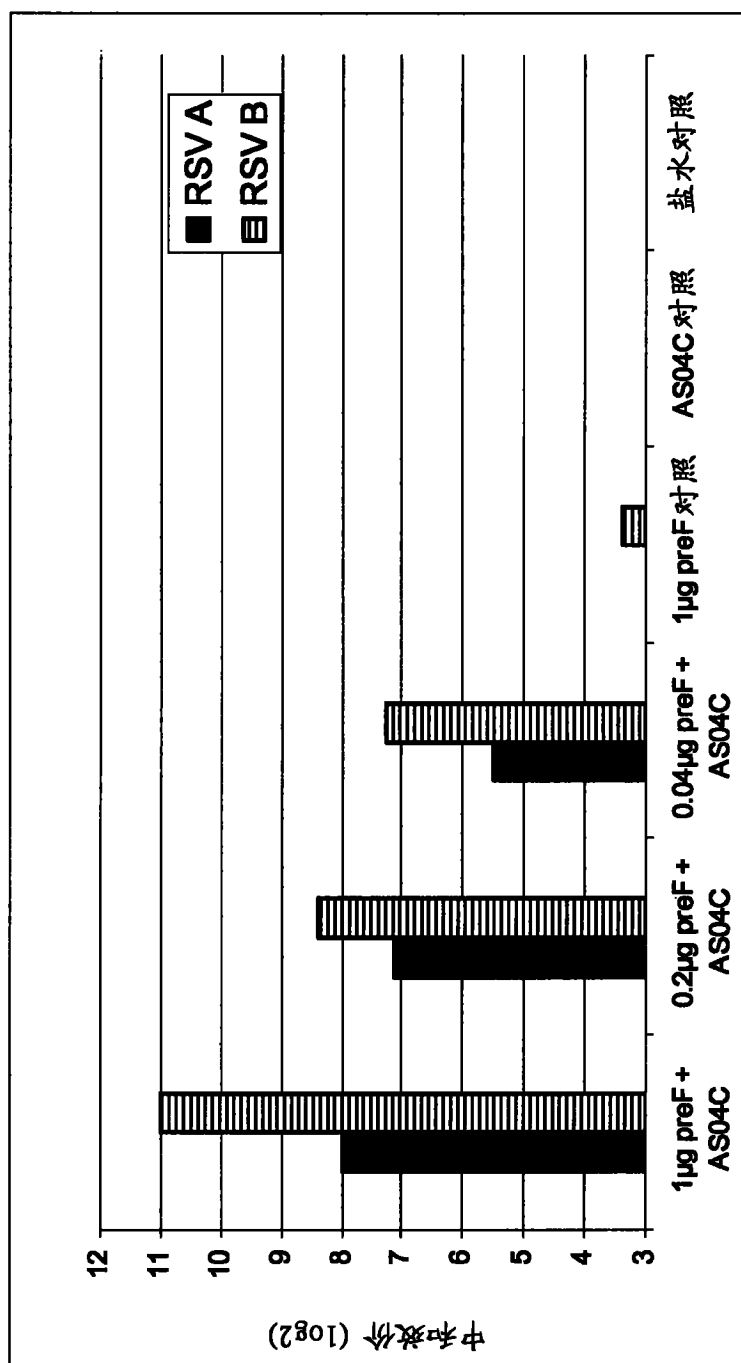


图 5B

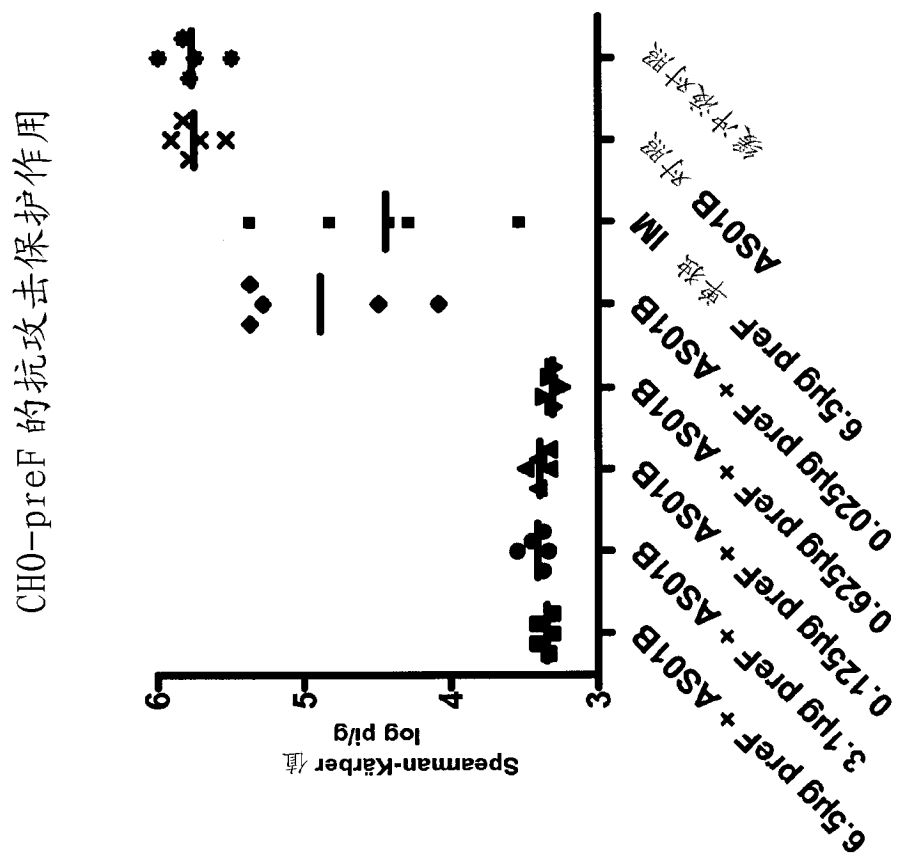


图 6A

