

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>

C07K 14/02



[12] 发 明 专 利 说 明 书

C07K 19/00 A61K 39/385

A61K 39/295 A61K 39/29

[21] ZL 专利号 99815261.7

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1179973C

[22] 申请日 1999. 12. 3 [21] 申请号 99815261.7  
[30] 优先权  
[32] 1998. 12. 4 [33] US [31] 60/110,911  
[86] 国际申请 PCT/US1999/028755 1999. 12. 3  
[87] 国际公布 WO2000/032625 英 2000. 6. 8  
[85] 进入国家阶段日期 2001. 6. 29  
[71] 专利权人 拜奥根有限公司  
地址 美国马萨诸塞  
[72] 发明人 K·默里  
审查员 吴文英

[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 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 39 页 附图 2 页

[54] 发明名称 含有通过肽配体连接的多个免疫原性成分的 HBV 核心抗原颗粒

[57] 摘要

本发明涉及特征在于多种免疫原特异性的乙型肝炎病毒(“HBV”)核心抗原颗粒。更具体而言,本发明涉及含有通过配体与之交联的免疫原、表位或其他相关结构的 HBV 核心抗原颗粒,这些配体是可与 HBV 核心蛋白选择性结合的 HBV 衣壳结合肽。这些颗粒可用作不同免疫原性表位包括 HBV 衣壳结合肽的输送系统,它们也通过阻断 HBV 核心蛋白与 HBV 表面蛋白之间的相互作用有利地抑制并干扰 HBV 病毒装配。不同免疫原的混合物、HBV 衣壳结合肽配体或两者可与同一 HBV 核心颗粒交联。产生的这些多成分或多价 HBV 核心颗粒可有利地用于治疗 and 预防疫苗和组合物中,以及诊断组合物和使用它们的方法中。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种具有多种免疫原特异性的 HBV 核心抗原颗粒, 该颗粒含有至少一种衣壳结合免疫原, 该衣壳结合免疫原含有至少一种 HBV 衣壳结合肽成分和至少一种免疫原性成分。

2. 根据权利要求 1 的 HBV 核心抗原颗粒, 其中所述衣壳结合免疫原通过所述 HBV 衣壳结合肽成分的氨基或羧基末端与该颗粒连接, 或者所述衣壳结合免疫原通过交联剂与所述颗粒交联。

3. 根据权利要求 1 的 HBV 核心抗原颗粒, 其中所述免疫原性成分与 HBV 衣壳结合肽成分直接连接或通过连接序列连接。

4. 根据权利要求 1 的 HBV 核心抗原颗粒, 其中所述免疫原性成分含有一个或多个选自免疫原性表位和抗原表位的表位。

5. 根据权利要求 1 的 HBV 核心抗原颗粒, 其中所述免疫原性成分选自抗原、变应原、抗原决定簇、蛋白质、糖蛋白、抗体、抗体片段、肽、模拟抗原或抗原决定簇的肽模拟位、多肽、糖肽、糖类、寡糖、多糖、寡核苷酸和多核苷酸。

6. 根据权利要求 1 的 HBV 核心抗原颗粒, 其中所述免疫原性成分针对于或来源于选自病毒、寄生虫、分枝杆菌、细菌、杆菌、真菌、原生动物、植物、噬菌体、动物细胞和植物细胞的因子。

7. 根据权利要求 6 的 HBV 核心抗原颗粒, 其中所述病毒选自反转录病毒、疱疹病毒、正粘病毒、副粘病毒、嗜肝 DNA 病毒、黄病毒、细小核糖核酸病毒、乳多空病毒、腺病毒、杆状病毒、汉坦病毒、细小病毒、肠道病毒、鼻病毒、肿瘤病毒、DNA 病毒、RNA 病毒、披膜病毒、弹状病毒和痘病毒。

8. 根据权利要求 7 的 HBV 核心抗原颗粒, 其中所述病毒选自 1 型人类免疫缺陷病毒、2 型人类免疫缺陷病毒、T 细胞白血病毒、1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒、EB 病毒、A 型流感病毒、B 型流感病毒、C 型流感病毒、呼吸道合胞病毒、麻疹样病毒、流行性腮腺炎病毒、副流感病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎

炎病毒、甲型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、黄热病毒、登革热病毒、蜱传脑炎病毒、肿瘤病毒、脊髓灰质炎病毒、人乳头瘤病毒、风疹病毒、狂犬病病毒和痘苗病毒。

9. 根据权利要求6的HBV核心抗原颗粒，其中所述免疫原性成分针对于或来源于芽孢杆菌属、肠细菌、梭状芽胞杆菌属、李斯特菌属、分支杆菌属、假单胞菌属、葡萄球菌属、真细菌、支原体、衣原体、螺旋体、奈瑟球菌属或沙门氏菌属。

10. 根据权利要求6的HBV核心抗原颗粒，其中所述免疫原性成分针对白喉、破伤风、非细胞性百日咳、嗜血杆菌流感、脊髓灰质炎、麻疹、流行性腮腺炎、风疹、水痘、乙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、肺炎球菌性肺炎、黄热病、疟疾、伤寒、脑膜炎球菌性脑炎或霍乱。

11. 根据权利要求5的HBV核心抗原颗粒，其中所述免疫原性成分选自动物变应原、昆虫变应原、植物变应原、空气变应原和吸入变应原。

12. 根据权利要求1的HBV核心抗原颗粒，其中该HBV核心抗原是一种组装成颗粒形式的HBV核心抗原融合蛋白。

13. 根据权利要求12的HBV核心抗原颗粒，其中HBV核心抗原融合蛋白含有免疫原性表位或抗原表位。

14. 根据权利要求12的HBV核心抗原颗粒，其中HBV核心抗原融合蛋白含有截短的HBV核心抗原。

15. 根据权利要求12的HBV核心抗原颗粒，其中HBV核心抗原颗粒含有融合蛋白，该融合蛋白含有HBV表面抗原。

16. 根据权利要求15的HBV核心抗原颗粒，其中HBV核心抗原融合蛋白含有选自HBV表面抗原的pre-S1区、HBV表面抗原的pre-S2区、HBV表面抗原的免疫显性a区的序列。

17. 根据权利要求1的HBV核心抗原颗粒，其中该HBV核心抗原颗粒含有全长HBV核心抗原多肽。

18. 根据权利要求1的HBV核心抗原颗粒，其中所述HBV衣壳结合肽成分选自：SLLGRMKGA、GSLLGRMKGA、DGSLLGRMKGAA、ADGSLLGRMKGAAG、SLLGRMKG( $\beta$ -A)C、RSLGRMKGA、

**HRSLLGRMKGA 、 ALLGRMKG 、 MHSLLGRMKGA 、  
RSLLGRMKGA( $\beta$ -A)C、MHSLLGRMKGAG( $\beta$ -A)GC 及其含有一至  
四个保守氨基酸替换的类似物。**

**19. 一种疫苗，其含有预防有效量的根据权利要求 1 的 HBV 核心抗原颗粒和药物可接受的载体。**

**20. 一种药用组合物，其含有治疗有效量的根据权利要求 1 的 HBV 核心抗原颗粒和药物可接受的载体。**

**21. 根据权利要求 1 的 HBV 核心抗原颗粒，其中该衣壳结合免疫原含有一种诊断标记或化学标记。**

## 含有通过肽配体连接的多个免疫原性成分的 HBV 核心抗原颗粒

### 发明技术领域

本发明涉及特征在于多种免疫原特异性的乙型肝炎病毒 (“HBV”) 核心抗原颗粒。更具体而言, 本发明涉及含有通过配体与之交联的免疫原、表位或其他相关结构的 HBV 核心抗原颗粒, 这些配体是可与 HBV 核心蛋白选择性结合的 HBV 衣壳结合肽。这些颗粒可用作不同免疫原性表位 (包括 HBV 衣壳结合肽) 的输送系统, 它们也通过阻断 HBV 核心蛋白与 HBV 表面蛋白之间的相互作用有利地抑制并干扰 HBV 病毒装配。不同免疫原的混合物、HBV 衣壳结合肽配体或两者可与同一 HBV 核心颗粒交联。产生的这些多成分或多价 HBV 核心颗粒可有利地用于治疗 and 预防疫苗和组合物中, 以及诊断组合物和使用它们的方法中。

### 发明背景

临床免疫治疗方案的前沿包括患者对传染性病原体和其他威胁健康的因素的免疫。尽管免疫剂很多, 但接种最多只能引起部分免疫, 这需要经常的重复免疫。对于多种常规单价或多价疫苗是这样。甚至在�些疫苗中, 能引起对多种免疫原免疫的单剂接种体的数量是有限的。此外, 病原体中的抗原性变异可限制常规疫苗的效能。

由于这些障碍, 所以工作集中于提高免疫系统对特定免疫原应答的方法学。为此, 通过将免疫原与乙型肝炎病毒 (“HBV”) 核心颗粒 (也称为核壳) 连接产生了免疫原性偶联物, 试图通过操作 HBV 核心抗原的依赖 T 细胞和不依赖 T 细胞的决定簇, 提高连接的免疫原的免疫原性。参见, 例如, 美国专利 4, 818, 527 和 R. Ulrich 等人, “乙型肝炎病毒的核心颗粒作为外源表位的载体”, 病毒研究进展 (Adv. Virus. Res.), 50, 141-82 (1998)。目的表位免疫原性的提高也可通过杂合病毒颗粒形

