



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103108653 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201080068977. 7

(22) 申请日 2010. 07. 08

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2013. 03. 06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2010/041406 2010. 07. 08

(87) PCT国际申请的公布数据
W02012/005732 EN 2012. 01. 12

(73) 专利权人 美国联合生物医学公司
地址 美国纽约

(72) 发明人 王长怡 彭文君

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 张国梁

(51) Int. Cl.
A61K 39/12(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2009017064 A1, 2009. 01. 15,
Liao, M. H. 等. Accession No: AAN62766.
《GenBank》. 2002,

审查员 杨佳倩

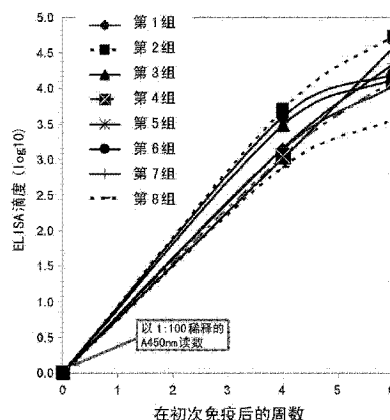
权利要求书1页 说明书28页
序列表16页 附图3页

(54) 发明名称

设计肽的 PCV2 疫苗

(57) 摘要

本发明记述了包含来源自 PCV2 衣壳蛋白的肽抗原的猪圆环病毒 (PCV2) 疫苗组合物。在多个实施方案中, 此肽抗原包含衣壳蛋白从约第 47 位氨基酸至约第 202 位氨基酸的氨基酸。在一些实施方案中, 此肽抗原任选地与人工 T 辅助细胞表位连接和 / 或与源自 PCV2 的 ORF1 与 ORF2 蛋白的 T 辅助细胞表位混合。本发明还记述了使用 PCV2 疫苗组合物的方法。在多个实施方案中, 疫苗组合物在动物中用于预防 PCV2 感染。在其他实施方案中, PCV2 疫苗组合物用作抗原用以诊断 PCV2 感染。



1. 一种 2 型猪圆环病毒 (PCV2) 疫苗组合物, 其包含肽抗原, SEQ ID NOs :3、4 和 5 的三种 PCV2T 辅助细胞表位肽的等摩尔混合物和兽医学上可接受的递送载体或佐剂, 其中所述肽抗原由选自下列组成的组的氨基酸序列组成:
 - a) PCV2 衣壳蛋白的第 47 个位置的氨基酸至第 202 个位置的氨基酸;
 - b) SEQ ID NO :1 ;
 - c) 选自 SEQ ID NOs :9-19 和 20 组成的组的氨基酸序列 ;和
 - d) (a) 至 (c) 的任意组合。
2. 根据权利要求 1 所述的 PCV2 疫苗, 其中所述肽抗原由 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列组成。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的 PC V2 疫苗, 其还包含共价连接到所述肽抗原的氨基端的 T 辅助细胞表位。
4. 根据权利要求 3 所述的 PCV2 疫苗, 其中所述 T 辅助细胞表位通过具有至少一个氨基酸的间隔区共价连接到所述肽抗原的氨基端。
5. 根据权利要求 3 所述的 PCV2 疫苗, 其中所述 T 辅助细胞表位为 SEQ ID NO :2。
6. 根据权利要求 4 所述的 PCV2 疫苗, 其中所述间隔区为 SEQ ID NO :7。
7. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的 PCV2 疫苗, 其中所述肽抗原的总量为 10 μ g 至 1mg。
8. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的 PCV2 疫苗, 其中所述 SEQ ID NOs :3、4 和 5 的等摩尔混合物的总量为 1 μ g 至 100 μ g。
9. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的 PCV2 疫苗, 其中所述递送载体和佐剂选自下列组成的组 :Montanide ISA 50V2、聚氧乙烯 (20) 失水山梨醇单油酸酯和 CpG 寡核苷酸。
10. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的 PCV2 疫苗, 其中所述肽抗原为 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :6。
11. 一种 PCV2 疫苗组合物, 其包含 SEQ ID NO :6 的肽抗原及兽医学上可接受的递送载体或佐剂, 其中所述肽抗原的量为 10 μ g 至 1mg。
12. 权利要求 1-11 中任一项所述的疫苗在制备用于保护仔猪抵抗 PCV2 感染的药物中的应用, 所述仔猪具有或不具有 PCV2 母体来源的抗体。
13. SEQ ID NO :1 ;
组成的肽抗原在制备用于诊断天然 PCV2 感染的猪和给予基于 CAP1 肽的 PCV2 疫苗的猪的诊断剂中的应用, 其中连接到固体支持物上的肽抗原在有助于抗体与所述肽结合的条件下用于暴露于包含所述抗体的猪血液、血清或血浆样品, 以检测与连接到所述固体支持物上的所述肽抗原结合的抗体的存在。

设计肽的 PCV2 疫苗

发明领域

[0001] 本发明涉及基于肽的抗 2 型猪圆环病毒 (porcine circovirus type2 ;PCV2) 疫苗以及制备所述疫苗的方法,所述疫苗用于保护仔猪甚至在短效但相对高滴度的母体来源的抗 PCV2 抗体的存在下抵抗 PCV2 感染。

[0002] 依据本发明的各个实施方案的疫苗制剂包含一种来源于开放阅读框架 2 (open reading frame2 ;ORF2)– 编码的衣壳蛋白的肽,此肽任选地连接人工 T 辅助细胞表位 (artificial T helper epitope) 以增强其 B 细胞免疫原性,所述肽可以任选地补充包含 PCV2T 辅助细胞表位的簇的来源于 PCV2 ORF1 和 ORF3 的肽混合物,其在兽医学上可接受的递送系统中制备成疫苗制剂。

[0003] 发明背景

[0004] 猪圆环病毒 (porcine circovirus ;PCV) 于 1974 年鉴定为猪肾组织培养细胞系 (PK15) 的微小核糖核酸病毒样污染物 (1)。1998 年,从猪组织中分离了抗原性和遗传性特异的 PCV,并将其命名为 2 型猪圆环病毒 (Porcine circovirus type 2 ;PCV2)。PCV2 与猪中的临床疾病相关 (2)。

[0005] 断奶仔猪多系统衰竭综合征 (Postweaning multisystemic wasting syndrome ; PMWS),作为一种猪中新出现的且具有经济重要性的疾病,其由 PCV2 引起。然而,证据显示 PMWS 体征的出现需要病原诸如猪细小病毒 (Porcine parvovirus ;PPV) 的共同感染或类似的免疫刺激物、胁迫或辅因子。这种综合征使 7 到 15 周龄的猪衰弱,伴随有衰竭 (wasting)、呼吸窘迫、淋巴结肿大、腹泻、苍白及黄疸。并且,肉眼可见的 (gross) 及组织学损伤可以影响多器官系统并且与间质性肺炎 (interstitial pneumonia)、淋巴结病 (lymphadenopathy)、肝炎 (hepatitis)、肾炎 (nephritis)、心肌炎 (myocarditis)、肠炎 (enteritis)、皮肤炎 (dermatitis) 及胰腺炎 (pancreatitis) 相关 (1,3)。

[0006] 追溯起来,早在 1973 年即可在猪血清中检测到 PCV2 特异性抗体 (4)。PMWS 的诊断依赖于与被感染的组织中损伤相关的 PCV2 特异性核酸或抗原的检测。已经从心脏、肺脏、肝脏、肾脏、脾脏、唾液腺、淋巴结、甲状腺、胸腺、胃肠道、粪便、胰脏、睪丸及脑中分离了所述病毒 (1,5)。

[0007] 主要的传播途径不明,但是证据显示 PCV2 可以横向和垂直传播。其已在天然感染的猪的眼、鼻和粪便样品中检测到。由流产的猪胎儿组织中分离到 PCV2 表明可以垂直传播。由自然感染及实验感染的公猪精液中检测到 PCV2 核酸表明从公猪到未感染 PCV2 的母猪及其仔猪的传播 (5)。

[0008] 2 型猪圆环病毒 (PCV2) 是一种小型无包膜病毒,带有环状单链 DNA (single-strand DNA ;ssDNA) 基因组。基因组包含六个编码推定蛋白 (putative proteins) 的开放阅读框 (ORFs) (2),其中四个 ORFs 与非致病性的 1 型猪圆环病毒 (Porcine circovirus type 1 ;PCV1) 类似的 ORFs 具有显著的相似性 (6)。在 PCV2 感染的细胞中仅已经检测到由 ORF1、ORF2 及 ORF3 编码的蛋白。ORF1 编码 312 个氨基酸的复制酶蛋白,另外也产生一个 168 个氨基酸的剪接变体,二者均是 PCV2 复制所必需的 (7)。结构

性衣壳蛋白 (capsid) 由 ORF2 编码 (8); ORF3 编码非复制必需但是在 PCV2 诱导的细胞凋亡 (apoptosis) 及致病性中起重要作用的高度保守性蛋白 (9)。

[0009] 只有暴露于表面的由 PCV2 ORF2 编码的衣壳蛋白能够引起宿主免疫系统 B 细胞的保护性抗体应答 (10)。与该观察结果一致, PEPSCAN 图谱研究将具有针对 PCV2 的特异性的 B 细胞优势免疫表位簇主要定位在 PCV2 衣壳蛋白上残基 65-87、113-139、169-183 及 193-207 的区域 (11)。除了 B 细胞表位之外, T 细胞优势免疫表位, 包括 T 辅助细胞表位, 是另一种影响病毒抗原性的重要因子。T 辅助细胞表位激发保护性 T 辅助细胞 (Th) 应答, 其传导信号至 B 细胞以产生抗体。利用 20mer 肽进行的 PCV2 的 T 细胞表位图谱及淋巴细胞增殖测定显示, 与 B 细胞表位在衣壳蛋白上的位置 (11) 相比, 免疫优势 Th 应答更一致性地定位在 ORF1 及 ORF3 的非结构蛋白上的表位, 然而 ORF2 编码的线性 Th 表位无一表现出免疫优势 (12)。

[0010] 通过合成肽向免疫系统呈递 Th 决定簇是控制合成肽的免疫原性的关键因素。具有免疫优势且泛宿主性的 Th 表位高度且广泛地在不同类型的 MHC 群体中反应 (13)。因此, 衣壳蛋白上缺少免疫优势 Th 位点帮助解释关于 PCV2 的亚单位衣壳蛋白疫苗的有限的免疫原性。肽亚单位免疫原的免疫原性可以通过将靶向的 B 细胞表位与所选的外源泛宿主性 Th 位点共价连接来加强, 所述外源泛宿主性 Th 位点包括通过组合化学增强其遗传反应性的泛宿主性 Th 表位 (14, 15, 16)。另外, 疫苗在猪中的免疫功效及疫苗提供的保护猪免受病毒感染的可受到病毒的多个 Th 表位影响, 且这些可以与来自不同蛋白的 B 细胞表位组合形成交叉保护性 (17)。

[0011] 对于保护仔猪抵抗 PCV2 相关疾病 (如 PMWS) 的低成本高特异性疫苗存在需求。用于猪的传统疫苗是基于灭活的完整 PCV2 病毒。然而, PCV2 在细胞培养中无法复制以达到高滴度, 使得传统疫苗成本高且功效低。替代的疫苗基于重组 PCV2 ORF2 抗原。PCV2 ORF2 衣壳蛋白亚单位已经在多个表达系统中表达, 包括在昆虫细胞中的杆状病毒 (baculovirus) 表达系统中表达 (3, 10)。在大部分应用中, 将产生重组 PCV2 衣壳蛋白的昆虫细胞裂解并且配制成用于接种仔猪的疫苗。此种重组抗原通常含有宿主细胞及载体 - 编码的抗原, 因此使得所述疫苗非特异性, 且可能引起严重的不适当的免疫应答, 包括过敏反应。

[0012] 使用灭活的 PCV2 病毒疫苗及使用作为重组病毒裂解物或作为纯化的蛋白的亚单位衣壳蛋白疫苗的另一个问题是在正常的田间仔猪中使用时功效相对低。因为田间仔猪通常带有母体来源的抗体 (maternally-derived antibodies; MDA), 因此这些疫苗通常在无特定病原 (specific-pathogen-free; SPF) 的仔猪或剖宫产禁食初乳 (cesarean-derived colostrums deprived; CDCD) 的仔猪中检测。这些母体抗体, 尽管典型地滴度太低且持续时间太短而无法提供足够的保护, 但仍然高得足以干扰接种。MDA 的这种干扰可以通过施用高剂量的重组 ORF2 衣壳蛋白抗原部分克服 (18)。在 US2009/0022749A1 中公开, 通过杆状病毒表达系统将重组全长 ORF2 抗原分泌到培养基中 (19)。该系统可部分减轻低产率及纯度的问题; 但是, 该系统及其他生物学表达系统存有全长 PCV2 抗原制剂的固有的有限的免疫原性, 并且其具有根源在于不可再现性、低产率和复杂的质量控制流程的成本问题。因此, 需要通过合理设计过程开发 PCV2 疫苗, 通过该设计过程设计并且合成免疫原性肽。所述基于肽的疫苗可以设计成含有衣壳蛋白 - 特异性的 B 细胞表位、有效的外源 Th 表位及来源于其他 PCV2 蛋白的 PCV2Th 表位, 并且作为疫苗制剂的主要成分组合使用, 从而激发精准

地抵抗仔猪中的 PCV2 感染的抗 - 衣壳蛋白抗体应答。

[0013] 用于病毒疫苗的免疫原性肽的合理设计起始于通过表位作图法鉴定免疫优势表位。表位作图法利用对应于靶向的病毒蛋白上的目的区域的重叠肽的位点来鉴定作为免疫原性决定簇参与同免疫系统的相互作用的位点。更通常地,表位作图法利用长度相对短的肽精准地检测线性决定簇。“PEPSCAN”已知为一种快速的表位作图法,其基于与固体支持物偶联的数百条重叠肽的同时合成。检测所述偶联的肽结合抗体的能力或刺激 T 细胞增殖的能力。这一方法有效地定位线性的 B 细胞及 T 细胞决定簇;然而,靶向的病毒或蛋白的对于疫苗开发重要的免疫优势 B 细胞表位通常是长的高亲和性的不连续表位,难以通过 PEPSCAN 方法确定 (20)。

[0014] 对于可以通过可控制的且可重现的固相肽合成技术化学合成毫克至千克量级的带有长的不连续表位的免疫原性 PCV2 肽的鉴定存在需求。这种用于合成 PCV2 衣壳蛋白免疫原的可控制的商业级别的工艺,以及表征所述肽产品的直接方式,将提供关于 PCV 疫苗制剂的低成本商业级别制造及质量控制的架构 (21)。

[0015] 参考文献:

[0016] 1.Allan GM, and Ellis JA.Porcine circoviruses :A review(猪圆环病毒:综述).J Vet Diagn Invest(兽医诊断研究杂志)2000 ;12 :3-14.

