



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117098549 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 21

(21) 申请号 202280025674.X

(22) 申请日 2022.03.28

(30) 优先权数据

2021-056392 2021.03.30 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/014798 2022.03.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/210465 JA 2022.10.06

(71) 申请人 国立大学法人东京大学

地址 日本东京都

申请人 和纳生物股份有限公司

(72) 发明人 清野宏 幸义和

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 魏中华

(51) Int.Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页
序列表9页 附图7页

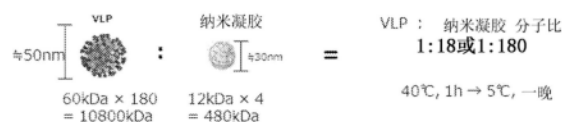
(54) 发明名称

纳米凝胶被覆型疫苗

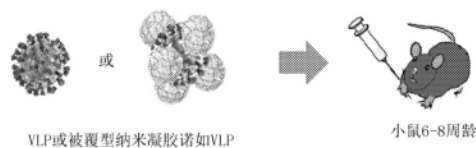
(57) 摘要

本发明的目的在于提供一种未被纳米凝胶内包的抗原与纳米凝胶的复合体和包含该复合体的疫苗制剂。具体而言,本发明提供一种复合体,是纳米凝胶和疫苗抗原的复合体,该疫苗抗原由纳米凝胶被覆。

纳米凝胶化条件



使用诸如病毒的VLP的纳米凝胶被覆检验试验



1. 一种复合体,是纳米凝胶和疫苗抗原的复合体,该疫苗抗原由纳米凝胶被覆。
2. 根据权利要求1所述的复合体,其特征在于,所述疫苗抗原的粒径为20nm以上。
3. 根据权利要求1或2所述的复合体,其特征在于,所述疫苗抗原是比纳米凝胶大的物质。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的复合体,其特征在于,所述疫苗抗原为VLP即病毒样颗粒、灭活病毒、20nm以上的巨大蛋白分子或聚合物。
5. 根据权利要求1~4中任一项所述的复合体,其特征在于,所述疫苗抗原与纳米凝胶以1:15~1:200的摩尔比进行复合化。
6. 根据权利要求1~5中任一项所述的复合体,其特征在于,进一步包含佐剂。
7. 一种疫苗制剂,包含权利要求1~6中任一项所述的复合体。

纳米凝胶被覆型疫苗

技术领域

[0001] 本发明涉及一种使用纳米凝胶的疫苗。更具体而言,涉及一种疫苗,是疫苗抗原与纳米凝胶的复合体,抗原被纳米凝胶被覆。

背景技术

[0002] 以往,疫苗的给药大部分通过注射来进行。通过注射进行的疫苗给药能够在生物体内诱导包含抗体产生的免疫应答。然而,通过注射进行的疫苗给药中,难以在病毒的感染局部诱导防御免疫反应,其结果,难以抑制病原体的感染本身。特别是在病毒感染症的情况下,在感染后且由感染引起的各种症状发病之前,病毒多会传播给他人,因此,注射型疫苗无法有效地阻止刚感染后对他人的感染。相对于注射型疫苗,经鼻型疫苗等向粘膜给药的疫苗能够在病原体感染的粘膜区域中诱导粘膜免疫(粘膜IgA),并中和病原体,因此能够抑制病原体的感染、进而抑制病原体向他人的传播。

[0003] 迄今为止,发明人等为了有效地诱导粘膜免疫,利用由作为经鼻粘膜疫苗的递送单元的加成了胆固醇的阳离子性普鲁兰多糖构成的自凝聚性纳米尺寸水凝胶(cCHP; cationic type of cholesteryl group-bearing pullulan(专利文献1、非专利文献1),以将疫苗抗原内包于纳米凝胶内的形状将抗原复合体制剂化,确立了能够诱导有效的粘膜免疫的方法。cCHP纳米凝胶在其纳米基质内部内包蛋白质抗原时,作为人工伴侣发挥作用,防止抗原的聚集和变性,有助于抗原释放后的重折叠。该纳米凝胶具有有效地附着于负电荷的粘膜表面的性质,通过持续地释放抗原,并将抗原递送至抗原呈递细胞来诱导免疫应答(非专利文献2、非专利文献3和专利文献2)。另外,在小鼠中,即便经鼻给药担载^[111In]-标记BoHc/A(肉毒杆菌A型毒素的重链C末端区域无毒区域)或肺炎球菌表面抗原PspA的cCHP纳米凝胶,也不会嗅球或脑等中枢神经系统中蓄积(非专利文献2),其安全性也得到了确认(非专利文献4)。

[0004] 然而,迄今为止报告的纳米凝胶-抗原复合体通过在由4分子左右的cCHP构成的纳米凝胶的内部内包蛋白质抗原,防止抗原的凝集和变性,促进从纳米凝胶内部释放的抗原的重折叠,诱导有效的免疫应答(非专利文献5)。因此,认为无法使纳米凝胶的分子量(约1000kDa)以上的分子内包于纳米凝胶,这样的巨大分子无法形成与纳米凝胶的复合体(非专利文献5)。即,在现有的将抗原内包于纳米凝胶的制剂化法中,无法制作比纳米凝胶(直径约30nm)大的病毒抗原、VLP(virus like particle,病毒样颗粒)和灭活病毒等抗原与纳米凝胶的复合体。

[0005] 技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:W000/12564号

[0008] 专利文献2:日本特开2010-105968

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1: Ayame等, Bioconj Chem 19:882-890 2008

- [0011] 非专利文献2:Nochi等,Nat Mater 9:572-578 2010
- [0012] 非专利文献3:Yuki等,Biotechnol Genet EngRev 29:61-72 2013
- [0013] 非专利文献4:Kong等,Infect Immun81:1625-1634 2013
- [0014] 非专利文献5:Yuki等,Mol.Pharmaceutics,18:1582-1592 2021

发明内容

[0015] 鉴于上述情况,本发明的解决课题在于提供一种未被纳米凝胶内包的抗原(超过能够内包于纳米凝胶的大小的抗原)与纳米凝胶的复合体和包含该复合体的疫苗制剂。

[0016] 本发明人等对形成超过能够内包于纳米凝胶内的大小的抗原与纳米凝胶的复合体的方法进行了深入研究。

[0017] 本发明人等尝试了制作不将疫苗抗原内包于纳米凝胶内,而是使纳米凝胶附着于疫苗抗原的表面,即,用纳米凝胶被覆疫苗抗原的复合体(以下也将这样的复合体记载为“纳米凝胶被覆型”),结果巧妙地成功制作了纳米凝胶被覆型的复合体。本发明人等确认了纳米凝胶被覆型抗原诱导有效的粘膜免疫。

[0018] 具体而言,用于制备以往的内包抗原的纳米凝胶复合体(以下,也记载为“抗原内包型复合体”)的抗原与纳米凝胶的最佳混合比是相对于1分子抗原为1~2.5分子(以 CHPNH_2 换算计为1~10),优选为1分子(以 CHPNH_2 换算计为4)(专利文献2),本发明等使相对于1分子的诺如病毒VLP(抗原)混合的纳米凝胶的量大幅增加,并将纳米凝胶利用18分子(以 CHPNH_2 换算计为72)或180分子(以 CHPNH_2 换算计为720)进行处理,首次发现了能够利用纳米凝胶比较均匀地被覆VLP(抗原)(参照图8和图9)。确认了对小鼠经鼻给药所得到的纳米凝胶被覆型VLP时,与VLP单独给药相比,能够诱导高10倍以上的粘膜免疫应答。诺如病毒的VLP的粒径约为30-40nm,是超过纳米凝胶的粒径(约30nm)的抗原。

[0019] 即,本发明人首次发现,即便是如VLP那样比纳米凝胶大的抗原,通过用纳米凝胶被覆抗原(而不是内包于纳米凝胶),也能够形成纳米凝胶与抗原的复合体,该纳米凝胶-抗原复合体有效地诱导粘膜免疫应答,从而完成了本发明。

[0020] 即本发明为以下的(1)~(7)。

[0021] (1)一种复合体,是纳米凝胶和疫苗抗原的复合体,该疫苗抗原由纳米凝胶被覆。

[0022] (2)根据上述(1)所述的复合体,其特征在于,上述疫苗抗原的粒径为20nm以上。

[0023] (3)根据上述(1)或(2)所述的复合体,其特征在于,上述疫苗抗原是比纳米凝胶大的物质。

[0024] (4)根据上述(1)~(3)中任一项所述的复合体,其特征在于,上述疫苗抗原为VLP(virus like particle,病毒样颗粒)、灭活病毒、20nm以上的巨大蛋白分子或聚合物。

[0025] (5)根据上述(1)~(4)中任一项所述的复合体,其特征在于,上述疫苗抗原与纳米凝胶以1:15~1:200的摩尔比计进行复合化。

[0026] (6)根据上述(1)~(5)中任一项所述的复合体,其特征在于,进一步包含佐剂。

[0027] (7)一种疫苗制剂,包含上述(1)~(6)中任一项所述的复合体。

[0028] 应予说明,在本说明书中,“~”的符号表示包含其左右的值的数值范围。

[0029] 根据本发明,即便是大的抗原分子,也能够形成与纳米凝胶的复合体,因此能够有效地诱导粘膜中的免疫应答。

附图说明

[0030] 图1表示关于本发明的实施例的纳米凝胶被覆型的纳米凝胶-抗原复合体的实验条件的概要。

[0031] 图2示出基于纳米凝胶被覆型VLP (GII.4VLP或GII.17VLP) 的经鼻免疫应答的结果。A是对小鼠单独经鼻给药纳米凝胶被覆型GII.17VLP或GII.17VLP后,测定血清中的IgG、鼻腔清洗液中的IgA和粪便中的IgA的抗体效价而得的结果。B是对小鼠单独经鼻给药纳米凝胶被覆型GII.4VLP或GII.4VLP后,测定血清中的IgG和鼻腔清洗液中的IgA而得的结果。VLP与纳米凝胶(粒子)的混合比率以分子比计设为VLP:纳米凝胶=1:180。

[0032] 图3示出基于纳米凝胶被覆型VLP (GII.17VLP) 的经鼻免疫应答的结果。是对小鼠单独经鼻给药纳米凝胶被覆型GII.17VLP或GII.17VLP后,测定血清中的IgG和鼻腔清洗液中的IgA而得的结果。VLP与纳米凝胶(粒子)的混合比率以分子比计为VLP:纳米凝胶=1:180或=1:18。

