[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[7]
C12N 15/09
C07K 14/135 C07K 16/10
A61K 39/135 A61K 47/38
C12N 5/10 C12N 5/20
C07K 19/00

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98807304.8

[43]公开日 2000年8月23日

[11]公开号 CN 1264425A

[22]申请日 1998.7.17 [21]申请号 98807304.8
[30]优先权
[32]1997.7.17 [33]FR [31]97/09079
[86]国际申请 PCT/FR98/01570 1998.7.17
[87]国际公布 WO99/03987 法 1999.1.28
[85]进入国家阶段日期 2000.1.17
[71]申请人 皮埃尔法博赫药品公司
地址 法国布洛涅－比朗古
[72]发明人 T·N·恩谷元 U·泊尔
L·格斯特克 A·贝克
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 陈文平

权利要求书3页 说明书28页 附图页数11页

[54]发明名称 用于诊断和治疗的呼吸道合胞病毒表位和含有它们的抗体

[57]摘要

本发明涉及抗RSV蛋白G之表位的多克隆或单克隆抗体，所述表位相应于选自RSV A或B蛋白G全序列中150—159、176—189、194—207和155—176氨基酸残基间肽序列或具有至少98%相同性的序列的一种序列。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 抗RSV蛋白G之表位的多克隆或单克隆抗体，所述表位相应于选自RSV A或B蛋白G全序列中150－159、176－189、194－207和155－176氨基酸残基间肽序列或具有至少80%相同性的序列的一种序列。

2. 根据权利要求1的抗体，其特征在于它是抗RSV A亚型或B亚型蛋白G 130－230氨基酸残基间序列所含肽的抗体。

3. 根据权利要求1或2的抗体，其特征在于它是抗具有至少下列序列之一的肽的抗体：SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No. 4、SEQ ID No.5、SEQ ID No.6、SEQ ID No.7、SEQ ID No.8、SEQ ID No.9、SEQ ID No.10、SEQ ID No.11、SEQ ID No.12、SEQ ID No.13、SEQ ID No.14、SEQ ID No.15、SEQ ID No.16、SEQ ID No.17、SEQ ID No.18、SEQ ID No.19、SEQ ID No.20、SEQ ID No.21和/或SEQ ID No.22。

4. 能产生权利要求1－3之一的抗体的肽，其特征在于它具有选自下列序列的至少一种序列：SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No. 4、SEQ ID No.5、SEQ ID No.6、SEQ ID No.7、SEQ ID No.8、SEQ ID No.9、SEQ ID No.10、SEQ ID No.11、SEQ ID No.12、SEQ ID No.13、SEQ ID No.14、SEQ ID No.15、SEQ ID No.16、SEQ ID No.17、SEQ ID No.18、SEQ ID No.19、SEQ ID No.20、SEQ ID No.21和/或SEQ ID No.22。

5. 根据权利要求4的肽，其特征在于它另外在N－末端或C－末端位置含有至少一个半胱氨酸残基。

6. 一种免疫原性剂，其特征在于它含有与载体蛋白偶联的至少一个权利要求4或5的肽。

7. 根据权利要求6的免疫原性剂，其特征在于载体蛋白选自：革兰氏阴性细菌的OmpA和其片段、TT蛋白、链球菌的人血清白蛋白结合蛋白和其片段及霍乱毒素B亚单位(CTB)。

8. 根据权利要求6或7的免疫原性剂，其特征在于载体蛋白为克雷

伯氏菌属细菌的OmpA。

9. 根据权利要求6～8之一的免疫原性剂，其特征在于肽与载体蛋白通过连接蛋白偶联。

10. 根据权利要求9的免疫原性剂，其特征在于连接蛋白选自：哺乳动物血清白蛋白受体和存在于粘膜细胞表面的受体。

11. 根据权利要求6－10之一的免疫原性剂，其特征在于所述偶联是共价偶联。

12. 编码权利要求6－11之一的免疫原性剂的核苷酸序列。

13. 根据权利要求12的核苷酸序列，其特征在于它是一种在编码载体蛋白的DNA分子中插入或融合与启动子融合的编码权利要求4或5的肽或其片段的DNA所产生的杂合DNA分子。

14. 根据权利要求12的核苷酸序列，其特征在于它是一种RNA分子。

15. 作为药物的权利要求1－3之一的抗体、权利要求4或5的肽、权利要求6－11之一的免疫原性剂或权利要求12－14之一的核苷酸序列。

16. 一种药物组合物，其特征在于它含有权利要求1－3之一的抗体、权利要求4或5的肽、权利要求6－11之一的免疫原性剂或权利要求12－14之一的核苷酸序列，及药物可接受的赋形剂。

17. 至少一种权利要求1－3之一的抗体、权利要求4或5的肽、权利要求6－11之一的免疫原性剂或权利要求12－14之一的核苷酸序列在制备用于治疗或预防RSV亚型A或B所致感染的组合物中的用途。

18. 一种诊断试剂盒，其特征在于它包含权利要求1－3之一的抗体、权利要求4或5的肽、权利要求6－11之一的免疫原性剂或权利要求12－14之一的核苷酸序列。

19. 制备权利要求6－11之一的免疫原性剂的方法，其特征在于肽与载体蛋白间的偶联是经过化学方法实现的。

20. 制备权利要求6－11之一的免疫原性剂的方法，其特征在于肽与载体蛋白间的偶联是经过DNA重组技术实现的。

21. 根据权利要求19的制备方法，其特征在于它包括向宿主细胞中引入权利要求12－14之一的核苷酸序列的步骤。

22. 根据权利要求21的制备方法， 其特征在于核苷酸序列是借助于源自质粒、噬菌体、病毒和/或粘粒的DNA载体引入的融合基因。

23. 根据权利要求21或22的方法，其特征在于融合基因是整合在宿主细胞基因组中的。

24. 根据权利要求21－23之一的方法，其特征在于宿主细胞是原核的。

25. 根据权利要求24的方法，其特征在于宿主细胞选自：大肠杆菌、芽孢杆菌、乳杆菌、葡萄球菌和链球菌。

26. 根据权利要求21－23之一的方法，其特征在于宿主细胞是一种酵母。

27. 根据权利要求21－23之一的方法，其特征在于宿主细胞是一种哺乳动物细胞。

28. 根据权利要求21－23之一的方法，其特征在于宿主细胞是一种植物来源的细胞。

29. 根据权利要求21－23之一的方法，其特征在于宿主细胞是一种昆虫细胞。

30. 根据权利要求21－23之一的方法，其特征在于使用病毒载体。

31. 根据权利要求20－27之一的方法，其特征在于融合分子被表达、锚定并暴露在宿主细胞膜上。

32. 根据权利要求16的组合物，其特征在于单克隆抗体是人源化的，并经重组方法产生。

33. 根据权利要求 16 的组合物，其特征在于单克隆抗体经噬菌体文库方法获得。

说　　明　　书

用于诊断和治疗的呼吸道合胞病毒表位和含有它们的抗体

本发明涉及呼吸道合胞病毒，特别是鉴定可用于由该病毒所致疾病的治疗、预防和诊断领域的新表位和相应的抗体。

呼吸道合胞病毒(RSV)是常见于婴儿和老人中的病原体。细支气管炎常是儿童中严重的疾病，需要住院治疗。现在还没有预防由RSV引起的疾病的方法，RSV的第一次感染并不能阻止以后的感染。抗生治疗(Ribavirine)和/或结合免疫治疗(人免疫球蛋白)对于重病例并不能减轻病情。而且这类治疗一直是很昂贵的。用ORAVAX的HNK20单克隆抗体(抗RSV的F蛋白)最近进行的临床试验表明，与安慰剂相比对儿童的RSV感染没有治疗效果。在60年代曾试图用以甲醛灭活的RSV疫苗对儿童接种，结果是病情加重而非保护肺对抗RSV的自然感染。与此问题相关，现在的诊断试剂并不能可靠地鉴定RSV的感染，至少在成人中是如此。

RSV被归于副粘病毒科，肺病毒属，含有非节段负极性RNA基因组，编码10种特异蛋白。

专利申请WO 87/04185提出在疫苗中使用RSV的结构蛋白，如称为蛋白F(融合蛋白)或蛋白G的包膜蛋白、22Kd的糖蛋白、9.5Kd的蛋白或衣壳的主蛋白(蛋白N)。

专利申请WO 89/02935描述了RSV的全蛋白F的保护特性，其以单体形式或脱糖化形式被修饰或未修饰。

已克隆了蛋白F的一系列片段以研究它们的中和特性。

WO 95/27787证明RSV的蛋白G可用于制备治疗和/或预防RSV(A或B亚型)所致感染的产品。

本发明现发现含有特定表位的RSV病毒蛋白G的片段具有特别有利的性质。因而可以制备RSV蛋白G的许多新肽片段，特别用于以下应用:

(i)通过化学方法或通过遗传工程与载体偶联或融合的所述肽片段构成对抗RSV感染的有效疫苗，而无论疫苗施用方式如何；

(ii)这些同样的肽片段用于产生在RSV感染宿主的预防或治疗中很有效的多克隆抗体和单克隆抗体；

(iii)这些肽片段和单克隆抗体用作诊断试剂盒中的反应物，该试剂盒可用于显示和确认RSV－A或RSV－B感染的宿主感染。

本发明的目的是提供抗RSV蛋白G之表位的多克隆抗体或单克隆抗体，所述表位相当于选自RSV A或B蛋白G全序列中150－159、176－189、194－207和155－176氨基酸残基间肽序列或具有至少80%、优选至少98%相同性的序列的一种序列。

这些抗体能识别A亚型或B亚型RSV蛋白G的130－230氨基酸残基间序列所含有的肽。

相应于RSV A蛋白G 130－230氨基酸的该区域以下称为G2Na。G2Na在细菌如大肠杆菌中产生，因而是非糖基化的。它可提供抗RSV感染的免疫保护，特别是当它与一种载体偶联时，载体如为革兰氏阴性菌如克雷伯氏菌的OmpA(蛋白p40，描述于WO 96/14415)或衍生自链球菌的蛋白(如与人血清白蛋白结合的蛋白，以下称为BB，描述于WO96/14416)。

已令人意外地证明，按本发明制备的一系列肽提供抗A亚型或B亚型RSV的交叉保护。

尤其是，重组蛋白BBG2a1在BALB/c小鼠中提供RSV－A或RSV－B的交叉保护，BB2a1是BBG2Na的一种衍生物，其中仅在G2Na基础上修饰了4个残基：残基Asn(aa191)、Lys(aa192)、Gly(195)和Thr(aa198)分别被残基Ser、Asn、Lys和Pro置换。为了提高交叉保护的相同目的，制备了两种新分子：BBG2a2，其中残基Asn(aa157)、Asn(aa160)、Asn(aa161)和Phe(aa163)分别被残基Lys、Lys、Asp和Tyr置换；BBG2a3，其含有BBG2a1和BBG2a2的8个修饰氨基酸。

按照本发明特别有利的肽具有选自下列序列的一种序列：在附件中给出的SEQ ID No.1、SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、

SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 6、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 8、SEQ ID No. 9、SEQ ID No. 10、SEQ ID No. 11、SEQ ID No. 12、SEQ ID No. 13、SEQ ID No. 14、SEQ ID No. 15、SEQ ID No. 16、SEQ ID No. 17、SEQ ID No. 18、SEQ ID No. 19、SEQ ID No. 20、SEQ ID No. 21和/或SEQ ID No. 22，这种肽另外还可以在N－末端或C－末端处含有至少一个半胱氨基酸残基。

