



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103354748 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 16

(21) 申请号 201180048358. 6

(22) 申请日 2011. 08. 04

(30) 优先权数据

2010903478 2010. 08. 04 AU

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 04. 03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2011/000991 2011. 08. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02012/016290 EN 2012. 02. 09

(71) 申请人 麦克法兰博尼特医学健康研究公司

地址 澳大利亚维多利亚

(72) 发明人 海蒂·卓默尔 潘提利斯·庞博瑞斯

凯萨琳·麦卡弗里

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王朋飞 刘成春

(51) Int. Cl.

A61K 39/29 (2006. 01)

C12N 7/00 (2006. 01)

C07K 14/02 (2006. 01)

C12Q 1/70 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书47页

序列表5页 附图24页

(54) 发明名称

修饰的丙型肝炎病毒蛋白

(57) 摘要

本发明提供包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽的组合物及其各种应用, 其中所述多肽经修饰而包含: (i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸; 并且, 其中, 相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽, 所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体, 并基本上保留 CD81 结合。本发明提供制备包含至少 40%、或至少 45%、或至少 50%、或至少 55%、或至少 60%、或至少 65%、或至少 70% 单体 HCV E2 多肽的组合物方法, 所述方法包括在宿主细胞中表达多肽并分离表达的产物, 其中所述多肽为包括受体结合变体在内的 HCV E2 多肽, 且其中所述多肽经修饰而包含: (i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸。

1. 一种组合物,其包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽,其中所述多肽经修饰而包含:

(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;

并且,其中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体,并基本上保留 CD81 结合。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。

3. 根据权利要求 2 所述的组合物,其中 C581 和 C585 发生了突变或中断。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的组合物,其中 C652 或者 C652 和 C677 发生了突变或中断。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的组合物,其中 C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的组合物,其中 C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的组合物,其中所述多肽折叠为至少 40%、或至少 45%、或至少 50%、或至少 55%、或至少 60%、或至少 65%、或至少 70% 的单体。

8. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的组合物,其中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键折叠为小于 70% 的多聚体,或小于 65%、或小于 60%、或小于 55%、或小于 50%、或小于 45%、或小于 40% 的多聚体。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的组合物,其中所述 HCV E2 多肽为 E2661 或其受体结合部分。

10. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的组合物,其中所述 HCV E2 多肽包含在选自 HVR2、HVR1 和 IgVR 的 1、2 或 3 个可变区中的缺失。

11. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的组合物,其还包含生理学或药学上可接受的载体和 / 或稀释剂。

12. 权利要求 1-11 中任一项所述的组合物在治疗或预防 HCV 感染中的应用。

13. 权利要求 1-10 中任一项所述的组合物在诊断或监测 HCV 感染或监测抗 -HCV 治疗方案中的应用。

14. 权利要求 1-10 中任一项所述的组合物在筛选防止丙型肝炎病毒进入宿主细胞的结合剂中的应用。

15. 包含权利要求 1-10 中任一项所述的组合物的宿主细胞或宿主细胞培养物。

16. 在个体中产生抗体的方法,所述方法包括在一段时间内、在适于引起抗体反应的条件下,将权利要求 1-11 中任一项所述的组合物给予所述个体。

17. 在个体或患者中引起免疫反应的方法,所述方法包括在一段时间内、在适于引起免疫反应的条件下,将权利要求 1-11 中任一项所述的组合物给予所述个体。

18. 包含权利要求 1-10 中任一项所述的组合物的诊断试剂盒或固体基质。

19. 制备包含至少 40%、或至少 45%、或至少 50%、或至少 55%、或至少 60%、或至少 65%、或至少 70% 单体 HCV E2 多肽的组合物的方法,所述方法包括在宿主细胞中表达多肽并分离表

达的产物,其中所述多肽为包括受体结合变体在内的 HCV E2 多肽,且其中所述多肽经修饰而包含:

(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中 C581 和 C585 发生了突变或中断。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的方法,其中 C652 或者 C652 和 C677 发生了突变或中断。

23. 根据权利要求 19-22 中任一项所述的方法,其中 C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。

24. 根据权利要求 19-23 中任一项所述的方法,其中 C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

修饰的丙型肝炎病毒蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及修饰的丙型肝炎病毒 (HCV) E2 蛋白以及制备和使用其的方法。

背景技术

[0002] 作者在本申请文件中引用的已出版具体文献集中于本说明书末尾。

[0003] 在本说明书中引用现有技术并不应该认为是承认或以任何形式暗示所述现有技术在任何国家构成了公知常识的一部分。

[0004] 丙型肝炎病毒 (HCV) 是一个主要的公共健康问题,全世界估计有 1.23 亿多慢性感染者。还没有可用的疫苗或暴露后的预防办法。目前可用的治疗办法限施用三氮唑核苷和聚乙二醇化的干扰素,其表现出 40-80% 的有限疗效并引起严重的副作用。HCV 是黄病毒科 (Flaviviridae) 丙型肝炎病毒属 (Hepacivirus) 中仅有的成员,并且分为 6 个主要基因型 (1-6) 和各种亚型 (a、b、c 等)。高度的序列多样性证明是研发通用疫苗以预防 HCV 感染的主要挑战。

[0005] HCV 编码两种包膜糖蛋白即 E1 和 E2,它们作为异二聚体位于病毒粒子表面,其介导病毒附着和融合以促进病毒进入。E1 和 E2 糖蛋白是宿主免疫反应、疫苗策略和抗病毒剂研发的靶标。

[0006] HCV 细胞进入因子包括四跨膜蛋白 CD81、B 类 I 型清道夫受体 (SR-B1)、紧密连接的膜蛋白封闭蛋白 (Claudin) 1、6 或 9 和密封蛋白 (Occludin)。已经在 E2 中鉴定出几个不连续的 CD81- 结合基序,有人提出其在折叠过程中组装,包括多蛋白残基 Trp⁴²⁰、Trp⁴³⁷、Leu⁴³⁸、Leu⁴⁴¹、Phe⁴⁴²、Tyr⁵⁷⁷、Trp⁵²⁹、Gly⁵³⁰ 和 Asp⁵³⁵ 以及 613-618 区域内的氨基酸。HCV 糖蛋白与封闭蛋白或密封蛋白之间的相互作用尚未见记载,尽管二者均为病毒进入的关键辅因子。

[0007] E1 和 E2 为 I 型跨膜蛋白,其分别在 4 或 5 和 11N- 连接的糖基化位点于生物合成期间被大量修饰。看起来经历由 ER 伴侣促进的缓慢合作性折叠途径的功能性异二聚体的形成需要 E1 和 E2 的顺式表达。在两个糖蛋白的跨膜结构域即 E2 的膜近侧区和 E2 胞外结构域内的 W⁴⁸⁷HY 基序内已鉴定出几个异二聚化的决定子。

[0008] 在糖蛋白 E2 内,伴随 CD81 和 SR-B1 受体结合的保留,可从细胞中有效表达和分泌独立折叠结构域 (多蛋白残基 384-661)。有 3 个离散的可变区位于该受体结合结构域 (RBD ;E2₆₆₁) 内 ;N- 末端高变区 1 (HVR1)、HVR2 和基因型间可变区 (igVR)。HVR2 和 igVR 的侧翼是成对的保守半胱氨酸残基,所有 3 个可变区均被认为是溶剂暴露的且排出在核心区以外。E2RBD 通过含有保守的 7 肽重复的膜近侧区与跨膜结构域 (TMD) 连接,该保守的 7 肽重复看来具有与黄病毒属 II 类融合蛋白糖蛋白 E 的“茎”区类似的结构和功能特征,意味着 E2 可能也表示 II 类融合蛋白。

[0009] 糖蛋白 E1 和 E2 在其各自的胞外域内具有 8 个和 18 个半胱氨酸残基,所述胞外域在 6 个主要基因型中是保守的 (图 1A)。这些蛋白内半胱氨酸和二硫键的排列还在研究中,然而,有人认为,它们在形成或稳定蛋白折叠方面起作用,因此其在病毒

结合至宿主细胞、进入宿主细胞和宿主体内的免疫原性方面起作用。Krey 等人, PLoS Pathog 6(2):e1000762, 2010 年, 近来利用胰蛋白酶的蛋白水解、氧化还原化学和质谱分析已经在 E2 胞外域内分配了 9 个由这些残基形成的二硫键 (Krey 等人, 2010(同上))。半胱氨酸的严格保守性表明二硫键在构建蛋白质三维结构上起着关键的作用。与二级结构预测模型一起, Krey 等人, 2010(同上) 进一步提出了作为 II 类融合蛋白的 E2 模型; II 类融合蛋白为存在于黄病毒科内许多病毒中的一类蛋白 (图 1B)。

[0010] 在该 HCV E2 的 II 类模型中, 已知的 CD81- 结合区被定位于 I 和 III 结构域的界面。二硫键 1 和 5 可稳定结构域 I 的 β -折叠夹层 (β -sheet sandwich), 而二硫键 6、7 和 8 位于结构域 III 中。所述 igVR 在这两个结构域与二硫键 1、5 和 6 之间形成“铰链”。在任何胰蛋白酶消化物中均没有正式确定出二硫键 7, 但认为其形成二硫键对 (bisulfide pair)。HVR1 是结构域 I 以外的 N-末端延伸。预测结构域 II 形成含有 3 个短程二硫键对的相对未结构化的结构域; 二硫键 2 和 3 位于 HVR2 侧翼, 二硫键 4 可稳定由 502-520 之间的富含甘氨酸疏水残基序列表示的候选融合“环”。预测二硫键对 9 位于结构域 III 的边缘, 同时 C677 位于 E2 的膜近侧区或提议的“茎”区内。

[0011] 二硫键聚集体的形成和异源形式的 E2 或 E1E2 异二聚体, 当这些蛋白重组表达于一系列表达系统中时, 已经阻碍了 HCV 的结构和功能研究。人们竭力追求的是产生构象活性多肽 (conformationally competent polypeptid) 的、没有上述这些缺点的修饰的 HCV E2 蛋白。

[0012] 发明概述

[0013] 在本文中, 除非另有说明, 词语“包含 (comprise)”或其变体如“包含 (comprises)”、“包含 (comprising)”应当理解为意指包括所述要素或整体或者要素或整体的组, 但不排除任何其他要素或整体或者要素或整体的组。

[0014] 如本文所用, 除非另有清楚地说明, 单数形式“一个 (a)”“一个 (an)”和“所述 (the)”包括复数形式。因而, 例如, 提到“突变 (a mutation)”时, 包括单个突变以及两个或更多个突变; 提到“多肽 (a polypeptide)”时, 包括一个多肽以及两个或更多个多肽; 等等。

[0015] 除非另有明确地说明, 本说明书中的每个实施方案经必要的变通 (mutatis mutandis) 后可用于每个其他实施方案。

[0016] 在一个实施方案中, 本发明提供了一种组合物, 其包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽, 其中所述多肽经修饰而包含: (i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸; 并且, 其中, 相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽, 所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中, 所述修饰的多肽基本上保留 CD81 结合。

[0017] 在其他实施方案中, 所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。

[0018] 在一些实施方案中, 所述多肽还包括 C581 和 C585 的突变或中断。

[0019] 在其他实施方案中, 所述多肽还包括 C652 或者 C652 和 C677 的突变或中断。

[0020] 在另一个示例性实施方案中, C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。

[0021] 在又一个实施方案中, C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0022] 在另一个实施方案中, 本发明提供了一种组合物, 其包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽, 其中所述多肽经修饰而包含: (i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸; 并且, 其中, 相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽, 所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中, 所述修饰的多肽基本上保留 H53 结合。

[0023] 在另一个方面, 本发明提供了一种组合物, 其包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽, 其中所述多肽经修饰而包含: (i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸, 其中所述多肽折叠为至少 40%、或至少 45%、或至少 50%、或至少 55%、或至少 60%、或至少 65%、或至少 70% 的单体。

[0024] 在一些实施方案中, 相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽, 所述多肽通过分子间二硫键折叠为小于 70% 的多聚体, 或小于 65%、或小于 60%、或小于 55%、或小于 50%、或小于 45%、或小于 40% 的多聚体。

[0025] 在另一个实施方案中, 所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。

[0026] 在一些实施方案中, 所述 HCV E2 多肽为 E2661 或其受体结合部分或变体。

[0027] 在其他实施方案中, 所述 HCV E2 多肽包括在选自在 HVR2、HVR1 和 IgVR 的 1、2 或 3 个可变区中的缺失。

[0028] 在另一个实施方案中, 所述组合物还包含生理学或药学上可接受的载体和 / 或稀释剂。

[0029] 这些 HCV E2 多肽以及产生所述多肽的能力可广泛用于诊断、治疗 (例如, 免疫、抗体产生、疫苗或寻靶剂)、筛选、生产和研究应用。特别是, 本发明提供了一种组合物, 其包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽, 其中所述多肽经修饰而包含: (i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸; 并且, 其中相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽, 所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中, 所述修饰的多肽基本上保留 H53- 结合, 供用于治疗或预防 HCV 感染或供用于诊断或监测 HCV 感染或监测抗-HCV 治疗方案或供用于筛选预防丙型肝炎病毒进入宿主细胞的结合剂。

[0030] 在一些实施方案中, 所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。在一些实施方案中, 所述多肽还包含在 C581 和 C585 处突变或中断的半胱氨酸。在其他实施方案中, 所述多肽还包含 C652 或者 C652 和 C677 的突变或中断。在另一个示例性实施方案中, C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。在又一个实施方案中, C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0031] 在另一个实施方案中, 本发明提供了宿主细胞或宿主细胞培养物, 其包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽, 其中所述多肽经修饰而包含: (i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸; 并且, 其中, 相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽, 所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少

的多聚体。在一些实施方案中,所述修饰的多肽基本上保留 H53- 结合。

[0032] 在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581 和 C585 处突变或中断的半胱氨酸。在其他实施方案中,所述多肽还包含 C652 或者 C652 和 C677 的突变或中断。在另一个示例性实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。在又一个实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0033] 在另一个方面,本发明提供了一种在个体 (subject) 中产生抗体的方法,所述方法包括在一段时间内、在适于引起抗体反应的条件下,将权利要求 1-11 任一项所述的组合物给予所述个体,其中所述组合物包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽,其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;并且,其中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中,所述修饰的多肽基本上保留 H53- 结合。

[0034] 在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581 和 C585 处突变或中断的半胱氨酸。在其他实施方案中,所述多肽还包含 C652 或者 C652 和 C677 的突变或中断。在另一个示例性实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。在又一个实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0035] 在另一个方面,本发明提供了一种在个体或患者中引起免疫反应的方法,所述方法包括将包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽的组合物给予所述个体,其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;并且,其中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中,所述修饰的多肽在适于引起免疫反应的条件下将 H53- 结合基本上保留一段时间。

[0036] 在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581 和 C585 处突变或中断的半胱氨酸。在其他实施方案中,所述多肽还包含 C652 或者 C652 和 C677 的突变或中断。在另一个示例性实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。在又一个实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0037] 在另一个方面,本发明提供了一种包含组合物的诊断试剂盒或固体基质,所述组合物包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽,其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 中的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;并且,其中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中,所述修饰的多肽基本上保留 H53- 结合。

[0038] 在其他实施方案中,所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581 和 C585 处

突变或中断的半胱氨酸。在其他实施方案中,所述多肽还包含 C652 或者 C652 和 C677 的突变或中断。在另一个示例性实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。在又一个实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0039] 在另一个方面,本发明提供了一种制备组合物的方法,所述组合物包含至少 40%、或至少 45%、或至少 50%、或至少 55%、或至少 60%、或至少 65%、或至少 70% 单体 HCV E2 多肽,所述方法包括在宿主细胞中表达多肽并分离表达产物,其中所述多肽为包括受体结合变体在内的 HCV E2 多肽,且其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸。

[0040] 在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。

[0041] 在其他实施方案中,所述多肽还包含在 C581 和 C585 处突变或中断的半胱氨酸,C581 和 C585 发生了突变或中断。

[0042] 在其他实施方案中,C652 或者 C652 和 C677 发生了突变或中断。

[0043] 在一些实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。

[0044] 在一些实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0045] 在本发明的另一个方面,本发明提供了一种组合物,其包含包括受体结合变体在内的 HCV E2 多肽,其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自二硫键 2、3、5 和 7 中的 2、3 或 4 个二硫键处突变或中断的 1 个半胱氨酸;并且,其中,相对于未修饰的半胱氨酸的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。

[0046] 在一些实施方案中,所述多肽还包含在选自二硫键 6 和 9 中的 1 或 2 个二硫键处突变或中断的 1 或 2 个半胱氨酸。

[0047] 根据这个方面,在一些实施方案中,在选自二硫键 2、3、5 和 7 中的 2、3 或 4 个二硫键处突变或中断的半胱氨酸选自:在 C459 处留下游离巯基的 C452,在 C494 处留下游离巯基的 C486,在 C564 处留下游离巯基的 C569 和在 C620 处留下游离巯基的 C597。

[0048] 以上概述不能也不应以任何形式看做是本发明所有实施方式的详尽描述。

[0049] 根据这个方面,在一些实施方案中,在选自二硫键 2、3、5 和 7 中的 2、3 或 4 个二硫键处突变或中断的半胱氨酸选自:C452、C486、C569 和 C597。

附图说明

[0050] 图 1A-B 为说明 HCV 包膜糖蛋白 E2 内保守半胱氨酸位置的图示。A. E1E2 多蛋白和截短的 E2 蛋白(E2₆₆₁)的示意图。E1 序列(多蛋白残基 191-383)以浅灰色表示,而 E2(384-746)以深灰色表示。绿色方框突出显示保守 CD81-结合基序的位置,而红色方框表示在 E2 内部的 3 个离散的可变序列的位置:从 N 末端至 C 末端分别为 HVR1、HVR2 和 igVR。柱形表示保守的膜近侧 7 肽重复区或预测的“茎”区。E2₆₆₁ 在多蛋白残基 661 处被截短,并具有 C-末端 6 组氨酸标签。B. 所示为作为 II 类融合蛋白模型的 E2 糖蛋白内的二硫键模式示意图(Krey 等人,2010(同上))。标示了 I、II 和 III 结构域的位置,并以柱形表示预测的“茎”区的位置。还标示了 HVR1、HVR2 和 igVR 序列,结构域 II 内的预测的融合肽序列

(残基 502-520) 以黑色虚线突出显示。标示了保守的半胱氨酸残基 (C), 其对应的二硫键以桥接这些氨基酸的线表示。

[0051] 图 2A-C 说明糖蛋白 E2 中单独的半胱氨酸至丙氨酸突变对 HCVpp 的 E2 折叠和功能具有不同的影响。A. 由含有具有单独的半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2 糖蛋白的 E1E2- 假型 HIV-1 病毒 (HCVpp) 介导而进入 Huh7 细胞。测量 HCVpp 进入 Huh7 细胞作为相对荧光素酶活性单位 (RLU) 的函数。B. 通过含有单独的半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2 糖蛋白成熟和合并到 HCVpp 中。使用抗 -E2 构象依赖性 MAb H53 作为 E2 折叠、成熟和与 E1 的非共价异二聚化的指示, 进行放射性免疫沉淀的 HCVpp 的非还原 SDS-PAGE 分析。还显示了对照, 其用于均匀产生 HCVpp (p24) 以及在转染的细胞裂解物的蛋白质印迹中测定的 E1 和 E2 的细胞内表达和加工。显示了以 1/4 稀释的源自图 2C 的 HCVpp 的 CD81 结合百分数 (底部)。C. 含有具有单独的半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2 糖蛋白的 HCVpp 与 CD81 的大胞外环 (LEL) 的结合。通过 MAb H53 检测的含有单独的 Cys- 至 -Ala 突变的 HCVpp 与 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 的结合。E2CD81- 结合位点内的 L441M 突变表示对非特异性相互作用的对照。

[0052] 图 3A-B 说明在 HCVpp 内糖蛋白 E2 中提议的二硫键对的作用。A. 通过具有两两半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2 糖蛋白成熟和合并到 HCVpp 中。使用抗 -E2 构象依赖性 MAb H53 作为 E2 折叠、成熟和与 E1 的非共价异二聚化的指示, 进行放射免疫沉淀的 HCVpp 的非还原 SDS-PAGE 分析。还显示了对照, 其用于产生 HCVpp (p24) 以及在转染的细胞裂解物的蛋白质印迹中测定的 E1 和 E2 的细胞内表达和加工。B. 含有具有两两半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2 的 HCVpp 与 CD81 的大胞外环 (LEL) 的结合。通过 MAb H53 检测的含有两两 Cys- 至 -Ala 突变的 HCVpp 与 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 的结合。E2CD81- 结合位点内的 L441M 突变表示非特异性相互作用的对照。

[0053] 图 4A-B 说明糖蛋白 E2 中单独的半胱氨酸至丙氨酸突变对 E2₆₆₁-his 中的 E2 折叠和功能具有不同的影响。A. 含有单独的半胱氨酸至丙氨酸突变的 E2₆₆₁-his 蛋白的表达、分泌和折叠。对使用抗 -HIS (上部图块 (panel)) 或抗 -E2 构象依赖性 MAb H53 免疫沉淀的含有单独的半胱氨酸至丙氨酸突变的、放射性标记的、分泌的 E2₆₆₁-his 在非还原 (中部) 和还原 (第二底部) 条件下进行 SDS-PAGE 分析。显示了单体 (E2 单体)、二聚体 (E2 二聚体) 和较高分子量形式 (高分子 E2) 的 E2₆₆₁-his 在非还原条件下的迁移。显示了以 1/4 稀释的源自图 4B 的 E2₆₆₁-his 的 CD81 结合百分数 (底部)。B. 通过含有单独的半胱氨酸至丙氨酸突变的 E2₆₆₁-his 蛋白结合于 CD81-LEL。通过兔抗 -His 抗体检测的含有单独的 Cys- 至 -Ala 突变的分泌的 E2₆₆₁-his 与 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 的结合。E2CD81- 结合位点内的 L441M 突变表示非特异性相互作用的对照。还显示了通过凝集素捕获和抗 -HIS 检测的同样 E2₆₆₁-his 蛋白的内参对照 (右边图块)。

[0054] 图 5A-C 说明提议的二硫键在 E2₆₆₁-his 的折叠和功能中的作用。A. 具有两两半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2₆₆₁-his 蛋白的表达、分泌和折叠。对使用抗 -HIS (上部图块) 或抗 -E2 构象依赖性 MAb H53 免疫沉淀的含有提议的二硫键对的半胱氨酸至丙氨酸突变的、放射性标记的、分泌的 E2₆₆₁-his 在非还原 (中部) 和还原 (底部) 条件下进行 SDS-PAGE 分析。显示了单体 (E2 单体)、二聚体 (E2 二聚体) 和较高分子量形式 (高分子 E2) 的 E2₆₆₁-his 在非还原条件下的迁移。B. 通过含有单独的半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2₆₆₁-his 蛋白结合于 CD81-LEL。通过兔抗 -His 抗体检测的含有提议的二硫键的两

两 Cys- 至 -Ala 突变的分泌的 E2₆₆₁-his 与 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 的结合。E2CD81- 结合位点内的 L441M 突变表示非特异性相互作用的对照。还显示了通过凝集素捕获和抗 -HIS 检测的同样 E2₆₆₁-his 蛋白的内参对照（右边图块）。C. 结构域 A 内的构象变化。对筛选的突变体，评估其通过对免疫原性结构域 A 具有特异性的构象敏感抗体得到检测的能力（Keck 等人，病毒学杂志 (J Virol) 78:9224-32, 2004)。使用标示的 MAb 对放射性标记的 E2₆₆₁-his 蛋白进行免疫沉淀并在非还原条件下检测。

[0055] 图 6A-B 说明保守的半胱氨酸残基在二硫键连接的寡聚体或截短的 E2 (E2₆₆₁-his) 聚集体的形成中的作用。A. 含有多个半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2₆₆₁-his 的分泌和折叠。对使用抗 -HIS (上部图块) 或抗 -E2 构象依赖性 MAb H53 免疫沉淀的含有多个半胱氨酸至丙氨酸突变的、放射性标记的、分泌的 E2₆₆₁-his 在非还原 (中间) 和还原 (底部) 条件下进行 SDS-PAGE 分析。显示了单体 (E2 单体)、二聚体 (E2 二聚体) 和较高分子量形式 (高分子 E2) 的 E2₆₆₁-his 在非还原条件下的迁移。所述“M”构建体表示在 C452、C486、C569、C581、C585 和 C652 位置处的同时突变。B. 通过含有多个半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2₆₆₁-his 蛋白结合于 CD81-LEL。通过兔抗 -His 抗体检测的含有多个 Cys- 至 -Ala 突变的分泌的 E2₆₆₁-his 与 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 的结合。E2CD81- 结合位点内的 L441M 突变表示非特异性相互作用的对照。还显示了通过凝集素捕获和抗 -HIS 检测的同样 E2₆₆₁-his 蛋白的内参对照 (右边图块)。

[0056] 图 7A-C 说明在截短的 E2 (E2₆₆₁-his) 中诱变替代性二硫键对。A. 含有替代性的两两半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2₆₆₁-his 蛋白的表达、分泌和折叠。对 E2₆₆₁-his 中的必需半胱氨酸进行两两半胱氨酸至丙氨酸突变。对使用抗 -HIS (上部图块) 或抗 -E2 构象依赖性 MAbH53 免疫沉淀的放射性标记的、分泌的 E2₆₆₁-his 在非还原 (中间) 和还原 (底部) 条件下进行 SDS-PAGE 分析。还显示了单体 (E2 单体)、二聚体 (E2 二聚体) 和较高分子量形式 (高分子 E2) 的 E2₆₆₁-his 在非还原条件下的预期迁移。B. 通过含有两两半胱氨酸至丙氨酸取代突变的 E2₆₆₁-his 蛋白结合至 CD81-LEL。通过兔抗 -His 抗体检测的含有替代性的两两 Cys- 至 -Ala 突变的分泌的 E2₆₆₁-his 与 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 的结合。E2CD81- 结合位点内的 L441M 突变表示非特异性相互作用的对照。还显示了通过凝集素捕获和抗 -HIS 检测的同样 E2₆₆₁-his 蛋白的内参对照 (右边图块)。C. 结构域 A 内的构象变化。对筛选的突变体，评估其通过对免疫原性结构域 A 具有特异性的构象敏感抗体得到检测的能力 (Keck 等人, 2004 (同上))。使用标示的 MAb 对放射性标记的 E2₆₆₁-his 蛋白进行免疫沉淀并在非还原条件下检测。

[0057] 图 8A-B 说明含有最少数量半胱氨酸残基的 E2₆₆₁-his 形成单体、二聚体和较高分子量形式的 E2 的倾向性。A. 含有 C652A 或 'M+C597A' 突变的 E2₆₆₁-his 所形成的二硫键连接的多聚体的比较。如同通过放射性同位素成像 (上部图块) 所检测的，凝集素亲和性纯化的放射性标记 E2₆₆₁-his 的蓝色非变性 PAGE 分析表示 C652A、'M+C597A' 或 WT 蛋白。还包括通过放射性同位素成像检测的纯化蛋白的还原性 SDS-PAGE 分析作为内参对照 (底部图块)。显示了单体、二聚体、三聚体和较高分子量形式的 E2₆₆₁-his 的预期迁移。B. 通过非变性 -PAGE 检测显示的不同 E2₆₆₁-his 寡聚体的定量分析。使用 ImageQuant 软件定量分析单体、二聚体、三聚体和较高分子量形式的 E2₆₆₁-his 分子量的对应条带，并计算每个种类的百分比。显示的数据为 2 个独立实验的平均值。

[0058] 图 9 是说明观察的 E1E2 和 E2₆₆₁ 中的 (A) 单独的半胱氨酸突变和 (B) 二硫键的基因型层级的图示。数据源自图 2 和图 4(A) 以及图 3 和图 5(B)。

[0059] 图 10 以照片表示,凝胶分离显示在野生型 E2₆₆₁ 和 Δ 123E2₆₆₁ 中 C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A (M+C597A) 同时突变导致构象依赖性单克隆抗体 H53 所识别的分泌形式的 E2 表达。用 ³⁵S-Met/Cys 对转染的 293T 细胞进行生物合成标记过夜。然后收集组织培养流体并用 MAb H53 和蛋白 G 琼脂糖进行免疫沉淀。于非还原条件下、在 10%SDS-PAGE 上运行样品,并磷屏成像。左边显示分子量标记,右边显示 WT E2₆₆₁ 和 Δ 123E2₆₆₁ 的位置。

[0060] 图 11A-D 是数据图示,所述数据显示 WT E2₆₆₁ (M+C597A) 和 Δ 123E2₆₆₁ (M+C597A) 蛋白被中和单克隆抗体和构象依赖性抗体 H53 识别的能力。先用 GNA 凝集素然后是 E2₆₆₁ 以 100ng/孔涂覆酶免疫测定板。对整个板上的抗体进行连续稀释,使用兔抗小鼠辣根过氧化物酶缀合的抗体检测结合的免疫球蛋白。于 450nm 处测量吸光度,并减去 620nm 处的背景。

[0061] 图 12A-B 是数据图示,所述数据显示 WT E2₆₆₁ (M+C597A) 和 Δ 123E2₆₆₁ (M+C597A) 蛋白被针对 WT E2₆₆₁ 和 Δ 123E2₆₆₁ 而产生的免疫血清识别的能力。先用 GNA 凝集素然后是 E2₆₆₁ 以 100ng/孔涂覆酶免疫测定板。对整个板上的抗体进行连续稀释,并使用抗豚鼠辣根过氧化物酶缀合的抗体检测结合的免疫球蛋白。于 450nm 处测量吸光度,并减去 620nm 处的背景。用 WT E2₆₆₁ (A) 或 Δ 123E2₆₆₁ (B) 接种疫苗的豚鼠产生免疫血清。

[0062] 图 13 是数据图示,所述数据显示 WT E2₆₆₁ (M+C597A) 和 Δ 123E2₆₆₁ (M+C597A) 蛋白结合 CD81 的能力。用在平板上连续稀释的 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 和 E2 蛋白涂覆免疫测定板。用兔抗-His 免疫球蛋白和山羊抗兔辣根过氧化物酶缀合的抗体检测结合的 E2。于 450nm 处测量吸光度,并减去 620nm 处的背景。包括了在 E2 结合区中含有突变 F186S 的对照 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 蛋白,以便使用 WT E2₆₆₁ 蛋白(空方框)显示测定的背景。

[0063] 图 14A-B 是数据图示,所述数据显示 (A) WT E2₆₆₁ (M+C597A) 和 (B) Δ 123E2₆₆₁ (M+C597A) 蛋白的凝胶过滤层析。在 S 缓冲液中平衡 Superdex200 柱。将蛋白($\sim$ 300 μ g)加载到柱上,并以 0.5ml/min 运行。分析约 300 μ g 亲本非突变形式的 WT E2₆₆₁ 和 Δ 123E2₆₆₁,用于比较。

[0064] 表格的简要说明

[0065] 表 1 提供了 HCV 糖蛋白 E2 中半胱氨酸至丙氨酸突变的位置。根据源自基因型 1a H77c 分离物的 HCV 多蛋白的氨基酸编号,列出了 E2 中保守半胱氨酸的位置。显示了线性序列中编号 1-18 的每个半胱氨酸的相对位置(1-18,N 至 C 末端),且根据 Krey 等人,2010(同上)显示了结构域的分配。

[0066] 表 2 提供了 HCV 糖蛋白 E2 中 18 个 Cys 残基的二硫键配对。如 Krey 等人,2010(同上)所确定的二硫键对,以及其结构域分配。