[0033] 图4示出研究由纳米凝胶被覆型VLP (GII.4VLP或GII.17VLP) 诱导的抗体的中和效果而得的结果。A是研究基于由纳米凝胶被覆型GII.17VLP诱导的血清中的IgG和鼻腔清洗液中的IgA的诺如病毒GII.17的增殖抑制效果而得的结果。B是研究基于由纳米凝胶被覆型GII.4VLP诱导的血清中的IgG以及鼻腔清洗液中的IgA的诺如病毒GII.4的增殖抑制效果而得的结果。Pre是利用经鼻免疫前的小鼠血清或鼻腔清洗液对诺如病毒溶液进行处理后,添加到肠道上皮细胞中,测定培养上清液中的病毒基因组拷贝数而得的结果。cCHP+VLP是预先利用由纳米凝胶被覆型VLP诱导的血清中的IgG或鼻腔清洗液中的IgA对诺如病毒溶液进行处理后,添加到肠道上皮细胞中,测定培养上清液中的病毒基因组拷贝数而得的结果。

[0034] 图5示出基于纳米凝胶被覆型VLP (GII.2 VLP) 的经鼻免疫应答的结果。在仅对小鼠经鼻给药纳米凝胶被覆型GII.2 VLP或GII.2 VLP后,测定血清中的IgG、鼻腔清洗液中的IgA、唾液中的IgA和肠道清洗液中的IgA的抗体效价而得的结果。VLP与纳米凝胶(粒子)的混合比率以分子比计为VLP:纳米凝胶=1:180。

[0035] 图6示出研究由纳米凝胶被覆型VLP (GII.2 VLP) 诱导的血清中的IgG的中和效果而得的结果。将诺如病毒溶液用经鼻免疫前的小鼠血清进行处理(未免疫)、用仅由VLP诱导的血清中的IgG进行处理(VLP单独)或由用纳米凝胶被覆的VLP诱导的血清中的IgG进行处理(纳米凝胶化VLP)后,添加到肠道上皮细胞中,测定培养上清液中的病毒基因组拷贝数而得的结果。

[0036] 图7示出研究由纳米凝胶被覆型VLP (GII.2 VLP) 诱导的肠道清洗液中的IgA的中和效果而得的结果。将诺如病毒溶液用经鼻免疫前的小鼠的肠道清洗液(未免疫)、仅由VLP诱导的肠道清洗液中的IgA处理(VLP单独)或由用纳米凝胶被覆的VLP诱导的肠道清洗液中的IgA进行处理(纳米凝胶化VLP)后,添加到肠道上皮细胞中,测定培养上清液中的病毒基因组拷贝数而得的结果。

[0037] 图8示出纳米凝胶被覆型VLP (GII.17VLP) 的利用电子显微镜得到的观察图像。A为GII.17VLP的电子显微镜观察图像,B为纳米凝胶的电子显微镜观察图像,C为纳米凝胶被覆型GII.17VLP的电子显微镜观察图像。对于C,一并示出将观察图像中的由四边形包围的区域分别放大后的图像。

[0038] 图9示出纳米凝胶被覆型VLP (GII.2 VLP) 的利用电子显微镜得到的观察图像。A和

B是GII.2 VLP的电子显微镜观察图像,C和D是纳米凝胶被覆型GII.2 VLP的电子显微镜观察图像,E是纳米凝胶(cCHP)的电子显微镜观察图像,F是内包了PspA的纳米凝胶-PspA复合体的电子显微镜观察图像。

[0039] 图10示出基于铟(^{111}In)标记化纳米凝胶的经鼻给药的小鼠体内动态试验的结果。

具体实施方式

[0040] 第一实施方式是一种复合体,是纳米凝胶和疫苗抗原的复合体(以下,也记载为“纳米凝胶—疫苗抗原(或抗原)”),该疫苗抗原由纳米凝胶被覆(以下,也记载为“本实施方式的复合体”)。

[0041] 在本实施方式中,纳米凝胶是指由加成了疏水性的胆固醇作为侧链的亲水性的多糖(例如,普鲁兰多糖)构成的高分子凝胶纳米粒子。纳米凝胶可以基于公知的方法、例如国际公开第W000/12564号公报中记载的方法等来制造。

[0042] 具体而言,首先使碳原子数12~50的含羟基烃或固醇与 $\text{OCN-R}_1\text{NCO}$ (式中, R_1 为碳原子数1~50的烃基)所示的二异氰酸酯化合物反应,制造碳原子数12~50的含羟基烃或固醇以1分子反应而得的含异氰酸酯基的疏水性化合物。使得到的含异氰酸酯基的疏水性化合物与多糖类反应,制造含有碳原子数12~50的烃基或固醇基的含疏水性基团的多糖类。接着,利用酮系溶剂对得到的生成物进行纯化,由此能够制造纯度高的含疏水性基团的多糖类。

[0043] 这里,作为多糖类,可以利用普鲁兰多糖、支链淀粉、直链淀粉、葡聚糖、羟乙基葡聚糖、甘露聚糖、聚果糖、菊糖、几丁质、壳聚糖、木葡聚糖或水溶性纤维素等,特别优选为普鲁兰多糖。

[0044] 作为本实施方式中使用的纳米凝胶,可举出阳离子性胆固醇取代普鲁兰多糖(cationic cholesteryl-group-bearing pullulan:称为cCHP)和其衍生物。cCHP具有在分子量3万~20万,例如分子量100000的普鲁兰多糖中每100个单糖取代有1~10个,优选1~3个胆固醇的结构。应予说明,本发明中使用的cCHP可以根据抗原的尺寸、疏水性的程度而适当地变更胆固醇取代量。另外,为了变更CHP的疏水性的程度,也可以加成烷基(碳原子数10~30,优选为碳原子数15~20左右)。在本发明中使用的纳米凝胶的粒径为10~50nm,优选为20~30nm。纳米凝胶已广泛市售,也可以使用这些市售品。

[0045] 本实施方式中使用的纳米凝胶是导入了具有正电荷的官能团、例如氨基以便疫苗能够侵入带负电的鼻粘膜表面的纳米凝胶。作为向纳米凝胶导入氨基的方法,可举出使用加成了氨基的胆固醇普鲁兰多糖(CHPNH_2)的方法。具体而言,将经减压干燥的CHP溶解于二甲基亚砜(DMSO),在氮气气流下向其加入1,1'-羰基二咪唑,在室温下反应几小时。向该反应溶液缓慢地添加乙二胺,搅拌几小时~几十小时左右。将得到的反应溶液相对于蒸馏水透析几天。将透析后的反应溶液冷冻干燥,得到乳白色的固体。乙二胺的取代度可以使用元素分析或H-NMR等进行评价。

[0046] 迄今为止报告的纳米凝胶—抗原复合体是在由阳离子性胆固醇取代普鲁兰多糖4分子左右构成的纳米粒子(纳米凝胶)的内部内包抗原的形体(Yuki等,Molecular Pharmaceutics,<https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c01003> 2021)。与此相对,本实施方式的复合体的特征在于,抗原是超过可内包于纳米凝胶的大小的物质,因

此该抗原未内包于纳米凝胶而是纳米凝胶附着于抗原表面的形体(也将这样的形体记载为“抗原被纳米凝胶被覆的形体”(参照图1、图8和图9)。这里,未内包于纳米凝胶的抗原是指与纳米凝胶相同程度大小的抗原或者比纳米凝胶大的抗原。该抗原与纳米凝胶的大小的比较例如可以通过以利用光散射法(例如动态光散射(dynamic light scattering:DLS)法)等算出的抗原的粒径(假定抗原为球体时的情况的直径)为指标的方法、利用电子显微镜观察观察纳米凝胶和抗原并评价各大小的方法等进行比较,但不限于这些方法,只要是本领域技术人员就可以容易地选择各种方法。更具体而言,纳米凝胶的粒径为约30nm左右(DLS法)(Yuki等,Molecular Pharmaceutics, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c01003> 2021),因此,本实施方式的抗原优选例如由DLS法等确定的粒径为比纳米凝胶的粒径稍小的约20nm以上(例如,20nm~1000nm左右,或30nm~600nm左右)的抗原。作为本实施方式的抗原,例如为灭活的病毒、VLP(virus like particle,病毒样颗粒)、20nm以上的巨大蛋白分子或聚合物(例如分子量为5000kDa以上的分子)等,但并不限于这些。另外,作为上述病毒,可以为任何病毒,如果硬要举例,则除诺如病毒以外,例如可举出札幌病毒、轮状病毒、季节性流感病毒(甲型和乙型)、新型(强毒性)流感病毒(例如H1N1、H5N1、H7N9流感病毒)、冠状病毒(例如SARS-CoV、SARS-CoV 2、MERS-CoV等)、RS病毒(甲型、乙型)、鼻病毒、腺病毒、疱疹病毒、人乳头瘤病毒、肠道病毒、巨细胞病毒、埃博拉病毒、西尼罗河病毒、寨卡病毒、登革热病毒、ATL(成人T细胞病毒)、HIV、甲型肝炎病毒、基孔肯雅病毒等。

[0047] 本实施方式的复合体可以通过使纳米凝胶和疫苗抗原共存,使其相互作用,使纳米凝胶附着于抗原表面而制作。此时,纳米凝胶与疫苗抗原的混合比没有特别限定,本领域技术人员可以通过预备实验让他容易地确定。例如疫苗抗原与纳米凝胶的优选的混合比可以适当地选择疫苗抗原:纳米凝胶以摩尔比或分子比计例如为1:10(以 CHPNH_2 换算计为40)~1:400(以 CHPNH_2 换算计为1600)左右,更优选为1:15(以 CHPNH_2 换算计为60)~1:200(以 CHPNH_2 换算计为800)左右的范围内的混合比。

[0048] 本实施方式的复合体的制造可以将纳米凝胶和疫苗抗原混合,在4℃~50℃(例如40℃)静置30分钟~48小时(例如1小时左右)。纳米凝胶—疫苗抗原的复合体形成中使用的缓冲液没有特别限定,如果硬要例示,则可举出Tris-HCl缓冲液等。

[0049] 另外,本实施方式的复合体中,除了纳米凝胶—疫苗抗原复合体以外,还可以包含佐剂(该复合体也包含在“本实施方式的复合体”中)。

[0050] 这里,佐剂与被称为抗原性加强剂或免疫活化剂等的情况同义,在该领域中,用于这些剂的通常的使用目的。本实施方式中使用的佐剂的有效成分没有特别限定,例如可举出使STING(stimulator of interferongenes,干扰素基因刺激蛋白)活化的STING配体(例如cGAMP、cyclic-di AMP、cyclic-di GMP、cyclic-di CMP、cyclic-di UMP或cyclic-di IMP等环状二核苷酸、DMXAA(5,6-二甲基XAA(xanthenone-4-acetic acid)、Vadimezan或ASA404)等咕吨酮(Xanthenone)衍生物)、聚IC或CpG ODN等。该佐剂可以进一步含有医药上可允许的载体或其它成分(例如稳定剂、pH调节剂、保存剂、防腐剂 and 缓冲剂等)。医药上可允许的载体和其它成分需要为不对被给予疫苗的动物的健康造成不良影响的物质。

