



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110381991 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 09

(21) 申请号 201880017019.3
 (22) 申请日 2018.03.15
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 110381991 A
 (43) 申请公布日 2019.10.25
 (30) 优先权数据
 62/477,481 2017.03.28 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2019.09.09
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2018/022552 2018.03.15
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/182983 EN 2018.10.04
 (73) 专利权人 儿童医院医学中心
 地址 美国俄亥俄州
 (72) 发明人 M·谭 X·J·姜
 (74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
 11256
 专利代理师 陈文平 刘盈盈

(51) Int.Cl.
 A61K 39/00 (2006.01)
 A61K 39/12 (2006.01)
 A61K 39/125 (2006.01)
 A61K 39/295 (2006.01)
 A61P 31/14 (2006.01)
 C07K 14/005 (2006.01)

(56) 对比文件
 US 2016038586 A1, 2016.02.11
 CN 103260645 A, 2013.08.21
 CN 102612525 A, 2012.07.25
 US 2016222066 A1, 2016.08.04
 吴琼 等. 诺如病毒的研究进展. 《中国人兽共患病学报》. 2014, 第30卷 (第12期), 第1245-1251页.
 Ming Tan 等. Norovirus P particle: a subviral nanoparticle for vaccine development against norovirus, rotavirus and influenza virus. 《Nanomedicine (Lond)》. 2012, 第7卷 (第6期), 第1-14页.

审查员 李莎莎

权利要求书2页 说明书22页
 序列表45页 附图10页

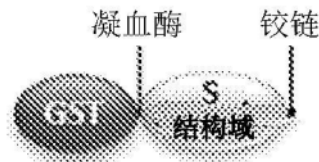
(54) 发明名称

诺如病毒S颗粒类疫苗及其制备和使用方法

(57) 摘要

本文公开了疫苗组合物,特别是用于抗原呈递的多价二十面体组合物。所公开的组合物可含有由重组融合蛋白组成的S颗粒。重组融合蛋白可包括诺罗病毒 (NoV) S结构域蛋白、可操作地连接到诺罗病毒S结构域蛋白的接头蛋白结构域、和可操作地连接到所述接头的抗原蛋白结构域。

A 构建体



1. 一种用于抗原呈递的多价二十面体组合物,其包含S颗粒,其中所述S颗粒包含重组融合蛋白,所述重组融合蛋白由以下组成

a) 修饰的诺罗病毒 (NoV) S结构域蛋白,其中所述诺罗病毒 (NoV) S结构域蛋白的序列是 SEQ ID NO:25;

b) 可操作地连接到所述修饰的诺罗病毒S结构域蛋白的接头蛋白结构域;和

c) 可操作地连接到所述接头的抗原蛋白结构域;

其中所述修饰的诺罗病毒S结构域蛋白包含蛋白酶切割位点的突变,其中所述突变位于第69位或第70位,并且其中所述突变使所述位点对胰蛋白酶切割具有抗性。

2. 根据权利要求1所述的多价二十面体组合物,其中所述组合物具有二十面体对称结构。

3. 根据权利要求1或2所述的多价二十面体组合物,其中所述组合物包含60个抗原呈递位点。

4. 根据权利要求1或2所述的多价二十面体组合物,其中所述修饰的诺罗病毒S结构域蛋白包含蛋白酶切割位点的突变,其中所述突变发生在位置R69。

5. 根据权利要求1或2所述的多价二十面体组合物,其中所述修饰的诺罗病毒S结构域蛋白包含蛋白酶切割位点的突变,其中所述突变发生在位置N70。

6. 根据权利要求1或2所述的多价二十面体组合物,其中所述修饰的诺罗病毒S结构域蛋白包含足以提供至少一个非天然二硫键形成位点的突变,其中所述突变选自(1) V57C和M140C; (2) V57C、Q58C和S136C;以及(3) V57C、Q58C、S136C和M140C。

7. 根据权利要求1或2所述的多价二十面体组合物,其中所述修饰的诺罗病毒S结构域蛋白是杯状病毒的蛋白质,其中所述杯状病毒的特征在于具有180个拷贝的单一衣壳蛋白。

8. 根据权利要求1所述的多价二十面体组合物,其中所述接头包含长度足以在S结构域蛋白颗粒和展示的抗原之间提供空间和一定柔性的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1或2所述的多价二十面体组合物,其中所述接头包含三至六个氨基酸。

10. 根据权利要求1或2所述的多价二十面体组合物,其中所述抗原蛋白结构域包含大小为8个氨基酸至300个氨基酸、或8个氨基酸至400个氨基酸、或8个氨基酸至500个氨基酸的抗原。

11. 根据权利要求1或2所述的多价二十面体组合物,其中所述抗原蛋白结构域包含轮状病毒 (RV) 抗原。

12. 根据权利要求1或2所述的多价二十面体组合物,其中所述抗原蛋白结构域包含RV刺突蛋白抗原VP8抗原。

13. 根据权利要求1或2所述的多价二十面体组合物,其中所述抗原蛋白结构域包含选自以下的抗原:疟疾寄生虫恶性疟原虫的环孢子蛋白 (CSP) 的TSR抗原、甲型流感病毒的HA1蛋白和M2e表位的受体结合结构域、戊型肝炎的P结构域抗原、星状病毒的表面刺突蛋白及其组合。

14. 根据权利要求4所述的多价二十面体组合物,其中所述突变是足以破坏蛋白酶切割位点的K以外的任何氨基酸。

15. 根据权利要求4所述的多价二十面体组合物,其中所述突变是R69A。

16. 根据权利要求5所述的多价二十面体组合物,其中所述突变是足以破坏蛋白酶切割位点的P以外的任何氨基酸。

17. 一种重组融合蛋白,其由以下组成

a) 修饰的诺罗病毒(NoV) S结构域蛋白,其中所述诺罗病毒(NoV) S结构域蛋白的序列是 SEQ ID NO:25;

b) 可操作地连接到所述修饰的诺罗病毒S结构域蛋白的接头蛋白结构域;和

c) 可操作地连接到所述接头的抗原蛋白结构域。

18. 根据权利要求17所述的重组融合蛋白,其中所述修饰的诺罗病毒(NoV) S结构域蛋白包含蛋白酶切割位点的突变,其中所述突变发生在位置R69或N70。

19. 根据权利要求17所述的重组融合蛋白,其中所述修饰的诺罗病毒(NoV) S结构域蛋白包含蛋白酶切割位点的突变,其中所述突变发生在位置R69或N70,并且还包含选自以下的突变:(1)V57C和M140C;(2)V57C、Q58C和S136C;以及(3)V57C、Q58C、S136C和M140C。

20. 一种制备权利要求1-16中任一项所述的多价二十面体组合物的方法,包括步骤:a) 制备包含修饰的NoV S结构域蛋白的第一区域,其中所述修饰包含足以破坏暴露的蛋白酶切割位点的突变,其中所述突变防止蛋白质降解,和b) 以接头和抗原重组地表达所述第一个区域。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述突变包含R69A突变,和在所述诺罗病毒(NoV) S结构域蛋白中引入选自以下的突变:(1)V57C和M140C;(2)V57C、Q58C和S136C;以及(3)V57C、Q58C、S136C和M140C。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述组合物在大肠杆菌中产生。

23. 根据权利要求1-16中任一项所述的组合物在制备用于在有需要的个体中引发免疫应答的药物中的用途,其包括施用所述组合物的步骤。

24. 根据权利要求23所述的用途,其包含多于一次、或多于两次、或多于三次施用所述组合物。

25. 一种试剂盒,其包含至少一剂根据权利要求1-16中任一项所述的组合物、递送装置和用于施用所述组合物的说明书。

诺如病毒S颗粒类疫苗及其制备和使用方法

[0001] 交叉引用相关申请

[0002] 本申请要求2017年3月28日提交的美国临时申请62/477,481的优先权和权益,其内容以其全部并入并且用于所有目的。

[0003] 关于联邦政府资助研究的声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院授予的R21 AI092434-01A1和R56 AI114831-01A1至XJ的政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] RV导致严重的急性胃肠炎,主要发生在婴儿和幼儿中,导致每年全球5岁以下儿童中约200,000人死亡、230万人住院以及2400万门诊[25-27]。目前的两种RV疫苗RotaTeq (Merck)和Rotarix (GlaxoSmithKline, GSK)在许多发达国家都能有效地保护儿童免受严重的RV病例[28,29]。然而,它们在非洲和亚洲的大多数发展中国家都没有表现出令人满意的效果[30-32],其中RV的感染率、发病率和死亡率大多发生,因此大多需要RV疫苗。

发明内容

[0006] 本文公开了疫苗组合物,特别是用于抗原呈递的多价二十面体组合物。所公开的组合物可含有由重组融合蛋白组成的S颗粒。重组融合蛋白可包括诺罗病毒(NoV) S结构域蛋白、可操作地连接到诺罗病毒S结构域蛋白的接头蛋白结构域、和可操作地连接到所述接头的抗原蛋白结构域。所公开的组合物可用于提供

附图说明

[0007] 此申请文件至少包含一个彩色绘图。具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本将在请求和支付必要费用后由专利局提供。

[0008] 本领域技术人员将理解,下面描述的附图仅用于说明目的。附图不旨在以任何方式限制本教导的范围。

[0009] 图1.天然诺罗病毒(NoV) S结构域蛋白以低效率组装成颗粒或复合物。(A) GST-S结构域融合蛋白的表达构建体的示意图,显示凝血酶切割位点和铰链的位置。(B和C) GST-S融合蛋白(GST-S, ~51kDa) (B)和游离S蛋白(~25kDa) (C)的SDS-PAGE分析。(D) S蛋白的EM显微照片,显示少量组装的S颗粒(箭头)。(E)通过尺寸排阻柱(Superdex 200)对S蛋白进行凝胶过滤色谱的洗脱曲线。通过凝胶过滤校准试剂盒和纯化的重组NoV P颗粒[21,22]、小P颗粒[20]和P二聚体[11]校准凝胶过滤柱。显示蓝色葡聚糖2000(~2000kDa,空隙)、P颗粒(~830kDa)、小P颗粒(~420kDa)、P二聚体(~69kDa)和抑肽酶(~6.5kDa)的洗脱位置。(F)来自两个峰的蛋白质的SDS-PAGE分析,峰1(级分#15和16)和峰2(级分#28和29)。在所有SDS PAGE中,泳道M是具有指定分子量的预染色蛋白质标记物。在(B)、(C)和(F)中分别观察到~42和~16kDa的次要S蛋白条带。

[0010] 图2.鉴定S结构域中暴露的蛋白酶位点。(A)蛋白酶切割的S蛋白的N-末端测序产

生五残基序列, NAPGE。(B) S结构域序列显示相同的五残基序列, NAPGE(下划线), 表明了蛋白酶切割位点(星号)。显示了C-末端铰链(下划线)、四残基接头(GGGG)和末端融合的Hisx6肽。还显示了该重组S结构域蛋白的计算的分子量。(C) 所有GII诺如病毒的表示之间的序列比对表明蛋白酶位点是高度保守的(突出显示位置69和70)。(D) 在3倍轴上以不同颜色的卡通表示检查部分GII NoV壳结构(W. J., 未发表的数据)显示由球形表示中的R69(红色)-N70(青色)形成的暴露的蛋白酶位点。左图:俯视图;右图:侧视图。