成蛋白实现，该蛋白至少包含一部分天然发生的病毒颗粒形成蛋白，例如 HBV 表面抗原，和一个或多个目的表位位点。参见美国专利 5, 965, 140。从这些工作中可以看出，HBV 的蛋白质已用作为免疫系统递呈目的免疫原的平台。

乙型肝炎病毒是一种血液传播的病毒，含有小的、部分双链的 DNA 基因组，带有四种大量重叠的开放阅读框，由含有 HBV 核心蛋白（“HBcAg”）的内部核壳、病毒聚合酶和病毒 DNA 组成，周围是含有 HBV 表面抗原（“HBsAg”）的包膜。病毒包膜含有三种不同的但是相关的表面抗原蛋白：长（L）、中（M）和短（S）表面抗原蛋白，它们共有一种普通的羧基端区，但具有不同的氨基端，这是由于在连续开放阅读框内不同位点处使用不同的起始三联体引起的。

长多肽（L 多肽）由 pre-S1、pre-S2 和 S 区组成。它是完整阅读框的产物，包含位于氨基端的 108 个氨基酸（或 199 个，取决于病毒亚型）的 pre-S1 结构域，随后是 55 个氨基酸的 pre-S2 结构域，和 226 个氨基酸的短多肽（S 多肽）区。中等长度多肽（M 多肽）在其氨基端具有 pre-S2 结构域，随后是 S 区，而最丰富的形式—S 多肽只含 S 区。pre-S 区被认为在病毒装配和附着于宿主细胞中都起重要作用。病毒中 HBsAg 的 S 形式多于 M 和 L 形式，并存在糖基化和非糖基化两种形式[V. Bruss 和 D. Ganem, “包膜蛋白在乙型肝炎病毒装配中的作用”，美国国家科学院院报（Proc. Natl. Acad. Sci. USA），88, 1059-63（1991）；V. Bruss 等人, “乙型肝炎病毒大包膜蛋白的跨膜拓扑学的翻译后改变”，EMBO J., 13, 2273-79（1994）；A.R. Neurath 等人, “乙型肝炎病毒上宿主细胞受体结合位点的鉴定和化学合成”，细胞（Cell），46, 429-36（1986）；K. Ueda 等人, “乙型肝炎病毒的三种包膜蛋白：形成丹氏粒所需的大 S、中 S 和主要 S 蛋白”，病毒学杂志（J. Virol.），65, 3521-29（1991）]。核心的外表面与包膜的内表面之间的特异相互作用可能引导病毒的正确装配并稳定产生的颗粒。

HBV 核心蛋白能在大肠杆菌中高效表达[M. Pasek 等人, “乙型肝炎病毒基因及其在大肠杆菌中的表达”，自然（Nature），282, 575-79

(1979) ]，在其中它装配为两种大小的二十面体外壳，分别含有 180 个 (T=3) 或 240 个 (T=4) 亚基[R.A. Crowther 等人，“经电子显微术确定的乙型肝炎病毒核心颗粒的三维结构”，细胞，77，943-50 (1994) ]。这些亚基聚簇为二聚体，每个二聚体形成突出于外壳表面的刺突。利用电子显微术和图像处理，最近以 7.4Å 的分辨率由 6000 个以上单个颗粒的图像制作了 T=4 外壳图谱[B. Bottcher 等人，“用电子显微术确定乙型肝炎病毒核心蛋白折叠”，自然，386，88-91 (1997) ]。这显示了多肽链的折叠，其主要是 $\alpha$ -螺旋，不同于以前的病毒衣壳。每个二聚体刺突由一对长 $\alpha$ -螺旋发夹构成，其中每一个来自于二聚体中的每个单体[Bottcher 等人 (1997); J.F. Conway 等人，“用电子显微术显示乙型肝炎病毒中的 4-螺旋束”，自然，386，91-94 (1997) ]。在折叠上添加氨基酸序列的编号方案[Bottcher 等人 (1997) ]使 HBV 核心蛋白的主要免疫优势区置于氨基酸 78-82 周围[J. Salfeld 等人，“乙型肝炎病毒核心抗原和 E 抗原的抗原决定簇和功能域”，病毒学杂志，63，798-808 (1989); M. Sallberg 等人，“乙型肝炎核心抗原单克隆抗体的线性结合位点的表征”，医学病毒学杂志 (J. Med. Virol.)，33，248-52 (1991) ]，位于刺突的顶端。

抑制 HBV 病毒装配的物质包括可与 HBV 核心抗原结合，从而阻断 HBV 核心蛋白与 HBV 表面蛋白之间相互作用的物质。PCT 专利申请 WO98/18818 和 M.R. Dyson 和 K. Murray，“参与复杂蛋白质装配的相互作用的肽抑制剂的选择：乙型肝炎病毒核心与表面抗原的结合”，美国国家科学院院报，92，2194-98 (1995) 中描述了一些这样的 HBV 衣壳结合肽。一种这样的衣壳结合肽 (MHR SLL GRM KGA) 已与 HBV 的核心抗原交联 (B.Bottcher 等，“阻断乙型肝炎病毒装配的肽：由低温显微镜、突变和转染分析 “EMBO J.,17,6839-45(1998) )。

从下面的公开内容中可以看出，HBV 衣壳结合肽可有利地用作构建 HBV 核心抗原颗粒的配体，其特征在于引起对一种或多种免疫原的增强的免疫应答的能力。

### 发明内容

本发明通过提供可引起对一种或多种成分免疫原的增强的免疫原

性的 HBV 核心抗原颗粒解决了上述问题。除了通过遗传操作编码序列或通过多肽合成可连接于或插入 HBV 核心抗原多肽的免疫原性结构域或表位外，这些多成分或多价 HBV 核心抗原颗粒还包含通过配体一可与 HBV 核心抗原颗粒选择性结合的肽一与之交联的免疫原、表位或其他有关结构。这些颗粒可用作多种免疫原性表位（包括 HBV 衣壳结合肽）的输送系统，其本身通过阻断 HBV 核心蛋白和 HBV 表面蛋白之间的相互作用抑制并干扰 HBV 病毒装配。产生的多成分或多价 HBV 核心颗粒可有利地用于治疗 and 预防性疫苗和组合物中，以及诊断组合物和使用它们的方法中。

本发明可使不同免疫原的混合物、HBV 衣壳结合肽配体或此两者与同一 HBV 核心颗粒交联。产物是为 T 细胞的有效刺激物并且是免疫学多价的一种颗粒。因此，一种抗原递呈细胞能刺激具有不同特异性的多种 B 细胞克隆的增殖。

### 附图简述

图 1 显示含有多种衣壳结合免疫原的 HBV 核心抗原颗粒的结构。“衣壳结合免疫原”包含至少一种 HBV 衣壳结合肽成分和至少一种免疫原性成分。每种衣壳结合免疫原通过 HBV 衣壳结合肽与 HBV 核心抗原颗粒连接。

图 2 是概括了多种 HBV 核心抗原融合蛋白的表格，这些蛋白也可以作为 HBV 核心抗原颗粒，多种免疫原可以通过 HBV 衣壳结合肽与之连接。

### 发明详述

为了更全面地了解此处所述的本发明，下面给出了详细描述。

根据本发明的一个实施方案，一种以上的免疫原的混合物和一种或多种 HBV 衣壳结合肽配体可以与同一 HBV 核心颗粒交联。此外，同一免疫原的多个拷贝可以与一种 HBV 衣壳结合肽连接，并与 HBV 核心颗粒上的不同位置交联。根据本发明的多成分或多价 HBV 核心抗原颗

粒特别可用于诱导抗所有成分免疫原的抗体。

HBV 衣壳结合肽连接免疫原与 HBV 核心抗原颗粒的用途可增强免疫原递呈，而不会通过变性、构象破坏或其他去稳定影响破坏免疫原的免疫原性或稳定性。例如，HBV 衣壳结合肽连接体可降低成分免疫原彼此干扰致使功能物质丢失的危险。结果是，HBV 核心抗原颗粒引发对成分免疫原的增强的免疫应答。因此，如果单剂施用每种免疫原，则可能用比需要的更少的接种次数和/或更少的接种体达到希望的治疗或预防作用。

免疫原通过 HBV 衣壳结合肽与 HBV 核心抗原颗粒的连接也可允许递呈大小、构象和性质不同的免疫原。因此，本发明允许在一种疫苗或组合物中包含可用于在特定个体中引发广谱免疫或治疗的免疫原组合。

### 免疫原

可与 HBV 衣壳结合肽连接，从而掺入 HBV 核心抗原颗粒中的免疫原包括含有一种或多种免疫、免疫原性或抗原表位的任何分子。这些表位在自然中可以是线性、构象性、单个或混合的。

更具体而言，免疫原可选自能引发免疫应答的任何物质。这些物质包括但不限于：抗原、抗原决定簇、蛋白质、糖蛋白、抗体、抗体片段、肽、模拟抗原或抗原决定簇的肽模拟位（mimotopes）、多肽、糖肽、糖类、寡糖、多糖、寡核苷酸和多核苷酸。免疫原也可以是变应原、毒素或内毒素。

