



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110049993 A

(43)申请公布日 2019.07.23

(21)申请号 201780063166.X

罗伯特·森特

(22)申请日 2017.09.22

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(30)优先权数据

2016903961 2016.09.29 AU

代理人 郑斌 刘振佳

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.11

(51)Int.Cl.

C07K 1/02(2006.01)

C07K 14/18(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2017/051037 2017.09.22

A61K 39/29(2006.01)

A61P 31/14(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/058177 EN 2018.04.05

G01N 33/576(2006.01)

(71)申请人 麦克法兰布奈特医疗研究与公共健康研究有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

(72)发明人 海迪·德鲁默尔

潘泰利斯·蓬布里奥斯

权利要求书2页 说明书51页

序列表34页 附图43页

(54)发明名称

组装的糖蛋白

(57)摘要

一种由天然低级抗原制备细胞外组装的高级抗原的方法,方法包括以下步骤:(i)使低级抗原与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间,时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸;以及(ii)去除或稀释还原剂或使还原的低级抗原与氧化剂接触,以引发来自(i)的低级抗原组装成组装的高级抗原;其中至少10%的低级抗原在步骤(ii)中转化为高级抗原,并且由此组装的高级抗原10与低级抗原相比显示出至少减少的与非中和抗体的结合并且保持与至少一种中和抗体的结合。一种生产疫苗组合物的方法,包括按照方法的步骤,然后将组装的高级抗原与药学上或生理学上可接受的稀释剂、载体或佐剂混合。一种包含15细胞外组装的高级抗原的组合物,其中组装的抗原与天然对照高级抗原相比显示出至少减少的与非中和抗体的结合。组装的高级抗原刺激免疫应答或检测和/或分离对抗原有特异性的免疫细胞诸如B细胞的用途。

1. 一种由天然低级抗原制备细胞外组装的高级抗原的方法,所述方法包括以下步骤:
 - (i) 使低级抗原与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间,所述时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸;
 - 以及
 - (ii) 去除或稀释所述还原剂或使还原的低级抗原与氧化剂接触,以引发来自(i)的低级抗原组装成组装的高级抗原;其中至少10%的所述低级抗原在步骤(ii)中转化为高级抗原,并且由此所述组装的高级抗原与所述低级抗原相比显示出至少减少的与非中和抗体的结合并且保持与至少一种中和抗体的结合。
2. 如权利要求1所述的方法,其中用包含来自步骤(ii)的残余低级抗原的溶液重复先前的步骤(i)和(ii),以便提高将低级抗原组装成高级抗原的所述方法的效率。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其中在步骤(i)中或在步骤(i)之前,包含低级抗原的所述溶液基本上缺乏天然寡聚物或高级抗原。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%、或至少80%、或至少90%或至少95%或更多的所述低级抗原转化为高级抗原。
5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述组装的高级抗原保持或超过了天然对照高级抗原结合或引发一种或多种中和抗体的能力。
6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述组装的高级抗原是HCV E2的受体结合结构域(RBD)。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述组装的高级抗原缺少全部或部分的高变区,诸如高变区1(HVR1)或其部分、高变区2(HVR2)或其部分和/或基因型间可变区(igVR/VR3)或其部分中的一种或多种。
8. 如权利要求6或7所述的方法,其中所述组装的寡聚抗原包含选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸残基中的非半胱氨酸取代或突变:C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597和C569。
9. 一种生产疫苗组合物的方法,其包括权利要求1至8中任一项所述的方法,其中将所述组装的高级抗原与药学上或生理学上可接受的稀释剂、载体或佐剂混合。
10. 如权利要求1所述的方法,其中所述抗原是病毒包膜抗原或癌抗原。
11. 如权利要求10所述的方法,其中所述病毒包膜抗原是肝炎病毒抗原或HIV包膜抗原。
12. 一种组装的高级抗原或包含组装的高级抗原的组合物,其通过权利要求1至11中任一项所述的方法由低级抗原产生。
13. 一种包含细胞外组装的高级抗原的组合物,其中所述组装的抗原与天然对照高级抗原相比显示出至少减少的与非中和抗体的结合。
14. 如权利要求13所述的组合物,其中所述组装的高级抗原是HCV E2或HCV E2的受体结合结构域(RBD)。
15. 如权利要求14所述的组合物,其中所述E2抗原缺少全部或部分的高变区,诸如高变区1(HVR1)或其部分、高变区2(HVR2)或其部分和/或基因型间可变区(igVR/VR3)或其部分

中的一种或多种。

16. 如权利要求14或15中任一项所述的组合物,其中所述E2抗原包含选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸残基中的非半胱氨酸取代或突变:C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597和C569。

17. 如权利要求12至16中任一项所述的组合物,其包含药学上或生理学上可接受的稀释剂、载体或佐剂。

18. 权利要求12至17中任一项所述的组合物在治疗或预防与所述抗原或HCV感染相关的病状中或在制备用于治疗或预防与所述抗原或HCV感染相关的病状的药物中的用途。

19. 权利要求12所述组装的高级抗原或权利要求13至17中任一项所述的组合物在制备用于诊断或监测HCV感染或监测抗HCV治疗方案的诊断剂中的用途。

20. 一种在受试者或患者中引发免疫应答的方法,所述方法包括在一定条件下向所述受试者或患者施用有效量的权利要求12所述的组装的高级抗原或权利要求13至17中的一项所述的组合物一段时间,所述时间和条件足以引发免疫应答。

21. 一种使受试者对HCV感染免疫的方法,其包括向所述受试者施用权利要求12的组装的寡聚E2抗原或权利要求13至17中任一项所述的组合物。

22. 一种治疗或预防受试者中的HCV感染的方法,其包括在一定条件下向所述受试者施用权利要求12的组装的寡聚抗原或权利要求13至17中任一项所述的组合物一段时间,所述时间和条件足以治疗或预防与所述抗原诸如HCV E2和HCV感染相关的病状。

23. 如权利要求13至16中任一项所述的组合物,其中所述组装的高级抗原包含可检测标签或纯化标签。

24. 一种产生针对权利要求13至16中任一项所述的组装的高级抗原的纯化抗体的方法,其包括向受试者施用有效量的抗原以及纯化产生的所述抗体。

25. 一种抗体,其特异性识别权利要求12至16中任一项所述的组装的抗原。

26. 一种药盒或固体或半固体基质,其包含权利要求12所述的组装的高级抗原或权利要求13至16中任一项所述的组合物。

27. 权利要求12所述的组装的高级抗原或权利要求13至16中任一项所述的组合物用于结合/检测抗原特异性免疫细胞的用途。

28. 权利要求12所述的组装的高级抗原或权利要求13至16中任一项所述的组合物用于检测和/或分离对所述抗原具有特异性的免疫细胞诸如B细胞的用途。

29. 一种检测和/或分离对HCV具有特异性的免疫细胞/B细胞的方法,其包括:

i) 用权利要求13至16所述的组装的高级E2抗原标记对HCV具有特异性的免疫细胞/B细胞;以及

ii) 通过细胞计数检测和/或分离所述标记的免疫细胞/B细胞。

组装的糖蛋白

技术领域

[0001] 本说明书总体上涉及疫苗和诊断组合物。具体而言,本说明书促进生产高级形式的目标抗原,诸如HCV包膜2(E2)糖蛋白和HIV包膜蛋白。高级抗原适用于疫苗生产和离体结合应用。

背景技术

[0002] 说明书末尾还列出了本说明书中参考文献的书目明细。

[0003] 在本说明书中参照任何现有技术不是并且不应当被认为是承认或者以任何形式暗示这种现有技术在任何国家构成公共常识的一部分。

[0004] 丙型肝炎病毒是一种高度可变的病原体,其长期感染世界3%的人口,是慢性肝病的主要原因。HCV以7种高度不同的基因型(G1-G7)和超过67种亚型(a、b、c等)循环,没有预防性疫苗可用。最近,直接作用抗病毒药物(DAA)已经到达临床,使得能够在>95%的治疗个体中实现病毒清除。然而,DAA无法预防再感染,并且其高成本给医疗保健系统带来了重大的经济负担。此外,估计有5000万人患有未确诊的感染,为病毒持续传播提供了方式。防治性疫苗将会预防新的感染和可能的再感染,并显著增强涉及使用DAA的消除程序。因此,防治性疫苗已被世界卫生组织认为是开发的优先事项。

[0005] 主要的表面糖蛋白E2将病毒粒子附着于宿主细胞受体CD81并产生基因型特异性和广谱(交叉基因型保护性)中和抗体(bNAbs)。在自然感染中,30%的个体自发清除其感染,已将与bNAbs的快速诱导和广泛反应性T细胞应答联系起来。另外,广谱中和单克隆抗体(NMAbs)的混合物可以预防和清除HCV小动物模型中确定的HCV感染。然而,先前的疫苗接种研究在动物中使用含有全长或截短形式的E2的疫苗进行并且重组HCV糖蛋白的I期临床试验并未引发高滴度的NAbs,并且观察到非常有限的交叉基因型中和。HCV E2高度糖基化,经历快速的序列变化并具有多个全部牵涉免疫逃避的可变区。已经提出非中和抗体会干扰中和抗体的结合。

[0006] 开发改进的HCV疫苗的现有技术方法集中于修饰E2以去除可变区,同时保持CD81结合。最近,发明人确定寡聚物且尤其是高分子量寡聚物(HMW形式)在产生所需的广谱中和抗体应答时优于单体。这种方法一直很有前景,但野生型HCV E2和缺少高变区的经修饰E2(例如 δ 123 HCV E2)的高分子量(HMW)形式通常以低产率表达并且在结构上是异源的,这为疫苗生产带来了挑战。目前,通过将表达E2的质粒转染到宿主细胞中并使细胞将E2折叠成天然寡聚物来产生寡聚物。然后根据需要将寡聚物与其它组分分离。

[0007] 在这种背景下,本发明人开发了一种生产E2的寡聚形式的策略,其具有几个用于商业疫苗生产目的的潜在优点,诸如在一些实施方案中,降低了成本和纯化的复杂性。该方法广泛适用于任何目标抗原和用于产生高级组装形式的抗原。

发明内容

[0008] 一方面,本公开实现了由天然低级抗原制备细胞外组装的高级抗原的方法,所述

方法包括以下步骤：(i) 在一定条件下使低级抗原与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间，所述时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸；以及(ii) 去除或稀释所述还原剂或使所述还原的低级抗原与氧化剂接触，以引发来自(i)的低级抗原组装成组装的高级抗原。在所述方法的一个实施方案中，至少10%的所述低级抗原在步骤(ii)中转化为高级抗原。在所述方法的一个实施方案中，组装的高级抗原与所述低级抗原相比显示出至少减少的与非中和抗体的结合。在所述方法的一个实施方案中，组装的高级抗原保持与至少一种中和抗体的结合。

[0009] 在一个实施方案中，所述抗原是病毒包膜抗原。在一个实施方案中，所述病毒包膜抗原是HCV或HIV。

[0010] 在另一个实施方案中，所述抗原是癌抗原。

[0011] 在一个实施方案中，所述高级癌抗原是四聚体、五聚体、六聚体、十聚体等，一直到23聚体。

[0012] 在一个实施方案中，提供了一种由天然低级抗原制备细胞外组装的高级抗原的方法，所述方法包括以下步骤：(i) 使低级抗原与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间，所述时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸；以及(ii) 去除或稀释所述还原剂或使所述还原的低级抗原与氧化剂接触，以引发来自(i)的低级抗原组装成组装的高级抗原；其中至少10%的所述低级抗原在步骤(ii)中转化为高级抗原，并且由此所述组装的高级抗原与所述低级抗原相比显示出至少减少的与非中和抗体的结合并且保持与至少一种中和抗体的结合。

[0013] 在一个实施方案中，在作为预防性或治疗性疫苗向受试者递送之前，将高级抗原纯化并与药学上可接受的稀释剂、载体或佐剂混合。

[0014] 在一个实施方案中，本公开实现了由天然低级HCV E2制备细胞外组装的高级丙型肝炎病毒(HCV)包膜糖蛋白2(E2)抗原的方法，所述方法包括以下步骤：(i) 使低级E2与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间，所述时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸；以及(ii) 去除或稀释所述还原剂或使所述还原的E2与氧化剂接触，以引发来自(i)的低级E2重新组装成高级HCV E2。在所述方法的一个实施方案中，至少20%的低级E2抗原在步骤(ii)中组装成高级抗原。在一个实施方案中，组装的高级HCV E2显示出与低级E2相比至少减少的与非中和抗体的结合，并保持与至少一种中和抗体的结合。

[0015] 因此，在一个实施方案中，本公开实现了一种由天然低级HCV E2制备细胞外组装的高级丙型肝炎病毒(HCV)包膜糖蛋白2(E2)抗原的方法，所述方法包括以下步骤：(i) 使低级E2与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间，所述时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸；以及(ii) 去除或稀释所述还原剂或使所述还原的E2与氧化剂接触，以引发来自(i)的低级E2重新组装成高级HCV E2；其中至少20%的所述低级抗原在步骤(ii)中组装成高级抗原，并且由此组装的高级HCV E2与所述低级E2相比显示出至少减少的与非中和抗体的结合并且保持与至少一种中和抗体的结合。

[0016] 在另一个实施方案中，本公开实现了由天然低级HIV包膜制备细胞外组装的高级HIV包膜糖蛋白抗原的方法，所述方法包括以下步骤：(i) 使低级HIV包膜与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间，所述时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸；以及(ii) 去除或稀释所述还原剂或使所述还原的包膜与氧化剂接触，以引发来自(i)的低级包

膜重新组装成高级HIV包膜,其中至少10%的低级抗原在步骤(ii)中组装成高级抗原。

[0017] 在一个实施方案中,用包含来自步骤(ii)的残余低级抗原的溶液重复先前的步骤(i)和(ii),以便提高将低级抗原组装成高级抗原的所述方法的效率。

[0018] 令人惊讶的是,甚至半胱氨酸修饰形式的HCV E2单体,诸如A1a7构建体,也使用当前描述的方法组装成高级形式。由于半胱氨酸修饰形式诸如A1a7以主要为单体的形式重组表达,因此由这种材料产生高级形式将是有益的,而不是从通常用例如HCV E2 RBD形式或 δ 123形式产生的不同形式的混合物中纯化单体形式。因此,半胱氨酸修饰形式也在本发明方法中组装的发现通过提供有用的低级或单体来源而促进疫苗生产。此外,如本文所确定的,当重复所述方法时,最初未组装成高级形式的低级抗原能够形成高级形式,从而实现了高级形式的更高产率。

[0019] 在所述方法的一个实施方案中,在步骤(i)中或在步骤(i)之前,包含低级抗原的溶液基本上缺乏天然寡聚物或高级抗原。

[0020] 在一个实施方案中,至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%,或至少80%,或至少90%或至少95%或更多的低级抗原转化为高级抗原。

[0021] 在另一个实施方案中,发明人发现了高级抗原产率的基因型特异性差异。因此,在一个实施方案中,所述方法还包括选择产生最高产率的组装的寡聚抗原的病毒或抗原基因型。

[0022] 在一个实施方案中,组装的高级抗原保持或超过了天然对照高级抗原结合或引发一种或多种中和抗体的能力。

[0023] 在一个实施方案中,组装的高级抗原是HCV E2的受体结合结构域(RBD)。

[0024] 在一个实施方案中,组装的高级HCV E2抗原缺少全部或部分的高变区,诸如高变区1(HVR1)或其部分、高变区2(HVR2)或其部分和/或基因型间可变区(igVR/VR3)或其部分中的一种或多种。

[0025] 在一个实施方案中,组装的寡聚抗原包含选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸残基中的非半胱氨酸取代或突变:C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597和C569。如本文所讨论的,半胱氨酸修饰形式的使用令人惊讶地提供了能够组装成高级形式的低级抗原的来源。

[0026] 另一方面,本发明提供了一种生产疫苗组合物的方法,其包括本文公开的组装方法,所述组装方法包括以下步骤:(i)使低级抗原与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间,所述时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸;以及(ii)去除或稀释所述还原剂或使所述还原的低级抗原与氧化剂接触,以引发来自(i)的低级抗原组装成组装的高级抗原,之后所述组装的高级抗原与药学上或生理学上可接受的稀释剂、载体或佐剂混合。

[0027] 在一些实施方案中,所述抗原是病毒包膜抗原或癌抗原。

[0028] 在一些实施方案中,所述病毒包膜抗原是肝炎病毒抗原或HIV包膜抗原。

[0029] 另一方面,本发明提供了通过本文公开的方法由低级抗原产生的组装的高级抗原或包含组装的高级抗原的组合物,所述方法包括以下步骤:(i)使低级抗原与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间,所述时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸;以及(ii)去除或稀释所述还原剂或使所述还原的低级抗原与氧化剂接触,以引发来自(i)的低级抗原组装成组装的高级抗原。

[0030] 在一个实施方案中,实现了包含细胞外组装的高级抗原的组合物。在一个实施方案中,与宿主细胞中产生的对应对照抗原相比,组装的高级抗原显示出更有利的免疫原性特征。在一个实施方案中,有利的免疫原性特征包括对一个或多个非中和表位的更大封闭和/或对病毒包膜抗原的一个或多个中和表位的更大暴露。在一个实施方案中,有利的免疫原性特征包括组装的抗原与在宿主细胞环境中组装成高级抗原的对应对照抗原相比,决定更有效的免疫应答。在一个实施方案中,有利的免疫原性特征包括能够减少或预防受试者中的肿瘤发展的更强免疫应答。在一个实施方案中,通过显示出与天然对照高级(寡聚)抗原相比,与非中和抗体的结合减少,组装抗原可与天然对照高级抗原区分开。结合减少包括没有可检测的结合(在组装的抗原中表位被封闭并且不能与非中和抗体结合,而在结合非中和抗体的天然对照抗原中表位未被封闭)。具体而言,如本文所述,在组装的E2中抗体CBH4G识别的表位被封闭。

[0031] 在另一个实施方案中,本公开实现了包含细胞外组装的高级HCV E2糖蛋白抗原的组合物,其中组装的E2显示出与非中和抗体的结合减少。具体而言,与天然对照寡聚HCV E2相比,非中和抗体CBH4G显示出与组装E2的结合减少。该抗体在文献中有描述,例如Keck等人*PLoS Pathogens*:8 (4) e1002653,2012年4月。而且,相对于天然对照寡聚HCV E2,抗体2A12显示出与组装的E2的结合减少。抗体组及其产生方法在通过引用并入本文的Viethier等人*Hepatology*:65 (4),1117-1131,2017及其中提及的参考文献诸如参考文献5、33-36、17和37和可从出版商获得的补充材料中有描述。

[0032] 因此,在一个实施方案中,组装的抗原被抗体2A12或抗体CBH4G结合的暴露表位和/或表位残基减少,或者不被非中和抗体(诸如本领域已知的抗体2A12或抗体CBH4G)识别。

[0033] 在另一个实施方案中,本公开实现了包含高级的细胞外组装的高级病毒包膜抗原的组合物,其中与天然对照高级病毒包膜抗原相比,组装的病毒包膜抗原显示出与非中和抗体的结合减少。

[0034] 在一个实施方案中,重新折叠的寡聚抗原显示出选自以下组成的组的至少一种特征:

[0035] (i) 相对于对照天然抗原形式或单体形式,与非中和抗体的结合减少;

[0036] (ii) 相对于对照天然抗原形式,与中和抗体的结合至少基本上相同;

[0037] (iii) 相对于对照天然抗原形式或单体抗原,引发较低滴度的非中和抗体的产生;

[0038] (iv) 引发中和抗体的产生;

[0039] (v) 引发广谱中和抗体的产生;

[0040] (vi) 任选地引发较高滴度的中和抗体的产生;和

[0041] (vii) 任选地引发较高滴度的广谱中和抗体的产生。

[0042] 在另一个实施方案中,本公开实现了包含高级的细胞外组装的高级HIV包膜抗原的组合物,其中与天然对照高级HIV包膜抗原相比,组装的HIV包膜抗原显示出与非中和抗体的结合减少。

[0043] 在本公开的上下文中,技术人员将很好地理解合适的对照。在一个实施方案中,对照抗原与目标试验抗原为相同基因型,在宿主细胞诸如细菌或哺乳动物、酵母、植物或昆虫细胞中重组产生。

[0044] 在一个实施方案中,组装的高级抗原是HCV E2的受体结合结构域(RBD)。

[0045] 在一个实施方案中,HCV E2抗原缺少全部或部分的高变区,诸如高变区1(HVR1)或其部分、高变区2(HVR2)或其部分和/或基因型间可变区(igVR/VR3)或其部分中的一种或多种。HVR1、HVR2和igVR/VR3序列的实例示于图12中。

[0046] 在一些实施方案中,E2抗原包含选自由以下组成的组的一个或多个氨基酸残基中的非半胱氨酸取代或突变:C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597和C569。在一个实施方案中,在这个背景下提及一个或多个氨基酸意指2、3、4、5、6或7个氨基酸为非半胱氨酸取代或缺失或以其它方式突变。

[0047] 在一个实施方案中,本公开提供了包含组装的高级HCV E2抗原(由单体E2组装)和药学上或生理学上可接受的载体和/或稀释剂的组合物。

[0048] 在一个实施方案中,所述组合物包含药学上或生理学上可接受的稀释剂、载体或佐剂。在一个实施方案中,抗原可以呈适于疫苗组合物的任何载体形式存在。

[0049] 在一个实施方案中,本公开提供如本文所述的组合物在制备用于治疗或预防病毒感染(诸如HCV或HIV感染)或癌症或与病毒包膜或癌抗原相关的病状的药物中的用途。

[0050] 在一个实施方案中,本公开提供了组装的高级抗原或组合物在制备用于诊断或监测与抗原诸如E2、HCV感染相关的病状或监测抗HCV治疗方案的诊断剂中的用途。

[0051] 在一个实施方案中,本公开提供了一种在受试者或患者中引发免疫应答的方法,所述方法包括在一定条件下向所述受试者或患者施用有效量的本文所述的组装的高级抗原或如本文所述的组合物一段时间,所述时间和条件足以引发免疫应答。

[0052] 在一个实施方案中,本公开提供了一种使受试者对HCV感染免疫的方法,其包括向受试者施用如本文所述的组装的寡聚抗原或组合物。

[0053] 在一个实施方案中,本公开提供了一种治疗或预防受试者中的HCV感染的方法,其包括在一定条件下向受试者施用所述的组装的寡聚抗原或组合物一段时间,所述时间和条件足以治疗或预防HCV感染。

[0054] 在一个实施方案中,所述组合物还包含来自不同病原体的第二高级抗原。

[0055] 在一个实施方案中,所述组装的高级抗原包含可检测标签或纯化标签。

[0056] 在一个实施方案中,本公开提供了产生针对如本文所述的组装的高级抗原的纯化抗体,其包括向受试者施用有效量的抗原以及纯化产生的抗体。

[0057] 在一个实施方案中,提供了特异性识别如本文所述的组装的高级抗原/E2抗原的抗体。可替代地或另外,可以鉴定识别天然未组装的抗原或组装而非天然的抗原上暴露的表位的抗体。

[0058] 在一个实施方案中,提供了一种药盒或一种固体或半固体基质,其包含如本文所述的组装的高级抗原,或如本文所述的组合物。

[0059] 在一个实施方案中,本公开提供了通过本文公开的方法由低级抗原产生的组装的高级抗原或包含高级的细胞外组装的高级癌抗原或病毒包膜抗原的组合物用于结合/检测抗原特异性免疫细胞的用途,所述方法包括以下步骤:(i)使低级抗原与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间,所述时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸;以及(ii)去除或稀释所述还原剂或使所述还原的低级抗原与氧化剂接触,以引发来自(i)的低级抗原组装成组装的高级抗原,其中所述组装的病毒包膜抗原与天然对照高级病毒包膜抗

原相比,显示出与非中和抗体的结合减少。

[0060] 在一个实施方案中,本发明的组装的高级抗原适于或用于检测和/或分离对抗原有特异性的免疫细胞诸如B细胞。在一个实施方案中,所述免疫细胞是对抗原有特异性的T细胞。

[0061] 在另一个实施方案中,本公开实现了一种检测和/或分离对抗原有特异性的免疫细胞/B细胞的方法,其包括:i)用本文所述的组装的高级抗原标记对抗原有特异性的免疫细胞/B细胞以及ii)通过细胞计数检测和/或分离标记的免疫细胞/B细胞。

[0062] 在另一个实施方案中,本公开实现了一种检测和/或分离对抗原有特异性的免疫细胞/B细胞的方法,其包括:i)用组装的高级抗原标记对抗原有特异性的免疫细胞/B细胞;以及ii)通过细胞计数检测和/或分离标记的免疫细胞/B细胞。

[0063] 该发明内容不是对说明书中描述的所有实施方案的详尽描述。

附图说明

[0064] 一些附图包含彩色图示或实体。可根据要求从专利权人处或从相应的专利局获得彩色版本的附图。如果从专利局获得,可能会收取费用。

[0065] 图1示出了含有 $\Delta 123$ 的质粒的琼脂糖凝胶电泳。顶行条带表示载体主链,底行条带表示 $\Delta 123$ 插入物,其是通过用限制酶消化从载体中分离的。pcDNA-H77c $\Delta 123$ -HIS和pcDNA-S52 $\Delta 123$ -HIS均用NheI和XbaI消化,而pcDNA-Con1 $\Delta 123$ -HIS用NheI和XhoI消化。从含有H77c、Con1和S52 $\Delta 123$ 的质粒释放的插入物的预期长度分别为762bp、759bp和710bp。将GeneRuler 1kb DNA梯度用作大小标记物(M)。

[0066] 图2示出了 $\Delta 123$ 的转染和纯化。(A-B)通过夹心ELISA分析来自于pcDNA-Con1 $\Delta 123$ -HIS (A)和pcDNA-S52 $\Delta 123$ -HIS (B)瞬时转染到FS293F细胞中的蛋白质表达。将转染后第3、5、7和9天收获的细胞培养物上清液稀释2倍,之后将这些的半对数连续稀释液施加到经二聚体MBP-CD81-LEL¹¹³⁻²⁰¹涂覆的酶免疫测定板上。单体H77c $\Delta 123$ 的半对数连续稀释液(1 μ g/mL)和含有缺少6xHIS标签的HIV gp140的细胞培养物上清液也分别作为阳性和阴性对照包括在内。在这之后添加稀释至1/1000的兔抗HIS抗体,并用稀释至1/1000的HRP缀合的山羊抗兔免疫球蛋白的单次稀释液进行检测。(C-D)亲和色谱后Con1 $\Delta 123$ (C)和S52 $\Delta 123$ (D)通过夹心ELISA分析以相同方式进行。将包含在细胞培养物上清液中的蛋白质施加到带有钴的TALON珠粒上以允许6xHIS标记的 $\Delta 123$ 结合,并收集TALON相互作用之后的上清液作为流过物(flow through)。然后洗涤蛋白质并洗脱成三个单独的级分。适当稀释所有样品以相对于原始制剂补偿其用于ELISA的量。

[0067] 图3示出了 $\Delta 123$ 的凝胶过滤曲线。(A)由在FS293F细胞中的稳定转染产生并使用Superdex 200通过凝胶过滤色谱分析的亲和纯化的H77c $\Delta 123$ 糖蛋白。虚线和峰高表示对应于单体(78)、二聚体(70)、HMW2(59)和HMW1(46) $\Delta 123$ 的级分。(B-C)示出了由第1轮瞬时转染到FS293F细胞中产生的亲和纯化的Con1 $\Delta 123$ (B)和S52 $\Delta 123$ (C)的使用Superdex200进行的凝胶过滤色谱。虚线和峰高分别表示对应于单体、二聚体、HMW2和HMW1的级分,对于Con1和S52而言分别用数字77、68、66、46和78、69、65、46标记。(D-E)显示重复Con1 $\Delta 123$ (D)和S52 $\Delta 123$ (E)向FS293F细胞的瞬时转染(即第2轮)并且产生的 $\Delta 123$ 糖蛋白经亲和纯

化,之后以与第1轮相同的方式通过凝胶过滤色谱进行分析。

[0068] 图4示出了通过SDS-PAGE分析的分级 $\Delta 123$ 的凝胶过滤。经凝胶过滤分级的(A) Con1 $\Delta 123$ (B) 和S52 $\Delta 123$ 的非还原性SDS-PAGE和考马斯染色,将来自两个连续级分中的每一个的20 μ L汇集并装载到5-12%聚丙烯酰胺梯度凝胶上。经凝胶过滤分级的(C) Con1 $\Delta 123$ 和(D) S52 $\Delta 123$ 的还原性SDS-PAGE和考马斯染色,将与非还原性SDS-PAGE相同的体积装载到12%丙烯酰胺凝胶上。装载Bio-Rad宽范围SDS-PAGE标准品作为标记物(M)。

[0069] 图5(A)示出了MAb结合单体和HMW1 $\Delta 123$ 的能力的实例。将单体 $\Delta 123$ (红色) (2 μ g/mL) 和HMW1 $\Delta 123$ (蓝色) (5 μ g/mL) 及作为阴性对照的BSA (绿色) 涂覆到酶免疫测定板上。然后添加一抗的半对数连续稀释液并用适当的HRP缀合的二抗检测结合。使用该技术,然后通过比较每个结合曲线的中点计算一组MAb对于HMW1 $\Delta 123$ 的相对结合,取中点为最高光密度值的一半。对于表7的构建,相对于单体和H77c HMW1 $\Delta 123$ 计算结合的倍数差异。(B) 示出了不同 $\Delta 123$ 株系对一组MAb的反应性。进行单稀释点评估,由此将H77c、Con1和S52 $\Delta 123$ 单体 (5 μ g/mL) 以及作为阴性对照的BSA (5 μ g/mL) 涂覆到酶免疫测定板上。添加一抗的单次稀释液,并用适当的物种特异性HRP缀合的二抗检测结合。

[0070] 图6(A)示出了小规模三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)还原。在37 $^{\circ}$ C下用在PBS pH 9.6中制备的不同浓度的TCEP (0-500mM) 还原涂覆在酶免疫测定板上的H77 $\Delta 123$ 单体30分钟。添加一抗的单次稀释液,包括构象依赖性小鼠H53 (1 μ g/mL) 以及分别表示阳性和阴性对照的兔抗HIS (1/1000) 和人抗CMV R04 (1/1000)。用适当的HRP缀合的二抗检测结合。测试对每种一抗的反应性,一式三份,并将平均光密度值绘制为线图,误差条显示标准偏差。(B) 示出了用TCEP和BMOE处理的单体H77c $\Delta 123$ 。在标记1-7的不同条件下进行TCEP还原和用BMOE交联剂重新折叠后,单体H77c $\Delta 123$ (10 μ g) 的非还原性SDS-PAGE和考马斯染色,所述条件在表8中有描述。将 $\Delta 123$ 样品连同作为对照的单体和HMW1 H77c $\Delta 123$ (各5 μ g) 以及宽范围SDS-PAGE标记物(M)一起装载到5-12%聚丙烯酰胺梯度凝胶上。

[0071] 图7(A)示出用谷胱甘肽处理的单体H77c $\Delta 123$ 。在标记1-5的不同条件下使用氧化还原改组系统,用GSH和GSSG进行重新折叠后单体H77c $\Delta 123$ (10 μ g) 的非还原性SDS-PAGE和考马斯染色,所述条件在表9中有描述。将H77c $\Delta 123$ 样品连同作为对照的单体和HMW1 H77c $\Delta 123$ (各5 μ g) 以及宽范围SDS-PAGE标记物(M)一起装载到5-12%聚丙烯酰胺梯度凝胶上。(B) 示出了用谷胱甘肽处理的单体H77c $\Delta 123$ 的凝胶过滤曲线。使用Superdex 200对未处理的单体H77c $\Delta 123$ 进行的凝胶过滤色谱。(C) 示出了在用2mM GSH和0.4mM GSSG处理10 μ g/ μ L糖蛋白后使用Superdex 200对H77c $\Delta 123$ 进行的凝胶过滤色谱。虚线和峰高表示对应于单体(78)和二聚体(69)的级分。

[0072] 图8(A)示出了小规模DTT还原。在37 $^{\circ}$ C下用在碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液pH 9.6中制备的不同浓度的DTT (0-10mM) 还原涂覆在酶免疫测定板上的H77 $\Delta 123$ 单体30分钟。添加一抗的单次稀释液,包括构象依赖性小鼠H53 (1 μ g/mL) 以及分别表示阳性和阴性对照的兔抗HIS (1/1000) 和人抗CMV R04。用适当的HRP缀合的二抗检测结合。测试对每种一抗的反应性,一式三份,并将平均光密度值绘制为线图,误差条显示标准偏差。(B) 示出了用DTT处理的单体H77c $\Delta 123$ 。在不同条件下(标记为1-12并在表3.6中有描述) 进行DTT还原并使用缓慢稀释方法重新折叠后,单体H77c $\Delta 123$ (10 μ g) 的非还原性SDS-PAGE和考马斯染色。将H77c $\Delta 123$ 样品连同作为对照的单体和HMW1 H77c $\Delta 123$ (各5 μ g) 以及宽范围SDS-PAGE标记

物(M)一起装载到5-12%聚丙烯酰胺梯度凝胶上。(C)示出了使用Superdex 200对未处理的单体H77c Δ 123进行的凝胶过滤色谱。(D)示出了在用1mM DTT处理1 μ g/ μ L糖蛋白后使用Superdex 200对H77c Δ 123进行的凝胶过滤色谱。虚线和峰高表示对应于单体(77-78)、二聚体(69)和HMW Δ 123(59)的级分。

[0073] 图9示出了经DTT处理的 Δ 123和ALA7 Δ 123的抗原性表征。如实施例15中所述,已经通过评估与抗体(A) AR3C (B) CBH4G (C) HC84.27和(D) HCV1的结合表征了经DTT处理的 Δ 123和ALA7 Δ 123。

[0074] 图10示出了使用凝胶过滤色谱对由重新折叠经DTT处理的 Δ 123产生的产物的分析。示出了未处理单体的曲线,接着如实施例14中所述增加用DTT处理的次数(1、2或3次)。

[0075] 图11示出了如实施例14中所述,使用凝胶过滤色谱对在蛋白酶抑制剂存在下重新折叠未重新折叠的 Δ 123单体和 Δ 123重新折叠产生的产物的分析。

[0076] 图12提供了所用HCV分离株的相应E2₆₆₁区的ClustalW比对。H77c (AF009606, G1a, SEQ ID NO:11)、J6 (AF177036, G2a, SEQ ID NO:16)、s52 (GU814263, G3a, SEQ ID NO:13)、ED43 (GU814265, G4a, SEQ ID NO:10)、SA13 (AF064490, G5a, SEQ ID NO:12)、EUHK2 (Y12083, G6a, SEQ ID NO:14)、QC69 (EF108306, G7a, SEQ ID NO:15)。HVR1、HVR2和igVR/VR3以红色/橙色显示。与ED43的氨基酸残基GFLASLFY、YTWGENETD和YRLWHF相对应的残基是CD81结合区。

[0077] 图13示出了针对以下的核苷酸构建体: Δ 123A1a7密码子优化;加下划线的区域对应于限制酶位点GGTACC=KpnI、GGATCC=BamHI、CTCGAG=XhoI及 Δ 123A1a7的蛋白质序列。

[0078] 图14至图14c显示了蛋白质序列的ClustalOmega氨基酸比对:AF009606编码序列(SEQ ID NO:6)、AF009606全长E2(SEQ ID NO:7)、AF009606E2₆₆₁(SEQ ID NO:8)、WT_E2₆₆₁(SEQ ID NO:4)和 Δ 123(SEQ ID NO:3)。加下划线的区域对应于残基630-635。

[0079] 图15(A)示出了用不同浓度的 β -巯基乙醇还原并组装的样品的非还原性SDS-PAGE。左侧示出了精确大小标记,分子量以kDa表示。右侧示出了单体、二聚体和高分子量形式的指示性大小。(B)示出了使用Superdex 200对用100mM BME处理后的(虚线)或未处理的(实线)单体 Δ 123的凝胶过滤色谱。

[0080] 图16示出了在接种了组装HCV蛋白的动物中的抗体滴度。分析来自接种了表15中所列抗原的动物的最终出血结合单体 Δ 123蛋白的能力。示出了每组的抗体滴度倒数。水平线是平均值,上下线条表示标准偏差。使用曼-惠特尼非配对t检验(Mann-Whitney unpaired t-test),2-F和4-F+5-F之间抗体滴度的差异在统计学上显著($p=0.0281$)。Prism v7.0。

[0081] 图17示出了在接种了组装HCV蛋白的动物中对于表位I的抗体滴度。分析来自接种了表15中所列抗原的动物的最终出血结合包含基因型1a H77c序列的残基409-428的合成肽的能力。示出了每组的抗体滴度倒数。水平线是平均值,上下线条表示标准偏差。使用曼-惠特尼非配对t检验确定组间抗体滴度的差异。Prism v7.0。

[0082] 图18示出了在接种了组装HCV蛋白的动物中对于表位III的抗体滴度。分析来自接种了表15中所列抗原的动物的最终出血结合包含基因型1a H77c序列的残基523-549的合成肽的能力。示出了每组的抗体滴度倒数。水平线是平均值,上下线条表示标准偏差。使用曼-惠特尼非配对t检验确定组间抗体滴度的差异。Prism v7.0。

[0083] 图19示出了在接种了组装HCV蛋白的动物中对于基因型2a表位I的抗体滴度。分析来自接种了表15中所列抗原的动物的最终出血结合包含基因型2a J6序列的残基409-428的合成肽的能力。示出了每组的抗体滴度倒数。水平线是平均值,上下线条表示标准偏差。使用曼-惠特尼非配对t检验确定组间抗体滴度的差异。Prism v7.0。

[0084] 图20示出了免疫血清抑制HCV E2与其细胞受体CD81之间的相互作用的能力。分析来自接种了表15中所列抗原的动物的最终出血抑制 (A) H77c G1a E2与CD81和 (B) J6 G2a E2与CD81之间结合的能力。示出了每组的抗体滴度倒数。水平线是平均值,上下线条表示标准偏差。使用曼-惠特尼非配对t检验确定组间抗体滴度的差异。Prism v7.0。

[0085] 图21示出了免疫血清防止肝细胞受基因型1a病毒感染的的能力。分析来自接种了表15中所列抗原的动物的最终出血防止受G1a HCVpp感染的的能力。示出了每组的抗体滴度倒数。水平线是平均值。

[0086] 图22示出了HMW1和单体免疫血清的特异性。将豚鼠血清的连续稀释液添加到恒量HCV1 (A)、HC84-27 (B)、AR3C (C) 和2A12 (D) 中。将抗体添加到单体 Δ 123中,并用抗人Fab2检测结合的MAb。使用曼-惠特尼t检验 (Prism v 7) 比较各组。

[0087] 图23示出了使用组装的 Δ 123分选的B细胞群的FACS图。用抗CD19 Cy7抗体和组装的 Δ 123检测CD19阳性和抗E2阳性B细胞。

[0088] 图24示出了用于测定组装蛋白质的大小的尺寸排阻色谱-多角度光散射。组装的 Δ 123A7 (蓝色) 和组装的 Δ 123 (红色) 样品的UV (A_{280nm}) 信号和摩尔质量的重叠。

[0089] 图25示出了用DTT处理后未组装成HMW形式,用DTT进行第二轮变性,然后进行组装的 Δ 123A7单体的尺寸排阻色谱。单体和HMW物质用箭头表示,表中示出了各自的%。

[0090] 图26示出了用DTT进行变性然后组装的RBD单体的尺寸排阻色谱。单体和HMW物质用箭头表示,表中示出了各自的%。

[0091] 图27示出了用DTT进行变性然后组装的RBDA7单体的尺寸排阻色谱。单体和HMW物质用箭头表示,表中示出了各自的%。

[0092] 图28示出了用DTT进行变性然后组装的env单体的尺寸排阻色谱。HMW物质用箭头表示。

[0093] 表格说明

[0094] 表1示出了瞬时转染条件。

[0095] 表2示出了MAb列表。

[0096] 表3示出了DTT还原的条件。

[0097] 表4示出了用谷胱甘肽进行蛋白质重新折叠的条件。

[0098] 表5示出了TCEP还原的条件。

[0099] 表6示出了 Δ 123的不同寡聚形式的表达。单体、二聚体、HMW2和HMW1的百分比通过将凝胶过滤曲线 (图3B-E) 上的相应峰下面积除以曲线下总面积来计算。使用GE Healthcare Life Sciences的UNICORN控制软件来量化曲线下面积。

[0100] 表7示出了HMW1 Δ 123的抗原性表征。

[0101] 表8示出了TCEP还原和BMOE介导的 Δ 123重新折叠的条件。

[0102] 表9示出了用谷胱甘肽进行H77c Δ 123重新折叠的条件。通过将来自于对谷胱甘肽处理的H77c Δ 123的非还原性SDS-PAGE分析的单体光密度测定值除以二聚体光密度测定值

来计算单体与二聚体的比率(图7A)。使用LI-COR Odyssey系统量化光密度测定值。

[0103] 表10示出了由谷胱甘肽处理的单体H77c Δ 123的多聚体形成的量化。按曲线下总面积的百分比计算凝胶过滤曲线(图7B)上的单体和二聚体峰下面积,并通过将单体峰下面积除以二聚体峰下面积计算单体与多聚体的比率。

[0104] 表11示出了由DTT处理的单体H77c Δ 123的多聚体形成的量化。按曲线下总面积的百分比计算凝胶过滤曲线(图7C-D)上的单体和HMW峰下面积,并通过将单体峰下面积除以多聚体峰下面积计算单体(76min)与多聚体(58min)的比率。

[0105] 表12示出了由DTT处理的单体H77c Δ 123的多聚体形成的量化。按曲线下总面积的百分比计算凝胶过滤曲线(图7B)上的单体和多聚体峰下面积,并通过将单体峰下面积除以多聚体峰下面积计算单体与多聚体的比率。

[0106] 表13示出了使用抗原 Δ 123产生重新折叠蛋白的方法。

[0107] 表14示出了通过不同的重新折叠方法产生的重新折叠蛋白%。

[0108] 表15示出了免疫组。

[0109] 表16示出了免疫血清对单体 Δ 123的反应性的统计分析。

[0110] 表17示出了免疫血清结合H77c表位I的能力的统计分析。

[0111] 表18示出了免疫血清结合H77c表位III的能力的统计分析。

[0112] 表19示出了免疫血清结合J6表位I的能力的统计分析。

[0113] 表20示出了免疫血清阻滞H77c G1a E2与CD81结合的能力的统计分析。

[0114] 表21示出了免疫血清阻滞JFH-1 G2a E2与CD81结合的能力的统计分析。

[0115] 表22示出了免疫血清防止H77c HCV病毒感染肝细胞的能力的统计分析。

[0116] 表23示出了免疫血清防止HCV1结合的能力的统计分析。

[0117] 表24示出了免疫血清防止HC84-27结合的能力的统计分析。

[0118] 表25示出了免疫血清防止AR3C结合的能力的统计分析。

[0119] 表26示出了免疫血清防止2A12结合的能力的统计分析。

[0120] 表27示出了重组蛋白的SEC-MALS。

[0121] 序列表注释

[0122] SEQ ID NO:1:密码子优化的 Δ 123A1a7的DNA构建体。

[0123] SEQ ID NO:2:编码密码子优化的 Δ 123A1a7的DNA序列。

[0124] SEQ ID NO:3:氨基酸序列 Δ 123A1a7。

[0125] SEQ ID NO:4:编码WT E2₆₆₁ (RBD) 的氨基酸序列。

[0126] SEQ ID NO:5: Δ 123E2₆₆₁。

[0127] SEQ ID NO:6:对应于AF009606编码序列的氨基酸残基。

[0128] SEQ ID NO:7:对应于AF009606全长E2蛋白序列的氨基酸残基。

[0129] SEQ ID NO:8:对应于AF009606 E2₆₆₁的氨基酸残基。

[0130] SEQ ID NO:9:N端信号序列。

[0131] SEQ ID NO:10:氨基酸序列ED43。

[0132] SEQ ID NO:11:氨基酸序列H77c。

[0133] SEQ ID NO:12:氨基酸序列SA13。

[0134] SEQ ID NO:13:氨基酸序列s52。

- [0135] SEQ ID NO:14:氨基酸序列EUHK2。
- [0136] SEQ ID NO:15:氨基酸序列QC69。
- [0137] SEQ ID NO:16:氨基酸序列J6。
- [0138] SEQ ID NO:17:对应于缺少C端跨膜结构域和胞质尾的HIV env的氨基酸残基。
- [0139] SEQ ID NO:18:对应于具有N端前导序列的HIV env的氨基酸残基。
- [0140] SEQ ID NO:19:编码密码子H77c Δ 123的DNA序列。
- [0141] SEQ ID NO:20:编码Con1 Δ 123的DNA序列。
- [0142] SEQ ID NO:21:编码s52 Δ 123的DNA序列。
- [0143] SEQ ID NO:22:人胰蛋白酶原信号肽。
- [0144] SEQ ID NO:23:人组织纤溶酶原激活物信号肽 (tPA)。
- [0145] SEQ ID NO:24:六个His标签。