[0011] 图3. S_{R69A} 蛋白和S60颗粒的生产和表征。(A) S_{R69A} 蛋白的表达构建体的示意图, 显示铰链、接头(GGGG)和Hisx6肽(标记为H的橙色球)。其完整序列显示在图2B中。(B) S_{R69A} 蛋白(~25kDa)的SDS-PAGE分析。泳道1至5是来自TALON CellThru树脂的洗脱级分。泳道M代表具有指定分子量的预染色蛋白质标记物。(C) S_{R69A} 蛋白的EM显微照片, 显示统一尺寸的自组装S60颗粒。(D和E) 通过凝胶过滤色谱法(D)分析 S_{R69A} 蛋白质, 然后对洗脱峰(E)进行SDSPAGE分析。(D) 通过尺寸排阻柱(Superdex 200, 10/300GL)对 S_{R69A} 蛋白质的凝胶过滤色谱的洗脱曲线。如图1E中所述校准凝胶过滤柱。蓝色葡聚糖2000(~2000kDa)、P颗粒(~830kDa)、P二聚体(~69kDa)和抑肽酶(~6.5kDa)的洗脱位置分别由(x)和1、2、3和4表示。(E) 凝胶过滤(D)中三个主峰的 S_{R69A} 蛋白的SDS-PAGE分析, 其中泳道C在加载到尺寸排阻柱之前是对照 S_{R69A} 蛋白;泳道M是具有指定分子量的预染色蛋白质标记物;泳道8和9来自峰1的级分#8和9, 泳道16来自峰2的级分#16;泳道19来自峰3的级分#19。(F) S_{R69A} 蛋白的电喷雾电离质谱(ESI-MS)分析。对于80 μ M S_{R69A} 蛋白(基于单体)的乙酸铵水溶液(200mM, pH6.8和25 $^{\circ}$ C)以阳离子模式获得的ESI-MS。检测到 S_{R69A} 结构域单体(25.047kDa)和二聚体(50.095kDa)。观察到以m/z ~ 15,500为中心的宽特征。尽管质量分辨率不足以建立电荷状态, 但是基于报道的大蛋白质复合物的m/z [61]估计这些离子的MW约为1.47MDa, 对应于60价S60颗粒的MW。

[0012] 图4. 基于60价猫杯状病毒VLP的已知晶体结构(PDB#: 4PB6)的S60颗粒的结构建模。(A) 显示S60颗粒的EM显微照片。(B至D) 表面表示中卡通表示(B)中的 S_{R69A} 蛋白单体(橙色)和五(C)和两倍(D)轴上的S60颗粒的结构。暴露的C端铰链(表面表示)以绿色显示。(E至G) 在表面表示中分别地, 具有C-末端稠合的接头(品红色)和Hisx6肽(天蓝色)在点图示(E)中的 S_{R69A} 蛋白单体(橙色)以及得到的S60颗粒在五(F)和两倍(G)轴上的结构。暴露的C-末端铰链、接头和Hisx6肽以点表示显示。

[0013] 图5. 表征S60-VP8嵌合颗粒。(A) SR69A-VP8嵌合蛋白的示意图。轮状病毒的VP8抗原(绿色)通过接头(HHHH)与铰链融合。将Hisx6肽(橙色)与VP8抗原的C末端融合。(B) S_{R69A} -VP8蛋白(~45kDa)的SDS-PAGE分析。(C) 通过尺寸排阻柱(Superdex 200, 10/300GL)对 S_{R69A} -VP8蛋白进行凝胶过滤色谱。如图1E所示校准所述柱。蓝色葡聚糖2000(~2000kDa)、P颗粒(~830kDa)、P二聚体(~69kDa)和抑肽酶(~6.5kDa)的洗脱位置分别用标记为1、2、3和4的(x)表示。(D) 来自凝胶过滤(C)的峰1的S60-VP8颗粒的EM显微照片。(E) S_{R69A} -VP8蛋白的电喷雾电离质谱(ESI-MS)分析。对于80 μ M S_{R69A} -VP8蛋白(基于单体)的乙酸铵水溶液(200mM, pH6.8和25 $^{\circ}$ C)以阳离子模式获得的ESI-MS。检测到 S_{R69A} -VP8单体(44.950kDa)和降解产物(19.990kDa)。观察到以m/z ~ 23,700为中心的宽特征。虽然质量分辨率不足以确定电荷状态, 但这些离子的MW根据报道的大蛋白复合物的m/z [61]估算约为3.4MDa, 相当于60价 S_{R69A} -VP8颗粒的MW。

[0014] 图6.通过引入S结构域间二硫键进一步稳定S60-VP8颗粒。(A和B)GII.4壳结构的结构分析。(A)在三维轴上GII.4NoV的部分壳结构(W.J.,未发表的数据)显示S结构域的V57和Q58分别在空间上接近相邻S结构域的M140'和S136'。六个S结构域以灰色显示卡通图示,而所提及的四个氨基酸以球形表示以不同颜色显示。(B)一个S结构域的V57(红色)/Q58(青色)与相邻S结构域的S136'(绿色)/M140'(橙色)之间的空间关系的特写,距离为5.7至5.9Å。(C至E)S_{R69A}/V57C/M140C-VP8蛋白的表征。(SEQ ID NO 31中所示的蛋白质序列)(C)S_{R69A}/V57C/M140C-VP8蛋白质的表达构建体。(D)S_{R69A}/V57C/M140C-VP8蛋白的SDSPAGE分析。泳道1、2、3和4是来自亲和柱的四种洗脱的蛋白质级分。在每个泳道中加载15μl每种级分。M,预染色蛋白标记物。(E)通过尺寸排阻柱(Superdex 200,10/300GL)的S_{R69A}/V57C/M140C-VP8蛋白的凝胶过滤色谱的洗脱曲线。如图1E中所述校准凝胶过滤柱。蓝色葡聚糖2000(~2000kDa)、P颗粒(~830kDa)、P二聚体(~69kDa)和抑肽酶(~6.5kDa)的洗脱位置用标记为1、2、3和4的(x)表示。(F至J)S_{R69A}/V57C/Q58C/S136C-VP8蛋白的表征。(SEQ ID NO 32中所示的蛋白质序列)(F)S_{R69A}/V57C/Q58C/S136C-VP8蛋白质的表达构建体。(G)S_{R69A}/V57C/Q58C/S136C-VP8蛋白的SDSPAGE分析。泳道1、2和3是来自亲和柱的三种洗脱的蛋白质级分。每个泳道加载10μl每种级分。(H)通过尺寸排阻柱(Superdex 200,10/300GL)对S_{R69A}/V57C/Q58C/S136C-VP8蛋白进行凝胶过滤分析。如图1E中所述校准凝胶过滤柱。具有不同MW的四种蛋白质的洗脱位置表示为(E)。(I)来自凝胶过滤(H)的峰1的S60-VP8颗粒的EM显微照片。(J)来自峰1(级分#7至10)、峰2(级分#21)和峰3(级分#23)的蛋白质的SDSPAGE分析。泳道C是加载到柱之前的对照蛋白质。

[0015] 图7.S60-VP8颗粒的结构。(A至C)通过cryoEM技术重建S60-VP8颗粒的三维结构。(A)S60-VP8颗粒在五倍轴的表面结构。(B和C)S60-VP8颗粒的中间切片(B)和后半部分(C)的切片结构,显示外部和内部结构。示出了内部S60颗粒(S)和突出的VP8抗原。显示了基于半径的颜色方案。“5”表示五倍轴。(D至F)将60价FCV壳结构(红色,卡通表示)拟合到S60-VP8颗粒的cryoEM密度图(透明灰色)中。拟合结果由三个透明切片视图显示,显示从正面观察的S60-VP8颗粒的前半部分(D)、中间切片(E)和后半部分(F)。(G和H)将60个拷贝的P[8]RV的VP8晶体结构(PDB代码:2DWR)拟合到S60-VP8颗粒cryoEM密度图的突出区域中。S60-VP8颗粒的S60颗粒区域中的拟合FCV壳晶体结构以卡通图示(红色)示出,而突出区域中的拟合VP8晶体结构以蓝色卡通图示示出。(I)基于上述拟合结果的S60-VP8颗粒模型。内部S60颗粒以红色卡通图示出,而60个突出的VP8抗原以浅蓝色以点图表示。

[0016] 图8.在CsCl密度梯度离心后,S60-VP8颗粒形成峰。将S60-VP8颗粒加载到CsCl密度梯度上。超速离心后,分别通过对P[8]RV VP8(A)和GII.4NoVVLP(B)特异的抗体检测分级梯度中的S60-VP8颗粒。在两种情况下,在梯度的中间检测到S60-VP8颗粒的确定峰。

[0017] 图9.S60颗粒展示的VP8保留了配体结合功能。(A)聚糖结合测定显示S60-VP8颗粒结合代表H1和Leb抗原但不代表Ley抗原的合成寡糖。没有VP8的S60颗粒不结合三种抗原中的任何一种。

[0018] 图10.S60-VP8颗粒增强了对展示的RV VP8抗原的免疫原性。将相同剂/剂量的S60-VP8颗粒、游离VP8抗原和不含VP8的S60颗粒分别免疫小鼠(N=6),然后测量VP8特异性IgG应答(A),以及针对RV VP8-配体相互作用的50%阻断效价(BT50)(B)和对所得小鼠血清的RV感染的中和活性(C)。(A)分别由S60-VP8颗粒、游离VP8抗原和S60颗粒引发的VP8特异

性IgG应答。(B)分别用相同的三种免疫原接种后,小鼠血清对抗RV VP8-配体相互作用的BT50。(C)分别用相同的三种免疫原免疫后小鼠血清对培养细胞中RV感染的中和活性。数据组之间的统计差异用星号表示(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

具体实施方式

[0019] 定义

[0020] 除非另有说明,否则术语应根据相关领域普通技术人员的常规用法来理解。如有冲突,将以本文件(包括定义)为准。下面描述了优选的方法和材料,但与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于实践或测试本发明。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用整体并入。本文公开的材料、方法和实施例仅是说明性的而非限制性的。

[0021] 如本文和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“一种方法”包括多种这样的方法,并且提及“一种剂量”包括提及一种或多种剂量及其本领域技术人员已知的等同物,等等。

[0022] 术语“约”或“近似”意指在本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分取决于如何测量或确定该值,例如,测量系统的限制。例如,根据本领域的实践,“约”可以表示在1或大于1的标准偏差内。或者,“约”可表示给定值的最多20%、或最多10%、或最多5%、或最多1%的范围。或者,特别是对于生物系统或过程,该术语可以表示数值的一个数量级内,优选地在5倍内,更优选地在2倍内。在申请和权利要求中描述了特定值的情况下,除非另有说明,否则应当假设术语“约”意味着在特定值的可接受误差范围内。

[0023] 如本文所用,术语“有效量”是指足以显示所需效果的一种或多种活性组分的量。这包括治疗和预防效果。当应用于单独施用的单独活性成分时,该术语仅指该成分。当应用于组合时,该术语是指导致治疗效果的活性成分的组合量,无论是组合施用、连续或同时施用。

[0024] 术语“个体”、“宿主”、“受试者”和“患者”可互换使用,是指作为治疗、观察和/或实验对象的动物。通常,该术语是指人类患者,但该方法 and 组合物可同样适用于非人类受试者,例如其他哺乳动物。在一些实施方案中,该术语涉及人。在进一步的实施方案中,该术语可以指儿童。

[0025] 如本文所用,术语“抗原”可与术语“免疫原”和“免疫原性抗原”互换使用,如下文所定义。从技术上讲,抗原是一种能够在产生免疫反应后与免疫反应产物结合的物质,但不一定能诱导免疫反应(即所有免疫原都是抗原,反之则不然);然而,本文讨论的作为本发明主题的抗原被认为是免疫原性抗原,即使被称为抗原。

[0026] 术语“融合蛋白”是指通过融合基因的翻译产生的蛋白质,产生具有衍生自每种原始蛋白质的功能特性的单一多肽。

[0027] 术语“免疫”是指具有足够的生物防御以避免由致病生物引起的感染、疾病或其他生物入侵的状态。

[0028] 术语“免疫原性”是指免疫原引发体液和/或细胞介导的免疫应答的能力。

[0029] 术语“免疫原”和“免疫原性抗原”是指能够以一种或多种抗体的产生形式诱导或激发适应性免疫应答的特定类型的抗原。

[0030] 术语“免疫原性应答”和“免疫应答”是指生物免疫系统响应免疫原的反应性的改变。这可涉及抗体产生、细胞介导的免疫的诱导、补体激活或获得性免疫的发展或对某种疾病或病原体的免疫耐受性。

[0031] 术语“免疫”和“疫苗接种”是指故意诱导免疫应答,并涉及有效操纵免疫系统的天然特异性以及其诱导性。免疫背后的原理是引入源自致病生物体的抗原,其刺激免疫系统发展针对该生物体的保护性免疫,但其中抗原本身不会引起该生物体的致病作用。

[0032] 术语“感染”是指病原体侵入动物或植物宿主的身体组织,以及体内病原体的增殖和身体对病原体及其可能产生的任何毒素的反应。

[0033] 术语“诺如病毒”、“NoV”、“诺沃克样病毒”或“NLV”是指杯状病毒科中诺如病毒属的任何病毒,包括但不限于以下:诺沃克病毒(“NV”)、MOH、Mexico、VA 207、VA 387、02-1419、C59、VA 115、Hawaii、Snow Mountain、Hillington、Toronto、Leeds、Amsterdam、Idaho Falls、Lordsdale、Grimsby、Southampton、Desert Shield、Birmingham和White Rivercap。NoV在人类中引起急性胃肠炎。