这些肽的反应性通过单克隆或多克隆探针来证明。利用该技术揭示了G2Na的4个区域：G5a(aa144－159)、G11a(aa164－176)、G4a(aa172－187)和G9a(aa190－204)。

因而本发明还涉及抗含有SEQ ID No. 1至SEQ ID No. 22的至少一种序列的肽的单克隆或多克隆抗体。

具有相应于RSV蛋白G序列中表位150－159、176－189、194－207和155－176的一个或多个单元的肽，在本发明的不同实施方案中将非常有用。

与载体蛋白偶联的本发明可用作免疫原性剂。

载体蛋白有利地选自：革兰氏阴性细菌的OmpA和它们的片段、TT蛋白（破伤风毒素）、链球菌的人血清白蛋白结合蛋白和其片段、及霍乱毒素的B亚单位(CTB)；优选载体蛋白是克雷伯氏菌属细菌的OmpA。

根据本发明的一个方面，肽与载体蛋白通过一种连接蛋白偶联；该连接蛋白特别可以选自哺乳动物血清白蛋白的受体和粘膜细胞表面的受体。

所述偶联优选是共价偶联，这可以通过化学方法或通过DNA重组技术实现。

另一方面，本发明涉及编码如上所述肽或免疫原性剂的核苷酸序列。这特别可以是通过在编码载体蛋白的DNA分子中插入或融合编码权利要求4或5的肽或其片段的DNA(与启动子融合)而产生的杂合DNA分子；还可以是一种RNA分子。

本发明的肽、抗体、免疫原性剂和核苷酸序列可用作药物，特别是用于制备治疗或预防RSV A或B亚型所致感染的组合物。

例如，已制备了特异性识别G5a和G11a和G1ΔCa肽的单克隆抗体。在自然小鼠中被动转移单克隆抗体5C2(抗G5a)和18D1(抗G1ΔCa)能够预防RSV－A的感染。另一方面，同样的单克隆抗体5C2在免疫缺陷小鼠中能迅速消除RSV－A的慢性感染。

本发明因此还涉及一种药物组合物，其特征在于它含有如上所定义的至少一种单克隆或多克隆抗体、本发明的肽或表位、免疫原性剂或核苷酸序列，及药物可接受的赋形剂。

单克隆抗体优选是人源化的，并通过重组方法产生。根据本发明的另一方面，它们通过噬菌体文库的方法获得。

根据本发明的一个实施方案，本发明的肽、免疫原性剂、抗体和核苷酸序列可进入诊断试剂盒的组成中。

如上文所述，免疫原性剂可通过DNA重组技术在宿主细胞中引入本发明的核苷酸序列来制备。这种核苷酸序列可以是一种融合基因，通过来源于质粒、噬菌体、病毒和/或粘粒的DNA载体来引入。在该制备方法的一种实施方案中，所述融合基因可以整合在宿主细胞的基因组中。

如本领域技术人员所知，所述载体可以是病毒载体。

宿主细胞可以是原核的，特别选自：大肠杆菌、芽孢杆菌、乳杆菌、葡萄球菌和链球菌。

但宿主细胞还可以是酵母、哺乳动物细胞、植物来源的细胞或昆虫细胞。

根据本发明方法的一个方面，表达的融合蛋白是：分泌的、处于胞浆中或暴露在宿主细胞的膜上。

下列实施例用于说明本发明。在这些实施例中参考下列附图。

图1和2：在载体中克隆基因G2a1、G2a2和G2a3的原理。

图3：A－考马斯蓝染色的20%SDS－PAGE胶。M=分子大小标准，泳道1和2为在HSA－Sepharose上亲和纯化的BBG2a1蛋白(理论分子量38.7Kd)。

B－BBG2a1蛋白用单克隆抗体18D1的免疫印迹。

图4: A－肽G5a和G9a的免疫原性。

B－肽G5a和G9a对肺的保护效力。

图5: A－肽G7a和G8a的免疫原性。

B－肽G7a和G8a对肺的保护效力。

图6: BBG2a1与RSV A(图6A)和RSV B(图6B)的免疫原性，和对抗RSV A(6C)和RSV B(6D)的保护效力。

图7: 单克隆抗体18D1和5C2的治疗效果。

图8: A－单克隆抗体18D1的预防效力。

B－单克隆克隆5C2的预防效力。

图9: BBG2Na免疫小鼠血清中存在的G2Na B表位的鉴定。A: 总体显示; B: 未显示155－176区。

图10: 用Pepscan B方法确定单克隆抗体5B7的识别区域。

实施例

实施例1: 肽的合成

· 肽G5aCys和CysG5a合成的实例。

缩写:

AA: 氨基酸

Boc: 叔丁氧羰基

BHA: 溴代氢化琥珀酰亚胺基酸(Bromo hydrosuccimidyl acid)

CE: 毛细管电泳

ESMS: 电喷雾质谱

FMOC: 芴基甲氧羰基

FZCE: 自由区毛细管电泳

HBTU: 2－(1H－苯并三唑－1－基)－1,1,3,3－四甲基脲镒六氟磷酸盐

HMP: 对羟甲基苯氧基甲基聚苯乙烯

MBHA: 甲基二苯甲基胺

NMP: N－甲基－2－吡咯烷酮

Pmc: 2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基

RP-HPLC: 反相高效液相色谱

SPPS: 固相肽合成

tBOC: 叔丁氧羰基

tBu: 叔丁基

TFA: 三氟乙酸

Trt: 三苯甲基

肽G5a是一种16个氨基酸的肽，相应于RSV-A蛋白G的一个片段(144-159)。通过固相化学合成法从C端到N端合成得到。肽CysG5a和G5aCys分别相应于该肽在N-或C-端增加一个半胱氨酸，用于与载体蛋白的单一偶联。这两个肽可用于研究肽与载体蛋白的偶联方向对免疫反应的可能影响。

利用一种固相肽自动合成仪从C端到N-端合成了这些肽(FMOC化学法，规模为0.1、0.25或1.0mmol)。肽GysG5a的合成从HMP型树脂上预载的脯氨酸开始进行，在裂解后可以获得C-端的游离酸功能团；或用Rink-酰胺MHBA型树脂，在裂解后可以获得C-端的酰胺功能团。肽G5aCys的合成从该两种树脂中任一种上预载的半胱氨酸开始。所用氨基酸的侧链反应性功能团用FMOC化学的适宜基团保护[Cys(Trt)；Arg(Pmc)；Asn(Trt)；Gln(Trt)；Lys(Soc)；Ser(tBu)；Thr(tBu)]。偶联循环按如下方式进行：用哌啶将第一个氨基酸的N-端胺功能团脱保护，将待偶联的第二个氨基酸的酸功能团用HBTU/HMP活化，然后偶联。在合成结束时将肽从树脂上解下，通过与水/TFA混合物的反应将侧链脱保护。用预冷至-40℃的醚沉淀肽，并离心混合物。用醚洗脱沉淀三次，然后在氮气下干燥。用含0.1%TFA的水重悬沉淀。将悬液再离心，将含有肽的上清液与沉淀分离，沉淀中含有树脂。粗肽用半制备性反相HPLC纯化。纯化肽的均质性通过反相HPLC及毛细管电泳(FZCE)验证。通过比较ES-MS质谱测得的质量与从氨基酸理论序列计算的质量的相符性，证实了理论结构。

· 肽CysG5aNH_2

合成:

用于合成的树脂－肽理论重量:	593 mg
氮气下干燥后测得的重量:	619 mg
树脂－肽裂解和粗肽分析:	200 mg(批重的1/3)
冻干后裂解粗肽的质量:	84 mg(肽净重的75%, 即收率为97%)
粗肽的均质性:	97%(RP－HPLC; UV210nm) 97%(FZCE/Microcoat™)

纯化:

冻干后纯化肽的质量:	50mg(肽净重的75%, 即收率为58%)

鉴定:

纯化肽的均质性:	>99%(RP-HPLC; UV210nm) >99%(FZCE/Microcoat™; UV200nm)

质谱(ES－MS)

计算质量:	1951.29Da
实测质量:	1950.80Da±0.31。

实施例2: 肽G5a、G7a、G8a、G9a、G11a和G11△Ca与载体蛋白(P40、BB、TT、KLH)的偶联

· 肽G11△Ca与蛋白P40偶联的实例

肽G11△Ca（SEQ ID No.14）是一个源自RSV蛋白G的13个氨基酸的肽，它相应于该蛋白的164-176间的序列。在合成时，173位的Cys残基已被Ser残基置换，以便仅保留176位的一个Cys残基，避免形成天然蛋白G（1-4/2-3配对）中不存在的1-2二硫桥。

该肽已借助戊二醛偶联（均双官能反应物，与胺和硫醇功能团偶联）或借助于BHA进行单一偶联（异双官能反应物，与C末端位半胱氨酸的硫醇功能团偶联）。

· 通过BHA的单一偶联

· 肽G11△Ca的溶解

将2mg G11△Ca溶解在2ml pH7 0.1M 磷酸缓冲液+0.1% Zwittergent 3-14中。

· 借助于异双官能反应物(BHA)与蛋白P40的单一偶联

将3mg BHA在25μl DMF中的溶液加入到预先对pH7 0.1M磷酸缓冲液 +0.1%Zwittergent 3-14透析过的2.5mg蛋白P40中，并在室温下搅拌1小时。在PD10柱上脱盐后，用pH7 0.1M磷酸缓冲液 +0.1%Zwittergent 3-14洗脱，每500μl一管进行收集，将含有溴代乙酰化蛋白的管合并(在280nm下测OD)在含有0.95ml G11△Ca溶液的管中。将反应介质用氮气饱和，室温下黑暗中搅拌2小时。然后将该溶液对pH7 0.1M磷酸缓冲液+0.1%Zwittergent 3-14于+4℃搅拌下透析过夜，冷冻保存所得溶液。

· 借助于均双官能反应物(戊二醛)与蛋白P40的偶联

将10mg P40对pH7 0.1M 磷酸缓冲液+0.1Zwittergent 3-14透析。用pH9 0.1M碳酸盐缓冲液+0.1%Zwittergent 3-14调节浓度至2mg/ml。加入200mg SDS的4%溶液。

将55.5μl 2.5%的戊二醛加入到肽G11△Ca在pH9 0.1M碳酸盐缓冲液+0.11% Zwittergent 3-14中的2.5ml 1mg/ml溶液(pH在9-10之间)中。+4℃下搅拌反应介质24小时，然后升至室温。加入25μl 1M赖氨酸阻止反应。将该溶液于+4℃搅拌下对pH7 0.1M磷酸盐缓冲液+0.1% Zwittergent 3-14透析24小时。收集透析液，用0.02M KCl溶液沉淀6次除去SDS。最终的上清液中含有P40-G11△Ca戊二醛偶联物，于-20℃下冷冻保存。

· 偶联物的灭菌

将偶联物解冻，无菌过滤(0.22μm)，分份于+4℃下保存以避免沉

淀问题。

· 偶联物的分析鉴定

偶联物通过如下方法鉴定：用Lowry法进行蛋白测定，用SDS－PAGE电泳(考马斯蓝显色)；气相酸水解后测定氨基酸，用PITC衍生化并经HPLC分析。

偶联物	体积(ml)	[蛋白] mg/ml	固定化G11△Ca的Nb	[G11△C] mg/ml
rP40-G11△Ca (BHA)	2.7	0.74	2	0.05
rP40-G11△Ca (戊二醛)	5.1	1.29	16	0.49