具体实施方式

[0146] 本公开不限于剂的特定筛选程序、剂的特定制剂和各种医学方法,因此可以变化。

[0147] 除非另外明确规定,否则本说明书中的每个实施方案经必要修改适用于每个其它实施方案。

[0148] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解相同的含义。与本文所述那些相似或等同的任何材料和方法均可用于实践或试验本发明。关于本领域的定义和术语以及本领域技术人员已知的其它方法,从业者尤其把注意力贯注到Sambrook等人,1989(同上),Coligan等人Current Protocols In Protein Science,John Wiley&Sons,Inc.,1995-1997,尤其是第1、5和6章,及Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Supplement 47,John Wiley&Sons,New York,1999;Colowick和Kaplan编辑,Methods In Enzymology,Academic Press,Inc.;Weir和Blackwell编辑,Handbook of Experimental Immunology,Vols.I-IV,Blackwell Scientific Publications,1986;Joklik编辑,Virology,第3版,1988;Fields和Knipe编辑,Fundamental Virology,第2版,1991;Fields等人编辑,Virology,第3版,Lippincott-Raven,Philadelphia,Pa.,1996。也可以参考Staby,Rathore和Ahuga编辑,Preparative Chromatography for Separation of Proteins;Wiley,2017,尤其是第3和7章。还有,Wen,Ellis,Pujar编辑,Vaccine Development and Manufacturing,Wiley,2014,尤其是第4、6、8、11章。对于方法和材料,还可以参考W02008022401、W02012016290和W02012068637。

[0149] 定义

[0150] 在整个说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”或诸如“包括(comprises)”或“含有(comprising)”的变型将被理解为暗示纳入所陈述的要素或整体或要素或整体的组,但不排除任何其它要素或整体或要素或整体的组。“由...组成”意指包括并限于短语“由.....组成”之后的任何内容。因此,短语“由.....组成”表示所列要素是必需的或强制的,并且不存在其它要素。“基本上由.....组成”意指包括在该短语之后列出的任何要素,并且限于不干扰或有助于本公开中针对所列要素指定的活性或作用的其它要素。

[0151] 如本文所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一”、“一种(个)”和“所述(该)”包括复数方面。因此,例如,提及“一种组合物”包括单一组合物,以及两种或更多种组合物;提及“一种剂”包括一种剂,以及两种或多种剂;提及“本公开”包括本公开的单个方面和多个方面等。

[0152] 虽然实例说明了由单体HCV E2组装寡聚HCV E2和由单体HIV env组装寡聚HIV env,但本公开不限于这些特定实例并且扩展到组装病毒包膜蛋白和癌抗原用于疫苗生产或离体结合应用。在这方面,所述方法提供了由低级抗原产生高级抗原。提及“高级”抗原意指三聚体或更大倍数,而“低级形式”意指单体或二聚体。术语“抗原”、“物质”和“形式”可互换使用。

[0153] 提及“天然”意指已经使用细胞内的细胞机器组装抗原。术语“组装”和“折叠”或“重新折叠”可互换使用,但“组装”用于表达组装抗原的部分新生性质。提及组装意指“无细胞”组装。在一个实施方案中,组装的抗原与其天然对应物一样是有效或更有效的免疫原。

[0154] 如本文所用,“非中和抗体”是指与病毒抗原结合但不减少或破坏病毒进入的抗体。在一个实施方案中,是指与E2结合但不减少或破坏病毒进入的抗体。关于癌抗原,提及非中和抗体意指不介导肿瘤细胞杀伤的抗体。

[0155] 如本文所用,“中和抗体”是指与病毒抗原结合并且在结合时抑制病毒进入的抗体。在一个实施方案中,是指与E2结合并且在与E2结合时抑制病毒进入的抗体。关于癌抗原,提及中和抗体意指直接或间接介导肿瘤细胞杀伤的抗体。

[0156] 如本文所用,“广谱中和抗体”是指提供针对抗原/HCV抗原的多种基因型或亚型的交叉保护作用的抗体。

[0157] 高级或寡聚形式是抗原的结构形式,包括三聚体和更大的折叠形式。高级抗原或形式或物质由低级形式、抗原或物质组装而成。低级形式包括抗原的单体或二聚体形式。

[0158] 对“对照”的提及将为技术人员所理解并且意指采用在本发明的背景下将产生或可能产生有意义的结果的一种或多种对比物(comparator)。通常,对照是在宿主细胞或无细胞表达系统中产生的对应物。

[0159] 可以使用本说明书中描述的方法工程改造任何病毒包膜抗原。病毒科的非限制性实例包括腺病毒科(Adenoviridae)、非洲类猪瘟病毒(African swine fever-like virus)、沙粒病毒科(Arenaviridae)、动脉炎病毒(Arterivirus)、星状病毒科(Astroviridae)、杆状病毒科(Baculoviridae)、双RNA病毒科(Birnaviridae)、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)、杯状病毒科(Caliciviridae)、圆环病毒科(Circoviridae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、 δ 病毒(Deltavirus)、丝状病毒科(Filoviridae)、黄病毒科(Flaviviridae)、嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)、肝炎病毒科(Hepeviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)、副粘病毒科(Paramyxoviridae)、小RNA病毒科(Picomaviridae)、痘病毒科(Poxyviridae)、呼肠孤病毒科(Reoviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)和弹状病毒(Rhabdoviridae)。特定的病毒包膜抗原来自副粘病毒科、逆转录病毒科和丝状病毒科。

[0160] 病毒包膜抗原的非限制性实例源自病原病毒,诸如流感血细胞凝集素(HA);慢病毒,诸如HIV-1糖蛋白(gp)120,包括R2亚型或HIV-2gp125;冠状病毒,诸如SARS Si糖蛋白;副粘病毒,诸如呼吸道合胞病毒(RSV)F2;或黄病毒,诸如登革病毒E蛋白(Dengue virus E

protein)。

[0161] 一组重要的抗原源自病原体,诸如人的原发性全身性真菌病原体,如粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)和巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)。倾向于依赖免疫受损宿主的重要的机会性真菌病原体包括新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、耶氏肺孢子虫(*Pneumocystis jiroveci*)、念珠菌属(*Candida spp.*)、曲霉菌属(*Aspergillus spp.*)、马尔尼菲青霉菌(*Penicillium mameffei*)和接合菌纲(*Zygomycetes*)、白氏毛孢子菌(*Trichosporon beigelii*)和镰刀菌属(*Fusarium spp.*)。一系列病原真菌与免疫受损的受试者相关,包括患有AIDS、化疗诱导的嗜中性白血球减少症(neutropenia)的那些受试者或正在接受造血干细胞移植的患者等。

[0162] 在一些实施方案中,所述抗原源自微生物,包括细菌、真菌、病毒、藻类、寄生虫(包括外寄生虫或内寄生虫)朊病毒、卵菌、粘液、霉菌、线虫、支原体等。通过非限制性实例的方式,所述微生物选自以下一个或多个目、属或种:不动杆菌属(*Acinetobacter*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)、放线菌(*Actinomycetes*)、放线菌(*Actinomyces*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、博德特氏菌属(*Bordetella*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)、布鲁氏菌属(*Brucella*)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、丹毒丝菌属(*Erysipelothrix*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、弗朗西斯菌属(*Francisella*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、克雷白杆菌属(*Klebsiella*)、军团菌属(*Legionella*)、钩端螺旋体属(*Leptospira*)、李斯特菌属(*Listeria*)、微球菌属(*Micrococcus*)、莫拉氏菌属(*Moraxella*)、摩根菌属(*Morganella*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*) (结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*))、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、奈瑟球菌属(*Neisseria*)、巴斯德菌属(*Pasteurella*)、邻单胞菌属(*Plesiomonas*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、变形菌属(*Proteus*)、普罗威登斯菌属(*Providencia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、链球菌属(*Streptococcus*)、密螺旋体属(*Treponema*)、弧菌属(*Vibrio*) (霍乱弧菌(*Vibrio cholera*))和耶尔森氏菌属(*Yersinia*) (鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia plague*))、腺病毒科、非洲类猪瘟疫病毒、沙粒病毒科(诸如病毒性出血热、拉沙热(*Lassa fever*))、星状病毒科(星状病毒(*astroviruses*))布尼亚病毒科(拉克罗斯(*La Crosse*))、杯状病毒(*Calicivirid*) (诸如病毒(*Norovirus*))、冠状病毒科(冠状病毒(*Corona virus*))、丝状病毒科(诸如埃博拉病毒(*Ebola virus*)、马尔堡病毒(*Marburg virus*))、细小病毒科(*Parvoviridae*) (B19病毒)、黄病毒科(诸如丙型肝炎病毒(*hepatitis C virus*)、登革病毒)、嗜肝DNA病毒科(诸如乙型肝炎病毒(*hepatitis B virus*)、 δ 病毒)、疱疹病毒科(单纯疱疹病毒(*herpes simplex virus*)、水痘带状疱疹病毒(*varicella zoster virus*))、正粘病毒科(流感病毒)、乳多空病毒科(*Papovaviridae*) (乳头瘤病毒(*papilloma virus*))副粘病毒科(诸如人副流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、人呼吸道合胞病毒、小RNA病毒科(普通感冒病毒)、痘病毒科(小痘病毒、口疮病毒、猴痘病

毒)、呼肠孤病毒科(轮状病毒(rotavirus))、逆转录病毒科(人免疫缺陷病毒)、细小病毒科(细小病毒(parovirus))、乳头瘤病毒科(Papillomaviridae)(乳头瘤病毒(papillomaviruses))、甲病毒(alphavirus)、弹状病毒科(狂犬病病毒)、锥虫属(Trypanosoma)、利什曼原虫属(Leishmania)、贾第虫属(Giardia)、毛滴虫属(Trichomonas)、内阿米巴属(Entamoeba)、纳氏虫属(Naegleria)、棘阿米巴属(Acanthamoeba)、疟原虫属(Plasmodium)、弓形虫属(Toxoplasma)、隐孢子虫属(Cryptosporidium)、等孢子球虫属(Isospora)、肠袋虫属(Balantidium)、血吸虫属(Schistosoma)、棘口吸虫属(Echinostoma)、姜片虫属(Fasciolopsis)、支睾吸虫属(Clonorchis)、片吸虫属(Fasciola)、后睾吸虫属(Opisthorchis)、并殖吸虫属(Paragonimus)、假叶目(Pseudophyllidea)(例如,裂头属(Diphyllobothrium))、圆叶目(Cyclophyllidea)(例如,绦虫属(Taenia))。病原线虫包括来自以下目的种:小杆目(Rhabditida)(例如,类圆线虫属(Strongyloides))、圆线目(Strongylida)(例如,钩虫属(Ancylostoma))、蛔科(Ascarida)(例如,蛔虫属(Ascaris)、弓蛔虫属(Toxocara))、旋尾目(Spirurida)(例如,龙线虫属(Dracunculus)、布鲁格丝虫属(Brugia)、盘尾属(Onchocerca)、吴策线虫属(Wuchereria))和有腺纲(Adenophorea)(例如,鞭虫属(Trichuris)和毛线虫属(Trichinella))、原壁菌属(Prototheca)、有害费氏藻(Ptiesteria)、犁头霉属(Absidia)、曲霉菌属(Aspergillus)、芽生菌属(Blastomyces)、念珠菌属(酵母)、斑替枝孢霉属(Cladophialophora)、球孢子菌属(Coccidioides)、隐球菌属(Cryptococcus)、小克银汉霉属(Cunninghamella)、镰刀菌属(Fusarium)、组织胞浆菌属(Histoplasma)、马杜拉分枝菌属(Madurella)、马拉色菌属(Malassezia)、小孢子菌属(Microsporum)、毛霉菌属(Mucor)、拟青霉属(Paecilomyces)、副球孢子菌属(Paracoccidioides)、青霉菌属(Penicillium)、肺孢子虫属(Pneumocystis)、假霉样真菌属(Pseudallescheria)、根霉属菌(Rhizopus)、红酵母属(Rhodotorula)、丝孢菌属(Scedosporium)、孢子丝菌属(Sporothrix)、毛癣菌属(Trichophyton)和毛孢子菌属(Trichosporon)。为避免疑义,病原体可包括新出现的病原体。

[0163] 说明性癌抗原包括CD抗原、糖蛋白、糖脂(神经节苷脂)、碳水化合物(Lewis-Y)血管靶标(VEGF/R)、生长因子和基质或细胞外基质抗原(FAP、腱生蛋白(Tenascin))等。例如,如下所列:KS1/4泛癌抗原、卵巢癌抗原(CA125)、前列腺酸性磷酸酶、前列腺特异性抗原、黑素瘤相关抗原p97、黑素瘤抗原gp75、高分子量黑素瘤抗原(HMW-MAA)、前列腺特异性膜抗原、癌胚抗原(CEA)、多态性上皮粘蛋白抗原、人乳脂肪球抗原、结直肠癌相关抗原、CEA、TAG-72、LEA、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)抗原-38.13、CD19、人B淋巴瘤抗原-CD20、CD33、黑素瘤特异性抗原、神经节苷脂GD2、神经节苷脂GD3、神经节苷脂GM2、神经节苷脂GM3、肿瘤特异性移植类型的细胞表面抗原(TSTA)、病毒诱导的肿瘤抗原、T抗原DNA肿瘤病毒、RNA肿瘤病毒包膜抗原、癌胚抗原-甲胎蛋白、结肠CEA、膀胱肿瘤癌胚抗原、分化抗原、人肺癌抗原L6、L20、纤维肉瘤抗原、人白血病T细胞抗原-Gp37、拟糖蛋白(neoglycoprotein)、鞘脂、乳腺癌抗原、EGFR(表皮生长因子受体)、HER2抗原、多态性上皮粘蛋白、恶性人淋巴细胞抗原-APO-1、分化抗原,包括在胎儿红细胞(原始内胚层)中发现的I抗原,在成人红细胞(植入前胚胎)中发现的I抗原,在胃腺癌中发现的I(Ma),在乳腺上皮细胞中发现的M18、M39,在骨髓细胞中发现的SSEA-1,在结直肠癌中发现的VEP8、VEP9、My1、

VIM-D5、Du56-22,在结肠腺癌中发现的TRA-1-85(血型H)、C14,在肺腺癌中发现的F3,在胃癌中发现的AH6,在胚胎癌细胞中发现的Y半抗原LeY,在A431细胞中发现的TL5(血型A)、EGF受体,在胰腺癌中发现的E1系列(血型B),在胚胎癌细胞中发现的FC10.2,胃腺癌抗原,在腺癌中发现的CO-514(血型Lea),在腺癌中发现的NS-10,CO-43(血型Leb),在A431细胞的EGF受体中发现的G49,在结肠腺癌中发现的MH2(血型ALeb/Ley),在结肠癌中发现的19.9,胃癌粘蛋白,在骨髓细胞中发现的TsA7,在黑素瘤中发现的R24,在胚胎癌细胞中发现的4.2、GD3、D1.1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2和M1:22:25:8,以及在4至8细胞期胚胎中发现的SSEA-3和SSEA-4。

[0164] 如本文所用,术语“人免疫缺陷病毒”或“HIV”是指慢病毒属(Lentivirus)和一部分逆转录病毒科的包膜正义单链RNA成员。随着时间的推移HIV导致获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。如本文所用,该术语是指任何HIV基因型,例如但不限于HIV1或HIV2或其任何分组或亚型。在一个实施方案中,HIV-1来自M、N、O或P组。在一个实施方案中,HIV-1亚型选自A、B、C、D、E、F、G、H、J、K或其流行重组形式(CRF)。HIV编码包膜蛋白糖蛋白(gp)120和env。

[0165] 如本文所用,术语“丙型肝炎病毒”或“HCV”是指属于黄病毒科的肝炎病毒属(Hepacivirus)的包膜正义单链RNA病毒。如本文所用,该术语是指任何基因型的HCV,例如但不限于HCV基因型1(G1)、HCV基因型2(G2)、HCV基因型3(G3)、HCV基因型4(G4)、HCV基因型5(G5)、HCV基因型6(G6)、HCV基因型7(G7)的株系并且可以包括其任何亚型,例如亚型a、b、c、d、e等。HCV编码两种糖蛋白E1和E2,它们是病毒进入宿主细胞内所必需的。

[0166] 如本文所用,“HCV E2”,也称为“E2”,包括来自HCV的任何基因型/亚型的E2多肽。在一个实施方案中,E2源自HCV基因型G1、G2、G3、G4、G5、G6、G7或其嵌合形式。源自直接或间接基于这些基因型中的一种或多种的方式。基因型自然变化并且可以由人进一步修饰,并且涵盖包含典型保守性突变的此类功能变体。包含一个或多个氨基酸突变的功能变体是本领域技术人员已知的,并且可包括包含重组E2胞外域的功能变体。该术语还包括含全长E2多肽的部分的变体,所述部分例如介导受体结合,通过识别构象或其它表位的一种或多种抗体进行的抗体结合和/或介导E1E2二聚体形成。该术语包括E2的修饰形式,诸如增加免疫原性的修饰(δ 123形式)或增加单体产生的修饰(例如,“A1a7”)。

[0167] 一种示例性亲本HCV E2多肽是E2多肽的受体结合部分,其包含基因型H77 1a(E2 661或E2e)的氨基酸384-661或来自另一HCV基因型的相应部分。因此,能够实现的E2多肽包括在没有跨膜结构域的情况下CD81结合所需的全部或部分的胞外域。其它变体可包括裂解或分泌所必需的序列的添加或缺失/破坏。例如,可以包括、缺失或修饰E384TH以改变信号肽裂解和糖蛋白分泌(McCaffrey等人,2007)。在一个实施方案中,E2多肽缺少一个或多个高变区或其部分。在一个实施方案中,E2缺少高变区,诸如高变区1(HVR1)或其部分、高变区2(HVR2)或其部分和基因型间可变区(igVR/VR3)或其部分中的一种或多种。

[0168] 在一个实施方案中,E2缺少HVR1、HVR2和igVR/VR3。在一个实施方案中,E2为 Δ 123。在一个实施方案中,E2包含SEQ ID NO:3、4、5、6、7或8中所示的序列;或保持CD81结合活性的其片段;或与其至少50%,或至少55%,或至少60%,或至少65%,或至少70%,或至少75%,或至少80%,或至少85%,或至少90%,或至少95%,或至少97%,或至少98%,或至少99%相同的序列。

[0169] 在一个实施方案中,E2包含零个或一个或多个突变或破坏的半胱氨酸。因此,在一

个实施方案中,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个半胱氨酸缺失或破坏。在一个实施方案中,这些选自:C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、C569和/或C620。在一个实施方案中,突变或破坏的半胱氨酸是C486、C581和C652。在一个实施方案中,突变或破坏的半胱氨酸是C581、C585和C652。在一个实施方案中,突变或破坏的半胱氨酸是C452、C486、C581和C652。在一个实施方案中,突变或破坏的半胱氨酸是C569、C581、C585和C652。在一个实施方案中,突变或破坏的半胱氨酸是C486、C581和C652。在一个实施方案中,突变或破坏的半胱氨酸是C452、C486、C569、C581、C585和C652。在一个实施方案中,突变或破坏的半胱氨酸是C452、C486、C569、C581、C585、C597和C652。在整个说明书中,包括权利要求,HCV糖蛋白E2的多肽残基的所有编号都基于图14中所示的原型HCV-H77多肽序列,Genbank登录号AF009606 (SEQ ID NO:6)。SEQ ID NO:6的氨基酸残基384至746涵盖成熟形式的E2,在SEQ ID NO:7中单独呈现。本文提及的修饰是参考SEQ ID NO:6中所示的氨基酸编号并如图14所示进行的。

[0170] E₂₆₆₁的一个示例性半胱氨酸突变形式包含下列半胱氨酸的突变或破坏:C581、C585、C652、C486、C452、C597和C569。这种突变体称为“Ala7”。其它半胱氨酸修饰形式的E2在国际公开案第W02012/016290号中有描述,其整体并入本文。

[0171] 如本文所用,“CD81”是指分化簇81,其是四跨膜蛋白超家族的跨膜蛋白并且是HCV宿主受体。

[0172] HCV E2的受体结合结构域(RBD)包含CD81结合基序并且折叠和寡聚成一系列各自含有不同的二硫化物和聚糖排列的不同物质。发明人已经做了大量工作来鉴定单体和二聚体WT E₂₆₆₁和 Δ 123 E₂₆₆₁上的二硫键排列,表明这两种蛋白质,即使是单体蛋白质,实际上也是异源的,并以多种交替的分子内二硫键键合形式存在。

[0173] 当重组产生HCV E2时,通常20-30%是寡聚物,大约70%是单体,这取决于所采用的基因型(如本文所确定)。用半胱氨酸修饰形式诸如Ala7产生更多单体。

[0174] 例如,只有大约20%的E2受体结合结构域(残基384-661)形式,其中高变区1(HVR1)、高变区2(HVR2)和基因型间可变区(igVR或VR3)已经去除,被称为“ δ 123”或“ Δ 123”,其由 δ 123的基因型1a H77c序列稳定转染到FS293F细胞中产生,是HMW形式,相比而言单体为64.9%(图3A)。如本文所示,通过选择产生增加量的寡聚形式的基因型,可以增加该百分比。

[0175] 通常,采用还原和重新折叠方法由不合需要的聚集体再生低级物质。根据本发明,采用还原和重新折叠由单体产生寡聚物或由单体和寡聚物产生寡聚物。

[0176] 在一个实施方案中,本发明提供了由天然HCV E2制备重新折叠的重组寡聚丙型肝炎病毒(HCV)包膜糖蛋白2(E2)的方法,所述方法包括以下步骤:

[0177] (i)使天然E2与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间,所述时间和条件足以还原一个或多个天然半胱氨酸(或二硫键);以及(ii)去除还原剂或使还原的天然E2与氧化剂接触以引发还原的单体E2重新折叠成重新折叠的寡聚HCV E2;

[0178] 其中至少20%的单体在步骤(ii)中转化为寡聚物,并且重新折叠的寡聚HCV E2与单体E2相比,显示出至少减少的与非中和抗体的结合。

[0179] 在一个实施方案中,步骤(i)在步骤(ii)之前进行两次。在一个实施方案中,步骤(ii)在步骤(ii)之前进行三次或更多次。在一些实施方案中,步骤(i)和(ii)再次进行两次

或更多次。

[0180] 在一个实施方案中,重新折叠的寡聚HCV E2显示出选自以下组成的组的至少一种特征:

[0181] (i) 相对于对照天然HCV E2形式或单体E2,与非中和抗体的结合减少;

[0182] (ii) 相对于对照天然HCV E2形式,与中和抗体的结合至少基本上相同;

[0183] (iii) 相对于对照天然HCV E2形式或单体E2,引发较低滴度的非中和抗体的产生;

[0184] (iv) 引发中和抗体的产生;

[0185] (v) 引发广谱中和抗体的产生;

[0186] (vi) 任选地引发较高滴度的中和抗体的产生;和

[0187] (vii) 任选地引发较高滴度的广谱中和抗体的产生。

[0188] 天然HCV E2单体可以有效地产生和从不同HCV E2物质的混合物中有效地纯化。天然单体HCV E2的产生如本文所述或如本领域已知的那样。天然单体和寡聚HCV E2的产生如本文所述或如本领域已知的那样。通常,蛋白质在用编码HCV E2的合适表达载体转化的宿主细胞中重组产生。

[0189] 合适的哺乳动物细胞系包括但不限于BHK、VERO、HT1080、293、293T、FS293F、Expi293、RD、COS-7、CHO、Jurkat、HUT、SUPT、C8166、MOLT4/克隆8、MT-2、MT-4、H9、PML、CEM、骨髓瘤细胞(例如,SB20细胞)和CEMX174可从例如ATCC获得。其它宿主细胞包括但不限于酵母,例如毕赤酵母(*Pichia pastoris*),或昆虫细胞如Sf9细胞。

[0190] 细胞可以在500mL、1L、1.5L、2L、2.5L或3L体积中培养。在一个实例中,使用分批细胞培养过程来培养细胞。在一个实例中,使用灌注细胞培养过程来培养细胞。在一个实例中,在种子培养基和生产培养基中培养细胞。在一个实例中,在搅拌槽式反应器中培养细胞。在一个实例中,该反应器的容积为约1L至约2500L。在一个实例中,反应器为1L反应器、1.5L反应器、2L反应器、2.5L反应器或3L反应器。在一个实例中,在wave生物反应器中培养细胞。在一个实例中,在细胞工厂系统(例如Nunc细胞工厂系统)中培养细胞。

[0191] 合成DNA可以通过分子克隆到含有合适启动子和其它适当转录调控元件的表达载体中重组表达,并转移到原核或真核宿主细胞中以产生重组蛋白。Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版) 描述了此类操作的技术。Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y., 1989; Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York, 1988。

[0192] 例如,用于在酵母中表达的构建体优选含有合成基因,有相关转录和翻译控制序列与其可操作地连接,诸如启动子(诸如GAL 10、GAL7、ADH1、TDH3或PGK)和终止序列(诸如酿酒酵母(*S. cerevisiae*) ADH1终止子)。酵母可以选自以下组成的组:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、毕赤酵母、脆壁克鲁维酵母(*Kluyveromyces fragilis*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)和粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。还参见Yeast Genetics: Rose等人, *A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1990。如本领域已知,可以对核酸分子进行密码子优化以在酵母中表达(参见Sharp和Cowe, *Yeast*, 7: 657-678, 1991)。鉴于本说明书的教导和本领域已知的关于表达载体的信息,本领域的普通

技术人员可以选择适于任何给定细胞类型的载体和控制元件。

[0193] 可用于在宿主细胞系中克隆和表达的载体是本领域熟知的,包括但不限于用于在哺乳动物细胞系或酵母(真菌)细胞中克隆和表达的载体,用于在细菌细胞系中克隆和表达的载体,用于在噬菌体中克隆和表达的载体和用于在昆虫细胞系中克隆和表达的载体。可以使用标准的蛋白质纯化方法回收表达的蛋白质。翻译控制元件已由M.Kozak(例如, Kozak, Mamm Genome, 7 (8) :563-74, 1996; Kozak, Biochimie., 76 (9) :815-21, 1994; Kozak, J Cell Biol, 108 (2) :229-241, 1989; Kozak和Shatkin, Methods Enzymol, 60:360-375, 1979)进行了综述。

[0194] 序列表中提供了编码HCV E2的示例性多核苷酸,并且包括SEQ ID NO:1或2中列出的多核苷酸序列。

[0195] 天然HCV E2可以是单体、二聚体、三聚体、四聚体、五聚体,直至23聚体,包括分子质量大于100kDa或大于200kDa的形式(诸如HMW1或HMW2形式)。可以基于大小、凝胶过滤特征、抗体反应性等来选择单体和寡聚形式。可以通过亲和色谱诸如通过抗体亲和色谱从细胞组分中纯化表达的蛋白质。

[0196] 在一个实施方案中,与用本文所述的方法处理之前的天然HCV E2相比,该方法提高了重新折叠的寡聚HCV E2的纯度。在一个实施方案中,与从细胞培养物中分离的天然寡聚HCV E2相比,该方法提高了重新折叠的寡聚HCV E2的纯度。如本文所用,术语“纯化”或“纯度”是指寡聚HCV E2与污染物即细胞或病毒污染物分开,所述污染物例如但不限于蛋白质、脂质、核酸和碳水化合物。

[0197] 此外,在一个实施方案中,该方法增加样品中(即来自含有单体HCV E2的样品)的寡聚HCV E2的浓度,用如本文所述的方法处理样品使寡聚HCV E2的浓度增加至少10%,或至少20%,或至少30%,或至少40%,或至少50%,或至少60%,或至少70%,或至少80%,或至少90%,或至少95%。在一个实施方案中,所述方法使二聚体的浓度增加至少10%,或至少20%,或至少30%,或至少40%,或至少50%,或至少60%,或至少70%,或至少80%,或至少90%,或至少95%。在一个实施方案中,所述方法使三聚体和/或高级形式的浓度增加至少10%,或至少20%,或至少30%,或至少40%,或至少50%,或至少60%,或至少70%,或至少80%,或至少90%,或至少95%。

[0198] 在一个实施方案中,与天然对照寡聚HCV E2相比,重新折叠的寡聚HCV E2显示出稳定性改变,即热力学稳定性和/或动力学稳定性改变。在一个实施方案中,与天然对照寡聚HCV E2相比,重新折叠的寡聚HCV E2显示出稳定性增加。

[0199] 在一个实施方案中,重新折叠的寡聚HCV E2显示和天然寡聚HCV E2等同的与非中和抗体的结合。在一个实施方案中,寡聚物是二聚体,或三聚体或四聚体或五聚体,直至23聚体。

[0200] 优选HCV E2单体部分还原。当保持与识别构象表位的抗体的一些抗体反应性时,实现部分还原。例如,在本文使用的部分还原方案中可以保留10%、20%或30%的蛋白质构象。

[0201] 在一个实施方案中,还原条件包括大于约7的pH,这取决于所用的还原剂。

[0202] 术语“寡聚物”或“多聚体”包括折叠为三聚体、四聚体等或高分子量(HMW)形式的抗原或E2形式。例如,通过它们在非还原凝胶电泳中的迁移模式,或通过凝胶过滤色谱或通

过它们的抗体反应性来鉴定不同的形式。在一个实施方案中,单体、二聚体、HMW2和HMW8123形式的分子质量分别为约46、97、239和2400。

[0203] 在一个具体实施方案中,低级形式包含二聚体形式或低级形式包含单体形式。

[0204] 在一个实施方案中,寡聚形式是三聚体形式。

[0205] 在一个实施方案中,寡聚形式是三聚体和/或高级形式。

[0206] 在一个实施方案中,寡聚形式是高级形式,诸如本文所述的HMW2或HMW,或如本文所述的其修饰形式。

[0207] 在一个实施方案中,天然E2是E2的修饰形式,其包含受体结合结构域而缺少茎区和跨膜结构域。

[0208] 如本领域已知的,跨膜结构域是残基715-746,茎区是残基662-714。在一个实施方案中,这种形式是WT E2₆₆₁。

[0209] 如本文所述,所有天然形式的HCV E2包含不同的分子内和分子间(对于二聚体和高级形式而言)二硫键键合形式。根据本发明的一个实施方案,将单体还原并重新折叠成寡聚物,将寡聚物还原并重新折叠成寡聚物,或将单体和寡聚物还原并重新折叠成二聚体或寡聚物。

[0210] 在该方法的一个实施方案中,至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或至少70%的单体转化为寡聚物。

[0211] 在另一个实施方案中,至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%,或至少86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、97%、98%、99%的单体转化为寡聚物。

[0212] 在一个实施方案中,寡聚物的表观分子质量大于100kDa。在一个实施方案中,寡聚物的表观分子质量大于200kDa。在一个实施方案中,寡聚物的表观分子质量大于2000kDa。

[0213] 在一个实施方案中,该方法还包括选择产生最高产率的重新折叠的寡聚HCV E2的HCV基因型。在一个实施方案中,HCV基因型选自G1、G2、G3、G4、G5、G6、G7和/或其它HCV基因型。在说明性的非限制性实施方案中,HCV基因型是Con1或S52。

[0214] 在一个实施方案中,与不是通过单体重新折叠制备的对照寡聚HCV E2相比,重新折叠的寡聚HCV E2显示与抗体CBH4G的结合减少。天然寡聚物是并非通过细胞外单体重新折叠制备的对照寡聚HCV E2的实例。

[0215] 在该方法的一个实施方案中,重新折叠的寡聚HCV E2基本上保持了对照寡聚HCV E2结合中和抗体的能力。在该方法的一个实施方案中,寡聚HCV E2基本上保持了对照寡聚HCV E2结合广谱中和抗体的能力。

[0216] 在一个实施方案中,还原剂是可逆性还原剂,并且例如选自DTT或2-巯基乙醇、三(2-羧乙基)膦、还原型谷胱甘肽、巯基乙酸或其它含硫醇的剂。

[0217] 在该方法的一个实施方案中,还原剂是以约0.1-1.0mM采用以引起天然E2部分还原的二硫苏糖醇。

[0218] 在该方法的一个实施方案中,溶液是pH>7-9的缓冲液。

[0219] 在一个实施方案中,在pH 9.6的碳酸盐缓冲液中抗原浓度为1mg/ml。使用0.6mM DTT(最终浓度)并在37℃孵育1小时。用pH6.8的PBS缓慢稀释溶液,抗原浓缩并用pH6.8的PBS交换缓冲液。

[0220] 在一个实施方案中,天然E2(并且因此重新折叠的寡聚物)缺少全部或部分的高变区,诸如高变区1(HVR1)或其部分、高变区2(HVR2)或其部分和/或基因型间可变区(igVR/VR3)或其部分中的一种或多种。

[0221] 受体结合结构域包含可变区HVR1、HVR2和igVR,其通过将免疫应答集中在对病毒入侵不必要的区域并屏蔽广谱中和抗体的表位而在免疫逃避中起作用。实现至少部分HVR2和/或igVR和/或HVR1的缺失,以将免疫应答集中在引发广谱中和抗体的保守性表位上。

[0222] 包含RBD而缺少全部三个可变区的构建体称为如W02008/022401中所述的E2₆₆₁Δ123或Δ123。缺失的区域任选地被W008/022401(其整体并入本文)中描述的柔性接头序列代替,诸如包含选自Gly、Ser、Ala和Arg的残基的至多20个氨基酸的肽序列(例如GSSG或ETHGSSG)。

[0223] 在一个实施方案中,天然E2包含信号序列或蛋白质标签以帮助纯化。在一个实施方案中,信号序列导致蛋白质从细胞中分泌。在一个实施方案中,信号序列是N端信号序列,其包含SEQ ID NO:9中提供的氨基酸序列“MNPLILTFVAAALA”。在一个实施方案中,蛋白质标签是C端His标签。在一个实施方案中,C端His标签包含氨基酸序列“HHHHHH”。

[0224] 发明人已经发现即使是单体E2也是异源的并且显示出不同的分子内二硫化物排列。他们推断单体的还原将为重新折叠更均匀的寡聚物提供良好的起点。

[0225] 在一个实施方案中,天然E2包含选自以下的一个或多个氨基酸残基中的非半胱氨酸取代或突变:C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597、C569和/或C620。令人惊讶的是,即使是有7个半胱氨酸残基被非半胱氨酸残基取代(C452、C486、C569、C597、C581、C585、C652半胱氨酸取代)的HCV E2单体(称为“A1a7”,也重新折叠成更高水平的寡聚物。

[0226] E2包含18个高度保守的半胱氨酸残基,其在ER中形成9个支撑糖蛋白三级结构的分子内二硫键。如W0 12/016290(通过引用整体并入本文)中所述,这些二硫化物中的一些对于CD81结合和MAb H53结合不是必要的。此外,半胱氨酸修饰形式,包括去除七个半胱氨酸残基,显著增加了单体的产生而减少了寡聚物的产生。通常,当E2在宿主细胞中重组产生时,产生不同单体和寡聚形式的混合物。W0 12/016290描述了各种半胱氨酸修饰的HCV E2的产生。本文考虑了W0 12/016290中公开的其它构建体,诸如有2、3或4个选自C452、C486、C569和C597的半胱氨酸被突变或破坏的Ala取代形式。E2₆₆₁在C677处缺少半胱氨酸而具有17个半胱氨酸。

[0227] 在一些实施方案中,天然HCV E2是半胱氨酸修饰形式,诸如HCV E2的Ala4、Ala5、Ala6或Ala7修饰形式,其在重组表达时产生至少40%单体和少于70%寡聚物,或至少50%单体和少于50%的天然形式的寡聚物。

[0228] 如本文所确定的,C620-Ala的诱变阻断了高分子量寡聚物的形成。因此,天然HCV E2形式通常是用于产生高级形式的C620。

[0229] 在另一个广泛的方面,本说明书提供了由单体包膜糖蛋白制备重组寡聚病毒包膜糖蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

[0230] (i) 使天然E2与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间,所述时间和条件足以部分还原一个或多个二硫键;以及

[0231] (ii) 去除还原剂或使来自(i)的E2与氧化剂接触以引发单体E2重新折叠成寡聚包

膜糖蛋白；

[0232] 并且其中至少20%的单体在步骤(ii)中转化为寡聚物,并且寡聚物与单体糖蛋白相比,显示出至少减少的与非中和抗体的结合。

[0233] 在一个实施方案中,步骤(i)在步骤(ii)之前进行两次。在一个实施方案中,步骤(ii)在步骤(ii)之前进行三次。

[0234] 在另一个实施方案中,本说明书实现了包含通过前文所述的还原和重新折叠方法产生的重新折叠的重组寡聚丙型肝炎病毒(HCV)E2糖蛋白的组合物。

[0235] 在一个实施方案中,重新折叠的寡聚蛋白包含SEQ ID NO:3、4、5、6、7、8中所示的氨基酸或其截短或修饰形式或其功能变体。与修饰前形式或任何其它合适的对照相比,功能变体和修饰形式可显示出增强的免疫原性。

[0236] 在一个实施方案中,所述组合物包含通过本文所述的还原和重新折叠方法产生的重新折叠的重组寡聚丙型肝炎病毒(HCV)E2糖蛋白,并且其中与不是通过单体还原和重新折叠制备的对照HMW E2相比,寡聚HCV E2显示出与非中和抗体的结合减少。

[0237] 在一个实施方案中,所述组合物包含通过本文所述的还原和重新折叠方法产生的重新折叠的重组寡聚丙型肝炎病毒(HCV)E2糖蛋白,并且其中与不是通过单体还原和重新折叠制备的对照HMW E2相比,重新折叠的寡聚HCV E2显示出与抗体CBH4G或AR3C的结合减少。

[0238] 在一个实施方案中,所述组合物包含重新折叠的寡聚HCV E2,并且其中与不是通过单体还原和重新折叠制备的对照HMW E2相比,重新折叠的寡聚HCV E2显示出与抗体CBH4G的结合减少。在一个实施方案中,所述组合物包含重新折叠的寡聚HCV E2,并且其中与不是通过单体还原和重新折叠制备的对照HMW E2相比,重新折叠的寡聚HCV E2显示出与抗体AR3C的结合减少。

[0239] 在一个实施方案中,所述组合物包含单体重新折叠的寡聚HCV E2和药学上或生理学上可接受的载体和/或稀释剂。

[0240] 在一个实施方案中,所述组合物还包含佐剂。

[0241] 本领域技术人员将理解,佐剂可以是增强组合物诱导免疫应答的能力的任何剂。在一个实施方案中,佐剂可以通过增加对抗原的免疫应答来起作用。在一个实施方案中,佐剂可以增加Th1和/或Th2免疫应答。在一个实施方案中,佐剂可以是明矾盐或其它矿物佐剂;表面活性剂(tensoactive agent);细菌衍生物;载体或缓释材料或细胞因子诸如Petrovsky等人(2004)和Wilson-Welder等人(2009)描述的那些。在一个实施方案中,佐剂可选自磷酸铝、氢氧化铝、硫酸铝钾(明矾)、磷酸钙、弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant)、弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant)、MF-59、皂苷、QS-21、脂多糖(LPS)、单磷酰脂质A(MPLA)、Th1活化肽(例如IMP321)、TLR-2配体(例如OspA、胞壁酰二肽(MDP)、巨噬细胞活化脂肽-2(MALP-2))、CpG佐剂、百日咳毒素、热不稳定性毒素(LTK63和LT-R192G)、白喉毒素、咪喹莫特(Imiquimod)、Addavax、ISCOMATRIX、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-12、IL-6、IL-4、IL-2、IL-1、IFN- γ 、AS04(含有MPLA和QS-21的脂质体制剂)、甘油和油乳剂,诸如石蜡、矿物油、羊毛脂、角鲨烯(squalene)、ISA-70和montanide。在一个说明性实施方案中,佐剂是基于皂苷的佐剂。在一个相关方面中,佐剂是基于皂苷的佐剂,其还包含胆固醇和甾醇,其说明性实例为ISCOMATRIX佐剂。在一个说明性实施方案

中,佐剂为MF59。在一个说明性实施方案中,佐剂为Addavax。在一个实施方案中,佐剂为碳水化合物佐剂,例如葡聚糖、右旋糖苷、香菇多糖、葡甘露聚糖或半乳甘露聚糖。

[0242] 在一个实施方案中,本说明书提供了包含重新折叠的寡聚HCV E2的组合物在治疗或预防HCV感染中或在制备用于治疗或预防HCV感染的药物中的用途。

[0243] 在一个实施方案中,本说明书提供了包含重新折叠的寡聚HCV E2的组合物在诊断或监测HCV感染或监测抗HCV治疗方案中或在制备用于诊断或监测HCV感染或监测抗HCV治疗方案的诊断剂中的用途。

[0244] 在一个实施方案中,所述组合物包含超过70重量%或超过80重量%的三聚体形式或三聚体和高级形式的HCV E2。

[0245] 在一个实施方案中,所述组合物包含超过70重量%或超过80重量%的二聚体HCV E2。

[0246] 在一个实施方案中,所述组合物包含超过70重量%或超过80重量%的高级形式的HCV E2糖蛋白。

[0247] 在一个实施方案中,本说明书提供了在受试者或患者中引发免疫应答的方法,所述方法包括在一定条件下向受试者或患者施用有效量的包含如本文所述的重新折叠的寡聚HCV E2的组合物一段时间,所述时间和条件足以引发免疫应答。

[0248] 根据这些实施方案,所述组合物通常在一定条件下施用一段时间,所述时间和条件足以引发包括产生广谱中和抗体的免疫应答。本发明的组合物可以作为单剂量或单次应用施用。可替代地,所述组合物可以涉及重复剂量或应用,例如所述组合物可以施用2、3、4、5、6、7、8、9、10次或更多次。

[0249] 本发明还提供了在受试者或患者中引发免疫应答的方法,所述方法包括向受试者或患者施用有效量的包含如本文所述的重新折叠的寡聚HCV E2的组合物。本发明还考虑了一种组合物,尤其是用于使受试者对丙型肝炎病毒感染免疫的疫苗组合物,其包含如本文所述的重新折叠的寡聚HCV E2。

[0250] 如本文所用的术语“疫苗”是指包含至少一种在受试者中诱导免疫应答的免疫活性组分和(可能但不一定)一种或多种增强所述活性组分的免疫活性的附加组分(例如佐剂)的药物组合物。疫苗可另外包含药物组合物典型的其它组分。疫苗的免疫活性组分包括组装的高级抗原,诸如重新折叠的寡聚HCV E2成分。术语“疫苗”和“疫苗组合物”在本发明中可互换使用。