[0067] 表 3 提供了合适的天然存在的蛋白(proteogenic)氨基酸的列表。

[0068] 表 4 提供了氨基酸次分类。

[0069] 表 5 提供了示例性氨基酸取代。

具体实施方式

[0070] 本发明不限于特定的制剂筛选方法、具体制剂剂型和各种医疗方法,因其可以变

化。本文所用术语仅用于描述具体的实施方案而非旨在限制本发明。

[0071] 除非另有定义,本文所用技术和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。任何与本文所描述的相似或等同的材料和方法均可用于实施或测试本发明。从业者具体涉及 Ream 等人编著,分子生物学技术:精编实验教程 (Molecular Biology Techniques:An Intensive Laboratory Course), 学术出版社,1998;Newton 和 raham 编著,PCR 生物技术系列介绍 (PCR,Introduction to Biotechniques Series) 第二版, Springer Verlag 出版社,1997;Sambrook 等人,分子克隆:实验指南 (Molecular Cloning:A Laboratory Manual),冷泉港实验室,冷泉港出版社,纽约,1989;Coligan 等人,蛋白质科学实验指南 (Current Protocols in Protein Science),John Wiley&Sons 出版公司,1995-1997,具体为第 1、5 和 6 章;Ausubel 等人,细胞免疫学 (Cell Immunol.),193(1):99-107,1999;Colowick 和 Kaplan 编著,酶学方法 (Methods In Enzymology), 学术出版社;Weir 和 Blackwell 编著,实验免疫学手册 (Handbook of Experimental Immunology),第 I-IV 卷,布莱克威尔 (Blackwell) 科学出版社,1986;Joklik 编著,病毒学 (Virology) 第三版,1988;Fields 和 Knipe 编著,基础病毒学 (Fundamental Virology) 第二版,1991;Fields 等人编著,病毒学 (Virology) 第三版, Lippincott-Raven 出版公司,宾夕法尼亚州费城,1996。

[0072] 术语“HCV E2 多肽”、“E2 多肽”或“HCV E2”等包括源自任何 HCV 基因型的 E2 多肽。如本领域所知,缺乏跨膜结构域的重塑 E2 胞外域是在 E1 存在下折叠后分泌的。该术语还包括变体,其包含全长 E2 多肽的部分,例如,介导受体结合、通过一个或多个识别构象或其他表位和 / 或介导 E1E2 二聚体形成的抗体的抗体结合。一个示例性 HCV E2 多肽为包含基因型 H771a (E2₆₆₁ 或 E2e) 的氨基酸 384-661 或另一 HCV 基因型的相应部分的 E2 多肽受体结合部分。因此,所得的 E2 多肽包括缺乏跨膜结构域的 CD81- 结合所需的所有或部分所述胞外域。其他变体可包括裂解或分泌所需序列的添加或缺失 / 中断。例如,可包括、缺失或修饰 E³⁸⁴TH,以改变信号肽裂解和糖蛋白分泌 (McCaffrey 等人,2007(同上))。本文进一步描述了包括一系列突变的突变体。

[0073] 在另一个实施方案中,题述修饰的多肽的 C- 末端边界包括氨基酸 661 至氨基酸 771,包括氨基酸 661、662、663、664、665、666、667、668、669、670、671、672、673、674、675、676、677、678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699、700、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、714、715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、733、734、735、736、737、738、739、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、769、770 和 771 在内。

[0074] HCV 的包膜糖蛋白作为二硫键连接的多聚体可能存在于感染性病毒粒子的表面。其证据可见于 Fraser 等人,生物化学杂志 (J Biol Chem)2011 刊登,Vieyres 等人,病毒学杂志 (J Virol)84(19):10159-10168,2010;Vieyres 等人,病毒学杂志 (J Virol)1810-10,2011。然而,E2 也可能作为单体存在的证据见于 Krey 等人,PLoS Pathog6(2):e1000762,2010,以及在 Chiron 的最初工作中。在一些实施方案中,有人认为,E1E2 在附着至受体之前作为二硫键连接的多聚体存在。一旦病毒附着至细胞即发生构象变

化,其导致巯基异构化的发生,其中不稳定的二硫键减少,从而使得蛋白折叠为低能量的构象。该构象可为 E2 单体,并有利于融合蛋白插入和促使膜融合的进一步构象变化。因此, E2 单体可代表病毒进入级联的折叠中间体,并代表免疫和抗体产生的重要抗原。

[0075] 因此,在一些实施方案中,在包括 M+C597A 在内的题述修饰的 HCV E2 多肽中发现的 E2 的同质或单体形式越多,就越代表折叠中间体并产生在病毒进入级联的晚期阻止进入的抗体。

[0076] HCV E2 多肽的“部分 (part)”或“部分 (portion)”或“区 (region)”或“结构域 (domain)”的最小大小为至少约 100 个氨基酸或约 100-200 个氨基酸或约 120-350 个氨基酸。该定义包括 100-350 个氨基酸范围内的所有大小,包括 100、200、300 和 332 个氨基酸在内。

[0077] 预期的 HCV E2 多肽部分包括含有一个或多个天然形式的保守半胱氨酸的 E2 多肽的区。在一些实施方案中,所述部分为包含中和抗体或在一些实施方案中非中和抗体所识别的构象表位的免疫原性结构域。有各种确定合适部分的方法。

[0078] 在一些具体实施方案中,包括部分在内的变体保留至少一种所需的亲本 E2 多肽功能,例如但不限于受体结合或通过 MA53 结合。另外,所选的变体保留了形成量较大的单体的能力。如本文所确定,在一些实施方案中,变体包括含有二硫键 1、4 和 8 的 HCV E2 部分或至少氨基酸 429-644,其对 CD81- 结合位点非常重要。

[0079] 在其他实施方案中,变体包括不具备一种或多种亲本多肽的功能属性的多肽或肽。

[0080] 根据本发明,本发明人已确定,失去多个二硫键和 / 或产生游离的半胱氨酸残基不中断 E2₆₆₁ 的整体折叠和功能。本发明人已确定,C581/C585 和 C652/C677 对介导 E1 结合和病毒进入非常重要,但对于 E2 的整体折叠或功能性 CD81 结合位点的组装并不重要。

[0081] 如实施例所述,本发明人已确定了可突变而不失去表型的保守半胱氨酸的数目和位置,所述表型如分泌、异二聚化、受体结合或通过构象依赖性抗体结合;另外,单个或两个或多个半胱氨酸中断如何调节这些功能中的一种或多种。如本文所描述,现在可产生保留构象表位而无受体结合的多肽,或者其中保留了这两种功能。这一点令人惊奇,因为推测二硫键可稳定 E2 蛋白的三维结构和功能属性,尤其是受体结合和通过识别构象表位的抗体的结合。虽然每个保守半胱氨酸被确定为对于病毒进入非常重要,但发现 E2 多肽的 CD81 和 H53 结合能力对于不成对半胱氨酸残基的存在或二硫键的缺乏具有明显的耐受性。在示例性实施方案中,如通过定量非变性 -PAGE 和凝胶过滤所确定的,7 个半胱氨酸同时突变大大增加了单体产生和减少了二聚体、三聚体和高分子量多聚体的产生。

[0082] E2 多肽中保守半胱氨酸及其突变或中断的编号和命名遵循表 1 的陈述。具体地,通过 HCV 多肽序列中氨基酸残基的位置来描述它们。例如,突变“C429A”是指 HCV E2 中氨基酸 429 处的半胱氨酸至丙氨酸取代。在基因型或变体之间或根据序号在哪里开始,所述氨基酸残基位置和编号可以变化。保守半胱氨酸、“半胱氨酸”还通过从所述 HCV E2 多肽的 N- 末端至 C- 末端的相对半胱氨酸编号位置来描述,即全长 HCV E2 中的 1-18 ;E₆₆₁ 中的 1-17。

[0083] 在整个说明书中,包括权利要求书中,HCV 包膜糖蛋白 E1 和 E2 的多肽残基的所有编号,均基于原型 HCV-H77 多蛋白序列,即 Genbank 登录号 No. AF009606。糖蛋白 E1 的成熟

形式包含于多蛋白残基 191 和 383 中,糖蛋白 E2 的成熟形式包含于多蛋白残基 384 和 746 中。

[0084] 另外,本文参照图 1 所示的折叠 HCV E2 多肽中二硫键的位置来描述所述半胱氨酸。考虑到所述多肽的其他折叠排列,在该折叠分子中,每个二硫键中的每个半胱氨酸的相对半胱氨酸编号可相应地变化。

[0085] 二硫键的编号和命名如表 2 所述,表 2 还列出了其结构域的分配。表 1 和表 2 以及图 1 和图 9 还显示了将不同的二硫键分配到 HCV E2 的结构域 I、II 或 III。

[0086] 在本文的研究中所用半胱氨酸/二硫键符号概括于图 1 中。

[0087] 在一个宽泛的实施方案中,本发明提供了多个修饰的 HCV E2 多肽,其被修饰从而 (i) 每个多肽中一个或两个或多个或所有保守半胱氨酸发生突变或中断,或 (ii) 每个多肽中一个或两个或多个或所有二硫键在一个或两个半胱氨酸处发生突变或中断。

[0088] 在一个实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽,其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;并且,其中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中,所述修饰的多肽基本上保留 CD81- 或 H53- 结合。

[0089] 在其他实施方案中,所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。

[0090] 在一些实施方案中,所述多肽还包含 C581 和 C585 的突变或中断。

[0091] 在其他实施方案中,所述多肽还包含 C652 或者 C652 和 C677 的突变或中断。

[0092] 在另一个示例性实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。

[0093] 在又一个实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0094] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽,其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;并且,其中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中,所述修饰的多肽基本上保留 H53- 结合。

[0095] 如本文所用,词语“基本上很少的多聚体”或“基本上较少的多聚体”是指形成小于 70% 的多聚体,或小于 65%、或小于 60%、或小于 55%、或小于 50%、或小于 45%、或小于 40% 的多聚体(以重量计)的多肽。

[0096] 在一些实施方案中,该词语是指小于 15% 或小于 10% 二聚体。

[0097] 在一些实施方案中,该词语是指小于 15% 或小于 10% 三聚体。

[0098] 在一些实施方案中,该词语是指小于 40% 高分子量聚集体。

[0099] 如本文所用,词语“基本上保留 CD81- 结合”是指,通过无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽或相对于不具有 1 个或多个修饰的半胱氨酸的对照多肽,多肽具有大于 50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的 CD81- 结合水平。

[0100] 如本文所用,词语“基本上保留 H53- 结合”是指,通过无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽或相对于不具有 1 个或多个修饰的半胱氨酸的对照多肽,多肽具有大于 50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的 H53- 结合水平。

[0101] 在另一个方面,本发明提供了一种组合物,其包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽,其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;其中所述多肽折叠为至少 40%、或至少 45%、或至少 50%、或至少 55%、或至少 60%、或至少 65%、或至少 70% 的单体。

[0102] 在一些实施方案中,相对于所述无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键折叠为小于 70% 的多聚体,或小于 65%、或小于 60%、或小于 55%、或小于 50%、或小于 45%、或小于 40% 的多聚体。

[0103] 在一些实施方案中,所述 HCV E2 多肽为 E2661 或其受体结合部分。

[0104] 在一些实施方案中,所述修饰的 HCV E2 多肽还包含 1 个或多个可变区的缺失。

[0105] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽,其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;并且,其中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中,所示修饰的多肽基本上保留 H53- 结合,其中所述 HCV E2 多肽包含在选自 HVR2、HVR1 和 IgVR 的 1、2 或 3 可变区中的缺失。

[0106] 术语“多肽”、“蛋白”、“肽”以及“糖蛋白”可互换使用,且意指氨基酸的聚合物而限于任何特定的长度。该术语不排除修饰如十四烷基化、糖基化、磷酸化和信号序列的添加或缺失。

[0107] E2 多肽或包含其的蛋白或蛋白复合体,可通过本领域已知的这些方法的重组或合成或组合来制备。

[0108] 如本文所用,“合成”序列包括其表达如本文所述已经得到优化的核苷酸,例如,通过密码子取代、缺失、代替和 / 或抑制序列的失活。如本文所用,“野生型”或“天然的”或“天然存在的”序列是指主要为在自然界中或半胱氨酸修饰之前发现的多肽编码序列。如本领域所知,可以对题述多核苷酸序列进行密码子优化。

[0109] 重组产物可通过在真核或原核细胞中表达而产生。真核细胞包括本领域已知的哺乳动物、植物、酵母和昆虫细胞。

[0110] 半胱氨酸可通过化学方法如碘化或烷基化阻断而被中断。在一些实施方案中,阻断可为可逆的或不可逆的。可逆阻断可以通过化学法或酶法来实现。中断或去除中断可使用本领域已知的化学交联剂来实现。

[0111] 半胱氨酸的突变或中断包括,对编码 HCV E2 多肽的核酸进行修饰从而编码不具备形成二硫键能力的氨基酸。通常,通过本领域已知的定点诱变方案实现突变,其描述于 Sambrook 等人,1989(同上),第 13 章。该术语还包括通过阻止二硫键形成的化学法或酶法原位修饰半胱氨酸。

[0112] 通常,半胱氨酸可以以分子内或分子间二硫键连接(称为“氧化的 E2”),或可通过例如磺化(称为“磺化的 E2”)或烷基化(称为“烷基化的 E2”)发生中断。或者,所述半胱氨酸携带游离硫醇基(称为“还原的 E2”)。

[0113] 二硫键是在两个半胱氨酸的巯基之间形成的共价键。一个半胱氨酸可与另一个半胱氨酸以分子内(在单个 E2 分子内)或分子间(在两个或更多个 E2 分子之间)二硫键(称为“氧化的 E2”)连接,或可通过例如还原(还原的 E2)、磺化(称为“磺化的 E2”)或烷基化(称为“烷基化的 E2”)发生中断。或者,所述半胱氨酸是不配对的,且未以分子间或分子内二硫键连接,并携带游离硫醇基(称为“非配对的半胱氨酸”或“游离硫醇基”或“还原的半胱氨酸”。在一些实施方案中,其中所述 HCV E2 多肽是 E2 的截断的胞外域,如果因为截断而缺失半胱氨酸,这被看作中断的半胱氨酸。

[0114] “不可逆中断的半胱氨酸”是指其中所述半胱氨酸硫醇基受到不可逆地保护的半胱氨酸。特别是,通过化学方法“不可逆保护”或“不可逆阻断”是指烷基化,优选使用烷化剂如活性卤素、乙烯亚胺或 N-(碘乙基)三氟-乙酰胺将蛋白中的半胱氨酸烷基化。半胱氨酸硫醇基的烷基化是指硫醇-氢的取代。可使用本领域熟知的任何方法进行烷基化,例如使用活性卤素 I、Br、Cl 或 F。活性卤素的实例为碘甲烷、碘乙酸、碘乙酰胺和 2-溴乙胺。

[0115] “可逆中断的半胱氨酸”是指其半胱氨酸硫醇基受到可逆地保护的半胱氨酸。特别是,如本文所用,所述术语“可逆保护”或“可逆阻断”是指修饰剂与半胱氨酸硫醇基的共价结合,以及控制所述蛋白的环境,从而保持所述半胱氨酸硫醇基的氧化还原状态(屏蔽)。可用化学法或酶法进行半胱氨酸硫醇基的可逆保护。

[0116] 如本文所用,术语“通过酶法可逆中断”是指通过酶,如酰基转移酶介导的可逆中断,例如,与催化巯基酯化有关的酰基转移酶,如棕榈酰酰基转移酶。

[0117] 如本文所用,术语“通过化学法可逆中断”是指通过下述而实现的可逆保护:(1) 修饰剂,所述修饰剂例如通过磺化和巯基酯化可逆地修饰半胱氨酸;(2) 修饰剂,所述修饰剂通过下述可逆地修饰本发明的半胱氨酸,例如重金属,尤其是 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、单硫-、二硫-和二硫键-化合物(例如,芳基-和烷基甲烷硫代磺酸酯、二巯基吡啶、二巯基吗啉、二氢硫辛酰胺、埃尔曼(Ellmann)试剂、aldrothiol™(奥德里奇(Aldrich)公司)、二硫代氨基甲酸酯),或硫醇化剂(例如,谷胱甘肽、N-乙酰半胱氨酸、半胱胺)。二硫代氨基甲酸酯包括许多种具有 $R_1R_2NC(S)SR_3$ 官能团的分子,该官能团赋予它们与巯基反应的能力。

[0118] 所用含巯基的化合物的优选浓度为 0.1-50mM,更优选浓度为 1-50mM,还更优选浓度为 10-50mM;(3) 通过保持巯基的状态(使其稳定)的修饰剂的存在,尤其是抗氧化剂,例如 DTT、二氢抗坏血酸、维生素及其衍生物、甘露醇、氨基酸、肽及其衍生物(例如,组氨酸、麦角硫因(ergothioneine)、肌肽、甲硫氨酸)、没食子酸盐、羟基苯甲醚、羟基苯甲、对苯二酚、羟甲基苯酚以及它们的衍生物,其浓度为 $10\mu M$ -10mM,优选浓度为 1-10mM;(4) 通过使巯基稳定的条件,例如(i)辅酶因子如金属离子(Zn^{2+} 、 Mg^{2+})、ATP,(ii)pH 控制(例如,对于蛋白质,大多数情况为 pH5,或 pH 优选为巯基 pK_a (2);例如对于以反相色谱法纯化的肽,大约 pH2)。也可使用(1)、(2)、(3)和(4)中所描述的可逆保护的组合。

[0119] 通过化学法或酶法可以去除半胱氨酸残基的可逆保护状态,例如,通过还原剂,特别是 DTT、DTE、2-巯基丙醇、连二亚硫酸盐、 $SnCl_2$ 、硼氢化钠、羟胺、TCEP,特别是其浓度为 1-200mM,优选浓度为 50-200mM;通过例如增加 pH 去除使巯基稳定的条件或试剂;酶,尤其

是硫酯酶、谷氧还蛋白、硫氧还蛋白,特别是其浓度为 0.01-5 μ M,优选浓度为 0.1-5 μ M;或者上述化学法和 / 或酶法条件的组合。

[0120] “源自”是指天然存在的形式和天然存在形式的功能性变体,因此其包括直接或间接源自生物体的序列。例如,病毒多肽源自特定多肽和 HCV(病毒多肽),如果其 (i) 由该病毒的多核苷酸的开放阅读框(病毒多核苷酸)编码,或者 (ii) 如本发明所述,显示了与该病毒的多肽的序列相似性。异源多肽不是源自同样的病毒。异源分子或试剂可源自任何来源,不一定源自生物体。

[0121] 在一些实施方案中,提供了修饰的 HCV E2 多肽,其主要以单体进行折叠或者以比没有题述半胱氨酸修饰的对照更高水平的单体和 / 或以与对照相比多聚体水平降低进行折叠。在一些实施方案中认为,具有两个或更多保守半胱氨酸 1-16 突变或中断的本发明所述修饰的 HCV E2 多肽,形成分子间二硫键的倾向降低,同时保留了构象能力,如 E2 的整体折叠和 / 或受体结合能力。因此,在一些实施方案中,本发明提供甚至包含多个中断的保守半胱氨酸的 HCV E2 多肽,在各种实施方案中所述多肽能够折叠并形成具有受体结合或保持天然构象能力的功能性多肽,以及还包含与没有所述半胱氨酸修饰的对照相比水平降低的异常二硫键。

[0122] 在另一个宽泛的实施方案中,本发明提供了修饰的 HCV E2 多肽,经修饰后,使得至少一个或多个保守半胱氨酸发生了突变或中断,且其中所述多肽比不包含所述修饰的半胱氨酸的对照 HCV E2 多肽形成基本上更多的单体。

[0123] 在一些实施方案中,所述修饰的多肽形成至少 40%、至少 50% 或至少 60% 的单体。对样品中单体或多聚体的比例进行测定或定量的方法为本领域所熟知。

[0124] 在一些实施方案中,所述修饰的多肽形成至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65% 或至少 70% 的单体。

[0125] 在另一个实施方案中,本发明提供了修饰的 HCV E2 多肽,经修饰后使得至少一个或多个保守的半胱氨酸残基发生了突变或中断,且其中所述多肽比不包含所述修饰的半胱氨酸的对照 HCV E2 多肽形成基本上更少的多聚体。

[0126] 在一些实施方案中,所述修饰的多肽形成小于 70% 的多聚体,或小于 60%、或小于 50%、或小于 40% 的多聚体。

[0127] 在一些实施方案中,所述修饰的多肽形成小于 70% 的多聚体,或小于 65%、或小于 60%、或小于 55%、或小于 50%、或小于 45%、或小于 40% 的多聚体。

[0128] 提及的“多聚体”包括二聚体、三聚体、四聚体、二聚体-二聚体、二聚体-三聚体和其他寡聚体,以及高分子量聚集体。通常,二硫键键合的多聚体在还原条件下解离。

[0129] 在一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述修饰的 HCV E2 多肽的蛋白质分子。在示例性实施方案中,所述蛋白为包含 E1 和 E2 多肽的共价复合体或为至少包含 HCV 的 E1 和 E2 的多蛋白。在一些实施方案中,所述分子包括异源蛋白或分子(试剂)。

[0130] 在一些实施方案中,本发明提供了包含本文所述修饰的 HCV E2 多肽的蛋白质分子。在示例性实施方案中,所述蛋白为包含 E1 和 E2 多肽的复合体或为至少包含 HCV 的 E1 和 E2 的多蛋白。在一些实施方案中,所述分子包括异源蛋白或分子。

[0131] 在一些实施方案中,本发明提供了修饰的 HCV 多肽,经修饰后使得一个或多个下述保守半胱氨酸发生了突变或中断:C581、C585、C652、C677、C494、C486、C459、C452、C564、

C597、C569 和 C620。

[0132] 在一些实施方案中，C581 和 / 或 C585 发生了突变或中断。

[0133] 在一些实施方案中，C652 和 / 或 C677 发生了突变或中断。

[0134] 在一些实施方案中，C486、C452、C564 和 C597 发生了突变或中断。

[0135] 在一些实施方案中，C486、C452、C569 和 C652 发生了突变或中断。

[0136] 在一些实施方案中，C581、C585、C486、C452、C569 和 C652 发生了突变或中断。

[0137] 在一些实施方案中，C581、C585、C486、C452、C569 和 C597 发生了突变或中断。

[0138] 在一些实施方案中，C581、C585、C486、C452、C569、C597 和 C652 发生了突变或中断。

[0139] 在一些实施方案中，如图 1B 所示，两个半胱氨酸残基在结构域 III 内一个二硫键处发生了突变或中断。在一些实施方案中，C581 和 C585 发生了突变和 / 或 C652 和 C677 发生了突变或中断。在一些实施方案中，C607 和 C644 没有发生突变或中断。

[0140] 在一些实施方案中，在选自二硫键 1-9 的两个或更多二硫键处一个或两个半胱氨酸发生了突变或中断。

[0141] 在一些示例性实施方案中，二硫键 2 和 3 处的半胱氨酸发生了突变或中断。在一个示例性实施方案中，C452 和 C486 发生了突变。

[0142] 在一些示例性实施方案中，二硫键 2 和 5 处的半胱氨酸发生了突变或中断。在一个示例性实施方案中，C452 和 C569 发生了突变。

[0143] 在一些示例性实施方案中，二硫键 3 和 5 处的半胱氨酸发生了突变或中断。在一个示例性实施方案中，C486 和 C569 发生了突变。

[0144] 在一些示例性实施方案中，二硫键 2 和 7 处的半胱氨酸发生了突变或中断。在一个示例性实施方案中，C452 和 C597 发生了突变。

[0145] 在一些示例性实施方案中，二硫键 3 和 7 处的半胱氨酸发生了突变或中断。在一个示例性实施方案中，C486 和 C597 发生了突变。

[0146] 在一些示例性实施方案中，二硫键 5 和 7 处的半胱氨酸发生了突变或中断。在一个示例性实施方案中，C569 和 C597 发生了突变。

[0147] 在一些实施方案中，二硫键 2、3、5 和 6 中的两个或多个位点处的半胱氨酸发生了突变或中断。在进一步的实施方案中，二硫键 2、3、5、6 和 7 中的两个或多个位点处的半胱氨酸发生了突变或中断。在又一个实施方案中，二硫键 2、3、5、6、7 和 9 中的两个或多个位点处的半胱氨酸发生了突变或中断。在一个示例性实施方案中，残基 C452、C486、C569、C581、C585、C652 和 C597 或其任意组合发生了突变。

[0148] 在一些实施方案中，在二硫键位置 1、2、4、8 中的一个或多个位点处的半胱氨酸残基未发生突变或中断。在一些实施方案中，在二硫键 2 处未发生突变的半胱氨酸为 C459。在一些实施方案中，在二硫键 8 处未发生突变的半胱氨酸为 C607。在一些实施方案中，包含二硫键位置 1、2、4、8 中一个或多个位点处的一个或两个半胱氨酸突变的修饰的 HCV E2 多肽，显示了一个或多个与受体如 CD81 的减少的结合，增加的二聚体或多聚体的比例，或识别构象表位的抗体的减少的识别。不同半胱氨酸突变对于本文确定的和基于本发明的 E2 多肽功能具有不同的影响，本领域技术人员能够选择保持构象能力如通过构象敏感性抗体（例如，H53）结合和 / 或受体结合（如 CD81 结合）的半胱氨酸 - 修饰的多肽，并形成比无特定

半胱氨酸修饰的对照明显更多的单体。

[0149] 在一些实施方案中,二硫键 1、4 和 8 未发生突变或中断。

[0150] 在一些实施方案中,修饰的 HCV E2 多肽还包含在一个或多个可变区 HVR2、HVR1 和 IgVR 中的缺失,如国际申请 No. W02008/022401 所述,其以引用方式全文并入于此。

[0151] 在一些实施方案中,所述 E2 多肽具有截短的受体结合结构域如 E2₆₆₁,从而在所述多肽 (C677) 或其变异形式的 C- 末端上缺少保守半胱氨酸。

[0152] 在一些实施方案中,所述修饰的多肽相对于未修饰的对照多肽基本上没有显示出减少的受体结合。在一些实施方案中,所述修饰的多肽相对于未修饰的对照 E2 多肽显示出增加的受体结合。在示例性实施方案中,受体结合为 CD81 结合,然而,本发明扩展至展示出一系列受体结合活性的修饰的多肽。

[0153] 在另一实施方案中,所述修饰的多肽相对于不具有一个或多个修饰的半胱氨酸的对照 HCV E2 多肽基本上没有显示出减少的通过构象抗体的结合如 H53 结合。

[0154] 在一些实施方案中,所述未修饰的 E2 多肽为全长 E2 (例如,氨基酸 384-746) 的截短的受体结合结构域 (例如,氨基酸 341-661),其在所述多肽 (C677) 或其修饰形式的 C- 末端缺少保守半胱氨酸,其中所述修饰不包含半胱氨酸的突变或中断。

[0155] 在一些实施方案中,所述修饰的 HCV E2 多肽包含一个或多个可检测或纯化的标签或标记物,以便于检测或纯化。

[0156] 本发明不限于特定的检测标记物,并扩展至使用检测试验中任何常用的报告分子如酶、荧光团和含放射性核素的分子以及化学发光分子的定性或定量检测。

[0157] “检测标记物”或“检测标签”是指由于其化学特性而提供使得能够检测 HCV 多肽的分析上可鉴别信号的分子或粒子。如大家所熟知,现有多种不同的报告物系统,并且使得能够快速进行视觉检测的那些系统在例如医疗点诊断环境中是最有用的。

[0158] 在一些实施方案中,所述检测标记物为视觉可检测的报告分子,如胶粒或微粒。胶体金属和类金属粒子包括包含金、银、铂、铁、铜、硒的粒子;金属络合物如三羰基环戊二烯基锰 (I)、金簇;以及微粒如乳胶和染色的乳胶粒子。所述可检测的修饰便利地选自:荧光分子、发色体、催化剂、酶、染料如红外吸收染料、荧光染料、化学发光或生物发光或发磷光的基团、镧系元素离子、放射性同位素或视觉标记如金或银纳米粒子。荧光分子尤其被大家接受,然而,这是一个快速变化的领域,本发明无论如何不限于使用任何特定检测修饰。在一些实施方案中,可辨别的化合物如荧光团、染料或粒子被用于促进组合分析。对于直接的视觉标记的情况,可使用胶体金属或非金属粒子、染色粒子、生物发光酶、酶或底物、有机聚合物、乳胶粒子、脂质体或其他含有产生信号的物质的囊泡等。尤其优选的这类标记包括大胶体,例如,金属胶体如源自金、硒、银、锡和三氧化钛的胶体。在利用酶作为直接的视觉标记的一个实施方案中,并入了生物素化的残基。

[0159] 合适的荧光染料包括但不限于,异硫氰酸荧光素 (FITC)、四甲基诺丹明异硫氰酸 (TRITC)、R- 藻红蛋白 (RPE) 和德克萨斯红。其他示例性荧光染料包括 Dower 等人 (国际公布 W093/06121) 讨论的那些。也可参考美国专利 No. 5, 573, 909 (Singer 等人)、No. 5, 326, 692 (Brinkley 等人) 中描述的荧光染料。或者,也可参考美国专利 Nos. 5, 227, 487、5, 274, 113、5, 405, 975、5, 433, 896、5, 442, 045、5, 451, 663、5, 453, 517、5, 459, 276、5, 516, 864、5, 648, 270 和 5, 723, 218 中描述的荧光染料。可从商业上

获得的荧光标记包括,例如,荧光素亚磷酰胺如 Fluoreprime(Pharmacia 公司)、Fluoredate(Millipore 公司)和 FAM(应用生物系统国际公司, Applied Biosystems International)、德克萨斯红、NBD、香豆素、丹磺酰氯和诺丹明。放射性报告分子包括,例如 ^{32}P ,其可用 X-射线或磷屏成像技术来检测。

[0160] 本发明扩展至使用任何本领域已知的检测试验常用的报告分子如酶、荧光团或含放射性核素的分子、化学发光分子和结合分子如结合对的定性或定量检测。在酶免疫测定的情况下,酶通常通过戊二醛或高碘酸盐与第二抗体缀合。常用的酶除此以外还包括,辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶。通常在通过相应的酶水解后选择与特定酶一起使用的底物,以产生可检测的颜色变化。合适的酶的实例包括碱性磷酸酶和过氧化物酶。还可使用产生荧光产物的荧光底物而非上述显色底物。在各种情况下,将酶标抗体加入至第一抗体抗原复合体使得其结合,并将过量试剂洗涤掉。再将含有合适底物的溶液加入至抗体-抗原抗体复合体中。该底物将与连接于第二抗体的酶反应,从而发出定性的视觉信号,通常可用分光光度法对所述信号进行进一步定量,以显示所述样品中存在的抗原的量。或者,将荧光化合物如荧光素和诺丹明化学偶联至抗体而不改变其结合能力。当以特定波长的光照明激活以后,所述荧光染料标记的抗体吸收光能,从而在分子中诱导出激发状态,然后发射出可用显微镜视觉检测的具有特征波长的光。术语“结合伴侣”或“结合对”是指彼此通过由其结构确定的可逆非共价或共价连接而结合或相互作用的互补分子。示例性蛋白结合伴侣包括抗体-抗原、酶-底物、生物素-链霉亲和素、生物素-抗生物素抗体、异羟基洋地黄毒苷-抗-异羟基洋地黄毒苷抗体甘露糖/麦芽糖/直连淀粉-甘露糖/麦芽糖/直链淀粉-结合蛋白和细胞因子/趋化因子受体相互作用。其他结合关系为本领域技术人员所熟知,例如,用谷胱甘肽、镍-螯合剂和亮氨酸拉链结构的结合对(c-Jun 和 vFos),以及包括在本文中的任何这样的结合关系。结合对可用于检测和/或纯化。亲和层析法通常使用结合对或配体底物相互作用以纯化目标多肽。