[0051] 在本实施方式的复合体中包含佐剂的情况下,该佐剂的含量可以相对于疫苗制剂(参照第二实施方式)100重量%包含0.01重量%~99.99重量%左右,相对于疫苗抗原1重

量,例如可以为0.01重量~10重量左右。

[0052] 本实施方式的复合体的形成可以通过将纳米凝胶和疫苗抗原、或者纳米凝胶、疫苗抗原和佐剂混合,在4℃~50℃(例如40℃)下静置30分钟~48小时(例如1小时左右)来实施。纳米凝胶和疫苗抗原、或者纳米凝胶、疫苗抗原和佐剂的复合体形成中使用的缓冲液没有特别限定,如果硬要例示,则可举出Tris-HCl缓冲液等。

[0053] 第二实施方式是一种疫苗制剂(以下,也记载为“本实施方式的疫苗制剂”),包含第一实施方式的复合体、即纳米凝胶和疫苗抗原的复合体,并且该疫苗抗原由纳米凝胶被覆的复合体。

[0054] 本实施方式的疫苗制剂可以包含药理学上可允许的添加剂作为组合物(本实施方式的疫苗组合物)。本实施方式的疫苗制剂适于经鼻给药,作为剂型,也优选能够经鼻给药的形体,可举出液体制剂(滴鼻剂和注射剂等)等。

[0055] 本实施方式的疫苗制剂为液体制剂的情况下,可根据需要将有效成分与盐酸、氢氧化钠、乳糖、乳酸、钠、磷酸一氢钠和磷酸二氢钠等pH调节剂、氯化钠和葡萄糖等等张剂一起溶解于制剂用蒸馏水,进行无菌过滤并填充于安瓿,或者进一步添加甘露醇、糊精、环糊精和明胶等进行真空冷冻干燥,制成用时溶解型制剂。该液体制剂可以含有药学上可允许的公知的稳定剂、防腐剂、抗氧化剂等,作为稳定剂,例如可举出明胶、葡聚糖和山梨醇等,作为防腐剂,例如可举出硫柳汞和β丙内酯等,作为抗氧化剂,例如可举出α-生育酚等。

[0056] 第三实施方式是一种疾病的预防和/或治疗方法,包括对患者经鼻给药包含第二实施方式的疫苗制剂、即纳米凝胶和疫苗抗原的复合体,并且该疫苗抗原由纳米凝胶被覆的复合体。

[0057] 第三实施方式的治疗或预防的对象疾病依赖于使用的疫苗抗原,没有特别限定,除了由病原体引起的感染症以外,也可以是癌症等。

[0058] 本发明的疫苗制剂可以介由鼻粘膜进行给药。作为其方法,例如可举出通过对鼻粘膜喷雾、涂抹、滴加等而向鼻腔内给药的方法。

[0059] 第二实施方式的疫苗制剂的给药量可以根据给药对象的年龄、体重等适当地确定,包含药学上有效量的疫苗抗原。药学上有效量是指诱导对该疫苗抗原的免疫反应所需的抗原量。例如,只要以1次疫苗抗原给药量几μg~几10mg,1天给药1次~几次,以1~几周间隔合计给药几次,例如1~5次左右即可。

[0060] 本说明书中引用的所有文献的公开内容作为整体通过参照并入到说明书中。另外,在本说明书整体中,在包含单数形式的“一个”、“一种”和“该”这样的单词的情况下,只要从上下文未明确指出并非如此,则不仅包含单数,也包含复数。

[0061] 以下示出实施例进一步进行本发明的说明,但实施例仅是本发明的实施方式的例示,并不限定本发明的范围。

[0062] 实施例

[0063] 1.材料和方法

[0064] 1-1.VLP的制备

[0065] 从地方独立行政法人大阪健康安全基盘研究所分配的包含HuNoV(human norovirus)的粪便中粗纯化病毒,由其制备病毒基因组。在制备的基因组上的GII.4、GII.17或GII.2的VP1 ORF的外侧设置引物,通过PCR扩增各ORF区域,确定该增幅产物的核

苷酸序列。各VP1的ORF克隆到pFastBac二元表达载体 (Invitrogen) 中。将GII.4VP1的氨基酸序列和编码该序列的核酸序列分别示于序列号1和序列号2, 将GII.17VP1的氨基酸序列和编码该序列的核酸序列分别示于序列号3和序列号4, 将GII.2 VP1的氨基酸序列和编码该序列的核酸序列分别示于序列号5和序列号6。各构建体在确认其序列正确后, 用于Bac-to-Bac表达系统 (Invitrogen) 的重组棒状病毒的制作。对于High Five细胞 (Invitrogen), 以MOI (multiplicity of infection)、7pfu (plaque-forming units)/细胞感染各重组棒状病毒。感染6天后, 回收培养上清液, 以20000g离心1小时。将得到的上清液以100000g超离心2小时, 将沉淀的VLP悬浮于PBS。浓缩的VLP以10% -60% 蔗糖密度梯度进行叠层, 以100000g超离心1小时而进行纯化。将通过蔗糖密度梯度的VLP相对于2L的PBS透析3次, 除去样品中的蔗糖。VLP用AmiconUltra 30-kDa离心过滤器 (Millipore) 进行浓缩。

[0066] 1—2. 诺如病毒VLP的利用纳米凝胶的被覆化

[0067] 依照已经报告的方法 (Ayame等, Bioconjugate Chem 19:882-890, 2008) 制备cCHP纳米凝胶。将制备的纳米凝胶 (作为4分子的cCHP形成1分子的纳米凝胶进行了各种计算; Kuroda等, Langmuir 18, 3780-3786, 2002) 和纯化的诺如病毒VLP (virus like particle, 病毒样颗粒) (作为VP1 (60kDa) 分子180个形成1分子的VLP进行了各种计算; Glass等, N. Engl. J. Med 361, 1776-1785, 2009) 以分子比 (VLP: 纳米凝胶)、1:18或1:180进行混合, 通过40°C的加热块孵育1小时后, 在4°C静置一晚。

[0068] 1—3. 基于纳米凝胶被覆诺如病毒VLP的小鼠经鼻免疫

[0069] 将纳米凝胶-VLP复合体或VLP (未形成复合体的VLP, 以下相同) 经鼻给药至7周龄雌性Balb/c小鼠。关于给药抗原量, 每1只每1次换算成VLP蛋白质给药5 μ g。经鼻免疫以1周间隔实施合计3次。从最终免疫起1周后, 采集血清、鼻清洗液、肠道清洗液、粪便。粪便悬浮于100mg/mL的PBS后, 将其上清液作为检体。

[0070] 1—4. 抗诺如病毒VLP抗体的抗体效价的测定

[0071] 通过ELISA法对抗原特异性的抗体应答进行解析 (参照Kong等, Infect Immun 81: 1625-1634, 2013)。PBS中, 将1 μ g/mL的VLP在4°C涂布于96孔板上一晚。用包含1% BSA的PBS-Tween进行封闭后, 添加连续稀释至10倍的样品, 在室温下孵育2小时。清洗后, 将HRP缀合山羊抗小鼠IgG (Southern Biotech公司) 或HRP缀合山羊抗小鼠IgA (Southern Biotech公司) 稀释至1:4000, 添加于孔后, 在室温下孵育1小时30分钟。孵育后, 用TMB微孔过氧化物酶底物系统 (XPL公司) 使其显色。端点效价由OD450的值比阴性对照相比高0.1以上的最终稀释倍率进行了对数表示的 (reciprocal log₁₀ titer) 表示。

[0072] 1—5. 使用由人iPS细胞诱导的类器官或单层化细胞的诺如病毒的增殖的中和活性测定法

[0073] 依照已经报告 (Sato等, Cell Mol Gastroenterol Hepatol 7:686-688, 2019) 中记载的方法进行由人iPS细胞株诱导的肠道类器官在Matrigel (Corning) 上的培养和单层化的方法、以及使用它们的基于抗VLP抗体的诺如病毒的增殖的中和活性测定。诺如病毒 (GII.4_2012 Sydney, GII.17_2015 Kawasaki和GII.2 OSN201926; 由大阪健康安全基盘研究所提供) 溶液用基础培养基 (在Advanced DMEM/F12 (Gibco) 中添加10mM HEPES (pH 7.3, Gibco)、2mM Glutamax (Gibco) 和100units/mL Penicillin plus 100 μ g/mL streptomycin (Gibco) 而得的培养基) 稀释成每100 μ L为 2×10^6 个基因组拷贝。然后, 将在感染细胞前稀释

的病毒溶液与适当地稀释的小鼠抗血清或鼻清洗液混合,或者不与小鼠抗血清、鼻清洗液混合,在37℃孵育90分钟。将得到的病毒溶液用于对肠道上皮细胞的感染。

[0074] 在单层化的肠道上皮细胞中添加100 μ L稀释的病毒液,使病毒感染肠道上皮细胞后,在37℃、5%CO₂条件下孵育1小时或3小时。然后,除去病毒液,将细胞用150 μ L的基本培养基清洗2次。在清洗后的孔中加入100 μ L向分化培养基(在基本培养基中添加1 \times B-27基础培养基、1.25%胎牛血清(Biosera)、50ng/mL小鼠EGF、375ng/mL小鼠R-Spondin1(R&D Systems)、50ng/mL小鼠Noggin(Peprotech)以及500nM A83-01而得的培养基)添加0.03%的胆汁而成的溶液后,立即回收上清液。将病毒感染后1小时或3小时的培养上清液分别作为1hpi(1hour post infection,感染后1小时)或3hpi样品。

[0075] 然后,向上清液回收后的孔中加入100 μ L的分化培养基和0.03%胆汁,在37℃、5%CO₂条件下孵育48小时。将该上清液以48hpi(48hour post infection,感染后48小时)的形式回收。病毒基因组拷贝的定量使用High Pure Viral RNA Kit(Roche),由稀释的病毒溶液、感染后1小时(上述1hpi)、3小时(上述3hpi)或48小时(上述48hpi)回收的样品制备RNA。RT-qPCR使用qPCR(GI/GII) Typing Kit(TakaRa)和StepOne Plus实时PCR系统(Applied Biosystems)实施。

[0076] 1—6. 纳米凝胶被覆诺如病毒VLP的基于负染色的电子显微镜观察

[0077] 将GII.17VLP和cCHP以摩尔比1:18的比例,或者将GII.2 VLP和cCHP以摩尔比1:180的比例进行纳米凝胶化,作为观察用样品。另外,作为已有报告的纳米凝胶内包型的纳米凝胶—抗原复合物,将PspA和cCHP以摩尔比1:1的比例进行纳米凝胶化。GII.17VLP用PBS(-)稀释至0.5mg/mL,GII.2 VLP用PBS(-)稀释至0.1mg/mL。对于cCHP,以原液的形式使用1% cCHP。在粘贴有实施了碳蒸镀和亲水化处理的Formbar支承膜的网格(MAXTAFORM网格HF36 Cu 400目)上载置样品5 μ L,染色1分钟。除去样品液,用1%乙酸铀溶液(溶解于蒸馏水)进行负染色后,利用透射式电子显微镜(JEM-1400,日本电子株式会社)进行观察。