[0251] 本发明中考虑到的“受试者”是人或动物,包括实验室或本领域公认的试验或载体动物。“患者”包括需要治疗或防治的人受试者。

[0252] 在一个实施方案中,本说明书还实现了一种使受试者对与抗原相关的病状免疫的方法,其包括向受试者施用包含如本文所述的组装或重新折叠的寡聚抗原的组合物。

[0253] 在一个实施方案中,本说明书还实现了一种使受试者对HCV感染免疫的方法,其包括向受试者施用包含如本文所述的细胞外重新折叠的寡聚HCV E2的组合物。

[0254] 在一个实施方案中,本说明书还实现了治疗或预防受试者中的HCV感染的方法,其包括在一定条件下向受试者施用包含如本文所述的细胞外重新折叠的寡聚HCV E2的组合物一段时间,所述时间和条件足以治疗或预防HCV感染。

[0255] 如本文所用的术语“有效量”,包括“治疗有效量”和“防治有效量”,是指本发明的

组合物,呈单剂量或作为系列或缓释系统的一部分,在一些受试者中提供所需治疗、预防或生理作用的足够量。有时可连同所需治疗作用一起表现出不良作用,例如副作用;因此,从业者确定适当的“有效量”时平衡了潜在利益与潜在风险。根据受试者的物种、年龄和一般状况、施用方式等,所需组合物的精确量将在受试者之间变化。因此,也许不可能指定确切的“有效量”。然而,本领域的普通技术人员可以使用常规技术或实验测定任何个别情况下的适当“有效量”。本领域的普通技术人员将能够基于诸如组合物或其它剂的在先施用、受试者的大小、受试者症状的严重性或受感染群体中症状的严重程度、病毒载量及选择的特定组合物或施用途径等因素来测定所需的量。

[0256] 术语“治疗”是指至少一些受试者中,在与抗原诸如E2抗原和HCV感染相关的病状的一种或多种症状方面或在发展HCV晚期症状的风险或传播HCV的风险方面的任何可测量的或统计学显著的改善。

[0257] 术语“预防”和“防治”等可互换使用,包括将本发明的组合物施用给不知道被HCV感染的受试者,以预防或减弱后续感染或降低受感染的风险或降低病状或与HCV感染相关的病状的体征的严重程度或发作。

[0258] 疫苗组合物的施用通常是为了防治的目的。组合物的防治性施用用于预防或减弱任何后续感染。在一个实施方案中,疫苗组合物用于预防受试者再感染病原体。“药理学上可接受的”组合物是受体患者耐受的组合物。考虑施用有效量的疫苗。“有效量”是足以实现所需生物效应,诸如诱导足够的体液或细胞免疫的量。这可取决于疫苗的类型、受者的年龄、性别、健康状况和体重。所需生物效应的实例包括但不限于无症状产生、症状减轻、组织或鼻分泌物中的病毒滴度降低、对丙型肝炎病毒感染的完全防御,以及对丙型肝炎病毒感染的部分防御。

[0259] 在一些实施方案中,如果本发明的疫苗或组合物的存在在受体患者的生理学方面导致可检测的变化,所述变化增强针对传染性丙型肝炎病毒的至少一个株系的至少一种原发性或继发性体液或细胞免疫应答或表明所述应答增强,则本发明的疫苗或组合物具有生理学意义。施用疫苗组合物以防御病毒感染。“防御”不一定是绝对的,即,与患者对照群体或对照组相比,如果存在统计学显著的改善,则不需要完全预防或根除丙型肝炎感染。防御可以限于降低丙型肝炎病毒感染症状的发作的严重程度或快速性。

[0260] 在一个实施方案中,本发明的疫苗组合物在感染发作之前(以预防或减弱预期的感染)或在感染开始之后提供给受试者,从而防御病毒感染。在一些实施方案中,在感染发作之前或之后向受试者提供本发明的疫苗组合物,以减少受试者之间的病毒传播。

[0261] 还应理解,本发明的组合物可作为唯一的活性药剂施用,或与一种或多种剂组合使用以治疗或预防病毒或癌症病状,诸如丙型肝炎感染或与HCV感染相关的症状。与本发明的组合物或组合物的组合呈组合施用的其它剂包括用于由HCV感染引起的疾病的或通过直接或间接机制抑制HCV病毒复制的治疗剂。这些剂包括但不限于宿主免疫调节剂(例如,干扰素- α 、聚乙二醇化干扰素- α 、复合干扰素、干扰素- β 、干扰素- γ 、CpG寡核苷酸等);抑制宿主细胞功能的抗病毒化合物,诸如肌苷一磷酸脱氢酶(例如,利巴韦林(ribavirin)等);调节免疫功能的细胞因子(例如白细胞介素2、白细胞介素6和白细胞介素12);增强1型辅助T细胞应答的发展的化合物;干扰RNA;反义RNA;包含HCV抗原或针对HCV的抗原佐剂组合的疫苗;与宿主细胞组分相互作用以通过抑制HCV病毒复制的内部核糖体进入位点(IRES)起始

翻译步骤而阻断病毒蛋白合成或与靶向膜蛋白的病毒孔蛋白家族例如HCV P7等的剂一起阻断病毒颗粒成熟和释放的剂;以及通过靶向参与病毒复制的病毒基因组的其它蛋白质而抑制HCV复制和/或干扰其它病毒靶标的功能的任何剂或剂组合,诸如NS3/NS4A蛋白酶、NS3解旋酶、NS5B聚合酶、NS4A蛋白和NS5A蛋白的抑制剂。

[0262] 根据另一个实施方案,本发明的药物组合物还可包含HCV生命周期中的靶标,包括但不限于解旋酶、聚合酶、金属蛋白酶、NS4A蛋白、NS5A蛋白和内部核糖体进入位点(IRES)的其它抑制剂。

[0263] 施用通常在一定条件下持续一段时间,所述时间和条件足以引发免疫应答,包括产生E2特异性抗体或细胞免疫应答。免疫原性组合物可以便利的方式施用,例如通过肺部、口服、静脉内(水溶性)、腹膜内、肌肉内、皮下、皮内、鞘内或栓剂途径或植入(例如使用缓释制剂)。施用可以是全身性的或局部的,但全身性更方便。考虑到的其它施用途径是通过贴剂、细胞转移、植入、舌下、眼内、局部、口服、直肠、阴道、鼻腔或透皮。

[0264] 如本文所用,“免疫应答”是指身体作为整体对本发明组合物的存在的反应,其包括产生抗体和发展对组合物的免疫力。因此,对抗原的免疫应答还包括在受试者中发展对目标抗原的体液和/或细胞免疫应答。“体液免疫应答”由浆细胞产生的抗体介导。“细胞免疫应答”是由T淋巴细胞和/或其它白细胞介导的免疫应答。如本文所用,“抗体滴度”可定义为免疫后血清中,产生的值大于每个受试者的免疫前样品的值的最高稀释度。

[0265] 本发明的实施方案还提供了用于评估对重新折叠的寡聚抗原(诸如HCV E2)的免疫应答的测定法。所述测定法可以包括体内测定法,诸如测量抗体应答和迟发型超敏反应的测定法。在一个实施方案中,测量抗体应答的测定法主要可以测量B细胞功能以及B细胞/T细胞相互作用。对于抗体应答测定,可以在抗原激发后比较血液中的抗体滴度。

[0266] 本说明书提供了产生针对如本文所述的重新折叠的寡聚抗原(诸如HCV E2)的纯化抗体的方法,其包括:向受试者施用有效量的重新折叠的寡聚抗原(诸如HCV E2);以及纯化产生的抗体。

[0267] 在另一个实施方案中,本发明提供了针对重新折叠的寡聚抗原(诸如HCV E2)产生的抗体。特异性抗体识别组装抗原,而不能识别天然抗原和/或反之亦然。抗体可以是多克隆的或单克隆的。此外,通常使用相关领域中技术人员已知的标准,可以选择抗体用于诊断、预后、治疗、防治和筛选目的。

[0268] 术语“一种抗体”和“多种抗体”包括多克隆和单克隆抗体以及源自单克隆抗体的所有不同形式,包括但不限于全长抗体(例如具有完整Fc区)、抗原结合片段,包括例如,Fv、Fab、Fab'和F(ab')₂片段;及使用重组方法产生的抗体来源的多肽,诸如单链抗体。如本文所用的术语“一种抗体”和“多种抗体”还指例如在转基因动物中或通过噬菌体展示产生的人抗体,以及抗体、人或人源化抗体、灵长类抗体或去免疫化抗体。还包括可以是治疗上可接受的其它形式的抗体及其抗原结合片段,例如源自软骨海洋动物或骆驼科,或来自基于此类抗体的文库的单结构域抗体。片段化或修饰形式的抗体的选择还可以涉及考虑片段或修饰形式对抗体或片段的半衰期的任何影响。

[0269] 在一些实施方案中,抗体与药学上或药理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂一起提供。在其它实施方案中,选择抗体用于诊断或预后。在一些实施方案中,提供了包含重新折叠的寡聚形式的HCV E2糖蛋白抗体的药盒。

[0270] “药学上可接受的载体和/或稀释剂”是药物媒介物,由并非不合需要的材料组成,即,其本身或与活性组合物一起不太可能引起显著的不良反应。载体可包括所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂,用于调节张力、增加或降低吸收或清除率的剂,用于维持pH的缓冲剂,螯合剂,膜或屏障穿过剂。药学上可接受的盐是并非不合需要的盐。所述剂或包含所述剂的组合物可以呈药学上可接受的无毒盐的形式施用,诸如酸加成盐或金属络合物。

[0271] 对于口服施用,可将组合物配制成固体或液体制剂,诸如胶囊、丸剂、片剂、锭剂、粉剂、混悬剂或乳剂。在制备口服剂型的组合物时,可以采用任何常用的药物介质,例如,在口服液体制剂(例如混悬剂、酏剂和溶液)的情况下,采用水、乙二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂、悬浮剂等;在口服固体制剂(例如粉剂、胶囊和片剂)的情况下,采用载体诸如淀粉、糖、稀释剂、制粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。由于其易于施用,片剂和胶囊代表最有利的口服剂量单位形式,在这种情况下显然采用固体药物载体。片剂可含有粘合剂,诸如黄耆胶、玉米淀粉或明胶;崩解剂,诸如海藻酸;和润滑剂,诸如硬脂酸镁。如果需要,可以通过标准技术为片剂包糖衣或肠溶衣。可以将活性组合物包封以使其稳定通过胃肠道。参见例如国际专利公开第W0 96/11698号。

[0272] 对于肠胃外施用,可将组合物溶解在载体中并作为溶液或混悬剂施用。对于透粘膜或透皮(包括贴剂)递送,使用本领域已知的适当渗透剂来递送所述组合物。对于吸入,递送使用任何方便的系统,诸如干粉气溶胶、液体递送系统、空气喷射雾化器、推进剂系统。例如,制剂可以呈气溶胶或雾的形式施用。所述组合物还可以呈持续递送或持续释放形式递送。例如,可生物降解的微球或胶囊或能够持续递送的其它聚合物构型均可包括在所述制剂中。可以修改制剂以改变药代动力学和生物分布。关于药代动力学的一般讨论,参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Company,Easton,PA, U.S.A.1990(同上)。在一些实施方案中,可以将所述制剂掺入脂质单层或双层,诸如脂质体或胶束。本领域已知的靶向疗法可用于将剂更准确地递送至某些类型的细胞或组织。

[0273] 活性剂的实际施用量及施用速率和时程将取决于疾病的性质和严重程度。治疗处方(例如对剂量的决定、定时等)在一般从业者或专家的职责内,并且通常考虑了个别患者的病状、递送位点、施用方法和从业者已知的其它因素。技术和方案的实例可以在Remington's Pharmaceutical Sciences,1990(同上)中找到。

[0274] 可以制备的持续释放制剂对于诱导免疫应答特别方便。持续释放制剂的实例包括含有多肽的固体疏水性聚合物的半渗透性基质,所述基质为成形制品的形式,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯、L-谷氨酸和L-谷氨酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸使得分子能够释放100天以上,但是某些水凝胶释放蛋白质的时间期限较短。可以使用小的(约200-800埃)单层类型的脂质体,其中脂质含量大于约30%胆固醇,所选择的比例经调整用于最佳治疗。

[0275] 蛋白质的稳定化可以通过改变巯基残基,从酸性溶液中冻干,控制水分含量,使用适当的添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现。蛋白质的体内半衰期可以使用本领域已知的技术(包括例如通过其它元件如聚乙二醇(PEG)基团的附连)来延长。

[0276] 考虑了本领域所公开的初免-加强 (Prime-boost) 免疫策略。参见例如国际公开第 WO/2003/047617 号。因此,组合物可以是疫苗、初免剂或加强剂的形式。

[0277] 在一个实施方案中,本说明书提供了一种药盒或一种固体或半固体基质,其包含含有如本文所述的还原和重新折叠的寡聚 HCV E2 形式的组合物。

[0278] 术语“分离的”意指基本上或本质上不含在天然状态下通常与之相伴的组分材料。例如,“分离的核酸分子”是指与在自然发生状态下其侧翼的序列分离的核酸或多核苷酸,例如,DNA 片段,其已经从通常与该片段相邻的序列上去除。非限制性地,分离的核酸、多核苷酸、肽或多肽可以指通过纯化分离的天然序列或通过重组或合成方法产生的序列。在一些实施方案中,纯化的重新折叠的寡聚 HCV E2 纯度至少为 95 至 99%。

[0279] 本领域技术人员将理解,通过本文所述的方法产生的重新折叠的寡聚物 HCV E2 可以通过本领域技术人员已知的任何方法纯化,包括例如以下步骤中的一个或多个:离心、微滤、抗体纯化、深度过滤超滤、渗滤、沉淀、珠粒色谱(例如尺寸排阻色谱、离子交换色谱或亲和色谱)、膜吸附剂(例如离子交换色谱或亲和色谱)。在一个实例中,通过本文所述的方法产生的重新折叠的寡聚 HCV E2 包含蛋白质标签,诸如有助于纯化重新折叠的寡聚 HCV E2 的 HIS 标签。

[0280] 在一个实施方案中,本说明书实现了一种由重组 HCV E2 制备重新折叠的重组寡聚丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜糖蛋白 2 (E2) 的方法,其中所述重组 E2 为单体 E2 或包含单体和寡聚重组 E2 的混合物,所述方法包括以下步骤:(i) 使重组 E2 与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间,所述时间和条件足以还原一个或多个单体二硫键;以及(ii) 去除还原剂或使所述单体与氧化剂接触以引发重组 E2 重新折叠成寡聚 HCV E2;其中重新折叠的重组寡聚 E2 包含比重折叠(ii)之前的重组 E2 多至少 20% 的寡聚物并且重新折叠的寡聚 HCV E2 与重组单体 E2 相比,显示出与非中和抗体的结合减少。

[0281] 在一些实施方案中,重新折叠的寡聚 E2 包含 E2 的二聚体、三聚体和/或高级形式。

[0282] 另一方面,本说明书提供了一种由天然包膜糖蛋白制备重新折叠的重组寡聚病毒包膜糖蛋白的更通用的方法,所述方法包括以下步骤:(i) 使天然 E2 与包含还原剂的溶液在一定条件下接触一段时间,所述时间和条件足以部分还原一个或多个单体二硫键或天然半胱氨酸;以及

[0283] (ii) 去除还原剂或使还原的天然 HCV E2 与氧化剂接触以引发还原的单体包膜糖蛋白重新折叠成寡聚包膜糖蛋白;

[0284] 并且其中至少 20% 的单体在步骤(ii)中转化为重新折叠的寡聚物,并且寡聚物与单体糖蛋白相比,显示出至少与非中和抗体的结合减少。

[0285] 本领域技术人员将理解,一旦产生如所述的高级抗原,就可以通过本领域技术人员已知的任何方法纯化。例如,“纯化”可包括以下步骤中的一个或多个:离心(例如超速离心)、色谱(例如尺寸排阻色谱、离子交换色谱或亲和色谱)和/或膜吸附剂(例如离子交换色谱或亲和色谱)、过滤(例如膜过滤、超滤或渗滤)。

[0286] 本领域技术人员将理解,可以将纯化的高级抗原配制成药物制剂,诸如疫苗组合物。此类组合物可包含以下一种或多种:佐剂、赋形剂、粘合剂、防腐剂、载体偶联剂、缓冲剂、稳定剂、乳化剂、润湿剂、非病毒载体和促转染化合物。技术人员将进一步理解,此类疫苗组合物可以是冻干的。在一个实施方案中,所产生的疫苗组合物适于人使用。在另一个实

施方案中,所述疫苗适于兽医使用。

[0287] 如本文所述的高级抗原或组合物可用于结合/检测抗原特异性免疫细胞。在一个实施方案中,免疫细胞为B细胞。在一个实施方案中,免疫细胞为T细胞。检测到抗原性免疫细胞表明受试者已经感染了与抗原相关的病原体和/或受试者已经接种了抗原疫苗。在一个实施方案中,如本文所述的高级抗原或如本文所述的组合物可用于检测和/或分离对包膜病毒有特异性的B细胞。在一个实施方案中,包膜病毒是HCV。在一个实施方案中,包膜病毒是HIV。

[0288] 本领域技术人员将理解,本发明的高级抗原适合用于诊断测定和/或免疫细胞的分离。在一个实施方案中,高级抗原可以在流式细胞术中用作免疫细胞的染剂或标记物。在一个实施方案中,高级抗原与标记物、染料或荧光团复合以允许使用流式细胞术进行检测。在一个实施方案中,标记物为d-生物素。

[0289] 免疫细胞的分离可涉及“四聚体测定”或“四聚体染色”,例如如Altman等人(1996),Vollers等人,2008和Dolton等人,2015中所述,其中如本文所述的高级抗原代替了所述测定中主要组织相容性复合物(MHC)四聚体的作用。

[0290] 在一个实施方案中,本发明提供了一种检测和/或分离对HCV有特异性的免疫细胞/B细胞的方法,其包括:i)用本文所述的高级抗原标记对HCV有特异性的免疫细胞/B细胞以及ii)通过细胞计数检测和/或分离标记的免疫细胞/B细胞。

[0291] 对变体的提及包括部分、衍生物和化学类似物。考虑到的化学类似物包括侧链的修饰、合成期间非天然氨基酸和/或其衍生物的掺入以及接头或交联剂的使用或尤其是施加构象限制的其它方法。

[0292] 本公开通过组装方法的以下非限制性实例和组装的高级抗原的特征而完成。如上所述,尽管使用肝炎和HIV包膜抗原说明了本发明,但本发明扩展到使用本发明方法产生的抗原,由低级抗原形成高级寡聚物以便增强抗原的抗原性和免疫原性。如本文所述,使用本领域已知的一系列技术进一步表征高级抗原。然而,迄今为止的分析显示,通过本文所述的还原和组装方法产生的组装寡聚物显示出细胞内产生的对照抗原未显示出的抗体结合特性,因此本发明组合物可以在此基础上区别于现有技术的抗原。

[0293] 实施例

[0294] 实施例1:表达载体和质粒

[0295] 克隆。使HCV E2 Δ 123的DNA序列与C端6x组氨酸(HIS)标签(SEQ ID NO:24)融合,并克隆到pcDNA3.1哺乳动物表达载体(Invitrogen)中。通过CSL克隆Con1基因型1b(G1b) Δ 123(SEQ ID NO:20)。H77c基因型1a(G1a) Δ 123(SEQ ID NO:19)也通过CSL克隆,但是克隆到专有的CSL-修饰的pcDNA3.1载体中。将含有H77c Δ 123和Con1 Δ 123的所得质粒分别命名为pcDNA-H77c Δ 123-HIS和pcDNA-Con1 Δ 123-HIS。使用T4DNA连接酶将S52G3a Δ 123的DNA序列(SEQ ID NO:21)连接到pcDNA3.1的NheI和XbaI位点,以产生pcDNA-S52 Δ 123-HIS。

[0296] DNA表达和纯化。使用热休克方法(Froger和Hall,2007),将pcDNA-Con1 Δ 123-HIS和pcDNA-S52 Δ 123-HIS转化到DH5 α 大肠杆菌(*Escherichia coli*)中,然后使其在Luria-Bertani (LB) 氨苄青霉素(100 μ g/mL)琼脂板上生长。在含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的LB肉汤中培养单菌落,并使用QIAGEN质粒maxi prep试剂盒根据制造商的建议提取DNA质粒。为了证实克隆的质粒成功连接和按比例增加(scale up),分别用NheI和XhoI及NheI和

XbaI限制酶消化来自maxi prep的pcDNA-Con1 Δ 123-HIS和pcDNA-S52 Δ 123-HIS。然后将所得消化物进行琼脂糖凝胶电泳,并使用Gel Doc XR+系统(Bio-Rad Laboratories)和Quantity One 1-D分析软件(Bio-Rad Laboratories)观察凝胶,以确认预期的限制模式。还使用BigDye Terminator v3.1化学法对质粒进行测序(由Micromon进行),并使用CLC Sequence Viewer(QIAGEN)和FinchTV(Geospiza)分析序列。

[0297] 实施例2:蛋白质表达和纯化

[0298] 瞬时转染。将源自人胚肾293细胞系的FreeStyle 293-F (FS293F) 细胞(Invitrogen)以150mL按 1×10^6 个活细胞/mL接种在1L Erlenmeyer细胞培养瓶(Corning)中,并保持FreeStyle 293 (FS293) 表达培养基(Invitrogen)中。将细胞使用Steri-Cycle CO₂培养箱(Thermo Electron Corporation)在37°C下在含8%CO₂的潮湿气氛中并且在以4x相对离心力(RCF)转动的轨道振荡器上孵育。使用293fectin转染试剂(Invitrogen),根据制造商的说明,使用表1中所示的体积,进行pcDNA-Con1 Δ 123-HIS和pcDNA-S52 Δ 123-HIS向FS293F细胞中的瞬时转染。在转染后的第1天,添加100mL FS293表达培养基,将总转染体积提高至250mL。细胞培养物还补充有0.5%羽扇豆蛋白胨(Solabia Biotechnology)和0.02%Pluronic F-68(Gibco)。在转染后的第3、5和7天进行半培养基更换,由此通过在300 \times RCF下离心5分钟收获一半细胞培养物上清液(125mL)。将团块化细胞重新悬浮于125mL新鲜FS293表达培养基中,同时补充0.5%羽扇豆蛋白胨和0.02%Pluronic F-68,然后返回细胞培养瓶中。最后,在转染后的第9天进行细胞培养物上清液的完全收获(250mL)。将所有收获的上清液在15,344 \times RCF下进一步离心30分钟,弃去团块以去除残留的细胞和细胞碎片。在收获的每一天使用台盼蓝染料排除法和血细胞计数器进行细胞计数以测定细胞密度和活力。

[0299] 亲和色谱。将含有分泌的HIS标记的 Δ 123糖蛋白的细胞培养物上清液施加到10mL(即1倍柱体积)带有钴的TALON金属亲和树脂(Clontech)上,在摇床上于室温(RT)下保持2小时,以允许结合HIS-标记的蛋白质。用20倍柱体积的洗涤缓冲液(50mM磷酸钠、300mM氯化钠,pH7.0)以5mL/分钟的流速洗涤珠粒两次,并用5倍柱体积的洗脱缓冲液(50mM磷酸钠、300mM氯化钠、200mM咪唑,pH7.0)以1mL/分钟的流速洗脱。使用截留分子量(MWC0)为30kDa的Amicon Ultra离心过滤装置(Merck Millipore)浓缩洗脱液中所含的蛋白质,在使用盐酸(HCl)调至pH 6.8(PBS pH 6.8)的磷酸盐缓冲盐水(PBS,Gibco)中洗涤,并在4°C下储存直至使用。

[0300] 实施例3:凝胶过滤色谱

[0301] 使用ÄKTA快速蛋白质液相色谱(FPLC)系统(GE Healthcare),在Superdex 200制备级16/600柱(GE Healthcare)上对蛋白质进行凝胶过滤色谱。使用经过滤和脱气的pH 6.8的PBS作为电泳缓冲液,以0.5mL/分钟的流速进行电泳。汇集含有所需寡聚物质的级分,然后使用MWC0为10kDa的Amicon Ultra离心过滤装置浓缩,并储存在pH6.8的PBS中直至使用。在280nm的光密度(OD₂₈₀)下使用1cm路径长度的比色皿,通过分光光度法测定蛋白质浓度,并使用以下公式以mg/mL计算:

[0302] 消光系数 \times OD₂₈₀下的吸光度

[0303] 使用 Δ 123的氨基酸序列确定消光系数,其使用以下公式计算:

[0304] 分子量(Da) / ((5690 \times 色氨酸数量) + (1280 \times 酪氨酸数量))

[0305] 实施例4:聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

[0306] 在适当的还原或非还原条件下,通过十二烷基硫酸钠(SDS)-PAGE分析蛋白质。为了还原SDS-PAGE,将蛋白质样品在含有2% (v/v) β -巯基乙醇的1x样品缓冲液中在100℃下加热5分钟,然后连同宽范围SDS-PAGE标准品(Bio-Rad Laboratories)一起装载到12%丙烯酰胺凝胶上。使用立式电泳装置(CLP)在1x电泳缓冲液(25mM Tris碱、192mM甘氨酸、0.1%SDS,pH8.3)中在180V下进行电泳~1.5小时。非还原性SDS-PAGE以相同方式进行,但是用4-12%聚丙烯酰胺梯度凝胶而在样品缓冲液中不含 β -巯基乙醇。凝胶用0.25% (v/v) 考马斯亮蓝R-250(Coomassie brilliant blue R-250) (Bio-Rad Laboratories)、10% (v/v) 乙酸和50% (v/v) 甲醇染色,然后用10% (v/v) 乙酸和50% (v/v) 甲醇脱色,并使用Odyssey红外成像系统(LI-COR)扫描。还使用Odyssey系统对条带强度进行定量。

[0307] 实施例5:抗体

[0308] 单克隆抗体(MAb) AR3A、AR3B、AR3C和AR3D是来自The Scripps Research Institute的Mansun Law博士的善意馈赠(Law等人2008)。CBH-4B、CBH-4D、HC-11和HCV-1是来自Standford University的Steven Founng博士的善意馈赠。H52和H53是Jeaun Dubuisson博士和Harry Greenberg博士的善意馈赠。MAb 1、7、10、12、16、20、24和60由我们的实验室与CSL Ltd合作生产(表2)。合适的抗体组在文献中有描述,例如Keck等人PLoS Pathogens: 8(4) e1002653,2012年4月。而且,相对于天然对照寡聚HCV E2,抗体2A12显示出与组装的E2的结合减少。抗体组及其产生方法在通过引用并入本文的Viethier P.等人Hepatology:65(4),1117-1131,2017及其中提及的参考文献诸如参考文献5、33-36、17和37和可从出版商获得的补充材料中有描述。

[0309] 实施例6:酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0310] 夹心ELISA。为了确认蛋白质表达和纯化成功,使用Maxisorb平底96孔板(Nunc)进行夹心ELISA。将孔用在pH 9.6的50mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的5 μ g/mL二聚麦芽糖结合蛋白(MBP)-CD81-LEL¹¹³⁻²⁰¹涂覆,然后在4℃下孵育过夜。在该洗涤步骤和后续洗涤步骤中,将板在含有0.05% Tween 20的PBS(PBST)中洗涤4次,然后在室温下用10mg/mL在PBS中的牛血清白蛋白(BSA,Sigma-Aldrich) (BSA10PBS)封闭1小时。洗涤后,在含有5mg/mL BSA的PBST(BSA5PBST)中进行组织培养上清液的半对数连续稀释,然后在室温下孵育1小时。洗涤后,添加兔抗6xHIS表位标签抗体(Rockland Immunochemicals)在BSA5PBST中的单次稀释液并在室温下孵育1小时。洗涤后,添加与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗兔免疫球蛋白(Dako)的单次稀释液。洗涤后,使用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物(Sigma-Aldrich)根据制造商的说明进行ELISA显影,并用1M HCl终止反应。最后,使用Multiskan Ascent酶标仪(Thermo Electron Corporation)在450nm下测量光密度。

[0311] 单稀释点评估和直接ELISA。为了评估 Δ 123对本领域已知的一组抗体(诸如实施例5/表2中列出的抗体组)的反应性,首先进行单稀释点评估,由此将Maxisorb平底96孔板用5 μ g/mL单体 Δ 123直接涂覆,然后在4℃下孵育过夜。在洗涤并用BSA10PBS封闭后,添加一抗的单次稀释液,接着添加二抗(Dako),在每次添加之间洗涤并在室温下孵育1小时。如以上对夹心ELISA所述,将板进行显影和测量。通过相同的方法进行直接ELISA,但是视情况将孔用2 μ g/mL单体 Δ 123或5 μ g/mL HMW1 Δ 123涂覆,并且将一抗在BSA5PBST中进行半对数连续稀释。

[0312] 实施例7:蛋白质还原和重新折叠

[0313] 小规模还原。为了测定用于蛋白质还原的最佳DTT (Pierce) 浓度,将Maxisorb平底96孔板用在pH 9.6的50mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中的5 μ g/mL单体H77c Δ 123涂覆,并在室温下孵育最少2小时。用PBST洗涤4次后,添加在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中制备的不同浓度的DTT (0-10mM) 并在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。然后立即将板在PBST中洗涤6次以去除DTT,接着用BSA10PBS封闭。如实施例6中所述,添加一抗(包括抗HIS、H53和R04),然后添加适当的二抗。最后,如实施例6中所述检测和测量结合的抗体。使用TCEP作为还原剂重复相同的实验。

[0314] 在溶液中用DTT进行的还原和重新新叠。在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中制备的H77c Δ 123单体在不同条件(表3)下进行DTT还原,以确定最佳HMW Δ 123形成的必要条件。以缓慢稀释方式进行蛋白质重新折叠,缓慢稀释通过按照为初始样品体积的一半的恒定体积,3次逐步添加pH 6.8的PBS来实现。例如,将4x200 μ L pH 6.8的PBS添加到400 μ L样品中。每次添加后,在室温下孵育15分钟。使用MWC0为10kDa的Amicon Ultra离心过滤装置去除DTT,接着在pH6.8的PBS中漂洗两次。然后如实施例4中所述,通过非还原性SDS-PAGE分析重新折叠的蛋白质。如果成功地形成了多聚体并通过如实施例3中所述的凝胶过滤色谱分析,则进行更大规模的重新折叠。

[0315] 使用氧化还原-改组系统进行的还原和重新折叠。将1:5比率的氧化型L-谷胱甘肽(GSSG, Pierce) 与还原型L-谷胱甘肽(GSH, Pierce) 添加到在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中制备的H77c Δ 123单体中,研究了不同的条件(表4)。通过去除L-谷胱甘肽来终止反应,然后分析重新折叠的蛋白质,如实施例7中所述。如果成功地形成了多聚体并通过如实施例3中所述的凝胶过滤色谱分析,则进行更大规模的重新折叠。

[0316] 用二马来酰亚胺基乙烷(BMOE) 交联三(2-羧乙基) 膦盐酸盐(TCEP) 还原的蛋白质。将不同浓度的TCEP添加到H77c Δ 123单体中并在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,所述单体是以不同浓度(表5) 在pH 6.8的PBS中制备的。然后添加在即将使用之前溶解在二甲基亚砷(Sigma) 中的BMOE (Sigma),至最终浓度为0.2mM,并按照制造商的指示在室温下孵育1小时。通过去除BMOE和TCEP来终止反应,然后分析重新折叠的蛋白质,如实施例7中所述。

[0317] 实施例8: Δ 123的产生

[0318] 将来自株系H77c、Con1和S52的 Δ 123的DNA序列掺入基于pcDNA3.1的载体中,产生以下质粒:pcDNA-H77c Δ 123-HIS、pcDNA-Con1 Δ 123-HIS和pcDNA-S52 Δ 123-HIS。这些质粒在琼脂糖凝胶电泳上显示出预期的限制模式,具有代表H77c、Con1和S52 Δ 123插入物全部分别对应于其预期长度762、759和710bp的条带(图1)。将H77c Δ 123克隆到专有的CSL修饰的pcDNA3.1载体中,这是与各自迁移到相同水平位置的含有Con1和S52的标准Invitrogen载体相比,观察到更大的载体大小的原因(图1)。

[0319] 将Con1和S52 Δ 123质粒瞬时转染到哺乳动物FS293F细胞中以产生 Δ 123糖蛋白。保持细胞悬浮在补充有用于保护细胞对抗水动力的Pluronic F-68和用于加强生长效率的羽扇豆蛋白胨的FS293表达培养基中。按 1×10^6 个活细胞/mL接种细胞,在转染后第0至9天细胞活力保持在约90%。为了确认 Δ 123糖蛋白成功表达,通过夹心ELISA分析细胞培养物上清液(图2A-B)。将转染后第3、5、7和9天收获的上清液的半对数连续稀释液施加到二聚体MBP-CD81-LEL¹¹³⁻²⁰¹涂覆的酶免疫测定板上,并用兔抗his抗体和HRP-缀合的山羊抗兔免疫球蛋白检测捕获的 Δ 123糖蛋白。第一孔内浓度为1 μ g/mL的单体H77c Δ 123用作阳性对照,

而第一孔内稀释至1/2的含有HIV包膜蛋白gp140的上清液用作阴性对照。所有细胞培养物上清液都表现出与CD81的阳性结合,表明上清液中存在 $\Delta 123$ 糖蛋白,因此蛋白质表达成功。此外,表示细胞培养物上清液的曲线出现在阳性对照之上,表明 $\Delta 123$ 糖蛋白产率 $>1\mu\text{g/mL}$ —对于Con1和S52分别为大约 $4\mu\text{g/mL}$ 和 $20\mu\text{g/mL}$ 。在第5天和第7天进行的收获的光密度(OD)值最高,表明在这些中间时间点蛋白质表达稍微更有效。还注意到来自S52 $\Delta 123$ 转染的上清液与Con1 $\Delta 123$ 相比表现出更高水平的CD81结合,表明S52株系的蛋白质表达更有效或S52 $\Delta 123$ 对CD81具有更强的亲和力。

[0320] 为了从细胞培养物上清液中分离 $\Delta 123$ 糖蛋白,使用TALON珠粒(一种带有钴的琼脂糖凝胶基质)进行亲和色谱,所述琼脂糖凝胶基质以比常规镍亲和支撑物更高的特异性,与his标记的蛋白质有效地结合。还通过夹心ELISA以对细胞培养物上清液进行的相同方式分析蛋白质纯化的效果(图2C-D)。将洗脱液依次收集到三个单独的级分中,第一级分中洗脱的蛋白质显示与纯化前的上清液相似的CD81结合水平,表明级分1含有大部分 $\Delta 123$ 糖蛋白。级分2中洗脱的蛋白质表现出CD81结合降低,表明存在较少量的 $\Delta 123$,而级分3的蛋白质表现出可忽略不计的CD81结合并且产生与HIV gp140阴性对照一致的曲线。纯化后的上清液(即流过物)和来自S52 $\Delta 123$ 纯化的洗液显示出与阳性对照几乎相似的CD81结合水平,而对于Con1 $\Delta 123$ 而言观察到低水平,表明更有效地进行了Con1 $\Delta 123$ 纯化。

[0321] 实施例9: $\Delta 123$ 表达谱

[0322] 来自通过凝胶过滤色谱对亲和纯化的H77c $\Delta 123$ 表达进行的株系先前分析的 $\Delta 123$ 的DNA序列揭示,H77c $\Delta 123$ 作为一系列不同大小的物质存在(图3A)。这些由分子质量分别为46、97、239和2402kDa并且在它们的抗原性和免疫原性方面不同(H.Drummer,未发表的数据)的单体、二聚体、HMW2和HMW1 $\Delta 123$ 组成。HMW物质能够诱导bNAb,而单体诱导类型特异性NAb(H.Drummer,未发表的数据)。然而,将H77c $\Delta 123$ 稳定转染到FS293F细胞中(由Rob J Center博士在本项目开始之前进行)产生的 $\Delta 123$ 仅23.13%为HMW形式,相比而言单体为64.90%(图3A和表6)。

[0323] 来自任何基因型的 $\Delta 123$ 应该同样能够引发bNAb,因为它包含E2的最保守区域。然而,WT E2和 $\Delta 123$ 的表达谱将在不同的基因型之间变化。为了确定Con1 $\Delta 123$ 和/或S52 $\Delta 123$ 是否表达更高产率的HMW物质,使用ÄKTA FPLC系统在Superdex 200制备级16/600柱上通过凝胶过滤色谱分析来自于瞬时转染到FS293F细胞中的亲和纯化的 $\Delta 123$ 糖蛋白。使用UNICORN软件对峰下面积进行的定量揭示Con1(图3B)和S52(图3C)株系确实产生更高产率的HMW $\Delta 123$,产生的所有 $\Delta 123$ 糖蛋白中46.02%(Con1)和44.88%(S52)为HMW形式(组合的HMW1和HMW2),相比而言H77c为23.13%(表6)。

[0324] 为了评估这些结果的再现性,重复 $\Delta 123$ 的瞬时转染和纯化,并再次进行凝胶过滤色谱以分析 $\Delta 123$ 表达。在第二轮中,如y轴上标度所示(图3D-E),Con1 $\Delta 123$ 的表达水平大约是第1轮的两倍,而S52 $\Delta 123$ 的表达水平保持相对稳定。尽管表达水平上有变化,但重要的是要注意Con1和S52 $\Delta 123$ 的表达谱在第1轮和第2轮中保持相似。与H77c相比,再次观察到HMW $\Delta 123$ 产率的提高,在第二轮产生相似比例的HMW物质—对于Con1和S52分别为46.98%和41.56%(表6)。

[0325] 通过SDS-PAGE分析凝胶过滤分级的 $\Delta 123$ 糖蛋白。5-12%聚丙烯酰胺梯度凝胶上的非还原性SDS-PAGE证实了来自凝胶过滤色谱的发现,再次证明 $\Delta 123$ 以多种二硫键连接

的寡聚形式存在,并且显示出条带强度与分子量之间的反比关系(图4A-B)。还使用 β -巯基乙醇(一种破坏二硫键键合,转而又破坏疏水接触的还原剂)在12%丙烯酰胺凝胶上进行还原性SDS-PAGE分析。结果揭示,二硫键对于高级结构的形成和稳定是必不可少的,因为一旦它们的二硫化物被 β -巯基乙醇裂解,这些就全部作为单体迁移(图4C-D)。疏水相互作用可以有助于高级物质的形成。

[0326] 这些数据揭示,Con1和S52株系与H77c相比,确实表达更高产率的HMW Δ 123,并证明了一种改善HMW Δ 123产生的可能方法。

[0327] 实施例10:HMW Δ 123的抗原性表征

[0328] 为了评估由Con1和S52株系产生的HMW Δ 123是否重现了H77c的抗原性模式,将来自所有三种株系的经凝胶过滤分级的单体和HMW1 Δ 123以ELISA形式针对一组构象敏感和不敏感的MAb进行测试(图5A)。单稀释点评估(图5B)最初作为快速试验进行,以确定哪些MAb对H77c及Con1和S52之一或两者的 Δ 123显示出阳性反应性,从而允许所比较的株系之间的抗原性。在直接ELISA中进一步测试满足该标准的MAb,由此将MAb的半对数连续稀释液施加到单独用单体和HMW1 Δ 123涂覆的酶免疫测定板上,接着用适当的HRP缀合的二抗进行检测。然后通过比较每个结合曲线(表7)的中点计算每种MAb对于HMW1 Δ 123的相对结合,中点被视为最高光密度值的一半。

[0329] 虽然单稀释点评估显示构象敏感的小鼠H53和MAb 1、7、12、16和20全部显示出对H77c Δ 123的阳性反应性,但证明对Con1和S52 Δ 123的反应性可忽略不计,表明这两种株系的表位完整性以致使这些MAb的靶表位无法识别的方式被改变,并且这些MAb具类型特异性。构象敏感的人AR3A显示出相反情况,其中对Con1和S52 Δ 123具有阳性反应性,但对H77c无反应性(图5B)。

[0330] 在直接ELISA中进一步测试的11种MAb中,有8种(AR3B、AR3C、AR3D、CBH-4B、CBH-4D、HC-11、MAb 10和60)与单体形式相比显示出与 Δ 123的HMW形式的结合减少(表7),表明其靶表位被更多封闭。只有小鼠H52显示出对所有三种株系而言结合HMW1 Δ 123的能力显著增强(表7),表明对残基C652的接近改善。

[0331] 在比较每种MAb结合Con1和S52的HMW形式与H77c的HMW形式的能力时,在所测试的11种MAb中有5种(HCV1、AR3B、AR3C、CBH-4D、HC-11)表现出增加或相当的结合水平。AR3D和H52也证明结合增加,但仅对Con1 Δ 123结合增加,而MAb 10和24对两种株系表现出结合水平降低(表7)。

[0332] 实施例11:使用TCEP和BMOE还原和重新折叠 Δ 123

[0333] 评估通过部分还原单体 Δ 123以产生游离巯基,接着将这些巯基重新缀合成将会介导多聚体形成的分子间二硫键而使 Δ 123单体重新折叠成单体的能力。

[0334] 使用TCEP(一种不含巯基的还原剂)的 Δ 123小规模还原作为快速试验进行试验,以确定 Δ 123部分还原所需的TCEP的最佳浓度(图6)。这通过在37℃下将涂覆到酶免疫测定板上的单体H77c Δ 123暴露于不同浓度的TCEP(0-500mM) 30分钟来执行,留出时间进行还原。为了确定由TCEP还原引起的结构变化的程度,将构象依赖性小鼠H53抗体的单次稀释液施加于板上,并用HRP缀合的抗小鼠抗体检测结合。用10-500mM TCEP处理的H77c Δ 123表现出与H53的结合逐渐减少,所有光密度值都高于R04阴性对照(一种针对人巨细胞病毒的人MAb)的光密度值。这些结果表明 Δ 123的构象未完全破坏,因为在一定程度上保持了H53识

别,表明实现了部分还原,并且随着TCEP浓度的增加,还原逐渐增加。此外,在不同浓度的TCEP存在下,一致地发生阳性抗HIS结合,消除了结合的 $\Delta 123$ 的损失可导致H53结合减少的可能性。由于认为 $\Delta 123$ 构象的保留是保持 $\Delta 123$ 的抗原性和免疫原性性质以及允许后续重新形成HMW $\Delta 123$ 所必需的,因此确定介于10–200mM之间的TCEP浓度适于进一步的蛋白质还原实验。

[0335] 酶免疫测定板所结合的蛋白质上的还原允许快速测试多种试剂浓度。然而,就潜在的疫苗生产而言,在溶液中还原更合适。因此,在pH6.8的PBS中制备H77c $\Delta 123$ 单体,因为TCEP在6至8的pH范围最有效。还制备了各种浓度的 $\Delta 123$ 以研究最初存在的不同量的蛋白质是否会影响单体转化为HMW形式的效率。然后按先前的小规模还原实验所指导的浓度添加TCEP。为了随后将部分还原的 $\Delta 123$ 单体转化为HMW $\Delta 123$,还原后进行蛋白质重新折叠,这是涉及二硫化物重新形成和重新改组的过程。这通过添加BMOE来促进,BMOE是一种短的同双功能性马来酰亚胺交联剂,其在6.5至7.5的pH范围与游离巯基形成硫醚键。结果巯基被缀合,从而模拟二硫化物重新形成。此外,TCEP不含巯基,因此适合连同巯基反应性BMOE交联剂一起使用,证明在该实验中使用TCEP作为还原剂是合理的。通过非还原性SDS-PAGE分析重新折叠的 $\Delta 123$ 糖蛋白(图6B)。所有样品显示出与单体对照和模拟对照相似的迁移模式,所述对照也进行了还原和重新折叠程序但不存在TCEP和BMOE(图6B中的泳道7和表8)。没有条带与HMW $\Delta 123$ 对照的条带对齐,揭示TCEP还原和使用BMOE重新折叠在将单体 $\Delta 123$ 转化为HMW $\Delta 123$ 方面是不成功的。