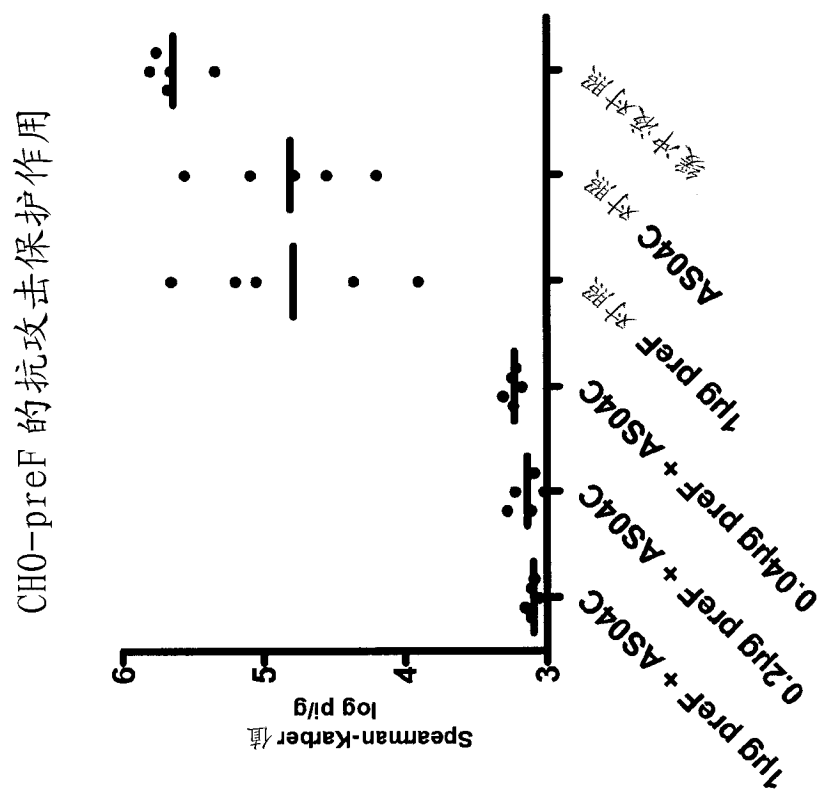


图 6B

小鼠中攻击后嗜酸性粒细胞募集

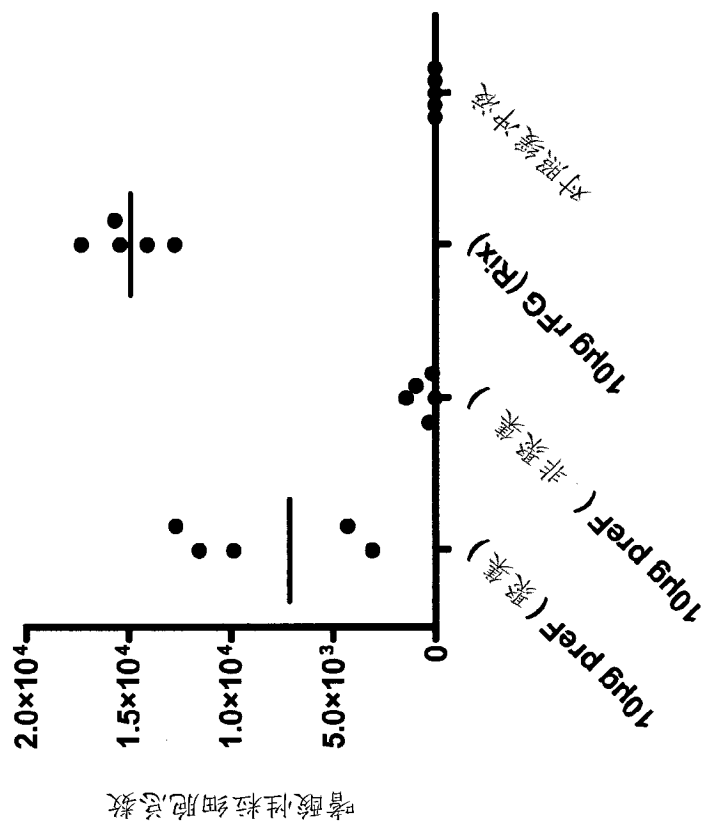


图 7