[0017] 2.Meehan BM,McNeilly F,Todd D,Kennedy S,Jewhurst VA,Ellis JA,Hassard LE,Clark EG,Haines DM, and Allan GM.Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs(与猪中衰竭综合征相关的新型圆环病毒 DNAs 的表征).J Gen Virol(遗传病毒学杂志)1998 ;79 :2171-2179.

[0018] 3.Roof M, Hayes P, Eichmeyer M, Nitzel G, and Schaeffer M.Use of a PCV2 immunogenic composition for lessening clinical symptoms in pigs(使用 PCV2 免疫原性组合物来减轻猪中的临床症状).US 2008/0267995A1.

[0019] 4.Walker IW, Konoby CA, Jewhurst VA, McNair I, McNeilly F, Meehan BM, Cottrell TS,Ellis JA, and Allan GM:Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2(研发用于检测针对 2 型猪圆环病毒的血清抗体的竞争性酶联免疫吸附测定及应用).J Vet Diagn Invest(兽医诊断研究杂志)2000 ;12 :400-405.

[0020] 5.McIntosh KA, Harding JCS, Parker S, Krakowka S, Allan G, and Ellis JA.Quantitative polymerase chain reaction for Porcine circovirus-2in swine feces in a Porcine circovirus disease-affected commercial herd and a nonaffected commercial herd(在猪圆环病毒疾病感染的商业畜群和未感染的商业畜群中对猪粪便中猪圆环病毒-2 的定量聚合酶链式反应).Can Vet J 2008 ;49 :1189-1194.

[0021] 6.Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendoerfer P, Mueller B, Schmitt C, Steinfeldt T, and Finsterbusch T.Molecular biology of Porcine circovirus:Analyses of gene expression and viral replication(猪圆环病毒的分子生物学:基因表达和病毒复制的分析).Vet Microbiol(兽医微生物学)2004 ;98 : 81-88.

[0022] 7.Cheung AK.Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2(2 型

猪圆环病毒的转录分析). *Virology* (病毒学) 2003 ;305 :168-180.

[0023] 8. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, and Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein(2型猪圆环病毒的开放阅读框2编码主衣壳蛋白). *J Gen Virol* (遗传病毒学) 2000 ;81 :2281-2287.

[0024] 9. Liu J, Chen I, Du Q, Chua H, and Kwang J. The ORF3 protein of porcine circovirus type 2 is involved in viral pathogenesis in vivo(2型猪圆环病毒的ORF3蛋白参与体内病毒发病机理). *J Virol* (病毒学杂志) 2006 ;80 :5065-5073.

[0025] 10. Blanchard P, Mahé D, Cariolet R, Keranflec'h A, Baudouard MA, Cordioli P, Albina E, and Jestin A. Protection of swine against post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) by porcine circovirus type 2 (PCV2) proteins(通过2型猪圆环病毒(PCV2)蛋白保护猪抵抗断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)). *Vaccine* (疫苗) 2003 ;21 :4565-4575.

[0026] 11. Mahé D, Blanchard P, Truong C, Arnould C, Le Cann P, Cariolet R, Madec F, Albina E, and Jestin A. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes(来自1型和2型猪圆环病毒的ORF2蛋白的区分性识别和免疫相关表位的鉴定). *J Gen Virol* (遗传病毒学杂志) 2000 ;81 :1815-1824.

[0027] 12. Stevenson LS, Gilpin DF, Douglas A, McNeilly F, McNair I, Adair BM, and Allan GM. T lymphocyte epitope mapping of porcine circovirus type 2(2型猪圆环病毒的T淋巴细胞表位作图). *Viral Immunology* (病毒免疫学), 2007 ;20 :389-397.

[0028] 13. Partidos CD, Stanley CM, and Steward MW. Immune responses in mice following immunization with chimeric peptides representing B and T cell epitopes of measles virus protein(在用代表麻疹病毒蛋白的B和T细胞表位的嵌合肽免疫后的小鼠中的免疫应答). *J Gen Virol* (遗传病毒学杂志) 1991 ;72 :1293-1299.

[0029] 14. Wang CY. Artificial T helper cell epitopes as immune stimulators for synthetic peptide immunogens including immunogenic LHRH peptides(作为用于包括免疫原性LHRH肽的合成的肽免疫原的免疫刺激剂的人工T辅助细胞表位). US6,025,468.

[0030] 15. Wang CY. Artificial T helper cell epitopes as immune stimulators for synthetic peptide immunogens(作为用于合成的肽免疫原的免疫刺激剂的人工T辅助细胞表位). US6,713,301.

[0031] 16. Wang CY. Immunogenic peptide composition comprising measles virus F protein T helper cell epitope(MVFThL-16) and N-terminus of β -amyloid peptide(包含麻疹病毒F蛋白T辅助细胞表位(MVFThL-16)和 β -淀粉样肽的N端的免疫原性肽组合物). US6,906,169.

[0032] 17. Sáiz JC, Rodríguez A, González M, Alonso F, and Sobrino F. Heterotypic lymphoproliferative response in pigs vaccinated with foot-and-mouth disease virus. Involvement of isolated capsid proteins(在用口蹄疫病毒接种的猪中的异型淋巴组织增生反应). *J Gen Virol* (遗传病毒学杂志) 1992 ;73 :2601-2607.

[0033] 18. Roerink F, and van Woensel P. PCV2 Vaccine (PCV2 疫苗). US2008/0248061A1.

[0034] 19. Eichmeyer M, Nitzel G, and Schaeffer M. PCV2 immunogenic compositions and methods of producing such compositions (PCV2 免疫原性组合物和产生所述组合物的方法). US2009/0022749A1.

[0035] 20. Meloen RH, Amerongen AV, Hage-Van Noort M, Langedijk JPM, Posthumus WPA, Puyk WC, Plasman H, Lenstra JA, Langeveld JPM. The use of peptides to reconstruct conformational determinants; a brief review (肽用于重建构象决定簇的应用, 简明概述). Ann Biol Clin 1991; 49: 231-242.

[0036] 21. Wang CY and Walfield AM. Site-specific peptide vaccines for immunotherapy and immunization against chronic diseases, cancer, infectious diseases, and for veterinary applications (用于慢性疾病、癌症、传染病和用于兽医应用的免疫治疗和免疫法的位点特异性肽疫苗). Vaccine (疫苗) 2005; 23: 2049-2056.

[0037] 22. Fuerst TR, Niles EG, Studier FW, and Moss B. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase (基于合成噬菌体 T7 RNA 聚合酶的重组痘苗病毒的真核瞬时表达系统). Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 1986; 83: 8122-8126.

[0038] 23. Chen C-M., Liu H-T, Tu C-F. Effects of PCV2 infection in a transgenic SPF pig farm in Taiwan (PCV2 感染在台湾转基因 SPF 猪农场中的作用). 13th AAAP Anim. Sci. Congr. (第 13 届 AAAP 动物科学回忆) September 22-26, 2008 Hanoi, Vietnam. Proceedings (兽医学进展), p. 420.

[0039] 24. Wang CY, Shen M, Tam G, Fang XD, Ye J, Shen F, Walfield AM, Wang JJG, Li ML, Li XM, Salas M, Shearer MH, Kennedy RC, and Hanson CV. Synthetic AIDS vaccine by targeting HIV receptor (通过靶向 HIV 受体的合成 AIDS 疫苗). Vaccine (疫苗) 2002; 21: 89-97.

[0040] 25. Wang CY, Shen M. Synthetic peptide vaccines for foot-and-mouth disease (用于口蹄疫的合成肽疫苗). US6,107,021.

[0041] 26. Harlow E and Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. Chapter 14 Immunoassays (抗体: 实验室手册, 第 14 章免疫测定), pp555-612. Cold Spring Harbor Laboratory (冷泉港实验室), Cold Spring Harbor, NY. 1988.

[0042] 27. Sokoll KK. Stabilized synthetic immunogen delivery system (稳定的合成免疫原递送系统). 美国专利申请公布 No. US2003/0165478.

[0043] 发明概述

[0044] 本公开内容涉及包含肽或肽组合物的 2 型猪圆环病毒 (porcine circovirus type 2; PCV2) 疫苗, 其中所述肽或肽组合物通过筛选重叠的短和长 PCV2 衣壳蛋白肽的血清学反应性而被最优化。此类经验性发现检测了 GenBank 登记号 AAN62766 示例的 PCV2 衣壳蛋白内的免疫优势 B 细胞表位簇。具体地, 发现该免疫优势 B 细胞表位簇存在于 PCV2 衣壳蛋白的 154 个氨基酸的长肽中 (肽 Cap1, SEQ ID NO: 1, 也显示在表 1 中)。此肽作为主要

的免疫原结合在基于肽的疫苗中,以引发抵抗 PCV2 感染的保护性抗体和细胞介导的免疫应答,并且通过另外的外源和 PCV2- 来源的 T 细胞表位而被增强。所述肽免疫原有效用于配制抗 PCV2 的疫苗。

[0045] 本发明的多个实施方案涉及用于制备作为引发能够保护仔猪抵抗 PCV2 感染的疫苗的所述肽、肽组合物和药物组合物的方法,以及用于制备用于检测 PCV2 感染的诊断试剂盒的方法。

[0046] 本发明的多个实施方案涉及疫苗制剂,所述疫苗制剂包含设计的来源于 ORF2 衣壳蛋白的 PCV2 Cap1 肽 (SEQ ID NO:1)、及其同源物和类似物。在这些制剂中的 PCV2 Cap1 肽优先地但任选地被连接到人工组合的 T 辅助细胞表位 (SEQ ID NO:2,也显示在表 1 中) 来增强其 B 细胞免疫原性。此 PCV2Cap1 肽还可以任选地与含有 PCV2 Th 表位簇的 PCV2ORF1 (SEQ ID NOS:3 及 4) 及 ORF3 (SEQ ID NOS:5) 肽 (也显示在表 1 中) 的混合物混合。所述基于肽的 PCV2 疫苗制剂可以在仔猪中引发对抗 PCV2 感染的 PCV2- 特异性抗体应答,所述仔猪包括可能带有能够干扰接种的母体来源的抗体 (MDA) 的仔猪。所述设计的基于的肽的疫苗包含可工业应用的毫克至千克级别化学合成并易于进行质量控制的作为免疫原的肽组合物。

[0047] 本发明多个实施方案还提供佐剂和 / 或递送载体以及疫苗制剂中常规结合的其他成分。

[0048] 附图简述

[0049] 图 1A 是显示根据本发明的一个实施方案,通过免疫荧光检测结合到共转染的 HTK 细胞系细胞的核内的衣壳蛋白上的针对 PCV2 衣壳蛋白的抗体的机制的示例。该示例显示 HTK 细胞感染 T7 聚合酶重组痘苗病毒 (T7/vac) (22) 并通过 lipofectamine™ 技术 (Invitrogen) 共转染 pCR-orf2 质粒。重组衣壳蛋白在其翻译后转运到核中 (23)。依据本发明的一个实施方案,抗-衣壳蛋白抗体结合到转染的 HTK 宿主细胞的核中,在此处可以通过标记的二级抗体的免疫荧光检测到它们。该方法能够通过 HTK 细胞中由原核 T7 启动子介导的全长 PCV2 衣壳蛋白的瞬时真核表达而高特异性检测针对真正的 PCV2 衣壳蛋白的抗体。

[0050] 图 1B 显示依据图 1A 描述的机制进行的免疫荧光测定 (IFA)。检测到具有结合到核内的衣壳蛋白上的针对 PCV2 衣壳蛋白的抗体的共转染 HTK 细胞系细胞。

[0051] 图 2 是在常规农场饲养的带有地方性 PCV2 感染的仔猪经过八次基于 Cap1 肽的 PCV2 疫苗制剂的免疫后的免疫原性的图,剂量如表 5 所述。免疫原性通过基于 PCV2 Cap1 肽的 ELISA 法评估 (滴度以 Log_{10} 表示)。

[0052] 图 3A 是未接种的猪感染 PCV2 后的肾脏照片。损伤被括了出来 (*)。

[0053] 图 3B 是未被感染的接种的猪的肾脏照片,一为剖面图 (左),一为完整图 (右)。闪光的光反射被括了出来 (**)。

[0054] 发明详述

[0055] 肽抗原可以检测免疫应答,并且某些肽抗原还可以刺激免疫应答。多种肽抗原可以用来灵敏且特异性的检测免疫应答,但是最常见的是,其本身不作用为免疫原。肽免疫原是一类特殊的肽抗原,其可以用来刺激免疫应答以及检测它们。依据本发明的一个实施方案,所述 PCV2 疫苗中的肽抗原为具有 B 细胞和 T 辅助细胞 (Th) 表位的肽免疫原,两种表位

共同作用以刺激产生保护性免疫应答,除此之外,所述肽免疫原还能够用来检测针对 PCV2 感染的免疫应答。

[0056] 一种鉴定 B 细胞表位的方法是依赖于—组多种长度(长度典型地为 20 到 60 个残基或更长)的巢式重叠肽。这些较长的肽是利用一系列费力的独立的固相合成技术合成的,而非利用快速且同步的 PEPSCAN 合成技术合成。然后,得到的各组巢式重叠肽可以用于抗体结合研究和实验上的免疫,以鉴定出最好存在免疫优势决定簇的长肽,其包括不连续的构象 B 细胞表位。这种方法已用于选择 CD4 上的非线性决定簇(CD4 用在疫苗中以阻断 HIV 的 gp120 糖蛋白的结合)(24),并且用于由口蹄疫病毒的 VP1 蛋白 G-H 环结构域设计有效的肽抗原(25)。

[0057] 本发明的一个实施方案提供 PCV2 ORF2-编码的衣壳蛋白肽,其包含具有用于最佳抗体识别的 B 细胞表位簇的 154mer 氨基酸序列(SEQ ID NO:1,也显示在表 1 中)。这些抗原肽凭经验鉴定出来并且用来自 PCV2-感染的仔猪的血清样品和 ELISA 免疫测定形式最优化。可以适用于包含肽抗原的抗体捕获相的任何免疫测定形式,例如,ELISA,都可以用来检测并且定量结合到来自 PCV2-感染的猪的血液、血清、或血浆样品中的 PCV2 衣壳蛋白的特定片段上的抗体。