[0336] 实施例12:使用氧化还原-改组系统进行的还原和重新折叠

[0337] 利用氧化还原-改组系统促进还原的巯基之间的氧化,由此在还原剂(GSH)和氧化剂(GSSG)的存在下同时进行还原和重新折叠。这是通过在pH9.6的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中制备H77c $\Delta 123$ 单体来进行的,因为高pH环境分别促进GSH和GSSG的还原和氧化能力。为了研究蛋白质浓度对聚集效率的影响,还制备了各种浓度的H77c $\Delta 123$ 单体(表9)。然后添加5 GSH:1 GSSG,该比率相当于2mM GSH和0.4mM GSSG的最终浓度,这是商用蛋白质重新折叠试剂盒中通常使用的浓度,并且已有报告称会使>90%的蛋白质重新折叠(信息由Thermo Fisher Scientific提供)。然后将这些 $\Delta 123$ 样品在37℃下孵育不同的时间长度(表9),接着立即用pH 6.8的PBS稀释50倍并使用离心过滤装置去除谷胱甘肽以终止反应。

[0338] 通过非还原性SDS-PAGE分析 $\Delta 123$ 样品(图7A),其揭示单体 $\Delta 123$ 成功地重新折叠成二聚 $\Delta 123$ 和高级物质,如二聚体条带的出现和尺寸大于二聚体的高级结构的存在所示。正如所预期的,单体和模拟对照各自产生对应于单体 $\Delta 123$ 大小的条带。然而,对于模拟对照也观察到模糊的二聚体条带(图7A中的泳道1)。这与单体 $\Delta 123$ 的凝胶过滤曲线一致(图7B),其也显示出少量的污染性二聚体 $\Delta 123$ 。当未处理的 $\Delta 123$ 单体预先在4℃下储存于加盖管中时,检测到二聚体还可表明由于暴露于空气或高温而导致的自发性蛋白质聚集。另外,在装载到凝胶上之前将样品煮沸可以促进聚集。使用LI-COR Odyssey系统对单体和二聚体条带密度测定的定量显示模拟对照含有比二聚体多4.65倍的单体。当用谷胱甘肽处理1 μ g/ μ L的单体 $\Delta 123$ 时,大多数单体不能重新折叠成高级物质,单体比二聚体多6.89倍,高于模拟对照的记录。相比之下,使用更高浓度(5和10 μ g/ μ L)导致更多的二聚体形成,表明在大量蛋白质存在下的重新折叠增强了 $\Delta 123$ 聚集效率。将孵育时间从2小时增加至24小时也诱导形成更多的二聚体,这通过并置图7A中的条件3和5得以证明。在所有测试条件中,当10

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 单体 $\Delta 123$ 经受谷胱甘肽处理24小时时,单体转化为二聚体是最有效的。因此,进行利用这些条件的实验的按比例放大重复并通过凝胶过滤色谱分析。

[0339] 来自重复实验的 $\Delta 123$ 的凝胶过滤曲线显示出单体和二聚体峰(图7C),与非还原性SDS-PAGE的结果一致(图7A)。还观察到二聚体峰上的肩,表明形成一些高级物质。使用UNICORN软件对曲线下面积的定量揭示几乎一半的 $\Delta 123$ 单体重新折叠成多聚体,二聚体包含大部分蛋白质(表10)。总的来说,这些结果证明使用氧化还原-改组系统确实导致谷胱甘肽还原型 $\Delta 123$ 单体之间形成分子间二硫键。主要是这些实验导致二聚体的形成。

[0340] 实施例13:使用二硫苏糖醇(DTT)还原并通过缓慢稀释重新折叠

[0341] 为了扩大我们对 $\Delta 123$ 聚集的研究,采用了不同的还原剂和重新折叠技术:分别为DTT和缓慢稀释。与TCEP一样,最初试验ELISA形式的 $\Delta 123$ 小规模DTT还原以测定实现 $\Delta 123$ 部分还原所需的最佳DTT浓度(图8A)。这通过在 37°C 下将涂覆到酶免疫测定板上的H77c $\Delta 123$ 单体暴露于不同浓度的DTT(0-10mM)30分钟来执行。然后将板洗涤以去除DTT,从而终止进一步还原,接着进行封闭,添加一抗(抗HIS、H53和R04)并用适当的HRP缀合的二抗进行检测。用 $>2\text{mM}$ DTT实现 $\Delta 123$ 几乎完全还原。用0.1-1.0mM DTT处理的 $\Delta 123$ 表现出H53结合逐渐减少,因此,在后续DTT还原实验中进一步研究了这些浓度。在所有DTT浓度下观察到一致的抗HIS结合,排除结合的 $\Delta 123$ 的损失是H53结合减少的因素。

[0342] 然后研究在溶液中的DTT还原,由此在pH 9.6的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中制备各种浓度的H77c $\Delta 123$ 单体(表11)并暴露于DTT,其在 $\text{pH}>7$ 时保持其还原能力。在不存在还原剂的情况下,还原的巯基最终将经历自发性氧化,导致二硫键重新形成。为了使该过程发生,随后通过缓慢稀释使还原的 $\Delta 123$ 糖蛋白进行重新折叠,缓慢稀释涉及向 $\Delta 123$ 样品逐步添加pH 6.8的PBS。此外,该程序稀释了DTT并通过逐渐中和pH环境来减弱其活性,从而促进巯基的氧化。

[0343] 通过非还原性SDS-PAGE分析重新折叠的 $\Delta 123$ 糖蛋白(图8B)。模拟对照产生正如预期的单体条带,和对应于二聚体 $\Delta 123$ 的大约100kDa的模糊条带,表明受二聚体的低水平污染或者可能是自发性蛋白质聚集,因为在单体对照中并未观察到二聚体条带。单体和二聚体条带密度测定的定量显示模拟对照含有比二聚体蛋白多3.41倍的单体蛋白(图8B中的泳道1和表11)。对于在所有试验条件下进行还原和重新折叠的 $\Delta 123$ 样品,记录了寡聚物增加的量(图8B),揭示由于成功形成分子间二硫键,一定比例的 $\Delta 123$ 单体确实转化为多聚体。对于在添加DTT后孵育30分钟的样品,记录了单体与二聚体比率的显著下降,这导致单体比二聚体蛋白质多不到2倍。延长孵育期未能增强 $\Delta 123$ 聚集,因为与孵育30分钟相比,孵育 ≥ 2 小时并未引起更多的多聚体形成。当用DTT处理 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 单体 $\Delta 123$ 时,记录到单体与二聚体的低比率,与来自谷胱甘肽处理的结果形成对比。当用0.1mM DTT处理 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 单体 $\Delta 123$ 30分钟时记录到1.33的最低值(图8B中的泳道11和表11),表明使用这些条件转化成二聚体是最有效的。当用1mM DTT处理 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 单体 $\Delta 123$ 30分钟时(图8B中的泳道9),在非还原性SDS-PAGE上高级物质的形成最为明显。

[0344] 使用多聚体形成的最佳条件(1mM DTT,30分钟)进行按比例放大的重复实验。然后通过凝胶过滤色谱分析重新折叠的 $\Delta 123$ 糖蛋白,以证实在非还原SDS-PAGE上的观察结果,并获得产生的每种寡聚物物质的更精确的测量值(图8C-D)。如DTT处理后单体峰的保留所示,一定比例的单体不受影响。凝胶过滤曲线还表明形成一些二聚体 $\Delta 123$,因为在对应于

二聚体 $\Delta 123$ 的区域内洗脱少量蛋白质, 这比处理前的凝胶过滤曲线更突出。最重要的是, 对应于超过 200kDa 大小的宽峰在大约 59 分钟洗脱, 类似于对 HMW2 $\Delta 123$ 观察到的洗脱时间, 证实 $\Delta 123$ 成功聚集成更大的多聚体。峰下面积的定量揭示大约五分之一的单体聚集成 HMW $\Delta 123$ 。在用于将单体 $\Delta 123$ 转化为 HMW $\Delta 123$ 的三种方法中, DTT 还原后进行缓慢稀释是最有效的。

[0345] 实施例 14: 分析由重新折叠经 DTT 处理的 $\Delta 123$ 产生的产物的大小

[0346] 使用以下方案分析由重新折叠经 DTT 处理的 $\Delta 123$ 产生的产物的大小。

[0347] 材料:

[0348] ● 单体 $\Delta 123$

[0349] ● pH 9.6 的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液

[0350] ● 二硫苏糖醇 (DTT)

[0351] ● pH 6.8 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS)

[0352] 为了还原单体 $\Delta 123$, 在 5mL 黄色加盖管中的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中制备 1mg 单体 $\Delta 123$, 达到总体积为 1mL。如果在蛋白酶抑制剂的存在下重新折叠, 则还添加 5 μ g/mL 抑肽酶 (aprotinin)、8 μ g/mL 亮肽素 (leupeptin) 和 5 μ M 几夫碱 (kifeunensine)。将 DTT 溶解在 Milli-Q 水中, 并以 0.3mM 的最终浓度 (即 3 μ L 的 100mM DTT) 加入管中。接下来, 将混合物在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。对于两次 DTT 处理, 孵育后将 3 μ L 的 100mM DTT 加入管中, 并将混合物在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟。对于三次 DTT 处理, 在第二次孵育后将 3 μ L 的 100mM DTT 加入管中, 并将混合物在 37 $^{\circ}$ C 下再次孵育 30 分钟。

[0353] 为了重新折叠, 添加 0.5mL PBS 并将蛋白质在室温下孵育 15 分钟。该步骤重复三次。通过使用 Amicon Ultra 离心过滤装置 (10k MWC0) 去除 DTT, 并将蛋白质在 PBS 中漂洗两次。

[0354] 为了分析大小, 将蛋白质转移到 1.5mL 埃彭道夫管 (Eppendorf tube) 中, 并在 4 $^{\circ}$ C 下以 13,000rpm 离心 10 分钟。然后使用 16/600 Superdex 200 制备级柱进行凝胶过滤色谱。

[0355] DTT 处理揭示单体 $\Delta 123$ 可以重新折叠成高级物质, 在 59 分钟和 54 分钟的洗脱时间形成峰 (图 10)。增加 DTT 处理的次数导致 HMW 样峰向左移动; 从 1 次时观察到的洗脱时间为 59 分钟变为 2 次或 3 次后的 54 分钟 (图 10)。同时, 观察到单体峰略微向右移动; 对于 1 次、2 次和 3 次而言, 洗脱时间分别为 77 到 76 到 75。添加蛋白酶抑制剂在 75 分钟时产生残留单体洗脱峰 (图 11, 底部实施例), 并且重新折叠的多聚体在 54 分钟洗脱, 表明蛋白酶抑制剂在该过程中可以是有益的。

[0356] 为了检查残留的未重新折叠的单体蛋白是否能够重新折叠, 收集来自上述经两次 DTT 处理的实施例中的残留单体物质 (汇集的凝胶过滤级分 72-81 并使用 Amicon Ultra 离心过滤装置 (10k MWC0) 浓缩)。如上所述用 DTT 将样品再处理两次, 进行重新折叠并对蛋白质进行大小分析。

[0357] 使未重新折叠的单体 $\Delta 123$ (图 11, 顶部实施例) 重新折叠导致 37% 二聚体形成和少量 HMW 样形成, 而 63% 保持为单体, 表明 $\Delta 123$ 单体亚群难以重新折叠。还注意到在单体峰的右侧形成相对较短的峰。然而, 在蛋白酶抑制剂的存在下重新折叠导致该峰的大小减小。

[0358] 结果证明, 使用本发明方法可以产生至少 60-70% 寡聚物 (>100MW 或 .200MW) 的产率。

- [0359] 实施例15:经DTT处理的 $\Delta 123$ 和ALA7 $\Delta 123$ 的抗原性表征
- [0360] 使用以下方案使用一组下述抗体来比较经DTT处理的 $\Delta 123$ 和ALA7 $\Delta 123$ 之间的抗原性。
- [0361] 材料:
- [0362] 试剂:
- [0363] ●pH 9.4的碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液
- [0364] ●ELISA洗涤剂 (PBST)
- [0365] ●ELISA过氧化氢封闭剂 (BSA10PBS)
- [0366] ●ELISA稀释剂 (BSA5PBST)
- [0367] ●磷酸柠檬酸盐缓冲液;3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)
- [0368] ●盐酸 (HCl)。
- [0369] 蛋白质:
- [0370] ●HMW1 $\Delta 123$
- [0371] ●重新折叠前的单体 $\Delta 123$
- [0372] ●耐重新折叠的 $\Delta 123$
- [0373] ●重新折叠的多聚体 $\Delta 123$
- [0374] ●重新折叠前的单体ALA7 $\Delta 123$
- [0375] ●耐重新折叠ALA7 $\Delta 123$
- [0376] ●重新折叠的多聚体ALA7 $\Delta 123$
- [0377] ●BSA
- [0378] 抗体:
- [0379] ●一抗AR3C、CBH4G、HC84.27、HCV1
- [0380] ●抗人HRP缀合的二抗
- [0381] 将Nunc Maxisorb平底96孔板用5 μ g/mL以上列出的蛋白质涂覆并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜(o/n),所述蛋白质是在pH 9.6的50mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液中制备的。第二天,将板用PBST洗涤4次并在室温下用100 μ L/孔BSA10PBS封闭1小时。接下来,将板用PBST洗涤4次,并进行材料中列出的1 $^{\circ}$ 抗体的半对数连续稀释,并在室温下孵育1小时。接下来,将板用PBST洗涤4次,并添加50 μ L/孔的材料中列出的2 $^{\circ}$ 抗体,并在室温下孵育1小时。接下来,将板用PBST洗涤4次,并用100 μ L/孔TMB进行显影,接着添加50 μ L/孔HCl。结果如图9中所示。与单体 $\Delta 123$ 对照和耐重新折叠的 $\Delta 123$ 对照相比,重新折叠的 $\Delta 123$ 与AR3C和CBH4G的结合减少,表明在重新折叠的 $\Delta 123$ 中靶表位更多地被封闭(这是HMW $\Delta 123$ 的典型特征)。与单体ALA7 $\Delta 123$ 对照和耐重新折叠的ALA7 $\Delta 123$ 对照相比,重新折叠的ALA7 $\Delta 123$ 与AR3C和CBH4G的结合减少,表明在重新折叠的ALA7 $\Delta 123$ 中靶表位更多地被封闭(这是高分子量形式的蛋白质的典型特征)。CBH4G对重新折叠的 $\Delta 123$ 和重新折叠的ALA7 $\Delta 123$ 的反应性降低可表明非中和表位在重新折叠材料中比在天然HMW材料中更多地被封闭。当使用重新折叠材料作为免疫原时,这可以提供优势,因为可能抑制非中和抗体应答的产生。
- [0382] 实施例16:重新折叠实验
- [0383] 上面进行的进一步重新折叠实验的结果汇总在表13和14中。
- [0384] 总的来说,亲和纯化的 $\Delta 123$ 的凝胶过滤色谱揭示除了主要的单体形式外还存在

二硫键连接的二聚体和高级HMW多聚体的非均匀混合物。HMW $\Delta 123$ 是一种吸引人的疫苗候选物。然而, HMW形式的 $\Delta 123$ 的吸引力在某种程度上由于相对较低的表达产率和污染蛋白的存在而减低。研究了几种提高HMW $\Delta 123$ 生产产率的方法, 所述方法对于疫苗生产将是有益的。

[0385] 评估人源性FS293F细胞中来自瞬时转染的 $\Delta 123$ 的表达, 并通过夹心ELISA, 利用CD81-LEL¹¹³⁻²⁰¹捕获 $\Delta 123$ 来验证 $\Delta 123$ 成功产生和纯化。

[0386] 从凝胶过滤色谱获得的结果揭示, Con1和S52株系均一致性表达更高比例的HMW $\Delta 123$, 对于Con1和S52分别增加大约23%和20%, 几乎是H77c株系产生的HMW $\Delta 123$ 的比例的倍增。此外, 这些结果揭示不同的HCV株系产生不同量的HMW $\Delta 123$ 。对于从第二轮独立转染和纯化产生的Con1和S52 $\Delta 123$, 结果具有重现性。

[0387] 虽然使用带有钴的TALON珠粒进行的亲和色谱有效地从细胞培养物上清液中纯化了分泌的 $\Delta 123$ 糖蛋白, 但是当用于疫苗生产时, 钴从这些珠粒中浸出会引起健康问题。更安全的替代方案可以是在纯化 $\Delta 123$ 时使用抗体亲和色谱

[0388] 虽然HMW $\Delta 123$ 的结构仍未定义, 但是本文所述的结果表明, 分子间二硫键介导独特的折叠排列, 其封闭了先前在WT E2和单体 $\Delta 123$ 中易接近的非特异性和类型特异性中和区域。H77c $\Delta 123$ 的免疫原性研究通过证明虽然单体不能产生bNAbs, 但是HMW形式能够引发可以中和所有7种HCV基因型的抗体而支持这一观点, 表明通过封闭这些区域而引导这些抗体应答远离非中和表位, 因此改为靶向广谱中和表位 (H. Drummer, 未发表的数据)。

[0389] 由于可以有效地产生并从不同 $\Delta 123$ 物质的非均匀混合物中有效地纯化单体, 因此针对将单体 $\Delta 123$ 重新折叠成HMW形式对策略进行了评估。假设单体部分还原产生游离巯基, 接着这些巯基的缀合或再氧化将导致二硫键以重现H77c HMW $\Delta 123$ 中的二硫化物排列的方式重新改组。常规地, 还原和重新折叠方法用于由不合需要的蛋白质聚集体 (特别是来自细菌包涵体) 再生低级物质 (单体/二聚体/三聚体) (Singh和Panda, 2005)。

[0390] 同双功能性BMOE交联剂与游离巯基反应, 导致它们缀合。此外, 如果在各个 $\Delta 123$ 亚基之间发生缀合, 则将确定介导聚集成HMW $\Delta 123$ 的分子间相互作用。然而, 在重新折叠过程中利用BMOE交联剂不能促进分子间二硫键的形成。这表明对于试验的条件而言BMOE不会使 $\Delta 123$ 单体交联, 这可能是由于空间位阻或实验误差。此外, 不存在经BMOE处理的阳性对照致使评估这些BMOE重新折叠实验的有效性极其困难。这并不是说其它交联剂不会产生交联多聚体并且不会是其生产的有用方法。相反, DTT还原后接着进行缓慢稀释法, 以及使用基于谷胱甘肽的氧化还原-改组系统导致形成二聚体和高级物质, 表明游离巯基被氧化成分子间二硫键。具体地, 半胱氨酸残基452、486、569和597处的巯基可以直接参与将各个 $\Delta 123$ 亚基桥接在一起, 因为这些残基对E2RBD的结构完整性不是必需的。

[0391] 使用DTT还原和通过缓慢稀释重新折叠是在试验的三种方法中将单体 $\Delta 123$ 转化为HMW物质最有效的方法。该方法允许将大约五分之一的 $\Delta 123$ 单体转化为HMW物质。氧化还原-改组系统的使用实现了大约50%的 $\Delta 123$ 单体的重新折叠, 尽管是重新折叠成二聚体。

[0392] 实施例17: 使用 β -巯基乙醇 (β ME) 还原和组装

[0393] 评估通过使用 β ME部分还原对 $\Delta 123$ 单体的还原和组装成高分子量寡聚物。

[0394] 在PBS中制备单体 $\Delta 123$ (20 μ g), 每个管中的总体积为20 μ L。添加 β ME使得终浓度为0-100mM并在室温下孵育15分钟。为了重新组装蛋白质, 添加10 μ L PBS, 将蛋白质在室温下

孵育7分钟并重复两次。通过使用Amicon Ultra离心过滤装置(30k MWCO)去除BME,并将蛋白质在PBS中漂洗两次。在非还原性SDS-PAGE中分析蛋白质。将经BME处理的 $\Delta 123$ $\Delta 1233$ 和HMW1 $\Delta 123$ 样品和2 μ L蛋白质标准品单独装载到孔中,然后在120V下进行凝胶电泳。一旦染料前沿迁移到分离凝胶的顶部,就将电压增加到160V。将凝胶用考马斯(0.25%考马斯亮蓝G-250、50%甲醇和10%乙酸)染色1小时,然后脱色(50%甲醇和10%乙酸)直至凝胶背景变透明。最后,使用Li-CorOdyssey成像系统观察凝胶。

[0395] 在非还原性条件下的SDS-PAGE中分析经处理和未处理的蛋白质。结果(图15A)显示未处理的单体 $\Delta 123$ 主要作为单体迁移,存在少量二聚体,这可能是在添加到SDS-PAGE之前将样品煮沸的结果。在BME高浓度下,可以观察到更大的HMW寡聚物,如图15A所示。为了证实它们的存在,用100mM β ME还原 $\Delta 123$ 单体并使其组装,之后进行凝胶过滤色谱。结果(图15B)显示在用100mM β ME处理的 $\Delta 123$ 单体上存在小肩,如阴影区域所示。这表明BME可以使 $\Delta 123$ 重新组装成高级寡聚物,尽管效率低。

[0396] 实施例18:组装的糖蛋白的免疫原性

[0397] 为了确定组装的蛋白质在动物中是否比单体抗原免疫原性更强,使用Addavax作为佐剂,将远系杂交豚鼠用100 μ g蛋白质接种四次,间隔三周(表15)。在最后一次接种后两周对豚鼠放血并分析免疫血清以测定针对 $\Delta 123$ 单体蛋白的抗体滴度。

[0398] 将Nunc MaxiSorp平底96孔板用在50 μ L/孔50mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)中制备的5 μ g/mL单体H77c E2 $\Delta 123$ 涂覆并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天,将板用PBST洗涤4次并在室温下用100 μ L/孔BSA₁₀PBS封闭1小时。用PBST洗涤4次后,将以1/100开始的豚鼠血清连续半对数稀释液加入板中,在室温下保持2小时。将板用PBST洗涤4次并添加1/1000的抗HIS抗体并在室温下孵育1小时。将板用PBST洗涤4次,并用100 μ L/孔TMB进行显影,接着添加50 μ L/孔HCl。将450nm-650nm下的光密度(y轴)相对于连续稀释度作图,并且使用产生0.5单位光密度所需的稀释度倒数来确定抗体滴度。由于组4-F和5-F各有4只动物,均接受单体形式的HCV蛋白,所以将来自这些组的结果组合以与其它组进行比较。

[0399] 结果显示用重新折叠的 $\Delta 123$ 和 $\Delta 123A7$ 蛋白接种的动物比用这些蛋白的单体形式接种的动物产生更高的抗体滴度($\Delta 123=41826$, $\Delta 123A7=28686$,而对于组合的 $\Delta 123$ 和 $\Delta 123A7$ 单体组而言为21756(图16)。这些组的平均滴度也更高。在组装的 $\Delta 123$ 组的情况下,几何平均抗体滴度高于接种天然 $\Delta 123$ HMW的组(表16)。接受组装的 $\Delta 123$ 的动物具有统计学上显著高于接受单体抗原的动物的抗体滴度($p=0.0286$)(图16)。

[0400] 实施例19:抗体应答的特异性

[0401] 为了确定组装抗原是否产生不同的抗体特异性,将血清针对代表E2糖蛋白的主要抗原性区域的合成肽进行试验,所述E2糖蛋白是预防HCV感染的广谱中和抗体的靶标。表位I跨越残基412-423并且涵盖广谱中和抗体的表位,所述广谱中和抗体诸如小鼠AP33(Owsianka等人,2001;Owsianka等人,2005;Tarr等人,2006);大鼠3/11(Tarr等人,2006;Flint等人,2009);人HCV1和95-2(Broering等人,2009);人HC33.1和相关抗体(Keck等人,2013);H77.39(Sabo等人,2011);MRCT10.v362和hu5B3.v3(Pantua等人,2013);和MAB24(Alhammad等人,2015)。合成肽用于检测此类特异性并且跨越残基408-428,并且先前已用于表征豚鼠血清中的多克隆抗体反应性(Vietheer等人,2017)。

[0402] 将Nunc MaxiSorp平底96孔板用在50 μ L/孔50mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)

中制备的5 μ g/mL H77c表位I肽(408-428)涂覆并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天,将板用PBST洗涤4次并在室温下用100 μ L/孔BSA₁₀PBS封闭1小时。用PBST洗涤4次后,从1/5开始添加豚鼠血清的半对数连续稀释液,并使其结合1小时。用PBST洗涤4次后,添加50 μ L/孔的抗豚鼠HRP抗体并在室温下孵育1小时。将板用PBST洗涤4次,并用100 μ L/孔TMB进行显影,接着添加50 μ L/孔HCl。

[0403] 结果显示接种组装的 Δ 123和 Δ 123A7的动物具有比接种这些抗原的单体形式的动物显著更高的抗体滴度(图17)。在组装的 Δ 123的情况下,平均滴度比单体组高15倍,比接种天然 Δ 123的组高1.15倍。在组装的 Δ 123A7的情况下,平均滴度比单体组高5倍。数据表明,将来自天然折叠状态(在该实施例中是HCV E2的单体)的抗原组装成高级寡聚物,通过增加抗体针对广谱中和抗体表位的滴度显著改善了抗原的免疫原性。

[0404] 实施例20:抗体应答-表位III的特异性

[0405] 为了确定组装的抗原是否产生不同的抗体特异性,将血清针对代表跨越残基523-549的CD81结合环的合成肽进行试验。该抗原性区域包含抗原性区域3的一部分,并且是中和抗体的靶标。

[0406] 将Nunc MaxiSorp平底96孔板用在50 μ L/孔50mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)中制备的5 μ g/mL H77c表位III肽(523-549)涂覆并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天,将板用PBST洗涤4次并在室温下用100 μ L/孔BSA₁₀PBS封闭1小时。用PBST洗涤4次后,从1/5开始添加豚鼠血清的半对数连续稀释液,并使其结合1小时。用PBST洗涤4次后,添加50 μ L/孔的抗豚鼠HRP抗体并在室温下孵育1小时。将板用PBST洗涤4次,并用100 μ L/孔TMB进行显影,接着添加50 μ L/孔HCl。

[0407] 结果(图18)显示接受组装的 Δ 123和 Δ 123A7的动物对H77c表位III产生高抗体滴度,接种 Δ 123的动物的平均值和几何平均值高于接受天然折叠的单体材料的那些(表18)。另外,在接受组装的 Δ 123和 Δ 123A7蛋白的动物中的抗体滴度始终较高,与接受单体材料的动物中观察到的抗体滴度的广泛分布截然不同, Δ 123和 Δ 123A7的滴度范围为5-6倍,而单体为200倍)。这表明组装的蛋白质能够在接种动物中诱导一致的免疫应答,而单体原材料不一致地产生对该区域有特异性的抗体。

[0408] 实施例21:针对表位I的抗体应答的交叉反应性

[0409] 为了确定针对H77c表位I产生的抗体是否与不同基因型的等同序列交叉反应,使用跨越残基408-428的基因型2a J6肽进行ELISA。

[0410] 将Nunc MaxiSorp平底96孔板用在50 μ L/孔50mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)中制备的5 μ g/mL J6表位I肽涂覆并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。第二天,将板用PBST洗涤4次并在室温下用100 μ L/孔BSA₁₀PBS封闭1小时。用PBST洗涤4次后,从1/5开始添加豚鼠血清的半对数连续稀释液,并使其结合1小时。用PBST洗涤4次后,添加50 μ L/孔的抗豚鼠HRP抗体并在室温下孵育1小时。将板用PBST洗涤4次,并用100 μ L/孔TMB进行显影,接着添加50 μ L/孔HCl。

[0411] 结果(图19)显示在接种 Δ 123和 Δ 123A7的动物中产生的抗体与表位I的基因型2a株系J6序列交叉反应,并且这些组中抗体的平均滴度和几何平均滴度高于通过用这些抗原的天然单体形式接种所获得的那些滴度(表19)。接种 Δ 123的动物的平均抗体滴度比通过用天然高分子量形式的 Δ 123(从用表达 Δ 123蛋白的质粒转染的293FS细胞直接收获)接种所获得的平均抗体滴度高几乎2倍(表19)。

[0412] 实施例22:HCV E2 CD81抑制的表征

[0413] HCV E2使用细胞受体CD81附着于细胞。在我们的实验室中,我们先前已经采用一种测定法来测定免疫血清中存在的抗体阻止可溶性E2与重组CD81结合的能力。

[0414] 将Nunc MaxiSorp平底板用在50mM碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液(pH9.6)中制备的5 μ g/mL MBP-CD81LEL涂覆,并在4 $^{\circ}$ C下储存过夜。第二天,将板用100 μ L/孔BSA₁₀PBS封闭1小时并在PBST中洗涤4次。将50 μ L在BSA₅PBST中以1/5开始的豚鼠免疫血清的连续半对数稀释液,按1 μ g/mL添加到所有孔中50 μ L未分级的E2RBD(分别为G1a H77c和G2a JFH1),然后在室温下孵育1小时。将80 μ L的E2 RBD-血清混合物添加到经CD81涂覆的平板中并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。将板用PBST洗涤4次,之后按1/500添加50 μ L/孔小鼠抗HIS,并在室温下孵育1小时。将板用PBST洗涤4次并用100 μ L/孔TMB显影,并添加50 μ L/孔1M HCl终止反应。结果显示接种组装的 Δ 123和 Δ 123A7的动物产生高滴度的能够阻止H77c G1a E2和CD81之间的相互作用的抗体,并且以与接受天然 Δ 123 HMW蛋白的小鼠中存在的那些相似的水平存在并且与接种这些抗原的单体形式的小鼠中达到的平均水平相似(图20A和表20)。

[0415] 评估免疫血清抑制G2a E2与CD81结合的能力(图20B)。在接种组装的 Δ 123和 Δ 123A7的动物中的抗体滴度类似于接种这些抗原的单体形式的动物和接种天然 Δ 123 HMW的动物。这些数据表明组装形式的 Δ 123和 Δ 123A7更有利于产生阻止HCV异源基因型与细胞表面受体CD81结合的交叉反应性抗体。

[0416] 实施例23:同源基因型1a病毒的中和

[0417] 为了确定产生的抗体是否产生了预防HCV感染肝细胞系的能力,使用同源基因型1a假型病毒进行中和测定。

[0418] 用于产生掺入来自G1a的E1E2异二聚体的HCVpp的表达载体是pE1E2H77c (Drummer等人,2003)。pNL4-3.Luc.R-.E-(pNL43)获自NIH AIDS Reagent Program,Division of AIDS,NIAID,NIH的Nathaniel Landau博士(Connor等人,1995;He等人,1995)。将6 μ g E1E2H77c DNA与6 μ g pNL43 DNA在1.5mL埃彭道夫管中混合。对于空载体对照,将1 μ g pcDNA4c与1 μ g pNL43 DNA混合。将312 μ L FuGENE6添加到5200 μ L Opti-MEM(+glutamax)中,然后在室温下孵育5分钟,并将600 μ L该混合物添加到DNA混合物中。向空对照中添加100 μ L。将这些在室温下孵育20分钟。在PC3实验室中,滴加8支管的内容物以分开来自步骤1的含293T细胞的培养皿。将空对照添加到来自步骤1的含293T细胞的板的一个孔中。将Fugene6/Optimem/DNA混合物在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育20分钟,之后滴加到293T细胞中。将细胞在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂中孵育3天。3天后,去除含有传染性E1E2假型病毒(HCVPP)或空载体假型病毒(Emptypp)的上清液,并通过0.45 μ m过滤器过滤,准备用于中和测定。

[0419] 进行从1/20开始的热灭活豚鼠血清的半对数连续稀释。将250 μ L血清添加到250 μ L HCVpp中并孵育1小时。将150 μ L/孔的血清-病毒混合物添加到Huh7.5细胞中,一式三份。将150 μ L/孔的空对照添加到无抗原组平板的底行,一式三份。然后将板在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下孵育。

[0420] 42小时后,从Huh7.5细胞中去除培养基,然后在1x PBS中洗涤一次。添加50 μ L/孔的1x细胞培养物裂解试剂并将细胞裂解物转移到u型底96孔板中。将5 μ L裂解物转移到384孔白色板中并在CLARIOstar酶标仪上读数。将重复三次的值的平均值相对于血清稀释度作图,使用非线性回归分析拟合曲线,并计算达到病毒感染细胞的50%抑制剂量所需的血清

的稀释度倒数(Prism v7)。

[0421] 结果(图21)显示接种组装的 $\Delta 123$ 和 $\Delta 123A7$ 的8只动物中有8只产生能够预防G1a HCVpp感染的抗体。相比之下,接受单体抗原的组的8只动物中仅有7只产生中和抗体。接受 $\Delta 123A7$ 的组中的平均抗体滴度和几何平均抗体滴度高于使用单体抗原获得的那些抗体滴度,表明通过组装方法增加抗原的大小改善了其免疫原性(表22)。通过组装获得的抗体中和滴度与使用天然HMW形式的抗原获得的相似(表22),表明该方法产生的抗原具有至少等同的产生对HCV同源株有效的中和抗体的能力并且比单体抗原提高。

[0422] 实施例24:免疫血清抑制人单克隆抗体与E2结合的能力

[0423] 关于豚鼠中产生的抗体是否识别与已知的人广谱中和抗体相似的表位,为进一步研究抗体应答的特异性,进行了竞争性酶免疫测定。

[0424] 人抗体HCV-1 (Broering等人,2009)、HC84-27 (Krey等人,2013)、AR3C (Law等人,2008)和2A12 (Khan等人,2014)通过下述产生:合成VH和VL区(Geneart)并分别克隆到pcDNA3-tPA-LC和pcDNA3-tPA-HC中,用于在组织纤溶酶原激活物(tPA)前导序列的指导下表达IgG1。将编码重链和轻链的质粒转染到FS293F细胞中用于产生IgG。

[0425] 将恒量的MAb和半对数稀释系列的每种豚鼠血清同时添加到封闭的孔中,并在室温下孵育2小时,之后添加到板结合的单体 $\Delta 123$ 中。用抗人Fab2检测残留的MAb结合。通过非线性回归拟合曲线并用于确定每种血清样品的ID50。当血清样品在试验的最高浓度(1:10稀释, $\log_{10}1$)下未达到ID50的情况下,将 $\log_{10}0.5$ 的值分配给该血清。

[0426] 结果显示接种了组装的 $\Delta 123$ 和 $\Delta 123A7$ 的动物具有更高的平均和几何平均抗体滴度,所述抗体与识别412-423区域(表位I)的抗体HCV1的表位重叠(表23和图22A)。已显示HCV1抗体预防和治疗黑猩猩中的HCV (Morin等人,2012)。另外,滴度与使用天然HMW $\Delta 123$ 获得的滴度相似,表明该方法产生等同的抗原。接受 $\Delta 123$ 的动物中的抗体滴度在统计学上高于单体接种组中的抗体滴度(图22A)。

[0427] 结果显示,与单体疫苗接种者或天然HMW疫苗接种者相比,接种组装的 $\Delta 123$ 的动物具有更高的抗体平均和几何平均抗体滴度,所述抗体与识别E2的430-446区域的抗体HC84-27的表位重叠并且包含与细胞受体CD81接触的区域的一部分(表24和图22B)。这种抗体特异性具有广谱中和性并且防止HCV逃逸突变体的产生(Krey等人,2013;Keck等人,2012)。该数据显示就产生与HC84.27所识别的表位重叠的抗体而论,所述组装方法产生了改进的抗原。接受 $\Delta 123$ 的动物中的抗体滴度在统计学上高于单体接种组中的抗体滴度(图22B)。

[0428] 结果显示与单体疫苗接种者相比,接种了组装的 $\Delta 123$ 和 $\Delta 123A7$ 的动物具有更高的平均和几何平均抗体滴度,所述抗体与抗体AR3C的表位重叠(表25和图22C)。在 $\Delta 123$ 的情况下,平均和几何平均滴度高于用等同天然HMW抗原产生的那些(表25)。

[0429] 结果显示与单体疫苗相比,接种了组装的 $\Delta 123$ 和 $\Delta 123A7$ 的动物具有能够防止非中和抗体2A12的结合的更低的平均和几何平均抗体滴度(表26和图22D)。数据表明,单体 $\Delta 123$ 和 $\Delta 123A7$ 的组装封闭了非中和表位,已证实非中和表位会阻碍HCV的中和(Zhang等人,2009)和中和抗体的产生(Vietheer等人,2017)。

[0430] 实施例25:组装的蛋白质用于检测E2特异性B细胞的用途

[0431] 为了确定组装的HCV蛋白是否可以用于鉴定具有抗原特异性抗体的免疫细胞,使

用从慢性感染者分离的PBMC进行以下操作。

[0432] 从冷冻的PBMC中富集B细胞

[0433] 试剂

[0434]

MiniMACS分离器	Miltenyi Biotec	目录号130-042-102
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec	目录号130-042-303
MS柱	Miltenyi Biotec	目录号130-042-201
死细胞去除试剂盒	Miltenyi Biotec	目录号130-090-101
B细胞分离试剂盒II(人)	Miltenyi Biotec	目录号130-091-151

[0435] 将来自HCV感染个体的PBMC在室温下解冻。使用死细胞去除试剂盒(#130-090-101Miltenyi Biotec)去除死细胞。每 10^7 个总细胞,用4.75ml无菌水稀释0.25ml的20x结合缓冲液原液。每 10^7 个总细胞,添加100ul死细胞去除微珠,混合并在室温下孵育15分钟。在MACS分离器上去除死细胞。将细胞重新悬浮在MACS缓冲液(PBS、0.5%BSA、2mM EDTA):50ml冷PBS+0.25g BSA和0.2ml 0.5M EDTA中。添加每 10^7 个总细胞40ul的MACS缓冲液和每 10^7 个总细胞10ul的生物素-抗体混合物,并在冰箱中孵育10分钟。每 10^7 个总细胞添加30ul MACS缓冲液。添加20ul抗生物素微珠,在冰箱中保持20分钟。重新悬浮到500ul MACS缓冲液中并在MACS分离器上去除MS柱上的非B细胞群。细胞是用于如下FACS Aria分选的染色细胞:

[0436]	CD19 Pe-Cy7 小鼠抗人(SJ25C1)	BD Pharmingen	目录号 557835
	纯化的 CD81 小鼠抗人(JS-81)	BD Pharmingen	目录号 555675
	CD81 APC 小鼠抗人(JS-81)	BD Pharmingen	目录号 551112
	δ 3 E2-HIS 蛋白 0.59mg/ml	Drummer Lab	
	Penta-HIS Alexa Fluor 488	Qiagen	目录号 35310
	Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG	Life Tech	目录号 A11001
	FACS 缓冲液(PBS、2% FCS、1mM EDTA): 50ml 冷 PBS+1ml FCS+0.1ml 0.5M EDTA		

[0437] 在FACS缓冲液中用100ul CD19 PE-Cy7抗体(1:50)标记细胞。充分混合,在冰箱中孵育30分钟。在FACS缓冲液中洗涤两次后,将重新悬浮的细胞团块用100ul纯化的CD81抗体(1:50)在FACS缓冲液中在4℃下染色30分钟。洗涤两次后,将重新悬浮的细胞团块用20ug δ 3蛋白在100ul FACS缓冲液中在4℃下孵育30分钟。用500ul FACS缓冲液以300g洗涤细胞两次,持续5分钟。将重新悬浮的细胞团块用100ul CD81APC抗体(1:50)和Penta-HIS 488(1:100)在FACS缓冲液中在4℃下染色30分钟。用500ul FACS缓冲液以300g洗涤细胞两次(持续5分钟)后,将细胞用200ul FACS缓冲液重新悬浮,并立即进行FACS分选。

[0438]	RPMI-1640 培养基补充有 10% FCS、1% NEAA、2mM L-谷氨酰胺、0.1mg/ml 庆大霉素(Gentamicin)、1ug/ml 米诺环素(minocycline)。		
	R848 (1mg/ml)	Invivogen	目录号 tlr1-r848
	IL-2 人	GenScript	目录号 Z00368

[0439] 结果(图23)显示含有多个拷贝的C端his标签的组装的 Δ 123可以有效地检测E2反应性B细胞。大约0.5%的B细胞群具E2特异性。这证明了组装的蛋白充当多价蛋白用于免疫

标记物检测的用途。

[0440] 实施例26:组装的蛋白质的大小

[0441] SEC-MALS分析用于测定组装的 Δ 123A7和组装的 Δ 123蛋白的摩尔质量。

[0442] 在装载样品之前,用MT-PBS平衡Wyatt WTC-030-N5 4.6/300柱。流量为0.2ml/分钟。DAWN Heleos MALS检测器与Agilent 1200系列UV二极管阵列检测器和Optilab T-rEx RI检测器串联使用。使用BSA将MALS检测器标准化。

[0443] 组装的 Δ 123A7样品是多分散的,含有在262至675kDa范围内的MW物质。重均摩尔质量为409kDa。组装的 Δ 123样品是多分散的,含有在210至744kDa范围内的MW物质。重均摩尔质量为408.7kDa。组装的 Δ 123A7样品中E2原体的范围为5-15, Δ 123中的E2原体的范围为4-16,每种情况下平均为9。

[0444] 实施例27:蛋白质的组装

[0445] 为了检查使用还原剂DTT可以实现的组装范围,进行了多个独立的组装实验。结果表明,单体 Δ 123A7可以以高达80%的效率重新折叠,而高达71%的 Δ 123可以组装成HMW形式。

[0446] 评估残留的单体物质是否可以用DTT处理并组装成HMW形式。将1mg/ml单体 Δ 123A7溶液(其来自于先前实验,未组装成HMW形式)用最终浓度0.6mM的DTT在37°C下处理30分钟。将另外3ul的100mM DTT添加到蛋白制剂中,混合并在37°C下再孵育30分钟。然后添加250ul的1xPBS (pH6.8)并在室温下孵育15分钟并且再重复两次。然后将蛋白质进行缓冲液交换并使用4ml Amicon超速离心装置(30K MWCO)浓缩,并用1xPBS (pH6.8)洗涤2次,直至达到500ul的体积并转移至埃彭道夫管中。使用凝胶过滤色谱分析经处理的蛋白质。结果显示30%的残留单体 Δ 123A7可以组装成HMW形式(图25)。这表明使用该方法使单体HCV E2蛋白组装成HMW形式的能力没有限制,并且实际上,高达100%的单体形式可以转化为组装的HMW形式。

[0447] 实施例28:其它蛋白质的组装

[0448] 检查是否可以使用相同的方法使其它形式的HCV E2组装成HMW物质。如实施例25中所述,用DTT处理包含残基384-661的单体H77c E2,并使其组装成HMW形式。凝胶过滤色谱显示大约40%已组装成HMW形式(图26)。使用RBDA7蛋白进行相同的过程,其中以相同的方式处理包含在C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、C597和C569(A7)处含有Cys-Ala突变的残基384-661的单体H77c E2。在该实施例中,大约10%组装成HMW形式(图27)。

[0449] 为了研究该方法是否广泛适用于由其它蛋白质组装高级物质,使用主要为单体的HIV包膜蛋白,其使用上述方法(Env)截短以从AD8序列中去除C端跨膜结构域和胞质尾。在用DTT处理和组装后,观察到与env的HMW物质形成相对应的凝胶过滤曲线的较小移动(图28)。高级寡聚物尤其是三聚体的形成对于HIV是理想的,因为已经证实这些会保持广谱中和抗体的结合,并且是用于生产广谱中和抗体的有利疫苗候选物(de Taeye等人,2015)。该数据表明,在需要由单体或低级物质形成高级寡聚物用于生产抗原的情况下,该方法可以适用于其它蛋白质。

[0450] 在不脱离本发明的范围的情况下,许多修改对于本领域的技术人员来说将是显而易见的。

[0451] 表1:

[0452]

转染体积	细胞总数	DNA 的量	DNA 稀释 体积(在 Opti-MEM 中)	293fectin 的量	293fectin 稀释体积(在 Opti-MEM 中)
150 mL	1.5×10^8	150 μ g	3 mL	150 uL	3 mL

[0453] 表2:

[0454]

抗体	物种	NAb 活 性 ¹	表位类型 ²	残基 ³	E2-CD81 ⁴
抗 HIS	兔	否	C	C 端 6xHIS	否
HCV1	人	是	C	L413、N415、W420	是
AR3A	人	是	DC	S424、G523、P525 、G530、D535、V538 、N540	否
AR3B	人	是	DC	Q412、T416、G418 、N423、S424、G523 、P525、G530、D535 、N540	是
AR3C	人	是	DC	S424、H488、G523 、P525、G530、D535 、V538、N540	是
AR3D	人	是	DC	Q412、S424、G523 、G530、D535	是
CBH-4B	人	否	DC	R587-R596	否
CBH-4D	人	否	DC	V536、P612、L615 、R587-R596	否
HC-11	人	是	DC	S424、T425、A426 、L427、N428、C429 、Y527、W529、	是

[0455]

				D535、V536	
H52	鼠	否	C	C652	否
H53	鼠	否	DC	N540、W549	否
1	鼠	否	DC	N/D	是
7	鼠	否	DC	N/D	是
10	鼠	是	DC	N/D	是
12	鼠	否	DC	N/D	是
16	鼠	否	DC	N/D	是
20	鼠	否	DC	N/D	是
24	鼠	是	C	N/D	是
60	鼠			N/D	

[0456] ¹MAb诱导至少类型特异性中和的能力。²靶表位是连续的/不依赖构象的(C)还是连续/依赖构象的(DC)。³靶氨基酸残基。未确定的缩写为N/D。⁴MAb阻断E2-CD81相互作用的

能力。

[0457] 表3.