经 preF 配以水包油乳剂佐剂进行免疫的小鼠中的血清 IgG 水平

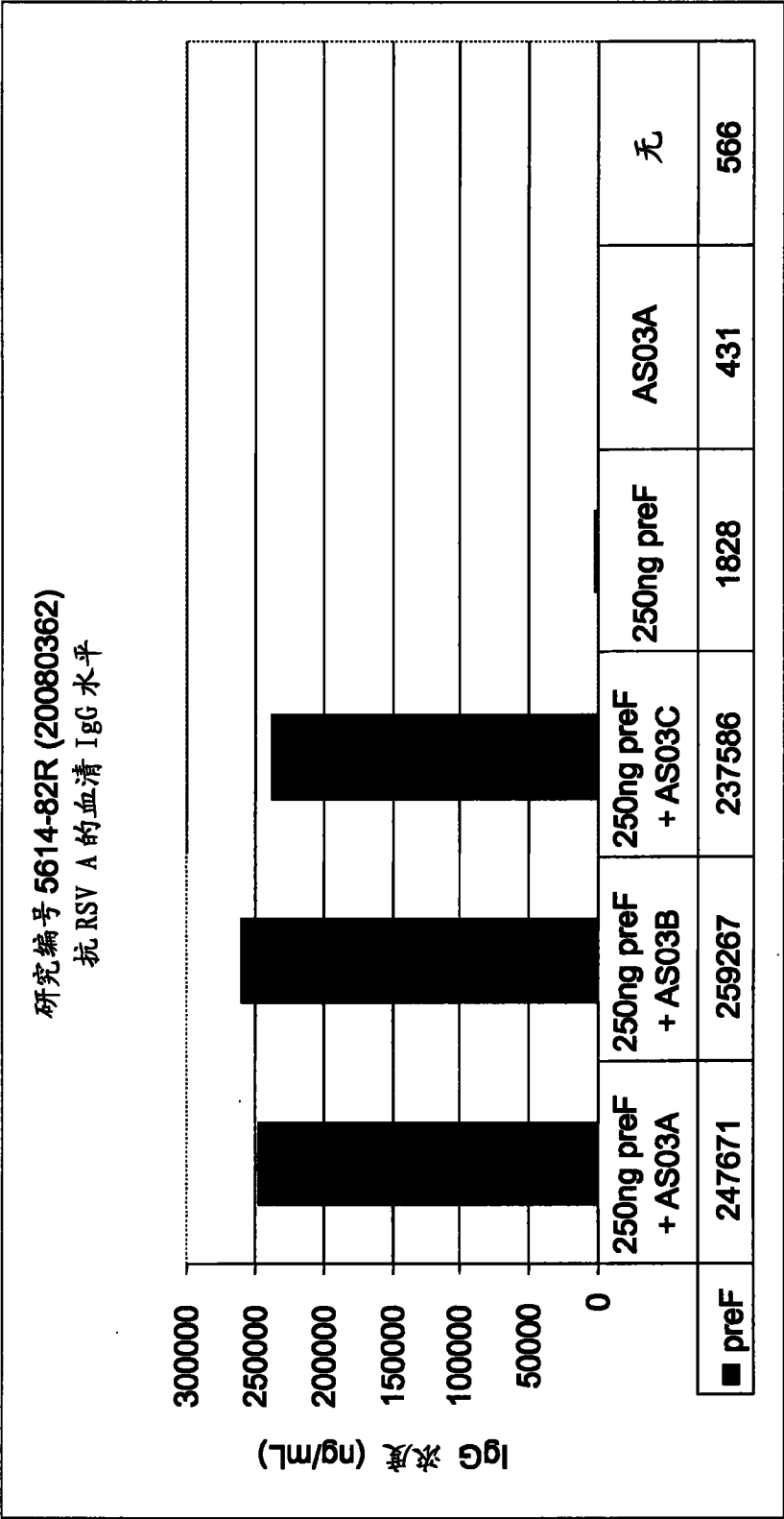


图 8

经 preF 配以水包油乳剂佐剂进行免疫的小鼠中的中和抗体效价