[0058] 在一个特定的实施方案中,约 154 个氨基酸的优化的 PCV2 抗原肽(SEQ ID NO:1),其对应于全长 PCV2 蛋白的氨基酸残基 47-202,具有 PCV2 衣壳蛋白上最有效用于通过接种产生保护性抗体和用于通过 ELISA 检测用于诊断的抗体的免疫原性和抗原性位点。这种高度抗原性和免疫原性的衣壳蛋白肽从多于 50 种长度为 20 至 170 个残基的重叠肽的集合中鉴定出来,设计、合成所述重叠肽并检测其与—组来自感染的仔猪的 PCV2 阳性血清的反应性。在所检测的多于 50 种候选肽抗原中,发现 PCV2 Cap1 抗原肽(SEQ ID NO.1)具有免疫优势 B 细胞表位簇并且具有最显著的且一致性的针对 PCV2 阳性血清组的抗原性。当在包含该肽序列的疫苗试验中检测时,还证明 Cap1 肽是高度免疫原性的。包含 PCV2 Cap1 抗原性/免疫原性肽(例如,SEQ ID NO:1)的疫苗的制备和应用包含在本发明的多个示例性的实施方案的范围内。

[0059] PCV2 Cap1 免疫原性/抗原性肽发明的特定实施方案进一步定义为 SEQ ID NO:1 的免疫学功能同源物,其具有来自突变或变体 PCV2 毒株的相应的序列和构象元件。同源的 PCV2 Cap1 抗原肽具有大致与起源变体 PCV2 毒株的衣壳蛋白位置 47-202 相关的氨基酸残基。通过序列比对程序,如 ClustalW(由德国欧洲分子生物学实验室(European Molecular Biology Laboratory)的 Julie D. Thompson, Toby Gibson 和英国剑桥的欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute)的 Desmond Higgins 提出,算法),容易证实所述同源物。表 2 显示选取的不同 PCV2 毒株的由 GenBank 登记号鉴别的 11 条 Cap1 抗原序列的 ClustalW 比对。表 2 中比对的 Cap1 同源物的起始 PCV 毒株包括基因型 2a, 2b, 2d, 1/2a 的病毒,并且这些不同的毒株由中国台湾、中国大陆、美国、加拿大、巴西、西班牙、德国和丹麦的动物分离。表 2 还示例了作为共有 Cap1 序列的同源物,其中分配到可变位置的氨基酸是最常用于这些位置的那些。在一个实施方案中,同源物具有 PCV2 衣壳蛋白的约位置 47 的氨基酸至约位置 202 的氨基酸的氨基酸序列。

[0060] 本发明的同源物进一步定义为与 SEQ ID NO:1 具有至少 80% 的同一性。在一个实施方案中,变体毒株同源物与 SEQ ID NO:1 具有至少 85% 的同一性。在另一个实施方案

中,变体毒株同源物与 SEQ ID NO:1 具有至少 90% 的同一性。在另一个实施方案中,变体毒株同源物与 SEQ ID NO:1 具有至少 95% 的同一性。

[0061] 本发明的其他实施方案提供 PCV2 Cap1 抗原肽的免疫学功能类似物。Cap1 肽的免疫学功能类似物包括 SEQ ID NO:1 的变体和保留与原始抗原肽基本上相同的抗原性和免疫原性的同源物。例如,作为 SEQ ID NO:1 的功能类似物或同源物的变体可以具有氨基酸位置的保守性置换;总电荷的改变;与另一个结构部分的共价连接;或小的添加、插入、缺失或保守性置换和/或它们的任意组合。因此,与 PCV2Cap1 抗原肽(例如,SEQ ID NO:1)结合的抗体也以基本上相似的功效与所述 PCV2Cap1 抗原肽的免疫学功能类似物结合。在一个实施方案中,所述功能类似物与 SEQ ID NO:1 或同源物具有至少 50% 的同一性。在另一个实施方案中,所述功能类似物与 SEQ ID NO:1 或同源物具有至少 80% 的同一性。在另一个实施方案中,所述功能类似物与 SEQ ID NO:1 或同源物具有至少 85% 的同一性。在另一个实施方案中,所述功能类似物与 SEQ ID NO:1 或同源物具有至少 90% 的同一性。

[0062] 在一个实施方案中,PCV2Cap1 抗原肽的免疫学功能类似物包括通过保守性置换、以及通过插入或缺失进行修饰的 PCV2Cap1 抗原肽的形式。在这一实施方案中,可以通过保守性置换修饰 SEQ ID NO:1 或修饰 SEQ ID NO:1 的类似物而得到免疫学功能类似物。

[0063] 保守性置换是一个氨基酸残基被另一个具有相似化学性质的氨基酸残基置换。例如,非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸;极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸及组氨酸;和带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。

[0064] 在另一个实施方案中,免疫学功能类似物可以通过肽 N 端、C 端的氨基酸添加和/或通过肽中间的插入而进行修饰。在本发明的不同实施方案中,添加是在肽的 N 端或 C 端。添加可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个氨基酸残基。所述添加可以组成不存在于 PCV2 衣壳蛋白中并且不改变肽的 PCV2 衣壳蛋白部分的免疫原性的氨基酸序列。不存在于 PCV2 衣壳蛋白的添加包括,但不限于,小的带电荷序列(例如,赖氨酸-赖氨酸-赖氨酸),能够形成分支结构的氨基酸(例如, ϵ N-赖氨酸)或能够形成环状结构的氨基酸(例如,半胱氨酸)。在本发明一个实施方案中,不存在于 PCV2 Cap1 中的氨基酸序列的添加是 5 个氨基酸以下。氨基酸添加可以是典型的或非典型的氨基酸或其混合物。

[0065] 在另一个特定的实施方案中,免疫性功能类似物可以通过肽的 N 端、C 端和/或中间的缺失而进行修饰。在不同的实施方案中,在肽的 N 端或 C 端缺失。缺失可以是 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个氨基酸残基。在一个特定的实施方案中,氨基酸缺失为 10 个氨基酸以下。

[0066] 在另一个实施方案中,PCV2Cap1 抗原肽的免疫学功能类似物包括已经通过电荷改变修饰的 PCV2cap 抗原肽。所述电荷改变可以是氨基酸置换、添加或缺失的结果,或是共价连接带电分子的结果。电荷改变可以具有这样的结果:与未修饰的肽相比,使得肽更为碱性、更为酸性或更为中性。在特定的实施方案中,通过在 N 端或 C 端添加 1-5 个赖氨酸残基而使肽更为碱性。在更具体的实施方案中,通过在 N 端添加 3 个赖氨酸残基而使肽更为碱性。

[0067] 非限制性举例,本发明的肽的免疫学功能类似物可以具有向末端氨基酸添加 1 至约 5 个另外的氨基酸(典型的或非典型的)。例如,可以向该 PCV2Cap1 肽的氨基端添加序列 Lys-Lys-Lys 而改变电荷。

[0068] 肽可以容易地使用标准技术合成,诸如 Merrifield 固相合成法以及对所述方法的许多可行的改进方案。肽也可以利用重组 DNA 技术制备。因此,本发明的多个示例性的实施方案包括编码 PCV2Cap1 抗原肽和 PCV2Cap1 抗原肽的免疫学功能类似物的核酸分子及其互补物(complements)。包含编码 PCV2Cap1 抗原肽和免疫学功能类似物的核酸分子的载体,尤其是表达载体,也包括在本发明的多个示例性的实施方案中。本发明的多个示例性的实施方案还包括包含所述载体的宿主细胞。

[0069] 本发明的多个示例性的实施方案还包括制备 PCV2Cap1 抗原肽和 PCV2Cap1 抗原肽的免疫学功能类似物的方法。例如,所述方法可以包括在表达 PCV2Cap1 肽和 / 或 PCV2Cap1 肽的免疫学功能类似物的条件下培育包含含有编码 PCV2Cap1 抗原肽和 / 或 PCV2Cap1 抗原肽的免疫学功能类似物的核酸的表达载体的宿主细胞。该实施方案可以使用来源于所述细胞的裂解物或分泌物的可控的且充分定义的免疫原。

[0070] 本发明的一个实施方案提供通过固相合成制备的肽组合物。通过该实施方案的化学方法制备的肽的质量可以被控制和定义,因此,可以保证抗原性、免疫原性和产率的再现性。此外,在肽抗原的制备过程中没有使用生物有害物质,这降低了风险并且消除了对昂贵的生物学防范的需求。由于位点特异性免疫原存在高摩尔浓度的所选表位,保证了利用 PCV2Cap1 抗原肽组合物的疫苗的安全性和免疫功效。

[0071] 在一个实施方案中,本发明的肽被合成。使用定义的 Cap1 合成肽使得在仔猪中用作抗原进行抗体检测和诊断时的假阳性结果最少。使用具有已知的 B 细胞和 Th 表位的定义的合成肽作为免疫原在用作疫苗的免疫原性成分时消除了由于存在来源于 PCV2- 感染的或重组病毒感染的宿主细胞的抗原性物质或来源于可以共纯化 PCV2 病毒和 / 或重组蛋白的重组蛋白表达系统的抗原性物质而引起的不需要的非-PCV2- 特异性免疫应答。例如,来自猪的血清可以具有针对宿主细胞的抗体,或针对重组大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、酵母或杆状病毒 (baculovirus) 的抗体,然后其与基于生物学来源的抗原的诊断检测中使用的抗原性物质交叉反应,并且由具有这些外来免疫原作为成分的疫苗产生的此类免疫应答将是非保护性的。相反,接受本发明的 PCV2Cap1 肽疫苗的猪将会产生专一的免疫应答,避免针对来源于宿主细胞或表达载体的蛋白的不需要的抗体和其他免疫应答,所述蛋白例如来源于重组大肠杆菌、酵母或杆状病毒的与生物学来源的 PCV2 抗原共同纯化的蛋白。

[0072] 合成肽的这一实施方案还使在制备过程中产生的杂质的干扰最小化。使用长的合成,尽管严格控制偶联效率,但是由于延伸循环过程中的事件,包括氨基酸插入、缺失、置换和提前终止,也会产生肽类似物,由此导致伴随着目标肽合成产生多种肽类似物。然而,此类肽类似物在作为固相抗原用于免疫学诊断目的或作为免疫原用于接种目的的免疫学应用中作为抗原性和免疫原性的贡献者在肽制剂中仍然是适用的。

[0073] 在合成肽免疫学应用的 25 年的经验中,我们发现,与允许通过小分子药物保留特定药物活性或在与生物来源的药物共同制备的大分子中存在的需要的活性和不需要的毒性的结构可变性范围相比,允许保留目的免疫学活性的结构可变性的范围适应性 (accommodating) 大得多。这就是为什么肽类似物(有意设计的或由于合成过程中的误差

不可避免产生的作为具有与目的肽相似的色谱和免疫学特性的缺失序列副产物的混合物)通常与所需要的肽的纯化制剂一样有效。设计的类似物和意图之外的类似物混合物是有效的,只要开发出有判断力的 QC 方法来监测制备过程和产物评估过程,从而保证利用这些肽的最终产品的再现性和功效。

[0074] 在本发明的其他实施方案中,肽包含在疫苗组合物中。Th 肽的存在可以提高 PCV2Cap1 肽疫苗的免疫原性。PCV2Cap1 肽(包括上述同源物和类似物)可以与 Th 表位共价连接和/或混合。

[0075] 在一个实施方案中,具有来源于 ORF1 和 ORF3 且不与 Cap1 免疫原连接的免疫优势 PCV2Th 表位簇,描述为 SEQ ID NOS :3-5(也显示在表 1 中)的 Th 肽可以用于补充 PCV2Cap1 肽疫苗的免疫原性。包括 SEQ ID NOS :3-5 的自由肽(不包含共价连接)可以提高疫苗制剂的免疫原性。

[0076] 在另一个实施方案中,PCV2Cap1 肽(包括上述同源物和类似物)可以通过或不通过间隔区与包含已知含有 Th 表位的序列的肽共价连接。该实施方案可以提供比不具有共价连接的 Th 表位的等价 Cap1 免疫原提高的免疫原性。在一个特定实施方案中,包含 Th 表位的肽被共价连接到 PCV2 肽的 N 端和/或 C 端。在另一个特定的实施方案中,间隔区具有序列 Lys-Lys-Lys-εNLys(SEQ ID NO :7),也显示在表 1 中。在一个实施方案中,包含 Th 表位的肽共价连接到 PCV2Cap1 肽的氨基端。在一个特定实施方案中,包含 Th 表位的肽是通过 Lys-Lys-Lys-εNLys 间隔区连接到氨基端的人工组合的 Th 肽 SEQ ID NO :2(如在表 1 中所示),并且表示为 SEQ ID NO :6(也显示在表 1 中)。

[0077] 本发明的多个实施方案涉及用于保护猪抵抗 PCV2 的疫苗组合物。在示例性的实施方案中,疫苗包含免疫原性肽抗原和可接受的递送载体或佐剂。在不同实施方案中,PCV2 疫苗组合物包含肽抗原和兽医学上可接受的递送载体或佐剂,其中所述肽抗原包含选自由下列组成的组的氨基酸序列:

[0078] a)PCV2 衣壳蛋白的约第 47 个位置的氨基酸至约第 202 个位置的氨基酸;

[0079] b)SEQ ID NO :1;

[0080] c)(b) 的同源物;

[0081] d)(a)、(b) 或 (c) 的抗原性和免疫学功能类似物;

[0082] e) 具有至少一个保守氨基酸置换、氨基酸添加和/或氨基酸缺失的 (a)、(b)、(c) 或 (d);和

[0083] f)(a)-(e) 的任意组合。

[0084] 在 PCV2 疫苗的实施方案中,通过添加或缺失 1 至 5 个氨基酸而改变肽抗原的电荷。在 PCV2 疫苗的另一个实施方案中,抗原性和免疫学功能同源物或类似物与 PCV2 衣壳蛋白大约位置 47-202 的氨基酸序列的抗原具有至少 80% 的同一性。在一个特别的实施方案中,肽抗原具有选自由 SEQ ID NOS 9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19 和 20 组成的组的氨基酸序列。

[0085] 在 PCV2 疫苗的另一个实施方案中,所述肽抗原还包含共价连接到所述肽抗原的 N 端或 C 端的 T 辅助细胞表位。在一个特定的实施方案中,T 辅助细胞表位共价连接到所述肽抗原的氨基端。在另一个特定的实施方案中,T 辅助细胞表位通过具有至少一个氨基酸的间隔区共价连接到肽抗原上。在一个特别的实施方案中,所述 T 辅助细胞表位为 SEQ ID