[0078] 2. 结果

[0079] 2—1. 本实施例的概要

[0080] 通过以往报告的方法,通过将抗原内包于纳米凝胶而进行经鼻免疫,能够诱导有效的免疫。在该情况下,抗原与作为单体的cCHP的最佳混合比率以分子比(抗原:cCHP)计为1:2~1:8左右。如果将其换算为抗原与球状的纳米凝胶(由4分子的cCHP形成1分子的纳米凝胶:Kuroda等,Langmuir 18:3780-3786,2002)的比率,则为1:0.5~1:2(抗原:纳米凝胶)。因此,在1分子的纳米凝胶中内包有1分子~2分子左右的蛋白质抗原(Yuki等, Molecular Pharmaceutics, <https://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c01003> 2021)。

[0081] 参考以上的见解,研究在抗原比纳米凝胶大的情况下(即,无法将抗原内包于纳米凝胶的情况下),通过用纳米凝胶被覆抗原(使纳米凝胶附着于抗原表面),能否发挥纳米凝胶所具有的经鼻免疫中的有用性。具体而言,将形成30~40nm的球状结构的VLP的诺如病毒VLP(GII.17和GII.4)作为抗原,使纳米凝胶相对于VLP的分子比(VLP:纳米凝胶)为1:180和1:18左右,与以往的方法相比大幅提高纳米凝胶相对于VLP的比率,实施纳米凝胶-VLP复合物的制备(参照图1)。

[0082] 2—2. 纳米凝胶被覆型VLP(GII.17和GII.4)的小鼠经鼻免疫应答

[0083] 在纳米凝胶相对于抗原分子的分子数大大过量的状态下,即,使纳米凝胶相对于诺如病毒VLP的分子比为1:180,形成诺如病毒VLP(GII.17和GII.4)与纳米凝胶的复合体。仅利用GII.17VLP或者利用纳米凝胶—GII.17VLP复合体对小鼠每隔1周经鼻免疫3次。将1周后的抗原特异性的血清IgG、鼻腔清洗液中IgA和粪便中IgA的抗体效价示于图2A。由纳米凝胶—GII.17VLP复合体免疫的全部小鼠中诱导的抗体效价与仅由VLP免疫时的抗体效价比较,确认到约10倍以上的上升。

[0084] 图2B示出在同样条件下的仅GII.4VLP或者纳米凝胶—GII.4VLP复合体的经鼻免疫的结果。由纳米凝胶—GII.4VLP复合体免疫的全部小鼠中诱导的抗体效价与仅由VLP免疫时的抗体效价比较,确认到约10倍以上的上升。

[0085] 2—3. 纳米凝胶被覆型VLP(GII.17)的小鼠经鼻免疫应答

[0086] 接下来,使纳米凝胶相对于VLP的混合比率为上述2—2时的混合比率的1/10,即,使纳米凝胶相对于抗原(VLP)的分子比(VLP:纳米凝胶)为1:18而形成诺如病毒VLP(GII.17)与纳米凝胶的复合体。仅利用GII.17VLP或者利用纳米凝胶—GII.17VLP复合体对小鼠每隔1周经鼻免疫3次。将1周后的抗原特异性血清IgG和鼻腔清洗液中IgA的抗体效价示于图3。即便在降低纳米凝胶相对于VLP的混合比的情况下,抗原特异性血清IgG和鼻清洗液IgA的抗体效价与仅利用VLP进行免疫时的抗体效价相比,也确认到约10倍以上的上升。

[0087] 2—4. 由纳米凝胶被覆型VLP(GII.17VLP和GII.4VLP)诱导的抗体的中和活性的研究

[0088] 接下来,对由纳米凝胶被覆型VLP(GII.17VLP和GII.4VLP)诱导的抗体是否具有中和活性、即抑制诺如病毒的肠道上皮细胞中的增殖的活性进行研究。诺如病毒的增殖以培养上清液中的病毒基因组的拷贝数为指标进行评价。将结果示于图4。对于通过经鼻给药纳米凝胶被覆型VLP诱导的血清IgG和鼻清洗液IgA,在VLP为GII.17VLP(图4A)和GII.4VLP(图4B)的任一情况下,均分别确认到抑制诺如病毒GII.17和诺如病毒GII.4的肠道上皮细胞内的增殖。即,可知由纳米凝胶被覆型VLP的经鼻免疫诱导的抗体具有显著的中和活性。

[0089] 2—5. 纳米凝胶被覆型VLP(GII.2 VLP)的小鼠经鼻免疫应答

[0090] 使纳米凝胶相对于GII.2 VLP的分子比为1:180,形成GII.2 VLP与纳米凝胶的复合体。仅利用GII.2 VLP或者利用纳米凝胶—GII.2 VLP复合体对小鼠每隔1周经鼻免疫3次。将1周后的抗原特异性的血清中IgG、鼻腔清洗液中IgA、唾液中IgA以及肠道清洗液中IgA的抗体效价示于图5。由纳米凝胶—GII.2 VLP复合体免疫的全部小鼠中诱导的抗体效价与仅由VLP免疫时的抗体效价相比,确认到约10倍~100倍以上的上升。特别是肠道清洗液中的抗体效价的上升显著。

[0091] 2—6. 由纳米凝胶被覆型VLP(GII.2 VLP)诱导的血清中的IgG抗体的中和活性的研究

[0092] 确认了通过纳米凝胶被覆型VLP的经鼻给药而诱导的血清中IgG与仅经鼻给药VLP时诱导的血清中IgG相比,更强地抑制诺如病毒(HuNoV GII.2)的肠道上皮细胞内的增殖(图6)。

[0093] 2—7. 由纳米凝胶被覆型VLP(GII.2 VLP)诱导的肠道清洗液中的IgA抗体的中和活性的研究

[0094] 接下来,确认了通过经鼻给药纳米凝胶被覆型VLP而诱导的血清中IgG与仅经鼻给

药VLP时诱导的血清中IgA相比,更强地抑制诺如病毒(HuNoV GII.2)的肠道上皮细胞内的增殖(图7)。

[0095] 值得特别写出的是,在本实施例中,如果将用纳米凝胶被覆的GII.2VLP进行经鼻免疫,与仅单独利用GII.2 VLP进行经鼻免疫的情况相比,能够证实在肠道清洗液中,HuNoV GII.2特异性IgA抗体被大量诱导达100倍以上,HuNoV GII.2的增殖可非常有效地得到抑制。根据该结果,诺如病毒的经鼻疫苗的临床应用非常值得期待。即,以往,报告了为了利用这样的经鼻VLP疫苗得到诺如病毒的防御效果,需要佐剂(Atma等,N.Eng.J.Med.365:2187-87,2011)。然而,基于本实施例所示的结果,认为通过用作为制剂添加物的纳米凝胶被覆抗原,能够充分地制造未添加佐剂的诺如病毒经鼻疫苗。

[0096] 2-6.基于负染色的纳米凝胶被覆型VLP的电子显微镜观察

[0097] 图8A示出GII.17VLP单独样品的电子显微镜观察图像。观察到粒径为约38nm且为正二十面体的中空粒子的VLP。另一方面,仅1% cCHP的样品中的纳米凝胶的大小(粒径)约为20-40nm,作为对比度稍弱的白漏白的粒子状的行列被观察到(图8B)。在纳米凝胶被覆型VLP的电子显微镜观察图像中,除了观察到VLP、纳米凝胶以外,还观察到与纳米凝胶形成复合体的VLP(图5C的放大图中,用箭头表示)。与纳米凝胶形成复合体的VLP由于表面被cCHP(纳米凝胶)覆盖,因此整体上看起来为白色圆盘状。另外,由于在真空状态下观察,因此VLP的中央凹陷,结果作为中心透明且看起来稍暗的球状的粒子被观察到。

[0098] 另外,图9A和B示出GII.2 VLP单独样品的观察图像。观察到粒径为约30-40nm且为正二十面体的中空粒子的GII.2 VLP。实际上,该GII.2 VLP由180个分子量60000的VP1形成,分子量约为1000万。纳米凝胶化GII.2 VLP的观察图像(图9C和D)中,观察到未被纳米凝胶化的VLP、cCHP,并且认为已纳米凝胶化的粒子由于表面被cCHP覆盖,因此以整体上白色~浅灰色的立体的球状被观察到(图中的箭头),认为比VLP稍大尺寸的物质为被覆状态的纳米凝胶。认为这样的观察结果与上述纳米凝胶被覆型GII.17VLP同样地,由于在真空状态下中央凹陷,因此与作为VLP的中空透明且看起来稍暗的球状的粒子被观察到的情况同样。另一方面,1% cCHP单独样品(图9E)的大小约为15-40nm,稍微观察到宽度,作为漏白的粒子状被观察到。PspA在透射式电子显微镜观察中难以单独确认,因此观察纳米凝胶化的PspA,结果观察图像与cCHP单独相比,几乎没有确认到大的变化(约20-40nm)。

[0099] 根据以上的电子显微镜观察的结果可知,表明cCHP(纳米凝胶)以覆盖VLP的周围的方式附着,进行了被覆。

[0100] 2-7.通过DLS(dynamic light scattering,动态光散射)法测定纳米凝胶被覆型VLP的粒径

[0101] 除了利用电子显微镜的观察以外,还通过DLS法测定cCHP纳米凝胶、GII.2 VLP和纳米凝胶被覆型GII.2 VLP的粒径并将各粒径进行比较(表1)。

[0102] [表1]

[0103] 表1.DSL测定

[0104]

| 样品 | D_H (nm) | PDI |
|------------------------|------------|-------|
| cCHP纳米凝胶 | 51.8 | 0.394 |
| GII.2 VLP | 69.7 | 0.345 |
| cCHP纳米凝胶化VLP(摩尔比1:180) | 109.2 | 0.308 |

| | | |
|-----------------------|------|-------|
| cCHP纳米凝胶化PspA(摩尔比1:1) | 53.8 | 0.407 |
|-----------------------|------|-------|

[0105] 其结果,cCHP纳米凝胶的粒径(DH)为52nm,多分散度(PDI)为0.394。另外,GII.2 VLP的粒径为70nm,PDI为0.345,与TEM观察图像相比,变大,但有PDI稍大,因此认为两者均因微量凝集体等的影响而值变大。由纳米凝胶被覆的VLP的粒径为109nm,PDI为0.308,结果是由纳米凝胶的被覆化所带来的粒径增加以值的方式显现。另一方面,内包于纳米凝胶的PspA的粒径和PDI均与cCHP纳米凝胶的粒径和PDI大致相同。根据以上的结果,与内包于纳米凝胶的PspA抗原(纳米凝胶内包PspA抗原)相比,由纳米凝胶被覆的纳米凝胶被覆型VLP抗原的粒径增加,上述电子显微镜观察的结果(图8和图9)的结果也能够根据DSL测定结果来确认。