这些物质也包括针对于或来源于不同病原体如病毒、寄生虫、细菌、真菌、噬菌体、原生动物和植物的物质。这些病毒包括：反转录病毒，包括 1 型和 2 型人类免疫缺陷病毒和 T 细胞白血病病毒；疱疹病毒，如 1 型和 2 型单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒和 EB 病毒；正粘病毒，如 A 型流感病毒、B 型流感病毒和 C 型流感病毒；副粘病毒，如呼吸道合胞病毒、麻疹样病毒、流行性腮腺炎病毒和副流感病毒；嗜肝 DNA 病毒，如乙型肝炎病毒；黄病毒，如丙型肝炎病毒、

甲型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、黄热病毒、登革热病毒和蜱传脑炎病毒；细小核糖核酸病毒，如肠道病毒、鼻病毒、口蹄疫病毒和脊髓灰质炎病毒；披膜病毒，如风疹病毒；弹状病毒，如狂犬病病毒；腺病毒、埃博拉病毒；杆状病毒；汉坦病毒；乳多空病毒，如人乳头瘤病毒；细小病毒；DNA 病毒；RNA 病毒；RNA 肿瘤病毒、如肿瘤病毒；和痘病毒，如痘苗病毒。另外，免疫原也可以是针对于或来源于芽孢杆菌属（*Bacillus*）、肠细菌（*Enterobacteria*）、梭状芽孢杆菌属（*Clostridium*）、李斯特菌属（*Listeria*）、分支杆菌属（*Mycoplasma*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、真细菌、支原体、衣原体、螺旋体、奈瑟球菌属（*Neisseria*）或沙门氏菌属（*Salmonella*）的免疫原。免疫原也可选自人类免疫缺陷病毒的下列表位：GELDRWEKI（gag）；ELDKWAS（gp40）；IGPGRAFYT TKN（V3 环）；ELDKWA（gp 41）和 DRFYKTLRA（gp 41）。

可与 HBV 衣壳结合肽连接，从而掺入 HBV 核心抗原颗粒中的糖蛋白包括，例如，抗体、来源于或类似于动物细胞的表面成分或如引起脑膜炎的病毒或细菌的糖肽，或这些部分的片段。

本领域技术人员应当理解，免疫原的大小不应大到其功能基团可干扰 HBV 衣壳结合肽连接体。

### HBV 核心抗原蛋白

由于其颗粒性质，HBV 核心抗原蛋白组成了一种可向免疫系统递呈类似或不同类型的多种免疫原的有利平台。根据本发明，利用 HBV 衣壳结合肽作为配体将希望的免疫原与 HBV 核心颗粒连接进一步突出了这一优点。这些颗粒含有 90 或 120 个配体结合位点—衣壳刺突，每一个均由 HBV 核心抗原二聚体组成（见图 1）。因此，多个免疫原可通过 HBV 衣壳结合肽作为配体与 HBV 核心抗原颗粒物理连接。产生的颗粒能诱导对所有成分免疫原的免疫应答。

HBV 核心抗原多肽的重组编码序列在合适的微生物、动物或植物系统中表达后，可形成 HBV 核心抗原颗粒。参见，例如，Sambrook 等

人,《分子克隆: 实验室指南》,第2版,冷泉港出版社,冷泉港,纽约(1989)。欲表达的多肽可包含全长 HBV 核心抗原序列,或其突变、衍生物、截短或部分,它们保留有在表达系统的细胞中以颗粒形式装配的能力。生产这些 HBV 核心抗原颗粒的重组方法在本领域中众所周知。参见,例如,美国专利 4,710,463。

此外,也可用化学合成法生产 HBV 核心抗原多肽。根据 HBV 抗原多肽的氨基酸序列,可用固相合成法进行化学合成[R.B. Merrifield, Fed. Proced., 21, 412(1964); R.B. Merrifield, 生物化学(Biochemistry), 3, 1385-90(1964)和 D.R. Milich 等人,免疫学杂志(J. Immunol.), 139, 1223-31(1987)]。

本领域技术人员应当理解,由于突变或变异的 HBV 核心抗原序列可影响与结合或配体肽的反应,所以本发明同样适用于自然变体或通过操作编码序列或其他方法引入 HBV 核心抗原亚基或相应结合或配体肽中的突变。

#### 对于肽结合至关重要的核心蛋白残基的突变

用来测定核心蛋白折叠的方法已应用于利用低温显微术在 SLLGRMKGA——一种可抑制与 L-HBsAg 结合的 HBV 衣壳结合肽——上定位结合位点。该方法显示在 T=3 和 T=4 外壳中与刺突顶端结合的肽[B. Bottcher 等人,“阻断乙型肝炎病毒装配的肽: 通过低温显微术、诱变和转染的分析”, EMBO J., 17, 6839-45(1998)]。图像分析显示,肽结合位点位于刺突顶端,在为多肽折叠提出的编号方案[Bottcher 等人(1997)]中对应于氨基酸 78-82 区域中的残基。有两个酸性残基(glu77 和 asp78)接近核心蛋白顶端,选择的结合肽含有两个保守的碱性残基。发现蛋白质中任一个酸性残基突变为丙氨酸,大大降低了肽对改变的核心外壳的亲合力,由此证明了这些带相反电荷的残基在结合反应中的重要性。将天冬氨酸 78 改变为丙氨酸使亲合力降低 160 倍,将谷氨酸 77 改变为丙氨酸使亲合力降低 1000 倍。这表明 HBV 核心抗原蛋白上的这两个或任一个残基可为 HBV 衣壳结合肽提供至少部分结合位点。

这些结果也说明了刺突顶端区域中 HBV 核心抗原的氨基酸序列对于配体结合的重要性。本领域技术人员应当理解, 来源于某些 HBV 株的 HBV 核心抗原可能需要突变以使特定配体-免疫原肽有效结合, 或需要选择和改变配体的变体以有效结合特异的 HBV 核心抗原变体。

### HBV 核心抗原融合蛋白

根据本发明的一个实施方案, 可通过 HBV 衣壳结合肽与免疫原连接的 HBV 核心抗原颗粒可以通过遗传融合技术展示一种或多种免疫原的 HBV 核心抗原颗粒。在一种这样的技术中, 将有关编码序列掺入携带 HBV 核心抗原多肽序列的质粒或其他载体中的适当位置中。

为提高 HBV 核心抗原多肽的表达水平而与大肠杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的融合证明, 抗原的前两个氨基酸替换为 11 个氨基酸的序列(8 个来自于 $\beta$ -半乳糖苷酶的氨基端, 另外 3 个残基来源于基因融合中引入的连接序列的翻译)对于产物易于回收、抗原性或形态学没有不利影响[S. Stahl 等人, “乙型肝炎病毒核心抗原。在大肠杆菌中的合成及在诊断中的应用”, 美国国家科学院院报, 79, 1606-10 (1982); B.J. Cohen 和 J.E. Richmond, “在大肠杆菌中合成的乙型肝炎核心抗原的电子显微镜观察”, 自然, 296, 677-78 (1982)]。

在本发明中有用的 HBV 核心抗原融合蛋白可以如 S.J. Stahl 和 K. Murray, “与乙型肝炎病毒核心抗原的肽融合体的免疫原性”, 美国国家科学院院报, 86, 6283-87 (1989) 所述产生。此外, 也用大量病毒编码序列举例说明了多肽序列与 HBV 核心抗原主要片段的融合而产生高免疫原性颗粒, 如图 2 所示。包括具有高免疫原性的颗粒产物, 它是通过痘苗病毒载体表达通过七肽连接序列与 HBV 核心抗原多肽氨基端之前的前核序列的六个氨基酸融合的 VP1 肽(残基 142-160)而产生的[B.E. Clarke 等人, “与乙型肝炎核心蛋白融合后肽表位的免疫原性提高”, 自然, 330, 381-84 (1987)]。其他有用的 HBV 核心抗原融合蛋白参见 Ulrich 等人 (1998)。

一系列其他融合蛋白的特征在于 HBV 核心抗原多肽羧基端的富含

精氨酸区域被替换为其他的编码序列。包含 HBV 表面抗原的免疫显性 a 区（残基 111-165）、pre-S1 和 pre-S2 表位和人类免疫缺陷病毒（HIV）包膜蛋白的不同片段的肽与 HBV 核心抗原多肽的残基 144 相连。全都在大肠杆菌中高效表达，产生显示与 HBV 核心抗原本身基本相同的形态学的颗粒产物[Stahl 和 Murray, 1989]。产物显示 HBV 核心抗原的抗原反应性，类似于在残基 144 处截短的 HBV 核心抗原多肽制剂，其检测也显示 HBV e 抗原反应性，而全长 HBV 核心抗原显示极低的这种活性。具有来源于 HBV 表面抗原的残基 111-156 或 111-165 的融合蛋白不显示明显的 HBV 表面抗原反应性，此结果与该主要表位的构象依赖性或者序列被埋于颗粒内的可能性一致。然而，对融合蛋白的免疫原性反应反映了其不同的成分表位。