NO :2。在另一个特别的实施方案中,间隔区为 SEQ ID NO :7。在一个特定的实施方案中,肽抗原为 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :6。

[0086] 在多个示例性实施方案中,可以使用任意量的免疫原性肽抗原来在动物中引发免疫应答。在一个特别的实施方案中,肽抗原的量约为 0.1 μ g 至约 100mg。在另一个特别的实施方案中,肽抗原的量约为 1 μ g 至约 10mg。在另一实施方案中,肽抗原的量约为 10 μ g 至约 1mg。

[0087] 在 PCV2 疫苗组合物的不同实施方案中,所述组合物还包含三种 PCV2T 辅助细胞表位肽 SEQ ID NOS :3,4 和 5 的等摩尔混合物。在一个特定的实施方案中,SEQ ID NOS :3,4 和 5 的等摩尔混合物的量为约 0.1 μ g 至约 1mg。在一个更具体的实施方案中,SEQ ID NOS :3,4 和 5 的等摩尔混合物的量为约 1 μ g 至约 100 μ g。

[0088] 在多个示例性的实施方案中,可以使用任意类型或任意量的递送载体或佐剂。在一个特定的实施方案中,递送载体或佐剂是 MontanideTM ISA50V2(一种由矿物油及二缩甘露醇油酸酯(mannide oleate)构成的油性疫苗佐剂,用于制备油包水形式的乳液)、Tween® 80(亦被称为:聚山梨醇酯 80 或聚氧乙烯(20)失水山梨醇单油酸酯)、CpG 寡核苷酸和/或它们的任意组合。

[0089] 在一个特定的实施方案中,PCV2 疫苗组合物包含 SEQ ID NO :6 的肽抗原和兽医学上可接受的递送载体或佐剂,其中肽抗原的量约为 10 μ g 至约 1mg。

[0090] 本发明的另一个实施方案涉及用于保护具有 PCV2MDA 或不具有 PCV2MDA 的仔猪抵抗 PCV2 感染的方法,所述方法包括施用上述任意示例性实施方案所包括的疫苗。

[0091] 按照本公开内容制备的 PCV2Cap1 肽还可以用于通过在免疫测定的捕获相中(例如,在 ELISA 检测试剂盒的固相免疫吸附中)使用抗原有效量的肽来检测 PCV2 抗体。按照本发明的实施方案,任何相容的免疫测定形式都可以与所述肽一起使用。所述形式是普通技术人员公知的,并且已经记述在许多标准的免疫学手册及文章中,例如,参见 Harlow 等,1988(26)。这些公知的免疫测定形式特别包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、酶免疫斑点分析、凝集测定、抗体-肽-抗体夹心测定、肽-抗体-肽夹心测定。在一个实施方案中,免疫测定时使用包被有 PCV2Cap1 肽组合物的固相的 ELISA。

[0092] 按照本发明的一个实施方案,所述肽能够通过筛查 ELISA 检测来自于母猪(sow)和育肥小母猪(gilt)、公猪和阉公猪以及仔猪的血清的 PCV2 感染,用于评估来自于接种前的仔猪的血清的母体来源的抗-PCV2 抗体的水平和用于确定接种的仔猪中针对使用 PCV2Cap1 抗原肽、全长衣壳蛋白或灭活的 PCV2 病毒体的疫苗的免疫应答水平。

[0093] 在一特定实施方案中,可以利用 ELISA 免疫测定来检测猪血液、血清或血浆样品中抗-PCV2 抗体的存在,包括以下步骤:

[0094] i. 将 PCV2Cap1 肽连接到固体支持物上,

[0095] ii 将连接到所述固体支持物上的所述肽在有助于抗体与所述肽结合的条件下暴露于包含所述抗体的猪血液、血清或血浆样品;和

[0096] iii. 检测与连接到所述固体支持物上的所述肽结合的抗体的存在。

[0097] 在所述 ELISA 试剂盒的示例性的应用中,将待检测的猪血清样品稀释在样品稀释剂中,然后在任意抗体(如果存在的话)与肽-致敏的固相结合的条件下与上述一种或多种 PCV2Cap1 肽接触一段时间。去除未结合的物质后(例如,通过用磷酸缓冲的盐水洗涤),

二级复合物与标记的针对猪特异性 IgG 的抗体或标记的蛋白 A、蛋白 G 或蛋白 A/G 接触。这些抗体或蛋白 A、G 或 A/G 与二级复合物结合形成三级复合物,并且由于第二抗体或蛋白 A 或 G 或 A/G 用报道分子标记,当进行检测方式时,检测到所述三级复合物。报道分子可以是酶、放射性同位素、荧光团、生物发光分子、化学发光分子、生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白等。对于 ELISA,报道分子优选是酶。

[0098] 下述实施例作用于举例说明本发明,并且不是用来限制本发明的范围。

[0099]

表1

来源于PCV2 ORF1、ORF2及ORF3蛋白的PCV2免疫原性肽的氨基酸序列及用于增强ORF2 Cap1肽免疫原性的人工组合的Th肽。

来源于PCV2 ORF2衣壳蛋白的B细胞表位簇肽(Cap1肽)	(SEQ ID No. 1)
TRLSRTFGYTVKATTVRTPSWAVDMMRFNISDFVPPGGGTNKNISIPFEYYRIRKVKVEFWPCSPITQDGRGVGSTAVILDDNFVT	
KATALTYDPYVNYSSRHTIPQPF SYHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNRNQLWLRQLQTSANVDHVGLGT	
人工组合的Th肽(UBITh3)	(SEQ ID No. 2)
ISISEIKGVIVHKIETILF	
T RT TR	
来源于PCV2 ORF 1 Rep 蛋白的T辅助细胞表位簇肽	(SEQ ID No. 3)
CHIEKAKGTDQONKEYCSKE	
KWWDGYHGEEVWVIDDFYGW	(SEQ ID No. 4)
来源于PCV2 ORF3 Apo蛋白的T辅助细胞表位簇肽	(SEQ ID No. 5)
PRWPHNDVYIGLPITILLHFP	
来源于PCV2 ORF2衣壳蛋白的B细胞表位簇肽(Cap1肽)通过间隔区连接至人工组合的Th肽(UBITh3)	(SEQ ID No. 6)
ISISEIKGVIVHKIETILF-KKK ~~E~~ K-TRLSRTFGYTVKATTVRTPSWAVDMMRFNISDFVPPGGGTNKNISIPFEYYRIRKVKVE	
T RT TR	
FWPCSPITQDGRGVGSTAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPF SYHSRYFTPKPVLDSITIDYFQPNKNRNQLWLRQLQTSANVDHVGLGT	

[0100]

表2

来自不同PCV2毒株的同源Cap1序列的比对和共有序列。
可变位置以阴影表示。

登记号	国家	* 47	130
ACC59783	US	TRLSTRTEGTYT ~~TKRTT~~ VRTPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSPRSPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
ACQ99546	DK	TRLSTRTEGTYT ~~TKRTT~~ VRTPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSPRSPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
ACX47360	DE	TRLSTRTEGTYT ~~TKRTT~~ VRTPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSPRSPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
ACV53396	ES	----RTFGYTVKRT ~~TPVRT~~ TPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSHRSPPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
ADI44325	CN	TRLSTRTEGTYTVK ~~TKTT~~ VRTPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSPLTPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
ADD25772	CN	TRLSTRTEGTYTVK ~~TKTT~~ VRTPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSPLTPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
ADB97547	CN	TRLSTRTEGTYTVK ~~TKTT~~ VRTPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSPLTPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
ABW76695	BR	TRLSTRTEGTYTVK ~~TKTT~~ VRTPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSPLTPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
ABI29888	US	TRLSTRTEGTYTVK ~~TKTT~~ VRTPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSPLTPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
YP_003422531	CA	TRLSTRTEGTYTVK ~~TKTT~~ VRTPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSPLTPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
AAN62766	TW	TRLSTRTEGTYTVK ~~TKTT~~ VRTPSWAVDNMRFNINDEFLPPGGGNSHRSIPPEFYIRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGSSAVILDDNEFV	
共有序列			
131			200
ACC59783	US	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	9
ACQ99546	DK	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	10
ACX47360	DE	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	11
ACV53396	ES	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	12
ADI44325	CN	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	13
ADD25772	CN	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	14
ADB97547	CN	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	15
ABW76695	BR	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	16
ABI29888	US	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	17
YP_003422531	CA	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	18
AAN62766	TW	TKATALTYDPYVNYSSRHTITQPF ~~SYHS~~ RYFTPKPVLDDSTIDYFQPNKRNQ ~~LWLRLQ~~ TAGNV ~~DH~~ VGLGT	19
共有序列			20

*US- 美国, DK- 丹麦, DE- 德国, ES- 西班牙, CN- 中国大陆, BR- 巴西, CA- 加拿大, TW- 中国台湾

[0101]

实施例 1

[0102]

使用在共转染的 HTK 细胞核内的衣壳蛋白进行免疫荧光测定检测针对 PCV2 的抗

体

[0103] 可以使用共转染 PCV2 衣壳蛋白的 HTK 细胞通过免疫荧光检测针对 PCV2 的抗体。这种方法提供全长 PCV2 衣壳蛋白抗原在 HTK 细胞中的瞬时表达。这种免疫测定法还提供通过重组病毒感染进行衣壳蛋白表达,同时在合成和成熟阶段确保保持天然的衣壳蛋白构象,提供高特异性和灵敏性抗体检测的条件。

[0104] 按照图 1A 所示的机制,将 HTK 细胞系细胞感染 T7 聚合酶重组痘苗病毒 (T7/vac) (22),并且通过 lipofectamine™(Invitrogen) (23) 共转染 pCR-orf2 质粒。具体地,构建由 T7 聚合酶启动子介导表达天然 PCV2 衣壳蛋白的 pCR-orf2 质粒按下述完成:通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增全长 PVC2ORF2 基因(来自于台湾 PCV2 毒株 Cys08,登记号:AAN62766,具有位置 77 的 N → S 突变),并且克隆到 pCR® 2.1-TOPO® 质粒载体 (Invitrogen) 中。通过测序证实 pCR-orf2 质粒的表达能力,测序显示来自 PCV2 毒株 Cyc08 的 ORF2 的全长核苷酸序列 (23)。

[0105] HTK 细胞在 96-孔平板中生长至 80% 汇合,感染 T7 聚合酶重组痘苗病毒 (T7/vac) (22),然后通过 lipofectamine™(Invitrogen) 共转染 pCR-orf2 质粒。发现共转染 pCR-orf2 质粒的细胞在 HSK 细胞核中可靠地表达 PCV 衣壳蛋白,因此适于用于通过免疫荧光测定 (IFA) 捕获和检测针对 PCV2 衣壳蛋白的抗体。

[0106] 通过免疫荧光测定 (IFA) 滴定 PCV2 抗体

[0107] 通过用转染的 HTK 细胞包被分批制备具有天然 PCV2 衣壳蛋白作为抗原的平板,并且保存于 -80℃。为确保质量控制,每次分批制备 100 个抗原包被的平板。血清样品用 PBS 稀释,起始稀释 50 倍,而后 2 倍连续稀释。对于每次检测运行,包括来自 PCV2- 感染的 SPF 猪的阳性对照血清和来自未感染的 SPF 猪的阴性对照血清,以验证由 pCR-orf2 质粒在 HSK 细胞核内表达衣壳蛋白。在高于 1 : 50 的稀释度给出定位在细胞核的荧光信号(如图 1B 所示)的血清样品评分为 IFA 滴度 > 50;这些滴度指示 PCV2 感染的动物或由于接种产生了抗 -PCV 抗体的动物。通过 IFA 观察还可以通过区分特异性细胞核定位的抗 -衣壳蛋白抗体结合与非特异性蛋白结合而帮助真阳性抗体信号与假阳性信号的区分。

[0108] 由具有天然感染的猪或由给予基于 PCV2Cap1 肽的疫苗的猪收集的血清样品的所有检测按照编号进行。

[0109] 实施例 2

[0110] ELISA 方法检测血清抗体以鉴别天然 PCV2- 感染的猪和给予基于 CAP1 肽的 PCV2 疫苗的 PCV2- 感染的猪

[0111] 96-孔平板的孔用 100 μL 在 10mMNaHCO₃缓冲液 (pH9.5) 中 2 μg/mL 的单个 PCV2 衣壳蛋白肽在 37℃ 分别包被 1 小时,所述 PCV2 衣壳蛋白肽(例如 SEQ ID NO. :1 的肽 (PCV2Cap1 肽)),除非另外指明。

[0112] 将肽包被的孔用 250 μL 在 PBS 中 3 重量%的明胶在 37℃ 温育 1 小时,以封闭非特异性蛋白结合位点,然后用含有 0.05 体积%TWEEN® 20 的 PBS 洗涤三次并且干燥。将通过 IFA 检测对 PCV2 抗体阳性的猪血清和阴性对照血清用含有 20 体积%正常山羊血清、1 重量%明胶和 0.05 体积%TWEEN® 20 的 PBS1 : 20 稀释,除非另外指明。每孔添加一百微升的稀释样品,并且允许在 37℃ 反应 60 分钟。

[0113] 然后,将孔用含有 0.05 体积%TWEEN® 20 的 PBS 洗涤六次,以去除未结合的抗

体。使用辣根过氧化物酶-缀合的山羊抗猪 IgG 作为标记的追踪剂来结合在阳性孔中形成的抗体/肽抗原复合物。每孔加入一百微升处于预先滴定的最佳稀释度且在含有 1 体积% 正常山羊血清和 0.05 体积% **TWEEN®** 20 的 PBS 中的过氧化物酶-标记的山羊抗-猪 IgG 并且在 37℃ 再温育 30 分钟。将孔用含有 0.05 体积% **TWEEN®** 20 的 PBS 洗涤六次,以去除未结合的抗体,并且与 100 μ L 在柠檬酸钠缓冲液中含有 0.04 重量% 3',3',5',5'-四甲基联苯胺 (TMB) 和 0.12 体积% 过氧化氢的底物混合物再反应 15 分钟。该底物混合物用来通过形成有色产物来检测过氧化物酶。通过加入 100 μ L 1.0M H_2SO_4 终止反应,并且确定 450nm 处的吸光度 (A_{450})。