[0106] 2—8. 纳米凝胶的安全性的研究(参考)

[0107] 本实施方式的纳米凝胶被覆型抗原(用纳米凝胶被覆巨大分子的抗原而成的复合体)能够在不添加佐剂的情况下作为经鼻疫苗进行临床应用。这些结果也与过去的流感经鼻疫苗和大肠菌易热性毒素佐剂的脑内转移相关中经鼻疫苗开发失败的问题相关(Mutsch等,N.Enlg.J Med 350:896-903,2004),可以说是非常重要的结果。本发明人等迄今为止关于纳米凝胶经鼻疫苗报告了否定抗原部分的脑内的转移的体内动态试验的结果(Yuki等,J.Immunol.185:5436-5443 2010;Fukuyama等,Mucosal Immunol.8:1144-1153 2015)。除了该结果以外,这里还新示出了关于将纳米凝胶本身进行经鼻给药所带来的体内动态的影响,特别是对脑内转移进行研究而得的数据。图10所示的结果与关于作为mRNA疫苗的DDS(制剂添加物)的脂质系纳米粒子本身的基于肌肉注射的安全性的体内动态试验同样地,可以认为是纳米凝胶(作为制剂添加物)本身的作为经鼻疫苗制剂的体内动态试验。

[0108] 为了调查纳米凝胶的体内动态,首先用¹¹¹In对纳米凝胶进行标记。使用DEAE Sepharose柱将¹¹¹In标记的纳米凝胶与未反应的¹¹¹In和¹¹¹In标记化纳米凝胶分离,将¹¹¹In标记化纳米凝胶纯化。将纯化的¹¹¹In标记化纳米凝胶(以纳米凝胶计为0.1mg)经鼻给药至小鼠(n=3)后,在0.25小时、1小时、3小时、6小时、12小时、24小时、48小时和72小时测定各种脏器中的¹¹¹In的放射活性(图10)。其结果,明确了作为制剂添加物的cCHP纳米凝胶不会转移到嗅球和脑内,能够确认纳米凝胶本身的安全性。应予说明,¹¹¹In标记基于已经报告(Yuki等,J.Immunol 185:5436-5443,2010)进行。

[0109] 产业上的可利用性

[0110] 本发明提供迄今为止难以制剂化的包含大的抗原分子的纳米凝胶疫苗制剂,可期待在医学领域中的利用。

序列表

<110> 国立大学法人东京大学
和纳生物股份有限公司

<120> 纳米凝胶被覆型疫苗

<130> TPC0428UVT

<150> JP2021- 56392

<151> 2021-03-30

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 540

<212> PRT

<213> 人诺如病毒

<400> 1

```

Met Lys Met Ala Ser Ser Asp Ala Asn Pro Ser Asp Gly Ser Ala Ala
1           5           10           15
Asn Leu Val Pro Glu Val Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val
           20           25           30
Val Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Val Ala Gly Gln Gln Asn Val Ile
           35           40           45
Asp Pro Trp Ile Arg Asn Asn Phe Val Gln Ala Pro Gly Gly Glu Phe
           50           55           60
Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Trp Ser Ala Pro
65           70           75           80
Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Arg Met Tyr
           85           90           95
Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Ile Leu Ala Gly Asn
           100          105          110
Ala Phe Thr Ala Gly Lys Val Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Asn Phe
           115          120          125
Pro Thr Glu Gly Leu Ser Pro Ser Gln Val Thr Met Phe Pro His Ile
           130          135          140
Val Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Ile Pro Leu Pro Asp
145          150          155          160
Val Arg Asn Asn Phe Tyr His Tyr Asn Gln Ser Asn Asp Pro Thr Ile
           165          170          175
Lys Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ala Gly
           180          185          190

```

Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro
 195 200 205
 Asp Phe Asp Phe Ile Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Arg Thr
 210 215 220
 Lys Pro Phe Ser Val Pro Val Leu Thr Val Asp Glu Met Thr Asn Ser
 225 230 235 240
 Arg Phe Pro Ile Pro Leu Glu Lys Leu Phe Thr Gly Pro Ser Ser Ala
 245 250 255
 Phe Val Val Gln Pro Gln Asn Gly Arg Cys Thr Thr Asp Gly Val Leu
 260 265 270
 Leu Gly Thr Thr Gln Leu Ser Pro Val Asn Ile Cys Thr Phe Arg Gly
 275 280 285
 Asp Val Thr His Ile Thr Gly Ser His Asn Tyr Thr Met Asn Leu Ala
 290 295 300
 Ser Gln Asn Trp Ser Asn Tyr Asp Pro Thr Glu Glu Ile Pro Ala Pro
 305 310 315 320
 Leu Gly Thr Pro Asp Phe Val Gly Lys Ile Gln Gly Met Leu Thr Gln
 325 330 335
 Thr Thr Arg Thr Asp Gly Ser Thr Arg Gly His Lys Ala Thr Val Tyr
 340 345 350
 Thr Gly Ser Ala Asp Phe Ala Pro Lys Leu Gly Arg Val Gln Phe Glu
 355 360 365
 Thr Asp Thr Asn Asn Asp Phe Glu Ala Asn Gln Asn Thr Lys Phe Thr
 370 375 380
 Pro Val Gly Val Ile Gln Asp Gly Gly Thr Thr His Arg Asn Glu Pro
 385 390 395 400
 Gln Gln Trp Val Leu Pro Ser Tyr Ser Gly Arg Asn Thr Pro Asn Val
 405 410 415
 His Leu Ala Pro Ala Val Ala Pro Thr Phe Pro Gly Glu Gln Leu Leu
 420 425 430
 Phe Phe Arg Ser Thr Met Pro Gly Cys Ser Gly Tyr Pro Asn Met Asp
 435 440 445
 Leu Asp Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Gln Tyr Phe Tyr Gln Glu
 450 455 460
 Ala Ala Pro Ala Gln Ser Asp Val Ala Leu Leu Arg Phe Val Asn Pro
 465 470 475 480
 Asp Thr Gly Arg Val Leu Phe Glu Cys Lys Leu His Lys Ser Gly Tyr
 485 490 495
 Val Thr Val Ala His Thr Gly Gln His Asp Leu Val Ile Pro Pro Asn

| | 500 | 505 | 510 | |
|-------|--|-------------------------|---------|------|
| | Gly Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Trp | Val Asn Gln Phe Tyr Thr | Leu Ala | |
| | 515 | 520 | 525 | |
| | Pro Met Gly Asn Gly Ala Gly Arg Arg Arg Ala | Leu | | |
| | 530 | 535 | 540 | |
| <210> | 2 | | | |
| <211> | 1623 | | | |
| <212> | DNA | | | |
| <213> | 人诺如病毒 | | | |
| <400> | 2 | | | |
| | atgaagatgg cgtcgagtga cgccaacca tctgatgggt cgcagccaa cctcgtccca | | | 60 |
| | gaggtcaaca atgaggttat ggetctggag cccgttggtg gtgccgcat tgcggcacct | | | 120 |
| | gtagcgggcc aacaaaatgt aattgacccc tggattagaa acaattttgt acaagcccct | | | 180 |
| | ggtggagagt ttacagtatc ccctagaaac gctccaggtg aaatactatg gagcgcgccc | | | 240 |
| | ttgggccctg atctaaatcc ctacttatct cacttggcca gaatgtacaa tggttatgca | | | 300 |
| | ggtggttttg aagtgcaggt aattctcgcg gggaacgcgt tcaccgccgg gaaggtcata | | | 360 |
| | tttgcagcag tcccacaaa ttttccaact gaaggcttga gccccagcca ggtcactatg | | | 420 |
| | ttccccata tagtagtaga tgtaggcaa ctagaacctg tgttgattcc cttaccgat | | | 480 |
| | gtaggaata atttctatca ttacaatcaa tcaaatgacc ccaccattaa gttgatagca | | | 540 |
| | atgtttgtata caccacttag ggctaataat gctggggatg atgtcttcac agtttcttgc | | | 600 |
| | cgagttctca cgagaccatc ccccgatttt gatttcatat ttctagtgcc acccacagtt | | | 660 |
| | gagtcaagaa ctaaaccatt ctctgtccca gttttaactg ttgatgagat gaccaattca | | | 720 |
| | agattcccca ttcttttga aaagttgtc acgggtccca gcagtgcctt tgttgtccaa | | | 780 |
| | ccacaaaacg gtaggtgcac gactgatggc gtgctcctag gcaccacca actgtctcct | | | 840 |
| | gtcaacatct gcaccttcag aggagatgtc acccatatca caggtagtca taactacaca | | | 900 |
| | atgaatttgg cttctcaaaa ttggagcaat tacgaccaa cagaagaaat cccagcccct | | | 960 |
| | ctagggactc cagactttgt ggggaagatt caaggcatgc ttacccaaac cacaaggaca | | | 1020 |
| | gatggttcaa cacgcggcca caaagccaca gtgtacactg ggagcggcca ctttgctcca | | | 1080 |
| | aaactgggta gaggttcaatt tgaaactgac acaacaatg attttgaagc taacaaaac | | | 1140 |
| | acaaaagtca ccccagttgg tgtcatccaa gatggtggca ccaccaccg aatgaaccc | | | 1200 |
| | caacagtggg tgctcccaag ttactcaggc aggaacactc ctaatgtgca tctggcccc | | | 1260 |
| | gctgtggccc ccacttttcc gggtagcaa ctctcttctc teagatccac catgcccgga | | | 1320 |
| | tgcagcgggt accccaacat ggatttggat tgtctgctcc cccaggaatg ggtgcagtac | | | 1380 |
| | ttctaccaag aggcagcccc agcacaatct gatgtggctc tgctaagatt tgtgaatcca | | | 1440 |
| | gacacaggta gggttttgtt tgaatgtaag cttcataaat caggctatgt tacagtggct | | | 1500 |
| | cacactggcc aacatgattt ggttatcccc cccaatggtt attttaggtt tgattcctgg | | | 1560 |
| | gtcaaccagt ttacacgct tgccccatg ggaaatggag cggggcgtag acgtgcactg | | | 1620 |
| | taa | | | 1623 |
| <210> | 3 | | | |