[0034] 如本文所用,当在所述颗粒的上下文中使用时,字母“S”表示“S结构域”,例如,在 $S_{69A/58C/140C}$ -VP8中,其表示具有69A/58C/140C突变的S-VP8蛋白质。在其他方面,所使用的命名法可以是例如其中“69A/58C/140C”表示为上标的S。

[0035] 术语“疫苗”是指提高对特定疾病的免疫力的生物制剂或组合物。疫苗是有意施用以在受体中诱导免疫应答的免疫原性抗原的实例。

[0036] 术语“多价疫苗(multivalent vaccine)”和“多价疫苗(polyvalent vaccine)”是指设计用于针对两种或更多种相同微生物的菌株(例如NoV)或针对两种或更多种不同微生物进行免疫的疫苗。

[0037] 诺如病毒(NoV)是杯状病毒科(Caliciviridae)中的诺罗病毒属(Norovirus)的成员,在人类中引起流行性急性胃肠炎,具有显著的发病率和死亡率[4,5]。在结构上,NoV病毒被蛋白质衣壳包裹,该衣壳由单一主要结构蛋白——衣壳蛋白或病毒蛋白1(VP1)——组成。NoV衣壳的晶体结构显示,NoV VP1含有两个主要结构域,N-末端壳(S)和C-末端突出(P)结构域,它们通过短铰链连接[6]。S结构域构建支持NoV病毒体基本支架的内部二十面体壳,而P结构域构成二聚体突起[7-10]以稳定NoV衣壳并识别细胞表面聚糖作为宿主附着因子或受体[11-14]。

[0038] 通过真核系统体外表达全长NoV VP1导致自身形成180价病毒样颗粒(VLP),其结构和抗原性与真正的病毒衣壳相似[6,15],同时产生通过大肠杆菌系统的P结构域形成P二聚体,其在结构上与NoV衣壳的那些无法区分[7-11,16-19]。此外,修饰NoV P结构域的产生组装成不同的高阶颗粒或复合物,包括12价小P颗粒[20]、24价P颗粒[21,22]和36价P络合物[23]。

[0039] 与P结构域不同,S结构域的研究较少,尽管通过在杆状病毒/昆虫细胞系统中表达S结构域报道了“薄层”S颗粒[11,24],可能相当于NoV衣壳的180价壳。在这项研究中,申请人开发了一种新技术,通过简单的大肠杆菌系统生产统一的60价S颗粒,称为S60颗粒,并将其作为抗原呈递的多功能疫苗平台应用于轮状病毒(RV)和其他病原体的亚单位疫苗开发。

[0040] RV导致严重的急性胃肠炎,主要发生在婴儿和幼儿中,导致每年全球5岁以下儿童中约200,000人死亡,230万人住院,以及2400万门诊[25-27]。目前的两种RV疫苗,RotaTeq

(Merck) 和Rotarix (GlaxoSmithKline, GSK), 在许多发达国家都能有效地保护儿童免受严重的RV病例[28, 29]。然而, 它们在非洲和亚洲的大多数发展中国家[30-32]都没有表现出令人满意的效果, 其中RV的感染率、发病率和死亡率大多发生, 因此大多需要RV疫苗。申请人最近的研究表明, 发展中国家RV疫苗的低效率可能是由于中和低收入国家中P型疫苗与变化的主要RV P类型的不匹配[33, 34]。此外, 目前的减毒活疫苗仍然很昂贵, 口服给药后肠道疫苗RV的复制可能是接种疫苗儿童肠套叠风险增加的原因[35-41]。因此, 需要能够克服两种现有RV活疫苗的上述限制的新一代RV疫苗。

[0041] RV P类型由病毒蛋白4 (VP4) 决定, 其构成RV病毒体的刺突蛋白。在结构上, 每个刺突蛋白含有两个主要部分, 由VP5形成的茎和由VP8构建的远端头[42]。VP5和VP8是胰蛋白酶对VP4的切割产物。VP8负责与RV宿主附着因子或受体的相互作用, 这些受体是一组细胞表面聚糖, 包括组织血型抗原 (HBGA) [33, 43-45]。以前的研究表明, VP8抗原引发中和抗体, 其抑制RV感染和培养细胞中的复制, 并保护免疫小鼠免受RV感染[46, 47], 因此, VP8抗原是抗RV的重要疫苗靶标[46-49]。

[0042] 然而, 许多定义的中和抗原, 包括RV VP8, 由于它们的小尺寸和低化合价, 因此面临非复制型疫苗开发的低免疫原性的常见问题。该问题可以通过将抗原融合或缀合到大的多价蛋白质平台来解决, 以增强免疫原性。在该研究中, 申请人提供了确实证据, 证明在NoV S60颗粒作为有效的疫苗平台展示后, RV VP8抗原的免疫原性显著增强。申请人的数据表明, S60-VP8颗粒可以容易地产生, 稳定并且对展示的RV VP8抗原具有高免疫原性, 因此是一种有希望的针对RV感染的亚单位疫苗。

[0043] 病毒衣壳蛋白的同型相互作用是常见的, 驱动病毒衣壳自我形成。通过利用天然构建诺罗病毒衣壳内部壳的诺罗病毒壳 (S) 结构域的这种相互作用, 申请人已经开发了通过简单的大肠杆菌系统生产60价二十面体S60颗粒的方法。这可以通过对S结构域的若干修饰来实现, 例如R69A突变以破坏暴露的蛋白酶切割位点和三重半胱氨酸突变 (V57C/Q58C/S136C) 以建立S-结构域间二硫键以增强S-结构域间相互作用。具有60个暴露的S结构域C末端的多价S60颗粒为抗原呈递提供了理想的平台, 导致对展示的抗原的免疫原性增强以用于疫苗开发。通过构建显示60种轮状病毒 (RV) VP8蛋白 (主要的RV中和抗原) 的嵌合S60颗粒证明了这一点。这些S60-VP8颗粒易于产生并在小鼠中引发显示的VP8抗原的高IgG应答。用S60-VP8颗粒免疫后的小鼠抗血清表现出对RVVP8与其聚糖配体结合的高阻断和对培养细胞中RV感染的高中和活性。研究了S60和S60-VP8颗粒的三维结构。最后, S60颗粒还可以显示其他抗原, 支持S60颗粒是多功能疫苗平台的概念。

[0044] 本文公开了可用于形成多价疫苗组合物的方法和组合物, 特别是使用修饰的诺罗病毒S颗粒。

[0045] 在一个方面, 公开了用于抗原呈递的多价二十面体组合物。所述组合物可包含S颗粒, 其中所述S颗粒可包含重组融合蛋白, 所述重组融合蛋白包含诺罗病毒 (NoV) S结构域蛋白; 与诺罗病毒S结构域蛋白可操作地连接的接头蛋白结构域; 和可操作地连接到接头的抗原蛋白结构域。

[0046] 该组合物通常具有二十面体对称结构。在一个方面, 该组合物包含60个用于抗原呈递的位点。

[0047] 在一个方面, 诺罗病毒S结构域蛋白是杯状病毒的蛋白质。杯状病毒的特征在于具

有180个拷贝的单个衣壳蛋白。

[0048] 在一个方面,诺罗病毒S结构域蛋白可以包含NoV S结构域蛋白的蛋白酶切割位点中的突变,其中所述突变使得该位点对胰蛋白酶切割具有抗性。如果突变有效地破坏胰蛋白酶切割位点,则可以对位点进行一个或多个突变。本领域普通技术人员将容易理解实现这种效果的位点的修饰。在一个方面,突变可以在位置69或位置70。在一个方面,突变可以发生在位置R69。在某些方面,突变可以是除K(赖氨酸)之外的任何氨基酸的变化,其足以破坏蛋白酶切割位点。在某些方面,突变是R69A。在其他方面,突变可以发生在N70位,例如,突变可以是除P(脯氨酸)之外的任何足以破坏蛋白酶切割位点的氨基酸。

[0049] 在一个方面,诺罗病毒S结构域蛋白可包含足以提供非天然二硫键结合位点的突变。诺罗病毒S结构域蛋白可以包含至少两个氨基酸(其在空间上彼此接近)至半胱氨酸残基的突变,其足以在多价二十面体S颗粒的相邻S结构域蛋白之间提供至少一个非天然二硫键结合位点,或者,在其他方面,至少两个非天然二硫键结合位点,或至少三个非天然二硫键结合位点。在某些方面,突变可以选自V57C、Q58C、S136C、M140C或其组合。

[0050] 在一个方面,接头可以包含足以在S结构域蛋白质颗粒和展示的抗原之间提供空间和一定柔性的长度的氨基酸序列。接头通常是1-10个氨基酸单元或3-6个氨基酸的短肽,其将S结构域的C-末端连接到展示的抗原上。接头在S60颗粒和展示的抗原之间提供空间和一定柔性,这有助于S结构域和展示的抗原的独立折叠。必要时可以使用更长的接头。接头的氨基酸长度应足以允许蛋白质结构域的柔性以形成要求保护的组合物。

[0051] 所公开的组合物理想地适合于呈递抗原。本领域普通技术人员可以容易地确定合适的抗原。本文公开了示例性抗原。在某些方面,除了免疫原性之外,可以通过大小选择抗原蛋白结构域,并且其可以编码具有8个氨基酸至约300个氨基酸、或8个氨基酸至约400个氨基酸,或8个氨基酸至约500个氨基酸的大小的抗原。如本领域普通技术人员将容易理解的,抗原的大小可以变化很大,并且本组合物可以用于呈递各种不同的抗原以引发免疫应答。

[0052] 在一个方面,多价二十面体组合物可包含抗原蛋白结构域,其是轮状病毒(RV)抗原。在一个方面,抗原蛋白结构域可包含RV刺突蛋白抗原(VP8抗原)。在其他方面,抗原可包含疟疾寄生虫恶性疟原虫的环孢子蛋白(CSP)的TSR抗原、甲型流感病毒的HA1蛋白和M2e表位的受体结合结构域、戊型肝炎的P结构域抗原、星状病毒的表面刺突蛋白及其组合。同样,这些抗原仅仅是示例性的,并且这些抗原的叙述并不旨在限制权利要求的范围。示例性序列包括SEQ ID NO 34和SEQ ID NO 35:人轮状病毒VP8抗原,SEQ ID NO 42和SEQ ID NO 43:戊型肝炎病毒(HEV)的P结构域抗原,SEQ ID NO 44和SEQ ID NO 45:禽类AstV的表面刺突蛋白抗原(参见,例如,(GenBank AC#:NP987088,残基423-630),SEQ ID NO 46和SEQ ID NO 47:甲型流感病毒的HA1抗原(H7),SEQ ID NO 48和SEQ ID NO 49:恶性疟原虫的环孢子蛋白的TSR抗原,和SEQ ID NO 50和SEQ ID NO 51:甲型流感病毒的M2E表位。应当理解,用于产生抗原肽的抗原序列与参考核酸序列可具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性,条件是所得抗原在施用具有抗原的组合物个体中引发至少部分免疫应答。

[0053] 重组融合蛋白是所公开的疫苗组合物的亚基。本文进一步公开了可以形成多价二十面体组合物基础的重组融合蛋白。融合蛋白可以包含诺罗病毒(NoV)S结构域蛋白,其具

有如上所述的胰蛋白酶位点至如上所述的添加的半胱氨酸位点的突变;与上述具有上述突变的诺罗病毒S结构域蛋白可操作地连接的接头蛋白结构域;和可操作地连接到接头的抗原蛋白结构域。以上描述了融合蛋白的每个部分的特征。

[0054] 除了上述S颗粒之外,所公开的组合物还可包含一种或多种药学上可接受的载体,其可包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、稳定剂、稀释剂、防腐剂、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂、吸附延迟剂等。所公开的S颗粒可以在生理盐水中提供。任选地,可以包括保护剂,例如抗微生物活性剂,例如庆大霉素、硫柳汞等。该组合物可进一步包括稳定剂,例如糖类、海藻糖、甘露糖醇、蔗糖等,以增加和/或维持产品的保质期。本领域技术人员将理解,本文的组合物可包含已知的可注射的生理学上可接受的无菌溶液。为了制备用于肠胃外注射或输注的即用型溶液,可以容易地获得水性等渗溶液,例如盐水或相应的血浆蛋白溶液。此外,本发明的免疫原性和疫苗组合物可包括稀释剂、等渗剂、稳定剂或佐剂。稀释剂可包括水、盐水、右旋糖、乙醇、甘油等。等渗剂可包括氯化钠、右旋糖、甘露醇、山梨糖醇和乳糖等。稳定剂包括白蛋白和乙二胺四乙酸的碱金属盐等。本领域普通技术人员将理解合适的佐剂。