[0114] 血清稀释按照检测动物血清中的 PCV2 抗体的目的进行:(a) 为了鉴定潜在的天然感染,使用 1:20 稀释,记录 A_{450} 读数,并且利用内在的固有阴性对照进行截点计算;或(b) 为了确定接受基于肽的 PCV2 疫苗制剂的猪的抗体滴度,检测 1:10 至 1:10,000 的 10 倍连续血清稀释,并且通过 A_{450} 的线性回归分析计算检测的血清的滴度,表示为 $\log_{10}$ 。

[0115] 通过 ELISA 结果和高特异性基于天然衣壳蛋白的 IFA 的结果(实施例 1)之间的高相关性系数(表 3 中显示为 0.782)证实基于 Cap1 的 ELISA 检测 PCV2 感染的血清学有效性。

[0116] 实施例 3

[0117] 以位点特异性血清学鉴定用于疫苗和诊断应用的最佳 PCV2 衣壳蛋白肽

[0118] 先前公布的来自 PCV2 分离株 1010-Stoon(2) 和来自 Taiwan 毒株 Cyc08 的序列的 PCV2 的基因组序列用来推断开放阅读框的蛋白序列,并且由这两个 ORF2 序列获得的数据用来设计候选肽抗原用于免疫学检测。设计并合成具有长度约 20 个至 170 多个氨基酸的重叠序列的 70 多种衣壳蛋白肽用于血清学验证,目的是鉴定作为与 PCV2 感染相关的 B 和 T 细胞识别的靶标的抗原肽。然后,通过血清学验证方法鉴定具有最佳 B 细胞表位的衣壳蛋白肽。这种利用长肽和短肽进行表位作图的方法鉴定不连续的构象表位和线性表位(24, 25)。实施例 1 中所述的通过 IFA 检测关于抗-PCV2 衣壳蛋白反应性表征的一组 24 份血清用于肽的血清学验证。所述血清用于筛选重叠的 PCV2 衣壳蛋白肽的强烈且一致性的抗原性,这可以用于诊断和预测抗体介导的保护性免疫原性。用于构建这种 PCV2 反应性组的血清从田间发现具有天然感染的猪收集或从已知不具有 PCV2 感染的正常的猪和 SPF 猪收集,通过 IFA 滴定每只猪具有它们各自的抗-PCV2 衣壳蛋白反应性,如表 3 所示。

[0119] 表 3

[0120] 来自具有或不具有 PCV2 感染的仔猪的血清用于通过与衣壳蛋白 IFA 滴度的相关性血清学验证 Cap1 肽 ELISA

[0121]

猪血清编号	宿主描述	IFA 滴度	Cap1 肽 ELISA (A ₄₅₀)
RS 3	SFP	< 50	0.251
RS 4	SFP	< 50	0.204
RS 6	SFP	< 50	0.134
RS 8	SFP	< 50	0.284
RS 9	SFP	< 50	0.285
RS 10	SFP	< 50	0.192
RS 12	SFP	< 50	0.179
RS 13	SFP	< 50	0.171
RS 15	SFP	< 50	0.233
NS 5	正常血清	< 50	0.123
NS 6	正常血清	< 50	0.140
NS 9	正常血清	< 50	0.245
RS 28	田间	200	0.259
RS 24	田间	400	0.354
RS 25	田间	800	0.528
RS 26	田间	800	0.479
RS 1	SFP	1600	0.794
RS 39	田间	1600	0.492
RS 7	SFP	3200	0.633
RS 16	SFP	3200	1.129
RS 42	PCV2-感染的	3200	3.000
RS 43	PCV2-感染的	3200	2.782
RS 41	PCV2-感染的	6400	3.000
RS 45	PCV2-感染的	12800	2.657
相关性系数		0.782	

[0122] 包含 12 个 PCV2IFA 阳性 (IFA 滴度 > 1 : 50) 猪血清和 12 个 PCV2IFA 阴性 (滴度 < 1 : 50) 猪血清的一组用于基于 PCV2Cap1 (SEQ ID NO :1) 肽的 ELISA 的血清学验证。血清以 1 : 21 稀释用于 ELISA 检测。在 IFA 滴度和来自基于肽的 ELISA 的 A₄₅₀ 读数之间发现相关性系数为 0.782。

[0123] 在重叠肽之间, 包含约 20 个氨基酸的短肽由 Applied BioSystems Inc. (应用生物系统公司) 433 型自动化肽合成仪 (Lexington, KY) 合成; 包含约 25 至约 170 个氨基酸的较长的肽用 430A, 431 和 433 型应用生物系统肽合成仪 (Applied BioSystems Peptide Synthesizer Models 430A, 431 和 433) 利用 Fmoc 化学合成。

[0124] 每种肽都是通过独立合成在固相支持物上产生, 具有末端 Fmoc 保护和三功能氨基酸的侧链保护基团。将合成完毕的肽从固相支持物上切下, 并且通过 90% 三氟乙酸去除侧链保护基团。合成的肽制剂通过 Matrix 辅助的激光解析飞行时间 (Matrix-Assisted

Laser Desorption Time-Of-Flight, MALD TOF) 质谱法表征正确的组成, 并且通过反相 HPLC 表征包括合成模式, 含量和浓度的内容。对于长的合成, 尽管严格控制偶联效率, 但是由于延伸循环过程中的事件还产生肽类似物, 所述延伸循环过程中的事件包括氨基酸插入、缺失、置换和提前终止, 由此导致与目标肽合成物一起产生多种肽类似物。但是, 当作为免疫诊断目的的固相抗原或作为接种目的的免疫原用于免疫学应用中时, 肽制剂中的此类肽类似物仍然适于作为抗原性和免疫原性的贡献剂。典型地, 有意设计的或通过合成方法作为副产物混合物产生的此类肽类似物通常与需要的肽的纯化制剂同样有效, 只要开发出有判断力的 QC 方法来监测制备过程和产物评估过程, 从而保证利用这些肽的最终产品的再现性和功效。

[0125] 用血清组检测不同长度的合成肽的抗原性的初始反应性模式。来自天然感染的猪的血清组中存在的抗体具有针对 PCV2 衣壳蛋白肽的反应性随长度增加而增加的趋势。作为用表 3 下组中的血清获得的广泛的血清学筛选数据的结果, 长度为 154 个氨基酸的命名为“Cap1”的长的衣壳蛋白肽 (SEQ ID NO :1) 提供了异常灵敏性的 ELISA。Cap1 肽还赋予这种 ELISA 高度的特异性, 如在表 3 上组中所示, 与 IFA- 验证的阴性猪血清的反应性低。事实上, PCV- 感染的猪的显著的血清学反应性仅与 Cap1 154mer 肽 (SEQ ID NO. 1) 相关。因此, 合理推测 PCV2- 感染的猪中存在的大部分血清学反应性是由于抗体识别仅存在于长肽上的 B 细胞表位簇。此外, 该 154mer 的出乎意料的免疫优势抗原性符合长肽代表衣壳蛋白上大的暴露表面, 其存在一系列长的连续的和连续的表位。这些表位包括与 T 辅助细胞 (Th) 表位连接的 B 细胞表位, 这是刺激 B 细胞抗体应答所必需的。

[0126] 实施例 4

[0127] 用由 PCV2CAP1 肽配制的疫苗免疫豚鼠进行初始免疫原性评估和通过基于 CAP1 肽的 ELISA 和基于天然衣壳蛋白的 IFA 检测的已接种疫苗者中的抗体滴度的相关性

[0128] 豚鼠免疫

[0129] 在本发明的疫苗的示例性应用中, 将含有包含 Cap1 抗原肽但不与外源 Th 表位连接的肽 (例如 SEQ ID NO :1) 或通过氨基端和 Lys-Lys-Lys-ε NLys (SEQ ID NO :7) 间隔区与外源 T 辅助细胞表位如 UBITH® 3 (SEQ ID NO :2) 共价连接的肽 (例如, SEQ ID NO :6) 作为免疫原的疫苗用商购油性疫苗递送载体 Montanide ISA 50V2 配制成油包水乳液。两组豚鼠用表 4 所示的基于肽的疫苗免疫。

[0130] 这是在小动物上进行的初步研究, 以评估有或无与外源 T 辅助位点 UBITH® 3 (SEQ ID NO :2) 的共价连接的 Cap1 肽 (SEQ ID NO :1) 的免疫原性, 研究以常用的油包水乳液制剂进行, 以得到具有一定范围的抗体应答的血清组。未连接的 Cap1 肽称为 SEQ ID NO :1 (表 1)。在氨基端通过间隔区与外源 T 辅助位点连接的 Cap1 肽称为 SEQ ID NO :6 (表 1)。在该 PCV2 Cap1 疫苗制剂的免疫原性研究中使用两个实验组, 每组三只 Duncan Hartley 豚鼠 (雌性, 9 周龄, 450gm, 无病毒), 如表 4 所示。

[0131] 表 4

[0132] 通过比较由 Cap1 肽 ELISA (滴度 Log₁₀) 和抗-衣壳蛋白 IFA 确定的抗-衣壳蛋白抗体滴度评估 Cap1PCV2 疫苗在宿主中的免疫原性

[0133]

组	免疫原	剂量	动物 ID #	ELISA		IFA 滴度
				0 wpi	4 wpi	4 wpi
				1/100 的 A ₄₅₀	滴度 Log ₁₀	
A	PCV2 Cap1 (SEQ ID NO: 1)	致敏: 25µg/0.25 ml/IM 加强: 25µg/0.25 ml/IM (用 ISA 50V2 1:1 v/v)	3963	0.050	4.108	100
			3964	0.055	3.280	
			3965	0.051	3.347	
			平均值	0.052	3.578	
			SD	0.002	0.376	
B	UBITh3-KKK-εK- PCV2 Cap1 (SEQ ID NO: 6)	致敏: 25µg/0.25 ml/IM 加强: 25µg/0.25 ml/IM (用 ISA 50V2 1:1 v/v)	3957	0.053	4.349	400
			3958	0.056	4.404	
			3959	0.053	4.051	
			Avg	0.054	4.268	
			SD	0.001	0.155	

[0134] 每只动物肌内免疫。对于组 A, 使用肽 PCV2Cap1 (SEQ ID NO: 1) 作为免疫原, 其配制在油包水溶液中, 将 Montanide™ ISA 50V2 (Seppic, Paris France) (常用于猪疫苗的二缩甘露醇油酸酯和矿物油的油性佐剂组合物) 用等体积的在 PBS 中的水相肽溶液乳化而成。对于给予组 B 的疫苗, Cap1 肽在氨基端通过序列为 Lys-Lys-Lys-εNLys (SEQ ID NO: 7) 的间隔区与人工组合的 UBITh® 3T 辅助细胞表位 (SEQ ID NO: 2) 共价连接 (间隔区连接靶向的 PCV Cap1B 细胞表位和 UBITh® 3T 细胞表位), 产生称为 SEQ ID NO: 6 (表 1) 的肽免疫原, 并且配制成如用于组 A 的油包水溶液。组 A 和 B 的豚鼠通过肌内途径在第 0 周 (致敏) 和第 2 周 (加强) 施用 25 µg 剂量。豚鼠在初始免疫后第 0 周和第 4 周 (wpi) 采血, 用于通过 ELISA 和 IFA 检测血清的免疫原性。如下文所讨论的, 含有无共价连接的间隔区和人工 UBITh® 3 (SEQ ID No: 1) 的肽免疫原的疫苗激发抗 -Cap1 抗体应答; 并且, 使用连接的 UBITh® 3T 辅助细胞表位, 如 SEQ ID No: 6, 产生更强烈的抗 -衣壳蛋白滴度, 此为提高的免疫原性的证据, 如通过每种测定法所评估的 (表 4)。

[0135] 免疫原性评估

[0136] 设计的 PCV2Cap1 肽疫苗制剂的免疫原性使用 PCV2 肽 Cap1 (SEQ ID NO: 1) 作为固相抗原 (已经以 2 µg/mL 每孔 100 µL 包被在孔上) 通过基于目标肽的 ELISA 完成。检测从 1 : 10 至 1 : 10,000 连续稀释的实验动物血清, 并且阳性滴度表示为稀释率倒数的 Log₁₀。将各组血清阳性样品混合在一起, 并且通过 Cap1ELISA 和过 IFA 法 (免疫荧光测定) 确定混合物的免疫原性结果。通过这种方式, 将通过与 Cap1 肽的反应性评估的 ELISA 免疫

原性与通过与在 HTK 细胞系细胞内表达的全长天然装配的 PCV2 衣壳蛋白的反应性评估的 IFA 滴度进行比较（图 1A 和 1B）。

[0137] 结果

[0138] 组 A 的结果表明,油包水乳液中的 PCV2 Cap1 肽 (SEQ ID NO :1) 在 25 μ g 的剂量本身是免疫原性的,无需与人工 Th 表位 (SEQ ID NO :2) 连接。通过 ELISA 检测,通过多赖氨酸间隔区添加人工组合的 Th 表位使免疫原性增强约五倍 ($4.268-3.578 = 0.69\text{Log}_{10}$ 滴度)。在与基于 Cap1 的 ELISA 结果的正相关性 (其用来验证 Cap1ELISA) 中,用于确定组 A 合 B 的免疫原性的基于天然衣壳蛋白的 IFA 方法也显示与 Cap1 肽本身 (SEQ ID NO :1) 相比提高的针对人工 Th 表位 - 连接的 PCV2 肽 (SEQ ID NO :6) 的应答,尽管准确度较低的免疫荧光测定仅显示对于嵌合的 SEQ ID NO :6 免疫原提高四倍,即 100vs. 400。类似地,用不连接UBITh® 3T辅助细胞表位 (SEQ ID NO :2) 的 Cap1 肽 (SEQ ID NO :1) 或连接UBITh® 3T辅助细胞表位 (SEQ ID NO :2) 的 Cap1 肽 (SEQ ID NO :6) 免疫的仔猪也表现出强烈的抗-Cap1 抗体应答,通过与 SEQ ID NO :2 的 T 辅助细胞表位连接显著提高反应 (实施例 5, 表 5)。

[0139] 然后,通过用另外的佐剂以更高的剂量施用在豚鼠中检测更具免疫原性的 SEQ ID NO :6 嵌合肽的较高的免疫原性范围。注射 400 μ g 的致敏剂量,其中肽免疫原以表 5 所述的量与 CpG 寡核苷酸佐剂 (SEQ ID No :8) (27) 复合,然后在 2wpi 注射 100 μ gCpG- 增强的免疫原的加强剂量。由这种 CpG- 增强的较高剂量接种方案发挥的免疫原性通过 ELISA 检测产生出人意料的免疫原性增加十倍,并且与 ELISA 滴度的增加一致,通过 IFA 检测滴度增加 16 倍。即,与表 4 所示的 400 的混合的组 B 的 IFA 滴度相比较,通过较高剂量 CpG- 增强的疫苗方案免疫的豚鼠组达到 1600 的令人印象深刻的 IFA 滴度。