<211> 540
 <212> PRT
 <213> 人诺如病毒
 <400> 3
 Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Asn Asp Gly Ala Ala
 1 5 10 15
 Gly Leu Val Pro Glu Gly Asn Asn Glu Thr Leu Pro Leu Glu Pro Val
 20 25 30
 Ala Gly Ala Ala Ile Ala Ala Pro Val Thr Gly Gln Asn Asn Ile Ile
 35 40 45
 Asp Pro Trp Ile Arg Thr Asn Phe Val Gln Ala Pro Asn Gly Glu Phe
 50 55 60
 Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asn Leu Glu
 65 70 75 80
 Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ser Arg Met Tyr
 85 90 95
 Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Val Glu Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Asn
 100 105 110
 Ala Phe Thr Ala Gly Lys Ile Leu Phe Ala Ala Val Pro Pro Asn Phe
 115 120 125
 Pro Val Glu Phe Leu Ser Pro Ala Gln Ile Thr Met Leu Pro His Leu
 130 135 140
 Ile Val Asp Val Arg Thr Leu Glu Pro Ile Met Ile Pro Leu Pro Asp
 145 150 155 160
 Val Arg Asn Thr Phe Phe His Tyr Ser Asn Gln Pro Asn Ser Arg Met
 165 170 175
 Arg Leu Val Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly
 180 185 190
 Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Thr Pro
 195 200 205
 Asp Phe Glu Phe Thr Tyr Leu Val Pro Pro Ser Val Glu Ser Lys Thr
 210 215 220
 Lys Pro Phe Ser Leu Pro Ile Leu Thr Leu Ser Glu Leu Thr Asn Ser
 225 230 235 240
 Arg Phe Pro Val Pro Ile Asp Ser Leu Phe Thr Ala Gln Asn Asn Val
 245 250 255
 Leu Gln Val Gln Cys Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu Asp Gly Glu Leu
 260 265 270
 Gln Gly Thr Thr Gln Leu Leu Pro Thr Gly Ile Cys Ala Phe Arg Gly

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

<210> 4

<211> 1623

<212> DNA

<213> 人诺如病毒

<400> 4

atgaagatgg cgtcgaatga cgccgctcca tctaataatgatg gtgctgctgg tctcgtacca

60

| | |
|--|------|
| gagggcaaca acgagaccct tcccctagaa ccagttgcgg ggcagctat agccgcaccc | 120 |
| gtcactggcc aaaataacat aattgacccc tggattagaa caaatTTTgt gcaagcacca | 180 |
| aatggagagt tcacagtgtc acccagaaac tctcctggag aaatTTTatt aaatTTtagag | 240 |
| ttgggcccctg atttgaaccc ttatttggct catttGTcaa ggatgtacaa tgggtatgct | 300 |
| ggtggagtgg aagttcaggt tctcctggca gggaacgcgt tactgccgg aaagatcctc | 360 |
| ttcggcccg tcccgcAAA tttcccagtg gaattcttaa gcccagcca gatcacaatg | 420 |
| ctcccacatt taatagtaga tgtaggact ctgaaccaa ttatgatccc actccctgat | 480 |
| gtaggaata cattcttcca ttatagtaac cagcctaaca gccgatgag attagtggct | 540 |
| atgctctata cccactcag atctaattggc tcaggatgag atgtctttac tgtctcttgc | 600 |
| agggtcttga ctaggectac tctgatttt gagttcactt atttagtgcc accttctggt | 660 |
| gaatctaaaa ctaagcctt ttccttacct attttaacc tttctgagct cacaaattcg | 720 |
| aggtttccag tcccacatga ttcgctttc accgcccaga ataatgtgtt gcaggTgcag | 780 |
| tgtcaaaatg gcagggttac acttgatggg gagttacaag gcacaacca gttgctccca | 840 |
| actggcatct gtgcattcag aggacgggtg acagcAAAA ttaaccaacg tgacaggTgg | 900 |
| cacatgcaac tgcaaaacct caatggtaca acatatgacc caactgatga tgtgccagcc | 960 |
| ccgctgggta cacctgactt caagggcgtc gtgtttggga tggtaaGcca aagaaatgtg | 1020 |
| ggtaatgatg cgctggctc aaccagagcc caacaggcgt gggtttcaac ctatagcccc | 1080 |
| caatTTgtcc ccaaattagg ttctgtcaat cttaggatta gtgataatga tgatttccaa | 1140 |
| ttccagccga caaaattcac accagtgggc gtcaatgatg acgatgatgg ccacccttc | 1200 |
| agacaatggg aactacaaa ctattcaggg gagcttacct tgaatatgaa tcttgcccc | 1260 |
| ccagttgctc caaatTTtcc tggTgaacaa ttgttattct tcagatcttt cgtgccatgc | 1320 |
| tcaggaggTt acaaccaagg tattatagat tgtcttattc cccaagaatg gatccaacac | 1380 |
| ttctatcagg aatcagcacc ctcccagTca gacgtggccc taatcaggta tgtcaacccc | 1440 |
| gatacgggac gtacactgtt tgaagcaaaa ttgcacagat ctggttacct cactgtggct | 1500 |
| cactctggag actatcctct tgttgttccg gctaatggac actttagatt tgattcttgg | 1560 |
| gtaaatcagt ttactcact cgccccaatg ggaactggga atgggcgaag gagggctcag | 1620 |
| taa | 1623 |

<210> 5

<211> 542

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ala Pro Ser Thr Asp Gly Ala Ala
 1 5 10 15
 Gly Leu Val Pro Glu Ser Asn Asn Glu Val Met Ala Leu Glu Pro Val
 20 25 30
 Ala Gly Ala Ala Leu Ala Ala Pro Val Thr Gly Gln Thr Asn Ile Ile
 35 40 45
 Asp Pro Trp Ile Arg Ala Asn Phe Val Gln Ala Pro Asn Gly Glu Phe

| | | |
|---------------------|---|-----|
| 50 | 55 | 60 |
| Thr Val Ser Pro Arg | Asn Ala Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Glu | |
| 65 | 70 | 75 |
| Leu Gly Pro Glu Leu | Asn Pro Tyr Leu Ala His Leu Ala Arg Met Tyr | 80 |
| | 85 | 90 |
| Asn Gly Tyr Ala Gly | Gly Met Glu Val Gln Val Met Leu Ala Gly Asn | 95 |
| | 100 | 105 |
| Ala Phe Thr Ala Gly | Lys Leu Val Phe Ala Ala Val Pro Pro His Phe | 110 |
| | 115 | 120 |
| Pro Ile Glu Asn Leu | Ser Pro Gln Gln Ile Thr Met Phe Pro His Val | 125 |
| | 130 | 135 |
| Ile Ile Asp Val Arg | Thr Leu Glu Pro Val Leu Leu Pro Leu Pro Asp | 140 |
| | 145 | 150 |
| Val Arg Asn Asn Phe | Phe His Tyr Asn Gln Lys Asp Asp Pro Lys Met | 155 |
| | 165 | 170 |
| Arg Ile Val Ala Met | Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly | 160 |
| | 180 | 185 |
| Asp Asp Val Phe Thr | Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser Pro | 175 |
| | 195 | 200 |
| Asp Phe Asp Phe Thr | Tyr Leu Val Pro Pro Thr Val Glu Ser Lys Thr | 205 |
| | 210 | 215 |
| Lys Pro Phe Thr Leu | Pro Ile Leu Thr Leu Gly Glu Leu Ser Asn Ser | 210 |
| | 225 | 230 |
| Arg Phe Pro Val Ser | Ile Asp Gln Met Tyr Thr Ser Pro Asn Glu Ile | 225 |
| | 245 | 250 |
| Ile Ser Val Gln Cys | Gln Asn Gly Arg Cys Thr Leu Asp Gly Glu Leu | 240 |
| | 260 | 265 |
| Gln Gly Thr Thr Gln | Leu Gln Val Ser Gly Ile Cys Ala Phe Lys Gly | 255 |
| | 275 | 280 |
| Glu Val Thr Ala His | Leu His Asp Asn Asp His Leu Tyr Asn Val Thr | 270 |
| | 290 | 295 |
| Ile Thr Asn Leu Asn | Gly Ser Pro Phe Asp Pro Ser Glu Asp Ile Pro | 285 |
| | 305 | 310 |
| Ala Pro Leu Gly Val | Pro Asp Phe Gln Gly Arg Val Phe Gly Ile Ile | 300 |
| | 325 | 330 |
| Ser Gln Arg Asp Lys | His Asn Ser Pro Gly His Asn Glu Pro Ala Asn | 315 |
| | 340 | 345 |
| Arg Gly His Asp Ala | Val Val Pro Thr Tyr Thr Ala Gln Tyr Thr Pro | 330 |
| | 355 | 360 |

Lys Leu Gly Gln Ile Gln Ile Gly Thr Trp Gln Thr Asp Asp Leu Thr
 370 375 380
 Val Asn Gln Pro Val Lys Phe Thr Pro Val Gly Leu Asn Asp Thr Glu
 385 390 395 400
 His Phe Asn Gln Trp Val Val Pro Arg Tyr Ala Gly Ala Leu Asn Leu
 405 410 415
 Asn Thr Asn Leu Ala Pro Ser Val Ala Pro Val Phe Pro Gly Glu Arg
 420 425 430
 Leu Leu Phe Phe Arg Ser Tyr Ile Pro Leu Lys Gly Gly Tyr Gly Asn
 435 440 445
 Pro Ala Ile Asp Cys Leu Leu Pro Gln Glu Trp Val Gln His Phe Tyr
 450 455 460
 Gln Glu Ala Ala Pro Ser Met Ser Glu Val Ala Leu Val Arg Tyr Ile
 465 470 475 480
 Asn Pro Asp Thr Gly Arg Ala Leu Phe Glu Ala Lys Leu His Arg Ala
 485 490 495
 Gly Phe Met Thr Val Ser Ser Asn Thr Ser Ala Pro Val Val Val Pro
 500 505 510
 Ala Asn Gly Tyr Phe Arg Phe Asp Ser Trp Val Asn Gln Phe Tyr Ser
 515 520 525
 Leu Ala Pro Met Gly Thr Gly Asn Gly Arg Arg Arg Val Gln
 530 535 540