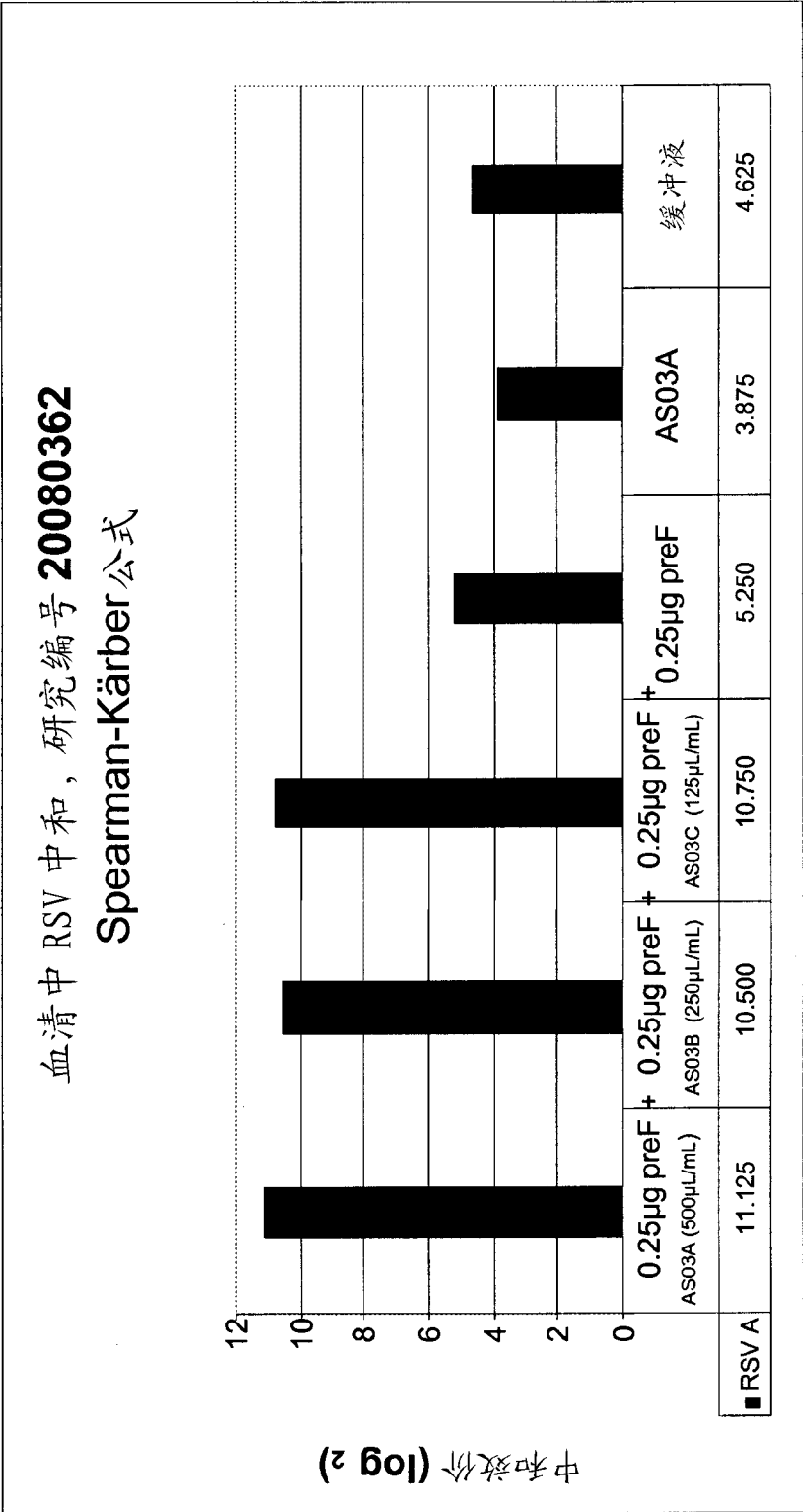


图 9

经 preF 配以水包油乳剂佐剂进行免疫的小鼠中的抗攻击保护作用受攻击小鼠肺匀浆物中的 RSV 滴定 Spearman-Kärber 公式 (有几何平均值)