[0055] 在一个方面,公开了一种容器,其包含至少一剂本文公开的免疫原性组合物。容器可包含1至250剂的免疫原性组合物,或在其他方面,1、10、25、50、100、150、200或250剂的免疫原性组合物。在一个方面,每个容器可包含一剂以上的免疫原性组合物,并且还可包含抗微生物活性剂。这些药剂可包括,例如,抗生素,如庆大霉素和硫柳汞等。

[0056] 另一方面涉及试剂盒。试剂盒可包含上述任何容器和说明书,说明书包括用于递送上文公开的免疫原性组合物的信息。例如,可以提供与肌肉内施用至少一剂相关的说明书,以减轻与本文公开的抗原感染相关的临床症状的严重性。试剂盒和/或组合物可进一步包括免疫刺激剂,例如匙孔血蓝蛋白(KLH)或不完全弗氏佐剂(KLH/ICFA)。也可以使用本领域技术人员已知的任何其他免疫刺激剂。

[0057] 在一个方面,公开了制备所公开的多价二十面体结构的方法。该方法可以包括以下步骤:a)制备包含修饰的NoV S结构域蛋白的第一区域,其中所述修饰包含足以破坏暴露的蛋白酶切割位点的突变(其中突变防止蛋白质降解),优选地R69A突变,和在所述诺罗病毒(NoV)S结构域蛋白中引入一个或多个突变,其足以产生S-结构域蛋白间二硫键,例如选自V57C、Q58C、S136C和M140C的突变,及其组合,和b)以接头和抗原重组地表达具有修饰的NoV S结构域蛋白的所述第一个区域。在某些方面,组合物可以在大肠杆菌中有效产生。

[0058] 在一个方面,公开了一种在有需要的个体中引发免疫应答的方法。在这方面,该方法可包括将如上公开的疫苗组合物施用给有需要的个体的步骤。容易理解,可以根据本领域已知的任何方法将所公开的组合物施用给个体,并且最佳施用(包括途径和量)不需要过多的实验。疫苗组合物可以预防性地施用给怀疑将来暴露于掺入疫苗组合物中的抗原的个体。在某些方面,提供了一种提供免疫应答的方法,所述免疫应答保护接受所述组合物的个体免于感染,或降低或减轻与感染相关的临床症状的严重性。感染可包括例如疟疾、甲型流感、戊型肝炎和星状病毒感染。剂量方案可以是单剂方案或多剂方案(例如,包括加强剂),其中组合物的单位剂型在不同时间施用。如本文所用,术语“单位剂型”是指适合作为人和动物受试者的单位剂量的物理上离散的单位,每个单位含有足以产生所需效果的预定量的本文公开的抗原组合物,该组合物与药学上可接受的赋形剂(例如,药学上可接受的稀释剂、载体或媒介物)联合提供。疫苗可以与其他免疫调节剂联合施用。

[0059] 实施例

[0060] 提供以下非限制性实施例以进一步说明本文公开的本发明的实施方案。本领域技术人员应该理解,以下实施例中公开的技术代表已经发现在本发明的实践中很好地起作用的方法,因此可以认为是构成其实践模式的实例。然而,本领域的技术人员应当理解,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,根据本发明公开的内容,对公开的特定实施方案可以做很多改动并能得到相同或相似的结果。

[0061] 通过生物工程生成新型生物材料已经成为现代医学中快速发展的领域。典型的实施例包括各种多价蛋白质纳米颗粒和复合物,它们是利用病毒衣壳蛋白的自身形成特征构建的[1-3]。病毒衣壳蛋白负责病毒生命周期,特别是病毒附着和进入所必需的许多基本功能,因此能够在免疫人和动物后引发针对病毒感染的中和抗体。这支持了病毒衣壳蛋白是针对相应病毒病原体的优异疫苗靶标的观点。事实上,已开发出各种衣壳蛋白颗粒和复合物,并用作非复制性亚单位疫苗,以对抗每年夺去数百万人生命的不同传染病[1-3]。与需要培养感染性病毒颗粒并因此与某些安全性问题相关的传统活减毒和灭活病毒疫苗不同,源自生物工程病毒衣壳蛋白的非复制性亚单位疫苗不涉及传染因子,因此更安全,制造成本低于传统疫苗。因此,非复制型亚单位疫苗代表了新一代的创新疫苗策略。

[0062] 材料和方法

[0063] 质粒构建体。1) 谷胱甘肽-s-转移酶(GST)标记的S结构域蛋白的表达构建体。通过BamH1/Sal I位点将具有GII.4NoV毒株VA387(GenBank AC#:AY038600.3;残基1至221)的铰链编码序列的S结构域插入pGEX-4T-1载体(GST)的多克隆位点(GST Gene Fusion System, GE Healthcare Life Sciences)。得到的S结构域蛋白质具有N末端GST,其间具有凝血酶切割位点。2) 用于Hisx6融合的S_{R69A}结构域表达的质粒构建体。将具有R69A突变的相同NoV S结构域-铰链编码序列通过BamH1/Not I位点插入pET-24b载体(Novagen)的多克隆位点。得到的S结构域蛋白具有C末端融合的Hisx6肽。3) 用于S_{R69A}-VP8嵌合蛋白表达的DNA构建体。含有P[8]人RV菌株BM14113的RV VP8编码序列的DNA片段,其等同于WA菌株VP8的64至231的氨基酸序列(GenBank AC#:VPXRWA),与S_{R69A}结构域-铰链的C-末端以其间的接头(四个组氨酸)融合。RV菌株BM14113直接从RV阳性粪便样品中分离[45]。将Hisx6-肽添加到VP8抗原的C-末端用于纯化目的。4) S_{R69A}/V57C/M140C-VP8、S_{R69A}/V57C/Q58C/S136C-VP8和S_{R69A}/V57C/Q58C/S136C/M140C-VP8嵌合蛋白的表达构建体。通过定点突变将另外两个(V57C/M140C)、三个(V57C/Q58C/S136C)或四个(V57C/Q58C/S136C/M140C)突变引入到S_{R69A}-VP8嵌合蛋白的表达构建体中来制备该DNA构建体。5) 用于S_{R69A}/V57C/Q58C/S136C-mVP8嵌合蛋白表达的质粒构建体。该构建体含有类似S_{R69A}/V57C/Q58C/S136C-VP8构建体的DNA序列,但VP8编码序列被编码小鼠RV EDIM(婴儿小鼠的流行性腹泻)菌株的VP8的那些序列替换[50]。另外,使用S_{R69A}/V57C/Q58C/S136C-VP8嵌合蛋白的构建体作为起始构建体构建DNA,所述DNA构建用于其他S_{R69A}/V57C/Q58C/S136C类嵌合颗粒,所述颗粒展示各种病原体的抗原,包括恶性疟原虫寄生虫3D7株的环孢子蛋白(CSP)的表面抗原TSR(GenBank#AC:CAB38998,残基309-375)[51]、甲型流感病毒的M2e表位[52,53]和戊型肝炎病毒的P结构域抗原[54-56],其中RV VP8编码序列被编码相应抗原的序列替换。

[0064] 重组蛋白的生产和纯化。如前所述,重组GST-和Hstx6-融合蛋白在大肠杆菌(BL21,DE3)中表达[11,47,53,56]。根据制造商的说明,使用用于GST标记的Sepharose

4Fast Flow纯化树脂(GE Healthcare Life Sciences)和用于Hisx6-肽融合蛋白的TALON CellThru树脂(Clontech)纯化得到的重组蛋白。可以通过凝血酶(GE Healthcare Life Sciences)切割从靶蛋白中除去GST,而GST-融合蛋白仍然与纯化树脂结合。

[0065] 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质定量。使用10%分离凝胶通过SDS-PAGE分析纯化的蛋白质。使用连续稀释的牛血清白蛋白(BSA,Bio-Rad)作为相同凝胶上的标准物,通过SDS-PAGE定量蛋白质[46]。

[0066] 凝胶过滤色谱。这是为了分析蛋白质和蛋白质复合物的大小分布进行的,如前所述[11,53,57],其通过AKTA快速性能液相色谱系统(AKTA Pure 25L,GE Healthcare Life Sciences),使用尺寸排阻柱(Superdex 200,10/300GL,GE Healthcare Life Sciences)。该柱通过凝胶过滤校准试剂盒(GE Healthcare Life Sciences)和纯化的NoV P颗粒(~830kDa)[57]、小P颗粒(~420kDa)[20]和P二聚体(~69kDa)[11]进行校准,如前所述[53,55]。通过SDS-PAGE分析洗脱峰的蛋白质。

[0067] 氯化铯(CsCl)密度梯度超速离心。将0.5mL树脂纯化的S60-VP8颗粒与密度为1.300g/mL的11mL CsCl溶液混合,然后装入12mL离心管中。在使用SW41Ti转子在Optima L-90K超速离心机(Beckman Coulter)中以288,000g离心45小时后,通过底部穿刺将梯度分级成23个级分,每个级分0.5mL。基于折射率确定级分的CsCl密度。通过ELISA分析级分中的S60-VP8颗粒,其中将各个级分在PBS中稀释20倍并包被在微量滴定板上。通过NoV VLP-和RVVP8特异性抗体检测包被的蛋白质。

[0068] 电子显微镜。使用1%钨酸铵作为染色溶液,制备蛋白质样品用于电子显微镜(EM)检查颗粒的形成[22]。在EM10C2显微镜(德国Zeiss)下在80kV、10,000x至40,000x的放大倍数下观察样本。

[0069] 电喷雾电离质谱(ESI-MS)。使用配备纳流ESI(nanoESI)源的Synapt G2S四极杆-离子迁移率分离-飞行时间(Q-IMS-TOF)质谱仪(Waters,Manchester,UK)以正离子模式进行所有ESI-MS测量。每种样品溶液在200mM乙酸铵水溶液(pH6.8,25°C)中制备并装入nanoESI尖端,该尖端由硼硅酸盐毛细管(1.0mm外径,0.68mm内径)制成,使用P-1000微量移液器拉拔器(Sutter Instruments,Novato,CA)将其拉至~5 μ m。为了进行ESI,将铂丝插入nanoESI尖端并施加1.10kV的电压。使用60°C的源温度。锥、阱和转移电压分别为50V、5V和2V,阱气体流速为6.0mL \cdot min⁻¹;所有其他参数都设置为默认值。使用WatersMassLynx软件(版本4.1)进行数据采集和处理。

[0070] N-末端氨基酸测序。切下含有切割的S结构域蛋白的SDS-PAGE凝胶切片,并通过在爱荷华州立大学的Protein Facility的Applied Biosystem,Inc.的494Procise蛋白测序仪/140C分析仪进行N-末端氨基酸测序(<http://www.protein.iastate.edu/>)。

[0071] 免疫小鼠。将3-4周龄的BALB/c小鼠(Harlan-Sprague-Dawley,Indianapolis,IN)分成4组(N=6),用于免疫接种(10 μ g/小鼠):1)S60-VP8嵌合体颗粒;2)游离VP8蛋白;没有VP8抗原的S60颗粒;和4)相同体积的稀释剂(磷酸盐缓冲盐水,PBS,pH7.4)。用Inject Alum佐剂(Thermo Scientific,50 μ l/小鼠)以两周的间隔肌肉注射三次进行免疫。在第三次免疫后两周收集血液,并通过标准方案从血液样品制备血清。

[0072] 酶免疫测定(EIA)。如前所述,进行EIA以测量用不同免疫原免疫后小鼠血清的抗体滴度[46]。将凝胶过滤纯化的游离VP8抗原(1 μ g/mL)包被在96孔微量滴定板上,并与连续

稀释的小鼠血清一起温育[47]。通过山羊抗小鼠二抗-HRP缀合物(MP Biomedicals, Inc)检测结合的抗体。通过终点稀释定义抗体滴度,截止信号强度为 $OD_{450}=0.1$ 。