对 HBV 表面抗原的免疫应答是复杂的，除了位于 L-HBsAg 的 pre-S1 和 pre-S2 区和主要免疫显性 a 区中的表位外，许多可变亚型决定簇已分配给 HBV 表面抗原的短或 S 多肽的其他区[G.L. Le Bouvier, “澳抗的异源性”，传染病杂志（J. Infect. Dis.），123, 671-75（1971）；W.H. Bancroft 等人，“乙型肝炎抗原其他抗原决定簇的检测”，免疫学杂志，109, 842-48（1972）；A.-M. Courouce-Pauty P.V.和 Holland, “研讨会 A2 总结：HBsAg 及其亚型”，《病毒性肝炎》，G.N. Vyas, S.N. Cohen 和 R. Schmid 编（Philadelphia, USA: Franklin Institute Press），649-54（1978）]。对从不同亚型血清中克隆的 HBV DNA 测定的 HBV 表面抗原编码序列显示相应的蛋白质序列不同。然而，明显重要的残基的特异单突变不能实现从一种血清学亚型（y）到另一种（d）的转变，但其他单突变诱导由同一分子显示的 y 和 d 反应性和免疫原性的逐渐改变[P.G. Ashton-Rickardt 和 K. Murray, “改变乙型肝炎病毒表面抗原免疫学亚型的突变和抗原与免疫原测定之间的差异”，医学病毒学杂志，29, 204-14（1989）]。在构象敏感的免疫显性 a 区内或接近其进行有关突变，全都处于在与上述 HBV 核心抗原融合中使用的 HBV 核心抗原的片段内。

突变对诱导的抗体的亚型特异性的影响提示融合蛋白也可提供一种改变对目的表位应答的特异性的方法，特别是当其依赖于构象时。因

此在 HBcS<sub>111-156</sub> 中的该残基处进行模拟天然逃避突变体的甘氨酸<sub>145</sub> 精氨酸的突变和向其他带正电或负电的残基（赖氨酸和谷氨酸）的突变，以进行体液和细胞免疫应答的比较研究[A.L. Shiau 和 K. Murray, “与病毒核心抗原融合的乙型肝炎表面抗原的突变表位诱导可与天然表面抗原反应的抗体”，医学病毒学杂志 51, 159-66 (1997)]。全部都在大肠杆菌中高效表达，产生预期的显示强 HBV 核心抗原性的颗粒产物，全都可在兔中诱导高效价的抗 HBV 核心抗原的抗体。

象其亲本蛋白 HBcS<sub>111-156</sub> 一样，3 个残基 145 突变体在固相放射免疫测定 (AUSRIA; Abbott Laboratories) 中或溶液中的抗体沉淀测定中显示与 HBV 表面抗原的抗体有最小的相互作用。然而，在变性条件下酰胺凝胶电泳后，在免疫印迹实验中它们都显示与兔抗 HBV 表面血清有强反应[A.L. Shiau, “乙型肝炎病毒核心抗原及其衍生物的免疫学方面”，博士论文，爱丁堡大学，UK (1993)]。当在包被有 HBV 核心抗原的抗体的固相上捕获时，高浓度的亲本和突变蛋白也与 HBV 表面抗原的抗体有弱阳性反应，这可能是由于颗粒的某些破坏使抗 HBsAg 分子可以接近[Shiau 和 Murray, 1997]。

用被免疫的兔检测对融合蛋白的 T 细胞反应，以及抗体产生。用免疫后不同时间采取的外周血单核细胞 (PBMC) 进行基于由接触 HBV 核心抗原引起的 [<sup>3</sup>H]-胸苷掺入的增殖测定，或用融合蛋白进行免疫。在所有情况中均发现有强反应，融合蛋白显示比 HBV 核心抗原更高的刺激指数，而如预期的，HBV 表面抗原是一种较差的刺激物。用与 [<sup>125</sup>I]-HBV 表面抗原的双抗体放射免疫沉淀测定[C.J. Burrell 等人, “用双抗体放射免疫测定法快速检测乙型肝炎表面抗原”，医学病毒学杂志, 3, 1926 (1978)]测定血样中的抗-HBs, 显示预期的与 HBcS<sub>111-156</sub> 的阳性反应。精氨酸突变体在该测定中也产生阳性反应，尽管略低于其亲本分子，谷氨酸突变体获得弱反应，但赖氨酸突变体均未获得。因此，结果表明，含有精氨酸 145 突变体的融合蛋白（称为 HBcS<sub>145K</sub>）是一种强 T 细胞刺激物，可诱导具有广泛反应特异性的抗体。

进行 HBV 表面抗原多肽不同部分包括残基 145 突变体与 HBV 核

心抗原多肽的另一组融合，以研究不同其他成分的总体大小和数量和位置对产物免疫原性的影响[Shiau (1993)]。图 2 显示这些构建体，与其他融合一样，全都产生显示 HBV 核心抗原形态学的颗粒产物，尽管在 HBV 核心抗原氨基端与 HBcS<sub>111-156</sub> 片段的融合不能令人满意，产生可形成不溶性聚集物的产物。

这组产物，象先前与 HBcS<sub>111-156</sub> 片段的产物一样，在固相上或溶液中显示与 HBV 表面抗原的抗体有较弱的或没有反应，但当被固相上的 HBV 核心抗原的抗体捕获时，它们显示类似的与 HBV 表面抗原的抗体反应性，并且略高（约 2 倍），这些融合体除 HBcS<sub>111-156</sub> 之外还带有 pre-S1 和 pre-S2 片段。对于全部融合蛋白，淋巴细胞增殖抑制的刺激指数均较高，包含 pre-S 片段及天然或突变 HBcS<sub>111-156</sub> 序列的融合蛋白产生更强的反应。在双抗体放射免疫沉淀测定中，在 HBc<sub>144</sub> 和 HBcS<sub>111-156</sub> 序列之间含有 pre-S1 和 pre-S2 序列（野生型或突变体）产生比缺乏 pre-S 片段的融合体更高的抗体水平，但在 HBc<sub>144</sub> 和 pre-S 序列之间引入第二个 HBcS<sub>111-156</sub> 序列不引起任何反应的再次增强。在脯氨酸<sub>144</sub> 处与 HBV 核心抗原肽结合的最长的这些序列—165 个氨基酸—对融合蛋白的产量或物理性质没有明显的不利影响。

也以部分及多个全长拷贝将丙型肝炎病毒（HCV）的核心蛋白（HCc）与在缬氨酸 149 处截短的 HBV 核心抗原多肽融合[A. Yoshikawa 等人，“与丙型肝炎病毒核心蛋白的部分拷贝嵌合的乙型肝炎病毒核心颗粒”，病毒学杂志，67，6064-70（1993）]。带有 HCc 残基 39-75 的融合显示微不足道的抗原性，但残基 1-91 或 180 个氨基酸的全序列产生阳性反应，而通过短接头添加另外拷贝（可达 4 个）的 1-180 序列可使抗原性几乎算术提高。电子显微镜显示，带有一个拷贝的 HCc 残基 1-91 的融合体形成形态学上相当于 HBV 核心抗原多肽的颗粒，但 3 个全长 HCc 拷贝大大扭曲了这种结构，该产物对蛋白质水解极敏感，但是产生保留有 HBV 核心抗原性的物质。尽管大多数融合蛋白含有 720 个以上的其他氨基酸，但对 HBV 核心抗原类型颗粒的限制似乎较少。

已在关于与 HBcAg 的融合位点对免疫原性的作用的其他研究中使

用了 PreS 序列。Borisova 等人 (1989) 制备融合体, 其中 pre-S1 片段 (残基 20-68, 20-69 或 69-106) 或完整的 pre-S2 与在脯氨酸 144 处截短的 HBV 核心抗原连接, 或插入全长 HBV 核心抗原序列内的该位点。在这些和类似的含有牛白血病病毒 (BLV) 包膜蛋白的残基 56-103 或 HIV 跨膜蛋白 (gp41) 的残基 78-129 的结构中, 与 HBV 核心抗原融合的序列被认为暴露于颗粒表面, 均报道有抗原性和免疫原性, 富含精氨酸的 C 端结构域显然有较低的不利作用。

F. Schodel 等人, “插入乙型肝炎病毒核心颗粒中的异源表位的位置决定其免疫原性”, 病毒学杂志, 6, 106-14 (1992) 研究了当 pre-S1 或 pre-S2 片段在全长 HBV 核心抗原氨基端 (或直接或通过前核序列部分) 或截短的 HBV 核心抗原的羧基端连接时, 融合位置对抗原性的影响和在近交系小鼠中的免疫应答; 另一种结构在 HBV 核心抗原的残基 75 和 83 之间有一个 pre-S1 片段, 并在截短的羧基端处 (脯氨酸 156) 有 pre-S2 片段。

全面分析显示, 通过短前核序列与 HBV 核心抗原氨基端融合的 pre-S1 序列具有抗原性, 但直接与氨基端融合没有, 尽管这两者具有相同的 HBV 核心抗原免疫原性, 通过前核序列融合刺激更强的抗 pre-S1 应答。在截短的 HBV 核心抗原端的 pre-S2 序列有类似程度的抗原性和免疫原性, 但内部融合以替换残基 76-82 (包含主要 HBV 核心抗原表位) 的 pre-S1 序列有比 N 端融合大大提高的抗原性和明显提高的免疫原性。如预期的, 内部融合蛋白中 HBV 核心抗原性和免疫原性大大降低。HBV 核心抗原的内部序列 (残基 78-82) 替换为含有免疫显性 a 表位的 HBV 表面抗原片段也产生显示阳性 HBV 核心抗原性和免疫原性的产物 [G. Borisova 等人, “携带乙型肝炎表面抗原的免疫显性区的杂种乙型肝炎病毒核壳”, 病毒学杂志, 67, 3696-3701 (1993) ]。