[0161] 在另一个方面,本发明提供了包含本发明的一种或多种修饰的 HCV E2 多肽的试剂盒。所述试剂盒预期用于诊断、预后、治疗或预防应用,以及用于设计和/或筛选 HCV E2 结合分子或 HCV 受体结合分子。

[0162] 因此,本发明提供了一种包含组合物的诊断试剂盒或固体基质,所述组合物包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒(HCV)包膜 2(E2)多肽,其中所述多肽经修饰而包含:(i)在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;并且,其中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中,所述多肽基本上保留 CD81- 或 H53- 结合。

[0163] 在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。

[0164] 在一些实施方案中,C581 和 C585 发生了突变或中断。

[0165] 在一些实施方案中,C652 或者 C652 和 C677 发生了突变或中断。

[0166] 在一些实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。

[0167] 在一些实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0168] 在一些实施方案中,所述 HCV E2 多肽为 E2661 或其受体结合部分或变体。在一些

实施方案中,所述 HCV E2 多肽包含在选自 HVR2、HVR1 和 IgVR 的 1、2 或 3 个可变区中的缺失。

[0169] 在另一个方面,本发明提供了编码一种或多种本发明公开的修饰的 HCV E2 多肽的核酸分子。在一些实施方案中,编码半胱氨酸的密码子 (TGC/T) 缺失或修饰为编码丙氨酸的密码子 (GCT/C) 或保守取代如编码丝氨酸的密码子 (AGT/C) 或甘氨酸 (GGT/C/A/G)、苏氨酸 (ACT/C/A/G)、酪氨酸 (TAT/C)、谷氨酰胺 (GAA/G) 或天冬酰胺 (AGA/G)。或者,可使用任何其他氨基酸或连接序列。

[0170] 在一些实施方案中,本发明提供了使用现有技术公认的方法和公布的核酸序列或其常规修饰的包含题述核酸分子的质粒、表达载体或其他构建体或人类或非人类细胞(宿主细胞)。

[0171] 因此,本发明提供了一种包含组合物的宿主细胞或宿主细胞培养物,所述组合物包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒(HCV)包膜 2(E2)多肽,其中所述多肽经修饰而包含:(i)在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;并且,其中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体。在一些实施方案中,所述多肽基本上保留 CD81- 或 H53- 结合。

[0172] 在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。

[0173] 在一些实施方案中,C581 和 C585 发生了突变或中断。在一些实施方案中,C652 或者 C652 和 C677 发生了突变或中断。在一些实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。在一些实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0174] 在一些实施方案中,所述多肽折叠为至少 40%、或至少 45%、或至少 50%、或至少 55%、或至少 60%、或至少 65%、或至少 70% 的单体。

[0175] 在一些实施方案中,相对于无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键折叠为小于 70% 的多聚体,或小于 65%、或小于 60%、或小于 55%、或小于 50%、或小于 45%、或小于 40% 的多聚体。

[0176] 在一些实施方案中,所述 HCV E2 多肽为 E2661 或其受体结合部分或变体。

[0177] 在一些实施方案中,所述 HCV E2 多肽包含在选自 HVR2、HVR1 和 IgVR 的 1、2 或 3 个可变区中的缺失。

[0178] 在另一个方面,本发明提供了筛选抗体或其抗原结合片段或其他结合剂的方法,其包括筛选结合一种或多种题述修饰的 HCV E2 多肽的抗体或制剂。在一些实施方案中,筛选方法包括选择不结合一种或多种其他题述 HCV E2 多肽的制剂。因而,本发明提供了能够用于探测 HCV- 宿主细胞相互作用的多种 HCV E2 多肽。

[0179] 抗体可为多克隆或单克隆抗体。此外,可使用相关领域技术人员熟知的标准选择抗体以用于诊断、预后、治疗、预防、筛选或研究目的。

[0180] 术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”包括多克隆和单克隆抗体以及源自单克隆抗体的所有各种形式,包括但不限于,全长抗体(例如,具有完整的 Fc 区)、抗原结合片段,包括例如, Fv、Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段;以及使用重组技术产生的源自抗体的多肽如单链抗体。如本文所用,术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”还指例

如,在转基因动物中产生的或通过噬菌体展示所产生的人类抗体,以及抗体、人类或人源化抗体、灵长类源化抗体或去免疫的抗体。其还包括治疗上可接受的其他形式的抗体及其抗原结合片段,例如,源自软骨类海洋动物或骆驼科 (Camelidae) 的单结构域抗体,或源自基于这些抗体的库。抗体的片段化或修饰形式的选择也可考虑所述片段化或修饰形式对该抗体或片段的半衰期的影响。

[0181] 在另一个方面,本发明提供了在个体或患者体内引起免疫反应的方法,所述方法包括将有效量的本发明所述修饰的 HCV E2 多肽给予所述个体。

[0182] 在另一个方面,本发明提供了本发明所述修饰的 HCV 多肽或包含其的复合体,用于治疗或预防个体的 HCV 感染。

[0183] 在另一个方面,本发明提供了本发明所述修饰的 HCV 多肽或包含其的复合体,用于在非人类动物个体中产生抗体或细胞免疫反应。

[0184] 还提供使用一种或多种题述 HCV E2 多肽的筛选方法。如本领域所知,涉及题述多肽的筛选方法旨在确定结合分子。结合分子如抗体或抗原结合片段、肽、拟肽类、有机或无机分子用本领域认可的方法进行常规筛选。

[0185] 在另一个实施方案中,本发明还提供了产生蛋白的方法,所述方法包括产生包含编码所述 HCV E2 多肽并能够指导所述多肽表达的序列的核酸构建体,以及将其导入表达载体并在合适的细胞使其进行表达。通过将宿主细胞培养足以使得在宿主细胞中表达该蛋白的时间,或优选足以将所述蛋白分泌至宿主细胞生长的培养基中的时间来制备蛋白。

[0186] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了一种制备组合物的方法,所述组合物包括至少 40%、或至少 45%、或至少 50%、或至少 55%、或至少 60%、或至少 65%、或至少 70% 单体 HCV E2 多肽,所述方法包括在宿主细胞表达多肽,并分离所述表达的产物,其中所述多肽为包括受体结合变体在内的 HCV E2 多肽,并且,其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸。

[0187] 在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。

[0188] 在一些实施方案中,C581 和 C585 发生了突变或中断。

[0189] 在一些实施方案中,C652 或者 C652 和 C677 发生了突变或中断。

[0190] 在一些实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。

[0191] 在一些实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0192] 在其他实施方案中,本发明提供了宿主细胞或细胞膜制剂、病毒样粒子或蛋白脂质体,各自包含或编码本发明的 HCV E2 多肽。本领域已描述制备蛋白脂质体的方法。

[0193] 在一些实施方案中,所述细胞为真核宿主细胞,优选酵母、鸟类、昆虫、植物或非人类哺乳动物细胞。在其他实施方案中,所述细胞为待治疗的个体的细胞。

[0194] “编码序列”或“编码”选定多肽的序列是当处在合适的调控序列(或“调控元件”)的控制下被体内转录(在 DNA 情况下)并翻译(在 mRNA 的情况下)为多肽的核酸分子。该编码序列的边界由 5' (氨基)末端的起始密码子和 3' (羧基)末端的翻译终止密码子确定。编码序列可包括但不限于,病毒 cDNA、原核或真核生物的 mRNA、病毒的基因组 DNA 序列或原核生物 DNA,以及合成 DNA 序列。转录终止序列可位于编码序列的 3'。

[0195] 典型的“控制元件”可用于提供表达,其包括但不限于,转录启动子、转录增强元件、转录终止信号、聚腺苷酸化序列(位于翻译终止密码子的3')、用于翻译起始优化的序列(位于编码序列的5')以及翻译终止序列。

[0196] “可操作连接”是指元件的排列,其中所描述的组分被配置为能实施其通常的功能。因而,当存在合适的酶时,可操作连接至编码序列的给定启动子能够实现所述编码序列的表达。只要启动子的功能是指导所述编码序列的表达,则所述启动子无需邻近该编码序列。

[0197] 术语“重组体”在本文可用于描述核酸分子并指基因组、cDNA、半合成或合成来源的多核苷酸,所述半合成或合成来源的多核苷酸根据其来源或操作:(1)不再与其天然上相关的多核苷酸的全部或部分有关联;和/或(2)与除了其天然上相关的多核苷酸以外的多核苷酸相连。针对蛋白或多肽所用的术语“重组体”是指由重组多核苷酸表达产生的多肽。

[0198] “重组体宿主细胞”、“宿主细胞”、“细胞”、“细胞系”、“细胞培养物”和其他这类表示作为单细胞实体培养的原核微生物或真核细胞系的术语可互换使用,是指能够或已经用作重组载体或其他转移DNA的接受者的细胞,并包括已被转染的原始细胞的子代。

[0199] 合适的哺乳动物细胞系包括但不限于,BHK、VERO、HT1080、293、293T、RD、COS-7、CHO、Jurkat、HUT、SUPT、C8166、MOLT4/克隆8、MT-2、MT-4、H9、PM1、CEM、骨髓瘤细胞(例如,SB20细胞)和CEMX174均可获得,例如自美国模式培养物集存库(ATCC)。

[0200] 所述合成DNA可通过以下方式重组表达:分子克隆至含有合适启动子和其他合适转录调控元件的表达载体,然后转移至原核或真核宿主细胞以产生重组蛋白。这类操作技术已充分描述于Sambrook等人,1989(同上);Ausubel等人,分子生物学最新指南(Current Protocols in Molecular Biology),Green Pub.Associates和Wiley-Interscience公司,纽约,1988。

[0201] 例如,在酵母中表达的构建体优选含有一个合成基因,其可操作地连接有相关的转录和翻译调控序列,如启动子(如GAL10、GAL7、ADH1、TDH3或PGK)和终止序列(如酿酒酵母(*S. cerevisiae*)ADH1终止子)。酵母可自选:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、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*)。也可参见酵母菌遗传学((Yeast Genetics), Rose等人,实验过程手册(A Laboratory Course Manual),冷泉港实验室,冷泉港出版社,纽约,1990)。如本领域所知,核酸分子可进行密码子优化以在酵母中表达(参见Sharp和Cowe,酵母(Yeast),7:657-678,1991)。

[0202] 可用于在宿主细胞系中克隆和表达的载体为本领域所熟知,其包括但不限于,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,以及用于在昆虫细胞系中克隆和表达的载体。所表达的蛋白可用标准蛋白纯化方法进行回收。

[0203] 翻译调控元件已由M.Kozak做了综述(例如,Kozak,哺乳动物基因组(Mamm Genome),7(8):563-74,1996;Kozak,生物化学(Biochimie),76(9):815-21,1994;Kozak,细胞生物学杂志(J Cell Biol),108(2):229-241,1989;Kozak和Shatkin,酶学方法

(Methods Enzymol), 60:360-375, 1979)。

[0204] 可用本领域已知的方法进行纯化,包括盐析法、离子交换层析、凝胶过滤、尺寸排阻层析、尺寸分离以及亲和层析。

[0205] 可使用标准的方法方便地制备重组糖蛋白,例如, Sambrook 等人所描述,1989(同上),具体为第 13、16 和 17 部分;Ausubel 等人,分子生物学最新指南 (Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley&Sons 公司,1994,具体为第 10 和 16 章;以及 Coligan 等人,1995-1997(同上),具体为第 1、5 和 6 章。多核苷酸可通过化学合成方法来合成,例如,使用溶液合成或固相合成,其描述于例如 Atherton 和 Shephard 的肽合成 (Peptide Synthesis) 第 9 章;Nicholson 编著的合成疫苗 (Synthetic Vaccines), 布莱克科学出版公司 (Blackwell Scientific Publications) 出版, Roberge 等人, (Science), 269(5221): 202-204, 1995。

[0206] 本发明所考虑的“个体 (subject)”是指人或动物,包括实验室或现有技术接受的试验或载体动物。“患者”包括需要治疗或预防的人类个体。

[0207] 本发明提供了产生 HCV 的中和抗体的方法,包括将一种或多种题述 HCV E2 多肽给予个体,并从所述个体选择能够结合 HCV E2 且尤其是能阻止受体结合的抗体。在一些实施方案中,测试抗体降低病毒感染力或病毒载量的能力。

[0208] 本发明还提供了筛选特异性结合题述 HCV 多肽的抗体或其他结合剂的方法,所述方法包括使包含抗体或其他结合剂的样品或溶液与本发明所述 HCV 多肽接触,并测定相对于对照的结合。然后,测定结合剂的例如降低感染力、病毒载量或传播的治疗或预防能力。

[0209] 本发明涉及筛选方法,所述方法包括使推定的相互作用化合物与 HCV E2 多肽接触;并测定所述推定的相互作用化合物与 HCV E2 多肽之间相互作用的结合特征或测定所述 HCV E2 多肽结合受体如 CD81 的能力。

[0210] 因此,在另一个方面本发明提供了用于筛选预防丙型肝炎病毒进入宿主细胞的结合剂的组合物,其中所述组合物包含包括受体结合变体在内的丙型肝炎病毒 (HCV) 包膜 2 (E2) 多肽,其中所述多肽经修饰而包含:(i) 在选自 C452、C486、C569 和 C597 的 2、3 或 4 个半胱氨酸处突变或中断的半胱氨酸;并且,其中,相比所述无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键形成基本上很少的多聚体,且基本上保留 CD81 结合。

[0211] 在一些实施方案中,所述多肽还包含在 C581、C585、C652 和 C677 中的 1、2、3 或 4 个位点处突变或中断的半胱氨酸。

[0212] 在一些实施方案中,C581 和 C585 发生了突变或中断。

[0213] 在一些实施方案中,C652 或者 C652 和 C677 发生了突变或中断。

[0214] 在一些实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581 和 C585 发生了突变或中断。

[0215] 在一些实施方案中,C452、C486、C569、C597、C581、C585 和 C652 发生了突变或中断。

[0216] 在一些实施方案中,所述多肽折叠为至少 40%、或至少 45%、或至少 50%、或至少 55%、或至少 60%、或至少 65%、或至少 70% 的单体。

[0217] 在一些实施方案中,相对于所述无半胱氨酸修饰的 HCV E2 多肽,所述多肽通过分子间二硫键折叠为小于 70% 的多聚体,或小于 65%、或小于 60%、或小于 55%、或小于 50%、或小于 45%、或小于 40% 的多聚体。

[0218] 在一些实施方案中,所述 HCV E2 多肽为 E2661 或其受体结合部分。

[0219] 在一些实施方案中,所述 HCV E2 多肽包含在选自 HVR2、HVR1 和 IgVR 的 1、2 或 3 个可变区中的缺失。

[0220] 本发明还涉及一种方法,其包括使来自个体的样品与本发明所述的 HCV 多肽或含有所述多肽的复合体接触;测定所述样品与所述 HCV E2 多肽之间的相互作用。在一些实施方案中,可使用源自不同 HCV 基因型的不同 E2 多肽阵列。在一些实施方案中,所述样品为包含抗体的样品。

[0221] 在一些实施方案中,所述样品源自感染的个体。对照样品包括源自未感染个体的样品。样品可源自所述个体的任何部分。方便的样品包括血液、血清、血浆、尿液、唾液等。

[0222] 合适的测定方法为本领域技术人员所熟知,其包括 ELISA、RIA 和 EIA- 类测定以及竞争性测定。所述测定方法尤其可用于血清监测。

[0223] 在一些实施方案中,将包含题述 HCV E2 多肽的试剂盒便利地用于病毒感染的诊断或预后、或病原体监测、或血清监测试剂盒,任选地包括包装、操作说明和各种其他组分如缓冲液、底物、抗体或配体、对照抗体或配体以及检测试剂。

[0224] 如本文所用,术语“有效量”、“治疗有效量”和“预防有效量”是指提供所需的治疗、预防或生理学效果的足够量的本发明组合物。不良效果如副作用,有时可能伴随所需的治疗效果而出现;因此,从业者确定恰当的“有效量”时针对潜在风险平衡潜在的效果。所要求的确切制剂量在个体之间是不同的,这取决于物种、年龄和该个体的总体状况、给药方式等。因此,不可能指定一个确切的“有效量”。然而,对于任何单独个体的合适“有效量”可由本领域技术人员用常规实验来确定。本领域普通技术人员将能够基于下述因素确定所需用量,诸如,此前给予的制剂、个体大小、个体症状的严重程度、病毒载量和所选的具体组合物或所选的给药方案。

[0225] 本发明提供了一种产生抗体的方法,其包括用本发明所述 HCV 多肽、包含所述多肽的病毒样粒子或编码所述多肽的核酸免疫非人类动物或筛选人类免疫球蛋白基因的表达产物,并分离特异性结合所述多肽或目标肽或者特异性结合包含所述肽的病原体全部或部分的抗体。

[0226] 在另一个实施方案中,本发明提供了使用题述蛋白或其人类形式或人源化形式通过本发明所述方法产生的抗体或抗原-结合片段。所述抗体优选单克隆抗体而非多克隆抗体,且优选为人源化的、去免疫的或人类抗体。

[0227] 如上所述,在一些实施方案中,本发明涉及本发明所述的 HCV 多肽或包含所述多肽的病毒样粒子在制备用于治疗或预防 HCV 的药物中的应用。

[0228] 术语“治疗 (treatment)”或“预防”或“治疗 (therapy)”在其最宽的上下文范围内可互换使用,且包括在至少一些个体中一种或多种 HCV 症状或发展 HCV 晚期症状风险的任何可测量或统计意义上的改善。预防可看做是降低了疾病状况的严重程度或发作或疾病状况的体征。

[0229] 根据这些实施方案,通常在一段时间内、在足以引起包括产生 E2- 特异性抗体的免疫反应的条件下给予所述组合物。本发明的组合物可作为单剂量或应用而给予。或者,所述组合物可涉及重复剂量或应用,例如,所述组合物可给予 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多次。

[0230] 预期当以取决于具体情况确定的量给予时,包含题述HCV E2多肽的药物组合物会表现出治疗活性。可使用宽范围的剂量。考虑到人类个体,例如,可按照每千克体重每天或每隔一天或每周或每月给予约0.1 μ g-1 μ g(即,包括0.1 μ g、0.2 μ g、0.3 μ g、0.4 μ g、0.5 μ g、0.6 μ g、0.7 μ g、0.8 μ g和0.9 μ g)、0.5 μ g-50 μ g、1 μ g-10 μ g、2 μ g-200 μ g、0.1mg-1.0mg(即,包括0.1mg、0.2mg、0.3mg、0.4mg、0.5mg、0.6mg、0.7mg、0.8mg和0.9mg)、约15mg-35mg、约1mg-30mg、或5-50mg或10mg-100mg蛋白。治疗组合物,包括预防组合物,可以约0.1-20mg/kg的剂量给予,然而,高于或低于该用量的剂量在以上所列的范围内考虑。可调整剂量治疗方案以提供最佳治疗响应。例如,可按照每日、每周、每月或其他合适时间间隔给予几次分剂量,或可根据情况的紧急程度按比例减少所述剂量。也可能以缓释制剂的形式来给予组合物。

[0231] 通常在一段时间内、在足以治疗或预防HCV感染的条件下给药。该制剂可以便利的方式给予,如通过口服、静脉内(溶于水的情况下)、腹膜内、肌肉内、皮下、皮肤内、鞘膜内或栓剂方式或植入(例如,使用缓慢释放分子)。尽管全身给药更便利,但是可全身或局部给药。提到的全身给药包括静脉内、腹膜内、皮下注射、输注,以及通过口腔、直肠、阴道、鼻途径或通过吸入给药,这是有利的。其他可考虑的给药途径为通过贴剂、细胞转移、植入、舌下、眼内、局部或透皮给药。根据疾病的严重程度或阶段以及血脑屏障的完整性,合适的组合物需要穿过血脑屏障。

[0232] 通常按照常规药物组合技术便利地制备药物组合物。参见,例如雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)第18版,Mack出版公司,美国宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton),1990。所述组合物可含有活性剂或其药用盐。除了一种活性物质,这些组合物还可包含药用赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域熟知的其他物质。这些物质应当无毒性且应当不干扰所述活性成分的功效。取决于给药所需的制剂形式,例如,静脉内、口服或非肠道给药,所述载体可采用多种形式。

[0233] “药用载体”和/或稀释剂是由并非不良物质构成的药用媒介(pharmaceutical vehicle),即,所述非不良物质本身或与活性剂一起不会引起大量的不良反应。载体可包括所有溶剂、分散介质、涂层、抗细菌和抗真菌剂,用于调节渗透性、增加或减少吸收率或清除率的试剂、维持pH的缓冲剂、螯合剂、膜或屏障穿越剂。药用盐是无不良反应的盐。该制剂或包括所述制剂的组合物可以以药用无毒性盐的形式给予,如酸加成盐或金属络合物。

[0234] 对于口服给药,可将所述组合物配制成固体或液体制剂,如胶囊、丸剂、片剂、锭剂、粉剂、悬浮剂或乳剂。在制备口服剂型的组合物时,可使用任何常用的药物介质,例如在口服液体制剂(如悬浮剂、酏剂和溶液)的情况下,使用例如水、甘油醇、油、醇类、增味剂、防腐剂、着色剂、悬浮剂等;或在口服固体制剂(如粉剂、胶囊和片剂)的情况下,使用诸如淀粉、糖、稀释剂、粒化剂、润滑剂、结合剂、崩解剂等载体。由于其易于给药,片剂和胶囊剂代表了最有利的口服单位剂型,在所述情况下,显然使用固体药用载体。片剂可含有粘结剂如黄蓍胶、玉米淀粉或明胶;崩解剂如藻酸;以及润滑剂如硬脂酸镁。若需要,片剂可为通过标准技术手段包糖的或包肠溶衣的。可封装活性剂以使其能够稳定地通过胃肠道。参见,例如,国际申请公布No. W096/11698。

[0235] 对于肠胃外给药,可将所述组合物溶解于载体中并以溶液或悬浮剂形式给予。当以鞘内方式给予所述制剂时,也可将其溶解于脑脊液中。对经粘膜或经皮(包括贴剂)递

送,使用本领域熟知的合适渗透液来递送拮抗剂。对于吸入,使用任何方便的系统递送,如干粉喷雾器、液体递送系统、气雾喷射器、推进物系统。例如,可以以气雾剂或薄雾形式给予所述制剂。所述制剂也可以以持续递送或缓释形式递送。例如,生物可降解微球体或胶囊或其他能够持续递送聚合物的结构均可包括在该制剂中。可修饰制剂以改变药物动力学和生物分布。对于药物动力学的一般讨论,参见,例如,雷明顿药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences),1990(同上)。在一些实施方案中,所述制剂可整合至脂质单层或双层如脂质体或胶团中。可使用本领域熟知的寻靶疗法来更特异性地针对某些类型的细胞或组织递送所述制剂。

[0236] 活性制剂的实际给药量和给药的速度与时程,将取决于疾病的性质和严重程度。治疗药方,例如,剂量、时间等的确定是一般从业者或专家的责任,并通常会考虑到个体患者的疾病状况、递送位点、给药方法和从业者已知的其他因素。技术和方案的实例可在雷明顿药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences),1990(同上)中找到。

[0237] 可制备的缓释制剂尤其便于诱导免疫反应。缓释制剂的实例包括含有所述多肽的固体疏水聚合物的半渗透基质,所述基质采用具有某种形状的物件形式,例如,膜或微胶囊。缓释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))、聚乳酸、L-谷氨酸与L-谷氨酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管聚合物如乙烯-醋酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸共聚物使得分子的释放达100多天,但某些水凝胶释放蛋白的时间更短。可使用具有小(约200-800埃(Angstroms))单层型的脂质体,其中脂质含量大于约30%的胆固醇,调整用于最佳治疗的选择比例。

[0238] 可通过修饰巯基残基、由酸溶液冻干、控制水分含量、使用合适的添加剂以及研制特定聚合物基质组合物来实施蛋白的稳定。可使用本领域已知的技术来延长蛋白的体内半衰期,包括,例如,通过连接其他元件,如聚乙二醇(PEG)基团。明确考虑了使用本领域公开的初免-加强免疫(prime-boost immunisation)策略。参见,例如,国际公布No. WO/2003/047617。因此,组合物的形式可为疫苗、初免或加强剂。

[0239] 术语“分离的”是指基本上或本质上不含与其天然状态下通常伴随的成分的物质。例如,如本文所用,“分离的核酸分子”是指与天然状态下位于其侧翼的序列分离的核酸或多核苷酸,例如,已经从通常相邻的序列取走的DNA片段。或者,如本文所用,“分离的多肽”等是指在体外从其天然细胞环境,以及从与细胞其他相关组分分离和/或纯化蛋白。在无限制的情况下,分离的核酸、多核苷酸、肽或多肽可指通过纯化分离的天然序列或指通过重组或合成方法产生的序列。

[0240] 在HCV治疗或预防的上下文中,“有效量”是指将该量的活性物质,以能够在一些个体中有效产生治疗效果的单剂量或者一系列或缓释系统的一部分给予个体。根据个体的健康和身体条件、待治疗的个体的分类群、所述组合物的构成、医疗状况评估以及其他相关因素,所述有效量可以变化。预期所述量会落入能够通过常规实验确定的相对宽泛的范围内。

[0241] 提到的功能性变体,包括通过添加、缺失和/或取代至少一个氨基酸残基而不同于其天然存在形式或本文所呈现形式的那些变体。因此,变体包括通过在天然蛋白的N-末端和/或C-末端缺失(所谓的截短)或添加一个或多个氨基酸,在天然蛋白的一个或多个位点缺失或添加一个或多个氨基酸,或在天然蛋白的一个或多个位点取代一个或多个氨基

酸,而源自该天然蛋白的蛋白。本发明所包括的变异蛋白通常具有生物活性,即,它们继续具有所述天然蛋白的一个或多个期望的生物活性(例如,CD81 和 H53 结合或排除病毒进入的构象能力的等效标记物)。而且,所选的变体继续变现出增强的单体形成和更少的多聚体形成。变体可源自例如,遗传多态性或源自人工操作。病毒多肽的生物活性变体与本发明所述多肽的氨基酸序列,通过在本文其他地方描述的序列比对程序用默认参数确定,通常具有至少 40%、50%、60%、70%,通常至少 75%、80%、85%,优选约 90%–95% 或以上,更优选约 98% 或以上的序列相似性或同一性。多肽的生物活性变体与所述多肽的差异通常可多达 100、50 或 20 个氨基酸残基,或合适地少至 1–15 个氨基酸残基,少至 1–10 个如 6–10 个,少至 5 个,少至 4、3、2 或甚至 1 个氨基酸残基。所述半胱氨酸氨基酸的数目标示可随氨基酸序列变化而改变。然而,所述半胱氨酸的线性顺序为本领域技术人员提供了切实可行的参照点,并包括所有这类变体。

[0242] 变异多肽可以以多种方式改变,包括氨基酸取代、缺失、截短和插入。这类操作方法通常为本领域所知。例如,多肽的氨基酸序列变体可通过实施例 9 所述的 DNA 的突变来制备。诱变和核苷酸序列改变的方法为本领域所熟知。参见,例如 Kunkel, 美国科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci.), 美国, 82:488–492, 1985; Kunkel 等人, 酶学方法 (Methods in Enzymo.), 154:367–382, 1987; 美国专利 No. 4, 873, 192; Watson 等人, 基因分子生物学 (Molecular Biology of the Gene) 第 4 版, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) 以及本文引用的参考文献。不影响目标蛋白生物活性的合适氨基酸取代的指导,可在 Dayhoff 等人的模型中发现, Dayhoff 等人, 蛋白序列和结构图册 (Atlas of Protein Sequence and Structure), 国家生物医药研究基金会 (Natl. Biomed. Res. Found.), 华盛顿特区, 1978。如下文更详细讨论的, 保守性取代, 如用另一个具有类似特性的氨基酸取代一个氨基酸是可取的。

[0243] 与参考氨基酸序列相比, 变异多肽可在沿着其序列上的各种位置含有保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是这样的取代, 其中, 氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基取代。本领域已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基家族, 其通常可再分为如下亚类:

[0244] 酸性残基: 在生理 pH 值时, 由于失去 H 离子, 所述残基带负电荷, 当肽处在生理 pH 值的水介质中时, 该残基被水溶液吸引从而寻找在包含其的所述肽构象中的表面位置。具有酸性侧链的氨基酸包括谷氨酸和天冬氨酸。

[0245] 碱性残基: 在生理 pH 值时或在其 1–2pH 单位内, 由于与 H 离子结合该残基带正电荷(例如, 组氨酸), 并且当肽处在生理 pH 值的水介质中时, 该残基被水溶液吸引从而寻找在包含其的所述肽构象中的表面位置。具有碱性侧链的氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0246] 带电荷残基: 所述残基在生理 pH 值带电荷, 因此, 包括具有酸性或碱性侧链的氨基酸(即, 谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸和组氨酸)。

[0247] 疏水性残基: 所述残基在生理 pH 值不带电荷, 当肽处在水介质中时, 该残基被水溶液排斥从而寻找在包含其的所述肽构象中的内部位置。具有疏水性侧链的氨基酸包括酪氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。

[0248] 中性/极性残基: 所述残基在生理 pH 值不带电荷, 但当肽处在水介质中时, 该残基没有被水溶液充分排斥从而其会寻找在包含其的所述肽构象中的内部位置。具有中性/极

性侧链的氨基酸包括天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、组氨酸、丝氨酸和苏氨酸。

[0249] 本说明书还将一些氨基酸表征为“小”，因为其侧链不够大（即便缺少极性基团）以赋予其疏水性。除脯氨酸以外，“小”氨基酸是当至少一个极性基团位于侧链上时具有 4 个或更少碳的氨基酸，而当不是至少一个极性基团位于侧链上时具有 3 个或更少碳的氨基酸。具有小侧链的氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸。基因编码的二级氨基酸脯氨酸是特殊情况，因已知其对肽链的二级结构有影响。脯氨酸的结构不同于所有其他天然存在的氨基酸，因为其侧链连接至 α -氨基的氮以及 α -碳上。然而，一些氨基酸相似性矩阵（例如，PAM120 矩阵和 PAM250 矩阵，公开于，例如，Dayhoff 等人，1978，（同上），蛋白演化变化的模型（A model of evolutionary change in proteins）。确定距离关系的阵列，Dayhoff 编著，蛋白序列和结构图册（Atlas of Protein Sequence and Structure），国家生物医药研究基金会（National Biomedical Research Foundation），华盛顿特区，第 5 卷，第 345-358 页；以及 Gonnet 等人，科学（Science），256 (5062):1443-1445, 1992，也在甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸的同一组中包括脯氨酸。因此，出于本发明目的，脯氨酸被归类为“小”氨基酸。

[0250] 分类为极性或非极性所要求的吸引或排斥程度是随意的，因此，已经将本发明特别考虑的氨基酸归类为一类或另一类。大多数没有明确命名的氨基酸可基于已知行为来分类。

[0251] 针对残基的侧链取代基团为小或大，可以将氨基酸残基进一步次分类为环状的或非环状的以及芳香的或非芳香的不言而喻的种类。假设存在另外的极性取代基，如果残基含有总数 4 个或更少的碳原子，包括羧基碳；如不存在另外的极性取代基，所述残基含有总数 3 个或更少的碳原子，那么所述残基被认为是小的。当然，小残基总是非芳香的。根据结构特性，氨基酸残基可归于两类或更多类。对于天然存在的蛋白氨基酸，根据该方案的次分类如表 3 所示。