[0073] HBGA结合测定。进行基于合成寡糖和唾液的HBGA结合测定以测量展示VP8的S60颗粒与其HBGA配体的结合功能[45]。简而言之,将分别代表H1、Leb和Ley抗原的合成寡糖($2\mu\text{g/mL}$)或为H1和/或Leb阳性或H1和Leb阴性的煮沸唾液样品(1:1000稀释)涂在96-将微量滴定板上并与各种S60-VP8颗粒或不合指定浓度的RV VP8的S60颗粒一起温育。通过豚鼠抗VP8抗血清(针对S60-VP8颗粒)或针对GII.4NoV VLP的豚鼠超免疫血清(针对S60颗粒)测量结合的蛋白质,然后温育HRP缀合的山羊抗豚鼠IgG(ICN Pharmaceuticals)。

[0074] 针对RV VP8-HBGA配体附着的血清阻断效价。这是作为先前描述的替代中和试验进行的[47]。将具有阳性H1和Lewisb (Leb) 抗原的煮沸和稀释的(1:1000)人唾液样品——P[8]RV的配体[45, 58]——包被在微量滴定板上。在不同的稀释度下用各种免疫原(S60-VP8颗粒、游离VP8抗原、S60颗粒和PBS)免疫后,将 625ng/mL 的P颗粒展示RV VP8(PP-VP8)[46]与免疫后血清预温育,然后将PP-VP8加入到包被的唾液样品中。将50%阻断效价(BT50)定义为与未阻断的阳性对照相比,导致PP-VP8颗粒与HBGAs/唾液样品结合至少50%减少的最低血清稀释度。

[0075] RV中和测定:如前所述进行[53]。简而言之,将MA104细胞在6孔板中培养,并且约50PFU/孔的滴度的组织培养适应的RV Wa菌株(G1P[8])被用作接种物。用指定的免疫原(见上文)免疫后,将胰蛋白酶处理的Wa RV与小鼠血清温育1小时,然后加入细胞中。用包括胰蛋白酶(Invitrogen)和0.8%琼脂糖的培养基覆盖平板。温育4天后,将噬斑染色并计数。通过相对于未处理的对照孔中的数量,用抗血清处理的孔中斑块数量的减少来计算血清的中和(%)。

[0076] S60颗粒的结构建模。使用60价猫科杯状病毒(FCV) VLP[59]的晶体结构(PDB#: 4PB6)作为模板,使用软件PyMOL Molecular Graphics System,版本1.8.2.0(Schroinger, LLC),模拟具有或不具有Hisx6肽和S60-VP8嵌合颗粒的S60颗粒的结构。所有基于晶体结构的图像都是由该软件制作的。

[0077] 通过cryoEM对S60-VP8嵌合颗粒进行结构重建。这是使用申请人之前的研究[20, 21, 46]中描述的类似的低温EM方法进行的。简而言之,将等分试样(3至 $4\mu\text{L}$)的凝胶过滤纯化的S60-VP8嵌合颗粒快速冷冻到Quantifoil网格上,然后将其加载到显微镜中。使用CM200低温显微镜在 $\times 50,000$ 的标称放大倍数和 2.0 至 $4.0\mu\text{m}$ 的散焦范围内在膜上记录低电子(e)-剂量图像($\sim 20\text{e}/\text{\AA}^2$)。通过使用步长为 $6.35\mu\text{m}/\text{像素}$ 的Nikon Super CoolScan 9000ED扫描仪选择并数字化显微照片。扫描的图像被分箱,导致图像的最终采样为 $2.49\text{\AA}/\text{像素}$ 。使用EMAN的拳击手(boxer)程序选择S60-VP8嵌合颗粒的图像。手动过滤所选图像以排除误报。EMAN的ctfit程序用于手动确定与源自相同显微照片的颗粒图像组相关的对比度-传递函数(CTF)参数。使用EMAN的startoct程序创建颗粒的初始模型。然后,EMAN的精炼程序用于迭代地确定原始颗粒的中心和方向,并通过EMAN make3d程序从2-D图像重建3-D图,直到收敛。在重建S60-VP8嵌合颗粒期间施加二十面体对称性。使用UCSF Chimera软件(版本1.12;<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>)进行cryo-EM模型的分析,包括拟合S60颗粒模型(参见aboe)和P[8]RV VP8(2DWR)的晶体结构。

[0078] 统计分析。通过软件GraphPad Prism 6(GraphPad Software, Inc),使用非配对非

参数t检验,计算数据集之间的统计学差异。P值设定为:差异显著,0.05($P < 0.05$);差异非常显著,0.01($P < 0.01$);差异极其显著,0.001($P < 0.001$)。

[0079] 道德声明。该研究严格按照美国国立卫生研究院实验动物护理和使用指南(23a)中的建议进行。该方案由辛辛那提儿童医院研究基金会(动物福利保证号A3108-01)的机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准。

[0080] 结果

[0081] 天然NoV S结构域的低颗粒形成效率。申请人的研究开始于使用表达载体pGEX-4T-1在大肠杆菌中利用GII.4NoV(VA387)的铰链产生天然S结构域,产生了具有分子量(MW)~51kDa的GST-S结构域融合蛋白(图1,A和B)。通过凝血酶切割获得在没有GST的~25kDa的游离S结构域蛋白(图1C),而GST仍然与琼脂糖珠结合。对S蛋白的EM观察揭示了直径为~20nm的很少的薄层环状结构(图1D),最可能等同于组装的S颗粒。为了确定S颗粒形成效率,进行S结构域蛋白的凝胶过滤色谱,揭示两个宽峰(图1E)。使用NoV VLP超免疫血清[15]和N末端测序(图2,见下文)进行SDSPAGE(图1F),然后进行Western分析(数据未显示),证实两个峰均为S蛋白。具有高于800kDa的高MW的峰1应代表自组装的S颗粒或复合物,而峰2应为S结构域单体(~25kDa)和/或二聚体(~50kDa)。

[0082] 申请人还观察到具有较低MW的较小蛋白质条带,其分别与GST-S融合蛋白(图1B,42kDa)和游离S蛋白(图1C,16kDa)共同发生,其应该是S蛋白的蛋白酶切割形式,因为这些次要蛋白条带与NoV VLP特异性抗体反应(数据未显示),并且显示出S结构域序列(图2,见下文)。申请人进一步注意到,组装成S颗粒或复合物的S结构域蛋白大部分被消化成较小的S结构域蛋白(图1E和F,峰1,级分#15和#16)。相比之下,未组装的S蛋白保持完整(图1E和F,峰2,级分#28和#29),表明组装的S颗粒或复合物对蛋白酶敏感,而未组装的S蛋白不是。事实上,峰1仅代表总S蛋白的一小部分(<25%),申请人得出结论,天然NoV S结构域蛋白以低效率组装成颗粒。

[0083] 鉴定S蛋白中暴露的蛋白酶切割位点。上述发现促使我们鉴定蛋白酶切割位点。这是通过在约16kDa处对两个切割的S蛋白条带进行N-末端测序来实现的(图1,C和F),产生相同的NAPGE的五残基序列(图2A)。该五残基与S结构域序列N70至E74匹配,表明切割位点在R69和N70之间(图2B),其是胰蛋白酶/Clostripaina识别位点。NoV VP1序列的遗传分析显示该蛋白酶位点在所有GII NoV中高度保守(图2C)。GII NoV壳结构的结构分析(Wen Jiang,未发表的数据)表明该蛋白酶位点暴露在壳表面上(图2D)。

[0084] 破坏蛋白酶位点以获得高S颗粒形成效率。基于上述数据,申请人引入了R69A突变以破坏蛋白酶切割位点,产生 S_{R69A} 蛋白。另外,申请人使用C末端连接的His₆肽代替GST标签以避免凝血酶切割步骤以进行简化的纯化过程(图3A)。申请人还在铰链和His₆肽之间插入短接头(GGGG)以使His₆肽具有柔性,以证明S颗粒的抗原呈递的概念。

[0085] S_{R69A} 蛋白(~25kDa)在大肠杆菌系统中很好地产生,并且可以通过结合His₆的TALON CellThru树脂以极高的产率(>40mg/升细菌培养物)和高稳定性(图3B)纯化。EM观察表明许多环形结构的尺寸统一,代表直径为~22nm的自组装S颗粒(图3C)。凝胶过滤显示一个主要和两个次要峰(图3,D和E),基于他们的MW,它们应分别代表S颗粒(>1mDa)、S二聚体(~50kDa)和S单体(~25kDa),这得到EM观测和ESI-MS分析支持(下面)。SDS-PAGE通常显示~50kDa的较小条带(图3,B和E),其与NoV VLP特异性抗体反应(数据未显示),表明它们是

在SDS-PAGE分析中未完全变性的S结构域二聚体。这在凝胶过滤色谱的S颗粒级分(峰1:级分#8和#9)(图3,D和E)与二聚体(峰2:#16)和单体(峰3:#19)级分相比尤为明显。这些数据表明绝大多数 S_{R69A} 蛋白质组装成统一的S颗粒。

[0086] 将SR68A蛋白自组装成60价S60颗粒。然后申请人进行ESI-MS分析以确定 S_{R69A} 蛋白的复杂性,揭示三种蛋白形式:1) 25.047kDa的S单体,2) 50.095kDa的S二聚体,和3) ~ 1.47mDa的S颗粒(图3F)。由于计算的重组S结构域蛋白的MW为24585.89道尔顿(图2B),因此观察到的自组装S颗粒应为60价,称为S60颗粒。没有观察到大于~ 1.47mDa的信号的事实表明传统的180价S颗粒没有组装,这与EM观察到的统一粒径(图3C)一致。通过cryoEM技术对S60-VP8嵌合颗粒的结构重建进一步证实了这些60价S60颗粒(图7,见下文)。

[0087] S60颗粒的结构建模。虽然60价NoV衣壳或其内壳的详细结构尚不清楚,但已报道60价猫科动物杯状病毒(FCV)VLP的晶体结构[59],提供了一种模拟S60颗粒以了解其结构特征的方法。通过使用60价FCV VLP(PDB#:4PB6)的晶体结构作为模板来构建S60颗粒的结构模型(图4,B至D)。模拟的S60颗粒分别在五倍轴或两倍轴显示出略微五边形(图4C)和六边形(图4D)的形状。在EM显微照片中的S60颗粒中可以容易地识别这些五边形和六边形形状(图4A和图3C)。此外,S60颗粒模型可以很好地适应S60-VP8颗粒的cryoEM密度图的S60颗粒区域(图7,D到F),支持60价FCV外壳和NoV S60颗粒之间的结构相似性。正如所料,60个C端铰链暴露在每个S60颗粒的表面上(图4,B至D),为S60颗粒显示的外来抗原提供了极好的融合点。

[0088] 申请人还使用C-末端接头(GGGG)和His₆肽对S60颗粒进行建模,以模拟S60颗粒的抗原呈递(图4,E至G)。得到的模型表明60个His₆肽显示在每个S60颗粒的表面上,支持了具有C末端连接的His₆肽的S60颗粒被His₆结合树脂有效纯化的事实(图3B)。因此,预测来自其他病原体的各种抗原也可以通过将它们融合到S蛋白的暴露的C末端而由S60颗粒展示。

[0089] S60-VP8嵌合颗粒的生产和表征。为了证明S60颗粒作为抗原呈递增强免疫原性平台的可行性,申请人生产了显示RV VP8蛋白的S60-VP8嵌合颗粒,RV VP8蛋白是主要的RV中和抗原。这通过经由接头将RV VP8蛋白与 S_{R69A} 蛋白的C末端融合来实现(图5A)。将His₆肽添加到VP8蛋白的C末端用于纯化目的。 S_{R69A} -VP8嵌合蛋白(~ 45kDa)在大肠杆菌系统中以> 30mg/升细菌培养物的高产率良好表达(图5B)。 S_{R69A} -VP8蛋白的凝胶过滤分析显示三个典型的峰,基于它们的MW,最可能分别代表 S_{R69A} -VP8颗粒(峰1)、二聚体(峰2)和单体(峰3)(图5C)。三个峰的保留比较表明,大约一半的 S_{R69A} -VP8蛋白自组装成颗粒(峰1与峰2和峰3比较)。