实施例3：基因G2a1、G2a2在表达载体pvaBB308中的克隆，融合蛋白BBG2a1和BBG2a2在大肠杆菌中的产生

基因G2a1(SEQ ID No.15)、G2a2(SEQ ID No.16)和G2a3(SEQ ID No.17)在载体中克隆的原理示于图1和2中。

3.1 G2a1的构建

利用质粒pRIT28G2Na作为起始材料通过定向诱变构建编码蛋白G2a1的基因(SEQ ID No.15)。为此，在下列条件下用寡核苷酸对RIT29/TH137(PCR1)和RIT30/TH136(PCR2)进行了两个PCR反应(聚合酶链式反应)：

PCR (94℃，15秒
25个循环 (55℃，30秒
(72℃，30秒

· 在磁珠上固定

将分别从反应1和2中获得约262bp和208bp的片段固定在磁珠上。将25μl与链亲和素偶联的磁珠DYNAL® M－280预先用T.E. 缓冲液

(10mM Tris; 1mM EDTA, pH7.5)洗两次，然后在37℃与90μl扩增反应液1和2保温20分钟。固定后，将磁珠与50μl 0.5M NaOH在室温下保温10分钟，片段被变性。收集2种上清液，用无水乙醇沉淀，重悬于5μl水中。

· 延伸反应

该反应是在如下条件下取每个扩增反应液10μl通过PCR完成的:

(95℃, 15秒
5个循环 (35℃, 30秒
(72℃, 30秒。

产生的片段用寡核苷酸RIT27和RIT28进行PCR扩增:

(95℃, 15秒
25个循环 (55℃, 30秒
(72℃, 30秒。

将509 bp的扩增片段用限制酶Pst I和HindIII消化。将产生的169bp的片段克隆到用相同酶消化的载体pRIT28中。

所得质粒pRIT28G2a1 down用染料脱氧终止子化学按Applied Biosystem(Perkin Elmer)描述的方法测序。

将pRIT28G2a1 down 的PstI/Hind III片段(PstI位点下游的片段)克隆在载体pRIT28G2Na中得到质粒pRIT28G2a1。

基因G2a1然后被克隆到表达载体pvaBB308的限制位点EcoRI/HindIII上，生成载体pvaBBG2a1。

寡核苷酸的序列如下所示:

RIT27: 5' - GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG - 3'

RIT28: 5' - AAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG - 3'

TH136: 5'- CCGAAGAAAAAACCGACGACCAAACCGACC - 3'

TH137: 5' - TTTTTTCTTCGGTTTGTTGCTCGGG - 3'

RIT29: 5'生物素化的RIT27。

RIT30: 5'生物素化的RIT28。

3.2. G2a2的构建(SEQ ID No.16)

克隆原理示意图见图2的下方。

在该构建中使用的寡核苷酸对如下：RIT29/TNG193(PCR1)，和TNG192/RIT30(PCR2)。寡核苷酸的序列如下所示：

TNG192：5'- CCGCCGAAAAAACCGAAAGACGAT - 3'

TNG193：5' - CGAAATGGTAATCGTCTTTCGG - 3'

3.3 G2a3的构建(SEQ ID No.17)

将单一PstI位点上游和下游的两个片段集中在同一个载体中，产生pRIT28G2a3。

三个插入片段G2a1、G2a2和G2a3已克隆在大肠杆菌中的不同表达载体中，特别是我们实施例中的载体pvaBB308，其中BB为编码白蛋白受体的基因。所产生的融合蛋白BBG2a1、BBG2a2和BBG2a3可通过HSA - Sepharose(人血清白蛋白)柱很容易地亲和纯化。

3.4 融合蛋白BBG2a1和BBG2a2的发酵和纯化

在两个锥形烧瓶中含氨苄青霉素(100μg/ml，Sigma)和四环素(8μg/ml，Sigma)的250ml TSB培养基(胰蛋白酶大豆培养液，Difco)中，接种分别用质粒pvaBBG2a1和pvaBBG2a2转化的大肠杆菌RV308。在T° =37℃及搅拌下培养16小时。将200ml该培养液接种在含有2升培养基的发酵罐中(CHEMAP CF3000，ALFA LAVAL)。培养基中含有(克/升)：甘油，5；硫酸铵，2.6；磷酸二氢钾，3；磷酸氢二钾，2；柠檬酸钠，0.5；酵母提取物，1；氨苄青霉素，0.1；四环素，0.008；硫胺素，0.07；硫酸镁，1和1ml/l微量元素溶液及0.65ml/l维生素溶液。发酵过程中的控制参数为：pH、搅拌、温度、通氧率、联合供料(甘油或葡萄糖)。pH调至7.0，温度固定在37℃。以恒定流量(12ml/h)的甘油(87%)供料控制生长，保持溶解氧的张力信号为30%。当培养液的浊度(580nm下测定)达到80(培养约24小时后)时，加入吲哚丙烯酸(IAA)至终浓度25mg/l诱导蛋白质产生。诱导后约4小时，离心收集细胞。所获生物量的收率为约200克(湿重)。BBG2a1和BBG2a2的产率为约4 - 6mg蛋白/克生物量。

将30克湿生物量重悬于70ml TST溶液(pH8.0 50mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 0.05% Tween20和0.5mM EDTA)。超声破碎细胞(Vibracell 72401, Sonics & Materials)。离心细胞裂解液后，过滤(1.2μM)上清液并在500ml TST中稀释。以溶解形式获得的融合蛋白按已述方法(Stanl等，免疫学方法杂志(J. Immunol. Methods)，1989; 124: 43-52)在亲和柱HSA-Sepharose(人血清白蛋白)上纯化。

离心后，不溶的裂解物用缓冲液洗一次(pH8.5 50mM Tris-HCl; 5mM $MgCl_2$)。洗涤后将沉淀溶解在30ml 7M 盐酸胍、25mM Tris-HCl(pH8.5)、10mM二硫苏糖醇(DTT)中，然后在37℃保温2小时。将溶解的蛋白加入到变性缓冲液中(25mM Tris-HCl (pH8.5); 150mM NaCl和0.05% Tween 20)。在加入溶解的融合蛋白前，调节变性缓冲液中盐酸胍的终浓度为0.5M。中度搅拌下室温下将混合物保温16小时。离心后，上清液中的可溶融合产物在HSA-Sepharose柱上纯化。纯化的融合蛋白在MINI PROTEAN II SYSTEM(BIORADS)仪器上用SDS-PAGE(12%)胶分析。用考马斯亮蓝R250将蛋白显色。另外，用RSV特异抗体进行的免疫印迹对重组蛋白的分析表明，这些蛋白是抗原性的(见图3中BBG2a的SDS胶和免疫印迹的实例)。

实施例4：与P40偶联的肽G5a和G9a的免疫原性和保护效力

材料和方法

每组7只的各组小鼠用20μg P40-G9aCys、P40-CysG5a或P40-G5aCys腹膜内免疫2次。对照小鼠用PBS免疫。水凝胶(20%v/v)用作所有免疫的佐剂。最后一次免疫后2周从眶后窦取血以证实对RSV-A的血清转化，再过一周后用$10^5 TCID_{50}$ RSV-A鼻内(i.n.)攻击，攻击后5天处死小鼠。取出肺并测定肺中的病毒滴度。

结果

体液免疫反应

如图4A中所述，肽G5a的免疫原性依赖于与P40的偶联方向。用肽的C-末端偶联时，在血清中诱导了弱到中度的抗-RSV-A抗体滴度。

而用N-末端偶联时，G5a不诱导这种抗体。一般而言，肽G9a以C-末端与P40偶联时就诱导抗RSV-A抗体而言具有弱免疫原性。用P40-G9aCys免疫的小鼠中，7只中一只产生了高滴度血清抗体。

肽G5a和G9a的肺保护效力

如图4B中所示，与抗RSV-A抗体的检测结果直接相关，肽G5a当以C-末端偶联时诱导了保护性免疫反应，而以N-末端偶联时则不能。实际上，7只用P40-G5aCys(以C-末端偶联)免疫的小鼠中6只被保护，在肺中没有出现病毒，最后一只只出现试验检测限水平的病毒。而用P40-CysG5a(以N-末端偶联)免疫的小鼠在肺中有与对照小鼠同样高的病毒滴度，对照组用PBS免疫。这些结果证实该肽与载体蛋白的偶联方向是其保护效力的关键所在。这种保护与抗RSV-A抗体诱导间的关联提示这种肺保护至少部分是由抗体介导的。

虽然就诱导抗RSV-A血清抗体而言P40-G9aCys在小鼠中只有弱免疫原性，但7只中5只小鼠的肺受到对抗RSV-A攻击的保护。实际上，7只中一只小鼠在肺中没有出现病毒，甚至在血清中没有抗RSV-A的抗体。

结论

肽G5a和G9a含有针对RSV-A肺感染的保护性表位。G5a与载体蛋白的偶联方向对其保护效力是关键的。

实施例5: 肽G7a和G8a的免疫原性和保护效力

材料和方法

每组3-4只的各组小鼠用20μg G7a、G8a、BB-G7a或BB-G8a腹膜内免疫2次。对照小鼠用PBS免疫。水凝胶(20%v/v)用作所有免疫的佐剂。最后一次免疫后2周从眶后窦取血以证实对RSV-A的血清转化，再过一周后用10^5TCID$_{50}$ RSV-A鼻内(i.n.)攻击，攻击后5天处死小鼠。取出肺并洗涤鼻道测定肺和鼻道中的病毒滴度。

结果

体液免疫反应

如图5A中所示，两种肽G7a和G8a与BB偶联与否都对RSV-A是免疫原性的。如果考虑血清的抗体滴度，非偶联的肽看来比偶联肽的免疫原性强些。

肽G7a和G8a的肺保护效力

如图5B中所示，用肽G7a或G8a（与BB偶联或否）免疫的所有小鼠的肺都被保护对抗了RSV-A的攻击，不出现病毒或仅有试验检测限水平的病毒。

结论

肽G7a和G8a含有对肺的保护性表位。这些肽与BB偶联或不偶联均有效。

实施例6: 融合蛋白BBG 2a1的免疫原性和保护效力

材料和方法

为了确定BBG 2a1对RSV-A和B的免疫原性和保护效力，

每组3只的各组小鼠用20μg蛋白以2周的间隔腹膜内分别免疫2次和3次。对照小鼠用PBS免疫。水凝胶（20%v/v）用作所有免疫的佐剂。最后一次免疫后2周从眶后窦取血以证实对RSV-A的血清转化，再过一周后用10^5 $TCID_{50}$ RSV-A鼻内（i.n.）攻击，攻击后5天处死小鼠。取出肺并测定肺中的病毒滴度。

结果

BBG2a1针对RSV－A和B的免疫原性

示于图6A和B中的结果证明BBG2a1能够诱导抗RSV－A和B的抗体。如所预料的那样，抗RSV－A抗体的滴度比抗RSV－B抗体的滴度高得多。但抗RSV两个株的抗体滴度都提高了。

BBG2a1针对RSV－A和RSV－B的保护效力

如图6C和D中所示，用BBG2a1免疫小鼠诱导了能够保护肺对抗RSV－A攻击及对抗RSV－B攻击的免疫应答。用RSV－A攻击的小鼠受到保护，使得在肺中不出现病毒(2/3小鼠)或仅有检测限水平的病毒(1/3小鼠)。用RSV－B攻击的小鼠受到保护，使得在肺中不出现病毒(1/3