作为上述融合蛋白的另一种选择, 或一种补充, 免疫原性成分可通过化学交联连接方法与 HBV 核心抗原连接。

Bottcher 等人 (1997) 提出的 HBV 核心抗原氨基酸序列在物理结构上的重叠有助于解释在或靠近 HBV 核心抗原羧基端融合的序列的低

抗原性，因为这些序列可能埋藏于 HBV 核心抗原颗粒内，而 N 端融合可得益于可弯曲的连接序列，而使免疫原远离刺突底部相对封闭的空间。免疫显性 HBV 核心抗原表位[残基 78-82; Salfeld 等人, (1989)]在刺突顶部的定位表明该位置对 HBV 衣壳结合肽-免疫原的插入或连接有吸引力。原则上，可同时使用所有这些位置来增加特定 HBV 核心抗原颗粒存在的表位的数量和/或多样性。

### 用来连接免疫原与 HBV 核心抗原颗粒的 HBV 衣壳结合肽

如上所述，可以用为 HBV 衣壳结合肽的配体将目的免疫原与 HBV 核心颗粒连接。这些 HBV 衣壳结合肽是分离、纯化的肽。这些 HBV 衣壳结合肽通过阻断 HBV 核心蛋白与 HBV 表面蛋白之间的相互作用而有利地抑制并干扰 HBV 病毒装配。

优选地，HBV 衣壳结合肽包括肽、片段、类似物及其同系物，其长度为约 2~20 个氨基酸。更优选地，肽长度为约 3~15 个氨基酸。这些肽包括下表中列出的肽，及其片段和类似物。

在此使用时，术语“片段”是指比原始肽更短，但保留了基本类似于原始肽的生物活性的氨基酸序列。这种片段至少为 2 个氨基酸长。

在此使用时，术语“类似物”是指肽氨基酸序列的变异，其一般可包括只有 1 个到约 4 个氨基酸改变的类似物。类似物的其他例子包括与此处例举的肽有较少氨基酸变异的肽。特别是，含有保守氨基酸置换—即其侧链相关的氨基酸家族内发生的置换—的肽构成类似物。

遗传编码的氨基酸一般分为 4 个家族：（1）酸性：天冬氨酸、谷氨酸；（2）碱性：赖氨酸、精氨酸、组氨酸；（3）非极性：丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸；和（4）不带电极性：甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸。苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸有时共同归类为芳族氨基酸。对于 HBV 衣壳结合肽，改变一个或多个氨基酸可能是有益的。本领域技术人员可容易地评估这种改变的影响。

术语“同系物”包括在氨基酸水平上共有至少 60% 同一性，优选

地 75%同一性，并与参照肽有基本上类似的生物活性的肽片段。这些优选的百分数反映了较小的肽大小。

有用的 HBV 衣壳结合肽包括基于 Dyson 和 Murray (1995) 公开的肽的 HBV 衣壳结合肽。随机诱变融合噬菌体 B1 中侧翼为肽 LLGRMK 的残基，并在为获得可结合具有提高的亲力的抗原的衍生物的生物淘筛反应中对 HBV 核心抗原重新选择后，合成这些肽。高分辨率电子低温显微镜检证明，这些 HBV 衣壳结合肽在 HBV 核心蛋白外壳的刺突顶端结合。通过在存在或不存在肽的情况下，用含有 HBV 基因组的从头到尾二聚体的复制型质粒转染通透性肝细胞瘤 Hep G2 细胞，检测感染的细胞中这些肽对 HBV 核心抗原与 HBV 表面抗原蛋白之间相互作用的抑制作用。参见 Bottcher 等人 (1998)。

携带 LLGRMK 序列的 HBV 衣壳结合肽以剂量依赖的方式降低了转染肝细胞瘤细胞培养中 HBV 的产量，其相对效率反映肽抑制溶液中 HBV 核心抗原与 L-HBV 表面抗原之间反应的  $IC_{50}$  值。

HBV 衣壳结合肽优选地具有低于约  $10\mu M$ ，优选地低于  $5\mu M$ ，更优选地低于约  $2\mu M$ ，最优选地低于约  $0.5\mu M$  的半数最大浓度 ( $IC_{50}$ )。优选的肽包括但不限于：SLLGRMKG ( $\beta$ -A) C, RSLGRMKGA, HRSLLGRMKGA 和 RSLGRMKGA ( $\beta$ -A) C, 或由其衍生的肽。此外，这种肽可以是肽 ALLGRMKG, 其抑制长乙型肝炎病毒表面抗原 (L HBsAg) 与 HBcAg 之间的相互作用，半数最大浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $10.0\mu M$ 。

HBV 衣壳结合肽举例如下，其中  $K_D^{Rel}$  (nM) 代表 HBV 核心抗原与携带 gpIII 蛋白氨基端区肽序列的 fd 融合噬菌体之间反应的相对解离常数[参见 Dyson 和 Murray (1995) ]:

| 序列           | $K_D^{Rel}$ (nM) |
|--------------|------------------|
| ADGALLGRMKGA | $152 \pm 5$      |
| ADGALLGRMKPA | $767 \pm 8$      |
| ADGSLLGRMKPA | $322 \pm 50$     |
| ADGALLGRMKRA | $181 \pm 12$     |
| ADGTLLGRMKLA | $20 \pm 2$       |
| ADGSLLGRMKGA | $1.7 \pm 0.3$    |
| ADRSLLGRMKGA | $1.09 \pm 0.02$  |

|                 |            |
|-----------------|------------|
| ADGSRSSLLGRMKGA | 1.96±0.32  |
| ADGAHSSLLGRMKGA | 1.72±0.17  |
| ADGHRSSLLGRMKGA | 1.40±0.13  |
| ADGPRSSLLGRMKGA | 0.84±0.07  |
| ADGAHRSLLGRMKGA | 0.94±0.12  |
| ADGYQRSLLGRMKGA | 0.88±0.08  |
| ADGTQRSLLGRMKGA | 0.84±0.06  |
| ADGMHRSLLGRMKGA | 0.55±0.03. |

这些肽，其模拟 L HBsAg 的胞质区，通过从丝状噬菌体上展示的随机六肽文库中筛选而鉴定，其在溶液中对 HBV 核心抗原的亲合力以噬菌体结合的形式测定。下列有关的肽（以下列出）也是 HBV 衣壳结合肽的例子， $IC_{50}$   $\mu M$  值代表以半数最大水平抑制 L HBsAg 与 HBV 核心抗原结合所需的肽浓度，N/D 代表未观察到抑制， $\beta$ -A 代表 $\beta$ -丙氨酸 [Dyson 和 Murray (1995) ]:

| 序列                             | $IC_{50}$ $\mu M$ |
|--------------------------------|-------------------|
| ALLGRMKG                       | 11.0±0.8          |
| LLGRMKG                        | 46.2±7.4          |
| LGRMKG                         | 980±157           |
| GRMKG                          | N/D               |
| LLGRM                          | N/D               |
| CLLGRMKC                       | 652±74            |
| ALLPRMKG                       | N/D               |
| SLLGRMKG                       | 6.4±0.7           |
| SLLGRMK                        | 40.7±4.8          |
| SLLGRMKGA                      | 2.4±0.2           |
| GSLLGRMKGA                     | 0.79±0.23         |
| DGSLLGRMKGAA                   | 3.0±0.4           |
| ADGSLLGRMKGAAG                 | 4.5±0.8           |
| ACSLGRMKG                      | 26.2±5.0          |
| SLLGRMKG ( $\beta$ -A) C       | 1.8±0.4           |
| RSLGRMKGA                      | 0.29±0.02         |
| HRSLLGRMKGA                    | 0.50±0.04         |
| MHRSLLGRMKGA                   | 0.80±0.10         |
| RSLGRMKGA ( $\beta$ -A) C      | 0.29±0.03         |
| MHRSLLGRMKGAG ( $\beta$ -A) GC | 3.80±0.69.        |

HBV 衣壳结合肽、片段、及其类似物和同系物，可用作使免疫原与 HBV 核心抗原颗粒结合的配体，优选地用常规合成技术如化学合成技术合成。此外，技术人员利用标准化学方法如 t-BOC 化学法使用自动肽合成仪可合成任何肽。参见，例如，L.A. Carpino，美国化学协会杂志（J. Am. Chem. Soc.）79，4427（1957）。肽也可通过蛋白质的化学切割或其他方法制备。分离这些肽，使得当化学合成时其基本上不含化学前体或其他化学试剂，或通过蛋白质的化学切割获得。

此外，可通过常规遗传工程技术如重组 DNA 技术，通过在宿主微生物或细胞中克隆表达一种带有所选择的肽的编码序列的 DNA 片段，在编码该肽的核酸序列所转化的宿主细胞中制备 HBV 衣壳结合肽。当通过重组技术产生时，在适当转化的细胞中，可用常规方法从细胞培养基、宿主细胞或两者中纯化这些肽。分离重组肽，使在通过重组 DNA 技术生产时，这些肽基本上不含细胞物质或培养基。这些肽的编码序列可以合成制备，或通过已知技术由病毒 RNA 产生，或从可获得的含 cDNA 质粒中产生。