[0090] 来自峰1的蛋白质的EM观察显示许多统一尺寸的 S_{R69A} -VP8颗粒(称为S60-VP8颗粒),其具有可识别的突起,这是由于表面显示VP8蛋白质,导致粗糙表面(图5D),其不同于S60颗粒的相对光滑表面(图3C和4A)。峰1蛋白的ESI-MS分析显示预期的60价S60-VP8颗粒,其MW为~ 3.4mDa(图5E)。同样,没有观察到180价颗粒的信号,这与相同蛋白质的显微照片上的S60-VP8颗粒的统一尺寸一致(图5D)。然而,ESI-MS分析确实揭示了 S_{R69A} -VP8蛋白的单体(44.950kDa)和在19.990kDa处的痕量降解产物,表明S60-VP8颗粒可以分解成单体。

[0091] S60-VP8颗粒的进一步稳定。 S_{R69A} -VP8蛋白质的相对低的颗粒形成效率表明通过增加S颗粒中相邻S结构域之间的分子间相互作用来改善的空间。检查GII.4壳结构(W.J.,

未发表的数据)表明,S结构域的V57和Q58分别在空间上接近相邻S结构域的M140和S136,距离为5.7至5.9(图6,A和B)。这表明两对残基是引入S结构域间二硫键以进一步增强S60-VP8颗粒形成的良好位置。

[0092] 当 S_{R69A} -VP8蛋白的V57和M140突变成半胱氨酸时(图6C), $S_{69A/58C/140C}$ -VP8蛋白在 $>50\text{mg}/\text{升}$ 细菌培养物的极高产率下良好表达(图6D)。凝胶过滤分析表明,大部分($\sim 70\%$)蛋白质组装成S60-VP8颗粒(图6E),其通过EM观察证实(数据未显示)。注意到代表S单体的峰3完全消失,支持二硫键引入后的S结构域间相互作用的增加。

[0093] 当 S_{R69A} -VP8蛋白的V57、Q58和S136突变成半胱氨酸时(图6F)时, $S_{69A/57C/58C/136C}$ -VP8蛋白可以高产率 $>40\text{mg}/\text{升}$ 细菌培养物生产(图6G)。凝胶过滤分析(图6,H和J)证明,绝大多数($>90\%$) $S_{69A/57C/136C}$ -VP8蛋白自组装成S60-VP8颗粒,这通过EM观察证实(图6I)。值得注意的是,分别代表S二聚体和单体的峰2和3均消失(图6,H和J),这支持了由于S结构域间二硫键导致S60-VP8颗粒形成效率显著增加的观点。申请人还对 S_{R69A} -VP8蛋白的所有四种V57、Q58、S136和M140进行了四重半胱氨酸突变,蛋白质产量和S60-VP8颗粒形成效率的结果与 $S_{69A/57C/58C/136C}$ -VP8蛋白的类似(数据未显示),表明三重半胱氨酸突变足以产生高度稳定的S60-VP8颗粒。

[0094] S60-VP8颗粒的结构。申请人通过cryo-EM技术(参见材料和方法)构建了S60-VP8颗粒的三维(3-D)结构,分辨率为 14\AA ,显示出含有60个S-VP8蛋白的 $T=1$ 对称性(图7)。S60-VP8颗粒的表面结构(图7A)表明,VP8抗原展示在S60-VP8颗粒的表面上,形成从内部S60颗粒延伸的突起。S60-VP8颗粒的中间切片(图7B)和后半部分(图7C)的切片结构显示外部VP8抗原(青色和部分绿色)和内部S60颗粒(红色、黄色和部分绿色)的结构。可以识别二十面体S60颗粒的五倍轴(图7C)。S60-VP8嵌合颗粒的直径为 $\sim 28\text{nm}$ 。

[0095] 当将60价FCV壳(PDB#:4PB6)的晶体结构拟合到S60-VP8颗粒cryoEM密度图的S60-颗粒部分时,两种结构彼此非常吻合(图7,D至F)。具有S60-VP8颗粒的前半部分(图7D)、中间切片(图7E)和后半部分(图7F)的适合的FCV壳体结构的透明cryoEM密度图证明了FCV 60价壳结构和S60-VP8颗粒的NoV S60颗粒区域之间的良好适应性,证实了申请人的S60颗粒(图4)和S60-VP8颗粒的60价二十面体结构。

[0096] 然后,申请人将60个拷贝的P[8]RV Wa株的VP8晶体结构(PDB代码:2DWR)拟合到S60-VP8颗粒cryoEM密度图的突出区域中(图7,G和H)。具有拟合的VP8晶体结构的S60-VP8颗粒的前半部分(图7G)和中间切片(图7H)的透明cryoEM密度图表明,S60-VP8颗粒的突出区域与60VP8结构之间具有出色的适应性,进一步证实了S60颗粒表面VP8抗原的结构和方向。基于拟合结果,申请人使用60价FCV壳和60VP8P[8]RV的晶体结构制作了S60-VP8颗粒模型(图7I)。

[0097] 显示VP8的S60颗粒保留了配体结合功能。申请人以前的研究表明,P[8]Rv的VP8结合H1抗原而不是Ley抗原[45]。基于唾液的结合测定表明,S60-VP8颗粒结合H1和/或Leb抗原阳性唾液样品,但不结合H1和Leb抗原阴性的那些。这些数据表明,S60颗粒展示的VP8抗原具有配体结合功能的正确折叠,验证了S60-VP8颗粒作为RV疫苗候选物。

[0098] 改善了对S60颗粒展示的VP8抗原的免疫原性。将S60-VP8颗粒免疫小鼠($N=6$)并使用游离VP8抗原作为对照测量VP8特异性免疫应答以进行比较。三次免疫后,用S60-VP8颗粒免疫后的VP8特异性IgG应答比游离VP8诱导的高出11.6倍($P=0.0004$)(图10A)。作为阴

性对照, S60颗粒不会引发任何VP8特异性IgG反应。这些数据表明S60颗粒能够改善所展示的RV VP8抗原的免疫原性。

[0099] S60-VP8颗粒引发的抗血清增强了抗VP8-配体结合的阻断作用。VP8与RV宿主配体或受体的结合是RV感染的关键步骤[43]。因此,已经开发了针对RV VP8蛋白与HBGAs结合的体外阻断测定作为替代RV中和测定[47]。申请人使用先前开发的P-VP8颗粒[47]和Leb阳性唾液样品作为RV配体进行了这种阻断测定[45]。申请人发现,用S60-VP8颗粒免疫后的小鼠抗血清表现出比用免疫VP8抗原免疫后抗血清的50%阻断效价(BT50)高22.8倍($P=0.0003$) (图10B),进一步支持S60颗粒显著改善了展示的RV VP8抗原的免疫原性的观察。作为阴性对照,用没有VP8抗原的S60颗粒免疫后的小鼠血清未显示出这种阻断。

[0100] S60-VP8颗粒引发的抗血清增强了对RV感染的中和作用。申请人还进行了常规的基于细胞培养的中和测定,以确定S60-VP8颗粒引发的抗血清对抗细胞培养适应(P[8]RV Wa菌株的感染的中和活性。与其BT50一致(见上文),用S60-VP8颗粒免疫后的小鼠抗血清在三种不同的血清稀释度(1:75、1:150和1:300)下表现出明显高于用游离VP8抗原免疫后抗血清的中和活性(分别为 $P=0.0003$ 、 $P=0.0001$ 和 $P=0.0016$) (图10C)。用没有VP8的S60颗粒免疫后的小鼠抗血清没有显示出这种中和活性。这些数据进一步支持了这样一种观点,即S60颗粒是一种能够增强所显示的RV VP8抗原免疫原性的有效疫苗平台,并且S60-VP8颗粒是一种很有前途的抗RV感染的候选疫苗。

[0101] S60颗粒作为多功能疫苗平台。除了RV VP8抗原之外,申请人已经能够通过相同的暴露的S结构域C-末端通过接头将几种其他表位和抗原融合到S60颗粒上,包括甲型流感病毒的M2e表位、疟疾寄生虫恶性疟原虫的环孢子表面蛋白(CSP)的TSR抗原、和戊型肝炎病毒的P结构域(表1)。因此,人工开发的S60颗粒用作新型疫苗开发的多功能平台。

[0102] 表1. 由S₆₀颗粒显示的表位和抗原的列表。

表位/抗原	尺寸(残基)	产量(mg/升细菌培养物)	S ₆₀ 抗原颗粒形成
M2e 表位 ¹	23	5	是
[0103] TSR/CSP 抗原 ²	67	10	是
全 RV VP8 ³	231	20	是
鼠 RV VP8 ³	159	5	是
HEV P-结构域 ⁴	187	10	是

[0104] ¹M2e表位是形成甲型流感病毒的质子选择性离子通道的基质-2(M2)蛋白的胞外域。²TSR/CSP抗原是环孢子(CSP)的主要表面蛋白的C-末端抗原,其在疟疾寄生虫恶性疟原虫的宿主细胞侵入中起关键作用。³全RV VP8是人P[8]轮状病毒的刺突蛋白的全长VP8结构域。³鼠RV VP8是鼠轮状病毒的刺突蛋白的核心部分。⁴HEV P结构域是戊型肝炎病毒衣壳的突出结构域。

[0105] 讨论

[0106] 在这项研究中,申请人开发了一种新技术,通过简单的细菌表达系统高效生产统一的60价NoV S60颗粒。这是通过利用自然地构建NoV衣壳的内壳的NoV VP1S结构域的同型相互作用以及用于稳定S结构域蛋白和增强S结构域间相互作用的若干修饰来实现的。具体地,申请人引入了R69A突变以破坏天然壳上暴露的蛋白酶切割位点,其否则会导致S蛋白的

易降解。此外,申请人将三重 (V57C/Q58C/S136' C) 或四重 (V57C/Q58C/S136' C/M140' C) 半胱氨酸突变引入在两个相邻的S结构域之间的两对空间接近残基 (V57/M140' 和Q58/S136', 图6), 以建立S-结构域间二硫键以获得比它们在天然NoV壳中表现出的更强的S-结构域间相互作用。最终,生物工程S结构域很容易通过简单的大肠杆菌系统以高产率生产,从而以高效率自我形成S60颗粒。

[0107] 具有60个柔性暴露的S结构域C末端的自组装多价S60颗粒是抗原呈递的理想平台,用于改善对展示的抗原的免疫原性以用于疫苗开发。通过构建显示60RV VP8蛋白(主要的RV中和抗原)的嵌合S60颗粒,该想法在本研究中得到了很大程度的证实。S60-VP8颗粒可以很容易地以高稳定性生产。它们引起小鼠对显示的VP8抗原的IgG反应显著高于游离VP8蛋白诱导的IgG反应。接种S60-VP8颗粒后的小鼠抗血清对RV VP8与其聚糖配体的结合显示出显著更强的阻断,并且与用游离VP8抗原免疫后的血清相比,对培养细胞中RV感染和复制的中和活性显著更高。虽然使用申请人实验室中的小鼠RV攻击模型确定了S60-VP8颗粒疫苗的保护功效,但本报告中提供的数据强烈支持这样一种观点,即S60-VP8颗粒是一种很有前景的RV感染候选疫苗,因此S60颗粒是新型疫苗开发抗原展示的优秀平台。

[0108] 天然NoV衣壳由180VP1制成,这是NoV的单一主要结构蛋白。通过真核系统体外表达NoV VP1通常产生180和60价VLP的混合物,并且两种VLP形式可通过人工变性和复性处理进行交换[60]。虽然尚未对其进行彻底研究,但先前通过杆状病毒/昆虫细胞系统表达截短的S结构域似乎是自组装180价S颗粒[11, 24]。然而,先前从未产生通过表达系统统一的60价NoV VLP或S颗粒。因此,申请人通过简单的大肠杆菌系统生产统一的NoV S60颗粒的技术代表了生物工程的进步。统一的S60颗粒的自我形成可能是由于重度修饰的S结构域和原核大肠杆菌表达系统的独特折叠环境的组合影响。候选疫苗的同质复杂性和大小是质量控制的重要考虑因素,因为疫苗复杂性和大小的变化将导致疫苗免疫结果的变化。