[0458]

	单体 H77 Δ123 浓度 (μg/μL)	DTT 浓度 (mM)	孵育时间(小 时)	温度(℃)
1.	1	0.00	24.0	37
2.	10	0.10	24.0	37
3.	5	1.00	24.0	37
4.	5	0.50	24.0	37
5.	5	0.10	24.0	37
6.	5	0.10	2.0	37
7.	5	0.10	0.5	37
8.	1	0.10	2.0	37
9.	1	1.00	0.5	37
10.	1	0.30	0.5	37
11.	1	0.10	0.5	37
12.	1	0.05	0.5	37

[0459] 表4.

[0460]

	单体 H77c Δ123 浓度 (μg/μL)	GSH 和 GSSG 分别的浓度 (mM)	孵育时间(小 时)	温度(℃)
1.	1	0.0, 0.0	24	37
2.	10	2.0, 0.4	24	37

[0461]

3.	5	2.0, 0.4	24	37
4.	1	2.0, 0.4	24	37
5.	5	2.0, 0.4	2	37

[0462] 表5.

[0463]

	单体 H77c Δ123 浓度 (μg/μL)	TCEP 浓度(mM)
1.	1	10
2.	1	50
3.	1	100
4.	1	200
5.	5	50
6.	5	200
7.	1	0

[0464] 表6.

[0465]

株系	轮数	% 单体	% 二聚体	% HMW2	% HMW1	总% HMW
H77	N/A	64.90	11.67	18.90	4.23	23.13
Con1	1	25.46	28.52	40.62	5.40	46.02
Con1	2	14.37	38.64	44.56	2.42	46.98
S52	1	35.29	19.05	36.74	8.14	44.88
S52	2	34.81	23.59	39.77	1.79	41.56

[0466] 表7.

抗体	NAb 活性 ¹	表位类型 ²	相对于相应株系的单体 Δ123 的结合 ³			相对于 H77c HMW1 Δ123 的 结合 ⁴	
			H77c	Con1	S52	Con1	S52
HCV1	是	C	1.21	1.46	0.92	2.05	2.08
AR3B	是	DC	<0.37	0.17	<0.09	<6.58	<1.68
AR3C	是	DC	0.18	0.13	0.54	3.92	6.17
AR3D	是	DC	<0.17	0.08		4.73	N/A
CBH-4B	否	DC	<0.27	<0.24	<0.62	<1.00	<1.00
CBH-4D	否	DC	<0.27	<0.11	<0.07	<1.23	<1.68
HC-11	是	DC	0.21	0.28	<0.20	6.97	1.00
H52	否	C	<9.53	<11.19	<6.14	1.47	0.56
10	是	DC	<0.07	<0.07	<0.25	<0.45	<0.45
24	是	C	3.03	0.82	0.52	0.67	0.28
60			<0.47	<0.57		<1.00	N/A

[0468] ¹MAb诱导至少类型特异性中和的能力。²靶表位是连续的/不依赖构象的(C)还是连续/依赖构象的(DC)。³相对于单体 Δ123, MAb与HMW1 Δ123的结合。有关原始ELISA结果, 请参阅图6A。蓝色表示来自单稀释点评估(图6B)和在ELISA上的中断测试的结果, 其中+表示阳性反应性, 而-表示可忽略的反应性。⁴相对于H77c HMW1 Δ123, MAb与Con1和S52HMW1 Δ123的结合。不适用缩写为N/A。

[0469] 表8.

	单体 H77c Δ123 浓度(μg/μL)	TCEP 浓度(mM)	BMOE 浓度(mM)
1.	1	10	0.2
2.	1	50	0.2
3.	1	100	0.2
4.	1	200	0.2
5.	5	50	0.2
6.	5	200	0.2
7.	1	0	0.2

[0471] 表9.

	单体 H77c Δ123 浓度 (μg/μL)	GSH 和 GSSG 分别的浓度 (mM)	孵育时间(小时)	温度(°C)	单体与二聚体的比率
1.	1	0.0, 0.0	24	37	4.65
2.	10	2.0, 0.4	24	37	2.51
3.	5	2.0, 0.4	24	37	2.99
4.	1	2.0, 0.4	24	37	6.89
5.	5	2.0, 0.4	2	37	3.36

[0473] 表10.

[0474]

H77c Δ123	单体%	多聚体%	单体与多聚体的比率
未处理的	87.52	2.59	33.82
GSH/GSSG	52.68	43.13	1.22

[0475] 表11.

[0476]

单体 H77c Δ123 浓度	DTT 浓度 (mM)	孵育时间(小时)	温度(°C)	单体与二 聚体的比
--------------------	----------------	--------------	--------	--------------

[0477]

	(μg/μL)				率
1.	1	0.00	24.0	37	3.41
2.	10	0.10	24.0	37	3.02
3.	5	1.00	24.0	37	2.35
4.	5	0.50	24.0	37	2.32
5.	5	0.10	24.0	37	2.55
6.	5	0.10	2.0	37	2.66
7.	5	0.10	0.5	37	1.91
8.	1	0.10	2.0	37	2.16
9.	1	1.00	0.5	37	1.51
10.	1	0.30	0.5	37	1.45
11.	1	0.10	0.5	37	1.33
12.	1	0.05	0.5	37	1.95

[0478] 表12.

[0479]

H77c Δ123	单体%	多聚体%	单体与多聚体的比率
未处理的	87.52	2.59	33.82
DTT	69.51	28.84	2.41

[0480] 表13.

[0481]

还原剂	重新折叠方法	抗原	分析方法 (SDS-PAGE 和/或凝胶过 滤)	产生重新折 叠的蛋白质 (是/否)
0-500mM TCEP	0.2mM BMOE 交联剂	Δ123	SDS-PAGE	否
2.00mM GSH	氧化还原-改 组系统 w.0.4mM GSSG	Δ123	SDS-PAGE 和 凝胶过滤	是
0-1.00mM DTT	缓慢稀释	Δ123	SDS-PAGE 和 凝胶过滤	是

[0482] 表14.

[0483]

还原剂	抗原	洗脱时间(分钟)	重新折叠的%	抗原性表征可用(是/否)
2.0mM GSH	Δ 123	69.00	43.13	否
0.3mM DTT 处理 1	Δ 123	59.44	50.15	否

[0484]

次				
0.3mM DTT 处理 2 次	Δ 123	54.48	62.81	是
	Δ 123(重复 1)	53.93	50.13	否
	D123 w. 蛋白酶抑制剂	54.55	52.67	否
	RBD	57.77	39.75	否
	ALA7 Δ 123	52.97	47.41	是
	ALA7 RBD	59.46	10.38	否
0.3mM DTT 处理 3 次	Δ 123	53.95	54.47	否

[0485] 表15.

[0486]

分组名称	抗原#	动物数量
1-F	天然 Δ 123 HMW	8
2-F	组装的 Δ 123	8
3-F	组装的 Δ 123 A7	8
4-F*	单体 Δ 123	4
5-F*	单体 Δ 123 A7	4
6-F	无抗原	6

[0487] #100 μ g抗原与等体积的Addavax一起施用4次,每次间隔3周。最后一次免疫两周后的最终出血。

[0488] *为了分析数据,将第4组和第5组的结果组合以产生大小均匀的动物组。

[0489] 表16.

[0490]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
几何平均值	30162	41866	28686	21756
平均值	34701	44460	32444	24898

[0491] 表17.

[0492]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
几何平均值	3756	2176	1339	232

[0493]

平均值	4588	5289	1763	344.4
-----	------	------	------	-------

[0494] 表18.

[0495]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
几何平均值	3051	4627	1888	1191
平均值	3638	5413	2150	3599
最小值	600	1800	900	90
25%百分位数	2125	3250	1200	400
中值	4500	4250	1950	1000
75%百分位数	5000	8000	2400	4375
最大值	5000	12000	5000	18000

[0496] 表19.

[0497]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
几何平均值	483.3	439.8	100.4	26.24
平均值	587.5	1100	162.5	52.5

[0498] 表20.

[0499]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
几何平均值	308.3	246.4	188.1	238.2
平均值	326.3	261.3	215	307.5

[0500] 表21.

[0501]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
几何平均值	39.92	51.36	41.33	39.94
平均值	41.25	58.75	45	46.25

[0502] 表22.

[0503]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
几何平均值	692.1	266.6	342.6	278.6
平均值	773.1	361.7	484.6	430.6
最小值	220.3	43.31	102.1	20
最大值	1231	627.5	1521	1122

[0504] 表23.

[0505]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
--	------------	------------	------------	----------------

[0506]

几何平均值	118	104	79	45
平均值	121	106	81	47
最小值	55	54	47	21
最大值	195	191	129	155

[0507] 表24.

[0508]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
几何平均值	18	20	12	14
平均值	19	20	12	14
最小值	10	16	10	10
最大值	35	27	17	39

[0509] 表25.

[0510]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
几何平均值	46	50	38	33
平均值	48	51	39	35
最小值	17	26	28	14
最大值	87	102	56	110

[0511] 表26.

[0512]

	1-F	2-F	3-F	4-F+5-F
几何平均值	119	207	222	353
平均值	124	213	228	362
最小值	46	71	105	191
最大值	303	432	814	756

[0513] 表27.

	保留时间(分钟)	摩尔质量范围 kDa	E2 范围的单位	摩尔质量 kDa Mw	E2 平均单位
[0514] $\Delta 123A7$	12-14.5	674.8-262.2	5-15	408.7	9
$\Delta 123$	12.5-15.5	744-210	4-16	408.7	9

[0515] 参考文献

[0516] Alhammad et al (2015) J Virol.2015;89 (24) :12245-61.doi:10.1128/JVI.02070-15.PubMed PMID:26378182;PubMed Central PMCID:PMC4665232.

[0517] Altman et al (1996) Science 274 (5284) :94-96.

[0518] Broering et al (2009) J Virol.2009;83 (23) :12473-82.Epub 2009/09/18.doi:10.1128/JVI.01138-09 JVI.01138-09[pil].PubMed PMID:19759151;PubMed Central PMCID:PMC2786766.

[0519] Connor et al (1995) Virology.206 (2) :935-44.doi:10.1006/viro.1995.1016.PubMed PMID:7531918.

[0520] de Taeye et al (2015) Cell;163 (7) :1702-15.doi:10.1016/j.cell.2015.11.056.PubMed PMID:26687358;PubMed Central PMCID:PMC4732737.

[0521] Dolton et al (2015) Immunology 146 (1) :11-22/

[0522] Drummer et al (2003) FEBS Lett.546 (2-3) :385-90.PubMed PMID:12832074.

[0523] Flint et al (1999) J Virol.73 (8) :6235-44.PubMed PMID:10400713;PubMed Central PMCID:PMCPMC112700.

- [0524] He et al (1995) J Virol.69 (7) :4587-92.PubMed PMID:7769729.
- [0525] Keck et al (2012) PLoS Pathog.8 (4) :e1002653.Epub 2012/04/19.doi:10.1371/journal.ppat.1002653 PPATHOGENS-D-11-02162[pii].PubMed PMID:22511875;PubMed Central PMCID:PMC3325216.
- [0526] Khan et al (2014) Nature.2014.doi:10.1038/nature13117.PubMed PMID:2455313.
- [0527] Krey et al (2013) 9 (5) :e1003364.doi:10.1371/journal.ppat.1003364.PubMed PMID:23696737;PubMed Central PMCID:PMC3656090.
- [0528] Keck et al (2013) J Virol.2013;87 (1) :37-51.Epub 2012/10/26.doi:10.1128/JVI.01941-12 JVI.01941-12[pii].PubMed PMID:23097455;PubMed Central PMCID:PMC3536422.
- [0529] Law et al (2008) Nat Med.2008;14 (1) :25-7.Epub 2007/12/08.doi:nm1698[pii]10.1038/nm1698.PubMed PMID:18064037.
- [0530] McCaffrey et al (2007) J Virol 81:9584-9590.
- [0531] Morin et al (2012) PLoS Pathog.8 (8) :e1002895.Epub 2012/09/07.doi:10.1371/journal.ppat.1002895PPATHOGENS-D-12-01073[pii].PubMed PMID:229.52447;PubMed Central PMCID:PMC3431327.
- [0532] Owsianka et al (2001) J Gen Virol.82 (Pt 8) :1877-83.Epub 2001/07/18.PubMed PMID:11457993.
- [0533] Owsianka et al (2005) J Virol.79 (17) :11095-104.PubMed PMID:16103160.
- [0534] Pantua et al (2013) J Mol Biol.2013;425 (11) :1899-914.Epub 2013/03/06.doi:10.1016/j.jmb.2013.02.025 S0022-2836 (13) 00127-7[pii].PubMed PMID:23458406.
- [0535] Petrovsky et al (2004) Immunol Cell Biol.Oct;82 (5) :488-96.
- [0536] Sabo et al (2011) J Virol.2011;85 (14) :7005-19.Epub 2011/05/06.doi:10.1128/JVI.00586-11 JVI.00586-11[pii].PubMed PMID:21543495;PubMed Central PMCID:PMC3 126585.
- [0537] Tarr et al (2006) Hepatology.43 (3) :592-601.Epub 2006/02/24.doi:10.1002/hep.21088.PubMed PMID:16496330.
- [0538] Viethier et al (2017) Hepatology.2017;65 (4) :1117-31.doi:10.1002/hep.28989.PubMed PMID:27997681;PubMed Central PMCID:PMCPMC5408392.
- [0539] Vollers et al (2008) Immunology.123 (3) :305-313.
- [0540] Wilson-Welder et al (2009) J Pharm Sci.Apr;98 (4) :1278-316.doi:10.1002/jps.21523.
- [0541] Zhang et al (2009) Proc Natl Acad Sci U S A.106 (18) :7537-41.Epub2009/04/22.doi:0902749106[pii]10.1073/pnas.0902749106.PubMed PMID:19380744;PubMed Central PMCID:PMC2670884.

序列表

<110> 麦克法兰布奈特医疗研究与公共健康研究所有限公司

<120> 组装的糖蛋白

<130> 526133

<141> 2017-09-22

<150> 2016903961

<151> 2016-09-29

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 774

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified viral sequence

<400> 1

ggtaaccgcta gcgccaccat gaacccctg ctgatactga cctttgtggc cgtgcccctg 60
gccgagacac accagaacat ccagctgac aacaccaacg gcagctggca catcaacagc 120
accgccctga actgcaacga gagcctgaac acaggctggc tggccggcct gttctaccag 180
cacaagtta acagcagcgg agccccgag agactggcct cttgtggatc ttctggcgcc 240
tggcactacc cccctagacc ttgtggaatc gtgcccgcga agagcgtgtg cggcccctgtg 300
tactgtctta cccctagccc tgtggctgtg ggcaccaccg atagatcttg cgcacctacc 360
tattcctggg gcgccaacga caccgacgtg ttctgtctga acaacacccg gccacccctg 420
ggcaattggt tcggtctcac ctggatgaac tccaccggtc tcaccaaagt gtgcggcgct 480
cctcctgccg gatccagcgg agcacctacc gacgcctta gaaagcacc cagggccacc 540
tactetagag ccggtatctg cccctggatc acccccagat gcatgggtga ctaccctac 600
cggctgtggc actatccctg caccatcaac tacaccatct tcaaagtgcg gatgtactgt 660
ggcggcgtgg aacacagact ggaagccgc tgcaactgga ccagaggcga gagagccgac 720
ctggaagatc gggacagaag cgagcaccac caccatcacc actgatgact cgag 774

<210> 2

<211> 747

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified viral sequence

<400> 2

atgaaccccc tgctgatact gacctttgtg gccgctgccc tggccgagac acaccagaac 60
atccagctga tcaacaccaa cggcagctgg cacatcaaca gcaccgcctt gaactgcaac 120
gagagcctga acacaggctg gctggccggc ctgtttctacc agcacaagtt caacagcagc 180
ggagcccccg agagactggc ctcttggtga tcttctggcg cctggcacta cccccctaga 240
ccttggtgaa tcgtgccgcg caagagcgtg tgcggccctg tgtactgctt cacccttagc 300
cctgtggtcg tgggcaccac cgatagatct ggcgccccta cctattcctg gggcgccaac 360
gacaccgacg tgttcgtgct gaacaacacc cggccacccc tgggcaattg gttcggtcgc 420

[0001]

```

acctggatga actccaccgg ctccacaaa gtgtgcggcg ctctctctgc cggatccagc      480
ggagcaccta ccgacgcctt cagaaagcac cccgagggcca cctactctag agccggatct      540
ggcccttgga tcaccccccag atgcatggtg gactaccctt accggtgtg gcactatecc      600
tgcaccatca actacaccat ctcaaagtg cggatgtacg tgggcggcgt ggaacacaga      660
ctggaagccg ctgcaactg gaccagaggc gagagagccg acctggaaga tcgggacaga      720
agcgagcacc accaccatca ccactga                                          747

```

<210> 3
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Modified viral sequence

<400> 3

Glu Thr His Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His
 1 5 10 15

Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser Leu Asn Thr Gly Trp
 20 25 30

Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Ala Pro
 35 40 45

Glu Arg Leu Ala Ser Cys Gly Ser Ser Gly Ala Trp His Tyr Pro Pro
 50 55 60

[0002]

Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr
 65 70 75 80

Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly
 85 90 95

Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu
 100 105 110

Asn Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
 115 120 125

Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Ala Gly Ser
 130 135 140

Ser Gly Ala Pro Thr Asp Ala Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr
 145 150 155 160

Ser Arg Ala Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Met Val Asp
 165 170 175

Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr Thr Ile
 180 185 190

Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Glu Ala
 195 200 205

Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Ala Asp Leu Glu Asp Arg Asp

210	215	220
Arg Ser Glu 225		
<210> 4		
<211> 278		
<212> PRT		
<213> Hepatitis C virus		
<400> 4		
Glu Thr His Val Thr Gly Gly Asn Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu 1 5 10 15		
Val Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn 20 25 30		
Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu 35 40 45		
Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe 50 55 60		
Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Arg Leu Thr 65 70 75 80		
Asp Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly 85 90 95		
[0003] Leu Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly 100 105 110		
Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro 115 120 125		
Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr 130 135 140		
Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg 145 150 155 160		
Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly 165 170 175		
Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly 180 185 190		
Asn Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu 195 200 205		
Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys 210 215 220		
Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn 225 230 235 240		
Tyr Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg 245 250 255		

Arg Ser Glu
225

<210> 6
<211> 3011
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 6

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
65 70 75 80

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp
85 90 95

Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
100 105 110

[0005]

Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
115 120 125

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
130 135 140

Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
145 150 155 160

Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
165 170 175

Phe Leu Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Thr Val Pro Ala Ser Ala Tyr
180 185 190

Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn Asp Cys Pro
195 200 205

Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Ala Ile Leu His Thr Pro
210 215 220

Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ala Ser Arg Cys Trp Val
225 230 235 240

Ala Val Thr Pro Thr Val Ala Thr Arg Asp Gly Lys Leu Pro Thr Thr
245 250 255

Gln Leu Arg Arg His Ile Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala Thr Leu Cys

	260	265	270
	Ser Ala Leu Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe Leu Val Gly 275 280 285		
	Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Thr Gln Asp Cys 290 295 300		
	Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg Met Ala Trp 305 310 315 320		
	Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Ala Ala Leu Val Val Ala Gln 325 330 335		
	Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Met Asp Met Ile Ala Gly Ala His 340 345 350		
	Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp 355 360 365		
	Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala Glu 370 375 380		
	Thr His Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu Val 385 390 395 400		
	Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr 405 410 415		
[0006]	Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser 420 425 430		
	Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn 435 440 445		
	Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Arg Leu Thr Asp 450 455 460		
	Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Leu 465 470 475 480		
	Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly Ile 485 490 495		
	Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser 500 505 510		
	Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser 515 520 525		
	Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro 530 535 540		
	Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe 545 550 555 560		
	Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly Asn		

	565	570	575
	Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala 580 585 590		
	Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Met 595 600 605		
	Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr 610 615 620		
	Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu 625 630 635 640		
	Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp 645 650 655		
	Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Gln Trp 660 665 670		
	Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly 675 680 685		
	Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly 690 695 700		
	Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val Val 705 710 715 720		
[0007]	Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Cys Leu Trp 725 730 735		
	Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala Ala Leu Glu Asn Leu Val 740 745 750		
	Ile Leu Asn Ala Ala Ser Leu Ala Gly Thr His Gly Leu Val Ser Phe 755 760 765		
	Leu Val Phe Phe Cys Phe Ala Trp Tyr Leu Lys Gly Arg Trp Val Pro 770 775 780		
	Gly Ala Val Tyr Ala Phe Tyr Gly Met Trp Pro Leu Leu Leu Leu Leu 785 790 795 800		
	Leu Ala Leu Pro Gln Arg Ala Tyr Ala Leu Asp Thr Glu Val Ala Ala 805 810 815		
	Ser Cys Gly Gly Val Val Leu Val Gly Leu Met Ala Leu Thr Leu Ser 820 825 830		
	Pro Tyr Tyr Lys Arg Tyr Ile Ser Trp Cys Met Trp Trp Leu Gln Tyr 835 840 845		
	Phe Leu Thr Arg Val Glu Ala Gln Leu His Val Trp Val Pro Pro Leu 850 855 860		
	Asn Val Arg Gly Gly Arg Asp Ala Val Ile Leu Leu Met Cys Val Val		

865	870	875	880
His Pro Thr Leu Val Phe Asp Ile Thr Lys Leu Leu Leu Ala Ile Phe	885	890	895
Gly Pro Leu Trp Ile Leu Gln Ala Ser Leu Leu Lys Val Pro Tyr Phe	900	905	910
Val Arg Val Gln Gly Leu Leu Arg Ile Cys Ala Leu Ala Arg Lys Ile	915	920	925
Ala Gly Gly His Tyr Val Gln Met Ala Ile Ile Lys Leu Gly Ala Leu	930	935	940
Thr Gly Thr Tyr Val Tyr Asn His Leu Thr Pro Leu Arg Asp Trp Ala	945	950	955
His Asn Gly Leu Arg Asp Leu Ala Val Ala Val Glu Pro Val Val Phe	965	970	975
Ser Arg Met Glu Thr Lys Leu Ile Thr Trp Gly Ala Asp Thr Ala Ala	980	985	990
Cys Gly Asp Ile Ile Asn Gly Leu Pro Val Ser Ala Arg Arg Gly Gln	995	1000	1005
Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Val Ser Lys Gly Trp	1010	1015	1020
Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly	1025	1030	1035
Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn	1040	1045	1050
Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Thr Gln Thr	1055	1060	1065
Phe Leu Ala Thr Cys Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His	1070	1075	1080
Gly Ala Gly Thr Arg Thr Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile	1085	1090	1095
Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala	1100	1105	1110
Pro Gln Gly Ser Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser	1115	1120	1125
Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val Arg	1130	1135	1140
Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Ile	1145	1150	1155
Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu Leu Cys Pro Ala			

[0008]

1160	1165	1170
Gly His 1175	Ala Val Gly Leu Phe 1180	Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly 1185
Val Ala 1190	Lys Ala Val Asp Phe 1195	Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu Thr 1200
Thr Met 1205	Arg Ser Pro Val Phe 1210	Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Ala 1215
Val Pro 1220	Gln Ser Phe Gln Val 1225	Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly 1230
Ser Gly 1235	Lys Ser Thr Lys Val 1240	Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly 1245
Tyr Lys 1250	Val Leu Val Leu Asn 1255	Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly 1260
Phe Gly 1265	Ala Tyr Met Ser Lys 1270	Ala His Gly Val Asp Pro Asn Ile 1275
Arg Thr 1280	Gly Val Arg Thr Ile 1285	Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr 1290
Ser Thr 1295	Tyr Gly Lys Phe Leu 1300	Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly 1305
Ala Tyr 1310	Asp Ile Ile Ile Cys 1315	Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala 1320
Thr Ser 1325	Ile Leu Gly Ile Gly 1330	Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr 1335
Ala Gly 1340	Ala Arg Leu Val Val 1345	Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly 1350
Ser Val 1355	Thr Val Ser His Pro 1360	Asn Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser 1365
Thr Thr 1370	Gly Glu Ile Pro Phe 1375	Tyr Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu 1380
Val Ile 1385	Lys Gly Gly Arg His 1390	Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys 1395
Lys Cys 1400	Asp Glu Leu Ala Ala 1405	Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn 1410
Ala Val 1415	Ala Tyr Tyr Arg Gly 1420	Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr 1425
Ser Gly 1430	Asp Val Val Val Val 1435	Ser Thr Asp Ala Leu Met Thr Gly 1440
Phe Thr	Gly Asp Phe Asp Ser	Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys Val

[0009]

[0010]

1445	1450	1455
Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser 1460	Leu Asp Pro Thr Phe 1465	Thr Ile Glu 1470
Thr Thr Thr Leu Pro Gln Asp 1475	Ala Val Ser Arg Thr 1480	Gln Arg Arg 1485
Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys 1490	Pro Gly Ile Tyr Arg 1495	Phe Val Ala 1500
Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly 1505	Met Phe Asp Ser Ser 1510	Val Leu Cys 1515
Glu Cys Tyr Asp Ala Gly Cys 1520	Ala Trp Tyr Glu Leu 1525	Thr Pro Ala 1530
Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg 1535	Ala Tyr Met Asn Thr 1540	Pro Gly Leu 1545
Pro Val Cys Gln Asp His Leu 1550	Glu Phe Trp Glu Gly 1555	Val Phe Thr 1560
Gly Leu Thr His Ile Asp Ala 1565	His Phe Leu Ser Gln 1570	Thr Lys Gln 1575
Ser Gly Glu Asn Phe Pro Tyr 1580	Leu Val Ala Tyr Gln 1585	Ala Thr Val 1590
Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro 1595	Pro Pro Ser Trp Asp 1600	Gln Met Trp 1605
Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys 1610	Pro Thr Leu His Gly 1615	Pro Thr Pro 1620
Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala 1625	Val Gln Asn Glu Val 1630	Thr Leu Thr 1635
His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile 1640	Met Thr Cys Met Ser 1645	Ala Asp Leu 1650
Glu Val Val Thr Ser Thr Trp 1655	Val Leu Val Gly Gly 1660	Val Leu Ala 1665
Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu 1670	Ser Thr Gly Cys Val 1675	Val Ile Val 1680
Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly 1685	Lys Pro Ala Ile Ile 1690	Pro Asp Arg 1695
Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe 1700	Asp Glu Met Glu Glu 1705	Cys Ser Gln 1710
His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln 1715	Gly Met Met Leu Ala 1720	Glu Gln Phe 1725
Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu	Leu Gln Thr Ala Ser	Arg Gln Ala

[0011]

1730	1735	1740
Glu Val Ile Thr Pro Ala	Val Gln Thr Asn Trp	Gln Lys Leu Glu
1745	1750	1755
Val Phe Trp Ala Lys His	Met Trp Asn Phe Ile	Ser Gly Ile Gln
1760	1765	1770
Tyr Leu Ala Gly Leu Ser	Thr Leu Pro Gly Asn	Pro Ala Ile Ala
1775	1780	1785
Ser Leu Met Ala Phe Thr	Ala Ala Val Thr Ser	Pro Leu Thr Thr
1790	1795	1800
Gly Gln Thr Leu Leu Phe	Asn Ile Leu Gly Gly	Trp Val Ala Ala
1805	1810	1815
Gln Leu Ala Ala Pro Gly	Ala Ala Thr Ala Phe	Val Gly Ala Gly
1820	1825	1830
Leu Ala Gly Ala Ala Ile	Gly Ser Val Gly Leu	Gly Lys Val Leu
1835	1840	1845
Val Asp Ile Leu Ala Gly	Tyr Gly Ala Gly Val	Ala Gly Ala Leu
1850	1855	1860
Val Ala Phe Lys Ile Met	Ser Gly Glu Val Pro	Ser Thr Glu Asp
1865	1870	1875
Leu Val Asn Leu Leu Pro	Ala Ile Leu Ser Pro	Gly Ala Leu Val
1880	1885	1890
Val Gly Val Val Cys Ala	Ala Ile Leu Arg Arg	His Val Gly Pro
1895	1900	1905
Gly Glu Gly Ala Val Gln	Trp Met Asn Arg Leu	Ile Ala Phe Ala
1910	1915	1920
Ser Arg Gly Asn His Val	Ser Pro Thr His Tyr	Val Pro Glu Ser
1925	1930	1935
Asp Ala Ala Ala Arg Val	Thr Ala Ile Leu Ser	Ser Leu Thr Val
1940	1945	1950
Thr Gln Leu Leu Arg Arg	Leu His Gln Trp Ile	Ser Ser Glu Cys
1955	1960	1965
Thr Thr Pro Cys Ser Gly	Ser Trp Leu Arg Asp	Ile Trp Asp Trp
1970	1975	1980
Ile Cys Glu Val Leu Ser	Asp Phe Lys Thr Trp	Leu Lys Ala Lys
1985	1990	1995
Leu Met Pro Gln Leu Pro	Gly Ile Pro Phe Val	Ser Cys Gln Arg
2000	2005	2010
Gly Tyr Arg Gly Val Trp	Arg Gly Asp Gly Ile	Met His Thr Arg

2015	2020	2025
Cys His 2030	Cys Gly Ala Glu Ile 2035	Thr Gly His Val Lys Asn Gly Thr 2040
Met Arg 2045	Ile Val Gly Pro Arg 2050	Thr Cys Arg Asn Met Trp Ser Gly 2055
Thr Phe 2060	Pro Ile Asn Ala Tyr 2065	Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Leu 2070
Pro Ala 2075	Pro Asn Tyr Lys Phe 2080	Ala Leu Trp Arg Val Ser Ala Glu 2085
Glu Tyr 2090	Val Glu Ile Arg Arg 2095	Val Gly Asp Phe His Tyr Val Ser 2100
Gly Met 2105	Thr Thr Asp Asn Leu 2110	Lys Cys Pro Cys Gln Ile Pro Ser 2115
Pro Glu 2120	Phe Phe Thr Glu Leu 2125	Asp Gly Val Arg Leu His Arg Phe 2130
Ala Pro 2135	Pro Cys Lys Pro Leu 2140	Leu Arg Glu Glu Val Ser Phe Arg 2145
Val Gly 2150	Leu His Glu Tyr Pro 2155	Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu 2160
Pro Glu 2165	Pro Asp Val Ala Val 2170	Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro 2175
Ser His 2180	Ile Thr Ala Glu Ala 2185	Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg Gly 2190
Ser Pro 2195	Pro Ser Met Ala Ser 2200	Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala 2205
Pro Ser 2210	Leu Lys Ala Thr Cys 2215	Thr Ala Asn His Asp Ser Pro Asp 2220
Ala Glu 2225	Leu Ile Glu Ala Asn 2230	Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly 2235
Gly Asn 2240	Ile Thr Arg Val Glu 2245	Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu 2250
Asp Ser 2255	Phe Asp Pro Leu Val 2260	Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val 2265
Ser Val 2270	Pro Ala Glu Ile Leu 2275	Arg Lys Ser Arg Arg Phe Ala Arg 2280
Ala Leu 2285	Pro Val Trp Ala Arg 2290	Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Val 2295
Glu Thr	Trp Lys Lys Pro Asp	Tyr Glu Pro Pro Val Val His Gly

[0012]

[0013]

2300	2305	2310
Cys Pro 2315	Leu Pro Pro Pro Arg 2320	Ser Pro Pro Val Pro Pro Pro Arg 2325
Lys Lys 2330	Arg Thr Val Val Leu 2335	Thr Glu Ser Thr Leu Ser Thr Ala 2340
Leu Ala 2345	Glu Leu Ala Thr Lys 2350	Ser Phe Gly Ser Ser Ser Thr Ser 2355
Gly Ile 2360	Thr Gly Asp Asn Thr 2365	Thr Thr Ser Ser Glu Pro Ala Pro 2370
Ser Gly 2375	Cys Pro Pro Asp Ser 2380	Asp Val Glu Ser Tyr Ser Ser Met 2385
Pro Pro 2390	Leu Glu Gly Glu Pro 2395	Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly 2400
Ser Trp 2405	Ser Thr Val Ser Ser 2410	Gly Ala Asp Thr Glu Asp Val Val 2415
Cys Cys 2420	Ser Met Ser Tyr Ser 2425	Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro 2430
Cys Ala 2435	Ala Glu Glu Gln Lys 2440	Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn 2445
Ser Leu 2450	Leu Arg His His Asn 2455	Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg 2460
Ser Ala 2465	Cys Gln Arg Gln Lys 2470	Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln 2475
Val Leu 2480	Asp Ser His Tyr Gln 2485	Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala 2490
Ala Ala 2495	Ser Lys Val Lys Ala 2500	Asn Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala 2505
Cys Ser 2510	Leu Thr Pro Pro His 2515	Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr 2520
Gly Ala 2525	Lys Asp Val Arg Cys 2530	His Ala Arg Lys Ala Val Ala His 2535
Ile Asn 2540	Ser Val Trp Lys Asp 2545	Leu Leu Glu Asp Ser Val Thr Pro 2550
Ile Asp 2555	Thr Thr Ile Met Ala 2560	Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln 2565
Pro Glu 2570	Lys Gly Gly Arg Lys 2575	Pro Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro 2580
Asp Leu	Gly Val Arg Val Cys	Glu Lys Met Ala Leu Tyr Asp Val

[0014]

2585	2590	2595
Val Ser Lys Leu Pro Leu	Ala Val Met Gly Ser	Ser Tyr Gly Phe
2600	2605	2610
Gln Tyr Ser Pro Gly Gln	Arg Val Glu Phe Leu	Val Gln Ala Trp
2615	2620	2625
Lys Ser Lys Lys Thr Pro	Met Gly Phe Ser Tyr	Asp Thr Arg Cys
2630	2635	2640
Phe Asp Ser Thr Val Thr	Glu Ser Asp Ile Arg	Thr Glu Glu Ala
2645	2650	2655
Ile Tyr Gln Cys Cys Asp	Leu Asp Pro Gln Ala	Arg Val Ala Ile
2660	2665	2670
Lys Ser Leu Thr Glu Arg	Leu Tyr Val Gly Gly	Pro Leu Thr Asn
2675	2680	2685
Ser Arg Gly Glu Asn Cys	Gly Tyr Arg Arg Cys	Arg Ala Ser Gly
2690	2695	2700
Val Leu Thr Thr Ser Cys	Gly Asn Thr Leu Thr	Cys Tyr Ile Lys
2705	2710	2715
Ala Arg Ala Ala Cys Arg	Ala Ala Gly Leu Gln	Asp Cys Thr Met
2720	2725	2730
Leu Val Cys Gly Asp Asp	Leu Val Val Ile Cys	Glu Ser Ala Gly
2735	2740	2745
Val Gln Glu Asp Ala Ala	Ser Leu Arg Ala Phe	Thr Glu Ala Met
2750	2755	2760
Thr Arg Tyr Ser Ala Pro	Pro Gly Asp Pro Pro	Gln Pro Glu Tyr
2765	2770	2775
Asp Leu Glu Leu Ile Thr	Ser Cys Ser Ser Asn	Val Ser Val Ala
2780	2785	2790
His Asp Gly Ala Gly Lys	Arg Val Tyr Tyr Leu	Thr Arg Asp Pro
2795	2800	2805
Thr Thr Pro Leu Ala Arg	Ala Ala Trp Glu Thr	Ala Arg His Thr
2810	2815	2820
Pro Val Asn Ser Trp Leu	Gly Asn Ile Ile Met	Phe Ala Pro Thr
2825	2830	2835
Leu Trp Ala Arg Met Ile	Leu Met Thr His Phe	Phe Ser Val Leu
2840	2845	2850
Ile Ala Arg Asp Gln Leu	Glu Gln Ala Leu Asn	Cys Glu Ile Tyr
2855	2860	2865
Gly Ala Cys Tyr Ser Ile	Glu Pro Leu Asp Leu	Pro Pro Ile Ile

2870	2875	2880
Gln Arg Leu His Gly Leu Ser	Ala Phe Ser Leu His	Ser Tyr Ser
2885	2890	2895
Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val	Ala Ala Cys Leu Arg	Lys Leu Gly
2900	2905	2910
Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp	Arg His Arg Ala Arg	Ser Val Arg
2915	2920	2925
Ala Arg Leu Leu Ser Arg Gly	Gly Arg Ala Ala Ile	Cys Gly Lys
2930	2935	2940
Tyr Leu Phe Asn Trp Ala Val	Arg Thr Lys Leu Lys	Leu Thr Pro
2945	2950	2955
Ile Ala Ala Ala Gly Arg Leu	Asp Leu Ser Gly Trp	Phe Thr Ala
2960	2965	2970
Gly Tyr Ser Gly Gly Asp Ile	Tyr His Ser Val Ser	His Ala Arg
2975	2980	2985
Pro Arg Trp Phe Trp Phe Cys	Leu Leu Leu Leu Ala	Ala Gly Val
2990	2995	3000
Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn	Arg	
3005	3010	

[0015]

<210> 7
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 7

Glu Thr His Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu	
1 5 10 15	
Val Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn	
20 25 30	
Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu	
35 40 45	
Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe	
50 55 60	
Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Arg Leu Thr	
65 70 75 80	
Asp Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly	
85 90 95	
Leu Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly	
100 105 110	
Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro	
115 120 125	

Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr
 130 135 140
 Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg
 145 150 155 160
 Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly
 165 170 175
 Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly
 180 185 190
 Asn Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
 195 200 205
 Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys
 210 215 220
 Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn
 225 230 235 240
 Tyr Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
 245 250 255
 Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
 260 265 270
 [0016] Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Gln
 275 280 285
 Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr
 290 295 300
 Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
 305 310 315 320
 Gly Val Gly Ser Ser Ile Ala Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val
 325 330 335
 Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Cys Leu
 340 345 350
 Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala
 355 360
 <210> 8
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus
 <400> 8
 Glu Thr His Val Thr Gly Gly Ser Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Val Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn
 20 25 30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu
 35 40 45
 Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe
 50 55 60
 Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Arg Leu Thr
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly
 85 90 95
 Leu Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly
 100 105 110
 Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
 115 120 125
 Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr
 130 135 140
 Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg
 145 150 155 160
 Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly
 165 170 175
 [0017] Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly
 180 185 190
 Asn Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
 195 200 205
 Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys
 210 215 220
 Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn
 225 230 235 240
 Tyr Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
 245 250 255
 Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
 260 265 270
 Asp Arg Asp Arg Ser Glu
 275
 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> N-Terminal signal sequence
 <400> 9
 Met Asn Pro Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val Ala Ala Ala Leu Ala

1	5	10	15
<210> 10			
<211> 353			
<212> PRT			
<213> Hepatitis C virus			
<400> 10			
Tyr Phe Ser Met Gln Ala Asn Trp Ala Lys Val Ile Leu Val Leu Phe			
1	5	10	15
Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala Glu Thr His Val Ser Gly Ala Ala Val			
	20	25	30
Gly Arg Ser Thr Ala Gly Leu Ala Asn Leu Phe Ser Ser Gly Ser Lys			
	35	40	45
Gln Asn Leu Gln Leu Ile Asn Ser Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg			
	50	55	60
Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Asn Thr Gly Phe Leu Ala Ser			
65	70	75	80
Leu Phe Tyr Thr His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Ser Glu Arg Leu			
	85	90	95
Ala Cys Cys Lys Ser Leu Asp Ser Tyr Gly Gln Gly Trp Gly Pro Leu			
	100	105	110
[0018] Gly Val Ala Asn Ile Ser Gly Ser Ser Asp Asp Arg Pro Tyr Cys Trp			
	115	120	125
His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ser Ser Val Cys			
	130	135	140
Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr			
145	150	155	160
Asp His Val Gly Val Pro Thr Tyr Thr Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp			
	165	170	175
Val Phe Leu Leu Asn Ser Thr Arg Pro Pro His Gly Ala Trp Phe Gly			
	180	185	190
Cys Val Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Ala Pro			
	195	200	205
Pro Cys Glu Val Asn Thr Asn Asn Gly Thr Trp His Cys Pro Thr Asp			
	210	215	220
Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Thr Thr Tyr Ala Lys Cys Gly Ser Gly			
225	230	235	240
Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Leu Ile Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp			
	245	250	255
His Phe Pro Cys Thr Ala Asn Phe Ser Val Phe Asn Ile Arg Thr Phe			
	260	265	270

Val Gly Gly Ile Glu His Arg Met Gln Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg
275 280 285

Gly Glu Val Cys Gly Leu Glu His Arg Asp Arg Val Glu Leu Ser Pro
290 295 300

Leu Leu Leu Thr Thr Thr Ala Trp Gln Ile Leu Pro Cys Ser Phe Thr
305 310 315 320

Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile
325 330 335

Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ala Val Val Ser Trp
340 345 350

Ala

<210> 11
<211> 353
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 11

Tyr Phe Ser Met Val Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu
1 5 10 15

[0019]

Leu Phe Ala Gly Val Asp Ala Glu Thr His Val Thr Gly Gly Asn Ala
20 25 30

Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu Val Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys
35 40 45

Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser
50 55 60

Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly
65 70 75 80

Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu
85 90 95

Ala Ser Cys Arg Arg Leu Thr Asp Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile
100 105 110

Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Leu Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His
115 120 125

Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly
130 135 140

Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp
145 150 155 160

Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val
165 170 175

	Phe	Val	Leu	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro	Leu	Gly	Asn	Trp	Phe	Gly	Cys
				180					185					190		
	Thr	Trp	Met	Asn	Ser	Thr	Gly	Phe	Thr	Lys	Val	Cys	Gly	Ala	Pro	Pro
			195					200					205			
	Cys	Val	Ile	Gly	Gly	Val	Gly	Asn	Asn	Thr	Leu	Leu	Cys	Pro	Thr	Asp
		210					215					220				
	Cys	Phe	Arg	Lys	His	Pro	Glu	Ala	Thr	Tyr	Ser	Arg	Cys	Gly	Ser	Gly
	225					230					235					240
	Pro	Trp	Ile	Thr	Pro	Arg	Cys	Met	Val	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Leu	Trp
					245					250					255	
	His	Tyr	Pro	Cys	Thr	Ile	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Lys	Val	Arg	Met	Tyr
				260					265					270		
	Val	Gly	Gly	Val	Glu	His	Arg	Leu	Glu	Ala	Ala	Cys	Asn	Trp	Thr	Arg
			275					280					285			
	Gly	Glu	Arg	Cys	Asp	Leu	Glu	Asp	Arg	Asp	Arg	Ser	Glu	Leu	Ser	Pro
		290					295					300				
	Leu	Leu	Leu	Ser	Thr	Thr	Gln	Trp	Gln	Val	Leu	Pro	Cys	Ser	Phe	Thr
	305					310					315					320
[0020]	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Ile	His	Leu	His	Gln	Asn	Ile
					325					330					335	
	Val	Asp	Val	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Ala	Ser	Trp
				340					345					350		
	Ala															
	<210>	12														
	<211>	354														
	<212>	PRT														
	<213>	Hepatitis C virus														
	<400>	12														
	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Ala	Ala	Asn	Trp	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Val	Leu	Phe
	1				5					10					15	
	Leu	Phe	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Asn	Thr	Arg	Thr	Val	Gly	Gly	Ser	Ala
				20					25					30		
	Ala	Gln	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	Pro	Gly	Pro	Gln
			35					40					45			
	Gln	Asn	Leu	Gln	Leu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	His	Ile	Asn	Arg
		50					55					60				
	Thr	Ala	Leu	Asn	Cys	Asn	Asp	Ser	Leu	Gln	Thr	Gly	Phe	Val	Ala	Gly
	65					70					75					80