为在本发明的方法中使用，可将上述肽设计为通常已知的或另外的构建体，以提高肽的产量，或其与 HBV 核心抗原的结合。例如，这些肽任选地可与蛋白质或肽融合配偶体融合。因此，本领域技术人员可设计与一种选择的融合配偶体如另一种肽结合的肽，或给予它希望的特征的其他肽或蛋白质。

在不同微生物和细胞包括如大肠杆菌、芽孢杆菌、链霉菌（Streptomyces）、酵母属（Saccharomyces）、哺乳动物、酵母、昆虫细胞和植物细胞中克隆表达 HBV 衣壳结合肽的系统及其合适的载体已知，并可从未公开及公开的实验室和保藏所获得，及从供应商处获得。

无论是重组产生还是合成产生，HBV 衣壳结合肽可用常规纯化方法纯化。本领域技术人员能容易地确定为了希望的用途使用肽所需的适当纯度水平。

应当理解，HBV 衣壳结合肽接头的选择一定程度上取决于构成

HBV 核心抗原颗粒的特定核心抗原多肽的性质。例如，不同原始病毒株的 HBV 核心抗原颗粒可能需要不同的 HBV 衣壳结合肽配体，这是因为位于或靠近特定 HBV 核心抗原多肽的配体结合部位的氨基酸序列不同。

### HBV 衣壳结合肽与免疫原的连接

HBV 衣壳结合肽可与目的免疫原连接，通过肽键形成衣壳结合免疫原。当免疫原本身是一种肽时，通常通过一次合成，或通过在被转化的细胞中表达一种肽的相应编码序列方便地实现，该肽含有与免疫原序列连接的 HBV 衣壳结合序列，通常且优选地是通过 2-5 个（通常 3 个）甘氨酸残基连接，以使这种较长的肽的两种成分之间有一定程度的弹性。此外，肽可与免疫原交联。

肽的结合成分与免疫原之间的连接方向可影响用于交联衣壳结合免疫原与 HBV 核心抗原颗粒的最终步骤的效率。此外，在欲与 HBV 核心抗原颗粒交联的大量衣壳结合免疫原中，可将一种特定免疫原置于与之连接的肽的氨基端，而将另一种免疫原置于与之连接的肽的羧基端。在某些情况中，将相同或不同的免疫原置于 HBV 衣壳结合肽的每一端可能是有利的。欲与特定 HBV 核心抗原颗粒交联的 HBV 衣壳结合肽-免疫原复合物组织中的这些变化有利地提供了高度多成分或多价的 HBV 核心抗原颗粒。见图 1。

因此，欲与 HBV 核心抗原颗粒交联的衣壳结合免疫原的方向对于产生的颗粒的最终免疫原性或多价性是重要的。当免疫原位于 HBV 衣壳结合肽的氨基端时，预期有较高的免疫原性或多价性。具有较大灵活性的这种方向对于较大的免疫原也是优选的。

### 衣壳结合免疫原与 HBV 核心抗原颗粒的连接

可用常规交联剂将衣壳结合免疫原与 HBV 核心抗原交联。这些交联剂包括，例如，多功能交联剂，如戊二醛、丁二醛、辛二醛和乙二醛。其他交联剂在《Pierce 目录与手册》，Pierce 化学公司，Rockford, Illinois

(1997) 中列出。其他交联剂包括如 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基磺基琥珀酰亚胺 (磺基-NHS), 其连接相邻的伯氨基和羧基, 形成酰胺键。当加入衣壳结合免疫原/HBV 核心抗原颗粒混合物中时, 这些试剂将肽的赖氨酸成分与相邻的 HBV 核心抗原的天冬氨酸或谷氨酸共价交联。

也应当理解, 与特定 HBV 核心抗原颗粒连接的不同免疫原的比例当然可随用于连接衣壳结合免疫原与 HBV 核心抗原颗粒的混合物中各种免疫原的相对比例而不同。

### 根据本发明的治疗组合物

本发明也提供可用于个体治疗或预防处理的组合物, 其含有此处公开的多成分或多价 HBV 核心抗原颗粒。任何个体, 包括人和其他哺乳动物, 以及任何动物, 均可用此处公开的 HBV 核心抗原颗粒处理。治疗组合物包含药学有效量的 HBV 核心抗原颗粒, 即, 对一种或多种传染剂免疫或经施用一定时间治疗个体一种或多种病症有效的量。预防组合物包含预防有效量的 HBV 核心抗原颗粒, 即, 经施用一定时间预防个体的一种或多种病症有效的量。

如果 HBV 核心抗原颗粒含有不同类型的多种免疫原, 可用含有它们的组合物和疫苗在个体中引发对每种成分免疫原的增强的免疫应答。如果 HBV 核心抗原颗粒含有相同类型的多种免疫原, 可用含有它们的组合物和疫苗在个体中引发对相同免疫原的增强的免疫应答。后一种组合物和疫苗特征在于较常规单一治疗增强的单价和能力。

含有本发明的多成分或多价 HBV 核心抗原颗粒的组合物可单独施用, 或作为药用或预防制剂的部分, 含或不含佐剂, 包括控制释放的制剂。它们还可包含适于为治疗这些感染而施用的药学可接受的载体或稀释剂。合适的药学可接受的载体是生理学惰性和/或无毒性的。本领域已知多种载体, 可根据希望的用途选用。典型的载体包括但不限于: 无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、糊精、琼脂、明矾、氧化铝、氢氧化铝、peptin、花生油、橄榄油、芝麻油和水。另外, 载体或稀释剂可

包括延时物质，如单独的或与石蜡一起的单硬脂酸甘油或二硬脂酸甘油。另外，也可使用常规缓释聚合物制剂，包括如可溶性玻璃。

潜在地，含有多成分或多价 HBV 核心抗原颗粒的组合物可含有其他治疗或预防剂。例如，这些组合物可含有在感染的治疗或预防中有用的多种试剂的“鸡尾酒混合物”。一种这样的鸡尾酒混合物可含有其他试剂如干扰素、核苷类似物和/或 N-乙酰-半胱氨酸。

任选地，含有免疫原性 HBV 核心抗原颗粒的组合物可进一步含有免疫系统调节剂，如在进一步诱导患者的抗体和 T 细胞应答中有用的佐剂或细胞因子。这些调节剂包括常规的基于明矾的佐剂，或胞壁酰二肽、防腐剂、化学稳定剂或其他抗原性蛋白质。一般而言，为测定最佳制剂在希望用途中的效能，稳定剂、佐剂和防腐剂等是合适的。合适的防腐剂可包括氯氧基丁炔醇 (chloryl butynol)、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯 (propyl gallate)、对羟基苯甲酸酯、甘油和苯酚。

可根据希望的反应水平确定这些组合物的适当含量。通常，含有免疫原性 HBV 核心抗原颗粒的组合物可含有约 5 $\mu$ g~200 $\mu$ g 颗粒。这些组合物可以以一次或一系列接种施用，例如，以 2~6 个月的间隔接种 3 次。也可由经治医生判断确定合适的剂量，当作为单一治疗施用时，应考虑如患者健康状态、体重或年龄，以及成分免疫原的常规剂量等因素。待患者病症改善或接触特定病原体的可能性增加后，如必要时可施用维持剂量的含有免疫原性 HBV 核心抗原颗粒的组合物。随后，施用的剂量或频率或此两者可减为能保持希望的作用的水平。此时，应停止治疗。但是，个体在不希望的特定病症复发后可能需要长期的断续治疗。

含有多成分或多价 HBV 核心抗原颗粒的组合物可通过任何合适的途径施用，例如，肠胃外施用，特别是肌肉或皮下，以及口服。也可利用其他途径，如肺、鼻、耳、肛门、皮肤、眼、静脉内、动脉内、腹膜内、粘膜、舌下、皮下和颅内。

根据本发明的免疫原性 HBV 核心抗原颗粒可以在 HBV 感染个体的活性治疗中使用，以抑制、降低或减缓体内病毒的增殖。治疗组合物包含能抑制或防止或使病毒装配机制失效的免疫原性 HBV 核心抗原颗

粒。可配制这些治疗组合物，使之含有载体或稀释剂，和本发明的一种或多种免疫原性 HBV 核心抗原颗粒。对于其他组合物，以上讨论了这些载体和稀释剂，本领域的技术人员应能鉴别。

可制备含有免疫原性 HBV 核心抗原颗粒作为活性成分的组合物或疫苗，以配制为液体溶液或悬液形式的可注射的组合物或疫苗。也可制备在注射前适于以液体溶解或悬浮的固体形式。在某些实施方案中，制剂也可以是乳化的或在脂质体中封装的，或为可溶性玻璃，以便逐渐释放和/或延时释放。此外，制剂也可以是气雾剂或喷雾形式。它们也可以包含于透皮贴剂中。活性成分可以与任意量的药学可接受的并与活性成分相容的赋形剂混合。这些赋形剂包括，例如，弗氏不完全佐剂、细菌脂多糖、离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、胞壁酰二肽、卵磷脂、缓冲物、基于纤维素的物质和聚乙二醇。