小鼠)，或只有检测限水平的病毒(1/3小鼠)或有略大于该检测限的病毒(1/3小鼠)。

结论

融合蛋白BBG2a1对RSV－A和对RSV－B是高免疫原性的。BBG2a1能够诱导保护肺对抗RSV两个亚型攻击的应答。

实施例7：18D1、5C2和5B7抗体的获取

免疫接种的肽为：(i)与KLH(钥孔血蓝蛋白)偶联的G1Δ Ca，(ii)G2Δ Ca，和(iii)BBG2aNa。

在第0天用CFA（完全弗氏佐剂）中的50μg抗原腹膜内免疫小鼠，在第14天用IFA(不完全弗氏佐剂)中的10μg各抗原腹膜内免疫，然后在第38天用10μg各肽无佐剂静脉内免疫。在第42天取出脾，与SP2－0骨髓细胞以1/1的比例融合。保留抗各抗原的阳性杂交瘤。将这些杂交瘤注射给小鼠以获得腹水，然后所得的不同抗体用不同的肽筛选，以确定所得抗体的特异性。以其抗肽G1Δ Ca、G5a特异性被筛选出来的单克隆抗体18D1、5C2特异性地识别RSV－A。从BBG2Na获得并识别肽G11a的单克隆抗体5B7能够识别RSV－A。

实施例8：单克隆抗体18D1和5C2对SCID小鼠中RSV－A慢性感染的治疗效果

材料和方法

用10^5TCID$_{50}$的RSV－A(50μl)鼻内(i.n.)攻击C.B－17 scid/scid小鼠。26天后，每组7只小鼠，鼻内(i.n.)途经接受抗RSV－A ELISA滴度为10^4的50μl 18D1抗体或5C2抗体制备液。对照小鼠接受抗BB ELISA滴度为10^4的抗BB血清。5天后处死动物，并取出它们的肺用于病毒测定。

结果

图7中所示结果证明单克隆抗体18D1和5C2能够消除SCID小鼠的RSV－A慢性感染，而且是杀毒性质的。在处死动物时没有检测到任何

病毒痕迹。在用5C2处理的小鼠肺中获得的结果相应于该实验的平均检测限，该检测限由于缺少样本而较高，但不相当于病毒存在。

结论:

抗克隆抗体5C2和18D1可以用于RSV－A肺感染领域的治疗。

实施例9：单克隆抗体18D1对小鼠RSV－A感染的预防效果

材料和方法

一组RSV－A血清阴性的自然BALB/c小鼠接受抗RSV－A ELISA滴度调至10^5的18D1抗体制备液200μl的腹膜内注射。对照小鼠腹膜内接受抗P40 ELISA滴度调至10^4的200μl抗P40血清(不相关血清)的平行注射。次日，所有的小鼠鼻内(i.n.)用含10^5 $TCID_{50}$ RSV－A的50μl病毒悬液感染。5天后处死动物，用于肺中病毒的检测。

结果

如图8A所示，抗体18D1在腹膜内转移后能够诱导对抗RSV－A攻击的小鼠肺保护。在注射10^5滴度的18D1 300μl后，所有的小鼠都得到了保护。7只中3只的保护程度为肺中不出现病毒。其余的小鼠中显示仅达实验检测限的痕量病毒(3只/7只)，或略高于该检测限(1只/7只)。对照小鼠的滴度在每克肺$\log_{10}$ 3.70－4.45之间。

结论:

抗体18D1能够预防RSV－A对BALB/c小鼠的肺感染，证明了其强预防效力。

实施例10：单克隆抗体5C2对小鼠RSV－A感染的预防效果

材料和方法

RSV－A阴性血清的自然小鼠鼻内(i.n.)转移接受抗RSV－A ELISA滴度调至10^4的5C2制备液50μl。对照小鼠平行接受抗BB ELISA滴度调至10^4的抗BB血清。

次日，所有小鼠用含10^5 $TCID_{50}$ RSV－A的病毒悬液50μl鼻内(i.n.)感染。5天后处死动物用于肺中病毒测定。

结果

如图8B中所示，所有用10^4滴度的5C2处理的小鼠的肺均被保护。7只中只有一只有病毒痕迹。对照小鼠的病毒滴度在每克肺$\log_{10}$ 3.70到4.70间。

结论

5C2抗体能够预防BALB/c小鼠的RSV－A肺感染，证明了其强预防效力。

实施例11：Pepscan: 覆盖G2Na的aa130－230序列并以一个氨基酸互相重叠的94个八肽的多重合成实例

按Geysen等，美国国家科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci)，1984，81，3998－4002描述的MULTIPIN™技术准备一个平行合成96个八肽的“PEPSCAN”板(2个对照肽+94个覆盖RSV－A蛋白 G 130－230序列的肽)。

这些肽在ELISA微滴定板的互补96“针”(8x12)末端固体支持物上合成，将在该板中直接进行单克隆或多克隆(血清)抗体的筛选。

·针和孔的定位系统

使用下列编号系统:

A1(1)位 = A号板，1行(共12行)1列(ELISA中的H1位)

A2(1)位 = A号板，2行，1列(ELISA中的H2位)

A1(1)：对照肽#1：PLAQGGGG

A2(1)：对照肽#2：PLAQGGGG

A3(1)：八肽#1：TVKTKNTT

A4(1)：八肽#2：VKTKNTTT

等等

A12(8)：八肽#94：KEVPTTKP。

·合成

该合成相应于脱保护、洗涤和偶联的多个循环，直到获得目的肽序列。在合成结束时，将肽N－乙酰化，再将侧链脱保护。

用于在针上合成的氨基酸是用基团Fmoc(9-芴基甲氧羰基)和下列侧链保护基团保护的：叔丁基醚(tBu)用于丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸，叔丁基酯(OtBu)用于天冬氨酸和谷氨酸，叔丁氧羰基(Boc)用于赖氨酸，组氨酸和色氨酸，2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基(Pmc)用于精氨酸，三苯甲基(Trt)用于半胱氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。酸功能团的活化用溶于DMF中的二异丙基碳二亚胺(DIC)和1-羟基苯并三唑(HOBt)进行。

·Fmoc脱保护和洗涤：在室温搅拌下，将针板浸入在含200ml 20%哌啶DMF溶液(40/160ml)的浴槽中达20分钟。然后从浴槽中取出这些针。将这些针在纸巾上拍打除去多余的溶剂。在200ml DMF中于室温搅拌下洗针。将这些针在纸巾上拍打，并完全浸入甲醇溶中2分钟，无搅拌。然后将这些针浸入在200ml甲醇中(3个浴，每个2分钟，200ml/浴)。将板干燥30分钟。

·Fmoc-氨基酸的偶联：在能够偶联之前Fmoc-氨基酸要经过一个活化步骤。偶联步骤的持续时间对于100mM的浓度、1.5当量HOBt和1.2当量DIC来说为2小时。有软件可以计算偶联步骤所需的反应物的量。在按氨基酸单字代码字母顺序排列的试管中进行称重。在天平外的一张纸巾上填充试管，然后称重直到获得接近称量纸上所指示的重量。该重量与理论值相比不应少0.2mg，也不应多出0.9mg。

·偶联步骤：将针轻轻地放入各孔中。小心地关闭盒子，在2小时的偶联过程中(氨基酸浓度为100mM)放在通风厨中。每天可以进行3次这样的2小时偶联。

·偶联后针堆的处理：将针从含有偶联溶液的板中取出，搅拌下用200ml甲醇洗涤5分钟。将针堆在纸巾上拍打并凉干2分钟。将针置于200ml DMF中，并在搅拌下洗涤5分钟，然后再进行接下来的脱保护循环。常规洗板，如上所述在最后的偶联后进行裂解Fmoc基团的步骤。

·末端氨基的乙酰化：将针头在含150μl以下反应混合物的板孔中保温：DMF/乙酸酐/三乙胺50/5/1(v/v/v)。将这些针封闭在一个盒子中，室温下达90分钟。这些针然后在200ml甲醇中洗涤15分钟，然后干燥15

分钟。

· 侧链的脱保护：将针在200ml TFA/茴香醚/乙二硫醇190/5/5ml的混合物中室温浸泡2.5小时，除去侧链的保护基团。该脱保护步骤后，将针从酸溶液中取出。盒子用甲醇清洗一次，然后充入甲醇，针再在其中浸泡10分钟。然后将针在纸巾上拍打，然后在200ml甲醇/水/乙酸(100/100/1ml)混合物中浸泡1小时，再在纸巾上拍打。将这些针放在干燥器中真空过夜。

实施例12：ELISA

将带有针的滴定板在饱和缓冲液(PBS, Tween 0.1%, 明胶1%)中37℃饱和1小时，在PBS中洗涤10分钟，搅拌下于4℃与预稀释的待分析血清保温过夜。然后用PBS洗板4次，每次10分钟，在室温下与过氧化物酶标记的第二抗体(1/5000的比例稀释的)保温1小时。用PBS洗涤4次后，加入底物TMB。加入硫酸终止反应。

用Pepscan B方法分析抗BBG2Na鼠血清产生的数据总结在图9中。

图9A和9B显示抗G2Na分子4个区域(黑体的残基代表在Ac/Ag识别中起重要作用的氨基酸)的抗BBG2Na小鼠血清的反应性：

- 第一区位于150 - 159残基间，其序列为QRQNKPPNKP。该区域包含于肽G5a(144 - 159)中，并相应于单克隆抗体5C2的反应活性区；
- 第二区位于176 - 189残基间，其序列为CSNNPTCWAICKPI。这是一个位于肽G1ΔCa(174 - 187)位置的区域，并相应于单克隆抗18D1和5D3的反应活性；
- 第3区位于194 - 207残基间，其序列为PGKKTTTKPTKKPT。该序列相应于肽G9(194 - 204)水平的反应活性，该反应活性已在产生抗BBG2Na的单克隆抗体中得到证实；
- 第4区跨越从155残基到176残基的较宽区域，看来它是各种反应性的总体结果。这些反应活性中覆盖G2Na分子高疏水区的一个(G11a)相应于单克隆抗体5B7(用侯选疫苗BBG2Na免疫BALB/c小鼠后获得)的识别区域，其Pepscan B示于下面的图10中。

该单克隆抗体识别序列FEVFNFVP(165－172)。

上述四个反应活性的总和另外已通过用对每个反应活性进行的不同ELISA对抗BBG2Na血清的测定得以证实。表I显示抗BBG2Na血清很好地代表了“抗－G4a、G5aCys、G9aCys和G11a”活性。

表I：用抗BBG2Na血清ref. BE－02的log_{10}表示的抗G4a、G5aCys、G9aCys和G11△Ca滴度

滴度(log_{10})	BE－02
G2Na	5.9
KLH－G4a	4.7
KLH－G9aCys	5.0
KLH－G5aCys	3.8
P40－G11△Ca	3.5

结论：

用Pepscan技术对抗BBG2Na血清的研究表明，用BBG2Na免疫小鼠产生了抗4个表位的抗体，这4个表位分别位于150－159、176－189、194－207和155－176区。从而利用该技术证实了164－176区(G11△Ca)的重要性。