	Leu	Leu	Tyr	Tyr	His	Lys	Phe	Asn	Ser	Thr	Gly	Cys	Pro	Gln	Arg	Met	
					85					90					95		
	Ala	Ser	Cys	Arg	Pro	Leu	Ala	Ala	Phe	Asp	Gln	Gly	Trp	Gly	Thr	Ile	
				100					105					110			
	Ser	Tyr	Ala	Ala	Val	Ser	Gly	Pro	Ser	Asp	Asp	Lys	Pro	Tyr	Cys	Trp	
			115					120					125				
	His	Tyr	Pro	Pro	Arg	Pro	Cys	Gly	Ile	Val	Pro	Ala	Arg	Gly	Val	Cys	
		130					135					140					
	Gly	Pro	Val	Tyr	Cys	Phe	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Val	Val	Gly	Thr	Thr	
	145					150					155					160	
	Asp	Arg	Lys	Gly	Asn	Pro	Thr	Tyr	Ser	Trp	Gly	Glu	Asn	Glu	Thr	Asp	
					165					170					175		
	Ile	Phe	Leu	Leu	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	Pro	Thr	Gly	Asn	Trp	Phe	Gly	
				180					185					190			
	Cys	Thr	Trp	Met	Asn	Ser	Thr	Gly	Phe	Val	Lys	Thr	Cys	Gly	Ala	Pro	
			195					200					205				
	Pro	Cys	Asn	Leu	Gly	Pro	Thr	Gly	Asn	Asn	Ser	Leu	Lys	Cys	Pro	Thr	
		210					215					220					
[0021]	Asp	Cys	Phe	Arg	Lys	His	Pro	Asp	Ala	Thr	Tyr	Thr	Lys	Cys	Gly	Ser	
	225					230					235				240		
	Gly	Pro	Trp	Leu	Thr	Pro	Arg	Cys	Leu	Val	His	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Leu	
				245					250						255		
	Trp	His	Tyr	Pro	Cys	Thr	Leu	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Lys	Val	Arg	Met	
				260					265					270			
	Tyr	Ile	Gly	Gly	Leu	Glu	His	Arg	Leu	Glu	Val	Ala	Cys	Asn	Trp	Thr	
		275						280					285				
	Arg	Gly	Glu	Arg	Cys	Asp	Leu	Glu	Asp	Arg	Asp	Arg	Ala	Glu	Leu	Ser	
		290					295					300					
	Pro	Leu	Leu	His	Thr	Thr	Thr	Gln	Trp	Ala	Ile	Leu	Pro	Cys	Ser	Phe	
	305					310					315				320		
	Thr	Pro	Thr	Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Ile	His	Leu	His	Gln	Asn	
					325					330				335			
	Ile	Val	Asp	Thr	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	Ile	Val	Ser	
				340					345					350			
	Trp	Ala															
	<210>	13															
	<211>	359															
	<212>	PRT															
	<213>	Hepatitis C virus															

<400> 13

Tyr Tyr Ser Met Gln Gly Asn Trp Ala Lys Val Ala Ile Val Met Ile
1 5 10 15

Met Phe Ser Gly Val Asp Ala Glu Thr Tyr Val Thr Gly Gly Ser Val
20 25 30

Ala His Ser Ala Arg Gly Leu Thr Ser Leu Phe Ser Met Gly Ala Lys
35 40 45

Gln Lys Leu Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser
50 55 60

Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser Ile Asn Thr Gly Phe Ile Ala Gly
65 70 75 80

Leu Phe Tyr Tyr His Lys Phe Asn Ser Thr Gly Cys Pro Gln Arg Leu
85 90 95

Ser Ser Cys Lys Pro Ile Ile Ser Phe Arg Gln Gly Trp Gly Pro Leu
100 105 110

Thr Asp Ala Asn Ile Thr Gly Pro Ser Asp Asp Arg Pro Tyr Cys Trp
115 120 125

His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Ser Val Val Pro Ala Ser Ser Val Cys
130 135 140

[0022]

Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr
145 150 155 160

Asp Ile Lys Gly Arg Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp
165 170 175

Val Phe Leu Leu Glu Ser Leu Arg Pro Pro Ser Gly Arg Trp Phe Gly
180 185 190

Cys Ala Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Leu Lys Thr Cys Gly Ala Pro
195 200 205

Pro Cys Asn Ile Tyr Gly Gly Glu Gly Asp Pro Glu Asn Glu Thr Asp
210 215 220

Leu Phe Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr
225 230 235 240

Ser Arg Cys Gly Ala Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val Asp
245 250 255

Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Leu
260 265 270

Phe Lys Val Arg Met Phe Val Gly Gly Phe Glu His Arg Phe Thr Ala
275 280 285

Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asn Ile Glu Asp Arg Asp

290	295	300
Arg Ser Glu Gln His Pro Leu Leu His Ser Thr Thr Glu Leu Ala Ile 305 310 315 320		
Leu Pro Cys Ser Phe Thr Pro Met Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile 325 330 335		
His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly 340 345 350		
Ser Asp Met Val Gly Trp Ala 355		
<210> 14 <211> 357 <212> PRT <213> Hepatitis C virus		
<400> 14		
Tyr Phe Gly Met Ala Gly Asn Trp Leu Lys Val Leu Ala Val Leu Phe 1 5 10 15		
Leu Phe Ala Gly Val Glu Ala Gln Thr Met Ile Ala His Gly Val Ser 20 25 30		
Gln Thr Thr Ser Gly Phe Ala Ser Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln 35 40 45		
[0023] Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg Thr 50 55 60		
Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Leu Ala Ser Leu 65 70 75 80		
Phe Tyr Thr His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala 85 90 95		
Ala Cys Lys Pro Leu Ala Glu Phe Arg Gln Gly Trp Gly Gln Ile Thr 100 105 110		
His Lys Asn Val Ser Gly Pro Ser Asp Asp Arg Pro Tyr Cys Trp His 115 120 125		
Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Glu Val Val Pro Ala Arg Ser Val Cys Gly 130 135 140		
Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp 145 150 155 160		
Lys Arg Gly Asn Pro Thr Tyr Thr Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val 165 170 175		
Phe Met Leu Glu Ser Leu Arg Pro Pro Thr Gly Gly Trp Phe Gly Cys 180 185 190		
Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Ala Pro Pro 195 200 205		

Cys Gln Ile Val Pro Gly Asn Tyr Asn Ser Ser Ala Asn Glu Leu Leu
 210 215 220
 Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Gln Arg
 225 230 235 240
 Cys Gly Ser Gly Pro Trp Val Thr Pro Arg Cys Leu Val Asp Tyr Ala
 245 250 255
 Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Leu His Lys
 260 265 270
 Val Arg Met Phe Val Gly Gly Thr Glu His Arg Phe Asp Val Ala Cys
 275 280 285
 Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Glu Leu His Asp Arg Asn Arg Ile
 290 295 300
 Glu Met Ser Pro Leu Leu Phe Ser Thr Thr Gln Leu Ser Ile Leu Pro
 305 310 315 320
 Cys Ser Phe Ser Thr Met Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu
 325 330 335
 His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Ser Thr Asn
 340 345 350

[0024] Val Thr Ser Trp Val
355

<210> 15
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 15

Tyr Phe Gly Met Ala Gly Asn Trp Ala Lys Val Ile Leu Ile Met Leu
1 5 10 15

Leu Met Ser Gly Val Asp Ala Glu Thr Met Ala Val Gly Ala Arg Ala
20 25 30

Ala His Thr Thr Gly Ala Leu Val Ser Leu Leu Asn Pro Gly Pro Ser
35 40 45

Gln Arg Leu Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Arg
50 55 60

Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Gln Thr Gly Phe Ile Ala Ala
65 70 75 80

Leu Phe Tyr Thr His Arg Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met
85 90 95

Ala Ser Cys Lys Pro Leu Ser Asp Phe Asp Gln Gly Trp Gly Pro Leu
100 105 110

	Trp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Glu	Arg	Pro	Ser	Asp	Gln	Arg	Pro	Tyr	Cys	Trp	
			115					120					125				
	His	Tyr	Ala	Pro	Ser	Pro	Cys	Gly	Ile	Val	Pro	Ala	Lys	Asp	Val	Cys	
		130					135					140					
	Gly	Pro	Val	Tyr	Cys	Phe	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Val	Val	Gly	Thr	Thr	
		145				150					155					160	
	Asp	Arg	Arg	Gly	Val	Pro	Thr	Tyr	Thr	Trp	Gly	Glu	Asn	Glu	Ser	Asp	
				165						170					175		
	Val	Phe	Leu	Leu	Asn	Ser	Thr	Arg	Pro	Pro	Gln	Gly	Ser	Trp	Phe	Gly	
			180						185					190			
	Cys	Ser	Trp	Met	Asn	Thr	Thr	Gly	Phe	Thr	Lys	Thr	Cys	Gly	Gly	Pro	
		195						200					205				
	Pro	Cys	Lys	Ile	Arg	Pro	Gln	Gly	Ala	Gln	Ser	Asn	Thr	Ser	Leu	Thr	
		210					215					220					
	Cys	Pro	Thr	Asp	Cys	Phe	Arg	Lys	His	Pro	Arg	Ala	Thr	Tyr	Ser	Ala	
		225				230					235					240	
	Cys	Gly	Ser	Gly	Pro	Trp	Leu	Thr	Pro	Arg	Cys	Met	Val	His	Tyr	Pro	
				245						250				255			
[0025]	Tyr	Arg	Leu	Trp	His	Tyr	Pro	Cys	Thr	Val	Asn	Phe	Thr	Ile	His	Lys	
			260						265					270			
	Val	Arg	Leu	Tyr	Ile	Gly	Gly	Val	Glu	His	Arg	Leu	Asp	Ala	Ala	Cys	
		275						280					285				
	Asn	Trp	Thr	Arg	Gly	Glu	Arg	Cys	Asp	Leu	Glu	Asp	Arg	Asp	Arg	Val	
		290					295					300					
	Asp	Met	Ser	Pro	Leu	Leu	His	Ser	Thr	Thr	Glu	Leu	Ala	Ile	Leu	Pro	
		305				310					315				320		
	Cys	Ser	Phe	Val	Pro	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Ile	His	Leu	
				325					330					335			
	His	Gln	Asn	Ile	Val	Asp	Ala	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Ala	
			340					345					350				
	Ile	Ile	Ser	Trp	Ala												
			355														
	<210>	16															
	<211>	357															
	<212>	PRT															
	<213>	Hepatitis C virus															
	<400>	16															
	Tyr	Phe	Ser	Met	Gln	Gly	Ala	Trp	Ala	Lys	Val	Val	Val	Ile	Leu	Leu	
	1				5					10					15		

	Leu	Ala	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Arg	Thr	His	Thr	Val	Gly	Gly	Ser	Ala	
				20					25					30			
	Ala	Gln	Thr	Thr	Gly	Arg	Leu	Thr	Ser	Leu	Phe	Asp	Met	Gly	Pro	Arg	
			35					40					45				
	Gln	Lys	Ile	Gln	Leu	Val	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	His	Ile	Asn	Arg	
		50					55					60					
	Thr	Ala	Leu	Asn	Cys	Asn	Asp	Ser	Leu	His	Thr	Gly	Phe	Ile	Ala	Ser	
	65					70					75					80	
	Leu	Phe	Tyr	Thr	His	Ser	Phe	Asn	Ser	Ser	Gly	Cys	Pro	Glu	Arg	Met	
				85						90					95		
	Ser	Ala	Cys	Arg	Ser	Ile	Glu	Ala	Phe	Arg	Val	Gly	Trp	Gly	Ala	Leu	
				100					105					110			
	Gln	Tyr	Glu	Asp	Asn	Val	Thr	Asn	Pro	Glu	Asp	Met	Arg	Pro	Tyr	Cys	
		115						120					125				
	Trp	His	Tyr	Pro	Pro	Arg	Gln	Cys	Gly	Val	Val	Ser	Ala	Lys	Thr	Val	
		130					135						140				
	Cys	Gly	Pro	Val	Tyr	Cys	Phe	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Val	Val	Gly	Thr	
	145					150					155					160	
[0026]	Thr	Asp	Arg	Leu	Gly	Ala	Pro	Thr	Tyr	Thr	Trp	Gly	Glu	Asn	Glu	Thr	
				165						170					175		
	Asp	Val	Phe	Leu	Leu	Asn	Ser	Thr	Arg	Pro	Pro	Leu	Gly	Ser	Trp	Phe	
			180						185					190			
	Gly	Cys	Thr	Trp	Met	Asn	Ser	Ser	Gly	Tyr	Thr	Lys	Thr	Cys	Gly	Ala	
		195						200					205				
	Pro	Pro	Cys	Arg	Thr	Arg	Ala	Asp	Phe	Asn	Ala	Ser	Thr	Asp	Leu	Leu	
		210					215					220					
	Cys	Pro	Thr	Asp	Cys	Phe	Arg	Lys	His	Pro	Asp	Thr	Thr	Tyr	Leu	Lys	
	225					230					235				240		
	Cys	Gly	Ser	Gly	Pro	Trp	Leu	Thr	Pro	Arg	Cys	Leu	Ile	Asp	Tyr	Pro	
				245						250					255		
	Tyr	Arg	Leu	Trp	His	Tyr	Pro	Cys	Thr	Val	Asn	Tyr	Thr	Ile	Phe	Lys	
			260						265					270			
	Ile	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Gly	Val	Glu	His	Arg	Leu	Thr	Ala	Ala	Cys	
		275						280					285				
	Asn	Phe	Thr	Arg	Gly	Asp	Arg	Cys	Asn	Leu	Glu	Asp	Arg	Asp	Arg	Ser	
		290					295					300					
	Gln	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	His	Ser	Thr	Thr	Glu	Trp	Ala	Ile	Leu	Pro	
	305					310					315					320	

Cys Ser Tyr Ser Asp Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Leu His Leu
325 330 335

His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Phe Met Tyr Gly Leu Ser Pro Ala
340 345 350

Leu Thr Lys Tyr Ile
355

<210> 17
<211> 632
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 17

Glu Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu
1 5 10 15

Ala Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr
20 25 30

Glu Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro
35 40 45

Asn Pro Gln Glu Val Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met
50 55 60

Trp Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu
65 70 75 80

[0027]

Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val
85 90 95

Thr Leu Asn Cys Thr Asp Leu Arg Asn Val Thr Ser Ser Glu Gly Met
100 105 110

Arg Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg
115 120 125

Asp Lys Val Lys Lys Asp Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Val Val
130 135 140

Pro Ile Asp Asn Asp Asn Thr Ser Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr
145 150 155 160

Ser Thr Cys Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro
165 170 175

Ile His Tyr Cys Thr Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp
180 185 190

Lys Lys Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln
195 200 205

Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn
210 215 220

Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Ser Asn Phe Thr

225	230	235	240
Asp Asn Ala Lys Asn Ile Ile Val Gln Leu Lys Glu Ser Val Glu Ile	245	250	255
Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly	260	265	270
Pro Gly Arg Cys Phe Tyr Thr Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg	275	280	285
Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Thr Lys Trp Asn Asn Thr Leu Asn	290	295	300
Gln Ile Ala Thr Lys Leu Lys Glu Gln Phe Gly Asn Asn Lys Thr Ile	305	310	315
Val Phe Asn Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser	325	330	335
Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe	340	345	350
Asn Ser Thr Trp Asn Phe Asn Gly Thr Trp Asn Leu Thr Gln Ser Asn	355	360	365
Gly Thr Glu Gly Asn Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln	370	375	380
Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro	385	390	395
Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Ile Leu	405	410	415
Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn His Asn Asn Asp Thr Glu Thr Phe Arg	420	425	430
Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys	435	440	445
Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Cys	450	455	460
Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Arg Arg Arg Lys Arg Ala Val Gly Thr	465	470	475
Ile Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met	485	490	495
Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Leu Leu Leu Ser	500	505	510
Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Pro Glu Ala Gln	515	520	525
Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala			

[0028]

530	535	540
Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly 545 550 555 560		
Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Cys Thr Ala Val Pro Trp 565 570 575		
Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Thr Leu Asp Met Ile Trp Asn Asn Met 580 585 590		
Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Gly Leu Ile 595 600 605		
Tyr Thr Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln 610 615 620		
Glu Leu Leu Glu Leu Asp Gly Ser 625 630		
<210> 18 <211> 661 <212> PRT <213> Artificial Sequence		
<220> <223> Amino acid residues corresponding to HIV1 env with N-terminal leader sequence and C-terminal HIS tag		
<400> 18		
[0029] Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly 1 5 10 15		
Ala Val Phe Val Ser Ala Ser Glu Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr 20 25 30		
Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser 35 40 45		
Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val His Asn Val Trp Ala Thr His 50 55 60		
Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro Gln Glu Val Val Leu Glu Asn 65 70 75 80		
Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met 85 90 95		
His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val 100 105 110		
Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn Cys Thr Asp Leu Arg Asn 115 120 125		
Val Thr Ser Ser Glu Gly Met Arg Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe 130 135 140		
Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asp Lys Val Lys Lys Asp Tyr Ala Leu 145 150 155 160		

Phe Tyr Arg Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asn Asp Asn Thr Ser Tyr
 165 170 175
 Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Thr Cys Thr Gln Ala Cys Pro Lys
 180 185 190
 Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Thr Pro Ala Gly Phe
 195 200 205
 Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys
 210 215 220
 Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val
 225 230 235 240
 Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val
 245 250 255
 Ile Arg Ser Ser Asn Phe Thr Asp Asn Ala Lys Asn Ile Ile Val Gln
 260 265 270
 Leu Lys Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr
 275 280 285
 Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Arg Cys Phe Tyr Thr Thr Gly
 290 295 300
 [0030] Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Thr
 305 310 315 320
 Lys Trp Asn Asn Thr Leu Asn Gln Ile Ala Thr Lys Leu Lys Glu Gln
 325 330 335
 Phe Gly Asn Asn Lys Thr Ile Val Phe Asn Gln Ser Ser Gly Gly Asp
 340 345 350
 Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr
 355 360 365
 Cys Asn Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Phe Asn Gly Thr
 370 375 380
 Trp Asn Leu Thr Gln Ser Asn Gly Thr Glu Gly Asn Asp Thr Ile Thr
 385 390 395 400
 Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly
 405 410 415
 Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser
 420 425 430
 Asn Ile Thr Gly Leu Ile Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn His Asn
 435 440 445
 Asn Asp Thr Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn
 450 455 460

Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
465 470 475 480

Gly Val Ala Pro Thr Lys Cys Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Arg Arg
485 490 495

Arg Lys Arg Ala Val Gly Thr Ile Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu
500 505 510

Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val
515 520 525

Gln Ala Arg Leu Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu
530 535 540

Leu Arg Ala Pro Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp
545 550 555 560

Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu
565 570 575

Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
580 585 590

Cys Cys Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Thr Leu
595 600 605

[0031]

Asp Met Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile
610 615 620

Asp Asn Tyr Thr Gly Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
625 630 635 640

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Gly Ser His
645 650 655

His His His His His
660

<210> 19

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> H77cdelta123

<400> 19

Glu Thr His Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His
1 5 10 15

Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser Leu Asn Thr Gly Trp
20 25 30

Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro
35 40 45

[0032]

Glu Arg Leu Ala Ser Cys Gly Ser Ser Gly Cys Trp His Tyr Pro Pro
 50 55 60
 Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr
 65 70 75 80
 Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly
 85 90 95
 Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu
 100 105 110
 Asn Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met
 115 120 125
 Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Gly Ser
 130 135 140
 Ser Gly Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr
 145 150 155 160
 Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Met Val Asp
 165 170 175
 Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr Thr Ile
 180 185 190
 Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Glu Ala
 195 200 205
 Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp
 210 215 220
 Arg Ser Glu His His His His His His
 225 230
 <210> 20
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ConIdelta123
 <400> 20
 Gly Thr Tyr Gly Ser Ser Gly Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp
 1 5 10 15
 His Ile Asn Arg Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Asn Thr Gly
 20 25 30
 Phe Leu Ala Ala Leu Phe Tyr Val His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys
 35 40 45
 Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Gly Ser Ser Gly Cys Trp His Tyr Ala
 50 55 60
 Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Ala Gln Val Cys Gly Pro Val
 65 70 75 80

Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Phe
 85 90 95
 Gly Val Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Leu
 100 105 110
 Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Gln Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp
 115 120 125
 Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Thr Cys Gly Gly Pro Pro Cys Gly
 130 135 140
 Ser Ser Gly Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr
 145 150 155 160
 Tyr Thr Lys Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Leu Val
 165 170 175
 His Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr
 180 185 190
 Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Glu
 195 200 205
 Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asn Leu Glu Asp Arg
 210 215 220

[0033]

Asp Arg Ser Glu
225

<210> 21
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> S52delta123

<400> 21

Glu Thr His Gln Lys Leu Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His
1 5 10 15

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

Ile Ala Gly Leu Phe Tyr Tyr His Lys Phe Asn Ser Thr Gly Cys Pro
35 40 45

Gln Arg Leu Ser Ser Cys Gly Ser Ser Gly Cys Trp His Tyr Ala Pro
50 55 60

Arg Pro Cys Ser Val Val Pro Ala Ser Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr
65 70 75 80

Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Ile Lys Gly
85 90 95

Lys Pro Thr Tyr Asn Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Phe Leu Leu
100 105 110

Glu Ser Leu Arg Pro Pro Ser Gly Arg Trp Phe Gly Cys Ala Trp Met
115 120 125

Asn Ser Thr Gly Phe Leu Lys Thr Cys Gly Ala Pro Pro Cys Gly Ser
130 135 140

Ser Gly Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr
145 150 155 160

Ser Arg Cys Gly Ala Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val Asp
165 170 175

Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Leu
180 185 190

Phe Lys Val Arg Met Phe Val Gly Gly Phe Glu His Arg Phe Thr Ala
195 200 205

Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asn Ile Glu Asp Arg Asp
210 215 220

Arg Ser Glu
225

[0034]

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> human trypsinogen signal peptide
<400> 22

Met Asn Pro Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val Ala Ala Ala Leu Ala
1 5 10 15

<210> 23
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> human tissue plasminogen activator signal peptide (tPA)
<400> 23

Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly
1 5 10 15

Ala Val Phe Val Ser Ala Ser
20

<210> 24
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 6 HIS tag
<400> 24

[0035]

His His His His His His
1 5

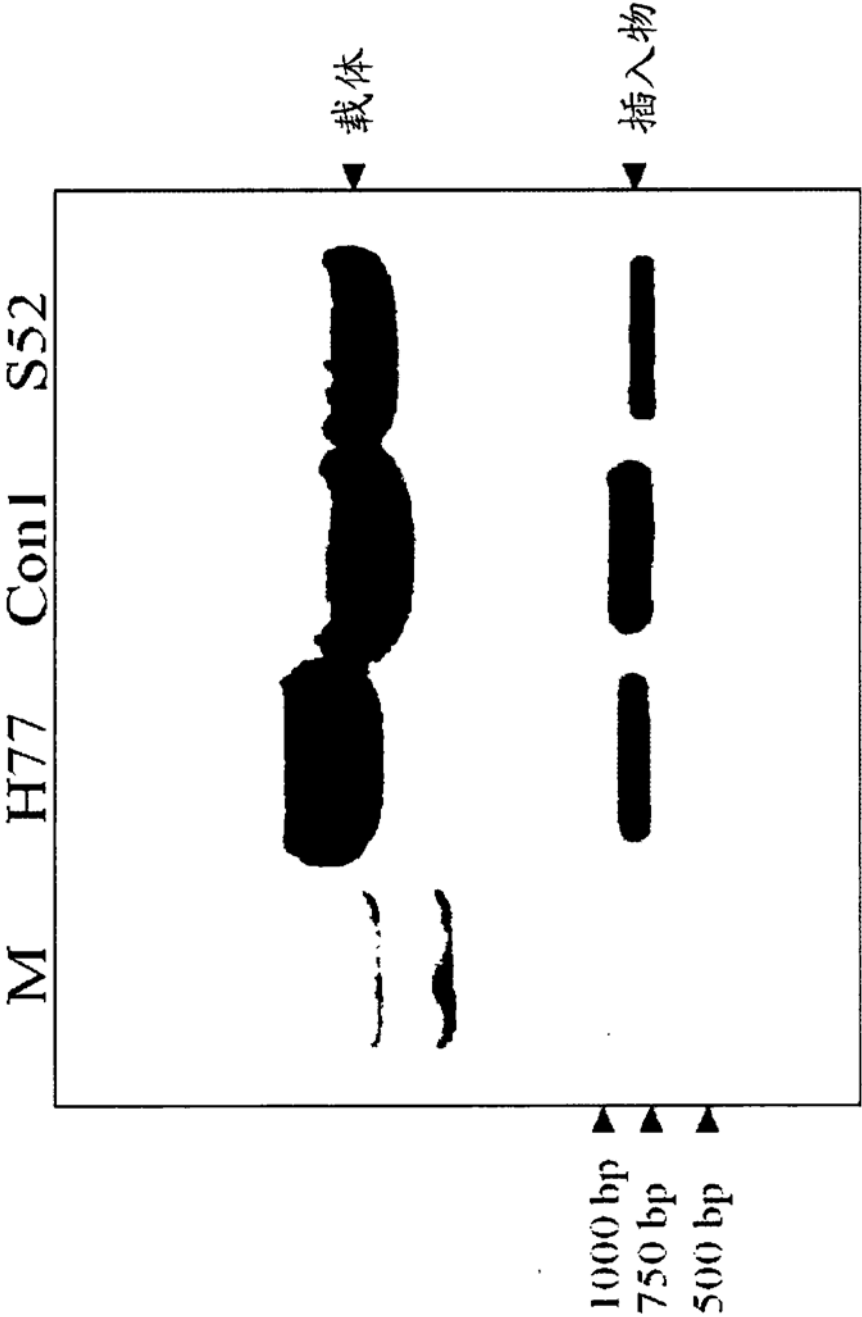


图1

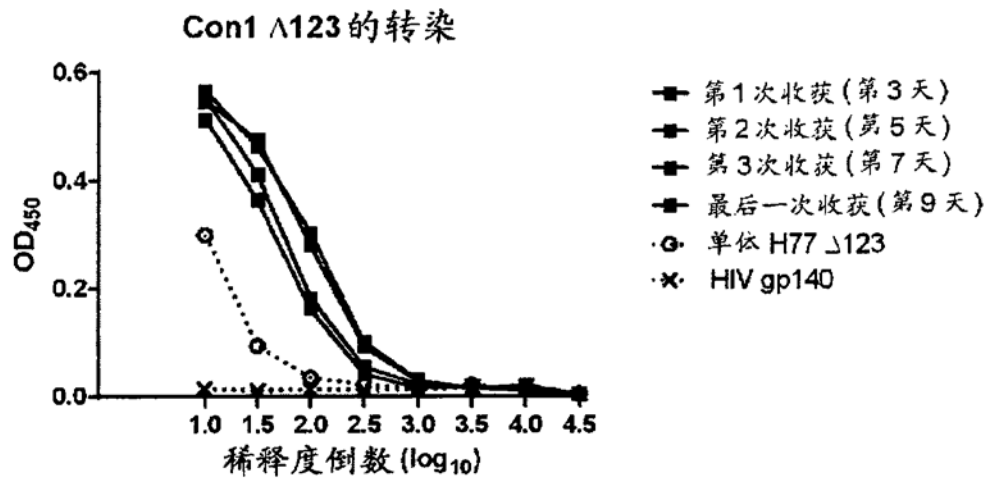
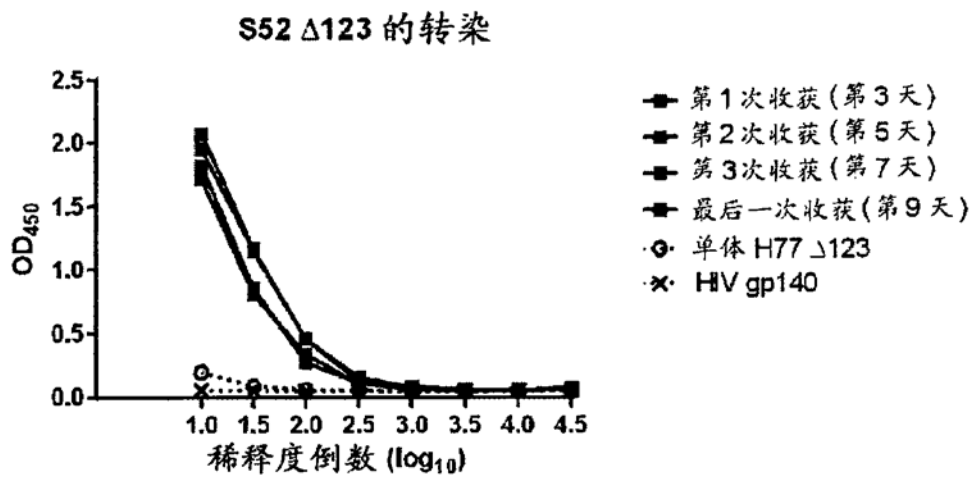
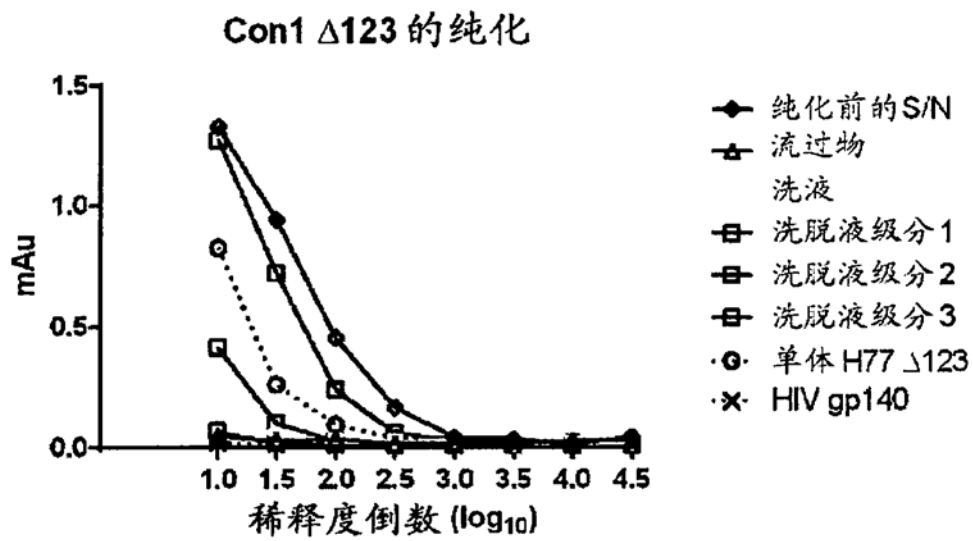
A**B**

图2

C



D

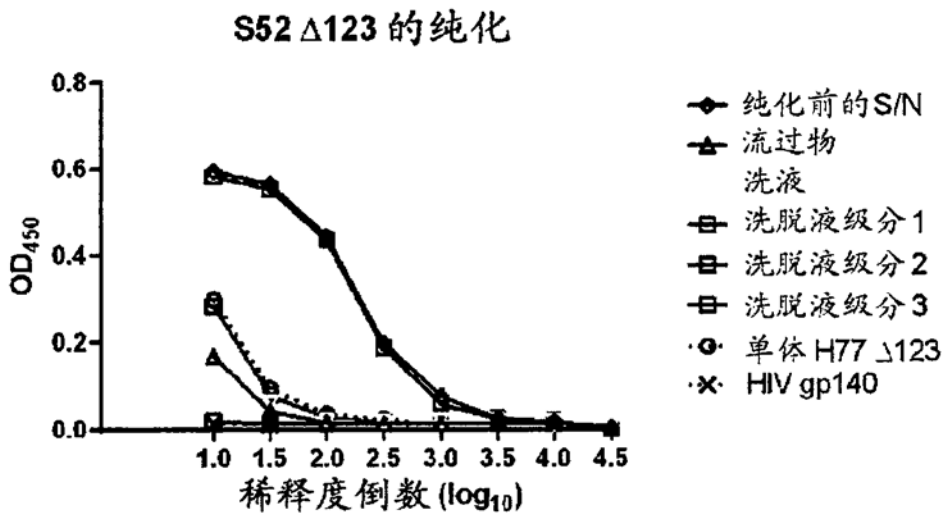


图2(续)

A

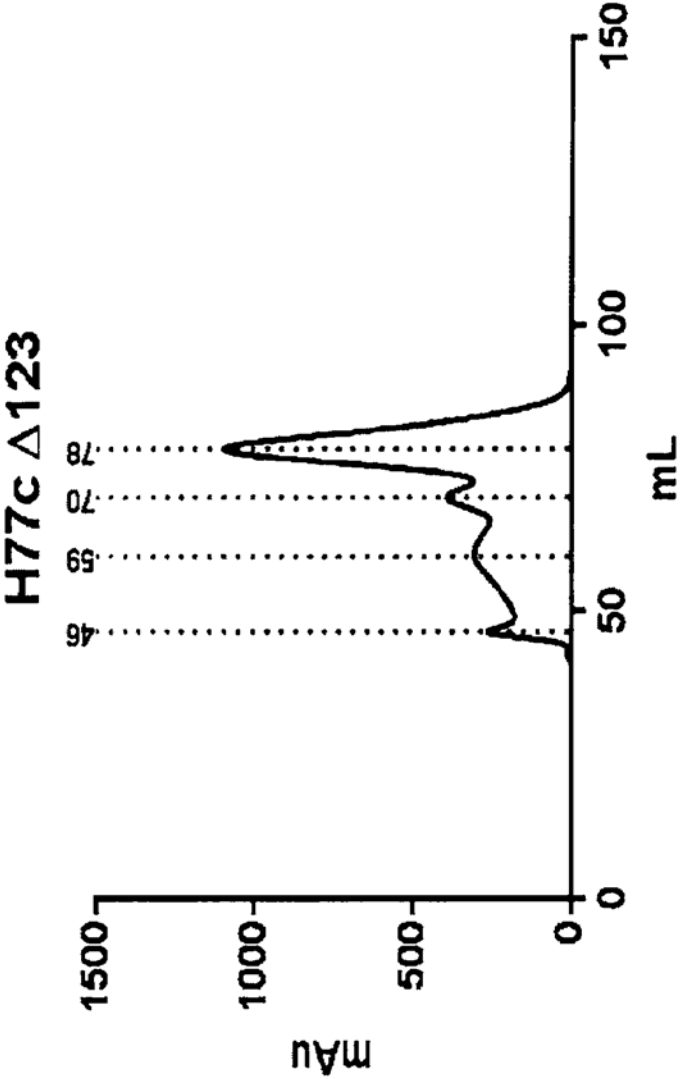


图3

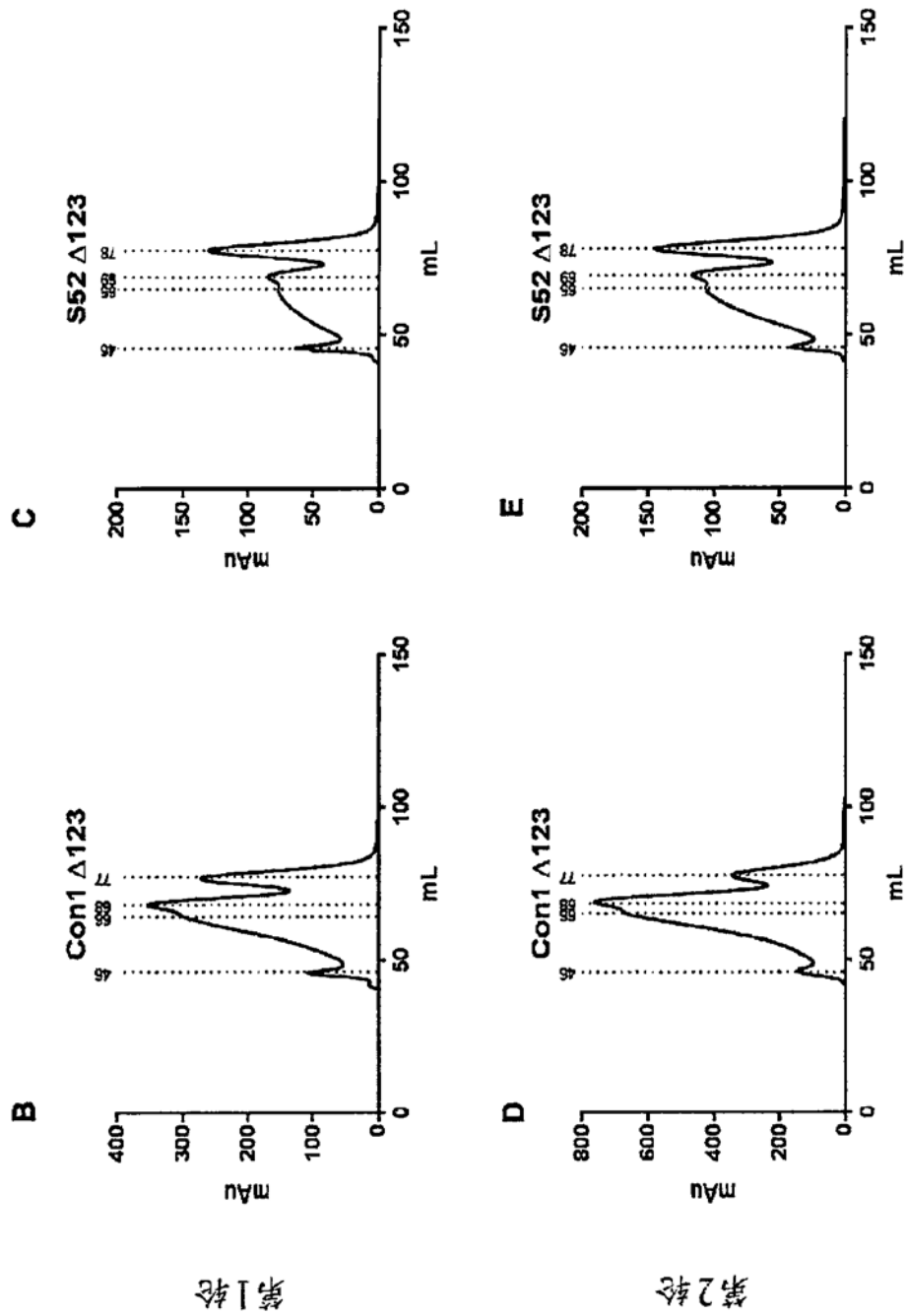


图3 (续)

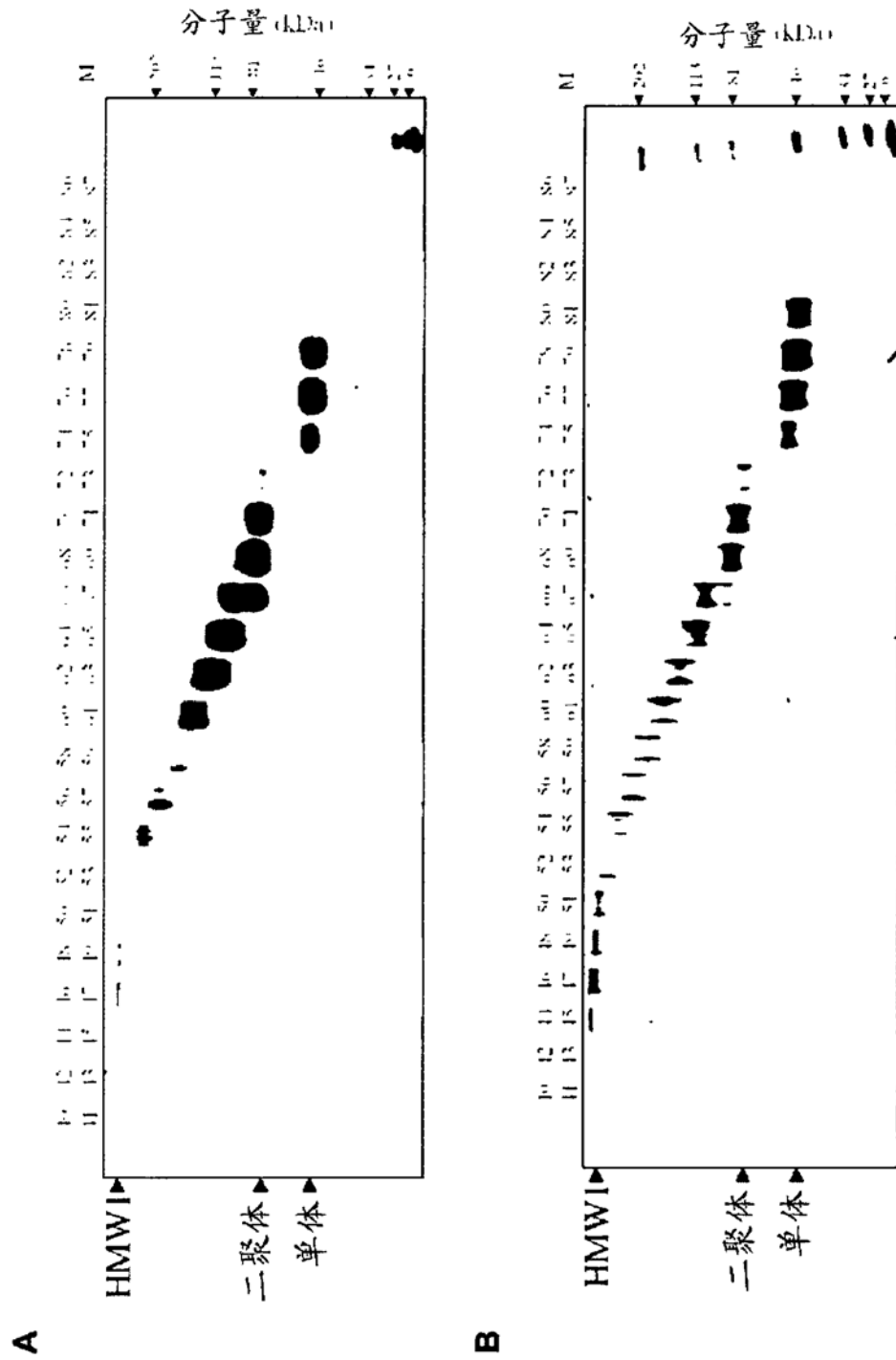


图4

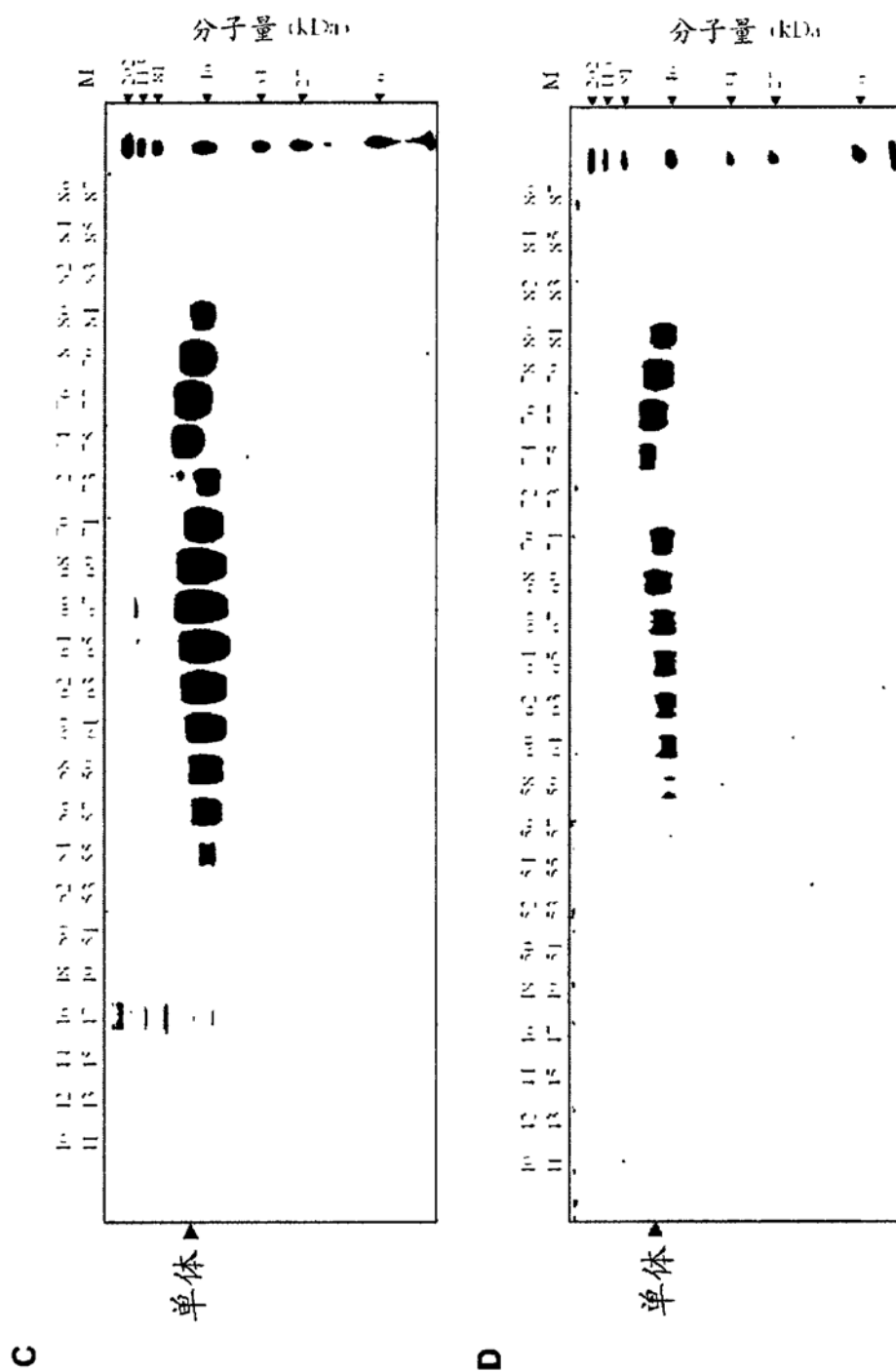


图4 (续)