[0252] 保守氨基酸取代还包括基于侧链来分组。例如，具有脂肪族侧链的氨基酸组为：甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；具有脂肪族-羟基侧链的氨基酸组为：丝氨酸和苏氨酸；具有含酰胺侧链的氨基酸组为：天冬酰胺和谷氨酰胺；具有芳香族侧链的氨基酸组为：苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；具有基本侧链的氨基酸组为：赖氨酸、精氨酸和组氨酸；以及具有含硫侧链的氨基酸组为：半胱氨酸和甲硫氨酸。例如，预期下述取代是合理的：以异亮氨酸或缬氨酸取代亮氨酸，以谷氨酸盐取代天冬氨酸盐，以丝氨酸取代苏氨酸，或者以结构上相关的氨基酸对一个氨基酸进行相似取代将不会对所得变异多肽的性质产生重要影响。通过测定活性，可容易地确定氨基酸改变是否产生了功能性多肽。保守取代以示例性取代为标题如表 4（以下）所示。优选的取代以优选的取代为标题显示。落入本发明范围的氨基酸取代通常通过选择在其维持以下特性的效果上没有很大不同的取代来实现：(a) 在该取代区的肽骨架的结构，(b) 靶位点分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。引入所述取代以后，针对生物活性如 CD81 或 H53 结合来筛选变体。

[0253] 或者，基于所述侧链的特性将进行保守取代的相似氨基酸分为 3 类。第一组包括谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸，均具有带电荷的侧链；第二组包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺；第三组包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸，这描述于 Zubay，生物化学（Biochemistry）

第 3 版, Wm. C. Brown 出版社, 1993。

[0254] 因此, 多肽中预测的非必需氨基酸残基通常用相同侧链家族的另一氨基酸残基来取代。或者, 可沿着多核苷酸编码序列的所有或部分随机引入突变, 如通过饱和诱变, 并对所得突变体针对其亲本多肽的活性进行筛选, 以鉴定保留了所述活性的突变体。诱变所述编码序列后, 可将通过重组表达该编码的多肽, 并可测定所述肽的活性。

[0255] 因此, 本发明还涉及本发明所提供的多肽的变体或其生物活性片段, 其中所述变体与所提供的序列如 SEQ ID NO:2 或 4 的不同之处在于一个或多个氨基酸残基的添加、缺失或取代。通常, 变体会表现出与参考多肽序列的至少约 30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99% 的相似性。令人满意的是, 变体与亲本多肽序列具有至少 30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99% 的序列同一性。另外, 还涉及与所公开的序列的不同之处在于 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100 或更多个氨基酸的添加、缺失或取代但保留了亲本多肽的生物活性的序列。SEQ ID NOs:2 和 4 所示的序列, 相比 SEQ ID NOs:1 和 3, 分别包括半胱氨酸的丙氨酸取代。如本领域所理解, 丙氨酸可由其他非 - 半胱氨酸氨基酸取代, 如丝氨酸、缬氨酸、甘氨酸、苏氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、亮氨酸或异亮氨酸。

[0256] 在一些实施方案中, 变异多肽与亲本多肽存在的不同在于: 至少一个但少于 50、40、30、20、15、10、8、6、5、4、3 或 2 个氨基酸残基。在另一个实施方案中, 变异多肽与所述序列的不同之处在于: 至少 1% 但小于 20%、15%、10% 或 5% 的残基。(如果该比较需要比对, 则应该进行序列的最大相似性比对。源于缺失、插入或错配的“环”出序列被看作差异)。合适地, 所述差异为在非必需残基或保守取代处的差异或改变。

[0257] “非必需”氨基酸残基是可从具体多肽的野生型序列中改变但不会废除或根本上改变如本文所述的其一种或多种功能活性的残基。合适地, 所述改变不会根本上改变这些活性之一, 例如, 其结合活性为亲本的至少 60%、70% 或 80%。“必需”氨基酸残基是当从本文公开的多肽中改变时会导致废除亲本分子的活性的残基, 如存在小于 60% 的亲本结合活性。

[0258] 在其他实施方案中, 变异多肽包括与包含如 SEQ ID NO:2 或 4 所示氨基酸序列的亲本 HCV E2 多肽的相应序列具有至少约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或更多相似性的氨基酸序列。

[0259] 通过以下非限制性实施例进一步描述了本发明。实施例中所用材料和方法提供如下。

[0260] 细胞系和抗体。将 HEK293T 和 Huh7 细胞维持在添加了 10% 胎牛血清和 2mM L-谷氨酰胺 (DMF10) 的达尔伯克氏最低基本培养基中。MAb H53 和 A4 由 Jean Dubuisson 惠赠。按照生产商的指导, 使用蛋白 G 琼脂糖凝胶 (GE Healthcare 公司) 从 HIV- 感染个体的血浆纯化免疫球蛋白 14 (IgG14)。已报道 MAb H53 可识别 E2 内的天然表位, 并与非共价连接的 E1 共沉淀。该表位还独立于已知的 CD81- 结合位点, 并提供针对 E2 内天然构象特征的更宽筛选。对免疫原性结构域 A 特具有异性的人构象敏感的单克隆抗体 CBH4B、4D 和 4G 由 Steven Fong 慷慨赠送 (Keck 等人, 2004 (同上))。MAb183 为对 HIV-1 衣壳蛋白具有特异性的鼠单克隆抗体, 获得自美国 NIH 艾滋病研究和参考试剂库 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Bank)。MAb24 为识别 E2 内线性表位 (res411-423) 的单克隆抗

体。抗 6- 组氨酸表位标签 (抗 -HIS, Rockland Biochemicals 公司)、荧光缀合的抗 - 兔 (IR-800, Rockland)、荧光缀合的抗 - 小鼠 (Alexa680, Invitrogen 公司) 和 HRP- 缀合抗体 (DAKO) 的兔多克隆抗体均可商业获得。

[0261] 表达载体。pE1E2, 即基于 pcDNA4HisMax (Invitrogen 公司) 的载体, 含有源自 H77c 基因型 1a 的 E1E2 序列, 其此前已有描述 (Drummer 等人, FEBS Lett 546:385-90, 2003)。HIV-1 荧光素酶报告物载体 pNL4-3. LUC. R-E- 通过美国 NIH 艾滋病研究和参考试剂项目 (NIH AIDS Research and Reference Reagent program) 获得自 N. Landau。通过标准重叠延伸 PCR 将半胱氨酸 (TGC/T) 引入至丙氨酸 (GCT/C) 取代进行体外诱变。使用 Big-Dye 终止化合物染料 (Big-Dye terminator chemistry) 和 ABI 自动测序来确定插入的 DNA 序列。基于 pcDNA3 (Invitrogen 公司) 的载体含有编码组织纤溶酶原激活物前导序列下游的截短的 E2 蛋白 (多蛋白残基 384 和 661) 的序列, 所述载体已有报道 (pE2₆₆₁)。使用 PCR 引物从相应的 pE1E2 载体扩增突变的 E2₆₆₁-his 序列, 以引入 C- 末端 6- 组氨酸表位标签以及 NheI 和 XbaI 限制位点, 用于插入至 pE2₆₆₁ 中。使用 F μ gene6 (Roche 公司), 根据生产商的指导, 将所有载体转染至 HEK293T 细胞。

[0262] 放射免疫沉淀 (RIP) 和蛋白质印迹法 (Western blotting)。在以每孔 3.5×10^5 个细胞接种于 6 孔组织培养皿中的 293T 细胞中进行 E1E2-HIV-1 伪型粒子的放射性标记, 并如此前所述各用 1 μ g 的 pNL43. LUC. RE 加上 pE1E2 或空 pcDNA4HisMax 载体进行共转染。转染后 24hr, 用含有 75uCi Trans³⁵S- 标记 (ICN, Costa Mesa 公司, 加利福尼亚) 的半胱氨酸 - 和甲硫氨酸 - 缺陷型 DMF10 替换组织培养基, 持续 18hr。使该组织培养液澄清, 然后于 4 $^{\circ}$ C 以 $14,000 \times g$ 离心 2hr。将所述病毒球团于 RIP 裂解液 (0.6M KCl, 0.05M Tris, pH7.4, 1mMEDTA, 0.02% 叠氮化钠) 中裂解, 用 MA b H53 和 IgG14 或 MA b183 免疫沉淀, 进行非还原十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和放射性同位素成像。使用 ImageQuant 软件 (GE Healthcare 公司) 对由 MA b H53 检测的 E2 进行定量。用 Western 裂解缓冲液 (PBS, pH7.4, 含有 1%T $\times$ 100, 1mM EDTA) 裂解剩余的细胞单层来测定 E1E2 的细胞内表达, 进行 SDS-PAGE 分析并转移至硝酸纤维素膜, 并用 MA bA4 (抗 -E1) 和 MA b24 (抗 -E2) 和荧光缀合的山羊抗 - 小鼠 Alexa680 抗体 (Invitrogen 公司) 检测。使用荧光扫描仪 (Odyssey; LI-COR) 进行免疫印迹成像。

[0263] 利用以每孔 3.5×10^5 个细胞接种于 6 孔组织培养皿 (Nunc) 的 293T 细胞, 对所分泌 E2₆₆₁-his 进行放射性标记, 并如此前所述用 2 μ g 的 pE2₆₆₁ 或空 pcDNA3 载体进行转染。转染后 24hr, 在加入 75uCi Trans³⁵S- 标记 (ICN, Costa Mesa 公司, 加利福尼亚) 1h 之前, 用半胱氨酸 - 和甲硫氨酸 - 缺陷型 DMF10 (MP Biomedicals) 将所述细胞处理 30min, 然后转移至低血清培养基 (OptiMEM, Invitrogen) 中 6h。以 $14,000 \times g$ 离心 10min 以使该组织培养液澄清, 用 MA b H53 或抗 -HIS 抗体免疫沉淀, 并进行 SDS-PAGE 分析和放射性同位素成像。如上所述, 对于 CD-81 结合检测, 通过转染 293T 细胞进行未标记 E2₆₆₁ 表达。转染后 24hr, 将组织培养液转入 OptiMEM 中, 并每 24h 收获共 72h。在进行还原 SDS-PAGE 和蛋白转移至硝酸纤维素膜之前, 将所述澄清的组织培养液浓缩约 10- 倍。用抗 -HIS (Rockland 公司) 和荧光缀合的 IR-800 抗体 (Rockland 公司) 通过免疫印迹将 E2₆₆₁-his 的表达归一化。使用 Odyssey LI-COR 荧光扫描仪和定量软件分析免疫印迹。

[0264] E1E2- 伪型 HIV-1 粒子 (HCVpp) 进入测定。如此前所述进行伪型粒子进入测定

(Drummer 等人, 2003(同上))。将 HEK293T 细胞用各 1 μ g 的 pNL43. LUC. R-E 加上 pE1E2 或空 pcDNA4HisMax 载体进行共转染。转染后 72hr, 将培养物上清液过滤 (0.45 μ M), 并将其一式三份应用于以每孔 3×10^4 个细胞接种于 48 孔组织培养皿 (Nunc) 的 Huh7 单层中。转染后 72hr, 将 Huh7 细胞裂解, 并使用 Promega 荧光素酶底物系统和配置荧光光学部件的 Fluostar (BMG Labtechnologies 公司) 测量荧光酶活性。

[0265] 固相结合测定: CD81-LEL 结合以及 GNA-凝集素捕获。由连接至残基 113-201 之间 (MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹) 的 CD81 大胞外环 (LEL) 的麦芽糖结合蛋白 (MBP) 组成的嵌合体的表达和纯化, 以前已有描述 (Drummer 等人, Biochem Biophys Res Commun 328:251-257, 2005; Drummer 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 76:11143-7, 2002)。这种二聚体形式的 CD81-LEL 已用于宽泛地表征 E2-CD81 相互作用, 并已经证明, 其为天然 CD81 的优异模拟物, 并能够与 Claudin-1 的第一胞外环 (EC1) 相互作用 (Harris 等人, J Biol Chem 285:21092-102, 2010)。另外, 其反映了在 hCD81-LEL 的晶体结构中观察到的同型二聚体以及与细胞相关全长 CD81 之间的同型相互作用。E2CD81-结合位点内的 L441M 突变作为非特异性结合的对照也包括在内。裂解的 HCVpp 与 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 的结合此前已有描述 (Drummer 等人, 2006(同上))。简而言之, 将 96-孔酶联免疫吸附测定 (Nunc Maxisorb) 板用 5 μ g/mL 二聚体 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 的 PBS 溶液涂覆过夜。用含有 10mg/mL 牛血清白蛋白溶液 (BSA₁₀PBS) 的 PBS 封闭任何未涂覆的位点, 之后用含有 0.05% 吐温-20 (PBST) 的 PBS 冲洗。针对使用 MAbs H53 的 RIP 检测的单体 E2 含量, 将 HCVpp 裂解物归一化, 并以在含有 5mg/mL BSA (BSA₅PBST) 的 PBST 中连续两倍稀释应用于固定的 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹。通过 MAbs H53 和兔抗-小鼠免疫球蛋白-辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物 (DAKO) 检测结合的 E2。根据生产商 (Sigma) 的指导使用四甲基联苯胺 (TMB) 底物来使 E2-抗体复合物显影。

[0266] 为了检测 E2₆₆₁-his 蛋白与 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 的结合, 如上所述, 首先针对通过使用抗-HIS (Rockland 公司) 的蛋白质印迹所检测的单体 E2 含量, 将总的分泌 E2₆₆₁-his 归一化。然后将 E2₆₆₁-his 蛋白以连续两倍稀释液应用于 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 涂覆的 EIA 板。使用抗-HIS 和山羊抗-兔免疫球蛋白-HRP 缀合物 (DAKO 公司) 检测结合的 E2, 并用 TMB 显影。作为蛋白内参照, 将源自雪花莲 (*Galanthus nivalis*) 凝集素 (GNA-植物凝集素, Sigma 公司) 的植物凝集素于 PBS 中以 0.5mg/mL 涂覆 EIA 板。用 BSA₁₀PBS 封闭未涂覆位点, 然后将 E2₆₆₁-his 蛋白以 CD81 结合测定所用的相同起始浓度应用于整个板。通过以在 BSA₅PBST 中两倍稀释应用于整个板的抗-HIS 和抗-兔 HRP-缀合的抗体检测结合的 E2。用配备吸光度光学部件的 Fluostar 仪, 测量所有结合, 作为 450nm (以 620nm 差减) 处吸光度的函数, 并计算为最大 WT 结合的百分数。

[0267] E2₆₆₁-his 的凝集素-亲和纯化以及蓝色-非变性 PAGE 分析。如上所述, 表达和代谢标记 E2₆₆₁-his 蛋白。使澄清的组织培养液与 GNA-凝集素缀合的琼脂糖珠 (Vector Laboratories) 于 4°C 结合过夜。去除组织培养液, 并用 PBS 洗涤剩下的珠。用 2 倍珠体积的 1M 甘露糖于 4°C 洗脱任何结合蛋白 1hr。将洗脱部分进行还原 SDS-PAGE 分析和放射性同位素成像, 以用 ImageQuant 软件 (GE Healthcare 公司) 定量相对表达。然后按照 Wittig 等人, Nat Protoc 1:418-28, 2006, 于 4°C 通过 4-16% 蓝色-非变性 PAGE 分析所述归一化的蛋白。将 5 μ g 纯化的甲状腺球蛋白 (660kDa)、铁蛋白 (880/440)、醛缩酶 (158)、伴清蛋白 (75) 和卵清蛋白 (45) (GE Healthcare 公司) 用作尺寸-标准标记物。还将非共

价连接的二聚体 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ (110kDa) 用作非变性条件的对照。用放射性标记材料标记考马斯亮蓝染色的标记物, 然后进行放射性同位素成像。用 ImageQuant 软件 (GE Healthcare 公司) 定量总 E2₆₆₁-his 和每个不同种类的比例。

[0268] 序列。以合成方式构建以下序列, 用于在哺乳动物系统中表达。通过 Geneart AG (德国, 雷斯根堡) 构建编码 E2 蛋白片段 (384-661 残基; H77c 株) 的合成基因。将人类胰蛋白酶原信号肽 (MNPLLILTFVAAALA) 框内附加至 E2 成熟蛋白的 N- 末端, 从而促进成熟多肽分泌至表达培养基中。将 Kozak 序列引入至恰好在 N- 末端前以增强翻译启动, 并框内添加 (His)₆ 序列, 以便随后能通过固定金属亲和层析纯化所分泌的蛋白。在 C- 末端的 His- 标签后添加两个终止密码子, 以确保有效的翻译终止。E2-his cDNA 的密码子使用适应人 (Homo sapiens) 基因的密码偏好。将 cDNA 的 5' 末端的 KpnI 限制位点和 Xho I 限制位点引入至 3' 末端, 以将 Geneart cDNA 连接至 pcDNA3 和 pcDNA3.1 质粒 (Invitrogen 公司) 中。使用 BigDye Terminator 测序证实编码这些序列的 DNA。

[0269] >WT E2₆₆₁

[0270] MNPLLILTFVAAALAETHVTGGNAGRTTAGLVGLLTPGAKQNIQLI NTNGSWHINSTALNCNESLNTG
WLAGLFYQHKFNSSGCPERLASC RRLTDFAQGWGPISYANGSGLDERPYCWHYPPRPGI VPAKSVC GPVYCFTP
SPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLGN WFGCTWMNSTGFTKVC GAPPCVIGGVGNNTLLCPTDCFR
KHPEA TYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGV EHRLEAACNWTRGERCDLED RDRSEH
HHHHH (SEQ ID NO:1)

[0271] >WT E2₆₆₁M+C597A

[0272] MNPLLILTFVAAALAETHVTGGNAGRTTAGLVGLLTPGAKQNIQLI NTNGSWHINSTALNCNESLNTG
WLAGLFYQHKFNSSGAPERLAS CRRLTDFAQGWGPISYANGSGLDERPYAWHYPPRPGI VPAKSVC GPVYCFTP
SPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLG NWFGCTWMNSTGFTKVC GAPPAVIGGVGNNTLLAPTDAFR
KHPE ATYSRAGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGG VEHRLA AACNWTRGERADLED RDRSEH
HHHHH (SEQ ID NO:2)

[0273] >Δ 123E2₆₆₁

[0274] MNPLLILTFVAAALAETHQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTG WLAGLFYQHKFNSSGCPERLAS
CGSSGCWHYPPRPGI VPAKSVC GPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLG NWFGCTWM
NSTGFTKVC GAPPCGSSGCPTDCFRKHPEATYSRCG SGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGVEH
RLEA ACNWTRGERCDLED RDRSEHHHHHHH (SEQ ID NO:3)

[0275] >Δ 123E2₆₆₁M+C597A

[0276] MNPLLILTFVAAALAETHQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTG WLAGLFYQHKFNSSGAPERLAS
CGSSGAWHYPPRPGI VPAKSVC GPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLG NWFGCTWM
NSTGFTKVC GAPPA GSSGAPTDAFRKHPEATYSRAG SGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGVEH
RLEA ACNWTRGERADLED RDRSEHHHHHHH (SEQ ID NO:4)

[0277] 蛋白的表达。对于镍亲和纯化, 在培养于添加有青霉素 / 链霉素 / 两性霉素 B (Invitrogen 公司) 的 FreeStyle™ 表达培养基 (Invitrogen 公司) 的 FreeStyle™293-F 细胞 (Invitrogen 公司) 中表达蛋白。将所有细胞维持于 37° C、具有 8%CO₂ 的湿润培养箱中。根据生产商的指导, 通过用基于 pcDNA3.1 的表达质粒和 293fectin 转染试剂 (Invitrogen 公司) 进行转染, 在 FreeStyle™293-F 细胞中瞬时表达每种蛋白。将总体

积 180ml 的细胞以终浓度 1×10^6 个活细胞 /ml 转染,并于 37°C 、在具有 8% CO_2 的湿润培养箱中,在以 150rpm 旋转的轨道摇床 (IKA 公司) 上的无菌震动烧瓶 (Corning 公司) 中培养 5 天。转染后 24h,向所述细胞培养物中添加胰蛋白胍 N1 (Organotechnie 公司,法国) 至终浓度为 0.5%v/v。通常在转染后 5 天收获所述细胞培养物。用 4-20%Tris-甘氨酸 SDS 聚丙烯酰胺凝胶将细胞培养物上清液样品电泳来检测蛋白表达,并用考马斯亮蓝试剂染色来使蛋白可见。对于蛋白纯化,通过 2500rpm 离心收获细胞培养物上清液,接着通过 0.45 μM 过滤器 (Nalgene 公司),之后进行层析。

[0278] 镍亲和纯化。过滤后,用镍琼脂糖将细胞培养物上清液进行固定金属亲和层析 (IMAC),以纯化野生型和变异的 E2-his 蛋白。纯化过程描述如下:

[0279] 1. 缓冲液: Ni-MAC 缓冲液 A (50mM NaH_2PO_4 , pH8.0, 300mM NaCl, 10mM 咪唑)。Ni-MAC 缓冲液 B (洗脱液) (50mM NaH_2PO_4 , pH8.0, 300mM NaCl, 500mM 咪唑)。

[0280] 2. 方案: 于 $4-8^\circ \text{C}$ 实施步骤 2-6。用 5 倍体积的重蒸水洗涤在 10ml Poly-Prep 柱 (Bio-Rad 公司) 中的 1ml 镍琼脂糖 6Fast Flow 树脂 (GE Healthcare 公司)。用 10ml Ni-MAC 缓冲液 A 平衡所述柱。将样品加载至所述柱,收集透过物 (B/T)。用 10ml Ni-MAC 缓冲液 A 洗涤所述柱。用 5ml Ni-MAC 缓冲液 B (洗脱液) 洗脱所述蛋白,收集到 1ml 级分。用 96-孔板规格的 Bradford 测定和考马斯亮蓝染色的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶确定峰级分。将峰级分汇合到一起,用 $1 \times \text{PBS}$ 于 4°C 透析过夜。透析后,用 96-孔板规格的 Bradford 测定和 1mg/ml BSA 的标准曲线确定蛋白浓度。

[0281] 凝胶过滤层析。在 S 缓冲液 (0.3M NaCl, 0.1M Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.02% 叠氮化物, pH8.0) 中平衡 Superdex200 柱 (PC3.2/30)。加载约 300 μg 蛋白,以 0.5ml/min 运行,并于 280nm 处监测吸光度。

[0282] 抗体。由单克隆抗体 24 (MAb24) 识别的表位对位于 E2 的 411-428 残基之间的保守表位具有特异性。由单克隆抗体 44 (MAb44) 识别的表位对位于基因型 1E2 序列的 512-529 残基之间的表位具有特异性。由 MAb53 识别的表位为构象依赖性的 {Deleersnyder, 1997#288}。

[0283] 免疫沉淀。如此前所述,利用以每孔 3.5×10^5 个细胞接种于 6 孔组织培养皿 (Nunc 公司) 中的 293T 细胞对所分泌的 E2661-his 进行放射性标记,并用 2 μg 的 pE2661 或空 pcDNA3 载体进行共转染。转染后 24hr,将所述细胞在半胱氨酸-和甲硫氨酸-缺陷型 DMF10 (MP Biomedicals 公司) 中孵育 30min,然后添加 100 μCi Trans ^{35}S -标记 (ICN 公司,加州科斯塔梅萨市),持续 4h,然后转移至低血清培养基 (OptiMEM, Invitrogen 公司) 中 18h。于 4°C 以 $14,000 \times g$ 离心 10min 以使该组织培养液澄清,用 MAb H53 抗体免疫沉淀后进行 SDS-PAGE 分析和放射性同位素成像。

[0284] 实施例 1: 在全长 E2 糖蛋白与 E1 共表达的背景下单独的半胱氨酸二硫键取代突变

[0285] 如 Krey 等人所提议,2010 (同上),有关 E2 的结构域结构的二硫键分配,如图 1 和表 2 所示。在源自 HCVpp 中的基因型 1a 分离物 H77c 的 E1E2 背景下,评估将单独的半胱氨酸取代为丙氨酸对 E2 折叠和功能的影响。Cys 至 Ala 的取代废除了 HCVpp 感染 Huh7 肝癌细胞的能力,这表明 E2 的 9 个二硫键对细胞进入能力很关键 (图 2A)。用 MAb H52 (针对 E2) 和 MAb A4 (针对 E1) 对转染细胞裂解物进行蛋白质印迹分析表明,E1 和 E2 以野生型水

平表达 (图 2B)。然而,在生物合成标记的 HCVpp 免疫沉淀中,构象依赖性 E2 特异性 MAbs、H53 的使用表明,所述突变在糖蛋白复合体中已经导致了缺陷。

[0286] 结构域 I。很少或没有 HCVpp- 相关的 E2 分别针对二硫键 1 突变体 C429A 和 C552A 被 H53 免疫沉淀,这与折叠和 / 或病毒粒子结合缺陷一致。使用融合至麦芽糖结合蛋白 (MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹) 的重组体形式的 CD81 大胞外环 (LEL) 的固相 CD81- 结合测定表明,两个突变体均无 LEL- 结合活性 (图 2C)。这些数据与所提出的 C429 和 C552 在结构域 I 的中央 β - 夹层内形成长距离二硫键的作用一致。C564 和 C569 的突变在结构域 I 底部形成二硫键 5,因此对于 E2 折叠和功能,具有与针对 C569A 而非针对 C564A 获得的 H53- 反应性 E2 不一致的影响。尽管将 C569A 并入 HCVpp 中,但是该突变体未与 E1 形成异二聚体,并显示 70%- 下降的 CD81 结合能力 (图 2C)。

[0287] 结构域 II 包含通过邻近的半胱氨酸残基之间相对短距离键合所形成的二硫键 2 (C452-C459)、3 (C486-C494) 和 4 (C503-C508)。C452A 突变体 (二硫键 2) 将野生型水平的 E2 并入 HCVpp,而其对应物 C459A 在 H53- 反应性 E2 上有明显减少;两个突变体均未与 E1 形成异二聚体。还观察到 CD81- 结合功能降低:对于 C452A 为 80%,对于 C459A 为 40%。C486A 突变体 (二硫键 3) 以 WT 水平并入了 HCVpp,而缺少其二硫键- 键合伴侣 C494A。C486A 突变体未与 E1 形成异二聚体,但保留了约 80% 的 WT LEL- 结合活性。二硫键 4 半胱氨酸的突变还导致与 H53- 反应性 E2 以及针对 C503A 而非 C508A 获得的 E1 不一致的影响。两个突变体均缺少 CD81- 结合功能。

[0288] 结构域 III 包含二硫键 6 (C581-C585)、7 (C597-C620) 和 8 (C607-C644),并通过二硫键 9 (C652-C677) 与茎区相连。C597 和 C620 参与形成二硫键 7 尚未得到证实,因此是推测性的 (Krey 等人,2010 (同上))。而 H53- 反应性 E2 在针对 C581A 和 C585A (二硫键 6) 的野生型水平上获自 HCVpp,这些突变体均未与 E1 形成异二聚体,并显示出 CD81- 结合降低 20-40%。对于推测的二硫键 7,C597A 导致 H53- 可沉淀的 E2 明显减少,而 C620A 作为 E1E2 复合体呈现;两个突变体均缺少 LEL- 结合功能。二硫键 8 突变即 C607A 或 C644A 为不可接受的,因为 H53 反应性 E2 未在 HCVpp 中检测到。最后,尽管将 C652A 和 C677A (二硫键 9) 以野生型水平并入至 HCVpp,但它们显示出与 E1 的异二聚化降低。然而,两个突变体均基本上保留了 CD81 结合,这与其位置邻近 (C652) 或在 E2 茎内 (C677) 内一致,E2 茎远离 CD81 结合区和结构域 III。

[0289] 实施例 2: 同时诱变参与二硫键形成的半胱氨酸对

[0290] HIV 包膜糖蛋白 gp120/gp41 复合体的 Cys- 至 -Ala 扫描表明,单独的半胱氨酸突变并不有利于功能蛋白的折叠,而同时 Ala 取代在 10 个中的 2 个二硫键中挽救了折叠和功能二者 (van Anken 等人, Mol Biol Cell 119:4298-309, 2008)。为减少由于存在非配对的半胱氨酸导致的蛋白错配趋势,同时进行每个二硫键对的 Ala- 取代。对于双 Cys- 至 -Ala 突变体,通过蛋白质印迹,证实了 E1 和 E2 的细胞内表达和多蛋白加工 (图 3A),但是,缺乏 HCVpp 进入活性 (数据未示出)。对于 C452A/C459A (结构域 II)、C581A/C585A 和 C652A/C677A (结构域 III),观察到了 H53- 反应性 E2 并入 HCVpp,后者未与 E1 形成异二聚体 (图 3A)。在这 3 种情况中,还将组分单一突变体并入至 HCVpp (参见图 2B)。在这 3 种突变体中,C581A/C585A 和 C652A/C677A 保留了 CD81 结合活性 (图 3B)。对于其他双突变体,未观察到与 HCVpp 有关的 H53- 反应性 E2 蛋白。这些数据表明,E2 糖蛋白有效并入 HCVpp 和

CD81- 结合功能并不需要结构域 III、C581-C585 和 C653-C677 中的 2 个二硫键。这些数据还表明,通过取代二硫键- 结合伴侣后去除不配对的 Cys,没有减轻与具体 Cys- 至 -Ala 突变有关的功能缺陷。

[0291] 实施例 3: 在截短的 E2 糖蛋白 (E2₆₆₁-his) 中的单独半胱氨酸和两两二硫键取代突变

[0292] 接下来,在 E2 的受体结合结构域(残基 384-661, E2₆₆₁-His) 背景下评估 Cys- 至 -Ala 突变的影响, E2 独立于 E1 折叠,保留了 Krey 等人,2010(同上) 描述的 3 个结构域结构,并保留了 CD81 和 SRB1 结合功能。所有突变体均以野生型水平分泌自转染的 293T 细胞,正如代谢标记的蛋白通过 C- 末端 6-His 标签与抗 -His 抗体的免疫沉淀所示(图 4A, 上部图块)。E2₆₆₁-His 突变体除一个以外的所有 MAbs H53- 反应性属性大部分反映了所观察的相应 E1E2 突变体的反应性属性(图 4A, 第 2 和第 3 图块,参见图 2B)。因此,对 H53 反应性为必需的 Cys 残基包括 C494、C508(DII)、C552、C564(DI)、C607 和 C644(DIII),而 C452、C459、C486、C503(DII)、C569、C581、C585(DI)、C597、C620 和 C652(DIII) 对于这项功能是非必需的(图 4A, 第 2 和第 3 图块)。C429A 突变体为异常者,因为在 E2₆₆₁-His 背景下 H53 结合未改变,但在病毒粒子并入的 E1E2 中被 H53 的识别降低。在非还原条件下,通过 SDS-PAGE 检测 H53- 反应性突变体(图 4A, 第 2 图块)揭示了对应于单体(约 60-80kDa)、二聚体(约 100-110kDa) 和更高阶种类的阶梯条带,其对于野生型而言也观察到了。

[0293] E2₆₆₁-His 中 C- 末端 6-His 标签的存在,使得能够独立于 H53 反应性评估 CD81LEL 结合活性(图 4A, 底部图块;图 4B)。当根据二硫键配对考虑 Cys- 至 -Ala 突变体时,分辨出相对于 H53 反应性的 3 种方式的 LEL 反应性:(1)Ala 取代二硫键对的至少 1 个 Cys 后,H53 反应性的丧失预测了两个突变体即 C429-C552(DI) 和 C503-C508(DII) 的 LEL- 结合功能降低或丧失;(2) 有助于二硫键的任一个 Cys 的 Ala- 取代后 H53 反应性水平预测了两个突变体即 C581-C585(DIII)、C452-C459(DII)、C597-C620(DIII) 和 C607-C644(DIII) 的 LEL- 结合功能水平;(3) 二硫键对中的一个半胱氨酸对于 H53 和 CD81 反应性不是必需的,而另一个对于这些功能是必需的:C569(二硫键 5, DI) 和 C486(二硫键 3, DII) 对于获得 H53 折叠或 CD81 结合功能不是必需的。在 652 处的游离 Cys 的突变不影响 H53 或 CD81-LEL 结合,这表明该残基对于 E2₆₆₁ 折叠不是必需的。