[0140] 实施例 5

[0141] 在常规农场饲养的仔猪中以不同剂量评估 PVC2 CAP1 肽疫苗制剂的免疫原性

[0142] 仔猪免疫

[0143] 如表 5 所示,将 80 头在常规无特定病原体 (SPF) 农场的 4 周龄的仔猪分成八组 (十头仔猪 / 组)。这些组在第 0 周和第 4 周用含有 50 μ g 肽 Cap1 (SEQ ID NO :1) 和 Tween® 80 的以 1 : 1 (v/v) 均质在 Montanide ISA 50V2 中的油包水乳液的疫苗进行肌肉内免疫 ;或含有 50 至 400 μ g 的与UBITh® 3 人工 Th 表位连接的肽 Cap1 (SEQ ID NO :6) 的以 1 : 1 (v/v) 均质在 Montanide ISA 50V2 中的油包水乳液的疫苗进行肌肉内免疫。不同剂量的 SEQ ID NO :6 免疫原与 CpG 寡核苷酸 (SEQ ID NO :7) 复合 (27) 或不与其复合,然后在存在或不存在Tween® 80 的条件下配制成油包水乳液 (表 5)。

[0144] 在第一次接种和在第 4 和 6wpi 时,收集血液样品进行 ELISA 分析。制备个体血清,并且如实施例 2 和 3 所述通过 ELISA 检验 PCV2 抗体。将来自每组的血清混合在一起并且进行进一步的 ELISA 检测。

[0145] 结果

[0146] 各组血清混合物的 ELISA 检测的免疫原性结果显示在表 5 和图 2 中。所有的疫苗制剂甚至在 50 μ g 的低剂量也是免疫原性的。每组的每只仔猪在第 4 周和第 6 周产生具有 1 : 1,000 或更高的 ELISA 滴度的个体免疫应答,并且在第 6 周对于组混合物滴度高于 1 : 10,000,例外的是第 8 组仔猪,其以 50 μ g 的低剂量给予未增强的免疫原 Cap1 肽 (SEQ

ID NO :1) 进行致敏和加强。

[0147] 表 5

[0148] PCV2 Cap1 肽疫苗的免疫原性评估。疫苗依 T 辅助细胞表位、肽剂量、和佐剂制剂而不同,施用至在常规农场饲养的仔猪,通过 Cap1 ELISA 评估。

[0149]

组号 [#]	免疫原描述	免疫原的量 ($\mu\text{g/mL}$)	另外的佐剂 [§]	0 wpi (1/100 稀释的 $A_{450\text{nm}}$)	ELISA 滴度 (Log_{10})	
					4 wpi	6 wpi
1	UBITh3-KKK- ϵ K-Cap1*	致敏: 400 $\mu\text{g}/1.0\text{ mL}$ 加强: 100 $\mu\text{g}/0.25\text{mL}$	CpG1: 1.2:1 [‡]	0.168	3.154	4.036
2	UBITh3-KKK- ϵ K-Cap1*	致敏: 200 $\mu\text{g}/2\text{mL}$ 加强: 200 $\mu\text{g}/2\text{mL}$	0.1% Tween 80	0.104	3.705	4.734
3	UBITh3-KKK- ϵ K-Cap1*	致敏: 200 $\mu\text{g}/2\text{mL}$ 加强: 200 $\mu\text{g}/2\text{mL}$	无	0.134	3.488	4.128
4	UBITh3-KKK- ϵ K-Cap1*	致敏: 100 $\mu\text{g}/1\text{mL}$ 加强: 100 $\mu\text{g}/1\text{mL}$	CpG1: 1.2:1 [‡] 和 0.1% Tween 80	0.096	3.045	4.116
5	UBITh3-KKK- ϵ K-Cap1*	致敏: 100 $\mu\text{g}/1\text{mL}$ 加强: 100 $\mu\text{g}/1\text{mL}$	0.1% Tween 80	0.120	3.027	4.576
6	UBITh3-KKK- ϵ K-Cap1*	致敏: 50 $\mu\text{g}/0.5\text{mL}$ 加强: 50 $\mu\text{g}/0.5\text{mL}$	0.1% Tween 80	0.090	3.603	4.203
7	UBITh3-KKK- ϵ K-Cap1*	致敏: 50 $\mu\text{g}/0.5\text{mL}$ 加强: 50 $\mu\text{g}/0.5\text{mL}$	无	0.153	3.157	4.350
8	Cap1 [†]	致敏: 50 $\mu\text{g}/0.5\text{mL}$ 加强: 50 $\mu\text{g}/0.5\text{mL}$	0.1% Tween 80	0.104	2.901	3.554

[0150] [‡]用于每组的混合的血清

[0151] *SEQ ID NO :6

[0152] † SEQ ID NO :1

[0153] § 所有疫苗是 1 : 1v/v 油包水乳液,其中肽溶解在 PBS 中或肽 /CpG 复合物悬浮在 PBS 中,作为水相, Montanide™ ISA50V2 作为油相和主要的佐剂,并且包含所示的另外的佐剂。

[0154] ‡阳离子肽 :阴离子寡核苷酸的电荷比例。

[0155] 第 0,4,6 和 10 周的来自个体猪的血清还通过 IFA 评估抗 - 衣壳蛋白抗体,如实施例 1 所述。发现大多数动物在接受两次疫苗注射后到第 10 周的 IFA 滴度在 400 至 1600 的范围内,来自第 3 组的少数动物血清具有出人意料高至 6,400 的 IFA 滴度。在每只猪中都没有出现注射部位的致反应性。

[0156] 在所述 80 头免疫的仔猪中,发现八头在第 0 周的第一次免疫之前具有母体来源的抗体 (MDA),通过 IFA 检测到,如表 6 所示。在台湾,MDA 典型地存在于在常规农场中饲养的仔猪中,并且它们典型地起作用来抑制抗 -PCV 衣壳蛋白应答。在具有 MDA 的所有八头仔猪中,在第 4 周至第 6 周通过 ELISA 检测到增加滴度的抗 -Cap1 抗体,与给予的剂量和制剂无关 (表 6)。因此,尽管存在母体来源的抗体的干扰,具有 MDA 的所有八头动物具有针对 PCV2Cap1 疫苗制剂的成功的疫苗反应。这是针对本发明疫苗的应答具有专一的性质的证据。

[0157] 在初次免疫后 10 周,从编号为 26,27,86 和 87 的 MDA- 阳性动物收集的免疫血清的 IFA 滴度分别具有 6400,3200,3200 和 3200 的空前的 IFA 滴度。包括具有 MDA 的可比较的仔猪用于 PCV2 疫苗研究,使用关于 PCV2 的 Ft. Dodge/Wyeth (现为 Pfizer Animal Health) Suvaxyn® 疫苗,一种灭活的病毒疫苗,和使用 Boehringer Ingelheim Inglevac® CircoFLEX® 疫苗,一种重组全长 PCV2 ORF2 衣壳蛋白疫苗。仔猪对这些疫苗应答,产生的 IFA 滴度不超过 50-100 的常规范围,仅有 5-10% 达到多至 400 的 IFA 滴度。因此,针对设计的 PCV2 Cap1 肽免疫原的反应的“专一的”性质能够区分基于肽的疫苗和已有类型的 PCV2 疫苗。

[0158] 表 6

[0159] 在通过不同剂量的基于 PCV2 Cap1 肽的疫苗免疫前,在具有母体来源的抗体 (MDA) 的仔猪中的疫苗反应

[0160]

个体动物耳标 签编号	IFA 滴度*	剂量 ($\mu\text{g}/\text{剂}$)		疫苗反应 ELISA 滴度(Log_{10})	
		Prime	加强	4 wpi	6 wpi
7	200	400	100	3.039	3.750
26	100	200	200	2.948	3.812
27	200	200	200	2.988	3.982
29	50	200	200	3.749	4.081
68	400	50	50	2.446	3.939
85	50	100	100	3.690	4.608
86	50	100	100	2.720	3.939
87	100	100	100	3.090	4.499

[0161] *MDA

[0162] 在整个研究期间,80 头接受两次不同的肽 Cap1 PCV2 疫苗注射接种的仔猪,其存活率为 93%,而另外 400 头圈养在该常规农场的同一养猪场中但未接种的猪,其存活率为 82%。与该常规农场其他圈养设施中饲养的 5000 头猪的平均存活率 80%相比,接种疫苗的猪的存活率 93%是一种大的提高。这种预计损失的显著减少(该免疫原性研究的意图之外的结果)已经进一步证明基于 Cap1 肽的 PCV2 疫苗的效力。

[0163] 总之,Cap1 肽 PCV2 疫苗在第 4 周显示仅单次给药的显著的免疫原性,如 ELISA 滴度所示,并且到第 6 周两次注射后已经显示极好的免疫原性,在第 3 组动物中 IFA 滴度高至 6400。发现具有母体来源的抗体的所有八头动物具有针对 Cap1 疫苗的免疫原应答,而与它们接受的剂量和制剂无关。与在同一建筑物中圈养的 400 头未接种仔猪 82%的存活率相比,和与在该常规农场的其他设施中圈养的另外 5000 头猪 80%的存活相比,设计的基于肽的 PCV2 疫苗在接种的正常(非 SPF)仔猪中提供 93%的存活率,因此提供了关于显著的经济效益的证据。

[0164] 实施例 6

[0165] 通过向制剂中加入来自 PCV2 的 ORF1 和 ORF3 蛋白的成簇的 T 辅助细胞肽提高 CAP1 肽 PCV2 疫苗的一次注射保护性

[0166] Cap1 肽 PCV2 疫苗的免疫原性通过结合表 1 所示的 ORF1 和 ORF3 编码的 PCV2T 细胞表位肽而进一步提高。这些表位最初由 Stevenson 等人 (12) 检测其在猪中对 T 细胞增殖的诱导作用。PCV2Cap1 肽(例如,SEQ ID NO S:1 或 6)与三种短 PCV2Th 肽(SEQ ID NO S.:3,4 和 5)的等摩尔组合以 1:1 降至 1:0.1 至 1:0.05 的摩尔比例混合,配制在水

相中,然后进行乳液制备。在仔猪中检测通过这些免疫优势 PCV2 Th 表位补充的 PCV2 Cap1 疫苗制剂,从而通过在单次疫苗注射后刺激 PCV2- 相关 T 细胞应答 (包括细胞因子产生) 而确定对免疫应答的影响。

[0167] 结果

[0168] 如表 7 所示,在给予较低剂量补充有 PCV2 Th 肽的 PCV2 Cap1 疫苗制剂的仔猪中观察到显著增强的 IFA 滴度。在第 10 组仔猪中,该组仔猪给予单一剂量疫苗,所述疫苗具有 50 μ g 与 **UBITh® 3** 连接的 Cap1 肽免疫原 (SEQ ID NO :6),与 20 μ g 三种 PCV2T 辅助细胞肽免疫原 (SEQ ID NOS :3,4,5) 混合,到第 4 周产生 50 至 400 的 IFA 滴度,与之相比的是,在第 9 组仔猪中,其接受单一剂量的疫苗 (具有 200 μ g SEQ ID NO :6Cap1 免疫原,无三种另外的 PCV2 Th 肽免疫原),在第 4 周观察到的 IFA 滴度为 < 50 至 50。

[0169] 因此,包含主要的 B 细胞表位 - 簇集的 PCV2 衣壳蛋白肽 (SEQ ID NO :6) 组合来自其他 PCV2 蛋白的免疫优势 Th 肽 (SEQ ID NOS. :3,4 和 5) 的等摩尔混合物的疫苗制剂允许使用较低总剂量的免疫原含量,同时保持平衡的 B 细胞抗体应答和 T 细胞应答,并且由此用较低剂量的肽免疫原发挥有效的抵抗感染的保护性免疫应答,从而提供节约免疫原的作用。当在可比较的疫苗制剂 (有或无补充的 Th 免疫原) 中不与 **UBITh® 3** 连接的 Cap1 免疫原 (SEQ ID NO :1) 是目标 B 细胞免疫原性肽时,通过所述三种补充的 PCV Th 肽也获得显著的免疫原 - 节约结果 (表 8)。在这一结果中,具有 50 μ g SEQ ID NO :1 与 10 μ g 补充的 Th 肽的剂量比 100 和 200 μ g 剂量的无三种补充的 Th 肽的 SEQ ID NO :1 更有效。当提供为用于紧急应用目的的低成本低剂量一次注射疫苗时,所述组合 Cap1 疫苗制剂应该是特别有效的。

[0170] 表 7

[0171] 在用不具有或具有 PCV2 ORF1 和 ORF3 Th 表位肽的 Cap1 肽疫苗单次免疫仔猪后,诱导针对 PCV2 衣壳蛋白的 IFA 抗体滴度

[0172]

组号	疫苗制剂	动物 ID	IFA 滴度		
			0 wpi	2 wpi	4 wpi
9	200 µg SEQ ID NO: 6, 体积为 2 mL (与 ISA 50V2 1:1 v/v 乳液)	154-03	<50	<50	<50
		154-07	<50	50	50
		152-03	<50	<50	<50
		152-10	<50	<50	<50
		152-04	<50	<50	<50
10	50 µg SEQ ID NO: 6 + 20 µg 等重量的 SEQ ID NOS: 3, 4 和 5, 体积为 1mL (与 ISA 50V2 1:1 v/v 乳液)	139-01	<50	<50	200
		139-02	<50	<50	50
		139-05	<50	<50	200
		139-13	<50	<50	200
		139-15	<50	<50	200
		139-03	<50	<50	400
		139-04	<50	50	200
		139-10	<50	<50	400
		139-12	<50	<50	200
		139-14	<50	<50	400

[0173] 实施例 7

[0174] 检测 Cap1 肽 PCV2 疫苗提供保护仔猪免受病毒传播和由暴露于 PCV2- 感染的猪引起的致病性的能力

[0175] 设计田间试验来评估 Cap1 肽 PCV2 疫苗以各种剂量和制剂激发保护性免疫性的能力。将与携带 PCV2 的仔猪（无其它特定病原）圈养在一起而暴露于 PCV2 的 SPF（无特定病原）仔猪接种 Cap1 疫苗。设计用于检测专门圈养的转基因猪对天然 PCV2 传播的感染的易受攻击性的这些条件理想地适于评估由 PCV2 疫苗提供的保护性免疫性。