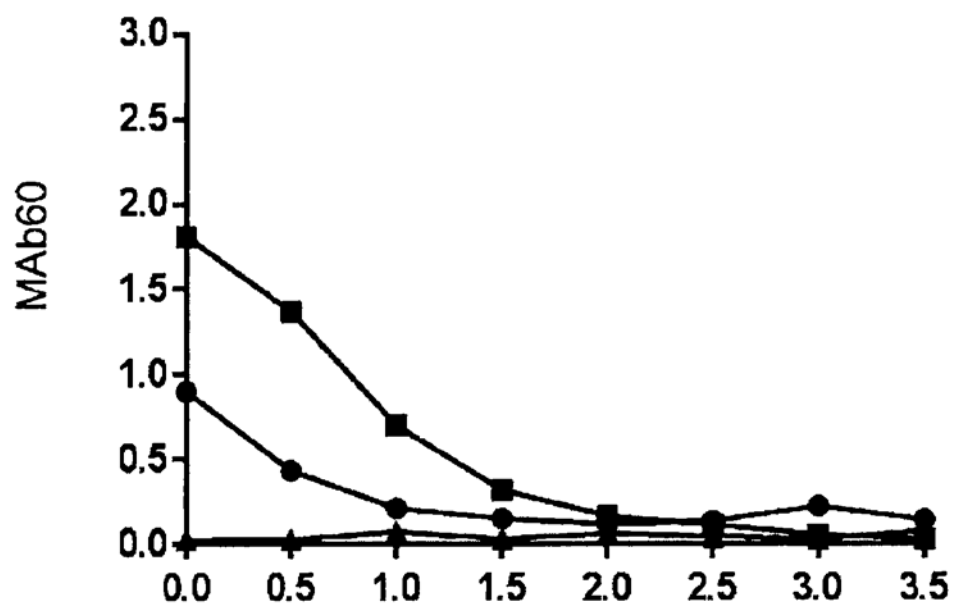
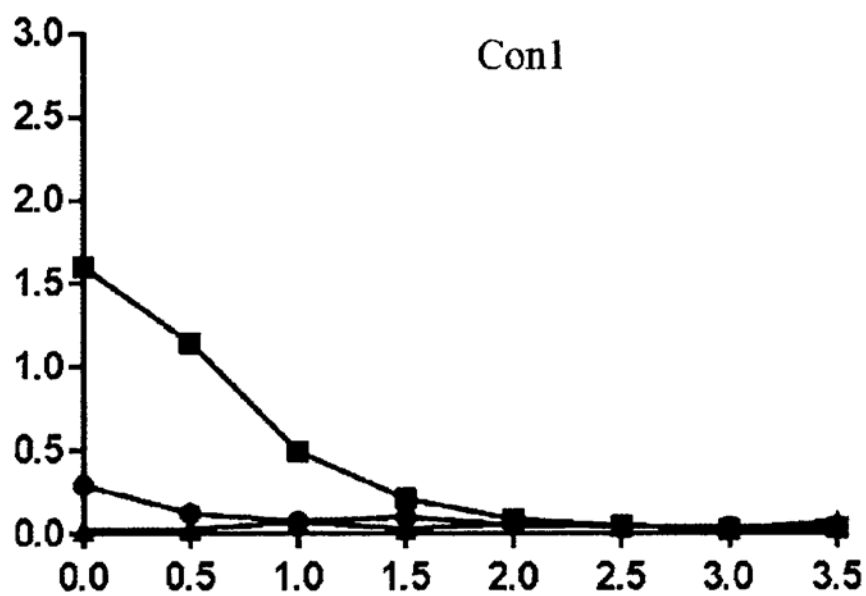
A**H77c****Con1**

图5

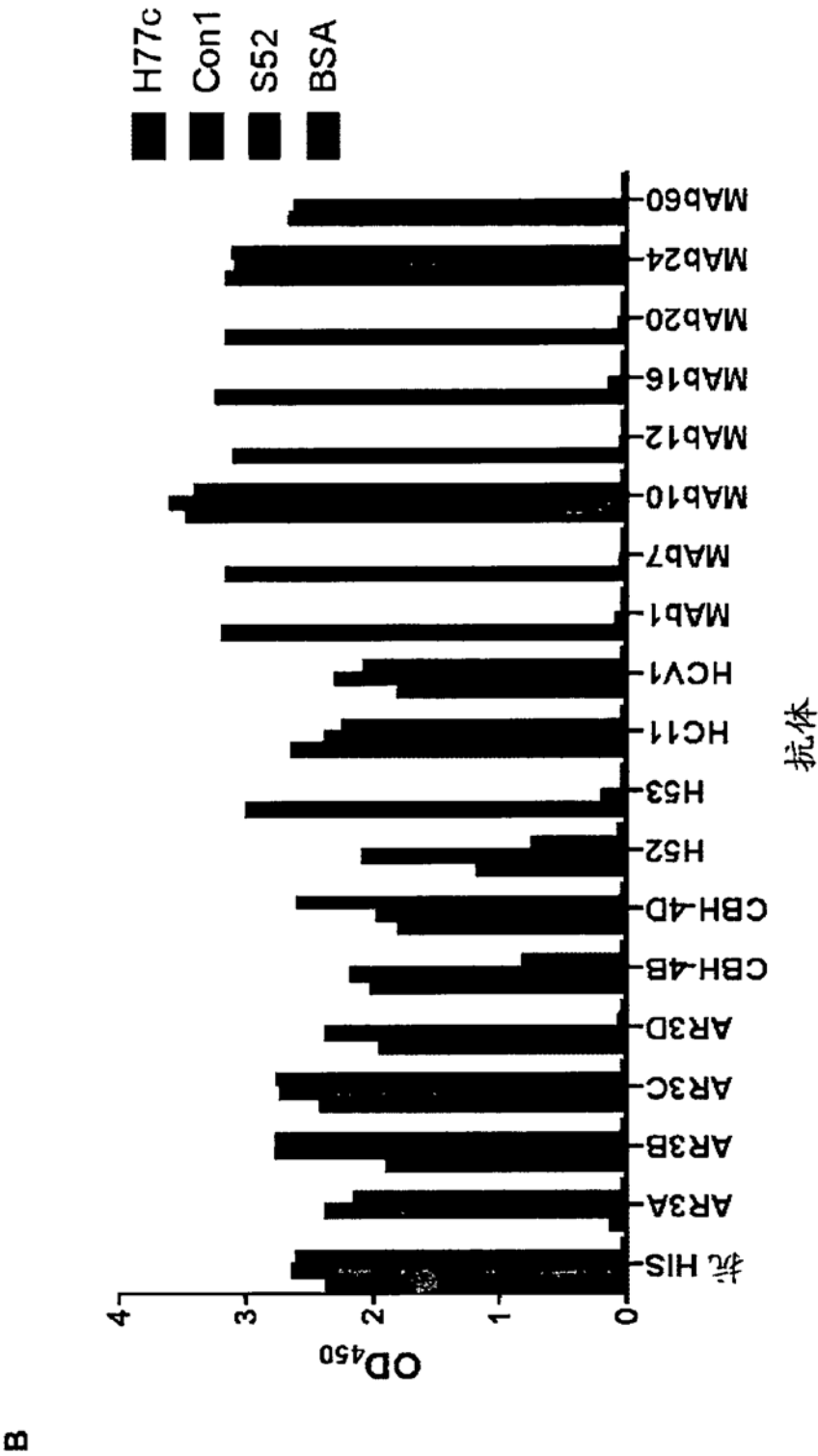


图5 (续)

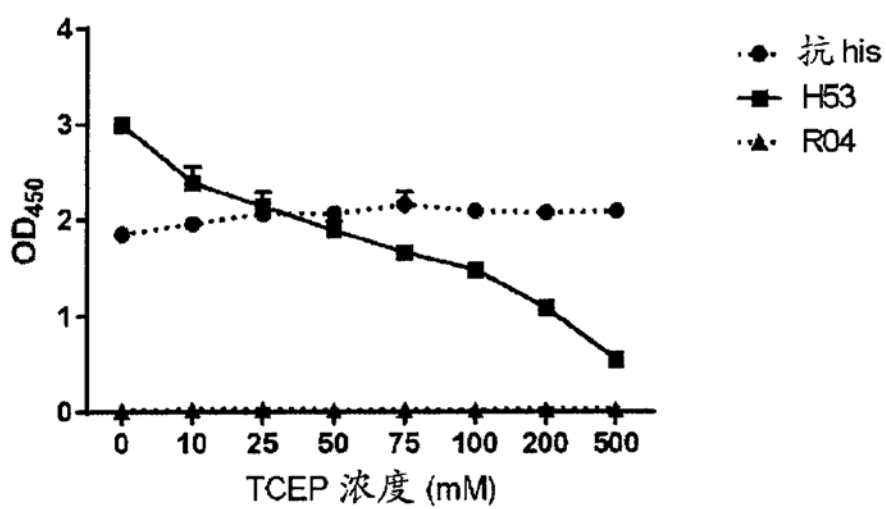
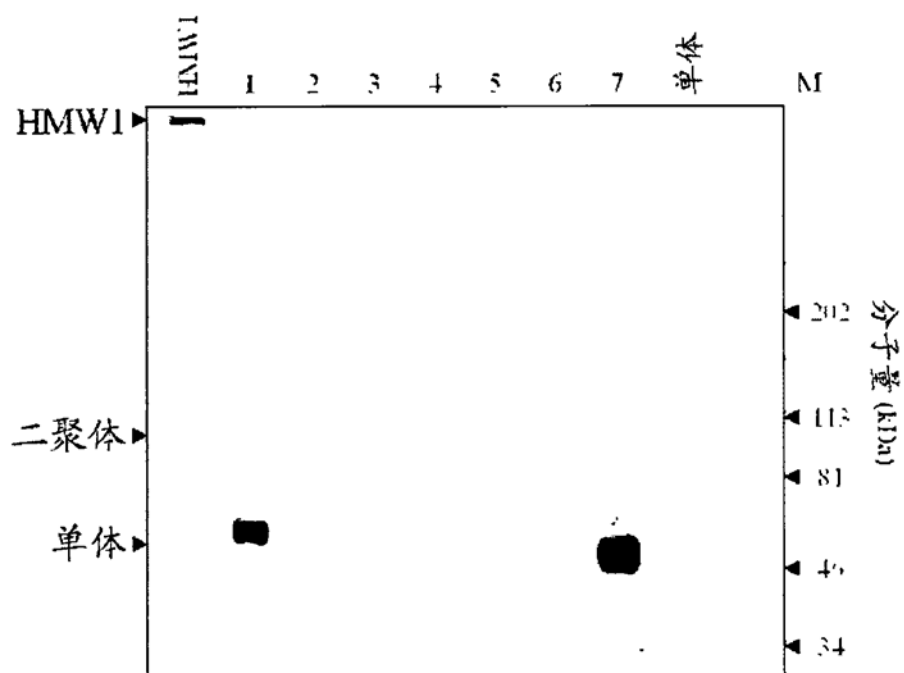
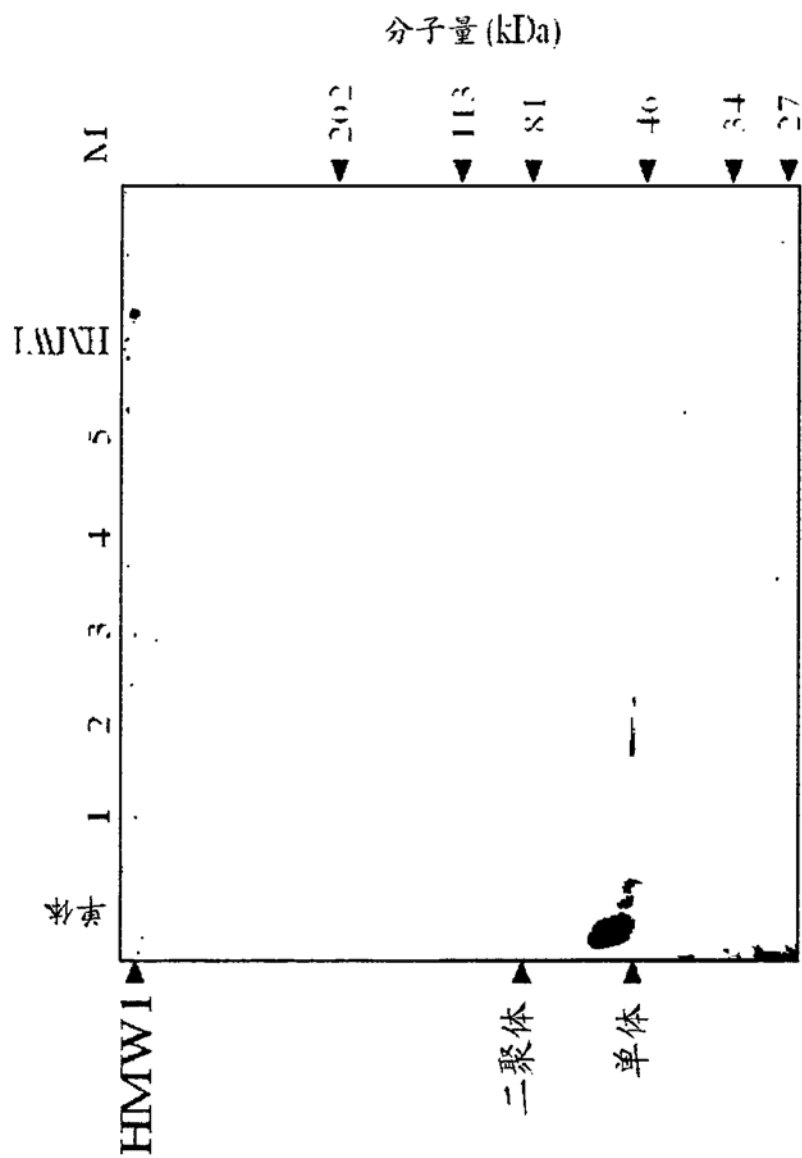
A**B**

图6



A

图7

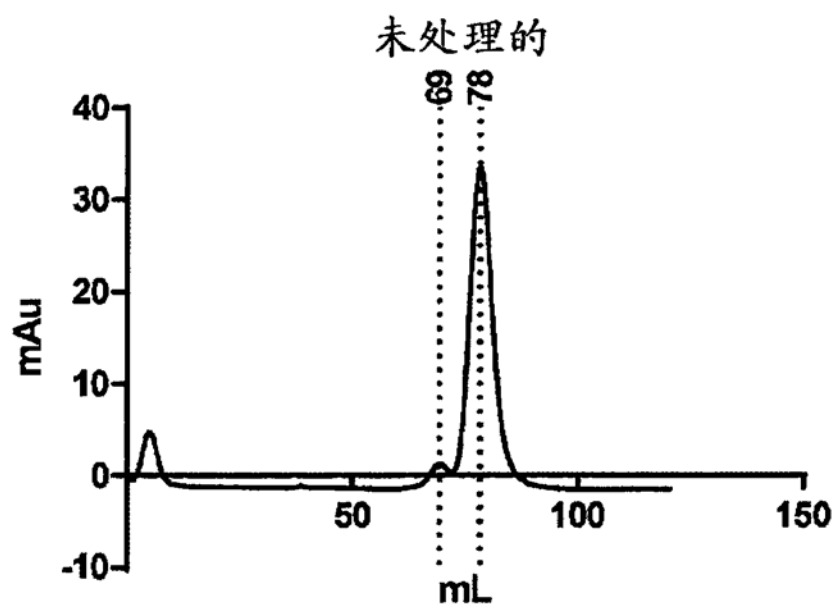
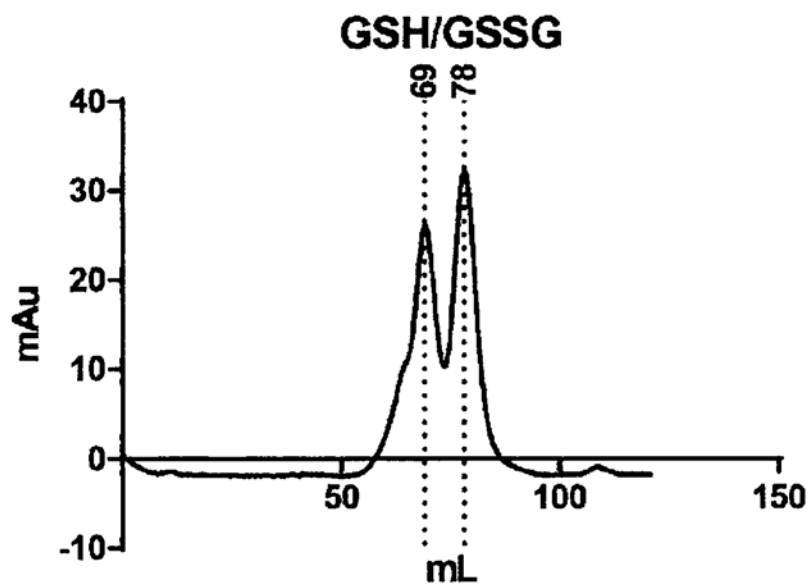
B**C**

图7(续)

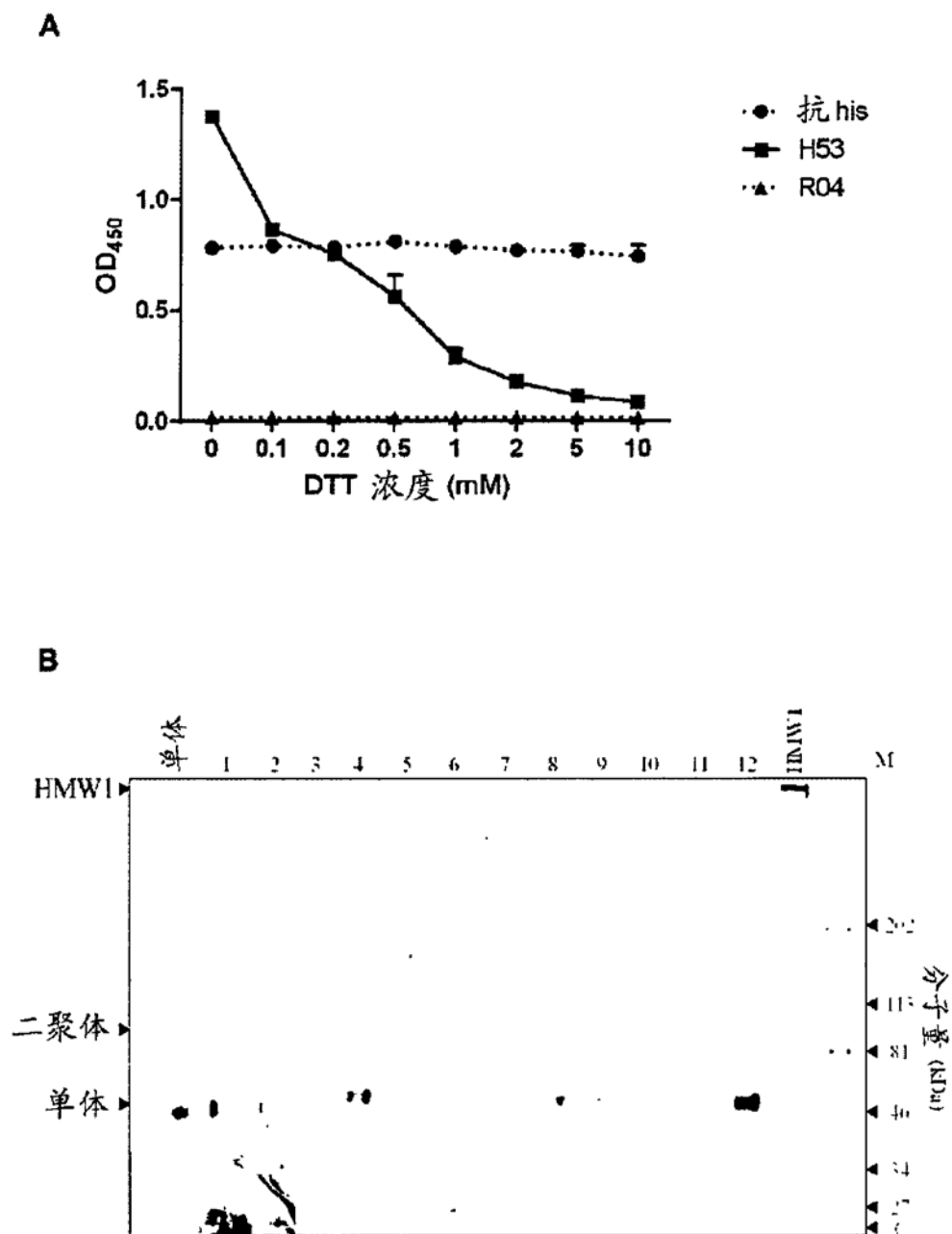
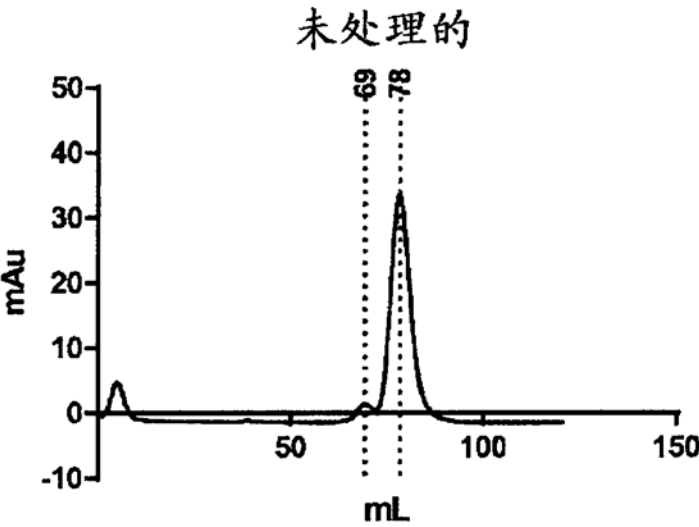


图8

C



D

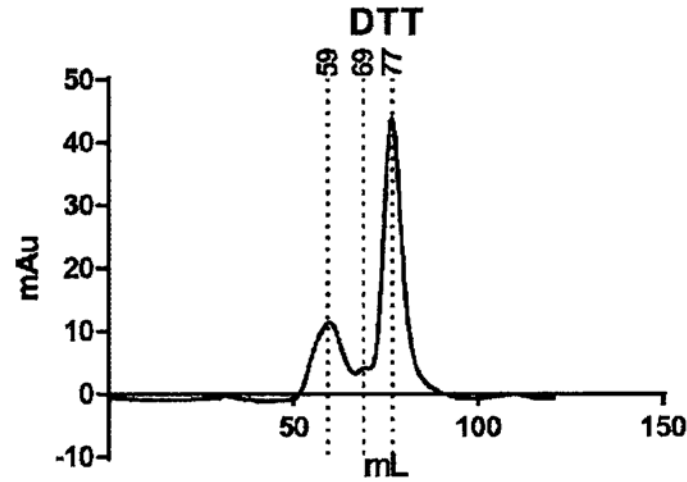
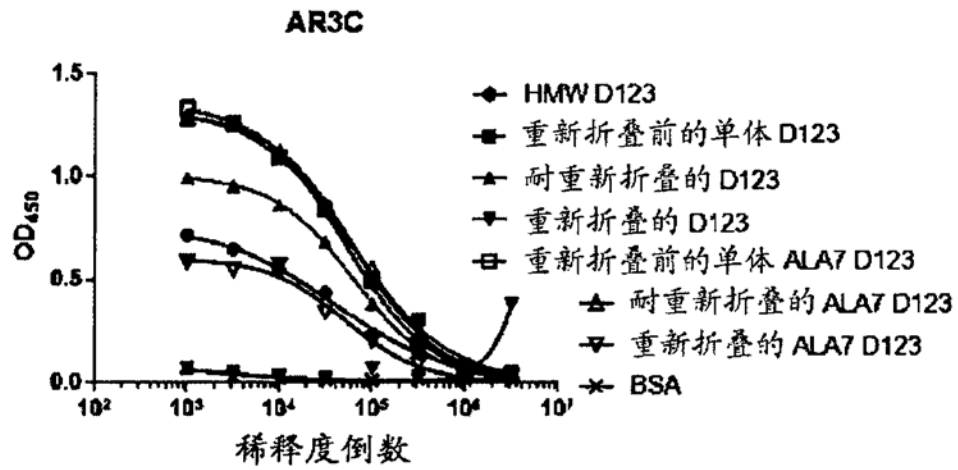


图8(续)

A



B

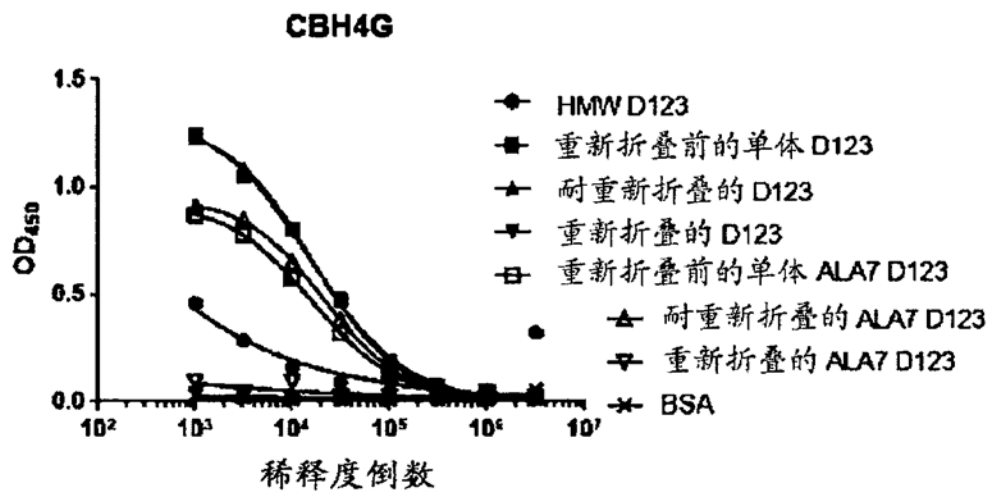
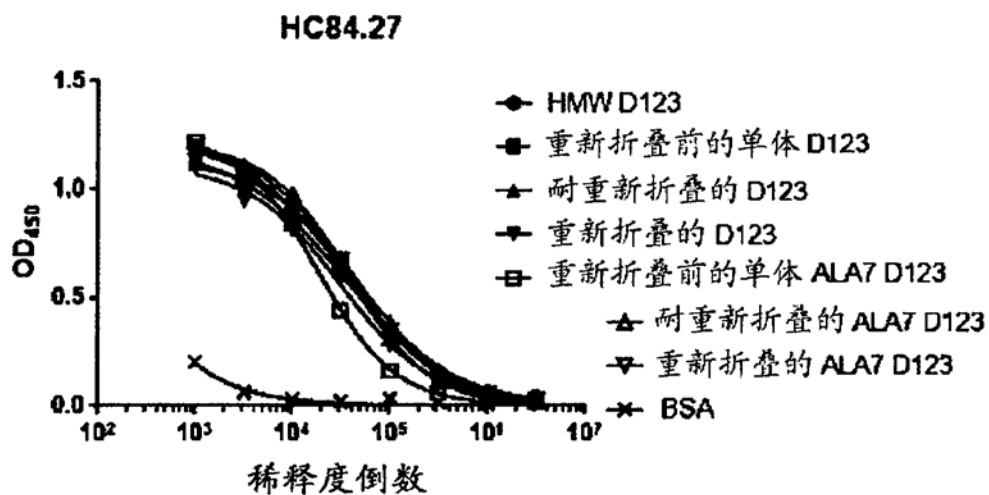


图9

C



D

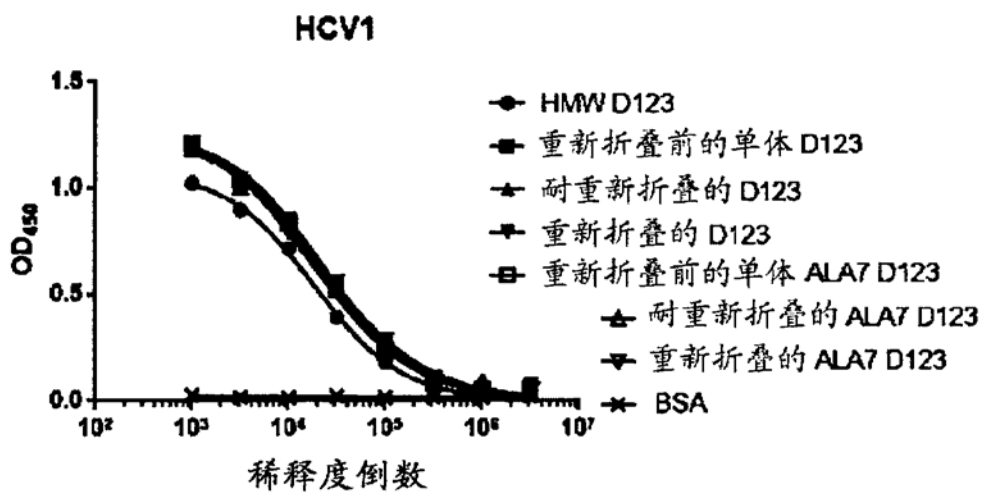


图9(续)

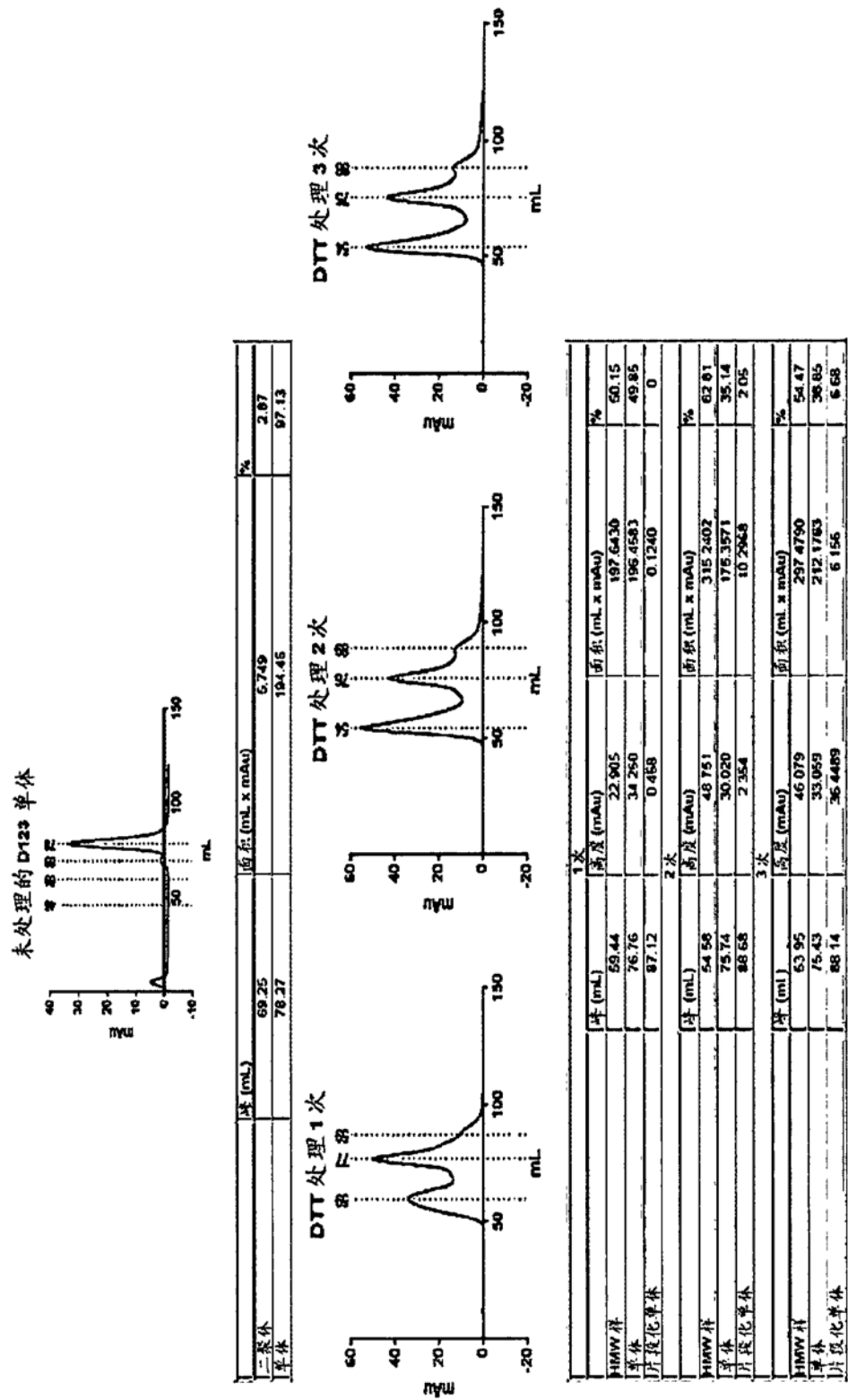
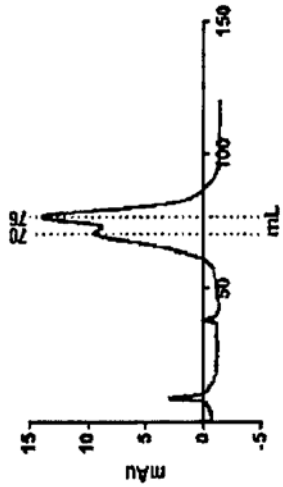


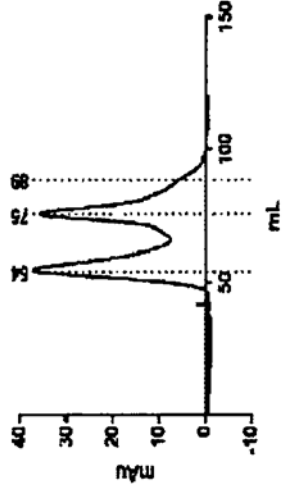
图10

使未重新折叠的D123单体重新折叠



	峰 (mL)	高度 (mAu)	面积 (mL x mAu)	%
二聚体	70.07	6.524	37.1145	36.62
单体	76.34	11.045	84.2488	63.38

用蛋白酶抑制剂重新折叠



	峰 (mL)	高度 (mAu)	面积 (mL x mAu)	%
PIAW 样	54.56	31.915	230.4685	52.67
单体	75.65	28.195	2017.0970	47.33

图11

HVR1

ED43 YFSMQANWAKVILVLFAGVDA...KONIQLINSNGSW
H77c YFSMVGNWAKVLVLLFAGVDA...KONIQLINTNGSW
SA13 YYASAANWAKVVLVLFAGVDA...KONIQLINTNGSW
S52 YYSMQGNWAKVAIVMIFSGVDA...KQKQLVNTNGSW
EUHK2 YFGMAGNWLKVLAVLFLFAGVEA...KONIQLINTNGSW
QC69 YFGMAGNWARVIIIMLMSGVDA...SQRQLQINTNGSW
J6 YFSMQGAWAKVVVILLLAAGVDA...ROKIQLVNTNGSW
*:. . * * * : : : : * : * * . . . : : * : * : * : * : *

HVR2

ED43 HINRTALNCNDSLNTGFLASLFYTHKFNSSGC...
H77c HINSTALNCNESLNTGWLAGLFYQHKFNSSGC...
SA13 HINRTALNCNDSLQTFVAGLLYHKNSTGC...
S52 HINSTALNCNESINTGFIAGLFYHKNSTGC...
EUHK2 HINRTALNCNDSLQTFGLASLFYTHKFNSSGC...
QC69 HINRTALNCNDSLQTFIAALFYTHRFNSSGC...
J6 HINRTALNCNDSLHTGFIASLFYTHSFNSSGC...
*** ***** : : : * : * * ***** : : : * : : * : *

ED43 CWHYAPRPCGIVPASSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDVGVPPTYTNGENETDVFL
H77c CWHYPPRPCGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFL
SA13 CWHYPPRPCGIVPARGVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRKGNPTYSWGNETDIFL
S52 CWHYAPRPCSVVPASSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDIKGRPTYNNGENETDVFL
EUHK2 CWHYAPRPCVVPARSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDKRGNPTYTNGENETDVFM
QC69 CWHYAPSPCGIVPAKDVCVPYCFTPSPVVVGTTDRRGVPTYTNGENESDVFL
J6 CWHYPPRCQGVVSAKTVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRLGAPTYTNGENETDVFL
* : ***** * * : * * ***** : : : * : * : *

IgVR/VR3

ED43 LNSTRPPHGAWEFCVWMNSTGFTKTCGAPPC...CPTDCFRKHPEET
H77c LNNTREPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPC...CPTDCFRKHPEAT
SA13 LNNTREPTGNWFGCTWMNSTGFTKTCGAPPC...CPTDCFRKHPEAT
S52 LESLRPPSGRWFGCAWMNSTGFLKTCGAPPC...CPTDCFRKHPEAT
EUHK2 LESLRPPTGGWFGCTWMNSTGFTKTCGAPPC...CPTDCFRKHPEAT
QC69 LNSTRPPQGSWFGCSWMNTTGTFTKTCGAPPC...CPTDCFRKHPEAT
J6 LNSTRPPLGSWFGCTWMNSSGYTKTCGAPPC...CPTDCFRKHPEAT
*:. *** * ***** : : * : * * ***** : : : * : * : *

ED43 YAKCGSGPWITPRCLIDYPYRLWHFPCTANFSVENIRTFVGGIEHRMQAACNWTGRGECG
H77c YSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPTINYTIKVRMTVGGVEHRLEAACNWTGRGERCD
SA13 YTKCGSGPWLTPRCMVDPYRLWHYPTINYTIKVRMTVGGVEHRLEAACNWTGRGERCD
S52 YSRCGAGPWLTPRCMVDPYRLWHYPTVNFITKVRMTVGGVEHRFTAACNWTGRGERCN
EUHK2 YQRCGSGPWITPRCLVDYAYRLWHYPTVNFITLHKVRMTVGGVEHRFDVACNWTGRGERCE
QC69 YSACGSGPWLTPRCMVHYPYRLWHYPTVNFITLHKVRLYIGGVEHRLDAACNWTGRGERCD
J6 YLKGSGGPWLTPRCCLIDYPYRLWHYPTVNYTIFKIRMTVGGVEHRLTAACNFTGRGDRCN
* * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ED43 LEHRDRVELSPLLLTTAWQILPCSFITLPAALSTGLIHLHQNIQVQYLYGVGSVAVSWA
H77c LEDRDRSELSPLLLSTTQWQVLPSCFITLPAALSTGLIHLHQNIQVQYLYGVGSSIASWA
SA13 LEDRDRAELSPLLHTTTQWAILPCSFITLPAALSTGLIHLHQNIQVQYLYGLSSSIVSWA
S52 IEDRDRSEQHPLHSTTELAILPCSFITLPAALSTGLIHLHQNIQVQYLYGVGSDMVGWA
EUHK2 LHDNRRIEMSPLLFSTTQLSILPCSFITLPAALSTGLIHLHQNIQVQYLYGVSTNVTSWV
QC69 LEDRDRVDMSPLLHSTTELAILPCSFVFLPALSTGLIHLHQNIQVQYLYGLSPAIISWA
J6 LEDRDRSQLSPLLHSTTEWAILPCSYSDLPALSTGLLHLHQNIQVQYLYGLSPALTRYI
:. * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

图12

Δ123Ala7 密码子优化的核苷酸序列

GGTACCGCTAGCGCCACCATGAACCCCTGCTGATCCTGACCTTTGTGGCCGCTGCCCTGGCCGAGACAC
ACCAGAACATCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGCTGGCACATCAACAGCACCGCCCTGAACTGCAACG
AGAGCCTGAACACAGGCTGGCTGGCCGGCCTGTTCTACCAGCACAAGTTCAACAGCAGCGGAGCCCCCG
AGAGACTGGCCTCTTGTGGATCTTCTGGCGCCTGGCACTACCCCTAGACCTTGTGGAATCGTGCCCGC
CAAGAGCGTGTGCGGCCCTGTGTAAGTCTTACCCCTAGCCCTGTGGTCGTGGGCACCACCGATAGATCT
GGCGCCCTACCTATTCCTGGGGCGCCAACGACACCGACGTGTTCTGTGCTGAACAACACCCGGCCACCCC
TGGGCAATTGGTTCGGCTGCACCTGGATGAATCCACCGGCTTCACCAAAGTGTGCGGCGCTCCTCCTGC
CGGATCCAGCGGAGCACCTACCGACGCTTCAGAAAGCACCCCGAGGCCACCTACTCTAGAGCCGGATC
TGGCCCTGGATCACCCCAAGATGATGGTGGACTACCCCTACCGGCTGTGGCACTATCCTGCAACATC
AACTACCATCTTCAAAGTGCGGATGTACGTGGGCGGCGTGGAACACAGACTGGAAGCCGCTGCAAC
TGGACCAGAGGCGAGAGAGCCGACCTGGAAGATCGGGACAGAAGCGAGCACCACCACCATCACCCTG
ATGACTCGAG

Δ123Ala7 蛋白质序列

ETHQNIQLIN TNGSWHINST ALNCNESLNT GWLAGLFYQH KFNSSGAPER LASCSSGAW
HYPPRPCGIV PAKSVCGPVY CFTPSPVVVG TDRSGAPTY SWGANDTDVF VLNNTRPPLG
NWFGCTWMNS TGFTKVC GAP PAGSSGAPTD AFRKHPEATY SRAGSGPWIT PRCMVDYPYR
LWHYPCTINY TIFKVRMYVG GVEHRLEAAC NWTRGERADL EDRDRSE