[0294] 实施例 4:E2 受体结合结构域(E2₆₆₁) 中的二硫键对突变

[0295] 单个 Cys- 至 -Ala E2₆₆₁-his 突变体中非配对的半胱氨酸的存在,会由于形成非天然二硫键而导致错误折叠的蛋白。因此,确定了参与二硫键形成的 Cys 残基的同时 Ala 取代是否能够挽救 E2₆₆₁-His 背景下的缺陷型单个 Cys- 至 -Ala 突变体的表型。保留了 C452A/C459A、C581A/C585A、C597A/C620A 和 C607A/C644A 的 MAbs H53 和 LEL 反应性,尽管双突变体的 CD81-LEL 结合活性倾向于低于单组分突变体的该活性(图 5A, B)。尤其是,C452A/C459A 的单组分突变具有 WT CD81-LEL 结合功能,而双突变体仅保留了 40% 的该活性。相比之下,通过一个或两个组分半胱氨酸 [C429A/C552A(DI)、C564A/C569A(DI)、C486A/C494A(DII) 和 C503A/C508A(DII)],与 LEL 结合功能丧失有关的单个 Cys- 至 -Ala 突变的组合并未恢复功能。将构象依赖性 MAbs, CBH-4B、-4D 和 -4G 用于探测结构域 II 突变体的构象。图 5C 显示, MAbs 反应性明显降低(C452A/C459A 的 CBH-4B 和 -4G, 40%LEL 结合) 或缺乏(C486A/C494A 和 C503A/C508A), 这表明双突变改变了结构域 II 的构象。这些数据表明,二硫键 1 和 5(DI)

以及二硫键 3 和 4(DII) 对于维持 WT 折叠和 LEL 结合活性是必要的,而二硫键 2(DII)、7 和 8(DIII) 则并非严格需要但有助于 H53 和 LEL 结合活性。相比之下,C581A/C585A(DIII) 对于这些功能是非必要的。

[0296] 实施例 5:E2 折叠中耐受多个游离半胱氨酸

[0297] 通过 Ala 取代,对参与形成二硫键的单独半胱氨酸进行的两两分析表明,在 452、459、486、569、581、585 或 652 处缺少 Cys 残基并不一定不利于 E2 折叠。为了确定 E2 折叠如何耐受未成对的 Cys 残基存在,对含有多个 Cys-Ala 取代的 E2₆₆₁-His 突变体进行表型分析。起初,将显示 WT 表型 (C452A、C486A、C569A、C581A、C585A 和 C652A) 的 Cys-Ala 突变合并至 E2₆₆₁-his (指定为“M”) 中。所述 M 突变体表现出野生型水平的 H53 和 LEL 反应性 (图 6A 和 B),这表明多个位置处的游离半胱氨酸被 E2 折叠耐受。在不同程度上影响 CD81- 结合功能的其他突变即 C459A、C597A 和 C607A (参见图 4),被单独地添加至所述 M 构建体中。所述 M+C597A 和 M+C607A 突变体的 H53 和 LEL 结合特征与单独的 C597A 和 C607A 突变体的所述特征大部分一致 (分别为野生型相对于降低的 H53 和 LEL 反应性)。相比之下,M+C459A 所显示出的 LEL 结合降低约 16 倍,这与 C459A 的所述野生型 LEL 结合活性不对应。同时将 C459A、C597A 和 C607A 以各种组合引入 M 对 H53 识别和 / 或 LEL 结合功能 (图 6) 有不利影响。这些数据表明,E2₆₆₁ 的 LEL- 结合活性折叠 (LEF-binding comptent fold) 对于不成对 Cys 残基的存在具有明显高水平的耐受。

[0298] 实施例 6 :E2 受体结合结构域内的构象可塑性

[0299] 为进一步研究 E2₆₆₁-his 对二硫键突变的耐受性,以不同的组合引入 C452A (结构域 II)、C486A (结构域 II)、C569A (结构域 I) 和 C597A (结构域 III) 的两两突变;单独的突变体保留了 H53 反应性和 CD81 结合 (图 4A 和 B)。通过抗 -HIS、MAb H53 检测,所有双突变体均得到有效表达和分泌,并保留了 WT 或接近 -WT 水平的 CD81 结合 (图 7)。还使用结构域 II 反应性构象敏感 MAb 研究 C452A-C486A、C452-C459A 和 C459A-C494A 的抗原属性。所述 C452A-C486A 突变体显示出野生型水平的 CBH-4B 和 CBH-4D 反应性,而与 CBH-4G 的反应性降低了。相比之下,C459A-C494A 未能被任何结构域 II 特异性 MAb 识别。这与涉及 C569A 和 C486A 的预测的二硫键对突变后获得的结果相反,其中丧失了 H53 反应性和 CD81 结合 (图 5A 和 B)。这些结果总体表明, (i) 获得 E2 受体结合结构域的天然折叠并不需要 C452,因此 C459 并不必需参与二硫键中, (ii) 获得 H53 表位和 CD81 结合并不需要 C597 和涉及该残基的二硫键对, (iii) C486 和 C494 的同时突变不利于 H53 反应性和 CD81 结合,然而,这些功能可耐受 C452 和 C486、C486 和 C569 或者 C486 和 C597 突变,这表明 C494 不需要参与二硫键中。

[0300] 实施例 7:E2₆₆₁-his 分子间的分子间二硫键形成

[0301] Whidby 等人,2009 (同上) 报道了用 Ser 取代在位置 652 处的游离 Cys 后,E2₆₆₁-His (基因型 2a) 的单体:二聚体的比率增加。与这些观察相反,H53 免疫沉淀和非还原 SDS-PAGE 之后,并未观察到 C652A 的 E2₆₆₁-His 二聚体或高阶寡聚体的明显降低 (图 4A)。为了排除由于样品煮沸或通过构象依赖性 MAb (H53) 的选择性免疫沉淀而导致的可能的硫醇-二硫键重排,用 GNA 凝集素亲和层析纯化放射性标记的 E2₆₆₁-His 蛋白,用于蓝色-非变性 PAGE 分析。如图 8A 所示,作为单体、二聚体、三聚体和高阶种类呈现的野生型和 C652A E2₆₆₁-His 蛋白具有几乎相同的电泳属性。E2 种类的定量表明,相对于 WT,针对 C652A 的单

体有约 10%- 增加。该增加并非由于二聚体或三聚体形式的降低所致,而是由较高分子量种类转变为单体。其他单独的 Cys- 至 -Ala 突变体的电泳属性类似于野生型的所述属性(数据未示出)。保留 H53 和 LEL 结合活性的“M+597A”突变体表现出的单体产量增加约为总蛋白的 60%,是 WT 和在所有较高分子量种类中明显降低的 C652A 中所观察到的两倍多(图 8B)。在天然条件下获得的这些数据与通过用 MAbs H53 免疫沉淀和 SDS-PAGE 分析所检测到的在较高分子量种类的降低是一致的(图 6A)。这些数据表明,在 C452、C486、C569、C581、C585、C597 存在下(即,在 M+C597A 中缺少)形成的异常二硫键有助于高阶 E2₆₆₁-His 种类的形成。

[0302] 实施例 8 :讨论

[0303] 丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 在介导病毒附着于包括 CD81 在内的细胞受体中起着关键作用,并且是体液免疫反应的靶标。HCV 附着于细胞表面受体以后,病毒进行融合,据认为是取决于 E2 与糖蛋白 E1 的结合。此前的研究表明,异二聚化是通过 E1 和 E2 的跨膜结构域和 E2 的膜近侧区(残基 675-599)介导的(Ciczora 等人, J Gen Virol 86:2793-8, 2005;Ciczora 等人,病毒学杂志 (J Virol) 81:2372-81, 2007;Drummer 和 Pountourios, J Biol Chem 279:30066-72, 2004)。E1 和 E2 的生物合成折叠途径并为得到彻底阐述。对 E1E2 异二聚体的功能形式的折叠很关键的是分别存在于 E1 和 E2 中的 8 和 18 保守半胱氨酸残基。根据单克隆抗体定位研究的结果和允许 II 类融合蛋白模仿 E2 的二硫键排列,有人认为糖蛋白 E2 具有 3 个免疫原性结构域(Keck 等人, 2004(同上);Krey 等人, 2010(同上))。如本文所述,根据最近由 Krey 等人, 2010(同上)在 E1E2 和分离的受体结合结构域(E2₆₆₁)背景下所做的描述,本发明是基于对 E2 中单个半胱氨酸残基的全面诱变分析及其提议的二硫键对而完成的。对于 E2₆₆₁ 维持生物合成、与构象依赖性单克隆抗体的反应性和 CD81 结合所需的最少数目的二硫键已经得以描述,从而揭示出 E2₆₆₁ 可容许相当数目的非配对半胱氨酸以及二硫键 6 和 / 或 9 的丧失。

[0304] 据认为结构域 I 是由通过两个二硫键(1 和 5)稳定的 8 条反向平行的 β 链组成。大多数 CD81 相互作用表面位于结构域 I 中,但据认为部分地与结构域 III 重叠。二硫键 1 或 5 的诱变表明,二者对于 E2 被病毒并入,以及对于 E2₆₆₁ 折叠为结合构象依赖性抗体 H53 和 CD81 的结构均为必需的。因此,二硫键 1 和 5 对于结构域 I 的结构完整性是必需的(图 9 中的 C429/555 和 C564/569)。然而,由于 C452、C486、C569、C581、C585、C597 和 C652 同时突变时维持野生型水平的 H53 和 CD81 反应性,因此结构域 I 容许游离硫醇基在其他结构域中的存在。而且,在多个突变体 C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 中 E2₆₆₁ 折叠为较高分子量种类(二聚体、三聚体和高阶寡聚体)的倾向性降低,从而导致从转染的细胞中分泌的单体 E2₆₆₁ 的量明显增加。这些数据表明,残基 C459、C494、C564 和 C620 处的游离硫醇基在 E2₆₆₁ 中是耐受的且有利于使异常二硫键的形成最小化。

[0305] 结构域 II 由 β - 折叠片 D0 和 E0 延伸,并且其特征是存在通过邻近 Cys 残基的配对形成的 3 个二硫键。长距离二硫键的缺乏使得意味着该结构域可能是灵活的(Krey 等人, 2010(同上))。描述 3 个免疫原性结构域的单克隆抗体的应用表明,结构域 A 可能是灵活的并能响应低 pH 而移动(Keck 等人,病毒学杂志 (J Virol) 79:13199-208, 2005)。结构域 II 内二硫键对的诱变表明,C486/C494(二硫键 3)和 C503/C508(二硫键 4)对于 E2 的病毒粒子并入,以及 H53 表位形成、结构域 A 抗体和 CD81 结合位点的反应性是必需的。据推断,

结构域 II 对应于结构域 A。尽管远离 CD81 结合位点,但二硫键 3 和 4 分别直接邻近高变区 2 和结构域 II 内的预测的融合环。这意味着该结构的形成对于邻近的结构域 I/III 亚结构形成和它们的相关功能是必需的。相比之下, C452/C459(二硫键 2) 的诱变维持了部分对 H53 的反应性、结构域 A 抗体和 CD81 结合,这表明其对 E2 的结构完整性并不那么重要。确实,在该位点产生了游离硫醇基的 C452 或 C459 的单个突变,在病毒粒子并入的 E2 和 E2₆₆₁ 两者中,对于 H53 反应性和 CD81 结合而言是耐受的。

[0306] 通过诱变两对中每对的一个残基研究了 E2₆₆₁ 对非配对半胱氨酸存在的耐受程度。基于单个突变不改变 CD81 结合或 H53 反应性来选择所述分析的残基。C452(二硫键 2 中) 和 C486(二硫键 3 中) 或者 C564 和 C569(二硫键 5 中) 的突变导致了保留野生型水平的 CD81 结合的 H53 反应性 E2₆₆₁ 的表达。该结果与完全去除二硫键 2(452/459) 导致 CD81 结合活性下降 60% 相反。这些结果表明,结构域 II 内 C459 或 C494 处的游离硫醇基相比完全去除二硫键 2 或 3 对形成位于结构域 I 和 III 内的 CD81 结合位点更有利。这可能意味着,在 E2 生物合成期间, C452、C486 和 C569 负责降低恰当折叠的 E2₆₆₁ 产量的异常二硫键形成。预测较少存在 E2₆₆₁ 与这些突变体的单独和 / 或组合的寡聚体形式。或者,这些氨基酸在与 C452/C459 形成不稳定二硫键的二硫键交换过程中,可以为该交换机制和 C452 与 C486 和 C569 中间物配对的替代性配对的终产物。不可能的是 C452 与结构域 II 中 C486 的稳定二硫键有关,因为尽管保留了野生型 CD81 结合,但去除该 Cys 对降低了结构域 A 抗体的反应性。而且, C459/C494 的诱变(如果 C452 和 C486 形成二硫键配对,则替代性配对) 废除了 H53 和 CD81 结合(图 7)。

[0307] 观察的病毒粒子并入的 E2 和 E2₆₆₁ 的作用方式类似于单半胱氨酸突变和提议的二硫键的双取代(图 9)。这证明,表达与 E1 联合表达的全长 E2 和分离的受体结合结构域的二硫键排列类似,且很大程度上证明了由 Krey 等人,2010(同上) 提出的排列。其例外是结构域 III 内的二硫键 7 和 8。任一个二硫键的诱变导致了 E1E2 中丧失 H53 反应性和 CD81 结合,在 E2₆₆₁ 中保留了这些功能。所述数据表明,含有茎区的 E2 和带有糖蛋白 E1 的 TMD 的表达,增加了结构域 III 对作为二硫键 7 和 8 诱变结果的结构变化的易感性。

[0308] 如本文所述,针对 E2₆₆₁ 的 CD81 结合活性结构的形成仅需存在 3 个二硫键: C429/552(结构域 I)、C503/508(结构域 II) 和 C607/677(结构域 III)。对于其余的半胱氨酸,所述二硫键可被去除(C581/585, C652/677) 或为非配对的 C494、C459、C569 和 C620,而不影响该构象能力。另外,游离硫醇基在 C494、C459、C569 和 C620 的存在出人意料地有利于量较大的单体 E2₆₆₁ 的形成。

[0309] 在 HIV-1gp120/gp41 的 Cys- 至 -Ala 诱变研究中,针对 10 个二硫键观察了诱变的等级效果,大多数突变不利于造成所述包膜复合体的折叠(van Anken 等人,2008(同上))。单个 Cys- 至 -Ala 突变的效果在涉及 gp120/gp41 的折叠和结合的对内的双突变中进行了总结。在一种情况下,单个 cys- 至 -ala 突变不利于病毒复制,而去除所述对恢复了复制。相比之下,在 HCV E2 中,二硫键中的半胱氨酸单独突变导致了不一致的效果。C564、C494 和 C508 的突变废除了 H53 反应性和 CD81 结合,而其二硫键对中的半胱氨酸 C569、C486 和 C503 维持了这些功能中的一个或两个。这意味着所述半胱氨酸的位置和方向使得单个诱变导致所述对中其余的半胱氨酸形成废除了 H53 和 CD81 结合的异常二硫键。相反,其伴侣 Cys 的空间环境当以游离硫醇基存在时阻碍了其参与形成二硫键,并且 E2 折叠成为准天然

结构。或者,通过突变为丙氨酸而去除亲水侧链不利于局部构象,并且丧失了 H53 和 CD81 反应性。C564、C508 和 C494 诱变为 Ser 会解决这种可能性。

[0310] HCV E2 的 9 个二硫键中的每一个对于形成进入活性结构都是完全必要的。这与针对 HIV-1gp120/gp41 观察到的两个二硫键对于病毒复制并不必需正相反 (van Anken 等人, 2008 (同上))。在 E2 中, 并入了二硫键 6 突变体的 HCVpp 保留了 H53 反应性、与 E1 形成异二聚体和 CD81 结合, 但无法进入细胞。可能的是, 其缺陷在 CD81 结合后发生, 且可能和由与其他细胞受体如 SR-B1、claudin-1 和密封蛋白 (occludin) 相互作用诱导的构象变化或与病毒融合相关的低 pH 依赖性构象变化有关。二硫键 6 的位置邻近被视为充当结构域 I 和 III 之间铰链的 igVR (Krey 等人, 2010 (同上))。在黄病毒糖蛋白 E 中, 暴露于低 pH 改变了结构域 III 的质量中心 (centre of mass), 使其位移 $33\text{\AA}$, 使得病毒粒子-膜固定的茎和邻近的 TMD 与目标膜固定的融合环并列, 从而驱使膜融合 (Bressanelli 等人, *Embo J* 23:728-38, 2004)。我们的数据表明, 二硫键 6 对于 E2 的 igVR 实施类似功能可能是必需的。

[0311] 该研究的结果对于 E1E2 结构和功能提供了新的视角, 并揭示了合成量较大的保留 CD81 结合功能的单体 E2 的新方法。另外, 该研究验证了提议的 E2 的二硫键排列, 并证实分离的 E2 受体结合结构域和病毒粒子并入的 E2 可能具有同样的二硫键排列。因此, 所述修饰的 HCV E2RBD 为产生预防疫苗和解析三维结构的结晶化研究提供了先导候选物。

[0312] 实施例 9: 在野生型 E2₆₆₁ 和 $\Delta 123\text{E}2_{661}$ 中同时突变 C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A (M+C597A) 导致构象依赖性单克隆抗体 H53 识别的分泌形式的 E2 的表达

[0313] 为检测 C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 的同时突变是否也能阻止在 E2₆₆₁ 的第二修饰形式中形成分子间二硫键, 其中 3 个可变区、高变区 1 (HVR1)、高变区 2 (HVR2) 和所述基因型间的可变区 (igVR) 被去除 (HVR1) 或被柔性 Gly-Ser-Ser-Gly 连接子 (HVR2 和 igVR) 取代。本实施例表明, 在 WT E2₆₆₁ 和 $\Delta 123\text{E}2_{661}$ 中 C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 的突变导致从转染的 293T 细胞中表达类似量的通过构象依赖性单克隆抗体 H53 免疫沉淀的蛋白。这表明, 如通过 MAb H53 所检测的, C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 的同时突变不影响蛋白表达水平或 WT E2₆₆₁ 和 $\Delta 123\text{E}2_{661}$ 的构象 (参见例如, 图 10)。

[0314] 实施例 10: 通过中和单克隆抗体和构象依赖性抗体 H53 识别 WT E2₆₆₁ (M+C597A) 和 $\Delta 123\text{E}2_{661}$ (M+C597A) 蛋白

[0315] 接下来, 确定具有 C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 同时突变的 WT E2₆₆₁ 和 $\Delta 123\text{E}2_{661}$ 是否能被防止 HCV 体外感染肝细胞的单克隆抗体识别。在涂覆有相似量 E2₆₆₁M+C597A、 $\Delta 123\text{E}2_{661}$ M+C597A 和非突变形式 E2₆₆₁ 和 $\Delta 123\text{E}2_{661}$ 的酶免疫测定板中连续稀释单克隆抗体。结果表明, MAb24 (411-428) 和 MAb44 (512-529) 均以相对于内部对照 (涉及 C-末端表位标签的抗-His) 的类似水平识别野生型和 M+C597A 蛋白, 并与用构象依赖性非中和抗体 H53 所观察到的结合类似。这些结果表明, C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 的突变不改变 H53、MAb24 和 MAb44 所识别的 E2₆₆₁ 或 $\Delta 123\text{E}2_{661}$ 的抗原性 (参见例如, 图 11)。

[0316] 实施例 11: WT E2₆₆₁ (M+C597A) 和 $\Delta 123\text{E}2_{661}$ (M+C597A) 蛋白被针对 WT E2₆₆₁ 和

$\Delta 123E2_{661}$ 引起的免疫血清识别

[0317] 经证实, $E2_{661}$ (M+C597A) 和 $\Delta 123E2_{661}$ (M+C597A) 蛋白被针对 $E2_{661}$ 和 $\Delta 123E2_{661}$ 的非突变亲本形式产生的免疫血清识别。按 3 周间隔 3 次以 $100 \mu\text{g}$ 蛋白接种豚鼠, 从而产生针对 $E2_{661}$ 和 $\Delta 123E2_{661}$ 的免疫血清。在涂覆有相似量非突变的亲本 $E2_{661}$ 、非突变的亲本 $\Delta 123E2_{661}$ 、 $E2_{661}$ (M+C597A) 或 $\Delta 123E2_{661}$ (M+C597A) 的酶免疫测定板中连续 $1/210\log$ 稀释最终血液。免疫血清识别了每个蛋白, 同样, 这进一步证实, $E2_{661}$ (M+C597A) 和 $\Delta 123E2_{661}$ (M+C597A) 保留了其亲本对应物的构象 (参见例如, 图 12)。

[0318] 实施例 12: WT $E2_{661}$ (M+C597A) 和 $\Delta 123E2_{661}$ (M+C597A) 蛋白结合 CD81

[0319] 接着, 验证了 $E2_{661}$ (M+C597A) 和 $\Delta 123E2_{661}$ (M+C597A) 蛋白均保留了结合重组体形式的细胞受体 CD81 的能力。将 $E2_{661}$ (M+C597A) 和 $\Delta 123E2_{661}$ (M+C597A) 的连续稀释物添加至涂覆有 $5 \mu\text{g/ml}$ CD81 的酶免疫测定板。用抗 -His 免疫球蛋白与山羊抗 - 兔辣根过氧化物缀合的抗体检测结合的 $E2_{661}$ 。包括了所述 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹E2 结合突变体 F186S, 以揭示每个蛋白获得的结合背景水平 (WT $E2_{661}$ 示出)。结果表明, 非突变亲本形式的 $E2_{661}$ 和 $\Delta 123$ 蛋白显示了与其 $E2_{661}$ (M+C597A) 和 $\Delta 123E2_{661}$ (M+C597A) 对应物类似的结合 CD81 的水平。这些结构提供了在 $E2_{661}$ (M+C597A) 和 $\Delta 123E2_{661}$ (M+C597A) 中形成的 CD81 相互作用表面通过 C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 的同时突变而得以保留的证据 (参见例如,

[0320] 图 13)。

[0321] 实施例 13: (A) WT $E2_{661}$ (M+C597A) 和 (B) $\Delta 123E2_{661}$ (M+C597A) 蛋白的凝胶过滤层析

[0322] 蓝色非变性 PAGE 数据 (图 8) 表明, 单体 $E2_{661}$ 的量从亲本形式的 $E2_{661}$ 的约 20% 增加至 $E2_{661}$ M+C597A 的约 70%。用 Superdex200 尺寸排阻柱通过凝胶过滤层析检测到 $E2_{661}$ 的寡聚化。在该系统中, 将镍亲和纯化的蛋白直接加载至平衡的柱, 根据其大小和形状分离所述蛋白。数据显示, 非突变亲本形式的 $E2_{661}$ 和 $\Delta 123E2_{661}$ 由与单体和二聚体、三聚体和更高分子量种类的分子量一致的 $E2_{661}$ 异源混合物组成。相比之下, C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 的同时突变, 导致与预期的单体糖基化 $E2_{661}$ (A) 和 $\Delta 123E2_{661}$ (B) 分子量一致的单个 $E2_{661}$ 种类的产生。这些结果表明, 在 $E2_{661}$ 中分子间二硫键的形成可能是由 C452、C486、C569、C581、C585、C597 和 C652 中一个或多个介导的, 且 C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 的同时突变废除了 $E2_{661}$ 中分子间二硫键的形成, 同时保留 $E2_{661}$ 结合 CD81 及其被中和 (MAb24, MAb44) 和构象依赖性抗体 (H53) 的识别的能力 (参见例如, 图 14)。

[0323] 实施例 14: E2 与细胞表面受体 CD81 结合的免疫血清抑制

[0324] 免疫血清抑制 HCV 糖蛋白 E2 与 CD81 结合的能力是免疫血清抑制 HCV 进入靶细胞能力的标志。在固相酶免疫测定中检测针对 WT $E2_{661}$ (M+C597A) 和 $\Delta 123E2_{661}$ his (M+C597A) 产生的免疫血清阻断 $E2_{661}$ his 蛋白与 CD81 的重组形式的大胞外环 (MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹) 之间相互作用的能力。

[0325] 在示例性实施例中, 将免疫血清的连续稀释物与 100ng 的 H77c 或 JFH1WT $E2_{661}$ his 蛋白混合, 然后加入至涂覆有 MBP-LEL¹¹³⁻²⁰¹ 的免疫测定板。用抗 -His 抗体检测结合的 $E2_{661}$ his。计算每个血清样品的 80% 抑制滴度, 并绘制点 - 线曲线。该数据将显示使用同源 H77c 和异源 JFH1E2₆₆₁ 的情况下用 WT $E2_{661}$ (M+C597A) 和 $\Delta 123E2_{661}$ his (M+C597A) 接种的动

物是否引起能抑制 E2-CD81 相互作用的高滴定度的抗体。这还将表明,WT 和 $\Delta 123E2_{661}his$ 蛋白的 M+C597A 形式是免疫原性的,且引起能抑制 E2-CD81 结合的抗体。

[0326] 实施例 15:H77c HCVpp 的同源中和

[0327] 使用含有 H77c E1E2 糖蛋白的逆转录病毒的伪型粒子测定免疫血清介导同源中和的能力。将热灭活的免疫血清连续稀释物与 HCVpp 混合,并添加到 Huh7.5 细胞中 4h。洗涤后,将细胞再孵育 3 天,定量细胞裂解物中的荧光素酶活性。测定介导 50% 和 80% 中和所需的抗体滴定度。

[0328] 实施例 16: 免疫血清介导细胞培养物衍生的 J6-JFH1 的交叉中和

[0329] 使用 J6-JFH1 细胞培养物衍生的 HCV 测定免疫血清介导异源中和的能力。将免疫血清的连续稀释物与 J6-JFH1 细胞培养物衍生的 HCV 混合,并添加到 Huh7.5 细胞中。感染后 44h,定量上清液中荧光素酶活性。测定介导 50% 和 80% 中和所需的抗体滴定度。

[0330] 实施例 17 :进一步讨论

[0331] 经证明,在 HCVpp 的背景下,HCV E2 的 9 个二硫键中的每一个及其相应的半胱氨酸残基,对于进入活性结构的形成是绝对需要的。使用构象依赖性单克隆抗体 H53、多克隆抗-E2 抗体表征以及重组 CD81 表征这些突变对 E2 折叠和 CD81 结合活性的影响,从而为病毒粒子并入的 E2 和 $E2_{661}$ 产生了类似的表型属性。这证实,与 E1 一起表达的全长 E2 和分离的受体结合结构域的二硫键排列大部分是相似的。明显的例外为结构域 III 内的二硫键 7 或 8 突变,其导致在 E1E2 的背景下丧失 H53 反应性和 / 或 CD81 结合,但在 $E2_{661}$ 中是部分耐受的。这些数据表明,含有所述茎区的 E2 和带有糖蛋白 E1 的 TMD 的表达,增加了结构域 III 对这些突变体导致的结构变化的易感性。

[0332] 观察到的二硫键突变体对于 H53 反应性和 CD81LEL 结合的影响方式还在很大程度上证实了由 Krey 等人提出的 E2 模型,例如,预测结构域 I (DI) 包含通过两个二硫键 (1 和 5) 稳定的 8 条反向平行的 β 链。大多数 CD81 相互作用表面位于结构域 I 中,但据认为与结构域 III 部分重叠。诱变表明,二硫键 1 对于 E2 被病毒粒子并入和对于 $E2_{661}$ 折叠成结合构象依赖性抗体 H53 和 CD81 的结构为必需的,这与该相对长距离的二硫键对维持 E2 结构完整性的关键作用一致。相反,二硫键 9 对于形成 H53 表位或 LEL 结合不是必需的,这与其位置远离 CD81- 结合位点和与提议的“茎”区重叠一致 (Drummer 等人,2004 (同上))。二硫键 9 突变还对应于失去与 E1 的接触,这与此前报道的该区内的异二聚化决定子一致 (Drummer 等人,2004 (同上))。

[0333] 在 HCVpp 的背景下,所述二硫键 6 突变体维持了 H53 反应性、与 E1 异二聚化 (即便在降低的水平下) 以及 CD81 结合,但不是进入活性的。可能的是,其在 CD81 结合后产生了缺陷,且可能与下述构象变化有关:与其他细胞受体如 SR-B1、Claudin-1 和 / 或密封蛋白 (Occludin) 的相互作用所诱导的构象变化,或与病毒融合相关的低 pH 诱导的构象变化。二硫键 6 的位置邻近被视为充当结构域 I 和 III 之间铰链的 igVR。在黄病毒糖蛋白 E 中,暴露于低 pH 改变了结构域 III 的质量中心,使其位移 $33\text{\AA}$,从而使得病毒膜固定的茎和邻近 TMD 与目标 1 膜固定的融合环并列,驱使膜融合。如本文所述,二硫键 6 对于 E2 的 igVR 实施类似功能可能是必需的。

[0334] 结构域 II 由结构域 I 的 β -折叠片 D0 和 E0 延伸,并且其特征是存在通过邻近 Cys 残基配对形成的 3 个二硫键。长距离二硫键的缺乏使得意味着该结构域在 E2 内可能是相对

灵活的。结构域 II 内二硫键对的诱变表明,二硫键 4 的形成对于 E2 的病毒粒子并入、H53 表位组装以及 CD81 结合功能是必需的。尽管远离 CD81 结合位点,但是二硫键 4 与预测的融合环重叠。这意味着这种结构的形成对于邻近的结构域 I/III 亚结构形成和它们的相关功能是必需的。相比之下, E2₆₆₁ 中二硫键 2 (C452/C452) 的诱变维持了对 H53 和 CD81-LEL 的部分反应性,这表明其对 E2 的结构完整性并不那么重要。值得关注的是, C452 或 C459 的单个突变在任一位点产生了游离硫醇基,这导致野生型水平的 H53 反应性和 CD81-LEL 结合,并因此比完全去除二硫键 2 更有利。可能的是,在预融合的病毒粒子并入形式 E1E2 中, C452 和 C459 以还原状态存在或在结构域 II 亚结构中形成不稳定的二硫键,其中二硫键 2 的形成代表硫醇基二硫键交换的终产物。

[0335] 由于通过在残基 C486、C503 和 C569 处的突变二硫键 3、4 和 5 的中断维持了 WT H53 反应性和 / 或 CD81-LEL 结合,因此还教导了对于 E2₆₆₁ 折叠和 / 或功能中丧失预测的二硫键的高度耐受。然而,对于其二硫键键合伴侣 C494、C508 或 C564 突变后分别观察到不一致的效果—即失去这些功能。对应于预测的二硫键的这些残基的两两突变并未减缓该功能表型的丧失,这表明游离硫醇基的存在不可能通过形成异常二硫键来错配的主要原因,正如此前在 HIV gp120/gp41 复合体 (26) 的类似半胱氨酸诱变研究中所所述。这表明在这些位点的 Cys- 至 -Ala 突变不利于 E2 中的局部构象,从而导致了 H53 和 CD81 结合的丧失。通过突变为丙氨酸而去除亲水侧链可能有助于该表型。在这些位置引入丝氨酸而非丙氨酸可能降低丙氨酸诱导的构象缺陷,并明确了这些半胱氨酸在 E1E2 功能中的作用。