[0176] PCV2- 感染和无菌动物圈养条件

[0177] 用于田间试验的设施是位于台湾北部 Xiang Hill Ranch 的“转基因动物测试站 (Transgenic Animal Testing Station, TATS)”。TATS 用于转基因猪在被有意释放到田间之前保持隔离时的安全性检测。其由台湾动物技术研究所 (Animal Technology Institute of Taiwan, ATIT) 的动物医学系管理 (23)。实验室、动物圈养和动物管理实践符合 ISO/IEC 17025 :2005 和 ISO9001 (SGS TW07/03565) 的规定。农场的转基因猪通过观察和常规检测而常规监测 SPF 状态, 检测项目为经典猪瘟、假性狂犬病病毒、猪繁殖和呼吸综合征病毒、猪霍乱病毒、萎缩性鼻炎、猪肺炎支原体、口蹄疫病毒、猪痢疾、疥疮、弓虫和胸膜炎肺炎放线杆菌。常规监测没有发现存在这些传染病和介质的证据。

[0178] 另外, 在过去两年里已经应用通过实施例 1 所述的最近开发的 IFA 测试检测 PCV2 感染, 并且发现这一猪群具有广泛的 PCV2 感染。该农场的 PCV2 阳性率通过血清学监测确定高达 89.4% (47/52)。这些除此之外是 SPF 的动物具有 PCV2 作为唯一传播的病原。

[0179] PCV2 接种和暴露的条件

[0180] 通过首先在血清中然后在初乳中通过 PCV2 IFA 滴度鉴定对 PCV2 抗体为阴性的待产的母猪开始挑选来自这种“仅有 PCV2”环境的无菌仔猪。来自血清和初乳均为阴性的

母猪的仔猪在约四周龄时纳入该试验。此时,将这些无菌仔猪随机分成五组,每组五只仔猪,第 11-13 组为疫苗组,疫苗组 14 具有 15 只仔猪,对照组 15 具有 6 只仔猪。然后,疫苗组通过肌肉注射 (i.m.) 施用表 8 所述的 PCV2 Cap1 疫苗致敏剂量 (100 或 200 μ g SEQ ID NO:1,或 50 μ g SEQ ID NO:1+50 μ g 等重量的 SEQ ID NOS:3,4 和 5 或 50 μ g SEQ ID NO:1+10 μ g 等重量的 SEQ ID NOS:3,4 和 5)。在初次免疫后 (wpi)4 周,各组给予相同疫苗的加强剂量。在第 2,6 和 10wpi 通过 IFA 监测抗体应答。表 8 所示的 IFA 滴度在 2wpi 时对于所有组均为基线水平。到第 6 周,对于所有接种组获得高的抗体应答,尽管在第 6 和 10wpi 各组的免疫原性不同。对于对照组的滴度在整个血清学检测期间保持在基线。

[0181] 接种组和对照组的无菌仔猪在养猪场中与“仅有 PCV2”的转基因猪的一般群体圈养在一起约两个月,使其处于 PCV2 传播的危险中。在该时间期结束时,此时所有实验动物的体重均达到约 120kg 活体重量 (5-6 月龄),将动物杀死并且通过尸检检验 PCV2 感染的迹象。

[0182] PCV2 感染的迹象是细微的,并且在 PCV2 感染过程中出现的多个病理损伤在两个月的暴露期过程中恢复后未发现。因此,使用尸检方法,一种提供比用来检验疫苗 / 攻毒研究或田间试验的接种动物被传播的病原感染的体征的常规更直接的方法更灵敏的诊断的方法,作为检测接种 / 暴露的动物中的感染的方法。尸检检验包括观察淋巴结、肺和肾。除了在对照动物的肾的损伤体征外,几乎没有发现感染证据。白点和条纹保留在未接种的感染动物的肾表面上作为纤维化的体征,如图 3A(*) 所示,而在接种的评分为无损伤的猪的肾上不存在此类标记损伤病史的体征,如图 3B 所示 (图 3B 中看到的微白色条纹是反射的光 (**))。

[0183] 获得由尸检对实验猪评分的病理学结果,显示在表 9 中,肾囊上的白点是之前的感染的主要迹象。这一试验用 PCV2 肽疫苗制剂以编号方式进行。

[0184] 结果和结论

[0185] 通过 PCV2 IFA 对对照和疫苗检测组检测的 PCV2 抗体滴度的结果见表 8,显示在接种的动物中抗体应答随时间增加,到第 10 wpi 应答较高。基于 Cap1 肽的 PCV2 疫苗制剂的免疫原性变化,并且最高的免疫原性是给予最大的组 (即第 14 组) 的制剂。

[0186] 对照组中,六头猪中有三头 (50%) 发现在肾囊上具有白点,为标志 PCV2 感染病史的典型损伤 (图 3A),对照猪中有一头具有轻微的损伤,有两头具有中度损伤。相比之下,30 头接种的猪中仅有两头 (6.7%) 表现出病理学变化,并且这些均评分具有轻微肾病理学迹象 (表 9)。这两头猪仅在最大组的接种猪 (即,具有 15 头猪的第 14 组) 中发现。在接种的猪中对淋巴结和肺完全没有病理学改变,仅对于两头接种的猪有轻微的肾损伤。因此,证实了本发明的基于肽的 PCV2 疫苗的多种制剂和剂量的保护性功效。

[0187] 在本说明书中,本发明人不尝试穷尽列举所有可能的变化。备选实施方案可能没有作为本发明的特定部分进行描述,并且可能产生所描述部分的不同的组合,或者对于一部分是可用的其他未描述的备选实施方案不视为放弃这些备选实施方案。应该理解,所述未描述的实施方案中的多个在下述权利要求的字面范围内,并且其他的是等同的。此外,在本说明书中引用的所有参考文献、出版物、美国专利和美国专利申请公布通过引用如同在本说明书中充分描述一样结合在本说明书中。

[0188] 表 8

[0189] 对于每组猪在用有或无 PCV2PRF1 和 ORF2T 表位肽的 Cap1 肽疫苗免疫后通过 IFA 检测的几何平均抗体滴度

[0190]

组号	疫苗描述*†	动物数目	IFA 滴度		
			2 wpi	6 wpi	10 wpi
11	SEQ ID NO:1 200 µg/2 mL	5	10	48	66
12	SEQ ID NO:1 100 µg/1 mL	5	10	60	105
13	50µg SEQ ID No: 1 + 50µg 等比例的 SEQ ID NOS: 3, 4, 5 /1mL	5	10	100	100
14	50µg SEQ ID No: 1 + 10µg 等比例的 SEQ ID NOS: 3, 4, 5 /1mL	15	10	127	174
15	对照	6	10	10	10

[0191] * 所有制剂为与作为佐剂的 Montanide™ISA50V2 的 1 : 1v/v 油包水乳液。

[0192] †疫苗肌内给予两次注射,在第 0wpi 给予致敏剂量,在第 4wpi 给予加强剂量。

[0193] 表 9

[0194] 在实验组中观察 PCV2 病理学

[0195]

组号	疫苗描述*	动物数目	动物编号	得分†
11	SEQ ID NO:1 (200 µg/2 mL)	5	154-03	0
			154-07	0
			152-03	0
			152-10	0
			152-04	0
12	SEQ ID NO:1 (100 µg/1 mL)	5	135-01	0
			135-02	0
			135-03	0
			135-10	0
			135-14	0
13	50µg SEQ ID No: 1 + 50µg 等比例的 SEQ ID NOS: 3, 4, 5 /1mL	5	135-04	0
			135-11	0
			135-12	0
			135-13	0
14	50µg SEQ ID No: 1 + 10µg 等比例的 SEQ ID NOS: 3, 4, 5 /1mL	15	135-15	0
			141-04	0
			140-11	0
			140-01	0
			140-02	1
			140-10	0
			140-12	0
			141-01	0
			141-05	0
			140-14	0
			140-03	0
			154-02	0
			154-06	0
			154-05	0
			152-02	0
			152-01	1
1-4 总计		30	2/30=6.7%感染的	
15	对照	6	140-04	0
			139-11	2
			146-03	2
			146-11	1
			146-12	0
			146-10	0
5 总计		6	3/6=50%感染的	

[0196] * 与表 8 所述的相同的两种剂量接种。

[0197] †得分 :0 =无损伤,1 =轻微,2 =中度,3 =严重

[0001]

序列表

<110> 美国联合生物医学公司
王长怡
彭文君

<120> 设计肽的 PCV2 疫苗

<130> 1004263.204WO (2029-WO)

<140> PCT/US2010/041406

<141> 2010-07-08

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 154

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(154)

<223> 来自台湾的 2 型 Cyc08 毒株

<400> 1

Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val
1 5 10 15

Arg Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Ser Asp
20 25 30

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
35 40 45

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
50 55 60

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp
65 70 75 80

Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
85 90 95

Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
100 105 110

Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
115 120 125

[0002]

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser
 130 135 140

Ala Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
 145 150

<210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 麻疹病毒

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> 修饰的 T 辅助细胞位点

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> S 或 T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> K 或 R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> G 或 T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> H 或 T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> K 或 R

<400> 2

Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile Glu Thr
 1 5 10 15

Ile Leu Phe

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 猪圆环病毒

[0003]

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(20)
<223> 来自 PCV2 ORF1 的 T 辅助细胞表位 1
<400> 3
Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
1          5          10          15

```

```

Cys Ser Lys Glu
          20

```

```

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> 猪圆环病毒

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(20)
<223> 来自 PCV2 ORF1 的 T 辅助细胞表位 2
<400> 4

```

```

Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp
1          5          10          15

```

```

Phe Tyr Gly Trp
          20

```

```

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> 猪圆环病毒

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(20)
<223> 来自 PCV2 ORF3 的 T 辅助细胞表位 1
<400> 5

```

```

Pro Arg Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Gly Leu Pro Ile Thr Leu
1          5          10          15

```

```

Leu His Phe Pro
          20

```

```

<210> 6

```

[0004]

<211> 177
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 通过间隔区与人工组合的 Th 表位 (UB1Th3) 连接的来源于
 PCV2 ORF2 衣壳蛋白的 B 细胞表位簇肽 (Cap1 肽)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> S 或 T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> K 或 R

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> G 或 T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> H 或 T

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> K 或 R

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> 酰胺化, (ε N)Lys

<400> 6

Ile Ser Ile Xaa Glu Ile Xaa Xaa Val Ile Val Xaa Xaa Ile Glu Thr
 1 5 10 15

Ile Leu Phe Lys Lys Lys Lys Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr
 20 25 30

Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met
 35 40 45

Met Arg Phe Asn Ile Ser Asp Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn
 50 55 60

Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val
 65 70 75 80

[0005]

Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly
 85 90 95
 Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala
 100 105 110
 Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro
 115 120 125
 Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu
 130 135 140
 Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu
 145 150 155 160
 Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Ala Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly
 165 170 175

Thr

<210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人工间隔区序列

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> 酰胺化, (ϵ N)Lys

<400> 7

Lys Lys Lys Lys
1

<210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CpG寡核苷酸

<400> 8
 tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

[0006]

```

<210> 9
<211> 154
<212> PRT
<213> 猪圆环病毒

<300>
<308> GenBank/ACC59783
<309> 2008-04-21
<313> (1)..(154)

<400> 9

Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Ile Lys Arg Thr Thr Val
1          5          10          15

Arg Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp
          20          25          30

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu
          35          40          45

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
          50          55          60

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp
65          70          75          80

Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
          85          90          95

Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
          100          105          110

Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
          115          120          125

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala
          130          135          140

Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145          150

<210> 10
<211> 154
<212> PRT
<213> 猪圆环病毒

<300>

```

[0007]

<308> GenBank/ACQ99546

<309> 2010-06-28

<313> (1)..(154)

<400> 10

Thr	Arg	Leu	Ser	Arg	Thr	Phe	Gly	Tyr	Thr	Ile	Lys	Arg	Thr	Thr	Val
1				5					10					15	

Lys	Thr	Pro	Ser	Trp	Ala	Val	Asp	Met	Met	Arg	Phe	Asn	Ile	Asn	Asp
			20					25					30		

Phe	Leu	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Arg	Ser	Val	Pro	Phe	Glu
		35					40					45			

Tyr	Tyr	Arg	Ile	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Glu	Phe	Trp	Pro	Cys	Ser	Pro
	50					55					60				

Ile	Thr	Gln	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	Gly	Ser	Ser	Ala	Val	Ile	Leu	Asp
65					70					75					80

Asp	Asn	Phe	Val	Thr	Lys	Ala	Thr	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Val
				85					90					95	

Asn	Tyr	Ser	Ser	Arg	His	Thr	Ile	Thr	Gln	Pro	Phe	Ser	Tyr	His	Ser
			100					105					110		

Arg	Tyr	Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Thr	Ile	Asp	Tyr	Phe
		115					120					125			

Gln	Pro	Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Trp	Leu	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala
	130					135					140				

Gly	Asn	Val	Asp	His	Val	Gly	Leu	Gly	Thr
145					150				

<210> 11

<211> 154

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒

<300>

<308> GenBank/ACX47360

<309> 2010-02-03

<313> (1)..(154)

<400> 11

Thr	Arg	Leu	Ser	Arg	Thr	Phe	Gly	Tyr	Thr	Ile	Lys	Arg	Thr	Thr	Val
1				5					10					15	

[0008]

```

Lys Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp
    20                      25                      30

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu
    35                      40                      45

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
    50                      55                      60

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp
    65                      70                      75                      80

Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
    85                      90                      95

Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
    100                     105                     110

Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
    115                     120                     125

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Ser
    130                     135                     140

Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
    145                     150

```

<210> 12

<211> 150

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒

<300>

<308> GenBank/ACV53396

<309> 2010-03-17

<313> (1)..(150)

<400> 12

```

Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Arg Thr Pro Val Arg Thr Pro Ser
1      5      10      15

Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu Pro Pro
    20                      25                      30

Gly Gly Gly Ser Asn His Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr Arg Ile
    35                      40                      45

```

[0009]

```

Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr Gln Gly
 50                      55                      60

Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val
 65                      70                      75                      80

Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr Ser Ser
                      85                      90                      95

Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr Phe Thr
                      100                      105                      110

Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro Asn Asn
 115                      120                      125

Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn Val Asp
 130                      135                      140

His Val Gly Leu Gly Thr
145                      150

```

<210> 13

<211> 154

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒

<300>

<308> GenBank/ADI44325

<309> 2010-06-14

<313> (1)..(154)

<400> 13