另外，这些结果与关于抗BBG2Na血清与肽G4a、G5aCys、G9aCys和G11△Ca反应活性的ELISA数据完全一致。

序列表

SEQ ID No.1的信号　　G1Δ Ca

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：14个氨基酸，42个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：肽

```
     174     176                         182             186 187
N - Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Ser Lys - C
5'- AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC AGC AAA - 3'
```

SEQ ID No.2的信号　　G1'Δ Ca

序列类型：氨基酸

序列长度：14个氨基酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：肽

```
    174     176                         182             186 187
N - Ser Ile Asp Ser Asn Asn Pro Thr Orn Trp Ala Ile Ser Lys - C
```

SEQ ID No.3的信号　　G1Δ Cb

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：14个氨基酸，42个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：肽

```
    174     176                         182             186 187
N - Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Ser Lys - C
5'- AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC AGC AAA - 3'
```

SEQ ID No.4的信号　　G1'ΔCb

序列类型：氨基酸

序列长度：14个氨基酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：肽

```
     174     176                         182             186 187
N - Ser Ile Asp Gly Asn Asn Gln Leu Orn Lys Ser Ile Ser Lys - C
```

SEQ ID No.5的信号　　G5a

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：16个氨基酸，48个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：肽

```
     144                                                         159
N - Ser Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro - C
5'- AGC AAA CCG ACC ACC AAA CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG - 5'
```

SEQ ID No.6的信号　　G5b

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：16个氨基酸，48个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：肽

```
     144                                                         159
N - Asn Lys Pro Ser Thr Lys Ser Arg Ser Lys Asn Pro Pro Lys Lys Pro - C
5'- AAC AAA CCG AGC ACC AAA AGC CGT AGC AAA AAC CCG CCG AAA AAA CCG - 3'
```

SEQ ID No.7的信号　　G7a

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：33个氨基酸，99个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：蛋白质

```
    158                                                                 173
N - Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile
5'-AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC
176                         182             186             190
Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro - C
TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG - 3'
```

SEQ ID No.8的信号　　G7b

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：33个氨基酸，99个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：蛋白质

```
    158                                                 173         176
N - Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly
5'- AAA CCG AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC
                182             186             190
Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro - C
AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG - 3'
```

SEQ ID No.9的信号　　G8a

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：43个氨基酸，129个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：蛋白质

```
    158                                                 173         176
N - Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser
5'- AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC
                182             186                                 197
Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr
AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC AAA AAA CCG GGC AAA AAA ACC
    200
Thr Thr - C
ACG ACC - 3'
```

SEQ ID No.10的信号　　G8b

序列类型: 氨基酸和核苷酸

序列长度: 43个氨基酸，129个核苷酸

链数: 单链

构型: 线性

分子类型: 蛋白质

```
    158                                                 173         176
N - Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly
5'- AAA CCG AAA GAT GAT TAC CAC TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC
178             182             186                                         198
Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys Thr Ile Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro
AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA ACC ATC CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG AAA CCG
    200
Thr Ile - C
ACC ATC - 3'
```

SEQ ID No. 11的信号　　G9a

序列类型: 氨基酸和核苷酸

序列长度: 15个氨基酸，45个核苷酸

链数: 单链

构型: 线性

分子类型: 蛋白质

```
    190                                                         204
N - Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys - C
5'- CCG AAC AAA AAA CCG GGC AAA AAA ACC ACG ACC AAA CCG ACC AAA -3'
```

SEQ ID No. 12的信号　　G9b

序列类型: 氨基酸和核苷酸

序列长度: 15个氨基酸，45个核苷酸

链数: 单链

构型: 线性

分子类型: 蛋白质

```
    190                                                         204
N - Pro Ser Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Ile Lys Pro Thr Asn - C
5'- CCG AGC AAC AAA CCG AAA AAG AAA CCG ACC ATC AAA CCG ACC AAC - 3'
```

SEQ ID No. 13的信号　　G11a

序列类型: 氨基酸和核苷酸

序列长度: 13个氨基酸, 39个核苷酸

链数: 单链

构型: 线性

分子类型: 蛋白质

```
    164                                                    176
N - His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys -C
5'- CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG TGC AGC ATC TGC -3'
```

SEQ ID No. 14的信号　　G11ΔCa

序列类型: 氨基酸和核苷酸

序列长度: 13个氨基酸, 39个核苷酸

链数: 单链

构型: 线性

分子类型: 蛋白质

```
    164                                                    176
N - His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Ser Ser Ile Cys -C
5'- CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC GTG CCG AGC AGC ATC TGC -3'
```

SEQ ID No. 15的信号　　G2a1

序列类型: 氨基酸和核苷酸

序列长度: 101个氨基酸, 303个核苷酸

链数: 单链

构型: 线性

分子类型: 蛋白质

```
    130
N - Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys
5'- ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA
150
Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe
CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAC AAA CCG AAC AAC GAT TTC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC
171     173         176                 182           186                 191
Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Ser
GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AGC
```

```
192          195          198
Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys
AAC AAA CCG AAG AAA AAA CCG ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA ACC ACC AAA

213                                                                  230
Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C
AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCG - 3'
```

SEQ ID No. 16的信号　　G2a2

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：101个氨基酸，303个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：蛋白质

```
    130
N - Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys
5'- ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA
150                          157         160 161     163
Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Lys Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe
CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAA AAA CCG AAA GAC GAT TAC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC
171     173         176                     182             186
Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn
GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AAC
192
Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys
AAA AAA CCG GGC AAA AAA ACC ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA ACC ACC AAA
213                                                                  230
Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C
AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCG - 3'
```

SEQ ID No. 17的信号　　G2a3

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：101个氨基酸，303个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：蛋白质

```
    130
N - Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser Lys Pro Thr Thr Lys
5'- ACC GTG AAA ACC AAA AAC ACC ACG ACC ACC CAG ACC CAG CCG AGC AAA CCG ACC ACC AAA
150                          157         160 161     163
Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Lys Lys Pro Lys Asp Asp Tyr His Phe Glu Val Phe Asn Phe
CAG CGT CAG AAC AAA CCG CCG AAA AAA CCG AAA GAC GAT TAC CAT TTC GAA GTG TTC AAC TTC
```

```
171     173         176                     182             186                 191
Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Ser
GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA CGT ATC CCG AGC
192         195         198
Asn Lys Pro Lys Lys Lys Pro Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys
AAC AAA CCG AAG AAA AAA CCG ACG ACC AAA CCG ACC AAA AAA CCG ACC TTC AAA ACC ACC AAA
213                                                                 230
Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys Pro - C
AAA GAT CAT AAA CCG CAG ACC ACC AAA CCG AAA GAA GTG CCG ACC ACC AAA CCG - 3'
```

SEQ ID No.18的信号　　G9v

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：15个氨基酸，45个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：蛋白质

```
    190                                                             204
N - Thr Glu Arg Ala Pro Ser Arg Ala Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys - C
5'- ACG GAA AGA GCA CCA AGC AGA GCA CCA ACA ATC ACC CTC AAA AAG - 3'
```

SEQ ID No.19的信号　　G5v

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：16个氨基酸，48个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：肽

```
    144                                                             159
N - Arg Lys Pro Pro Ile Asn Pro Ser Gly Ser Ile Pro Pro Glu Asn His - C
5'- AGA AAA CCA CCA ATT AAT CCA TCA GGA AGC ATC CCA CCA GAA AAC CAT - 3'
```

SEQ ID No.20的信号　　G4A

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：17个氨基酸，42个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：肽

```
    171     173         176                         182             186 187
N - Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys - C
5'- GTG CCG TGC AGC ATC TGC AGC AAC AAC CCG ACC TGC TGG GCG ATC TGC AAA - 3'
```

SEQ ID No.21的信号　　G4B

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：17个氨基酸，42个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：肽

```
    171     173         176                         182             186 187
N - Val Pro Cys Ser Ile Cys Gly Asn Asn Gln Leu Cys Lys Ser Ile Cys Lys - C
5' -GTG CCC TGC AGC ATC TGC GGC AAC AAC CAG CTG TGC AAA AGC ATC TGC AAA - 3'
```

SEQ ID No.22的信号　　G4V

序列类型：氨基酸和核苷酸

序列长度：17个氨基酸，51个核苷酸

链数：单链

构型：线性

分子类型：肽

```
    171     173         176                         182             186 187
N - Val Pro Cys Ser Thr Cys Glu Gly Asn Leu Ala Cys Leu Ser Leu Cys His - C
5'- GTT CCC TGC AGT ACA TGT GAA GGT AAT CTT GCA TGC TTA TCA CTC TGC CAT - 3'
```

说 明 书 附 图

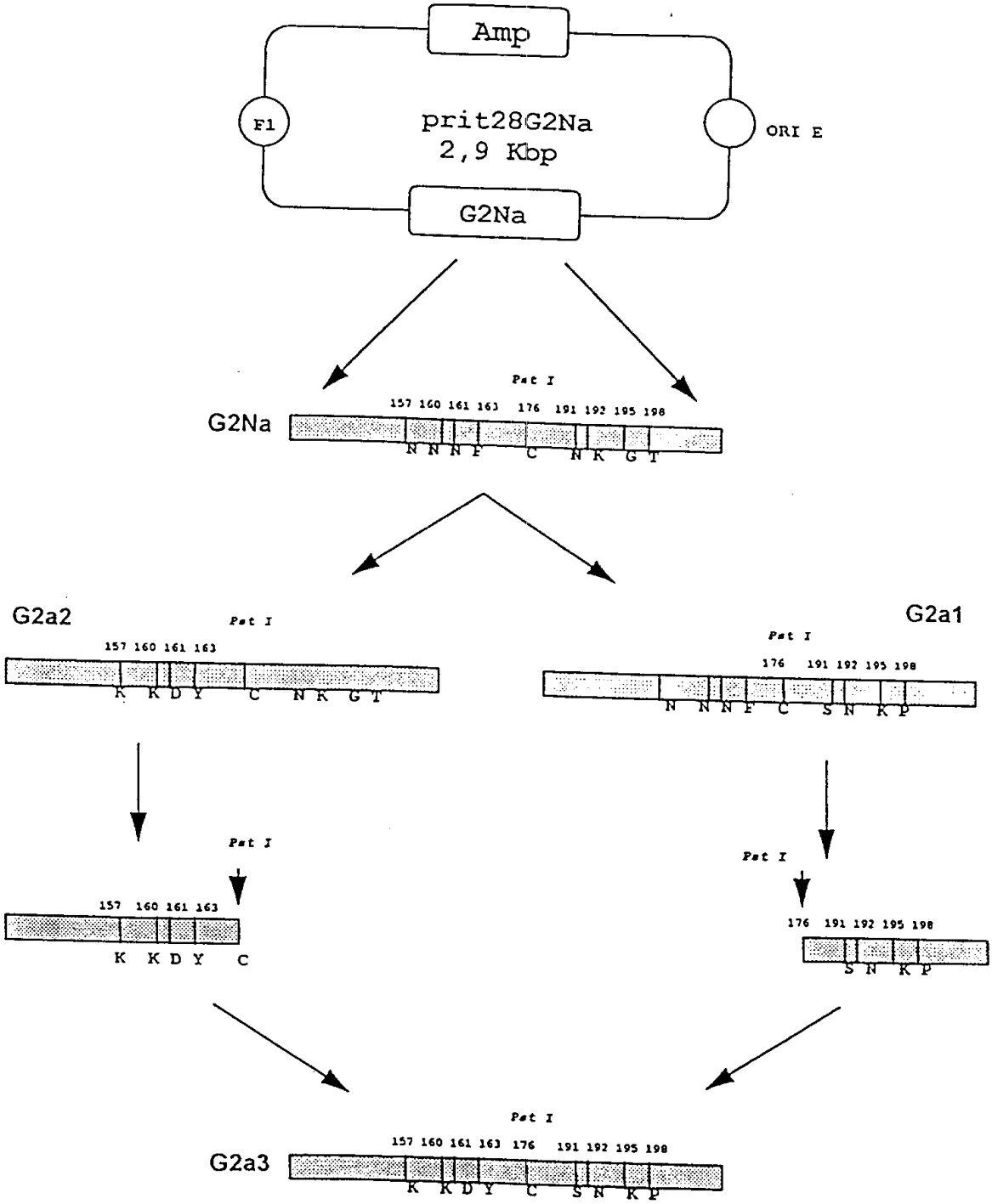

Amp
F1
prit28G2Na
2,9 Kbp
ORI E
G2Na
Pst I
157 160 161 163 176 191 192 195 198
N N N F C N K G T
G2a2
Pst I
157 160 161 163
K K D Y C N K G T
G2a1
Pst I
176 191 192 195 198
N N N F C S N K P
Pst I
157 160 161 163
K K D Y C
Pst I
176 191 192 195 198
S N K P
G2a3
Pst I
157 160 161 163 176 191 192 195 198
K K D Y C S N K P