方便地，含有根据本发明的 HBV 核心抗原颗粒的疫苗可以是含有大量不同免疫原的组合疫苗。这些疫苗包括，例如，含有针对下列两种或多种疾病的免疫原的组合疫苗：白喉、破伤风、非细胞性百日咳、嗜血杆菌流感、脊髓灰质炎、麻疹、流行性腮腺炎、风疹、水痘、乙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒或肺炎球菌性肺炎。其他疫苗包括在国际旅游前进行个体接种的疫苗。这些疫苗包括，例如，含有针对下列两种或多种疾病的免疫原的组合疫苗：黄热病、疟疾、乙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、伤寒、脑膜炎球菌性脑炎或霍乱。

也可在免疫治疗方案中用含有根据本发明的 HBV 核心抗原颗粒的组合物使个体对一种或多种变应原脱敏，如动物变应原、昆虫变应原、植物变应原、空气变应原和吸入变应原。

根据本发明的另一个实施方案，可以用 HBV 核心抗原颗粒产生抗目的免疫原的抗体，以在免疫治疗或诊断中使用。例如，可以分离在接种了 HBV 核心抗原颗粒的个体中产生的抗体，并以纯化的形式使用。此外，也可通过常规技术用来源于个体的这些抗体或 B 细胞产生单克隆抗体。

### 根据本发明的检测方法

本发明的 HBV 核心抗原颗粒也可以多种常规测定形式中使用，特别是用于诊断感染或接触传染物的免疫测定形式。当本发明的构建体的 HBV 衣壳结合肽成分与诊断标记、化学标记、毒素或另一种蛋白质或肽结合时，得到这种应用。例如，HBV 衣壳结合肽可与常规标记结合，在接触与特定 HBV 核心抗原结合肽连接的免疫原后，这些标记能单独或与其他组合物或化合物一起提供可检测信号，而表明样品中目标分析物的存在。这些可检测标记可选自诊断测定领域技术人员周知的且易于获得的大量组合物。

因此本发明不被特定测定形式的选择所限制，并且认为其包括本领域技术人员周知的测定形式。为方便起见，可以以试剂盒的形式提供测定试剂。这些试剂盒包括预吸附有本发明的 HBV 核心抗原颗粒的微量滴定板，多种稀释液和缓冲液，用于检测特异结合的衣壳结合肽免疫原的标记偶联物及其他信号产生试剂，如酶底物、辅因子和生色团。其他成分可由本领域技术人员轻易确定。

此外，根据本发明的 HBV 核心抗原颗粒可在目前用于病原体检测的免疫学诊断检测中使用，即放射免疫测定或 ELISA（酶联免疫吸附测定）。

在本发明的一个实施方案中，可将欲检测是否存在多种免疫原的抗体的样品与含有不同免疫原性成分、含有可检测标记的 HBV 衣壳结合免疫原的 HBV 核心抗原颗粒接触一段足够的时间，以使该样品中的所有抗体均与一种或多种 HBV 衣壳结合免疫原形成复合物。然后可用检测方法检测衣壳结合免疫原与该样品中的抗体形成的复合物。然后可根据每种成分免疫原对样品进行第二轮筛选，以鉴定样品中抗体的特异性。

在本发明的另一个实施方案中，可将欲检测是否存在特异免疫原的抗体的样品与含有特异免疫原作为免疫原性成分、含有可检测标记的 HBV 衣壳结合免疫原的 HBV 核心抗原颗粒接触一段足够的时间，以使该样品中的所有抗体均与一种或多种 HBV 衣壳结合免疫原形成复合

物。由于 HBV 核心抗原颗粒证明特异免疫原为高价，这种诊断测定的特征在于比常规测定更高的敏感性。

### 实施例

为了更全面地理解此处所述的本发明，叙述了下列实施例。应当理解，这些实施例只是为了说明目的，而绝不应看作是对本发明的限制。

#### 实施例 1

##### HBV 核心抗原制剂

HBV 核心抗原 (aa3-183) 或 C 端截短的 HBV 核心抗原 (aa3-148) 在大肠杆菌中的表达和纯化如 Dyson 和 Murray(1995)所述进行。蛋白质制剂贮存于 4℃ 下，在含 TBS、蔗糖 (20%) 和  $\text{NaN}_3$  (0.02%) 的缓冲液中作为蔗糖梯度级分。该制剂在这种形式下至少可稳定 6 个月。

##### HBV 衣壳结合肽与 HBV 核心抗原的化学交联

用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羧基-磺基琥珀酰亚胺 (磺基-NHS) (均购自 Pierce Europe B.V.) 将 HBV 衣壳结合肽 MHRSLGGRMKGA (Albachem, 爱丁堡大学) 与 HBV 核心抗原颗粒交联。这些试剂连接相邻的伯氨基和羧基，形成酰胺键[Staros 等人, “N-羧基磺基琥珀酰亚胺对水溶性碳二亚胺介导的偶联反应的增强”, 分析生物化学 (Analytical Biochem.) 156, 220-22 (1986)]。当加入 HBV 衣壳结合肽/HBV 核心抗原混合物时，它们将肽的赖氨酸与相邻的 HBV 核心抗原的天冬氨酸或谷氨酸共价交联，使其分子量提高。

更具体而言，在肽 MHRSLGGRMKGA (1mM) 存在或不存在下，截短的 HBV 核心抗原 (15 $\mu\text{g}$ ) 在含有磷酸钾 (25mM, pH7)、NaCl (150mM)、EDC (1.8mM) 和磺基-NHS (1.8mM) 的缓冲液 (30 $\mu\text{l}$ ) 中在室温下温育。18 小时后，如述[Sambrook 等人 (1989)]经 SDS-PAGE (15% w/v) 分析该反应。向肽-HBV 核心抗原颗粒复合物中加入 EDC 和磺基-NHS 导致在对 HBV 核心抗原级分的 SDS-PAGE 上发生相当于约 1kd 的条带移位。尽管在不同条件下电泳反应物，但未获得 50%以

上的移位蛋白带产量。这与一种肽相一致，该肽可与接近局部 2 倍轴的 HBV 核心抗原二聚体结合，从而在空间上阻断了其他肽与 2 倍相关位点的结合。

## 实施例 2

### HBV 核心抗原制剂

除了在实施例 1 中制备的两种 HBV 核心抗原样品外，还如 Stahl 和 Murray (1989) 所述制备了含有 HBV pre-S1 序列 1-36 或 HBV 表面抗原序列 111-156 或 111-165 的 HBV 核心抗原样品，所含的这些序列通过短接头肽序列与截短的 HBV 核心抗原多肽（在残基 144 处截短）连接。

### HBV 衣壳结合肽与 HBV 核心抗原的化学交联

通过固相合成制备的下列衣壳结合免疫原从爱丁堡大学的 Albachem 获得：

AS-151: GSLLGRMKGA GGG LDPAFRG

AS-152: GSLLGRMKGA GGG EQKLISEEDL

AS-163: LDPAFR GG GSLLGRMKGA

AS-164: EQKLISEEDL GG GSLLGRMKGA,

其中序列 GSLLGRMKGA 是 HBV 衣壳结合肽，序列 LDPAFR 是 HBV pre-S1 表位或免疫原，序列 EQKLISEEDL 是 myc 癌基因或免疫原。这些肽和基本 HBV 衣壳结合肽 GSLLGRMKGA 以不同浓度分开或一起与 HBV 核心抗原颗粒结合，并如实施例所述用 EDC 或磺基-NHS 交联。

### 产生的 HBV 核心抗原颗粒的性质

在 SDS 存在下通过丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析产物，随后用考马斯蓝染色，并用抗 HBV 核心抗原颗粒或变性 HBV 表面抗原颗粒的单克隆抗体和多克隆兔血清进行 Western 印迹分析。可使用针对

HBV pre-S1 表位和 myc 癌基因表位之每一个的单克隆抗体。它们分别是单克隆抗体 18/7[K.H. Heermann 等人, 病毒学杂志 52, 396-402 (1984)] 和单克隆抗体 9E10[Invitrogen, 目录号#R950-25]。

这些实验证明, 所有交联反应的产物都与针对连接反应组分中每种组成表位的抗体有阳性反应。用通过配体肽的氨基或羧基端连接的免疫原可获得阳性反应。

如下所述, 用普通 HBV 衣壳结合肽配体从包括与两个或多个不同免疫原交联的反应中纯化的 HBV 核心抗原颗粒制剂可与抗所有成分免疫原的抗体反应。此外, 用免疫原之一的特异性抗体沉淀的 HBV 核心抗原颗粒显示与配体交联步骤中使用的其他肽有交叉反应性。

连接产物以蔗糖梯度超离心。用一种抗体—抗 myc 抗体沉淀, 然后经 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析。

用一种抗体如抗 myc 抗体沉淀的物质在 Western 印迹中显示与抗 myc 和抗 pre-S1 抗体有强烈的交叉反应性。用另一种抗体—抗 pre-S1 抗体沉淀的产物也显示同样的交叉反应性。

在携带不同免疫原的两种 HBV 衣壳结合肽以不同比例混合以与核心颗粒结合并交联的反应中, SDS-PAGE 和 Western 印迹分析显示, 用两种单克隆抗体染色的相对强度反映了用于交联的混合物中两种免疫原的比例。