<210> 6

<211> 1629

<212> DNA

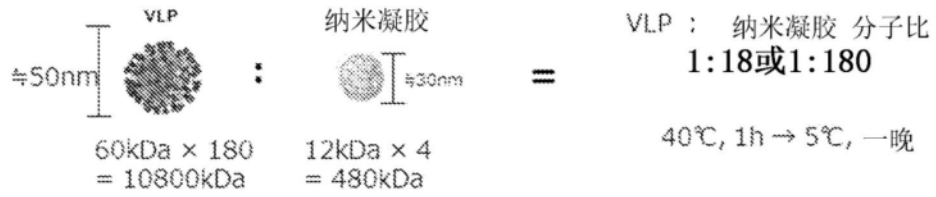
<213> 智人

<400> 6

atgaagatgg cgtcgaatga cgccgctcca tctactgatg gtgcagccgg cctcgtgcca 60
 gaaagtaaca atgaggatcat ggctcttgaa cccgtggctg gtgccgcctt ggcagccccg 120
 gtcaccggtc aaacaaatat tatagacct tggattagag caaattttgt ccaggcccc 180
 aatggatgaat ttacagtctc tccccgaaat gccctgggtg aagtgtact gaatctagag 240
 ttgggtccag aattaaatcc ttatctggca catttagcaa gaatgtacaa tgggtatgcc 300
 ggtgggatgg aggtgcaggt catgttggct gggaacgcgt tcacagccgg caagttggtc 360
 ttcgccgccg tgccacccca ctccccgatt gaaaacctta gccacagca aatcaccatg 420
 ttccctcatg tgattataga tgtgagaacc ttggaacctg ttttattacc actccctgat 480
 gttaggaata acttcttcca ttataaccag aaagatgatc ccaagatgag aattgtggct 540
 atgctttata cccccctcag gtctaattgg tccaggtgatg atgtgtttac agtctctgt 600
 agagtgttga ctagacctc cctgacttt gacttccat acctggtgcc accaacagtg 660
 gagtctaaaa caaagccatt caccctccca atcctcacac ttggggaact ttccaattct 720

| | |
|--|------|
| aggttcccag tgtctataga ccagatgtac accagcccta atgaaattat atcagtgcag | 780 |
| tgtcaaaatg gtaggtgcac actggacggg gagtccaag ggacaacaca actccaagtc | 840 |
| agtggcattt gtgctttcaa aggtgaagt accgcccact tacatgacaa tgatcaccta | 900 |
| tataatgtca ccatcacaaa cttgaatggg tccccttttg atccctccga ggatatccct | 960 |
| gccccctctgg gtgtgcctga cttccaggga agggtttttg gtatcatctc ccaaagagat | 1020 |
| aaacacaata gtcctgggca taatgaacca gaaacaggg gacacgacgc tgtggtcct | 1080 |
| acttacacag cacagtacac tccaaaactt ggacaaattc aaattggcac atggcaaact | 1140 |
| gacgacctta cagtcaacca accagtcaaa ttcaccccag ttggactcaa tgacactgaa | 1200 |
| cactttaacc aatgggtggt ccctaggtat gctggtgcc taaacctcaa taaaacctt | 1260 |
| gccccctctg ttgtccagt atttccggga gacgcctgc tcttcttcag atcatacatt | 1320 |
| cccctcaagg gcggttatgg aaaccagecc attgattgcc tactgccaca agagtgggtg | 1380 |
| caacacttct atcaggaagc agccccctca atgagtgagg tgccctcgt cagatacatc | 1440 |
| aaccgggaca ctggtcgggc actgtttgag gccaaagctc acagagctgg tttcatgaca | 1500 |
| gtctcgagca acaccagtgc cccggtggtt gtgcctgcca acgggtactt cagatttgat | 1560 |
| tcttgggtga accaatttta ttctctcgc ccatgggaa ctgggaatgg gcgtagaagg | 1620 |
| gtccaataa | 1629 |

纳米凝胶化条件



使用诺如病毒的VIP的纳米凝胶被覆检验试验

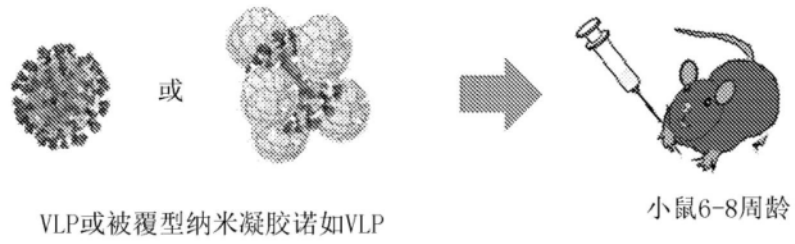
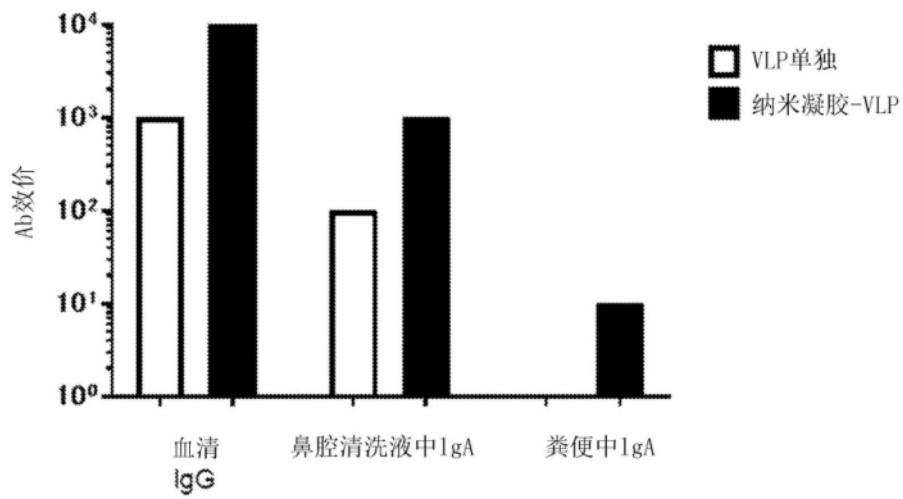


图1

A 相对于诺如病毒GII.17 VIP的抗体效价 (比1:180)



B 相对于诺如病毒GII.4 VIP的抗体效价 (比1:180)

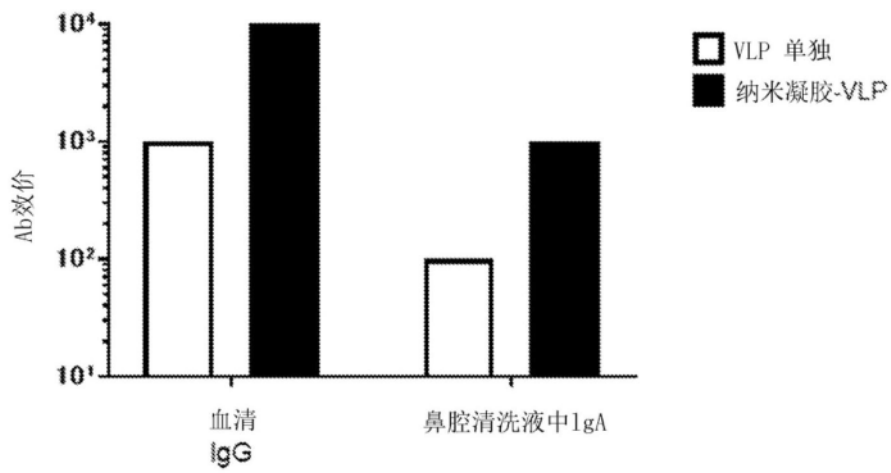


图2

相对于诺如病毒GII.17 VLP的抗体效价 (比1:180)

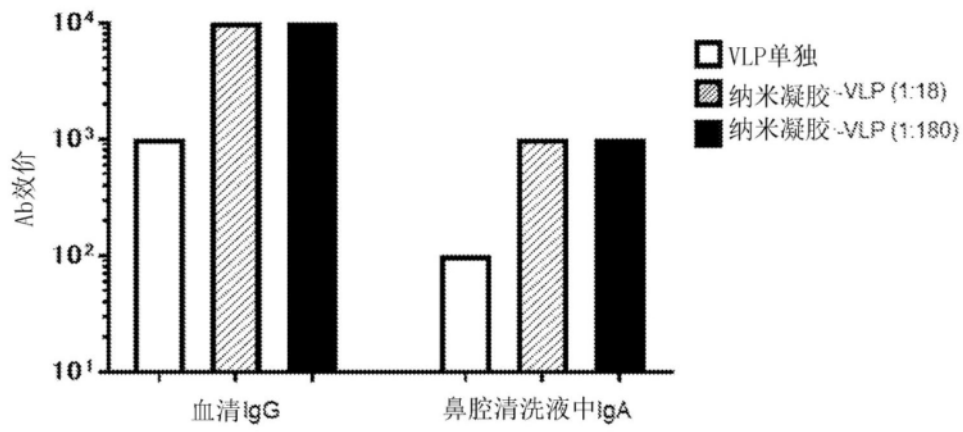
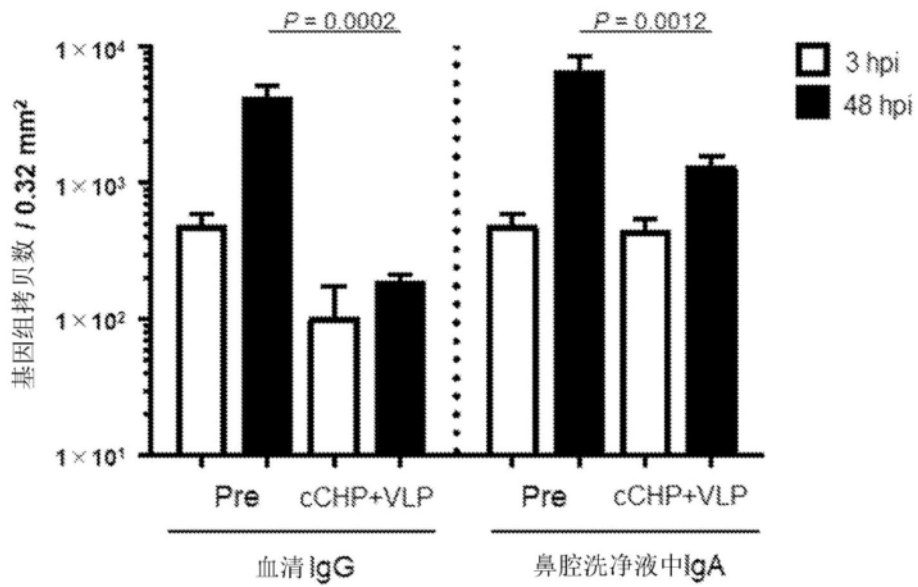