图 1

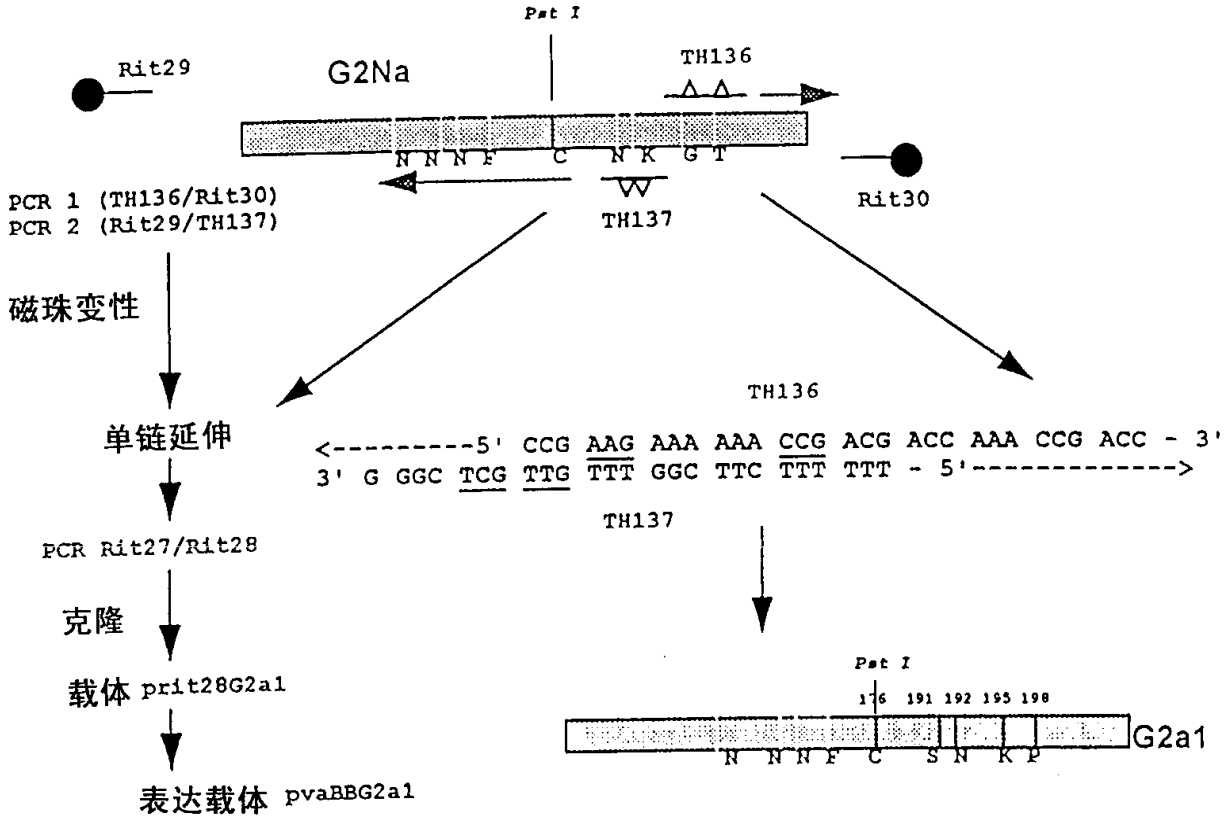

Pst I
Rit29
G2Na
TH136
N N N F C N K G T
Rit30
PCR 1 (TH136/Rit30)
PCR 2 (Rit29/TH137)
TH137
磁珠变性
单链延伸
TH136
<---------5' CCG AAG AAA AAA CCG ACG ACC AAA CCG ACC - 3'
3' G GGC TCG TTG TTT GGC TTC TTT TTT - 5'---------->
TH137
PCR Rit27/Rit28
克隆
载体 prit28G2a1
表达载体 pvaBBG2a1
Pst I
176 191 192 195 198
N N N F C S N K P
G2a1

图 2

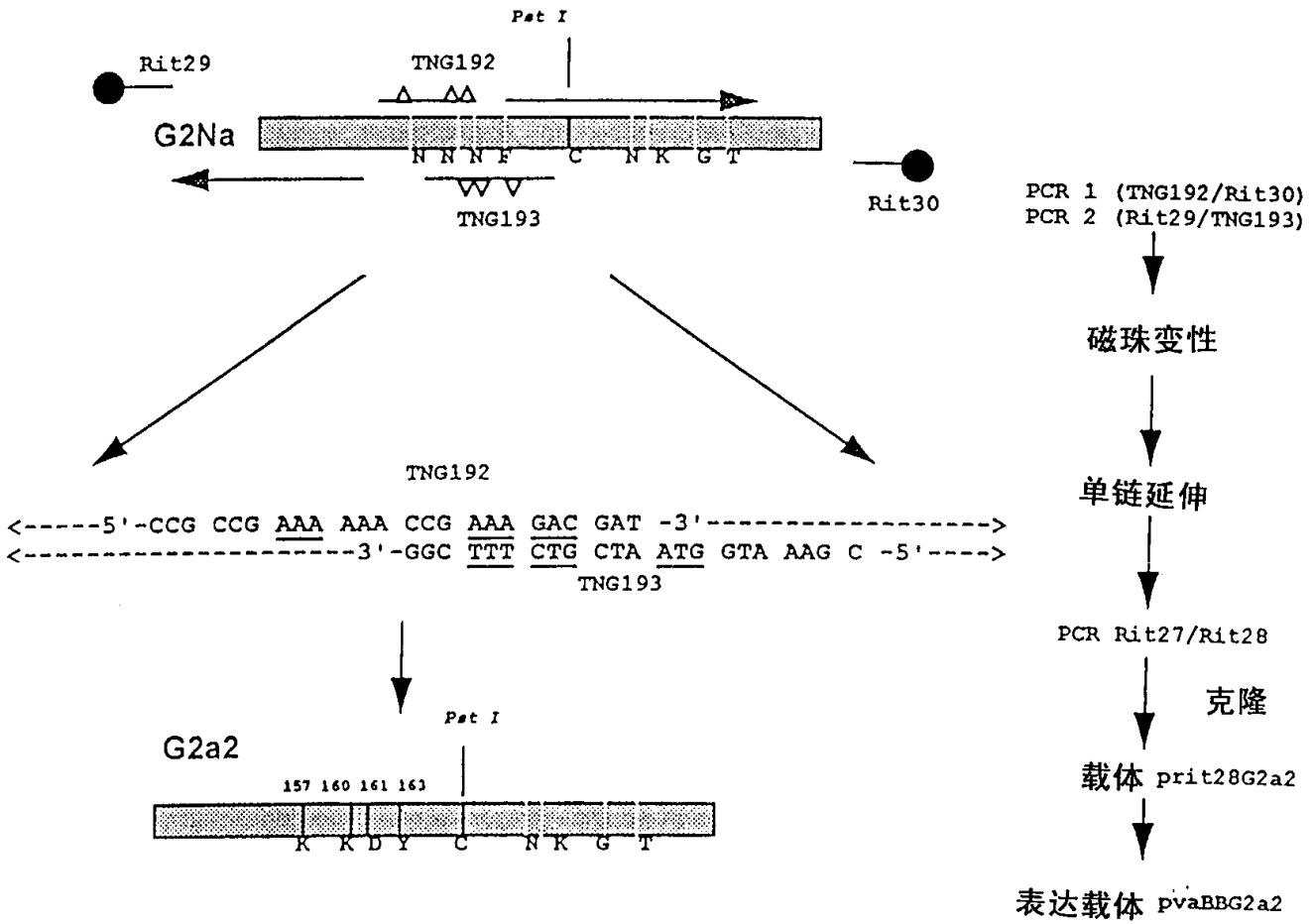

Pst I
Rit29
TNG192
G2Na
N N N F C N K G T
Rit30
TNG193
PCR 1 (TNG192/Rit30)
PCR 2 (Rit29/TNG193)
磁珠变性
单链延伸
TNG192
<-----5'-CCG CCG AAA AAA CCG AAA GAC GAT -3'------------------>
<----------------------3'-GGC TTT CTG CTA ATG GTA AAG C -5'---->
TNG193
PCR Rit27/Rit28
克隆
Pst I
G2a2
157 160 161 163
K K D Y C N K G T
载体 prit28G2a2
表达载体 pvaBBG2a2