这些实验表明, 由反应产生的至少某些 HBV 核心颗粒与两种免疫原共价连接。由于配体肽与 HBV 核心抗原颗粒(核壳)的顶端结合, 这些制剂将显示对两种成分的强免疫原性, 预计可在施用的个体中产生高抗体效价。

虽然我们在上文中叙述了本发明的大量实施方案, 但显然能改变我们的基本结构以提供利用本发明的方法的其他实施方案。因此应当理解, 本发明的范围将由附加的权利要求书而不是由上文中以实施例形式提出的具体实施方案所限定。

## 序列表

<110> BIOGEN, INC  
Murray, Kenneth

<120> 含有通过肽配体连接的多个免疫原性成分的 HBV 核心抗原颗粒

<130> A067 PCT

<140> PCT/US99/28755

<141> 1999-12-03

<150> 60/110,911

<151> 1998-12-04

<160> 47

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 1

Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu Lys Ile  
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 2

Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser  
1 5

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 3

Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Asn  
1 5 10

<210> 4  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 4  
Glu Leu Asp Lys Trp Ala  
1 5

<210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人免疫缺陷病毒

<400> 5  
Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 6  
Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala  
1 5

<210> 7  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 7  
Leu Leu Gly Arg Met Lys  
1 5

<210> 8  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)  
<223> bAla

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 8  
Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Xaa Cys  
1 5 10

<210> 9  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<221>  
<222>  
<223>

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 9  
Arg Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala  
1 5 10

<210> 10  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 10  
His Arg Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala  
1 5 10

<210> 11  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)  
<223> bAla

<400> 11  
Arg Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala Xaa Cys  
1 5 10

<210> 12  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 12  
Ala Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly  
1 5

<210> 13  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 13

Ala Asp Gly Ala Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala  
1 5 10

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 14

Ala Asp Gly Ala Leu Leu Gly Arg Met Lys Pro Ala  
1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 15

Ala Asp Gly Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Pro Ala  
1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 16

Ala Asp Gly Ala Leu Leu Gly Arg Met Lys Arg Ala  
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 17

Ala Asp Gly Thr Leu Leu Gly Arg Met Lys Leu Ala  
1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 18

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

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 19

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

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 20

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

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 21

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

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 22

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

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 23

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

<210> 24  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 24  
Ala Asp Gly Ala His Arg Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala  
1 5 10 15

<210> 25  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 25  
Ala Asp Gly Tyr Gln Arg Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala  
1 5 10 15

<210> 26  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 26  
Ala Asp Gly Thr Gln Arg Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala  
1 5 10 15

<210> 27  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 27

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

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 28

Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly  
1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 29

Leu Gly Arg Met Lys Gly  
1 5

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 30

Gly Arg Met Lys Gly

1

5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

&lt;400&gt; 31

Leu Leu Gly Arg Met

1

5

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

&lt;400&gt; 32

Cys Leu Leu Gly Arg Met Lys Cys

1

5

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

&lt;400&gt; 33

Ala Leu Leu Pro Arg Met Lys Gly

1

5

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 34

Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly  
1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 35

Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys  
1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 36

Gly Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala  
1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 37  
Asp Gly Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala Ala  
1 5 10

<210> 38  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 38  
Ala Asp Gly Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala Ala Gly  
1 5 10

<210> 39  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 39  
Ala Cys Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly  
1 5 10

<210> 40  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 40  
Met His Arg Ser Leu Leu Gly Arg Met Lys Gly Ala  
1 5 10

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> bAla

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 41

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | His | Arg | Ser | Leu | Leu | Gly | Arg | Met | Lys | Gly | Ala | Gly | Xaa | Gly | Cys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 42

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Leu | Leu | Gly | Arg | Met | Lys | Gly | Ala | Gly | Gly | Gly | Leu | Asp | Pro |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Phe | Arg | Gly |
|     |     |     | 20  |

<210> 43

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 43

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Ser | Leu | Leu | Gly | Arg | Met | Lys | Gly | Ala | Gly | Gly | Gly | Glu | Gln | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
20

<210> 44

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV 衣壳结合肽

<400> 44

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

Gly Ala

<210> 45

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: myc 癌基因表位或免疫原

<400> 45

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Gly Ser Leu Leu  
1 5 10 15

Gly Arg Met Lys Gly Ala  
20

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: HBV pre S-1 表位或免疫原

<400> 46

Leu Asp Pro Ala Phe Arg  
1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

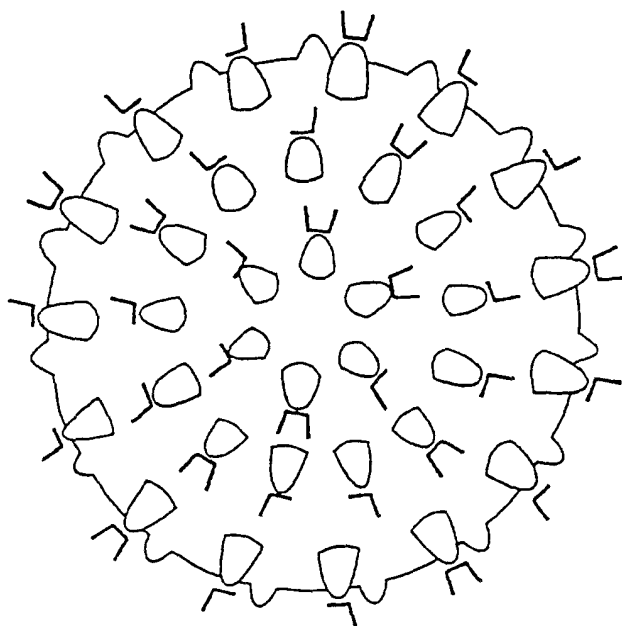
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: myc 癌基因表位或免疫原

<400> 47

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
1 5 10



┐ = HBV 衣壳结合肽 — 免疫原

┘ = 免疫原 — HBV 衣壳结合肽 — 免疫原

多种HBcAg融合蛋白的表征

| 肽序列 <sup>a</sup>                                                | 位置 <sup>b</sup>     | 长度 <sup>c</sup> | 特征 <sup>d</sup> | 参考文献                 |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------|----------------------|
| $\beta$ -半乳糖苷酶 (1-8)                                            | N (3)               | 192             | M, A, I         | Stahl 等 1982         |
| FMDV VP1 (142-160)                                              | N (前核心)             | 215             | A, I            | Clarke 等 1987        |
| HBV PreS1                                                       | C (144)             | 187; 198        | M, A, I         | Stahl 和 Murray, 1989 |
| HBV PreS1                                                       | C (144); 144/145    | 193-233         | A, I            | Borisova 等 1989      |
| HBV PreS1                                                       | N; N (前核心)          | 210; 224        | A, I, T         | Schödel 等 1992       |
| HBV PreS2                                                       | C (144)             | 191             | A, I            | Stahl 和 Murray, 1989 |
| HBV PreS2                                                       | C (144); 144/145    | 199; 236        | A, I            | Borisova 等 1989      |
| HBV PreS2                                                       | C (156)             | 167             | A, I, T         | Schödel 等 1992       |
| HBV PreS1; PreS2                                                | 75/83; C (156)      | 187             | A, I, T         | Schödel 等 1992       |
| HBV PreS1 + PreS2                                               | C (144)             | 218             | M, A, I, T      | Shiau 1993           |
| HBV S <sub>111-156/165</sub>                                    | C (144)             | 211; 218        | A, I            | Stahl 和 Murray, 1989 |
| HBV S <sub>111-156</sub> (145 mutants)                          | C (144)             | 211             | M, A, I, T      | Shiau 和 Murray, 1997 |
| HBV S <sub>111-149</sub>                                        | 78/82-144           | 180             | A, I            | Borisova 等 1993      |
| HBV PreS1 + PreS2 + S <sub>111-156</sub>                        | C (144)             | 266             | M, A, I, T      | Shiau 1993           |
| HBV S <sub>111-156</sub> + PreS1 + PreS2 + S <sub>111-156</sub> | C (144); N, C (144) | 318; 314        | M, A, I, T      | Shiau 1993           |
| HIV Env (728-751)                                               | C (144)             | 178             | I               | Stahl 和 Murray, 1989 |
| HIV gp 41 (78-129)                                              | C (144); 144/145    | 196; 235        | A               | Borisova 等 1993      |
| BLV gp 51 (56-103)                                              | C (144)             | 192             | A               | Borisova 等 1993      |
| HCV Hc (数种)                                                     | C (149)             | 186-881         | M, A            | Yoshikawa 等 1993     |

- a 与 HBcAg 融合的肽。括号中的数字指氨基酸序列。数个作者使用与 PreS1 和 PreS2 不同区段的编号。
- b 在 HBcAg 中融合的位置; N, N-末端; C, C-末端, 或在括号中的残基截短。内部融合由两个号码间的斜线表示。
- c 融合蛋白中氨基酸的总编号
- d M, 形态学 (电子显微镜); A, 抗原性; I, 抗体产生; T, T-细胞增殖
- e 一些组合包括按顺序所示的额外 S<sub>111-156</sub> 区段, 但在其它中, 将其置于 HBcAg 序列的 N-末端