[0109] 人工引入的分子间二硫键可用作稳定病毒蛋白质颗粒或复合物的一般方法。在申请人先前构建NoV P颗粒期间,申请人发现在NoV P结构域末端添加含半胱氨酸的肽通过P-二聚体间二硫键促进和稳定P颗粒形成[20-23]。在该当前研究中,S60颗粒有效地自组装(图3D),但是由于添加了VP8抗原,原始形式的S60-VP8颗粒的形成效率相对较低(图5C)。值得注意的是,通过引入S结构域间二硫键,S60-VP8颗粒的自身形成效率显著提高。这是通过两个基本步骤实现的。首先,申请人分析了GII.4NoV (Wen Jiang, 未发表的数据)的壳结构,以确定两个相邻S结构域之间的两对空间上接近(5.7至5.9Å)的残基(V57/M140' 和Q58/S136') (图6, A和B)。然后将这些残基中的两到四个以不同的组合同时突变成半胱氨酸:1) V57C/M140' C, 2) Q58C/S136' C, 3) V57C/Q58C/S136' C, 4) V57C/Q58C/S140' C, 和5) V57C/Q58C/S136' C/S140' C, 然后生产和测量所得S60-VP8颗粒的自身形成效率。

[0110] 在这些突变中,具有三重半胱氨酸突变的S60-VP8颗粒(V57C/Q58C/S136' C)表现出最高的颗粒形成效率,其中>95%的S-VP8蛋白自组装成S60-VP8颗粒(图6, F到J)。突变的S-VP8蛋白的二聚体和单体形式完全消失(比较图6H与图5C和图E)。申请人还注意到具有四联半胱氨酸突变的S60-VP8颗粒(V57C/Q58C/S136' C/M140' C)与具有三半胱氨酸突变的那些相比表现出S60-VP8颗粒形成几乎相同的高效率(数据未显示)。然而,各种半胱氨酸突变组合中这些不同结果背后的详细结构基础或机制仍然是难以捉摸的。这些结果和申请人之前对P颗粒的研究[20-23]表明,分子间二硫键的引入可以用作促进和稳定病毒蛋白质颗粒

或复合物形成的一般方法。根据这些数据,使用具有R69A和V57C/Q58C/S136'C突变的S60-VP8颗粒进行下游实验,而具有相同突变的修饰的S结构域用于和将用于产生稳定的S60颗粒,作为显示其他抗原的平台。

[0111] 本研究中的S60-和S60-VP8颗粒通过与S结构域的暴露的C-末端或S-VP8蛋白连接的小Hisx6肽纯化。申请人的数据显示GST标签不适合S60和S60-VP8颗粒生产,因为它很大(220个残基),扰乱了S60颗粒的形成,因此需要通过额外的凝血酶切割步骤去除,使纯化过程复杂化。此外,我们还测试了无标记纯化方法的可能性。申请人发现,S60和S60-VP8颗粒都可以通过硫酸铵选择性沉淀并在PBS和其他缓冲液中分离(数据未显示)。最后,申请人发现S60和S60-VP8颗粒通过凝胶过滤尺寸排阻柱和阴离子交换色谱法(数据未显示)作为单峰洗脱。这些数据共同表明,S60和S60-VP8颗粒,以及最可能的其他S60-抗原嵌合颗粒可以通过无标记方法纯化。

[0112] 60个自由暴露的C端是促进S60颗粒成为有用的疫苗平台的另一个特征。外源抗原或表位可以通过重组DNA技术通过柔性接头简单地融合到S结构域的末端。这项研究清楚地表明,S60颗粒可以很好地呈现Hisx6肽和RV VP8抗原,正如S60-Hisx6和S60-VP8颗粒的结构稳定性以及它们对于TALON CellThru树脂(Hisx6)和H1和Leb配体(RV VP8)的优异结合能力所显示的那样。此外,S60颗粒可以很好地呈现几种其他测试抗原或表位的事实表明S60颗粒是多功能疫苗平台。

[0113] S60颗粒的建模,使用60价FCV VLP的晶体结构的S60-Hisx6以及通过cryoEM技术重建S60-VP8颗粒的3-D结构,为S60颗粒如何显示Hisx6肽和RV VP8抗原的结构基础提供了新的见解。将S60颗粒模型的结构拟合到S60颗粒区域,以及将60拷贝VP8抗原复制到S60-VP8颗粒cryoEM密度图的突出区域,进一步阐明了S60颗粒与其展示的抗原之间的结构关系。这些结构数据将有助于设计和理解S60颗粒对其他外来抗原的未来呈现。最后,这些结构研究还证实了S60颗粒和S60-VP8颗粒的60价T=1二十面体对称性。

[0114] 总之,我们开发了一种易于生产、高稳定性和高免疫原性的自组装多价蛋白纳米颗粒,用作抗原展示的理想平台。作为概念证明,已经构建了显示60拷贝RV中和VP8抗原的嵌合S60颗粒。申请人的数据表明,高免疫原性S60-VP8颗粒是一种有前途的抗RV感染的候选疫苗,并且S60颗粒是增强各种抗原的免疫原性的多功能平台,用于针对不同病原体的新型疫苗开发。

[0115] 参考文献

[0116] [1]Tan M,Jiang X.Norovirus P particle:a subviral nanoparticle for vaccine development against norovirus,rotavirus and influenza virus.Nanomedicine(Lond)2012;7:889-97。

[0117] [2]Tan M,Jiang X.Subviral particle as vaccine and vaccine platform.Current opinion in virology 2014;6C:24-33。

[0118] [3]Tan M,Jiang X.Recent Advancements in Combination Subunit Vaccine Development.Human vaccines&immunotherapeutics 2016:0。

[0119] [4]Patel MM,Widdowson MA,Glass RI,Akazawa K,Vinje J,Parashar UD.Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis.Emerg Infect Dis 2008;14:1224-31。

- [0120] [5]Glass RI,Noel J,Mitchell D,Herrmann JE,Blacklow NR,Pickering LK等人.The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis:a review.Archives of virology Supplementum 1996;12:287-300。
- [0121] [6]Prasad BV,Hardy ME,Dokland T,Bella J,Rossmann MG,Estes MK.X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid.Science 1999;286:287-90。
- [0122] [7]Bu W,Mamedova A,Tan M,Xia M,Jiang X,Hegde RS.Structural basis for the receptor binding specificity of Norwalk virus.J Virol 2008;82:5340-7。
- [0123] [8]Cao S,Lou Z,Tan M,Chen Y,Liu Y,Zhang Z等人.Structural basis for the recognition of blood group trisaccharides by norovirus.J Virol 2007;81:5949-57。
- [0124] [9]Chen Y,Tan M,Xia M,Hao N,Zhang XC,Huang P等人.Crystallography of a lewis-binding norovirus,elucidation of strain-specificity to the polymorphic human histo-blood group antigens.PLoS pathogens 2011;7:e1002152。
- [0125] [10]Choi JM,Hutson AM,Estes MK,Prasad BV.Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008;105:9175-80。
- [0126] [11]Tan M,Hegde RS,Jiang X.The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors.J Virol 2004;78:6233-42。
- [0127] [12]Tan M,Jiang X.Norovirus gastroenteritis,carbohydrate receptors, and animal models.PLoS pathogens 2010;6:e1000983。
- [0128] [13]Tan M,Jiang X.Norovirus-host interaction:Multi-selections by human histo-blood group antigens.Trends in microbiology 2011;19:382-8。
- [0129] [14]Tan M,Jiang X.Histo-blood group antigens:a common niche for norovirus and rotavirus.Expert Rev Mol Med 2014;16:e5。
- [0130] [15]Huang P,Farkas T,Zhong W,Tan M,Thornton S,Morrow AL等人.Norovirus and histo-blood group antigens:demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns.J Virol 2005;79:6714-22。
- [0131] [16]Liu W,Chen Y,Jiang X,Xia M,Yang Y,Tan M等人.A Unique Human Norovirus Lineage with a Distinct HBGA Binding Interface.PLoS Pathog 2015;11:e1005025。
- [0132] [17]Shanker S,Choi JM,Sankaran B,Atmar RL,Estes MK,Prasad BV.Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4epidemic variant:implications for epochal evolution.J Virol 2011;85:8635-45。
- [0133] [18]Shanker S,Czako R,Sankaran B,Atmar RL,Estes MK,Prasad

BV. Structural analysis of determinants of histo-blood group antigen binding specificity in genogroup I noroviruses. *J Virol* 2014;88:6168-80.

[0134] [19] Hansman GS, Biertumpfel C, Georgiev I, McLellan JS, Chen L, Zhou T 等人. Crystal Structures of GII.10 and GII.12 Norovirus Protruding Domains in Complex with Histo-Blood Group Antigens Reveal Details for a Potential Site of Vulnerability. *J Virol* 2011;85:6687-701.

[0135] [20] Tan M, Fang PA, Xia M, Chachiyo T, Jiang W, Jiang X. Terminal modifications of norovirus P domain resulted in a new type of subviral particles, the small P particles. *Virology* 2011;410:345-52.

[0136] [21] Tan M, Fang P, Chachiyo T, Xia M, Huang P, Fang Z 等人. Noroviral P particle: Structure, function and applications in virus-host interaction. *Virology* 2008;382:115-23.

[0137] [22] Tan M, Jiang X. The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *Journal of Virology* 2005;79:14017-30.

[0138] [23] Bereszczak JZ, Barbu IM, Tan M, Xia M, Jiang X, van Duijn E 等人. Structure, stability and dynamics of norovirus P domain derived protein complexes studied by native mass spectrometry. *Journal of structural biology* 2012;177:273-82.

[0139] [24] Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad BV, Estes MK. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol* 2002;76:4044-55.

[0140] [25] Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD 等人. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012;12:136-41.

[0141] [26] Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006;12:304-6.

[0142] [27] Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA 等人. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet* 2013;381:1405-16.

[0143] [28] Vesikari T, Itzler R, Matson DO, Santosham M, Christie CD, Coia M 等人. Efficacy of a pentavalent rotavirus vaccine in reducing rotavirus-associated health care utilization across three regions (11 countries). *Int J Infect Dis* 2007;11 Suppl 2: S29-35.

[0144] [29] Yen C, Tate JE, Patel MM, Cortese MM, Lopman B, Fleming J 等人. Rotavirus vaccines: update on global impact and future priorities. *Human vaccines* 2011;7:1282-90.

[0145] [30] Zaman K, Dang DA, Victor JC, Shin S, Yunus M, Dallas MJ 等人. Efficacy

of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia:a randomised,double-blind,placebo-controlled trial.Lancet 2010;376:615-23。

[0146] [31]Madhi SA,Cunliffe NA,Steele D,Witte D,Kirsten M,Louw C等人.Effect of human rotavirus vaccine on severe diarrhea in African infants.N Engl J Med 2010;362:289-98。

[0147] [32]Armah GE,Sow SO,Breiman RF,Dallas MJ,Tapia MD,Feikin DR等人.Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa:a randomised,double-blind,placebo-controlled trial.Lancet 2010;376:606-14。

[0148] [33]Liu Y,Ramelot TA,Huang P,Liu Y,Li Z,Feizi T等人.Glycan Specificity of P[19]Rotavirus and Comparison with Those of Related P Genotypes.J Virol 2016;90:9983-96。

[0149] [34]Jiang X,Liu Y,Tan M.Histo-blood group antigens as receptors for rotavirus,new understanding on rotavirus epidemiology and vaccine strategy.Emerging Microbes&Infections 2017;6。

[0150] [35]Desai R,Cortese MM,Meltzer MI,Shankar M,Tate JE,Yen C等人.Potential intussusception risk versus benefits of rotavirus vaccination in the United States.The Pediatric infectious disease journal 2013;32:1-7。

[0151] [36]Bauchau V, Van Holle L, Mahaux O, Holl K, Sugiyama K, Buyse H. Post-marketing monitoring of intussusception after rotavirus vaccination in Japan.Pharmacoepidemiology and drug safety 2015;24:765-70。

[0152] [37]Yung C-F, Chan SP, Soh S, Tan A, Thoon KC. Intussusception and Monovalent Rotavirus Vaccination in Singapore: Self-Controlled Case Series and Risk-Benefit Study. The Journal of pediatrics 2015;167:163-8.e1。

[0153] [38]Rosillon D, Buyse H, Friedland LR, Ng S-P, Velazquez FR, Breuer T. Risk of Intussusception After Rotavirus Vaccination: Meta-analysis of Postlicensure Studies. The Pediatric infectious disease journal 2015;34:763-8。

[0154] [39]Yih WK, Lieu TA, Kulldorff M, Martin D, McMahonill-Walraven CN, Platt R 等人. Intussusception risk after rotavirus vaccination in U.S. infants. The New England journal of medicine 2014;370:503-12。