图 2 （续）

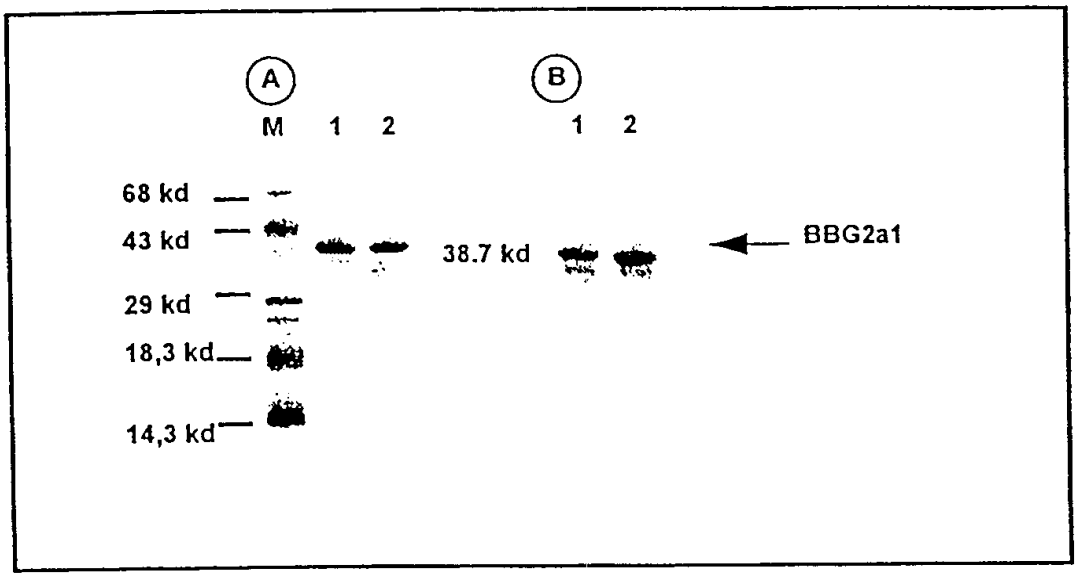


图 3

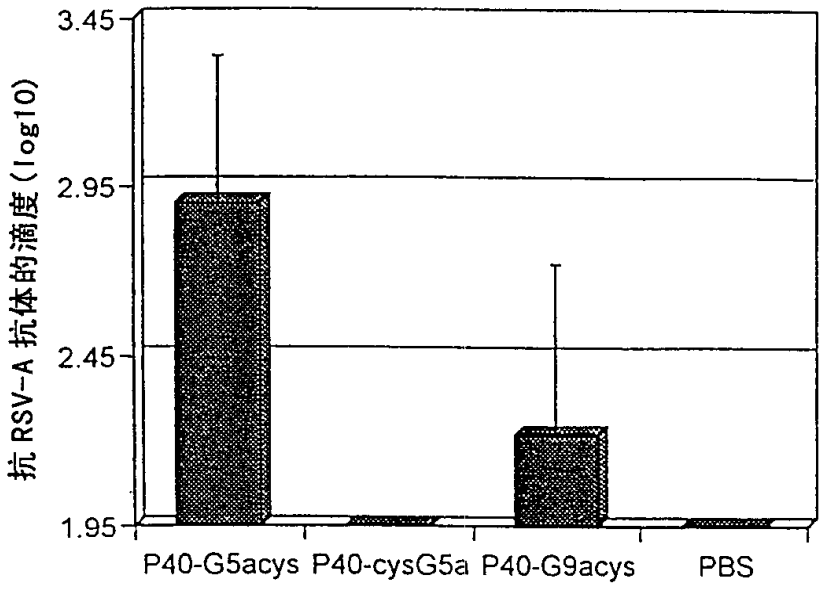

抗 RSV-A 抗体的滴度 (log10)
3.45
2.95
2.45
1.95
P40-G5acys
P40-cysG5a
P40-G9acys
PBS

图 4A

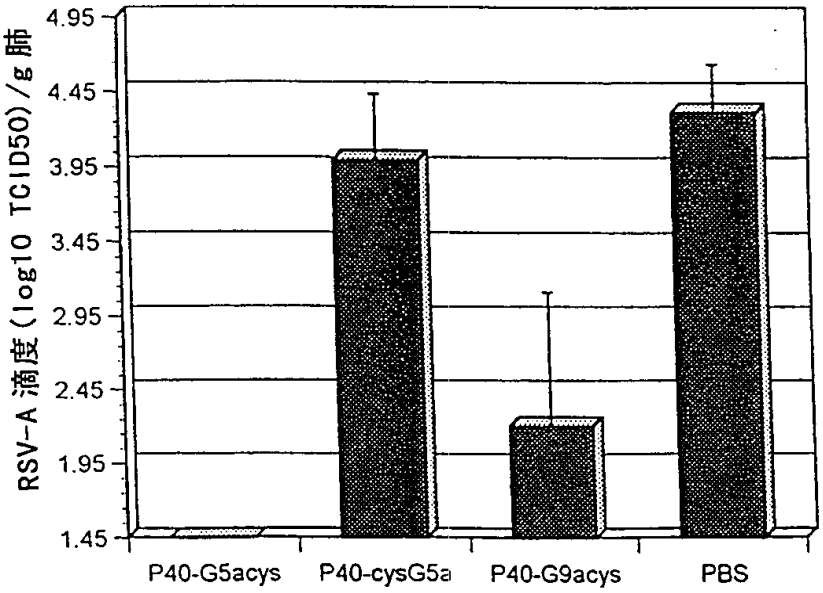

RSV-A 滴度 (log10 TCID50)/g 肺
4.95
4.45
3.95
3.45
2.95
2.45
1.95
1.45
P40-G5acys
P40-cysG5a
P40-G9acys
PBS

图 4B

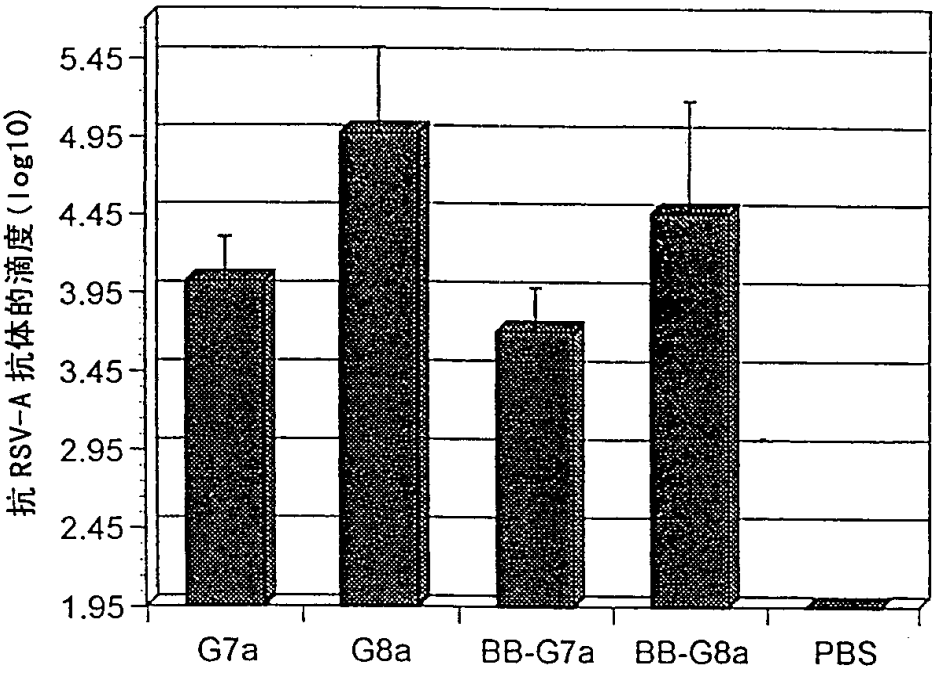

抗 RSV-A 抗体的滴度(log10)
5.45
4.95
4.45
3.95
3.45
2.95
2.45
1.95
G7a
G8a
BB-G7a
BB-G8a
PBS

图 5A

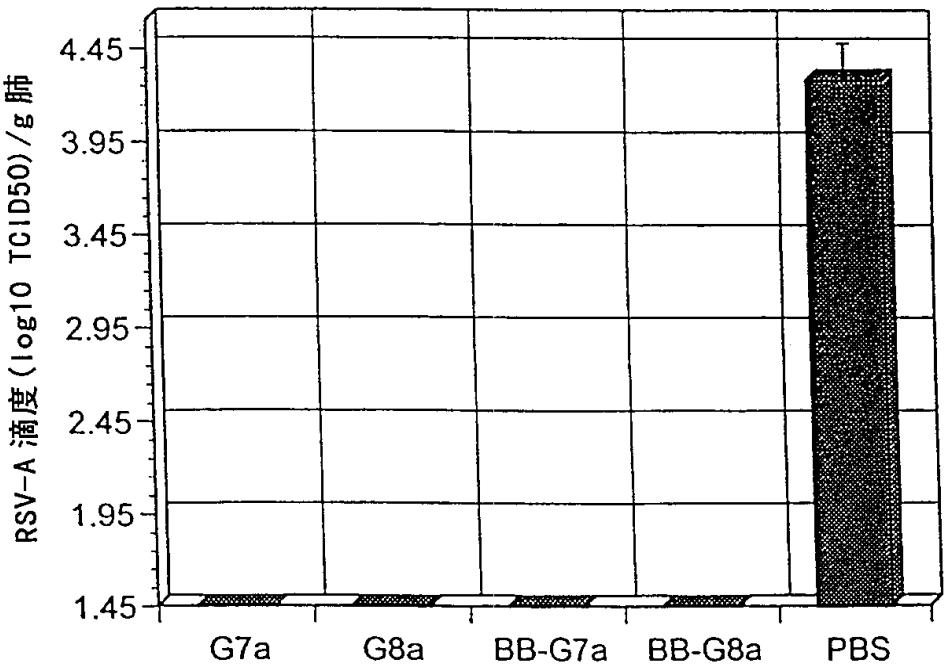

RSV-A 滴度(log10 TCID50)/g 肺
4.45
3.95
3.45
2.95
2.45
1.95
1.45
G7a
G8a
BB-G7a
BB-G8a
PBS