[0336] 使用表型诱变方法描述了 E2₆₆₁ 维持 WT 生物合成、H53 反应性和 CD81 结合所需的最小数目的半胱氨酸残基。同时引入 C452A、C486A、C569A、C597A、C581A、C585A 和 C652A (M+C597A), 导致了维持 H53 和 CD81 结合活性的野生型水平 E2₆₆₁ 的表达。这意味着 C459、C494、C564 和 C620 作为游离硫醇基存在,因为没有证据表明这些残基参与二硫键键合的具体可替代方式。与存在游离硫醇基一致, M+C597A 突变体还表现出降低的形成较高分子量种类的倾向性,从而导致对于任何单个突变体均未观察到的从转染的细胞分泌的单体 E2₆₆₁ 量明显增加。这些数据一起表明,位置 459、494、564 和 620 处的游离硫醇基在 CD81 结合活性 E2₆₆₁ 结构中是耐受的,且其预测的二硫键 - 键合伴侣 (C452、C486、C569 和 C597) 在 E2₆₆₁ 生物合成期间可参与复杂模式的异常分子间二硫键。由于通过 E2₆₆₁ 大部分残基获得的半胱氨酸诱变结果还包括用于 E2 分子之间以及 E1 和 E2 之间二硫键 - 介导的分子间接接触的决定子,正如最近关于成熟 HCV 病毒粒子表面所描述的 (Vieyres 等人, 2010 (同上))。

[0337] 总之,该研究的结果为 E1E2 结构提供了新的视角,并表明病毒粒子并入的 E2 和可溶性 E2₆₆₁ 共享类似的二硫键键合排列。我们已经报道, E2₆₆₁ 的 CD81- 活性结构的形成严格需要在 3 个预测结构域中的每一个结构域中存在 3 个二硫键,所述 3 个预测结构域为: C429-C552A (DI)、C503-C508 (DII) 和 C607-C644 (DIII)。对于其余的半胱氨酸,所述二硫键可被去除 (C581-C585 or C652-C677) 或是非配对的 (C459、C494、C564 或 C620), 而不影响该基本构象要求。我们的数据还表明, E2 内非配对硫醇基的存在可以反映出分子内或分子间二硫键交换的机制。另外, C452、C486、C569、C581、C585、C597 和 C652 的去除有些出人意料地有利于形成量较大的功能性单体 E2₆₆₁, 并可能标志着合成量较大的可溶性 E2 作为用于结晶化研究和解析三维结构的先导候选物的新方法。

[0338] 如实施例 9-13 所述,同时将 7 个半胱氨酸突变为丙氨酸 (M+C597A)、同时保留

CD81 结合、被构象依赖性抗体识别和随后大量增加单体产量的能力,并不限于重组 E2₆₆₁ 的亲本形式。在 3 个可变区已经被去除 ($\Delta 123$) 的重组形式的 E2₆₆₁ 中,C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 的突变,通过凝胶过滤,也导致其作为单体蛋白表达,并且所述蛋白保留了野生型水平的 CD81 结合和 H53 反应性。这些数据表明, $\Delta 123$ 的二硫键连接形式的形成也可通过 C452A、C486A、C569A、C581A、C585A、C597A 和 C652A 的突变而得到阻止。

[0339] 在不背离本发明范围的情况下对于本领域技术人员来说许多修改将是显而易见的。

[0340] 表 1 :HCV 糖蛋白 E2 中保守半胱氨酸的位置

[0341]

突变	相对位置	结构域分配
C429A	1	I
C452A	2	II
C459A	3	II
C486A	4	II
C494A	5	II
C503A	6	II
C508A	7	II
C552A	8	I
C564A	9	I
C569A	10	I
C581A	11	III
C585A	12	III
C597A	13	III
C607A	14	III
C620A	15	III
C644A	16	III
C652A	17	III
C677A	18	茎

[0342] 表 2 :HCV 糖蛋白 E2 的 18Cys 残基的二硫键配对

[0343]

配对	结构域	二硫键数目
C429-C552	I	1
C564-C569	I	5

[0344]

C581-C585	III	6
C452-C459	II	2
C486-C494	II	3
C503-C508	II	4
C597-C620	III	7
C607-C644	III	8
C652-C677	III	9

[0345] 表 3 :合适的天然存在的能生成蛋白的氨基酸

[0346]

氨基酸	单字母代码	3 字母代码
L- 丙氨酸	A	Ala
L- 精氨酸	R	Arg
L- 天冬酰胺	N	Asn
L- 天冬氨酸	D	Asp
L- 半胱氨酸	C	Cys
L- 谷氨酰胺	Q	Gln
L- 谷氨酸	E	Glu
甘氨酸	G	Gly
L- 组氨酸	H	His
L- 异亮氨酸	I	Ile
L- 亮氨酸	L	Leu

L- 赖氨酸	K	Lys
L- 甲硫氨酸	M	Met
L- 苯丙氨酸	F	Phe
L- 脯氨酸	P	Pro
L- 丝氨酸	S	Ser
L- 苏氨酸	T	Thr
L- 色氨酸	W	Trp
L- 酪氨酸	Y	Tyr
L- 缬氨酸	V	Val

[0347]

[0348] 表 4 :氨基酸次分类

[0349]

亚类	氨基酸
酸性	天冬氨酸、谷氨酸
碱性	非环状：精氨酸、赖氨酸；环状：组氨酸
带电	天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸
小	甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸、脯氨酸
极性/中性	天冬酰胺、组氨酸、谷氨酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、 苏氨酸
极性/大	天冬酰胺、谷氨酰胺
疏水	酪氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯 丙氨酸、色氨酸
芳香的	色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸
影响链方向的残基	甘氨酸和脯氨酸

[0350] 表 5 :示例性及优选的氨基酸取代

[0351]

最初的残基	示例性取代	优选的取代
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

[0352]

[0353] 参考文献：

[0354] Atherton 和 Shephard, 肽合成 (Peptide Synthesis), Nicholson 编著, 合成疫苗 (Synthetic Vaccines), 布莱克科学出版公司 (Blackwell Scientific Publications) 出版, 第 9 章

- [0355] Ausubel 等人, 细胞免疫学 (Cell Immunol.), 193(1):99-107, 1999 Ausubel 等人, 分子生物学最新指南 (Current Protocols in Molecular Biology), Green Pub. Associates and Wiley-Interscience 出版社, 纽约, 1988
- [0356] Ausubel 等人, 分子生物学最新指南 (Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley&Sons Inc, 第 10 和 16 章, 1994
- [0357] Bandyopadhyay 和 Temin, 分子细胞生物学 (Mol. Cell. Biol.) 4:749-754, 1984
- [0358] Berglund 等人, 生物工艺学 (Biotechnology) 11:916-920, 1993
- [0359] Berkner 等人, 生物技术 (BioTechniques) 6:616-629, 1988
- [0360] Berkner, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:39-66, 1992
- [0361] Bird, 科学 (Science) 242:423, 1988
- [0362] Breakefield 和 Geller, Mol. Neurobiol. 1:339-371, 1987
- [0363] Bressanelli 等人, Embo J 23:728-38, 2004
- [0364] Buchschacher 和 Panganiban, 病毒学杂志 (J Virol) 66:2731-2739, 1982
- [0365] Carter 等人, Bio/Technology 10:163-167, 1992
- [0366] Carter 等人, Proc. Nat. Acad. Sci. 89:4285 1992
- [0367] Ciczora 等人, J Gen Virol 86:2793-8, 2005
- [0368] Ciczora 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 81:2372-81, 2007
- [0369] Clackson 等人, 自然 (Nature) 352:624-628, 1991
- [0370] Coligan 等人, 蛋白质科学实验指南 (Current Protocols in Protein Science) 第 1、5 和 6 章, John Wiley&Sons 出版公司, 1995-1997, Colowick 和 Kaplan 编著, 酶学方法 (Methods In Enzymology), 学术出版社 (Academic Press, Inc.)
- [0371] Dayhoff 等人, 蛋白序列和结构图册 (Atlas of Protein Sequence and Structure), 国家生物医药研究基金会 (Natl. Biomed. Res. Found.), 华盛顿特区, 1978
- [0372] Dayhoff 编著, 蛋白序列和结构图册 (Atlas of Protein Sequence and Structure), 国家生物医药研究基金会 (National Biomedical Research Foundation), 华盛顿特区, 第 5 卷, 第 345-358 页
- [0373] Drummer 和 Pournourios, J Biol Chem 279:30066-72, 2004
- [0374] Drummer 等人, FEBS Lett 546:385-90, 2003
- [0375] Drummer 等人, Biochem Biophys Res Commun 328:251-257, 2005
- [0376] Drummer 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 76:11143-7, 2002
- [0377] Drummer 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 80:7844-53, 2006
- [0378] Fields 和 Knipe 编著, 基础病毒学 (Fundamental Virology) 第 2 版, 1991 Fields 等人编著, 病毒学 (Virology) 第 3 版, Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, 1996
- [0379] Fink 等人, Ann. Rev. Neurosci. 19:265-287, 1996
- [0380] Fink 等人, Hum. Gene Ther. 3:11-19, 1992
- [0381] Fraser 等人, J Biol Chem 2011, In print
- [0382] Freese 等人, Biochem. Pharmacol. 40:2189-2199, 1990
- [0383] Gonnet 等人, 科学 (Science), 256(5062):1443-1445, 1992
- [0384] Gorziglia 和 Kapikian, 病毒学杂志 (J Virol) 66:4407-4412, 1992

- [0385] Harris 等人, J Biol Chem 285:21092-102, 2010
- [0386] Helseth 等人, 病毒学杂志 (J Virol), 64:2416-2420, 1990
- [0387] Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988
- [0388] Johnson 等人, 病毒学杂志 (J Virol), 66:2952-2965, 1992
- [0389] Joklik 编著, 病毒学 (Virology), 第 3 版, 1988
- [0390] Jones 等人, 自然 (Nature) 321:522-525, 1986
- [0391] Kabat 等人, 具有免疫学重要性的蛋白的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第 5 版, 美国卫生和公共服务部 (US Department of Health and Human Services), PHS, NIH, NIH 出版号 No. 91-3242, 1991
- [0392] Keck 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 78:9224-32, 2004
- [0393] Keck 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 79:13199-208, 2005
- [0394] Kielian 和 Rey, Nat Rev Microbiol 4:67-76, 2006
- [0395] Kohler 和 Milstein, 自然 (Nature) 256:495-499, 1975
- [0396] Kortt 等人, 蛋白工程 (Protein Engineering) 10:423, 1997
- [0397] Kozak 和 Shatkin, 酶学方法 (Methods Enzymol), 60:360-375, 1979
- [0398] Kozak, 生物化学 (Biochimie.), 76(9):815-21, 1994
- [0399] Kozak, J Cell Biol, 108(2):229-241, 1989
- [0400] Kozak, Mamm Genome, 7(8):563-74, 1996
- [0401] Krey 等人, PLoS Pathog 6(2):e1000762, 2010
- [0402] Kunkel 等人, 酶学方法 (Methods Enzymol), 154:367-382, 1987
- [0403] Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492, 1985
- [0404] Larrick 等人, Bio/Technology 7:934, 1989
- [0405] Liu 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439, 1987
- [0406] Madzak 等人, J. Gen. Virol. 73:1533-1536, 1992
- [0407] Mann 和 Baltimore, 病毒学杂志 (J Virol), 54:401-407, 1985
- [0408] Margolskee, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:67-95, 1992
- [0409] Marks 等人, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991
- [0410] McCaffrey 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 81:9584-90, 2007
- [0411] Miller 等人, 病毒学杂志 (J Virol), 62:4337-4345, 1988
- [0412] Miller 等人, Mol. Cell. Biol. 5:431-437, 1985
- [0413] Miller, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:1-24, 1992
- [0414] Morrison 等人, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984
- [0415] Moss, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:25-38, 1992
- [0416] Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11341-11348, 1996
- [0417] Muzyczka, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158:97-129, 1992
- [0418] Naldini 等人, 科学 (Science), 272:263-267, 1996
- [0419] Newton 和 Graham eds., PCR, Introduction to Biotechniques Series, 2nd ed., Springer Verlag, 1997
- [0420] Ohi 等人, Gene 89:279-282, 1990

- [0421] Owsianka 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 80:8695-704, 2006
- [0422] Padlan 等人, Mol. Immunol. 28:489-498, 1991
- [0423] Page 等人, 病毒学杂志 (J Virol), 64:5270-5276, 1990
- [0424] Pedersen 等人, J. Mol. Biol. 235:959-973, 1994
- [0425] Petropoulos 等人, 病毒学杂志 (J Virol), 66:3391-3397, 1992
- [0426] Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992
- [0427] Quantin 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2581-2584, 1992
- [0428] Ream 等人编著, Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press, 1998
- [0429] Reichmann 等人, 自然 (Nature) 332:323-329, 1988
- [0430] 雷明顿药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences), 18th Ed., Mack Publishing, Company, Easton, PA, U. S. A., 1990
- [0431] Roberge 等人, 科学 (Science), 269(5221):202-204, 1995
- [0432] Roccasecca 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 77:1856-67, 2003
- [0433] Rose 等人, 实验指导手册 (A Laboratory Course Manual), 冷泉港实验室, 冷泉港出版社, 纽约, 1990
- [0434] Rosenfeld 等人, 细胞 (Cell) 68:143-155, 1992
- [0435] Russell 和 Hirata, 自然—遗传学 (Nature Genetics) 18:323-328, 1998
- [0436] Sambrook 等人, 分子克隆: 实验指南 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 冷泉港实验室, 冷泉港出版社, 纽约, 第 13、16 和 17 部分, 1989
- [0437] Schneider 等人, 自然—遗传学 (Nature Genetics) 18:180-183, 1998
- [0438] Sharp 和 Cowe, 酵母菌 (Yeast), 7:657-678, 1991
- [0439] Shimada 等人, J. Clin. Invest. 88:1043-1047, 1991
- [0440] Sorge 等人, Mol. Cell. Biol. 4:1730-1737, 1984
- [0441] Stratford-Perricaudet 等人, Hum. Gene Ther. 1:241-256, 1990
- [0442] van Anken 等人, Mol Biol Cell 19:4298-309, 2008
- [0443] Vieyres 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 1810-10, 2011
- [0444] Vieyres 等人, 病毒学杂志 (J Virol) 84(19):10159-10168, 2010
- [0445] Ward 等人, 自然 (Nature) 334:544, 1989
- [0446] Watson 等人, 基因分子生物 (Molecular Biology of the Gene), 第 4 版, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987
- [0447] Weir 和 Blackwell 编著, 实验免疫学手册 (Handbook of Experimental Immunology), 第 I-IV 卷, 布莱克威尔科学出版社 (Blackwell Scientific Publications), 1986
- [0448] Whidby 等人, 病毒学杂志 (Journal of Virology) 83(21):11078-11089, 2009
- [0449] Wilkinson 等人, 核酸研究 (Nucleic Acids Res.), 20:2233-2239, 1992
- [0450] Winter 和 Harris, TIPS 14:139, 1993
- [0451] Wittig 等人, Nat Protocol:418-28, 2006
- [0452] Zubay, 生物化学 (Biochemistry), 第 3 版, Wm. C. Brown 出版社, 1993。

[0001]

序列表

<110> 麦克法兰博尼特医学健康研究公司

<120> 修饰的丙型肝炎病毒蛋白

<130> KHP13212034.6

<140> AU2010903478

<141> 2010-08-04

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 299

<212> PRT

<213> 丙型肝炎病毒

<400> 1

Met Asn Pro Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val Ala Ala Ala Leu Ala Glu
1 5 10 15
Thr His Val Thr Gly Gly Asn Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu Val
20 25 30
Gly Leu Leu Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr
35 40 45
Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser
50 55 60
Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn
65 70 75 80
Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Arg Arg Leu Thr Asp
85 90 95
Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Ser Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Leu
100 105 110
Asp Glu Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly Ile
115 120 125
Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
130 135 140
Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser
145 150 155 160
Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro
165 170 175

[0002]

Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
 180 185 190
 Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly Asn
 195 200 205
 Asn Thr Leu Leu Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala
 210 215 220
 Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Met
 225 230 235 240
 Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr
 245 250 255
 Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
 260 265 270
 Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp
 275 280 285
 Arg Asp Arg Ser Glu His His His His His
 290 295

<210> 2

<211> 299

<212> PRT

<213> 丙型肝炎病毒

<400> 2

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

[0003]

```

Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser
  130                135                140
Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser
  145                150                155                160
Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro
                165                170                175
Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe
                180                185                190
Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Ala Val Ile Gly Gly Val Gly Asn
                195                200                205
Asn Thr Leu Leu Ala Pro Thr Asp Ala Phe Arg Lys His Pro Glu Ala
                210                215                220
Thr Tyr Ser Arg Ala Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Met
  225                230                235                240
Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr
                245                250                255
Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu
                260                265                270
Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Ala Asp Leu Glu Asp
                275                280                285
Arg Asp Arg Ser Glu His His His His His His
                290                295

```

```

<210> 3
<211> 248
<212> PRT
<213> 丙型肝炎病毒

```

```

<400> 3
Met Asn Pro Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val Ala Ala Ala Leu Ala Glu
  1                5                10                15
Thr His Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile
                20                25                30
Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu
                35                40                45
Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu
                50                55                60
Arg Leu Ala Ser Cys Gly Ser Ser Gly Cys Trp His Tyr Pro Pro Arg
  65                70                75                80

```

[0004]

```

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

```

```

<210> 4
<211> 248
<212> PRT
<213> 丙型肝炎病毒

```

```

<400> 4
Met Asn Pro Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val Ala Ala Ala Leu Ala Glu
1              5              10              15
Thr His Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile
      20              25              30
Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu
      35              40              45
Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Ala Pro Glu
      50              55              60
Arg Leu Ala Ser Cys Gly Ser Ser Gly Ala Trp His Tyr Pro Pro Arg
      65              70              75              80

```

[0005]

Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys			
	85	90	95
Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala			
	100	105	110
Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr Asp Val Phe Val Leu Asn			
	115	120	125
Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn			
	130	135	140
Ser Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Ala Gly Ser Ser			
	145	150	155
Gly Ala Pro Thr Asp Ala Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ser			
	165	170	175
Arg Ala Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro Arg Cys Met Val Asp Tyr			
	180	185	190
Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Ile Asn Tyr Thr Ile Phe			
	195	200	205
Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Glu Ala Ala			
	210	215	220
Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Ala Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg			
	225	230	235
Ser Glu His His His His His His			
	245		

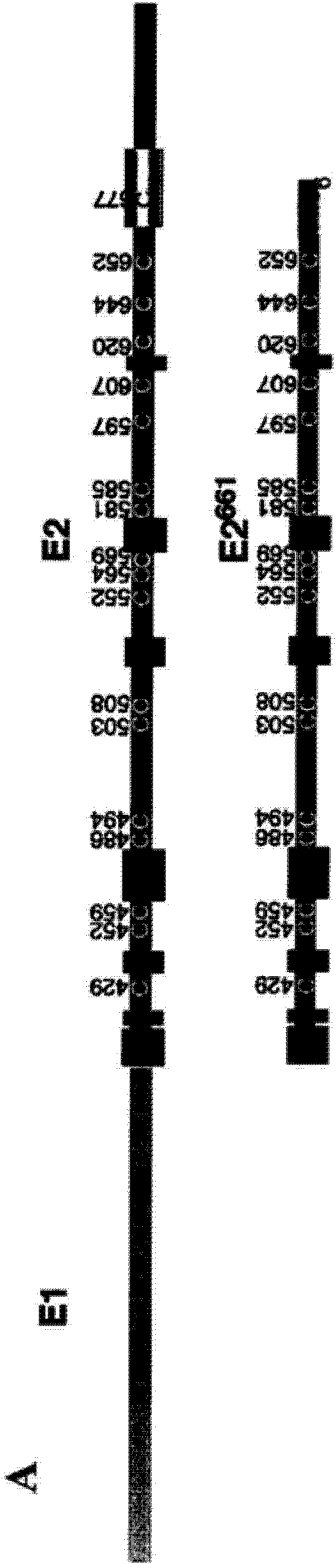


图 1

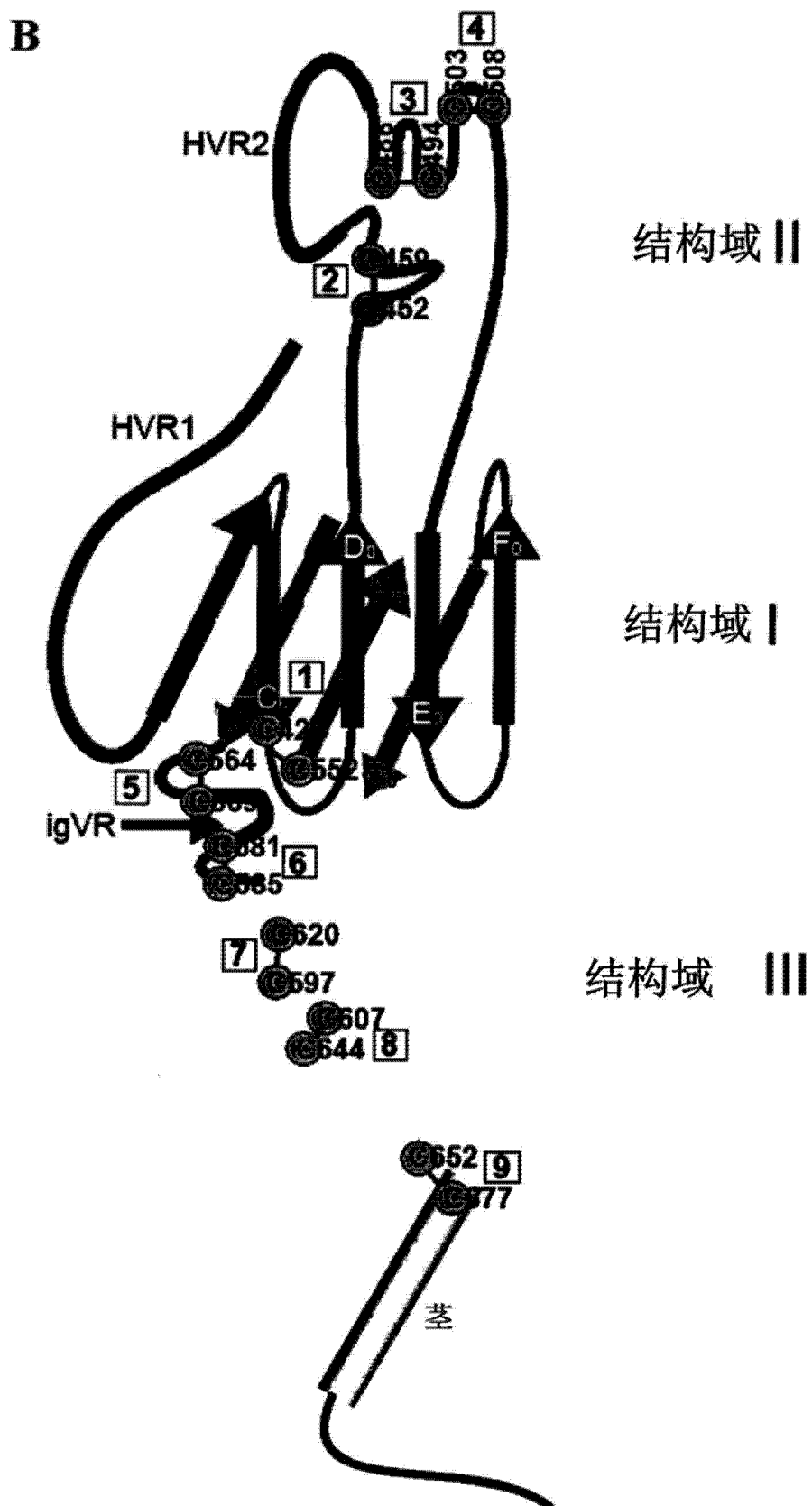


图 1(续)

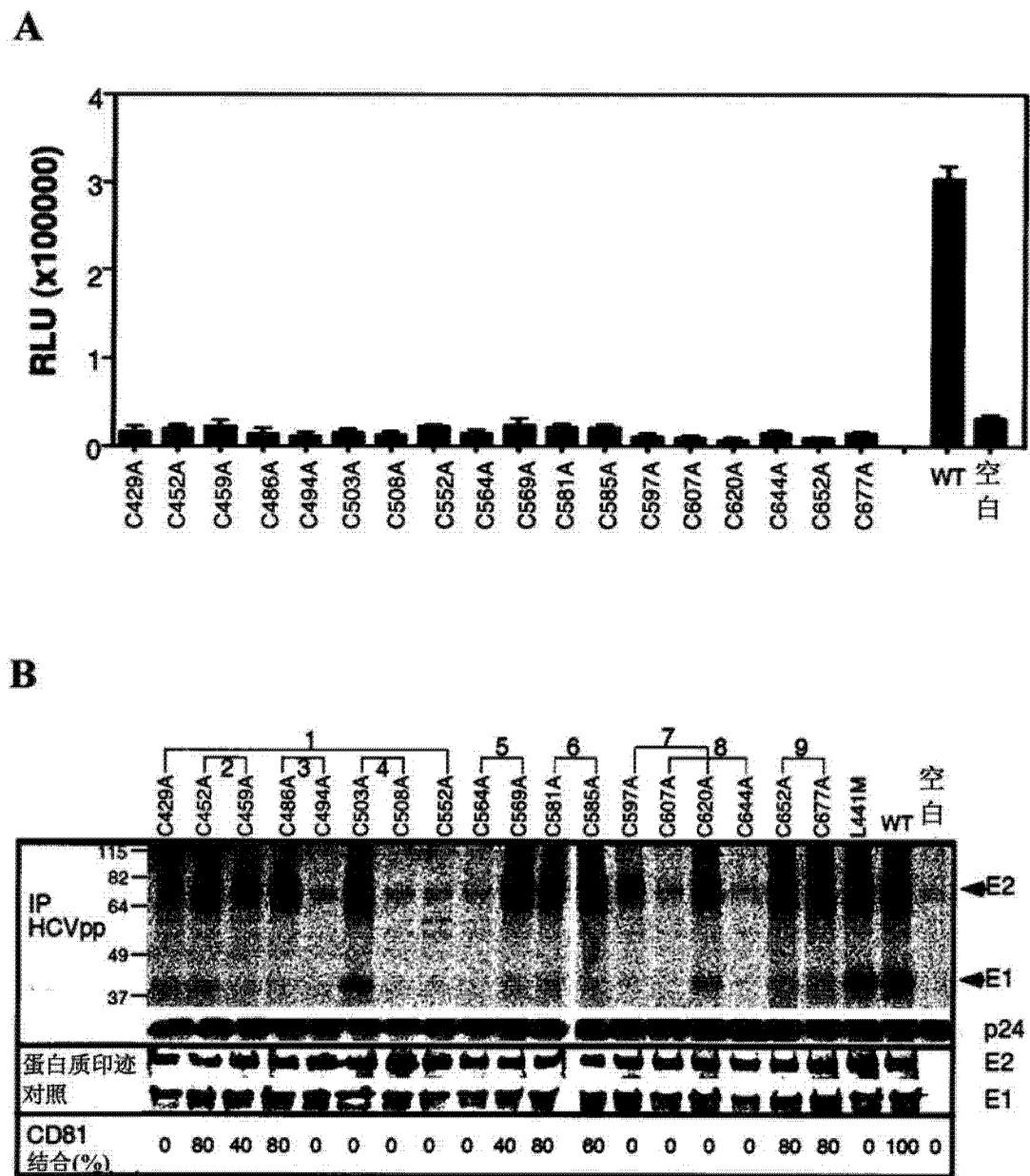


图 2

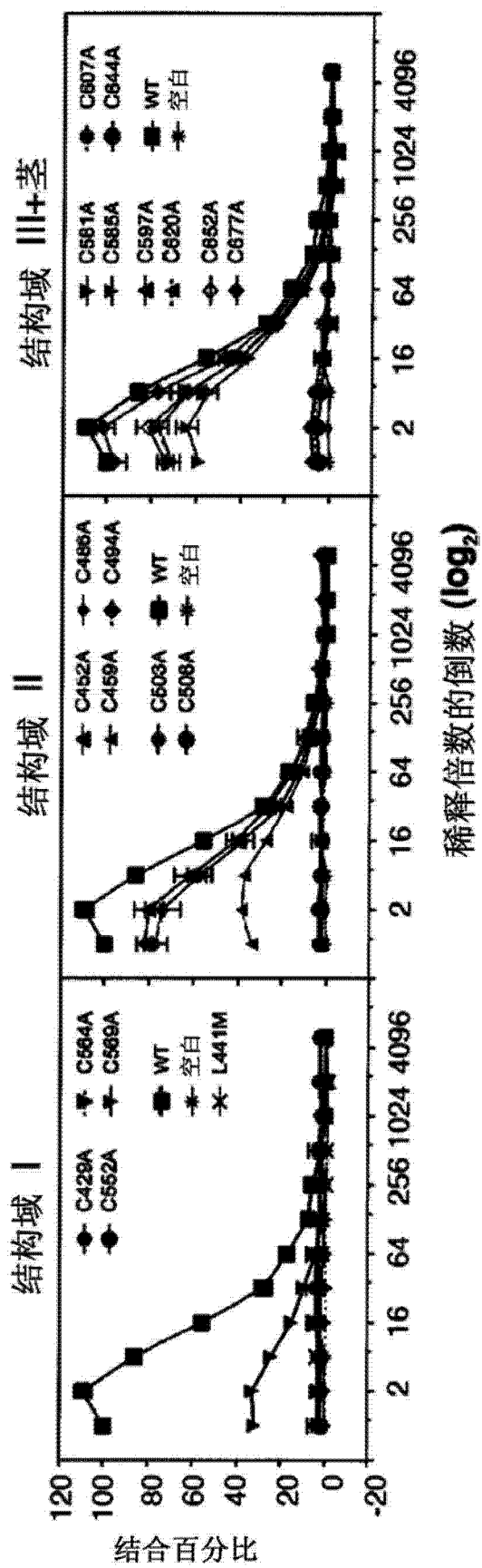


图2(续)