图3

A 相对于诺如病毒GII.17 VIP的抗体效价（比1:180）



B 相对于诺如病毒GII.4 VIP的中和效果（比1:180）

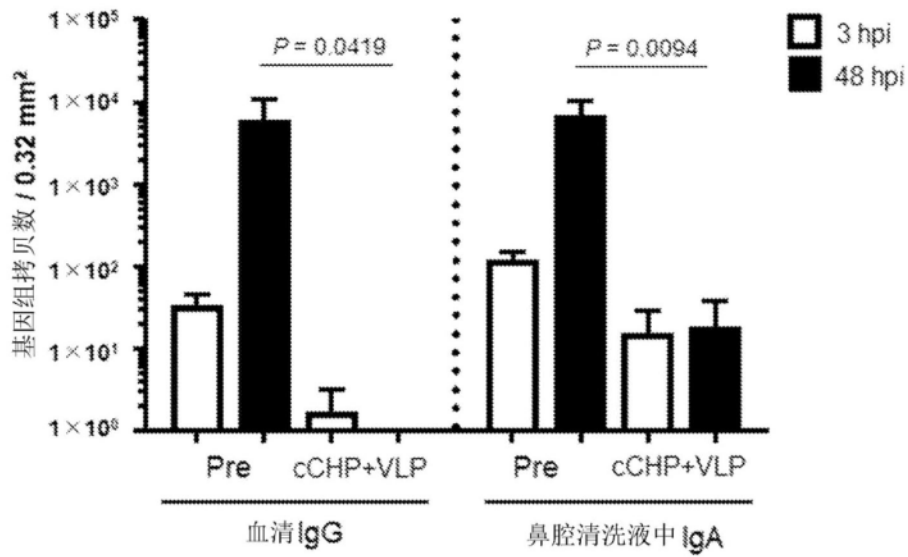


图4

诺如病毒GII.2 VLP的经鼻免疫中的小鼠抗原特异的抗体效价

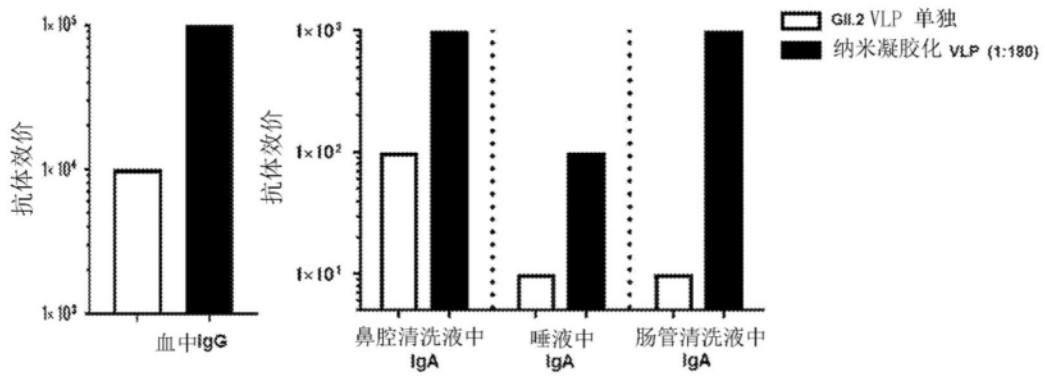


图5

相对于诺如病毒GII.2的VLP经鼻免疫中的血清中IgG的中和效果

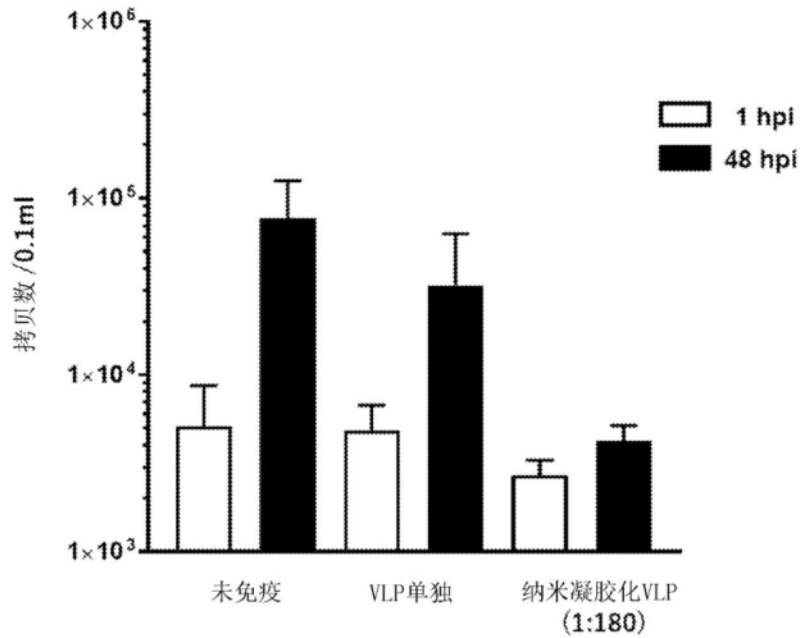


图6

相对于诺如病毒GII.2的VLP经鼻免疫中的肠管清洗液中IgA的中和效果

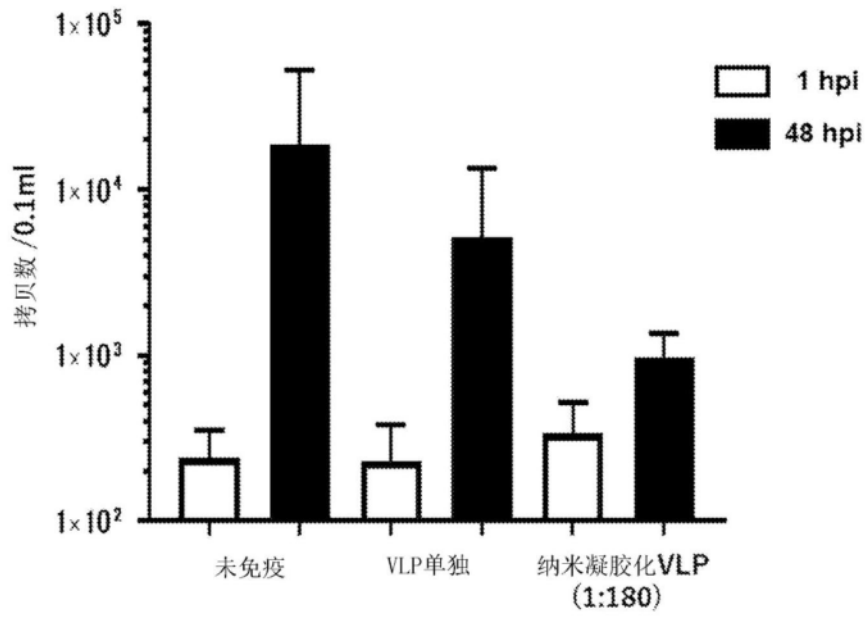


图7

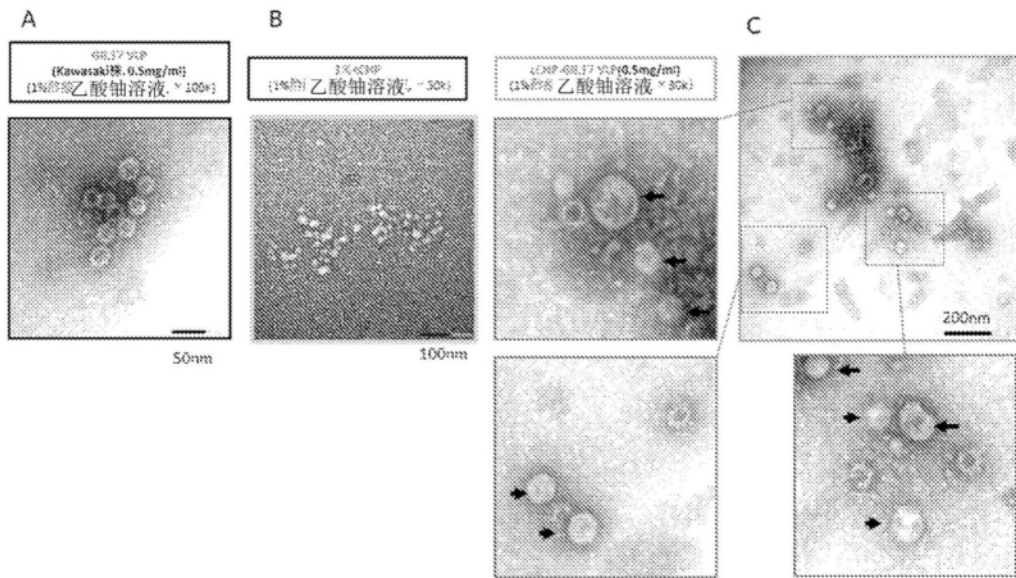


图8

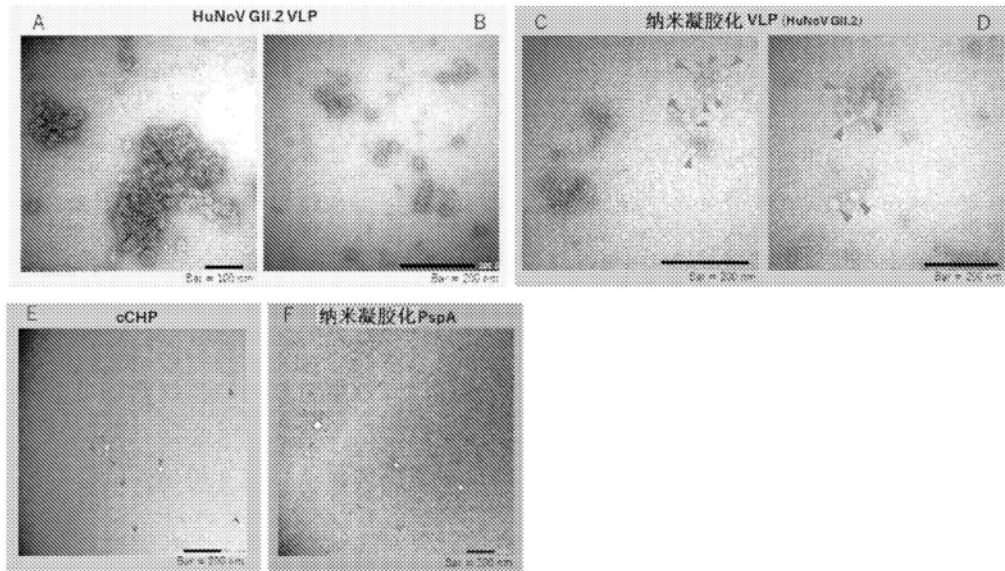


图9

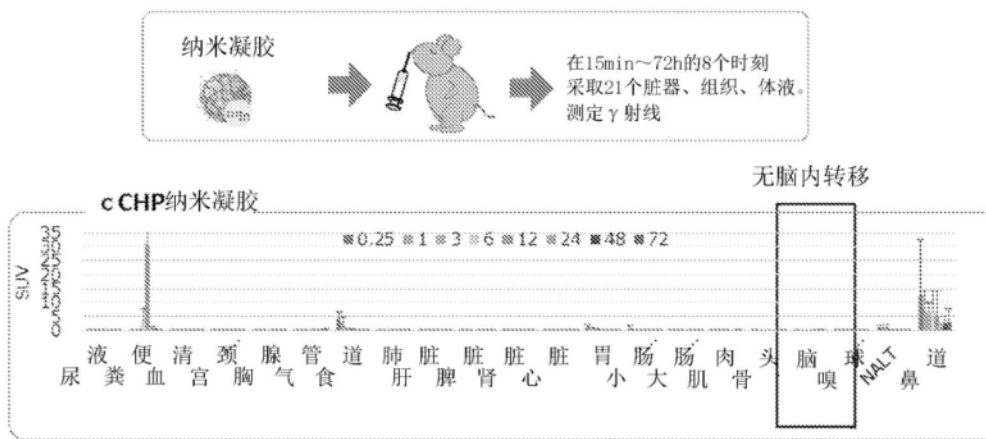


图10