图 5B

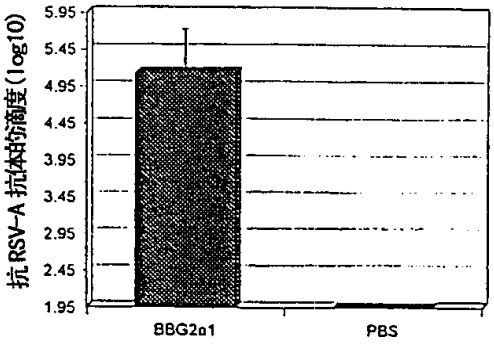


图 6A

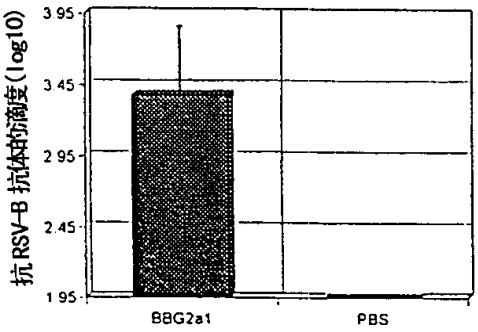


图 6B

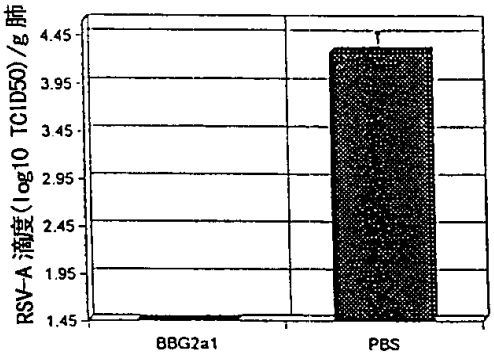


图 6C

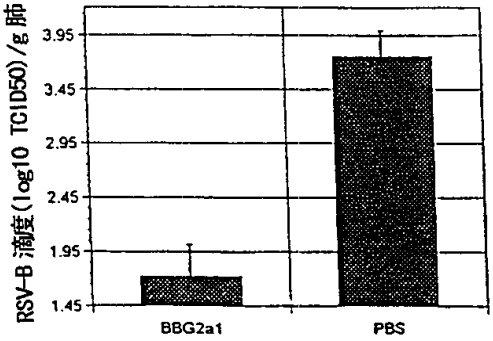


图 6D

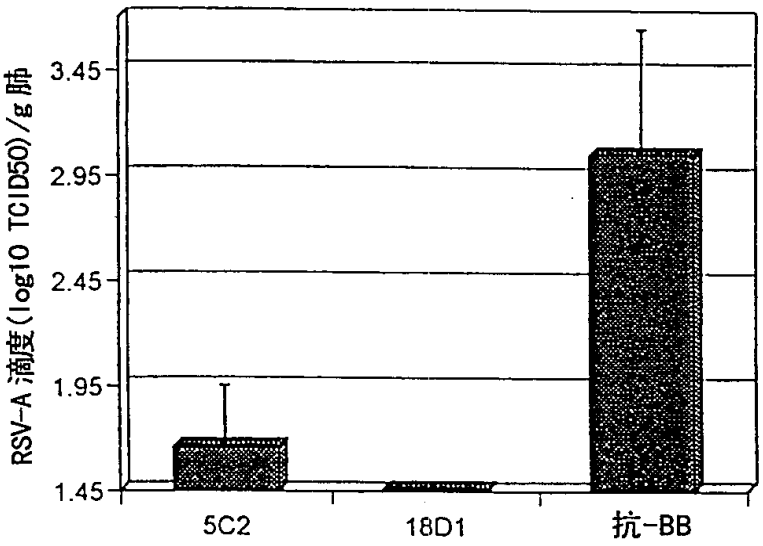


图 7

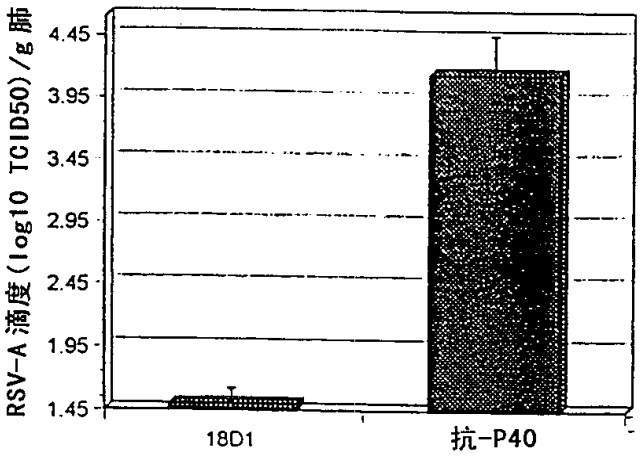

RSV-A 滴度(log10 TCID50)/g 肺
4.45
3.95
3.45
2.95
2.45
1.95
1.45
18D1
抗-P40

图 8A

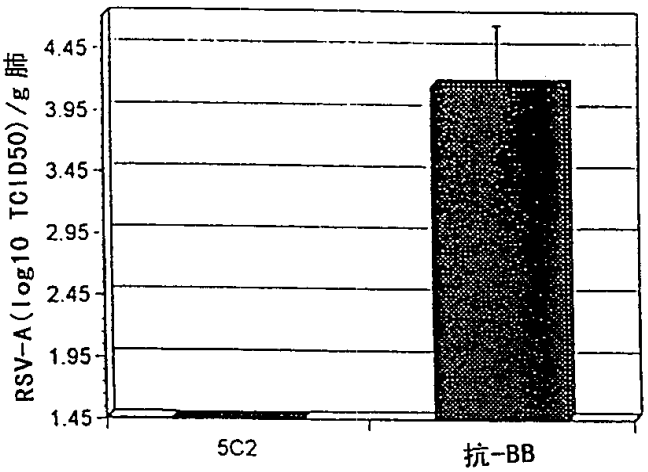

RSV-A(log10 TCID50)/g 肺
4.45
3.95
3.45
2.95
2.45
1.95
1.45
5C2
抗-BB

图 8B

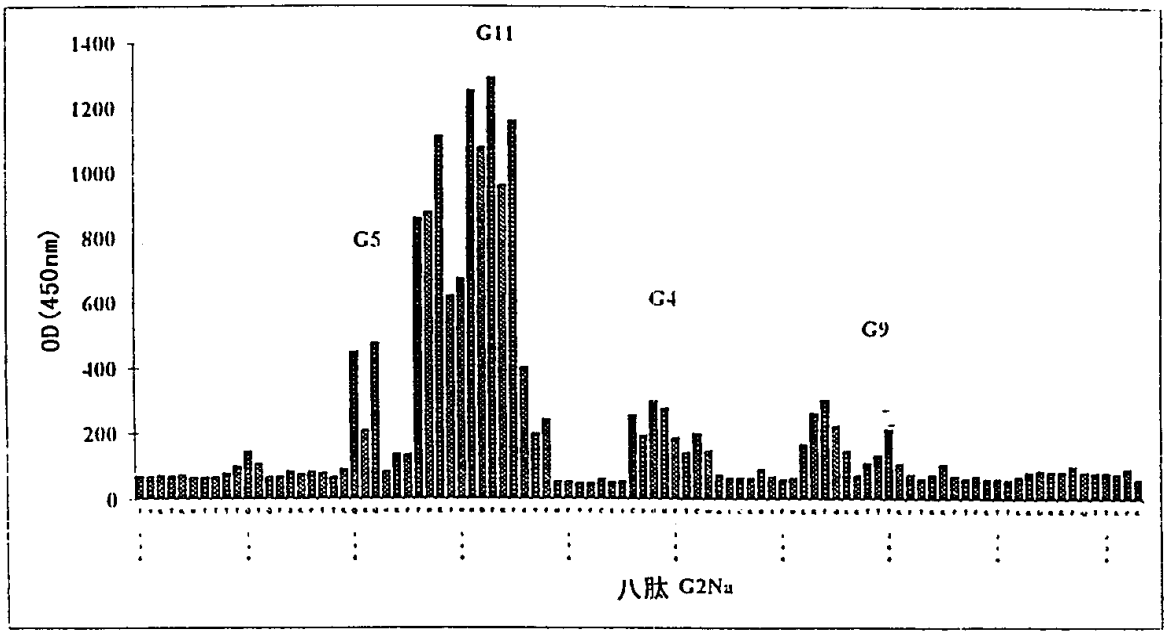

G11
G5
G4
G9
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
OD(450nm)
八肽 G2Na

图 9A

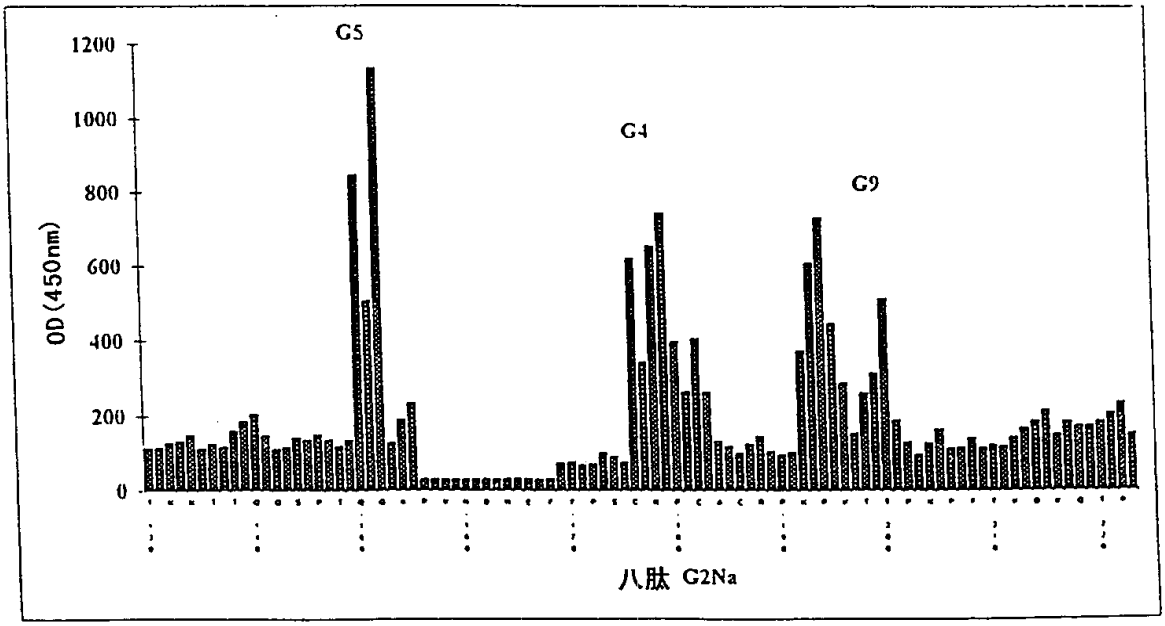

G5
G4
G9
1200
1000
800
600
400
200
0
OD(450nm)
八肽 G2Na

图 9B

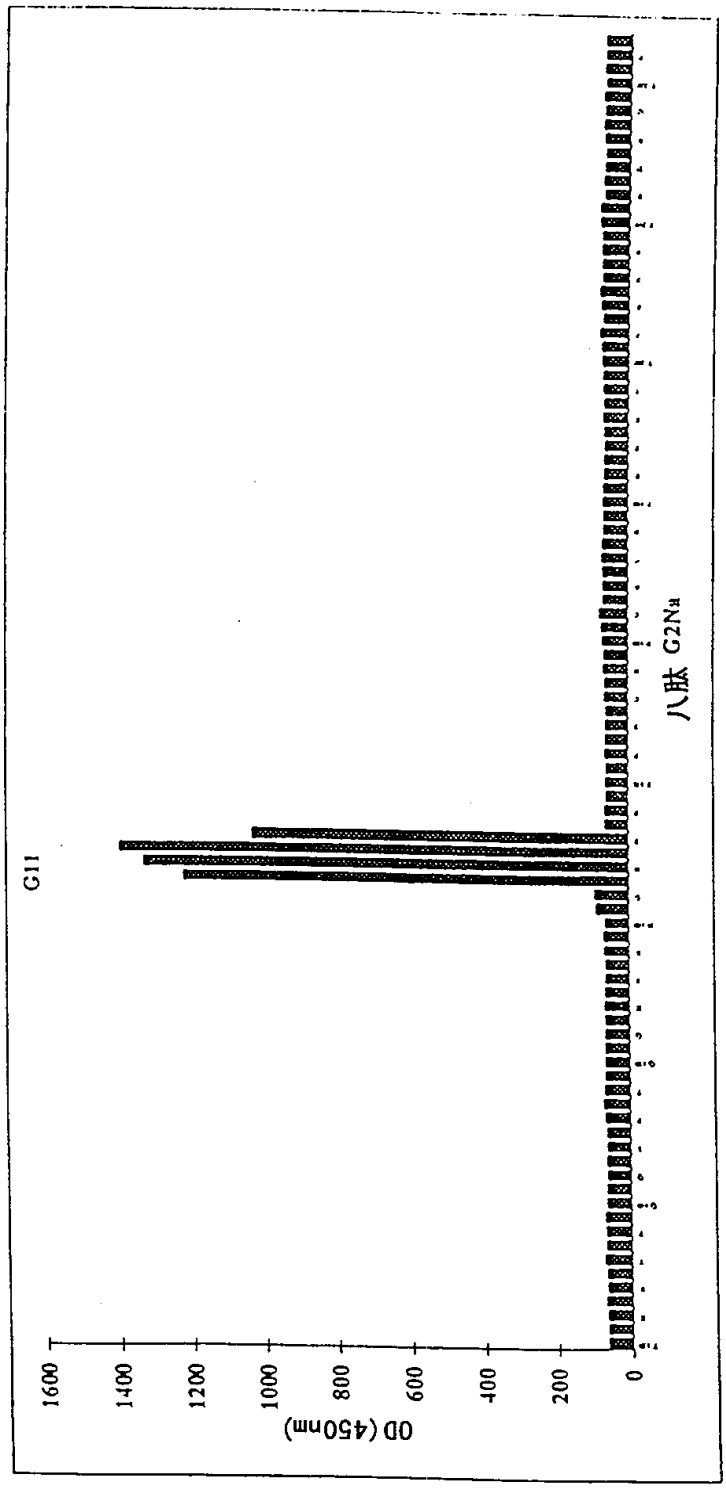


图 10