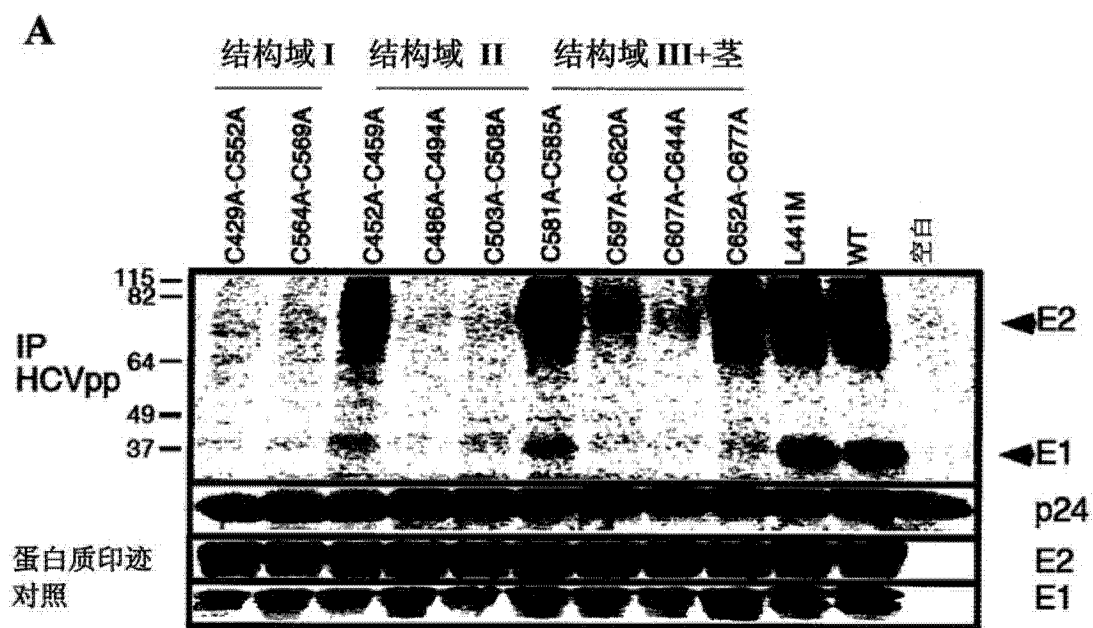
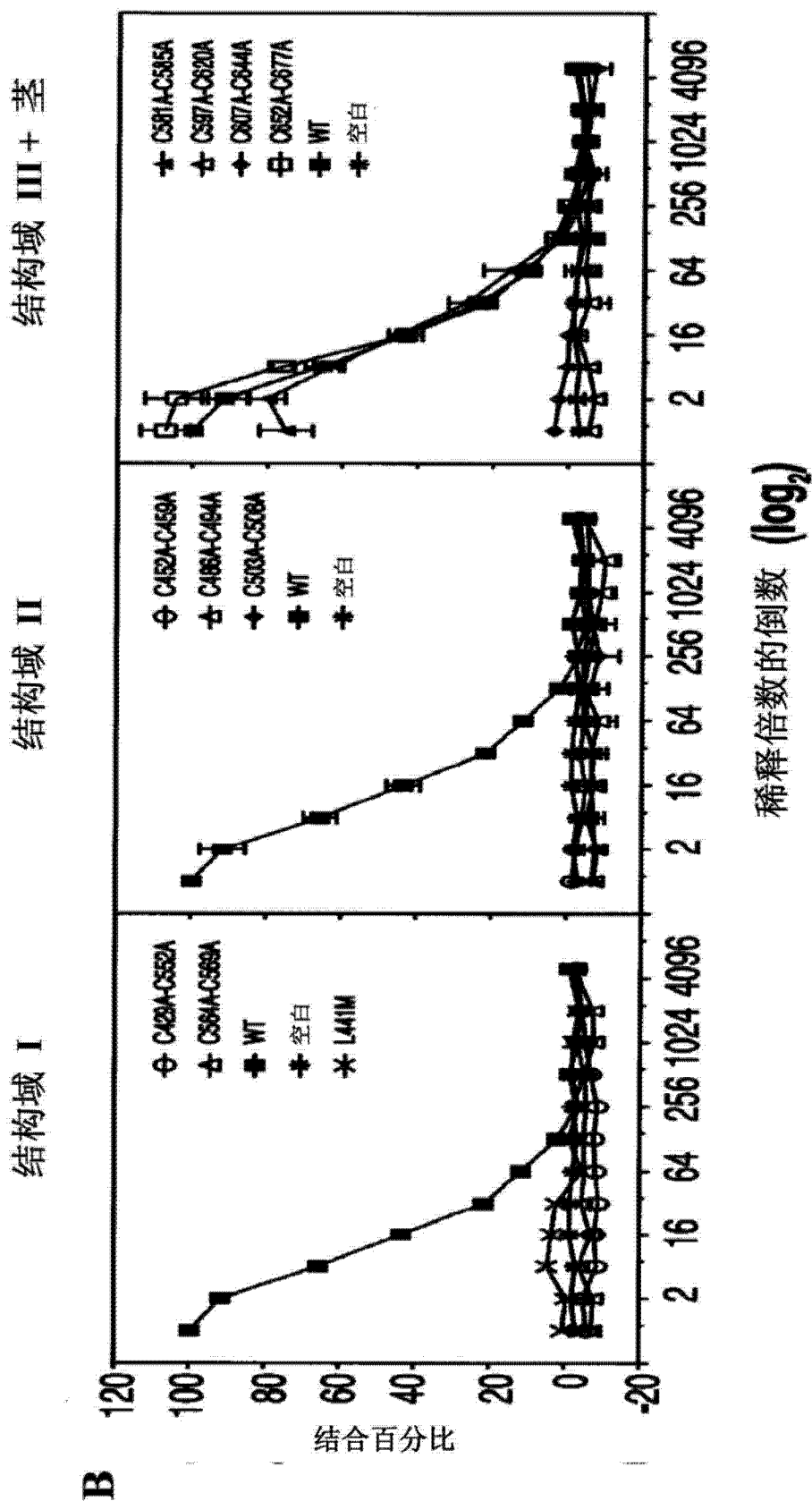


图 3



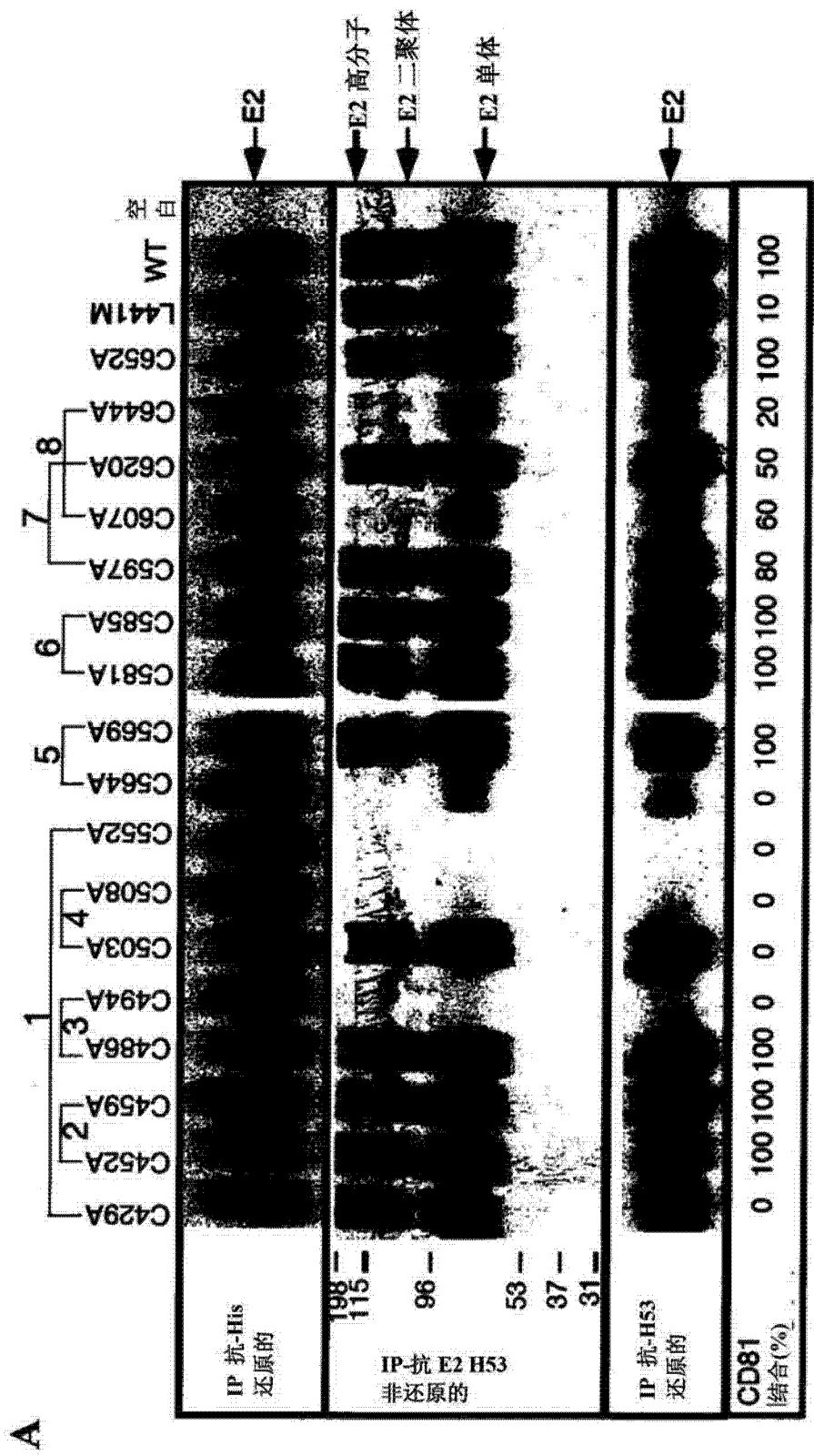


图 4

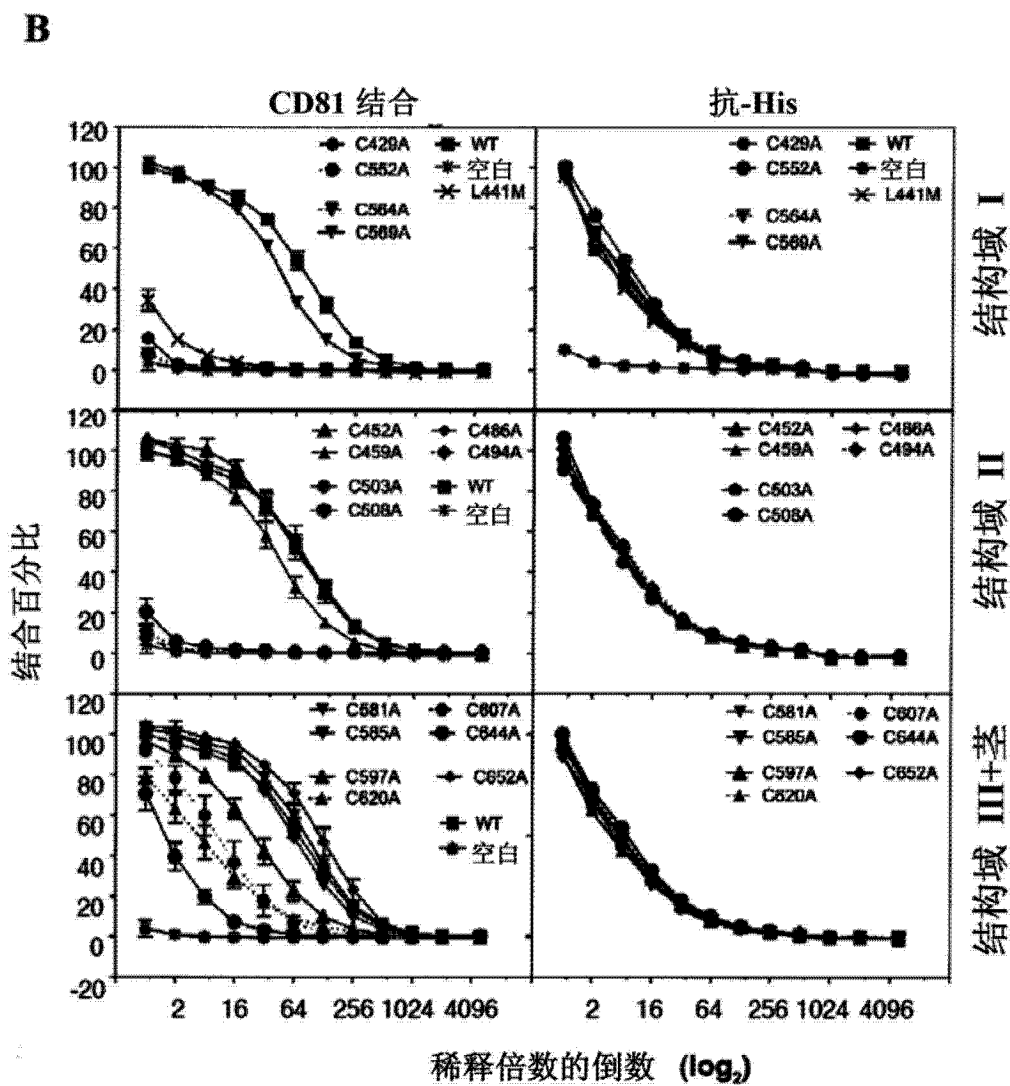


图 4(续)

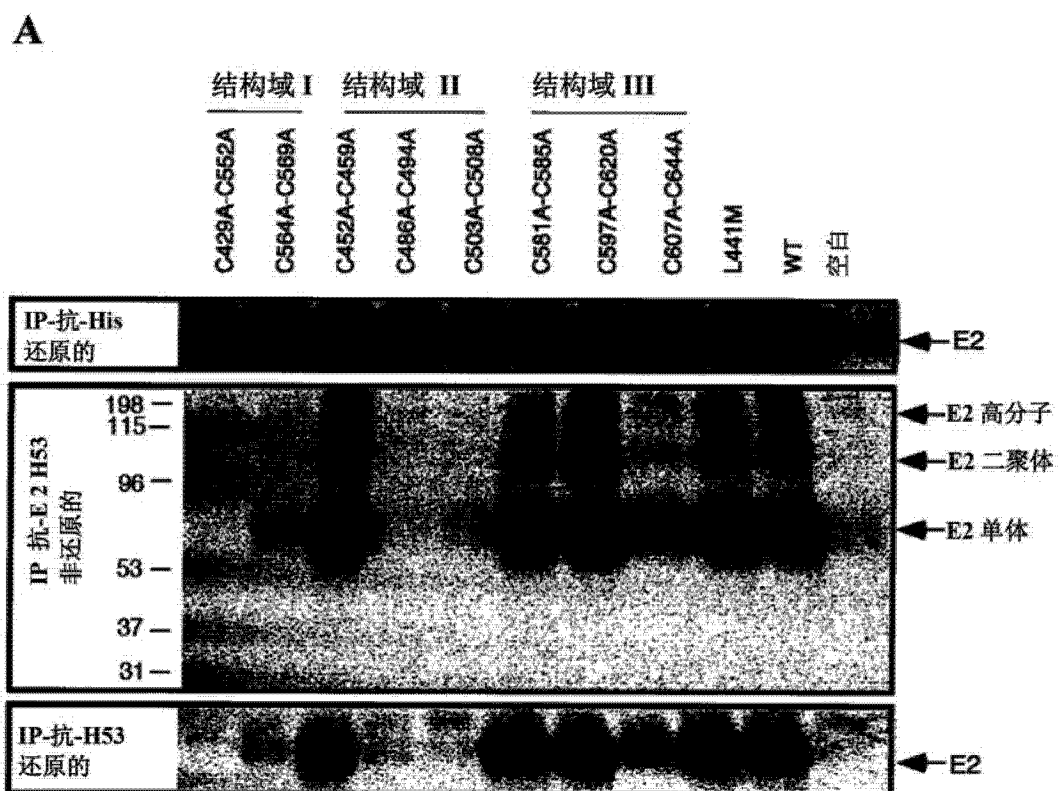


图 5

B

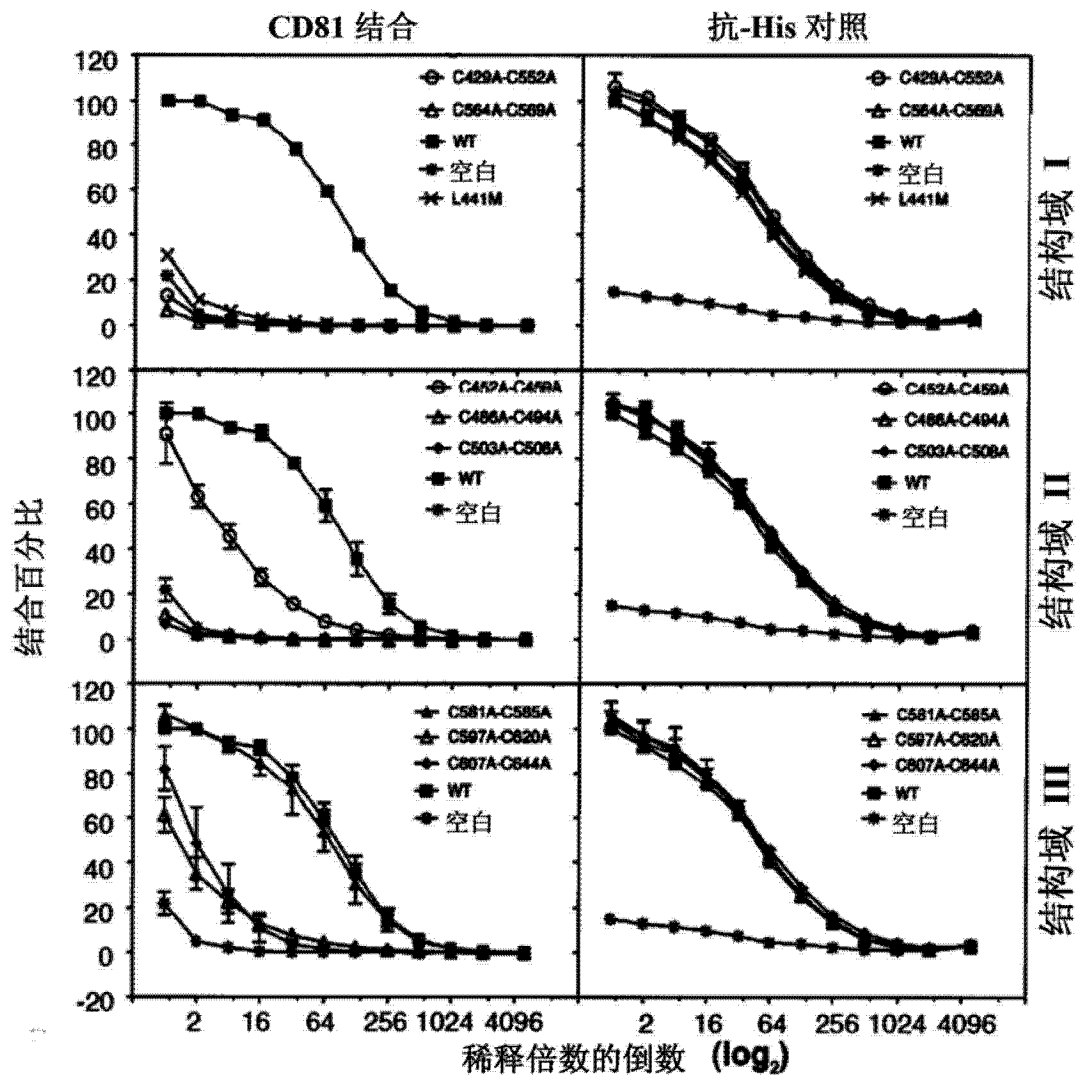


图 5(续)

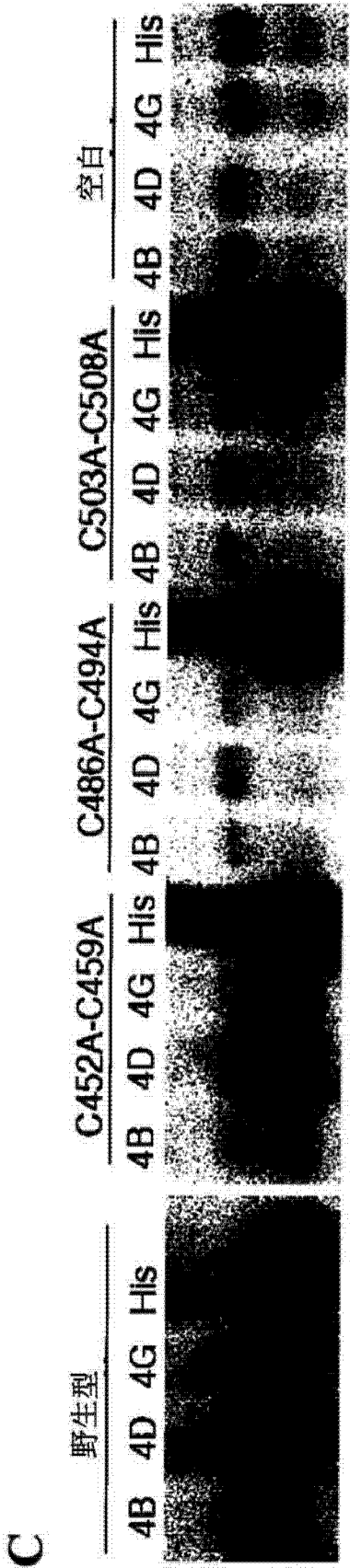


图 5(续)

A

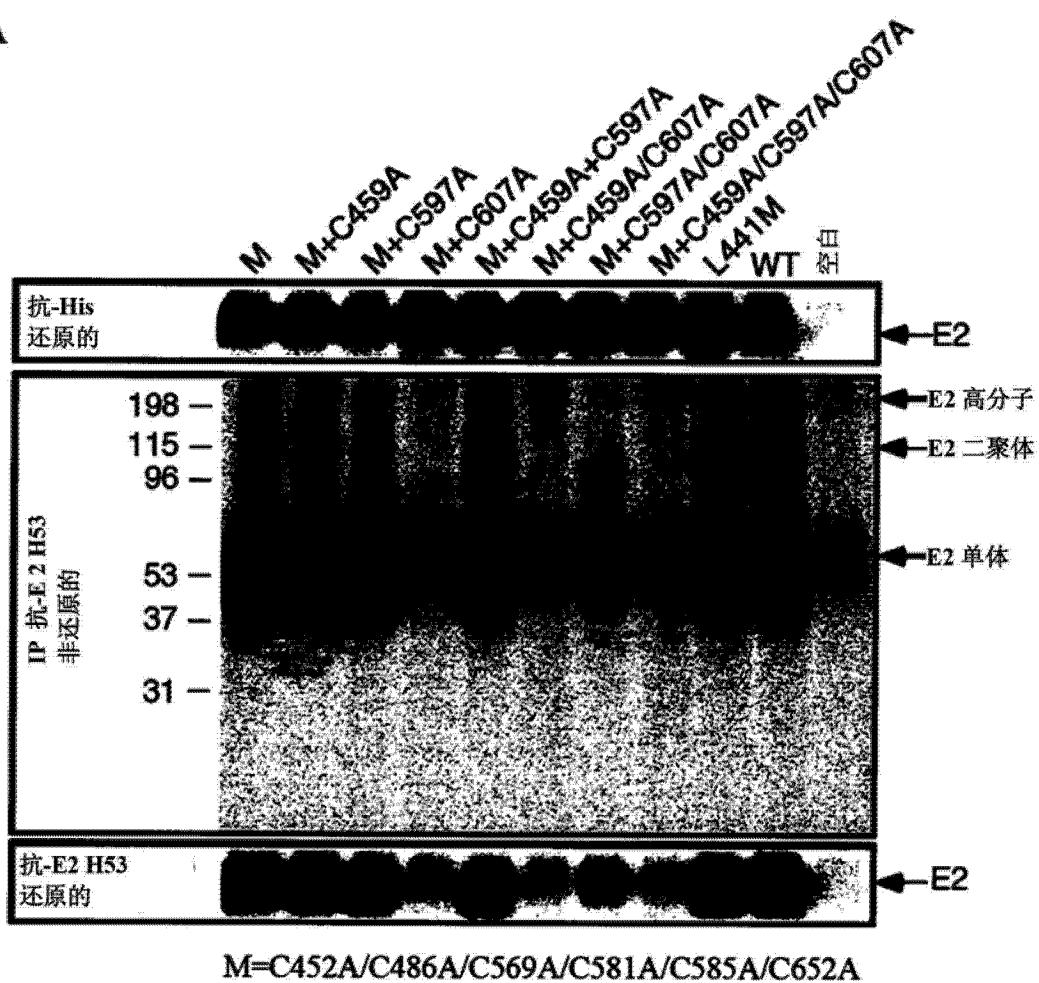


图 6

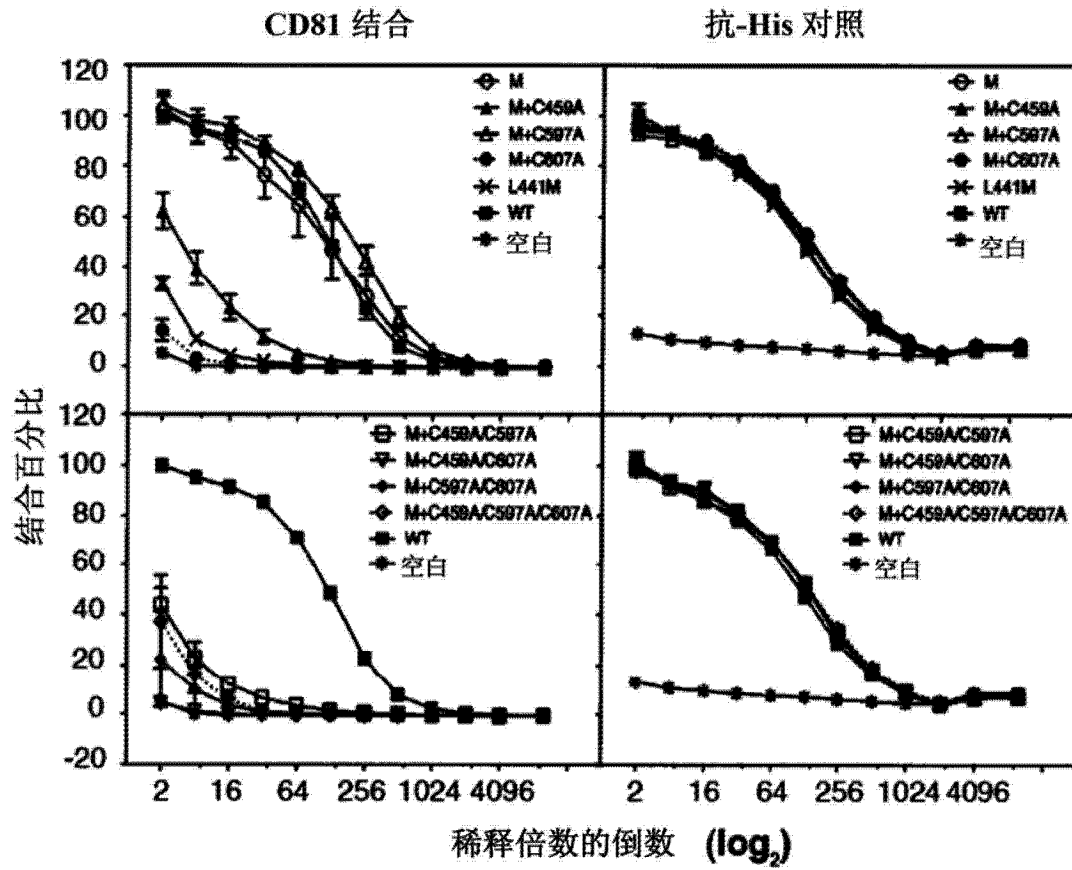
B

图 6(续)

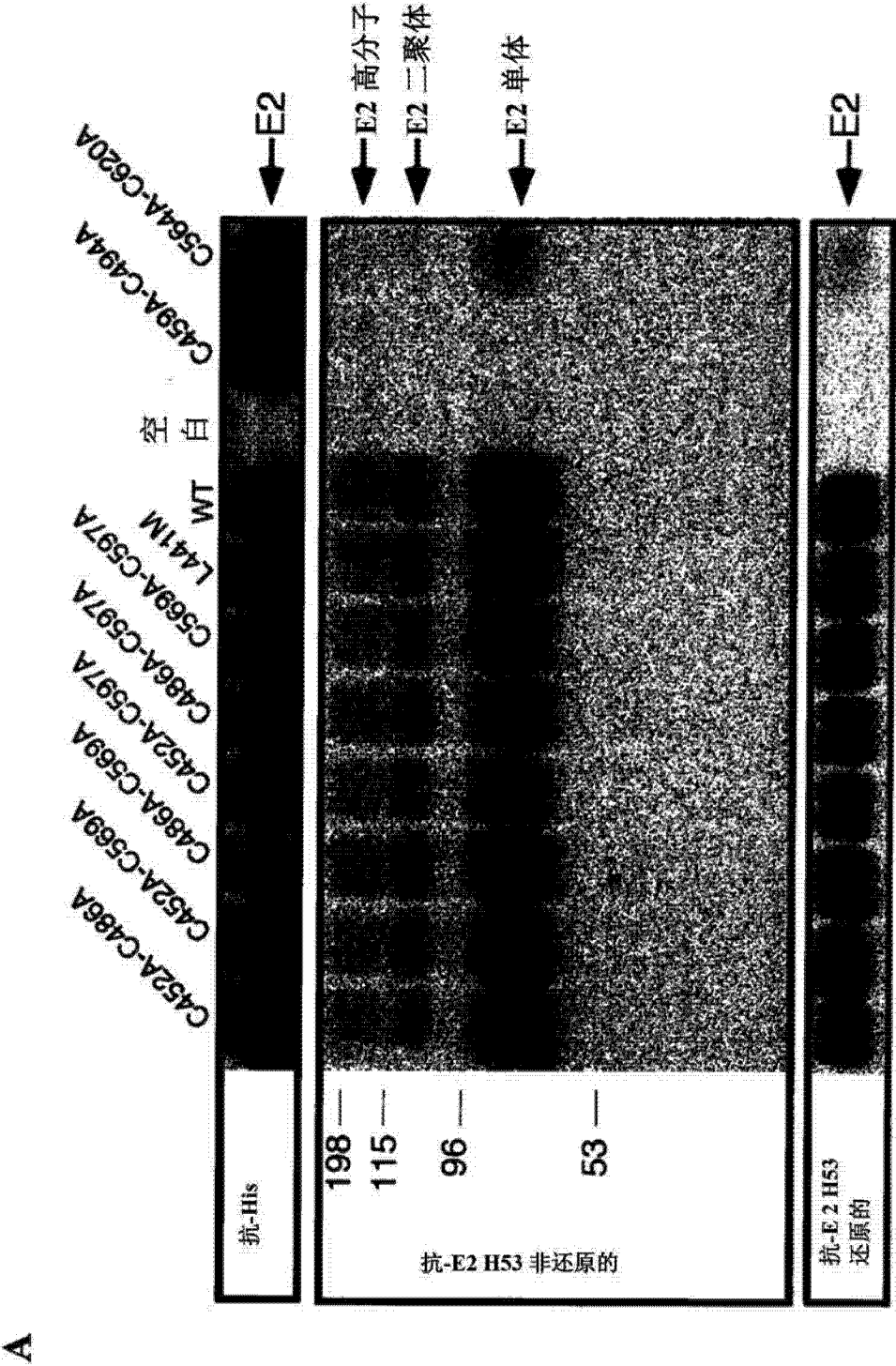
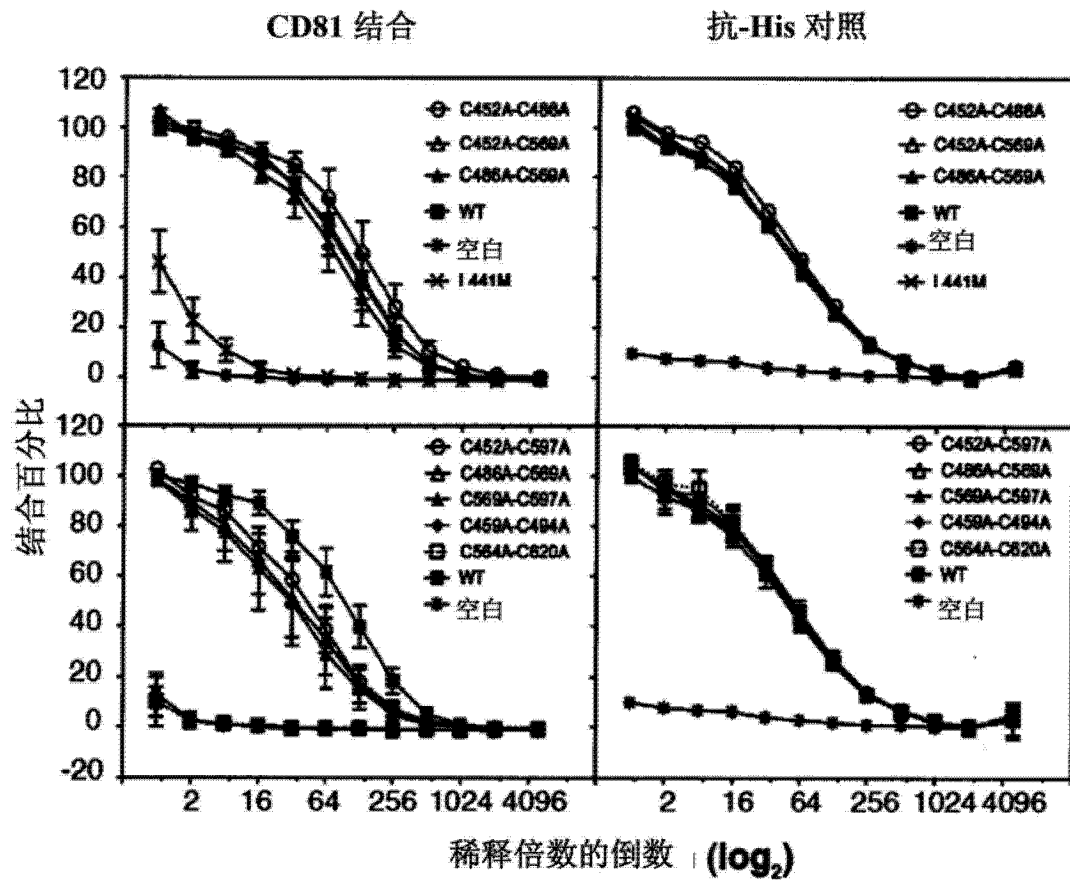