```

Thr Arg Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val
 1                      5                      10                      15

```

```

Arg Thr Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp
 20                      25                      30

```

```

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Val Pro Phe Glu
 35                      40                      45

```

```

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
 50                      55                      60

```

```

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp
 65                      70                      75                      80

```

[0010]

Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
85 90 95

Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
100 105 110

Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe
115 120 125

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr
130 135 140

Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 14

<211> 154

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒

<300>

<308> GenBank/ADD25772

<309> 2010-03-08

<313> (1)..(154)

<400> 14

Thr Arg Leu Ser Arg Thr Ile Gly Tyr Thr Val Lys Lys Thr Thr Val
1 5 10 15

Arg Thr Pro Ser Trp Asn Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp
20 25 30

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Leu Thr Met Pro Phe Glu
35 40 45

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
50 55 60

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp
65 70 75 80

Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
85 90 95

Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
100 105 110

[0011]

Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Arg Thr Ile Asp Tyr Phe
115 120 125

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Thr
130 135 140

Gly Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 15

<211> 154

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒

<300>

<308> GenBank/ADB97547

<309> 2010-08-18

<313> (1) .. (154)

<400> 15

Ala Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Arg Thr Thr Val
1 5 10 15

Thr Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Lys Leu Asp Asp
20 25 30

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
35 40 45

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
50 55 60

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp
65 70 75 80

Asp Asn Phe Val Pro Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
85 90 95

Asn Tyr Ser Phe Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
100 105 110

Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
115 120 125

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Ile Gln Thr Ser
130 135 140

[0012]

Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 16

<211> 154

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒

<300>

<308> GenBank/ABW76695

<309> 2008-08-01

<313> (1)..(154)

<400> 16

Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Arg Thr Thr Val
1 5 10 15

Thr Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Lys Leu Asp Asp
20 25 30

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
35 40 45

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
50 55 60

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp
65 70 75 80

Asp Asn Phe Val Pro Lys Ala Asn Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
85 90 95

Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
100 105 110

Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
115 120 125

Gln Pro Asn Asn Lys Lys Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser
130 135 140

Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 17

<211> 154

[0013]

```

<212>  PRT
<213>  猪圆环病毒

<300>
<308>  GenBank/ABI29888
<309>  2007-06-14
<313>  (1)..(154)

<400>  17

Ala Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val
1          5          10          15

Ser Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Leu Asp Asp
          20          25          30

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
          35          40          45

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
          50          55          60

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Ile Ile Leu Asp
65          70          75          80

Asp Asn Phe Val Ile Lys Ala Thr Ala Gln Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
          85          90          95

Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
          100          105          110

Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
          115          120          125

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Ser
          130          135          140

Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145          150

<210>  18
<211>  154
<212>  PRT
<213>  猪圆环病毒

<300>
<308>  GenBank/YP_003422531
<309>  2010-06-28
<313>  (1)..(154)

```

[0014]

<400> 18

Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val
1 5 10 15

Arg Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp
20 25 30

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
35 40 45

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
50 55 60

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp
65 70 75 80

Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
85 90 95

Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
100 105 110

Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
115 120 125

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Ser
130 135 140

Arg Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 19

<211> 154

<212> PRT

<213> 猪圆环病毒

<300>

<308> GenBank/AAN62766

<309> 2002-11-06

<313> (1)..(154)

<400> 19

Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val
1 5 10 15

Arg Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp
20 25 30

[0015]

Phe Val Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu
35 40 45

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
50 55 60

Ile Thr Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp
65 70 75 80

Asp Asn Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val
85 90 95

Asn Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser
100 105 110

Arg Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe
115 120 125

Gln Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser
130 135 140

Ala Asn Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr
145 150

<210> 20

<211> 154

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 猪圆环病毒 - 共有序列

<400> 20

Thr Arg Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Arg Thr Pro Val
1 5 10 15

Arg Thr Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp
20 25 30

Phe Leu Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn His Arg Ser Ile Pro Phe Glu
35 40 45

Tyr Tyr Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro
50 55 60

[0016]

Ile	Thr	Gln	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	Gly	Ser	Thr	Ala	Val	Ile	Leu	Asp
65					70					75					80
Asp	Asn	Phe	Val	Thr	Lys	Ala	Thr	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Val
			85						90					95	
Asn	Tyr	Ser	Ser	Arg	His	Thr	Ile	Thr	Gln	Pro	Phe	Ser	Tyr	His	Ser
			100					105						110	
Arg	Tyr	Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Thr	Ile	Asp	Tyr	Phe
		115					120					125			
Gln	Pro	Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Trp	Leu	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser
	130					135					140				
Ala	Asn	Val	Asp	His	Val	Gly	Leu	Gly	Thr						
145					150										

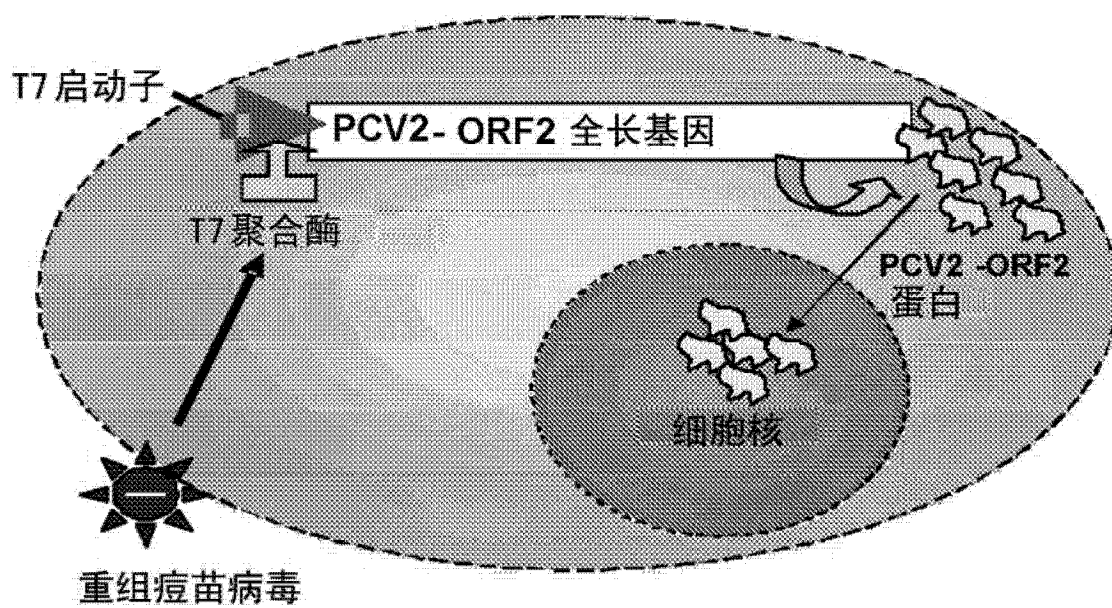


图 1A

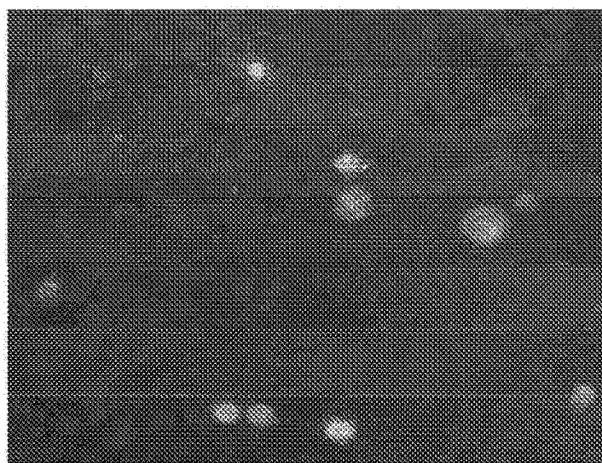


图 1B

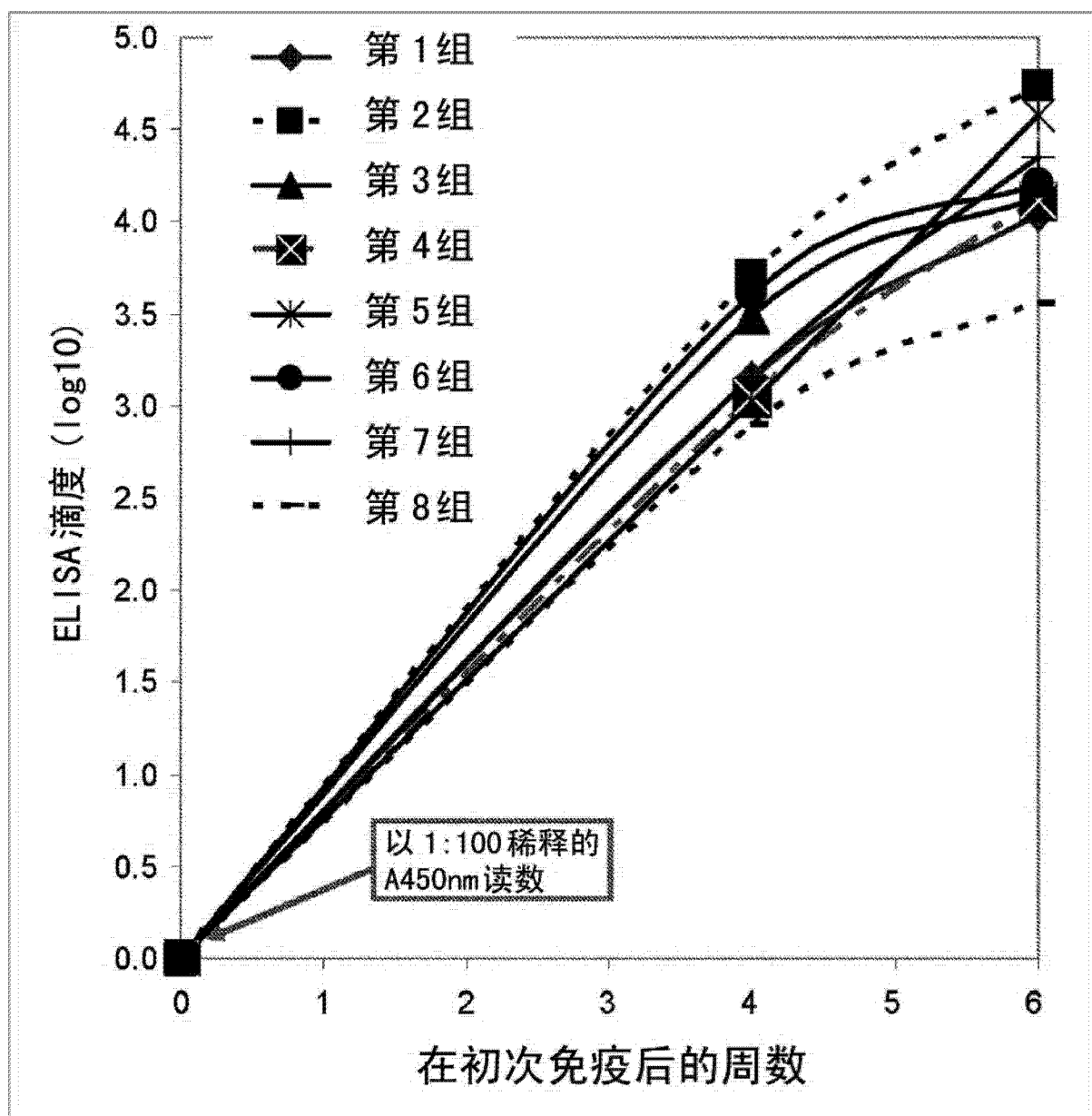


图 2

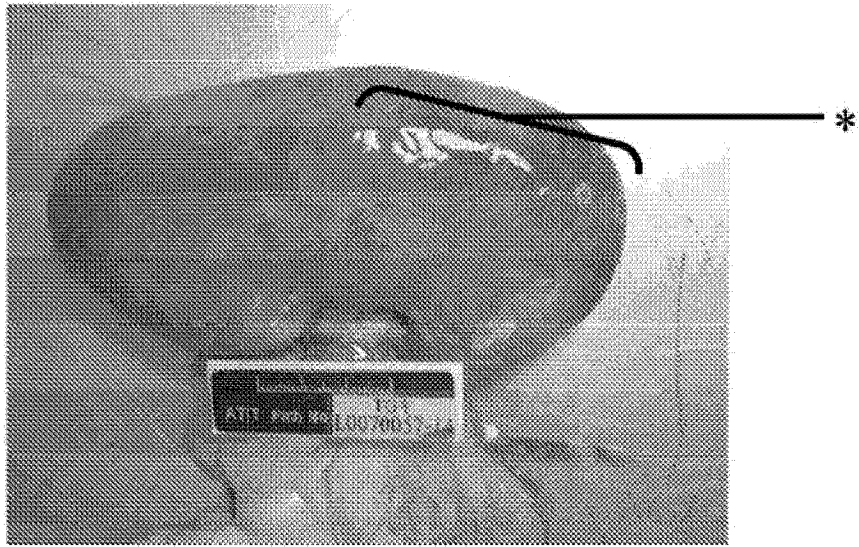


图 3A

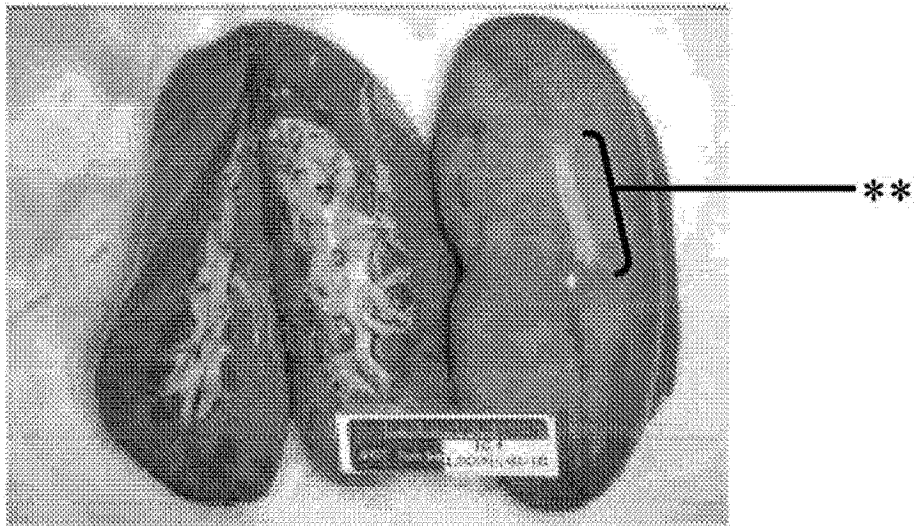


图 3B