图13

AF009606	MSTNPKPQRTKRTNRRFQDVKFPGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSERSQPRG	60
AF009606_全长 E2	-----	0
AF009606_E2661	-----	0
WT_E2661	-----	0
Delta123	-----	0
AF009606	RRQPIPKARRPECRTWAPGYFWPLYGNEGCCWACWLLSPRGRSPSWGPTDPRRRSRNLG	120
AF009606_全长 E2	-----	0
AF009606_E2661	-----	0
WT_E2661	-----	0
Delta123	-----	0
AF009606	KVIDTITCGGFADIMGYIPIVGAPIGGAARALAHGVRVLEDDGVVYATGNI.PGCSFSIFJIA	180
AF009606_全长 E2	-----	0
AF009606_E2661	-----	0
WT_E2661	-----	0
Delta123	-----	0
AF009606	LLSCLTVPASAYQVRNSSGLYHVNDPCPNSIYVEAADAIIHFTGCCVFCVREGNASRCNV	240
AF009606_全长 E2	-----	0
AF009606_E2661	-----	0
WT_E2661	-----	0
Delta123	-----	0
AF009606	AVTPTVATRDGKLPPTTQLRRHIDLELVGSATTCUSALYVGDLCSSVFLVGQLFTFSPPRHWT	300
AF009606_全长 E2	-----	0
AF009606_E2661	-----	0
WT_E2661	-----	0
Delta123	-----	0

图14

AF009606	TQDCNCSTYPGHI	360
AF009606_全长 E2	-----	0
AF009606_E2661	-----	0
WT_E2661	-----	0
Delta123	-----	0
AF009606	YFSMVGNAKVLVLLFAGVDAETHVTGGSAGRTAGLVGLTPCAKQNIQLINTNGSW	420
AF009606_全长 E2	-----	37
AF009606_E2661	-----ETHVTGGSAGRTAGLVGLTPCAKQNIQLINTNGSW	37
WT_E2661	-----ETIIVTGGAGRTAGLVGLTPCAKQNIQLINTNGSW	37
Delta123	-----ETIIVTGGAGRTAGLVGLTPCAKQNIQLINTNGSW	15
AF009606	HINSTALNCNESLNTGNLAGLFYQHKFNSSGCCPERLASCRRLTDFAQGWGPISYANGSGL	480
AF009606_全长 E2	-----	97
AF009606_E2661	-----HINSTALNCNESLNTGNLAGLFYQHKFNSSGCCPERLASCRRLTDFAQGWGPISYANGSGL	97
WT_E2661	-----HINSTALNCNESLNTGNLAGLFYQHKFNSSGCCPERLASCRRLTDFAQGWGPISYANGSGL	97
Delta123	-----HINSTALNCNESLNTGNLAGLFYQHKFNSSGCCPERLASCRRLTDFAQGWGPISYANGSGL	56
AF009606	DERPYCNHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTDRSGAPTYSWGANDTDVFFVLN	540
AF009606_全长 E2	-----	157
AF009606_E2661	-----DERPYCNHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTDRSGAPTYSWGANDTDVFFVLN	157
WT_E2661	-----DERPYCNHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTDRSGAPTYSWGANDTDVFFVLN	157
Delta123	-----SGCNHYPPRPGGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTDRSGAPTYSWGANDTDVFFVLN	113
AF009606	NTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSG	600
AF009606_全长 E2	-----	217
AF009606_E2661	-----NTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSG	217
WT_E2661	-----NTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSG	217
Delta123	-----NTRPPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCGSG-----GCPTDCFRKHPEATYSRCGSG	166

图14(续)

[illegible]

图14 (续)

AFC09606	WCMWLLQYFLERVEAQLHVVPPFNVRGRDAVILLMCVVHFLNFDITKLLALFGPLW	900
AFC09606_全长E2	-----	363
AFC09606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AFC09606	ILQASLLKVEYFVRVQGLLRICALARKLAGGHVYQMAIIKLGALTGVVYNILLTPLRDWA	960
AFC09606_全长E2	-----	363
AFC09606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AFC09606	HNCIRD:AVAVEPVVFSRNETK:ITWGAINEAACGDIINGEPVSARR3QELILGPAIDGMVS	1020
AFC09606_全长E2	-----	363
AFC09606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AFC09606	KGKRLLAPITAYAQOTRGLIGCIITSLFGRDKNQVEGEVQIVSTATQTFLATCINGVCWT	1080
AFC09606_全长E2	-----	363
AFC09606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AFC09606	VYHIGAGTRITASPKEPVIMQYTNVRODLVGNPAPQGSRSITPCTCGSSDXYVTRHADVT	1140
AFC09606_全长E2	-----	363
AFC09606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227

图14A

AF009606	全长 E2	EVRRKSLRGSLSPRPESYLKSSSGGPLLCPSGSHAVGLFRAAVCTRGVAKAVDFIFVEN	1200
AF009606	E2661	-----	363
WT_E2661		-----	273
Delta123		-----	227
AF009606	全长 E2	LEETMRSPVFTDNSSPPAVFQSFQVAHLHAPIGSGSGTKVPAAAYAAQGYKVLINPSVAA	1260
AF009606	E2661	-----	363
WT_E2661		-----	273
Delta123		-----	227
AF009606	全长 E2	YSGGAYMSKAHGVDPNIRTEVRVYTHGNSP TYSTYGKFLADGGCSGGAYDITIDECHS	1320
AF009606	E2661	-----	363
WT_E2661		-----	273
Delta123		-----	227
AF009606	全长 E2	TDAFSIGIGIVLDQAEAGARLWVLAFAFPPGSVTVSHFNLEEVALSTTGELTFYKAI	1380
AF009606	E2661	-----	363
WT_E2661		-----	273
Delta123		-----	227
AF009606	全长 E2	PPEVTKGGRHLECHSKKKCELAAKVAGINAVAYYRGIDVSVPTSGDVVVVSTDAI	1440
AF009606	E2661	-----	363
WT_E2661		-----	273
Delta123		-----	227

图14A (续)

AF009606		MFGTSGDFDSVIDCNTCVTQTWDESLDPTFTIETTLFPQDAVSRTORRGRTGRGKPGLYR	1500
AF009606_全长L2		-----	363
AF009606_E2661		-----	278
WT_E2661		-----	278
Delta123		-----	227
AF009606		EVAIGERPSGMFDSSVLCECYDAGCAWYELTPAETTURLRAYMNTPGLPVQCQHLEFWEG	1560
AF009606_全长L2		-----	363
AF009606_E2661		-----	278
WT_E2661		-----	278
Delta123		-----	227
AF009606		VFTGLITHIDAHFLSQTKQSGENFFYLWAYQATVCARAQAAPPSPWDQMWKCLIRLKPTLLHG	1620
AF009606_全长L2		-----	363
AF009606_E2661		-----	278
WT_E2661		-----	278
Delta123		-----	227
AF009606		PTPLLRLGAVQNEVTLTHPIPKYIMTCMSADLEVVTSTWLVGGVLAALAAAYCLSTGCY	1680
AF009606_全长L2		-----	363
AF009606_E2661		-----	278
WT_E2661		-----	278
Delta123		-----	227

图14A (续)

AF0C96C6	VIVGRIVLSGKPA11PDREVIYQHFED4PFECSSQHLPV1EQGMMLAEQFKOKA1GL1QTAS	1740
AF0C96C6_全长E2	-----	363
AF0C96C6_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF0C96C6	RQAEVITPAVQTNWQKLEVTWAKHMWNFISG1QYLAGEST1PCNPALAS1MAFTAAVTSP	1800
AF0C96C6_全长E2	-----	363
AF0C96C6_E2661	-----	278
WT_F2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF0C96C6	1TTGQTL1LFNI1GGWVAQ1AAPGAATAFVGAG1AGNA1GSGV1GKVLVD11AGYGAGVA	1860
AF0C96C6_全长E2	-----	363
AF0C96C6_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF0C96C6	GALVAFK1MSGEVPESTED1VN1LPAILSPGALVVGVCAA11LRREVSGEGGAVQWNR11	1920
AF0C96C6_全长E2	-----	363
AF0C96C6_E2661	-----	278
WT_F2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF0C96C6	AFASRGNIVSPTH1VPESDAAARVTA11SSL1VTQL1RRI1HOW1SSECTTTPGSGWLRD1	1980
AF0C96C6_全长E2	-----	363
AF0C96C6_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227

图14B

AF0C96C6	WDW_CEVLSDEKTLKAKLMPQLPGIPFVSCQRGYRGVWRGGINHTRCHCGAEITGHVK	2040
AF0C96C6_全长 E2	-----	363
AF0C96C6_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF0C96C6	NCTMRIVGPRTCRNKWSCTEPINAVTTCPCGTFLPAPNYKFAFWVSAAEYVEIRRVGDFH	2100
AF0C96C6_全长 E2	-----	363
AF0C96C6_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF0C96C6	YVSGMTTDNKKPCQCI PSPEFFTELDGVRLEHFAPPCKPLDREELVSFKVGLHEYPVGSOL	2160
AF0C96C6_全长 E2	-----	363
AF0C96C6_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF0C96C6	PCLEPDPVAVLTSMLTDPSHITAEAGRRRLARGSPFPMASSSASQLSAPSLKATCTANHD	2220
AF0C96C6_全长 E2	-----	363
AF0C96C6_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF0C96C6	SPDAELTEANLLWRQEMGGNITRVESENKVVILDSFDPLVAEEDEREVSVPAEILRKSR	2280
AF0C96C6_全长 E2	-----	363
AF0C96C6_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227

图14B(续)

AF009606	全长E2	2340
AF009606	E2661	363
AF009606	E2661	278
WT_E2661		278
Delta123		227
AF009606	全长E2	2400
AF009606	E2661	363
AF009606	E2661	278
WT_E2661		278
Delta123		227
AF009606	全长E2	2460
AF009606	E2661	363
AF009606	E2661	278
WT_E2661		278
Delta123		227
AF009606	全长E2	2520
AF009606	E2661	363
AF009606	E2661	278
WT_E2661		278
Delta123		227

图14B (续)

AF009606	FGYGAKQVRCHARKAVAHINSVWKDILLEDSVTPLDITIMAKNEVFCVQPKGGRKPARII	2580
AF009606_全长E2	-----	363
AF009606_E2661	-----	273
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF009606	VFPDLGVRVCEKMALYDVVSKLFLAVHGSSYGFQVSPGQVVEFLVQAWKSKKTPKGFESYD	2640
AF009606_全长E2	-----	363
AF009606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF009606	TKCFDSTVTFESDIRTEFAIYQCCD:CPQARVAIKSLTEKLYVGGP:JNSKGFNCGYRRCR	2700
AF009606_全长E2	-----	363
AF009606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF009606	ASGVLTTSNGNTEFCYIKARAACRAAGLQDCTMLVCGDELVV-CESAGVQEDAAISIRAF	2760
AF009606_全长E2	-----	363
AF009606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF009606	EAMTRYSAPEGNPPQPEVYHLEI:ITSCSSNVSAH:DGASKRVYVITRQPTTP:ARAAWFYA	2820
AF009606_全长E2	-----	363
AF009606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227

图14C

AF009606	RHTPVNSWLGNIINEAFETLWARM--LMTHTFFSVL--ARDQLEQALNCLITYGACYSIEPLDLP	2980
AF009606_全长E2	-----	303
AF009606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF009606	PIIQRIHGLSAFSLHSYSPGEINRVAACLRKLGVPPIRAWRHRSVVRARLLSRGGRAAI	2940
AF009606_全长E2	-----	363
AF009606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF009606	CGKYLENWAVERTKIKITPIAAAGRLDLSGWFTAGYSGDIYHSVSHARPRWFWNCULLLA	3000
AF009606_全长E2	-----	363
AF009606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227
AF009606	ASVGIYLLPNR	3011
AF009606_全长E2	-----	363
AF009606_E2661	-----	278
WT_E2661	-----	278
Delta123	-----	227

图14C (续)

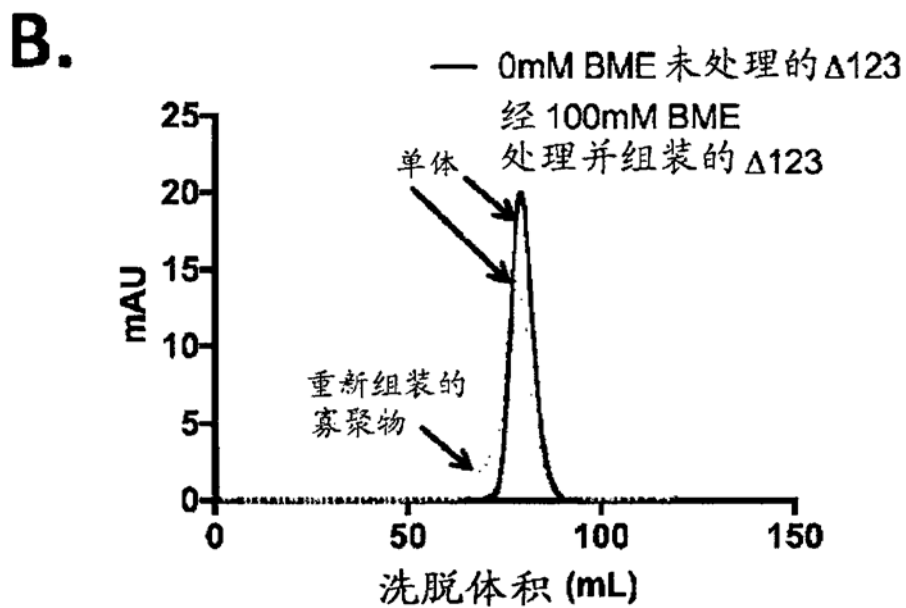
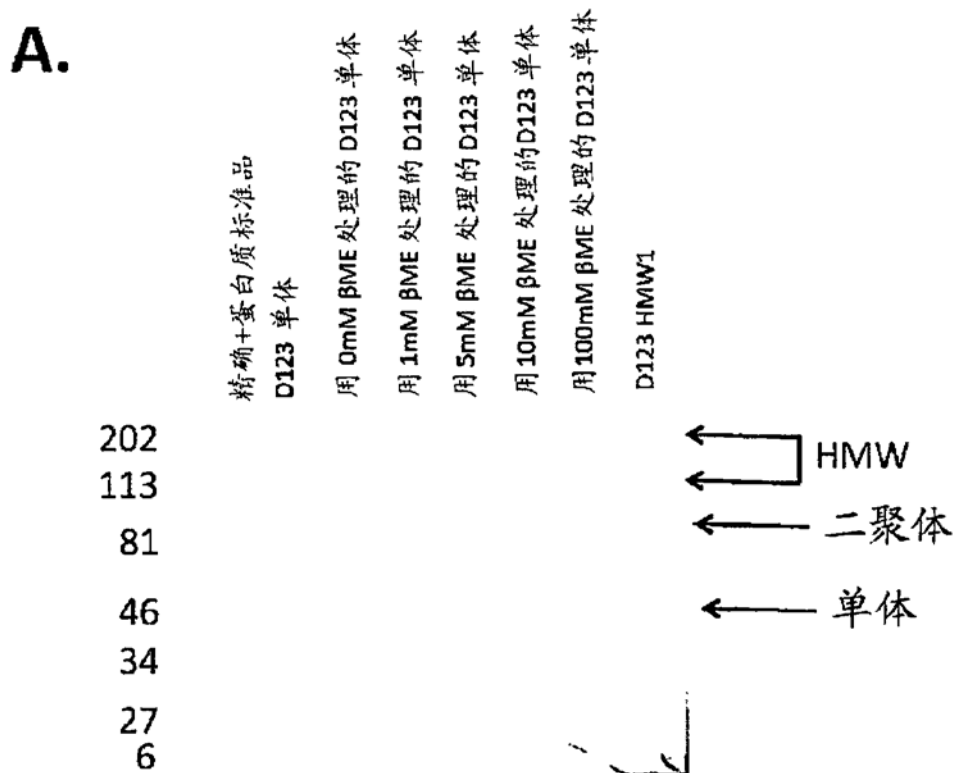


图15

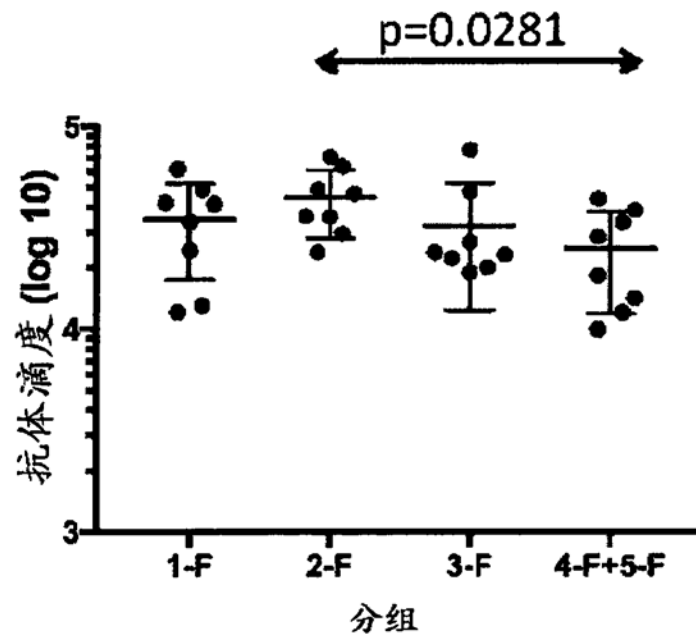


图16

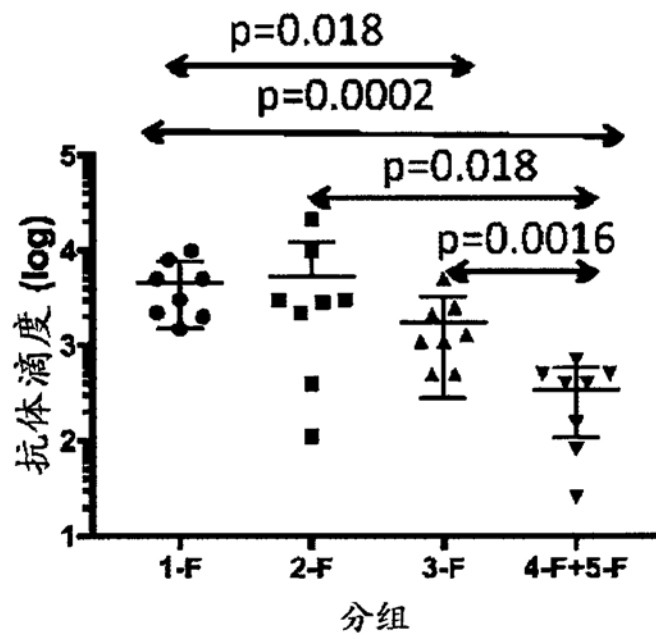
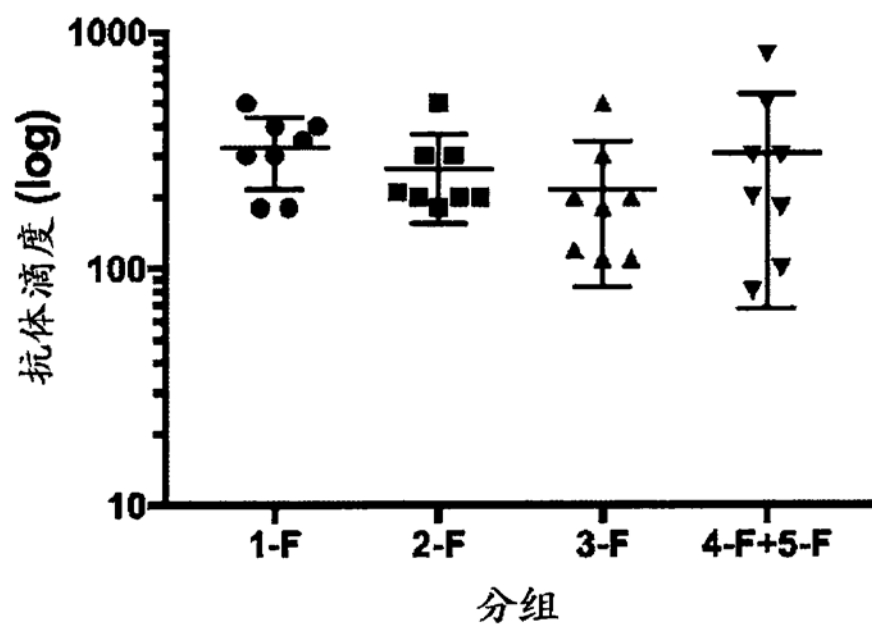


图17

A.



B.

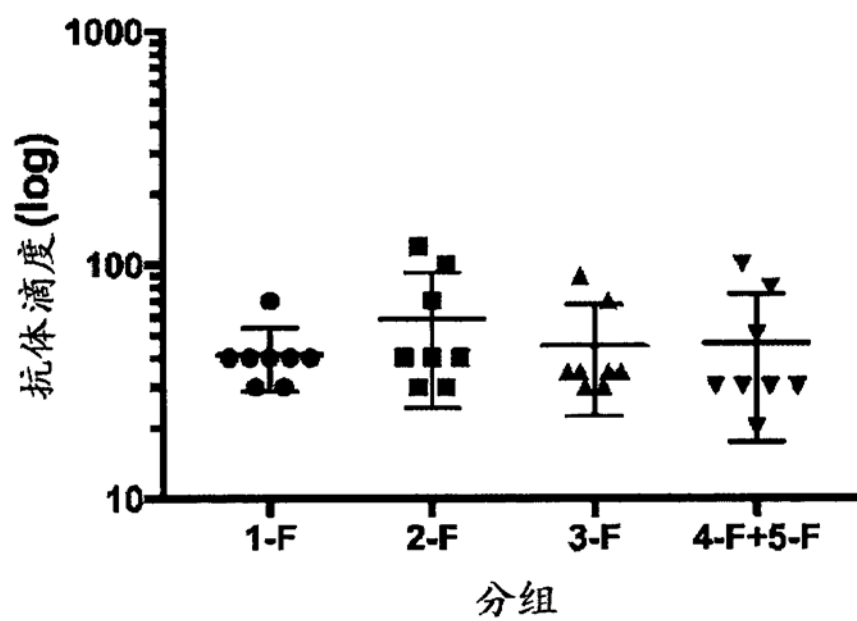


图20

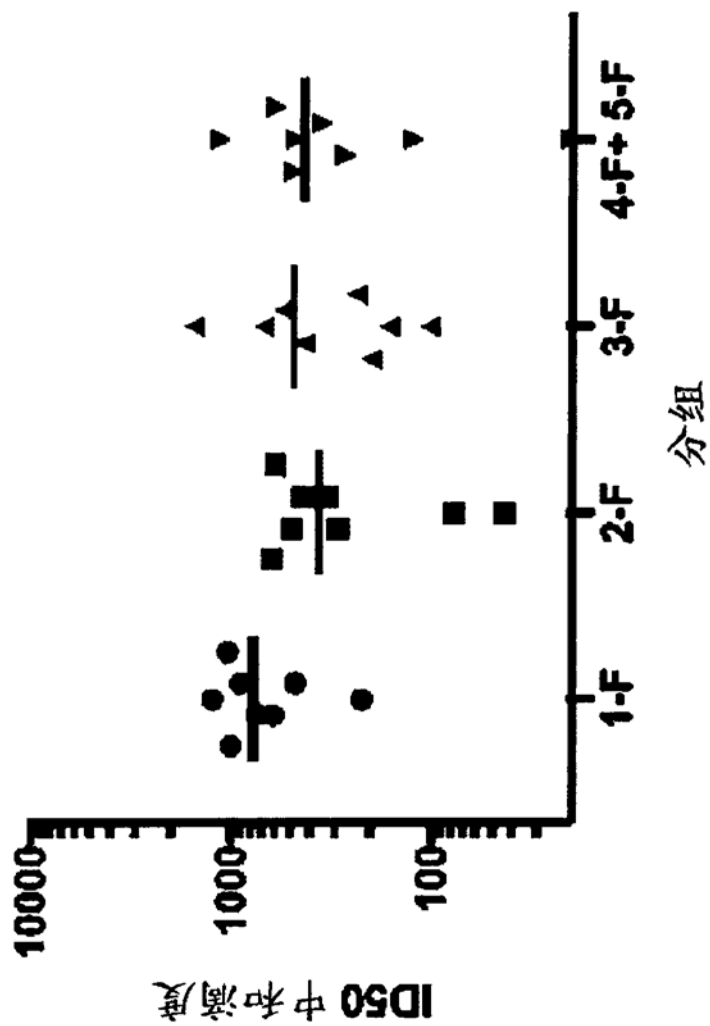


图21

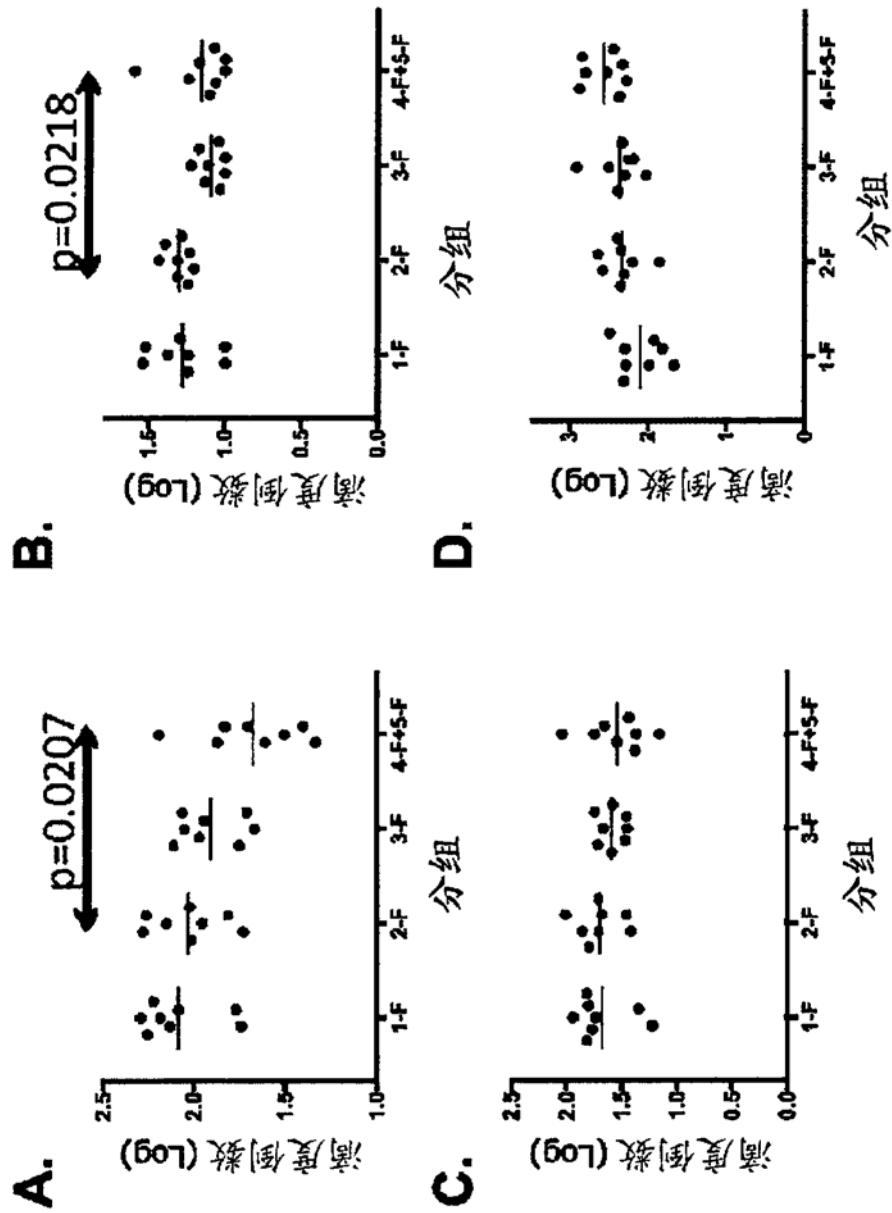
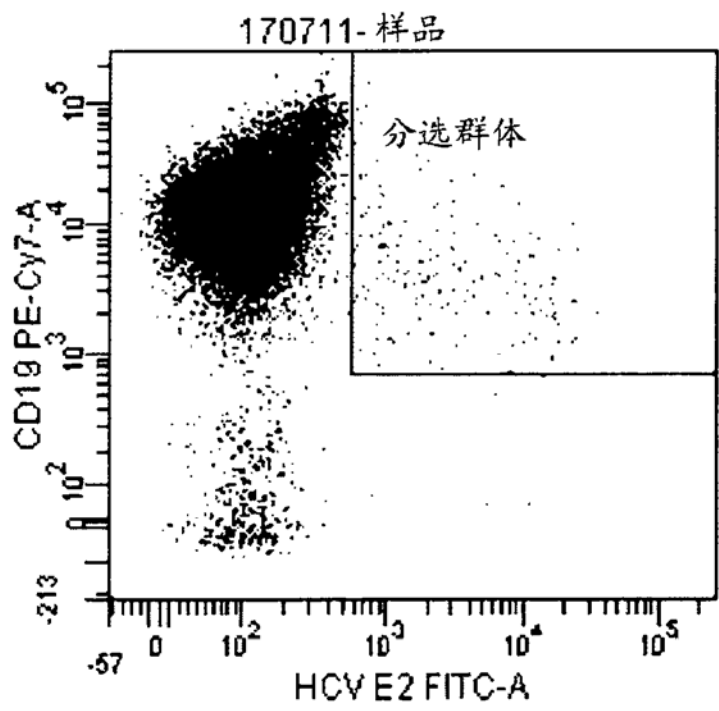


图22



管：样品			
群体	事件数	亲本 %	总量 %
■ 所有事件	50,935	####	100.0
■ P1	39,010	76.6	76.6
■ P2	34,160	87.6	67.1
■ 分选群体	232	0.7	0.5
⊠ P3	20,912	61.2	41.1

图23

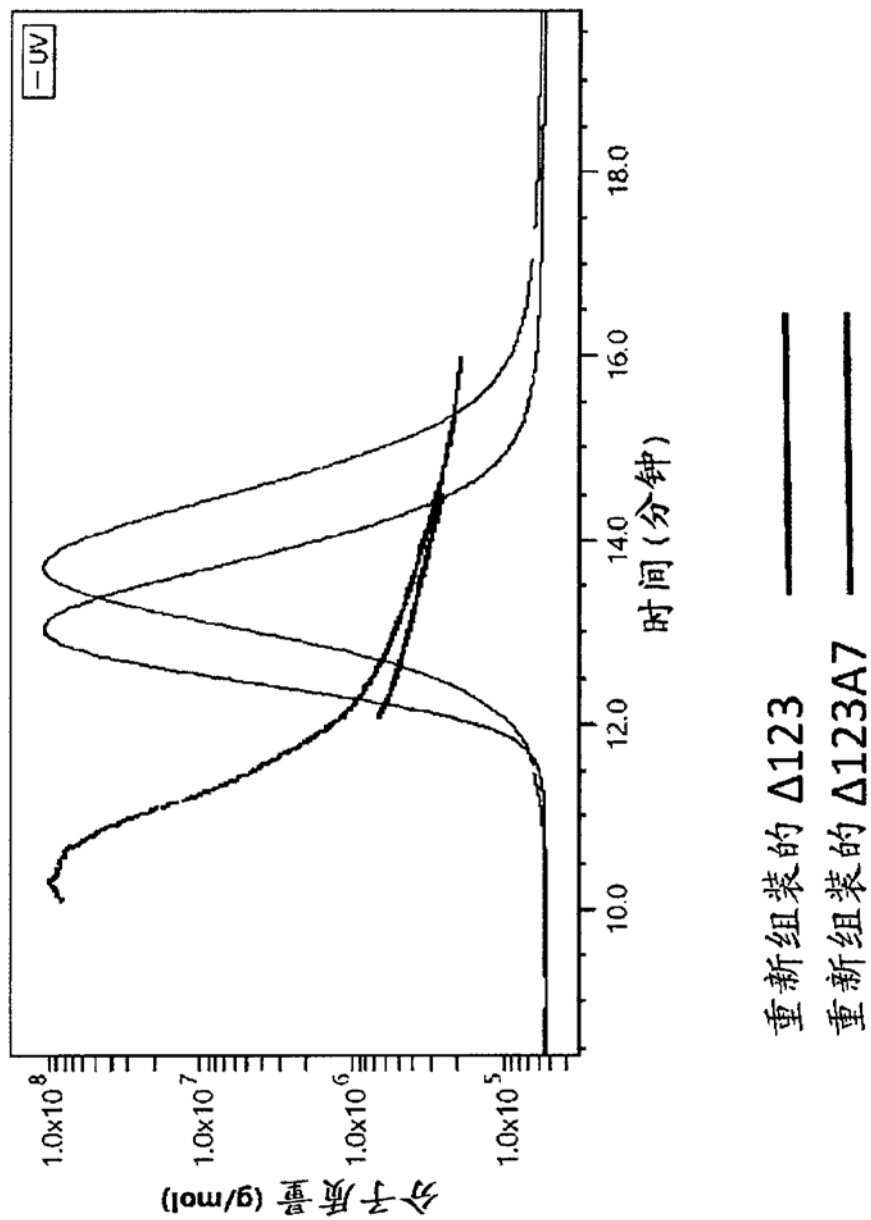
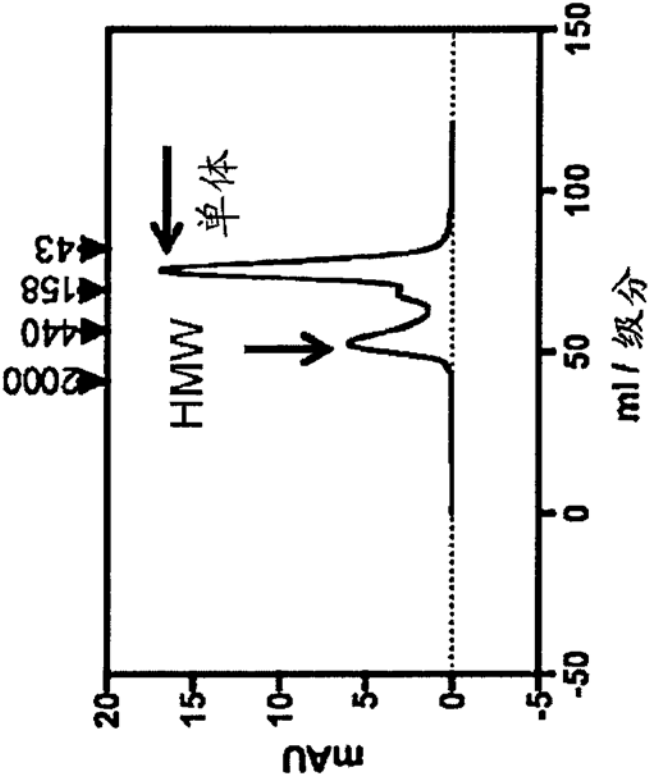


图24



	HMW	二聚体	单体
ML	52.587	68.09	75.523
高度	5.95	3.029	16.76
面积	50.87	11.79	106.7
%	30.03	6.96	63.01

图25

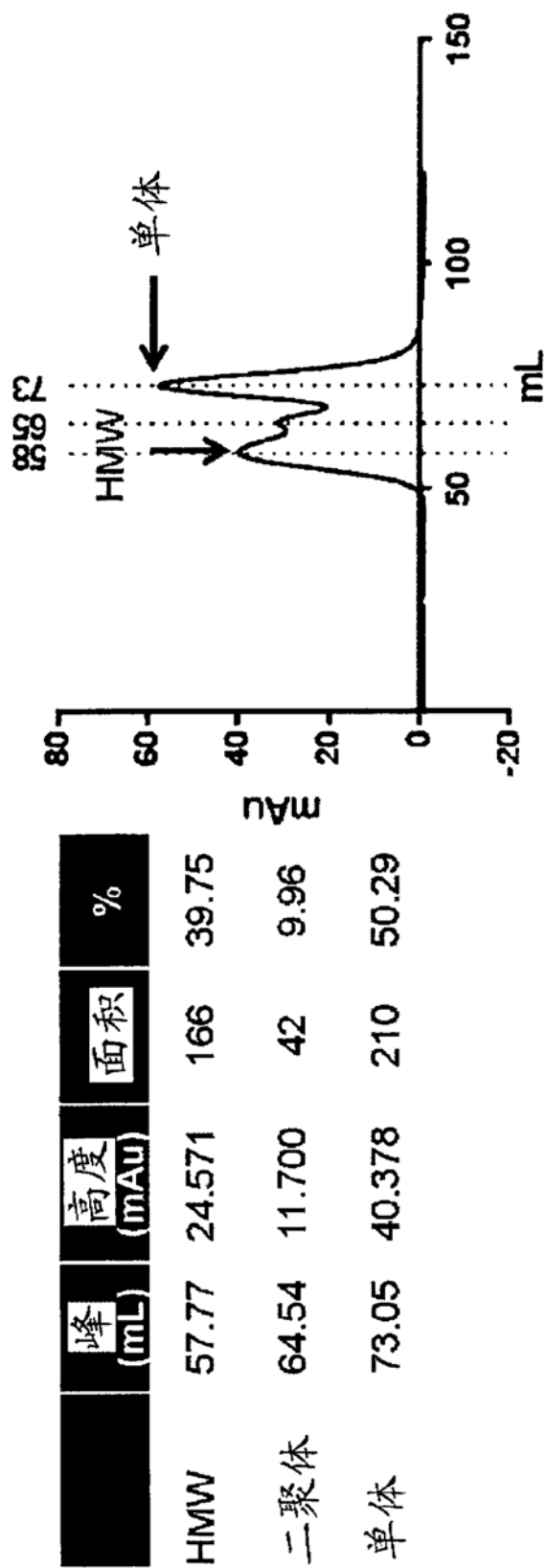


图26

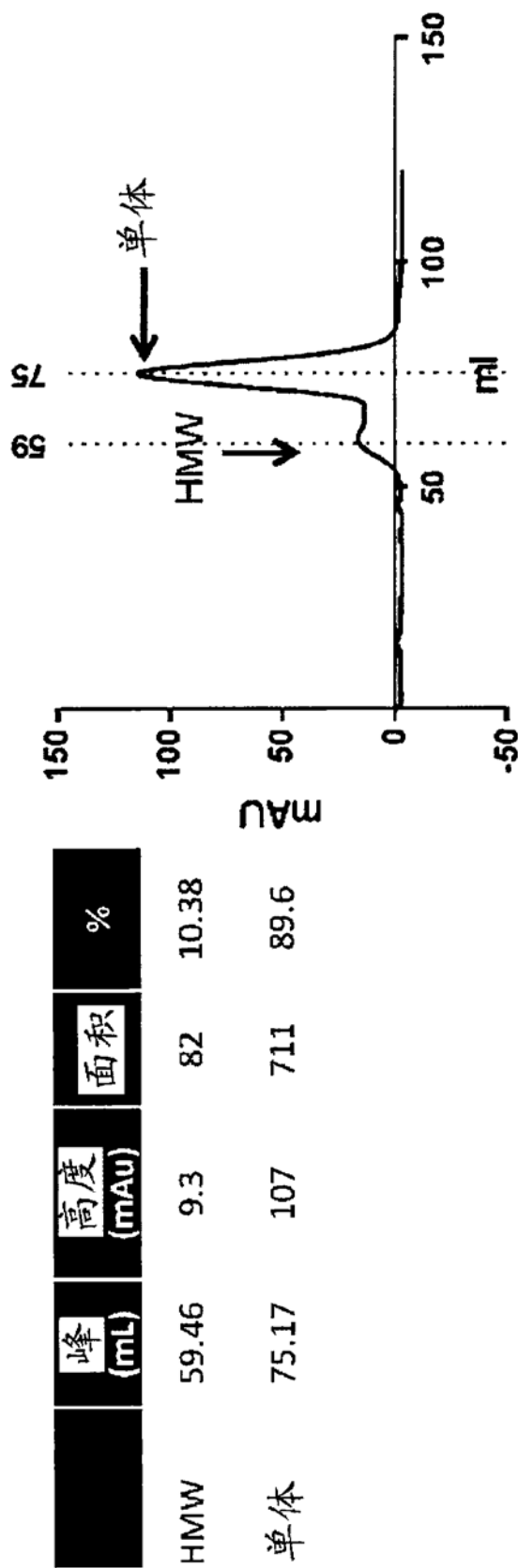


图27

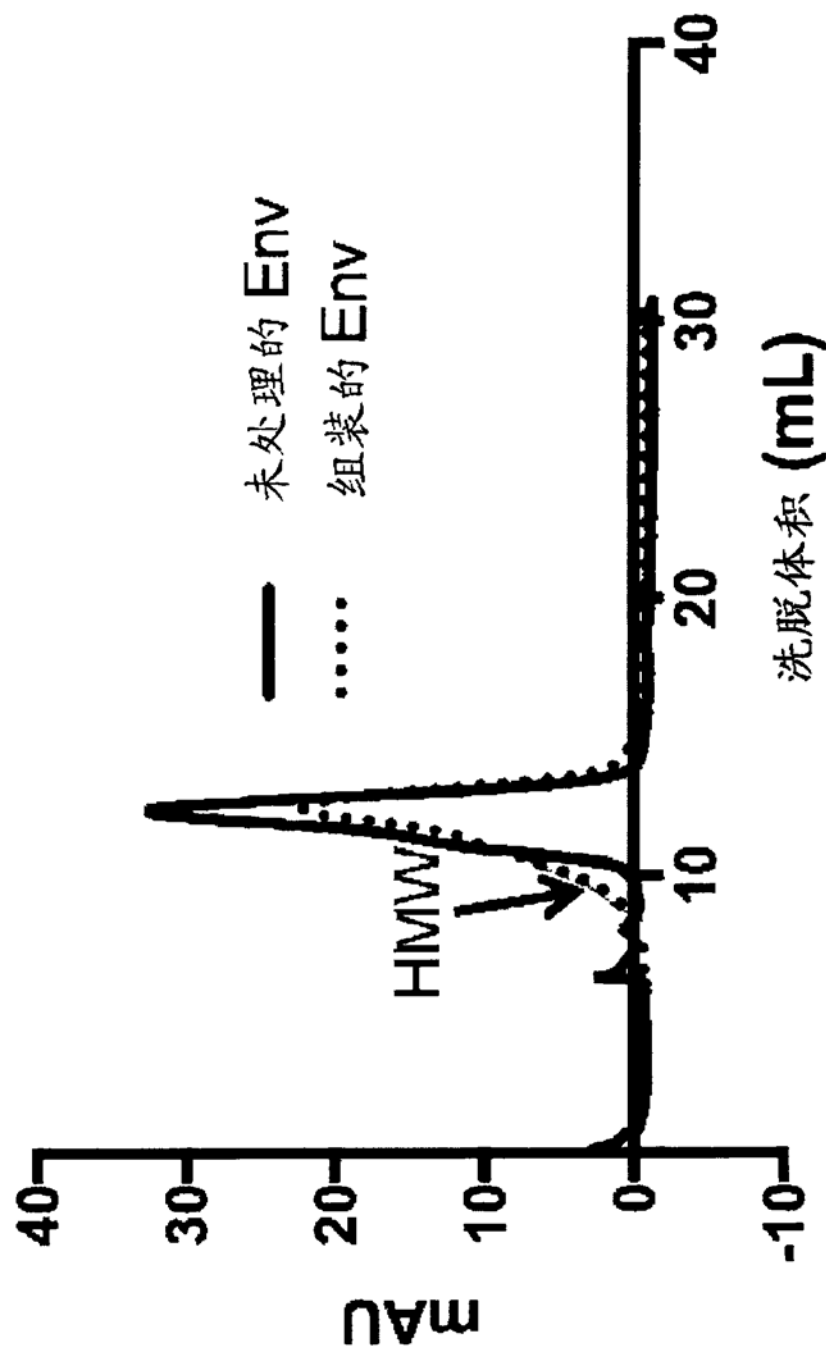


图28