图 7

B

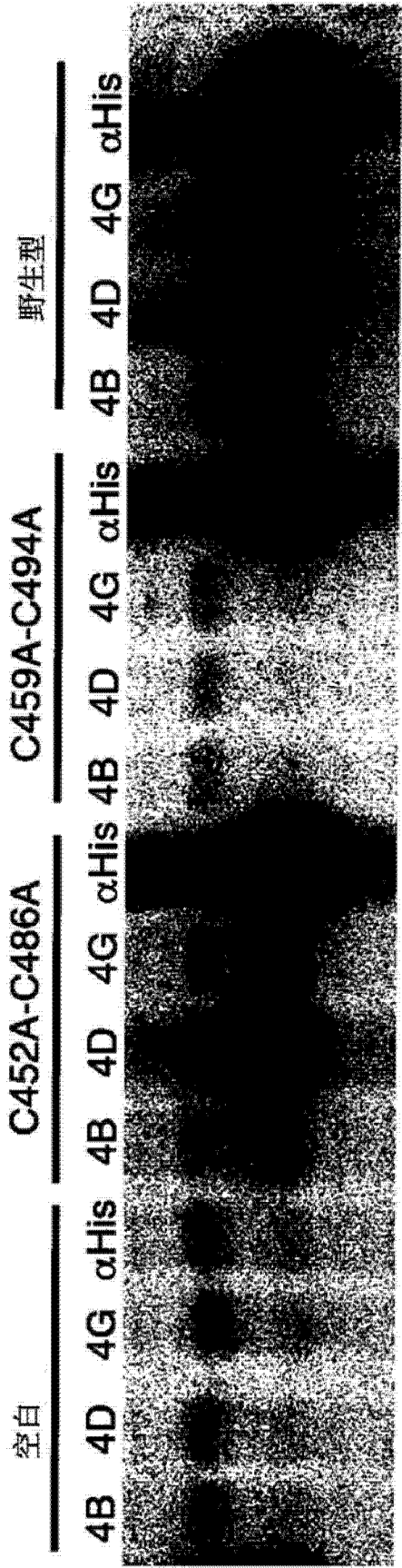


图 7 续

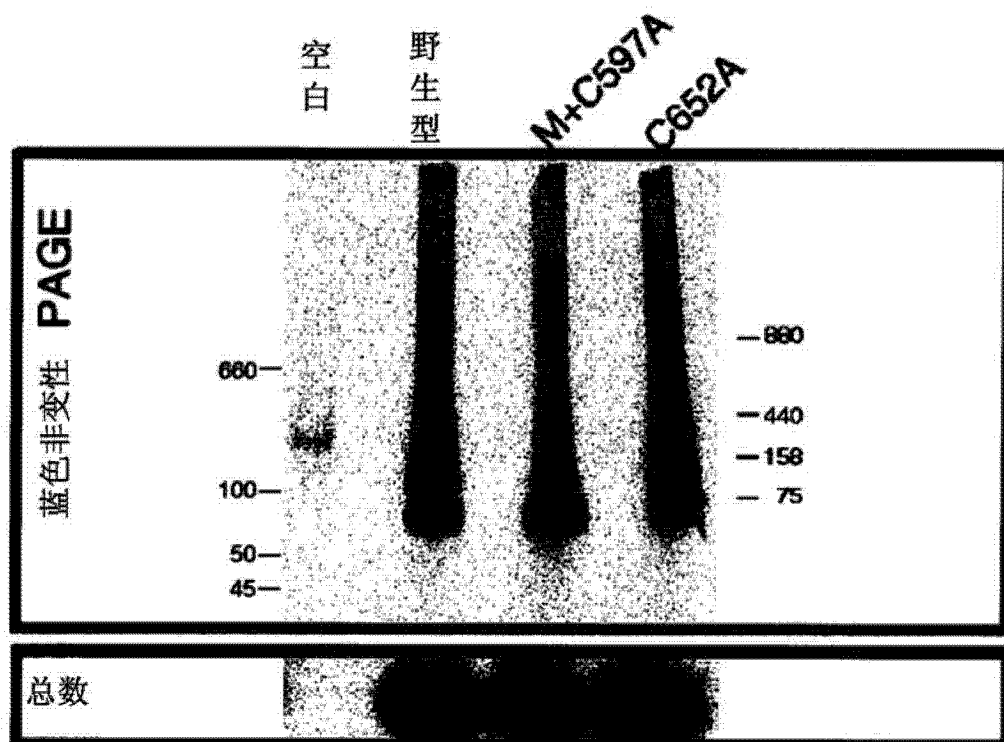
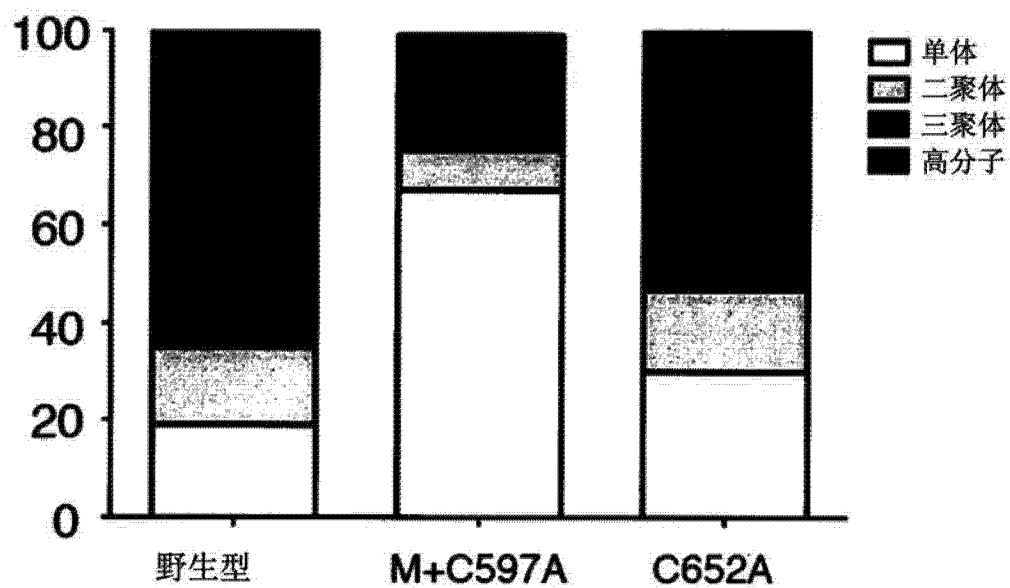
A**B**

图 8

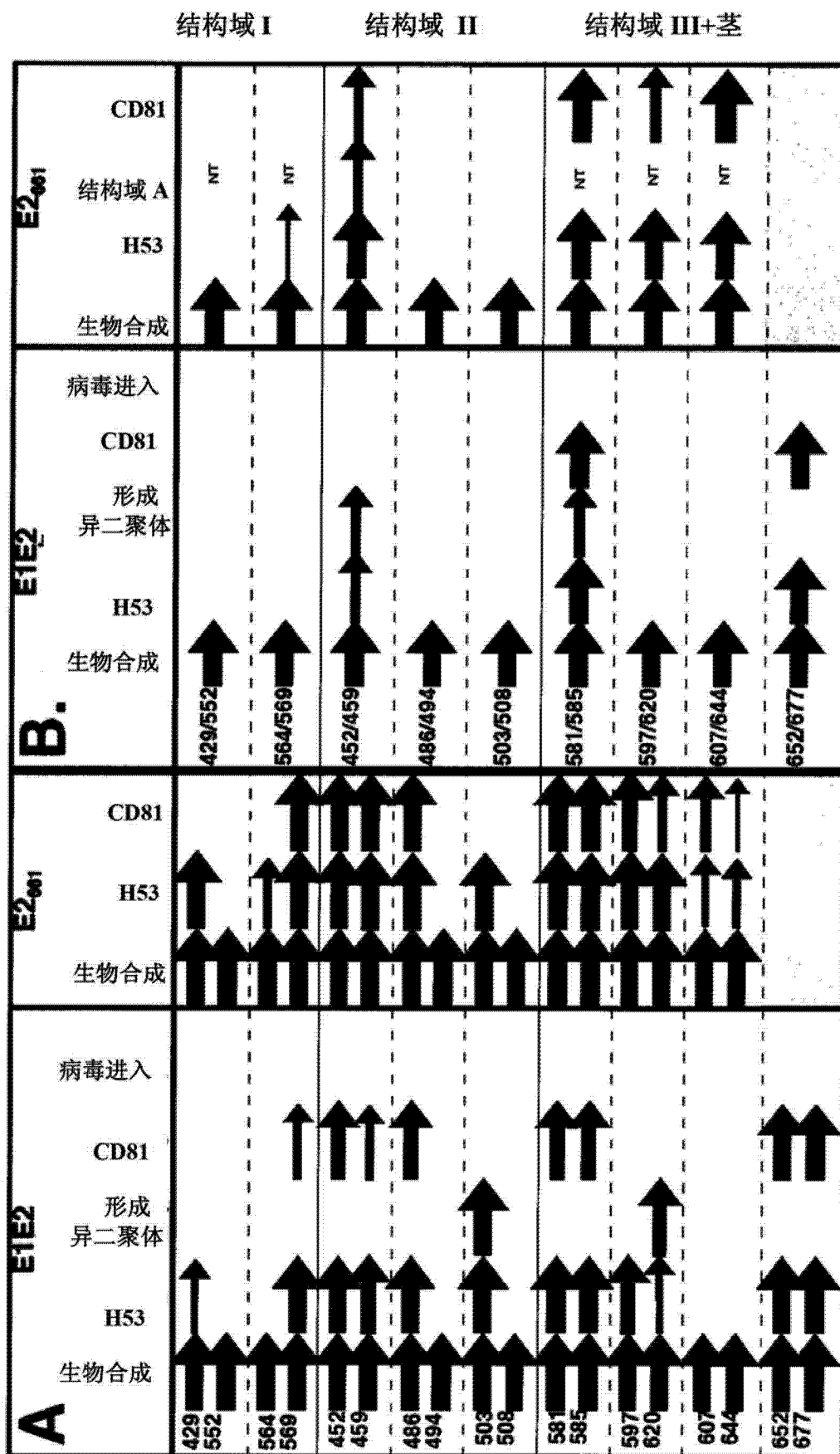


图 9

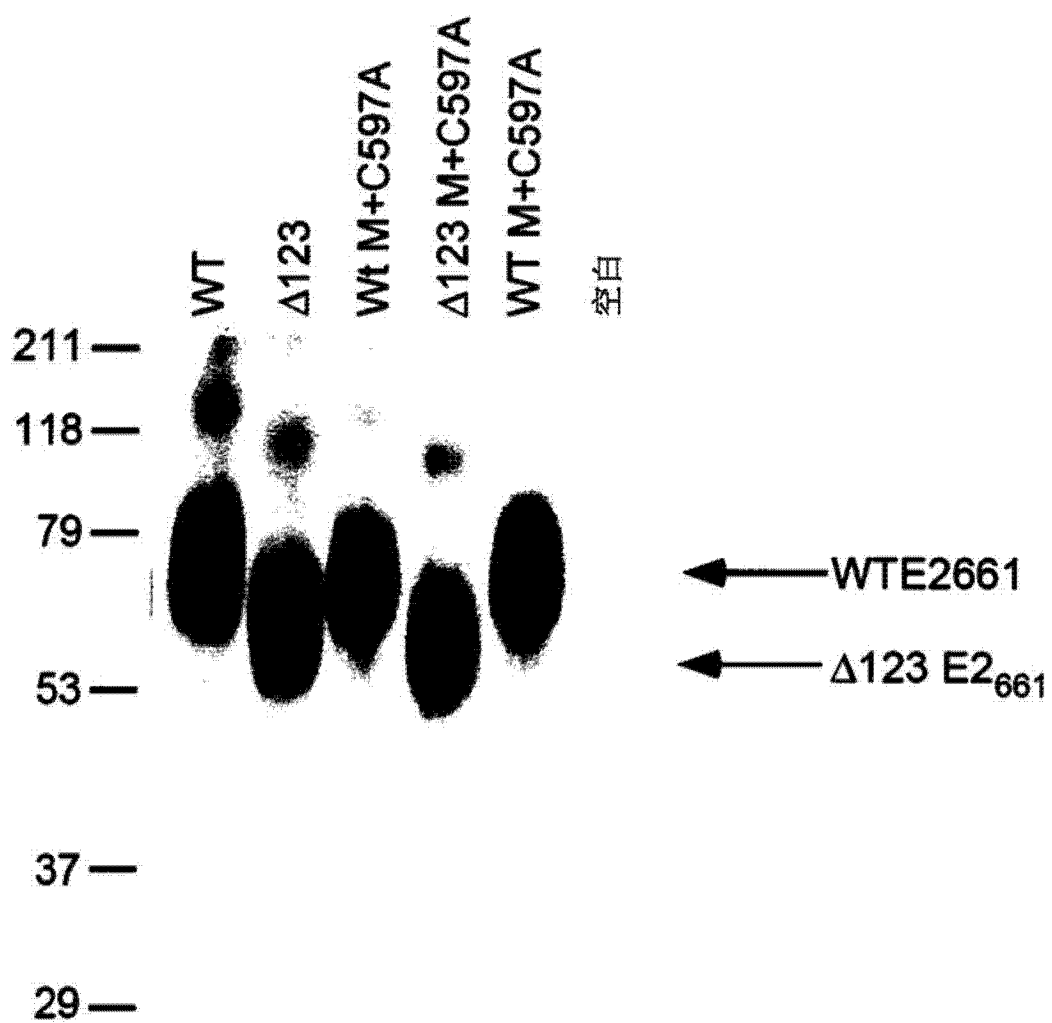


图 10

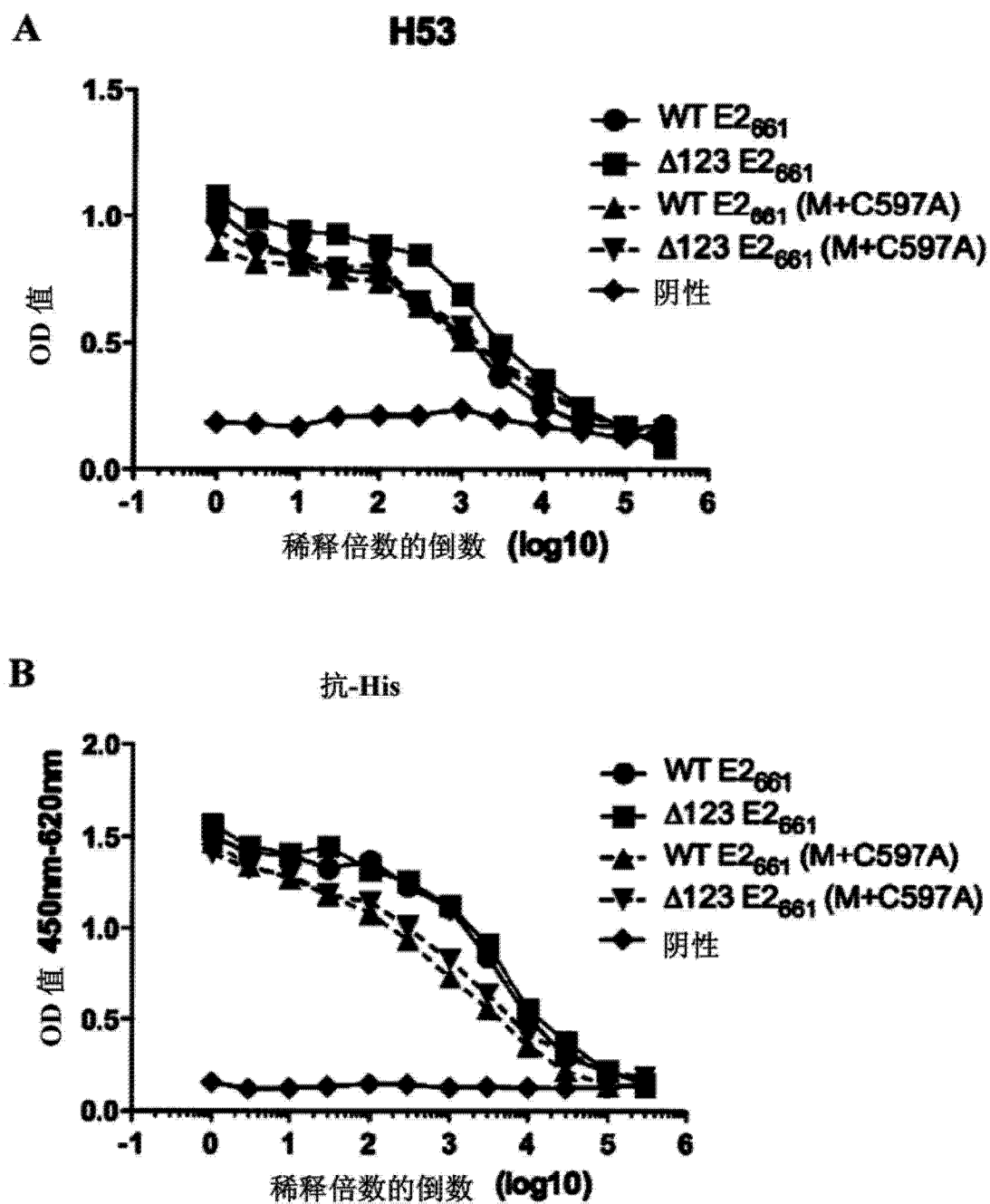


图 11

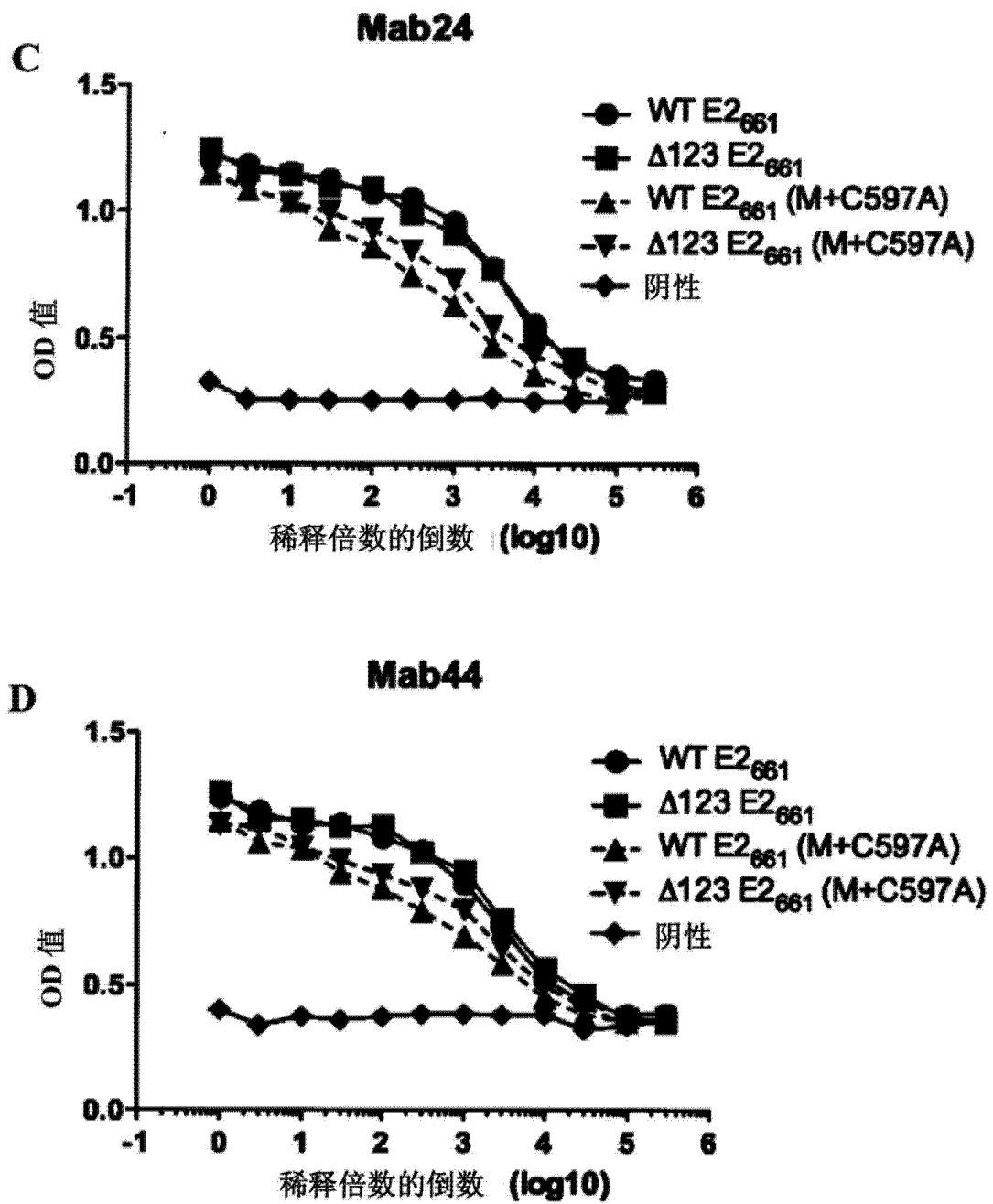


图 11(续)

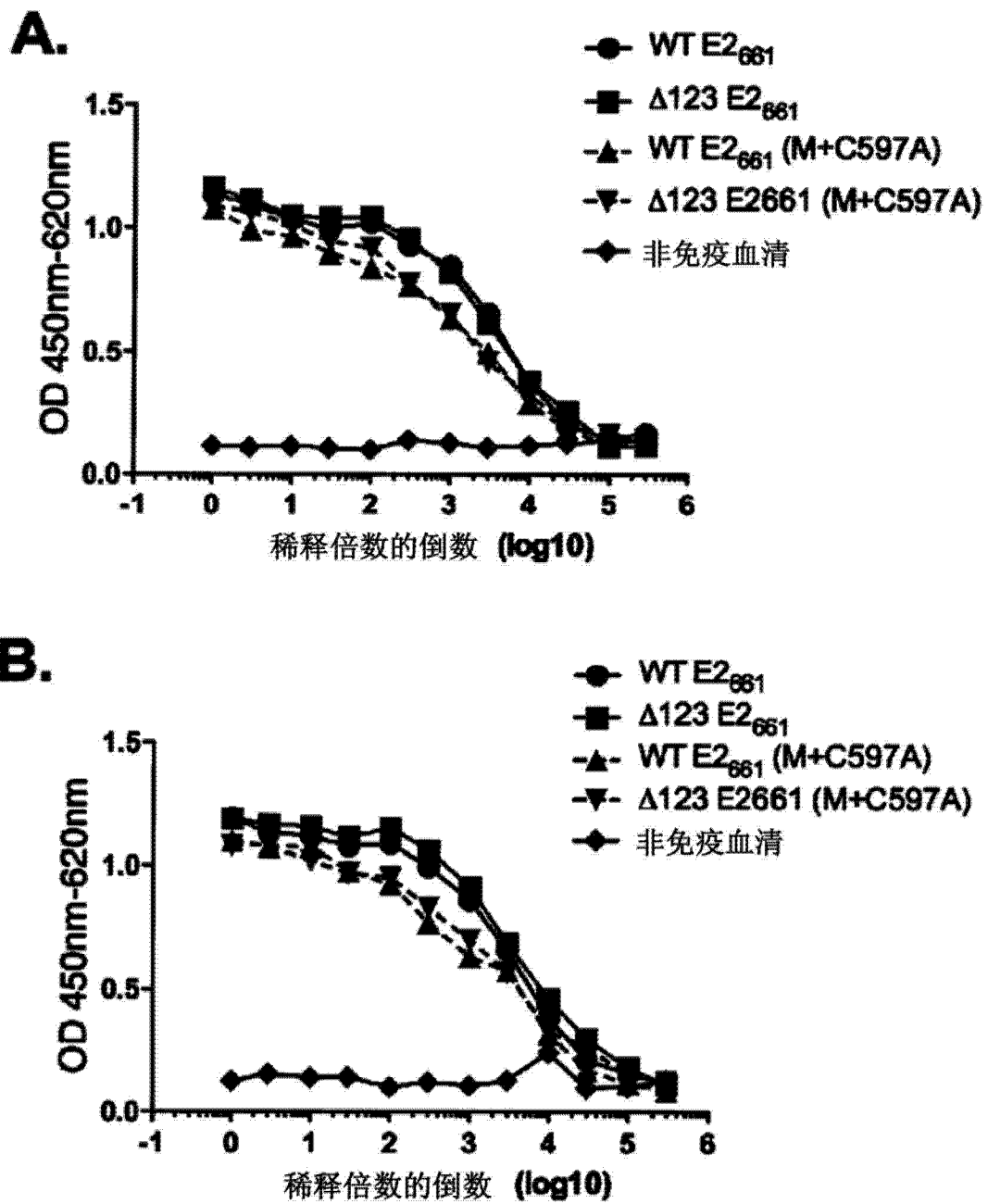


图 12

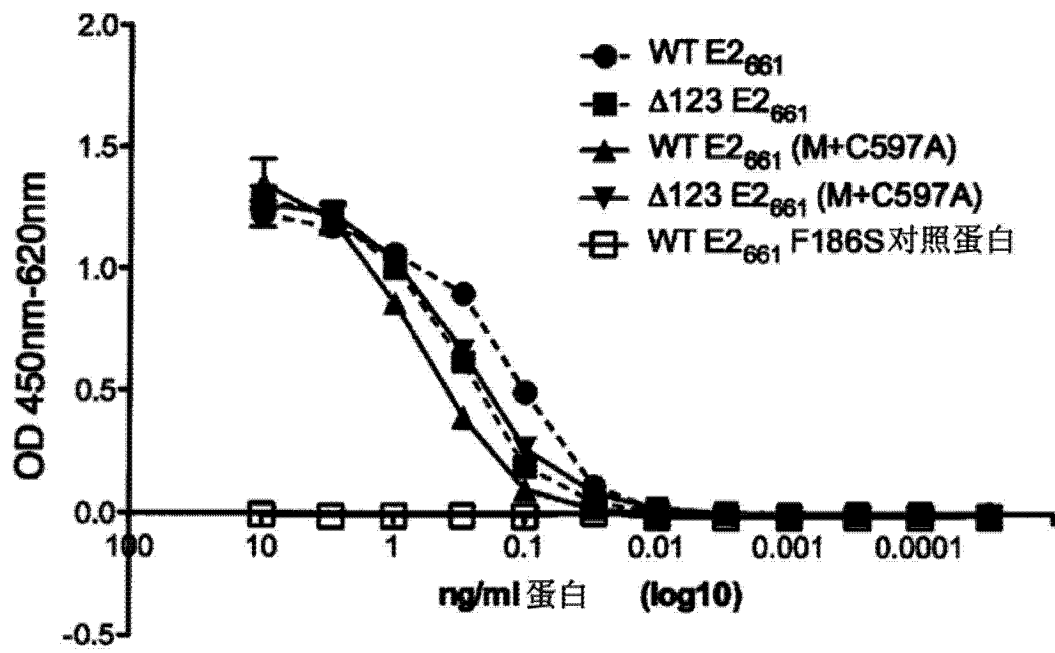


图 13

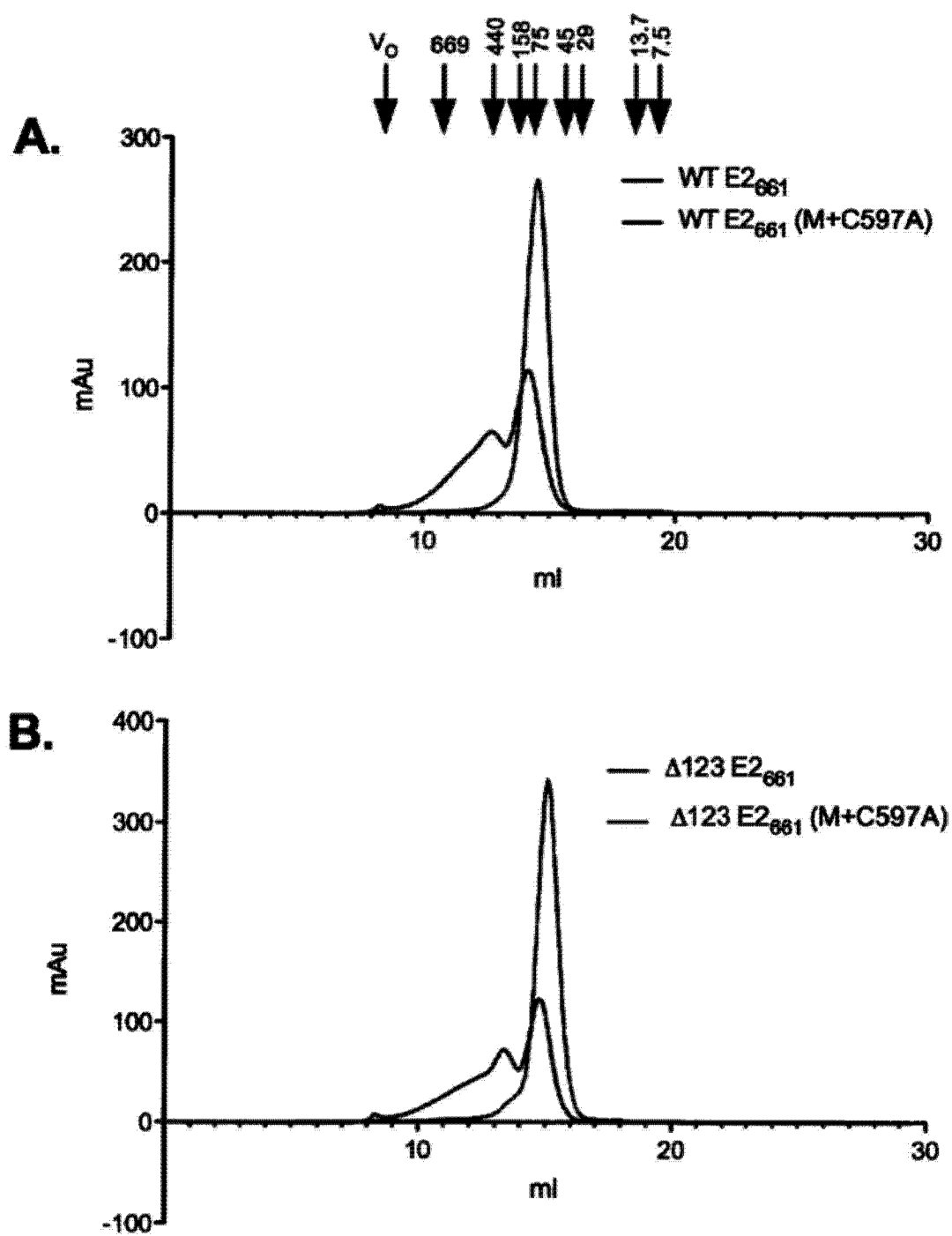


图 14