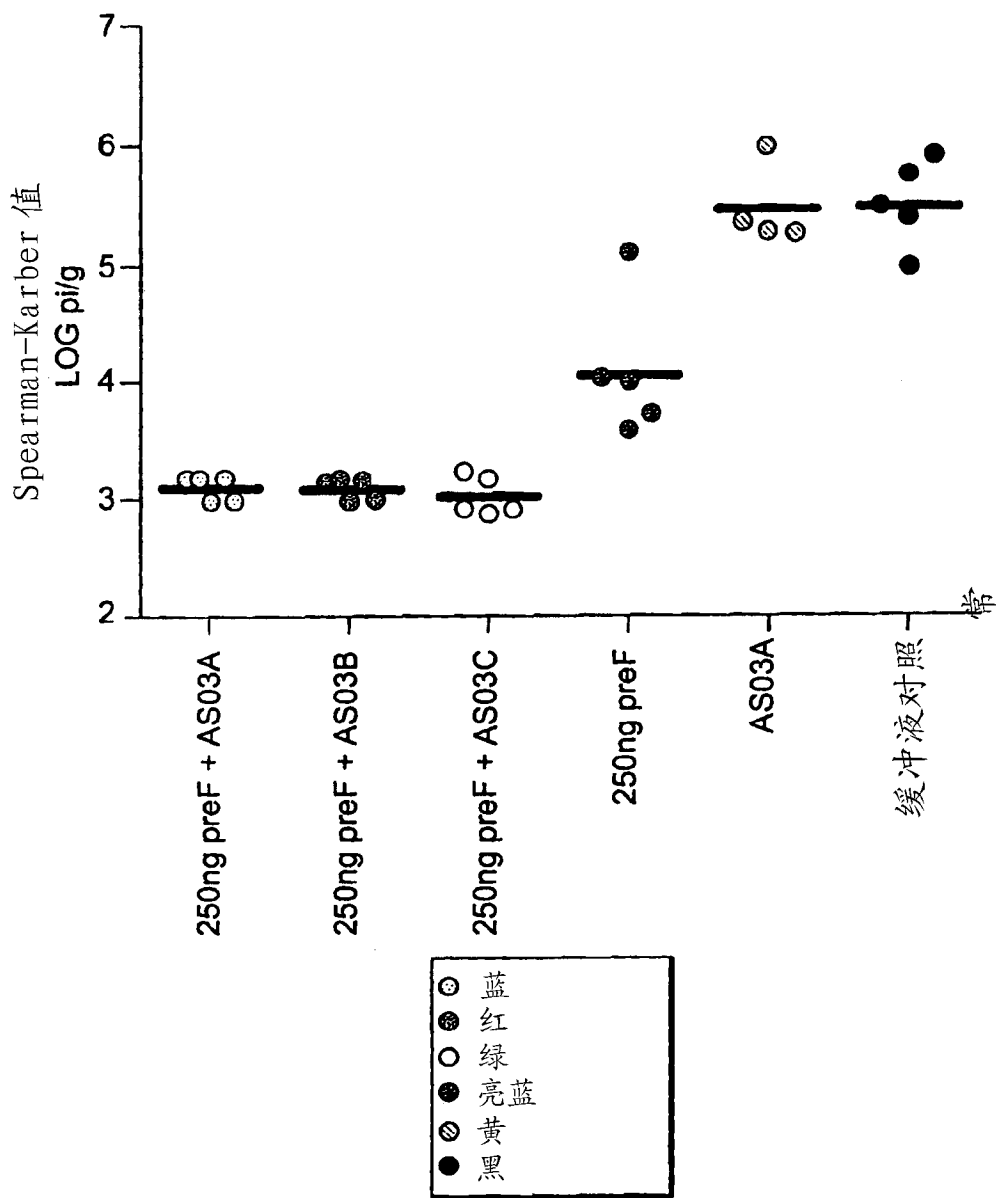


图 10