[0155] [40]Weintraub ES, Baggs J, Duffy J, Vellozzi C, Belongia EA, Irving S 等人. Risk of intussusception after monovalent rotavirus vaccination. The New England journal of medicine 2014;370:513-9。

[0156] [41]Glass RI, Parashar UD. Rotavirus vaccines--balancing intussusception risks and health benefits. The New England journal of medicine 2014;370:568-70。

[0157] [42]Settembre EC, Chen JZ, Dormitzer PR, Grigorieff N, Harrison SC. Atomic model of an infectious rotavirus particle. EMBO J 2011;30:408-16。

- [0158] [43]Hu L,Crawford SE,Czako R,Cortes-Penfield NW,Smith DF,Le Pendu J等人.Cell attachment protein VP8*of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen.Nature 2012;485:256-9。
- [0159] [44]Hu L,Ramani S,Czako R,Sankaran B,Yu Y,Smith DF等人.Structural basis of glycan specificity in neonate-specific bovine-human reassortant rotavirus.Nat Commun 2015;6:8346。
- [0160] [45]Huang P,Xia M,Tan M,Zhong W,Wei C,Wang L等人.Spike protein VP8*of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner.J Virol 2012;86:4833-43。
- [0161] [46]Tan M,Huang P,Xia M,Fang PA,Zhong W,McNeal M等人.Norovirus P particle,a novel platform for vaccine development and antibody production.J Virol 2011;85:753-64。
- [0162] [47]Xia M,Wei C,Wang L,Cao D,Meng XJ,Jiang X等人.Development and evaluation of two subunit vaccine candidates containing antigens of hepatitis E virus,rotavirus,and astrovirus.Sci Rep 2016;6:25735。
- [0163] [48]Groome MJ,Koen A,Fix A,Page N,Jose L,Madhi SA等人.Safety and immunogenicity of a parenteral P2-VP8-P[8]subunit rotavirus vaccine in toddlers and infants in South Africa:a randomised,double-blind,placebo-controlled trial.Lancet Infect Dis 2017;17:843-53。
- [0164] [49]Wen XB,Cao DJ,Jones RW,Hoshino Y,Yuan LJ.Tandem truncated rotavirus VP8*subunit protein with T cell epitope as non-replicating parenteral vaccine is highly immunogenic.Human vaccines&immunotherapeutics 2015;11:2483-9。
- [0165] [50]Du J,Lan Z,Liu Y,Liu Y,Li Y,Li X等人.Detailed analysis of BALB/c mice challenged with wild type rotavirus EDIM provide an alternative for infection model of rotavirus.Virus research 2017;228:134-40。
- [0166] [51]Doud MB,Koksal AC,Mi LZ,Song G,Lu C,Springer TA.Unexpected fold in the circumsporozoite protein target of malaria vaccines.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2012;109:7817-22。
- [0167] [52]Xia M,Tan M,Wei C,Zhong W,Wang L,McNeal M等人.A candidate dual vaccine against influenza and noroviruses.Vaccine 2011;29:7670-7。
- [0168] [53]Wang L,Huang P,Fang H,Xia M,Zhong W,McNeal MM等人.Polyvalent complexes for vaccine development.Biomaterials 2013;34:4480-92。
- [0169] [54]Wang L,Cao D,Wei C,Meng XJ,Jiang X,Tan M.A dual vaccine candidate against norovirus and hepatitis E virus.Vaccine 2014;32:445-52。
- [0170] [55]Wang L,Xia M,Huang P,Fang H,Cao D,Meng XJ等人.Branched-linear and agglomerate protein polymers as vaccine platforms.Biomaterials 2014;35:8427-38。

[0171] [56] Xia M, Wei C, Wang L, Cao D, Meng XJ, Jiang X 等人. A trivalent vaccine candidate against hepatitis E virus, norovirus, and astrovirus. *Vaccine* 2016;34:905-13.

[0172] [57] Tan M, Jiang X. The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol* 2005;79:14017-30.

[0173] [58] Liu Y, Huang P, Tan M, Liu Y, Biesiada J, Meller J 等人. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *J Virol* 2012;86:9899-910.

[0174] [59] Burmeister WP, Buisson M, Estrozi LF, Schoehn G, Billet O, Hannas Z 等人. Structure determination of feline calicivirus virus-like particles in the context of a pseudo-octahedral arrangement. *PLoS One* 2015;10:e0119289.

[0175] [60] White LJ, Hardy ME, Estes MK. Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. *J Virol* 1997;71:8066-72.

[0176] [61] Shoemaker GK, van Duijn E, Crawford SE, Uetrecht C, Baclayon M, Roos WH 等人. Norwalk virus assembly and stability monitored by mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics: MCP* 2010;9:1742-51.

[0177] 除非另有说明,否则所有百分比和比率均按重量计算。

[0178] 除非另有说明,否则所有百分比和比率均基于总组合物计算。

[0179] 应理解,在整个说明书中给出的每个最大数值限制包括每个较低的数值限制,如同这类较低的数值限制在本文中明确写出一样。在整个说明书中给出的每个最小数值限制将包括每个较高的数值限制,如同这类较高的数值限制在本文中明确写出一样。在整个本说明书中给出的每个数值范围将包括落入这类较宽的数值范围内的每个较窄的数值范围,如同这类较窄的数值范围都在本文中明确写出一样。

[0180] 本文公开的尺寸和值不应理解为严格限于所述的精确数值。相反,除非另有说明,否则每个这类尺寸旨在表示所述值和围绕所述值的功能等效范围。例如,公开为“20mm”的尺寸旨在表示“约20mm”。

[0181] 除非明确排除或以其它方式限制,否则本文引用的每个文件,包括任何交叉引用的或相关的专利或申请,其全部内容通过引用的方式并入本文。任何文件的引用并不是承认它是关于本文公开或要求保护的发明的现有技术或者单独或与任何其它参考文献的任何组合,教导、暗示或公开任何这类发明。此外,如果本文件中术语的任何含义或定义与通过引用并入的文件中的相同术语的任何含义或定义相冲突,则以本文件中赋予该术语的含义或定义为准。

[0182] 虽然已经说明和描述了本发明的特定实施例,但是对于本领域技术人员来说显而易见的是,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以进行各种其它变化和修改。因此,旨在在所附权利要求中覆盖在本发明范围内的所有这类变化和修改。

<210> 2
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 2

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Trp Ser
 1 5 10 15

Ala Pro

<210> 3
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 诺如病毒诺沃克病毒

[0003] <400> 3

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn
 1 5 10 15

Leu Pro

<210> 4
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 4

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asn
 1 5 10 15

Leu Glu

<210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 诺如病毒诺沃克病毒

<220>
 <221> misc_特征
 <222> (1).. (1)
 <223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 5

Xaa Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn
 1 5 10 15

Leu Glu

[0004]

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 6

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asn
 1 5 10 15

Leu Glu

<210> 7
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 7

Glu Phe Thr Ile Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asn
 1 5 10 15

Met Glu

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 8

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn
 1 5 10 15

Leu Glu

[0005]

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 9

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Val Asn
 1 5 10 15

Leu Glu

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 10

<400> 13

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asn
1 5 10 15

Leu Glu

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 14

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asp
1 5 10 15

[0007]

Leu Glu

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 15

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asp
1 5 10 15

Leu Glu

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 16

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn
1 5 10 15

Leu Glu

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 17

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Val Leu Leu Asn
1 5 10 15

[0008] Leu Glu

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 18

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Met Leu Leu Asn
1 5 10 15

Leu Glu

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 19

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Phe Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Leu Glu

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 20

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Phe Leu Leu Asp
 1 5 10 15

[0009]

Leu Glu

<210> 21

<211> 18

<212> PRT

<213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 21

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Leu Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Leu Glu

<210> 22

<211> 18

<212> PRT
 <213> 诺如病毒诺沃克病毒
 <400> 22

Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ser Pro Gly Glu Ile Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Leu Glu

<210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 诺如病毒诺沃克病毒
 <400> 23

[0010] Glu Phe Thr Val Ser Pro Arg Asn Ala Pro Gly Glu Val Leu Ile Asp
 1 5 10 15

Leu Glu

<210> 24
 <211> 663
 <212> DNA
 <213> 诺如病毒诺沃克病毒

<400> 24
 atgaagatgg cgtcgaatga cgccagccca tctgatgggt ccacagccaa cctcgtccca 60
 gaggtcaaca atgaggttat ggctttggag cccgttgttg gtgccgctat tgcggcacct 120
 gtggcgggcc aacaaaacgt aattgacccc tggattagga ataattttgt acaagcccct 180
 ggtggagagt ttacagtatc ccctagaaac gctccaggtg agatactatg gacgcgccc 240
 ttgggccctg atttgaacce ctacctttct catttggcca gaatgtacaa tggttatgca 300

ggtgggttttg aagtgcaggt aatcctcgcg gggaacgcgt tcaccgccgg gaaagtcata 360
 ttgcagcag tcccacaaa tttccaact gaaggcttga gccccagcca ggttactatg 420
 ttccccata taatagtaga tgtaggcaa ttggaacctg tgttgatccc ctacctgat 480
 gttaggaata acttctatca ttacaatcaa tcaaatgatt ctaccattaa attgatagca 540
 atgctgtata caccacttag ggctaataat gctggggatg atgtcttcac agtctcttgt 600
 cgagtcctca cgaggccatc ccccgatttt gatttcatat tcttgggtgcc acccacagtt 660
 gaa 663

<210> 25
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> 诺如病毒诺沃克病毒
 <400> 25

[0011]

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr 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

Ile 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 Ser Thr Ile
 165 170 175

[0012]

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
 210 215 220

<210> 26

<211> 663

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SR69A 序列

<400> 26

atgaagatgg cgtcgaatga cgccagccca tctgatgggt ccacagccaa cctcgtccca

60

gaggtaaca atgaggttat ggctttggag cccgttgttg gtgccgctat tgcggcacct 120
 gtggcgggcc aacaaaacgt aattgacccc tggattagga ataattttgt acaagcccct 180
 ggtggagagt ttacagtatc ccctgcaaac gctccagggt agatactatg gagcgcgccc 240
 ttgggccctg atttgaacce ctacctttct catttggcca gaatgtacaa tggttatgca 300
 ggtggttttg aagtgcaggt aatcctcgcg gggaacgcgt tcaccgccgg gaaagtcata 360
 tttgcagcag tcccacaaa ttttccaact gaaggcttga gccccagcca ggttactatg 420
 ttccccata taatagtaga tgttaggcaa ttggaacctg tgttgatccc cttacctgat 480
 gttaggaata acttctatca ttacaatcaa tcaaatgatt ctaccattaa attgatagca 540
 atgctgtata caccacttag ggctaataat gctgggatg atgtcttcac agtctcttgt 600
 cgagtcctca cgaggccatc ccccatttt gatttcatat tcttgggtcc acccacagtt 660
 gaa 663

[0013]

- <210> 27
- <211> 221
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> SR69A 序列 (蛋白质)

- <400> 27

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr 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	Ala	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		
[0014]	Pro	Thr	Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Val	Thr	Met	Phe	Pro	His	Ile
	130						135					140				
	Ile	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	Ser	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			
	210						215					220				

<210>	28	
<211>	1152	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	SR69A-VP8 嵌合蛋白 (Sr69A-VP8 的核苷酸序列)	
<400>	28	
	atgaagatgg cgtcgaatga cgccagccca tctgatgggt ccacagccaa cctcgtccca	60
	gaggtaaca atgaggttat ggctttggag cccgttggtg gtgccgctat tgcggcacct	120
	gtggcgggcc acaaaaacgt aattgacccc tggattagga ataattttgt acaagcccct	180
	ggtggagagt ttacagtatc ccctgcaaac gctccagggt agatactatg gagcgcgccc	240
	ttgggccctg atttgaacce ctacctttct catttggcca gaatgtacaa tggttatgca	300
	ggtggttttg aagtgcaggt aatcctcgcg gggaacgcgt tcaccgccgg gaaagtcata	360
[0015]	tttgcagcag tcccacaaa ttttccaact gaaggettga gccccagcca gttactatg	420
	ttccccata taatagtaga tgttaggcaa ttggaacctg tgttgatccc ctacctgat	480
	gtaggaata acttctatca ttacaatcaa tcaaatgatt ctaccattaa attgatagca	540
	atgctgtata caccacttag ggctaataat gctggggatg atgtcttcac agtctcttgt	600
	cgagtcctca cgaggccatc ccccgatttt gatttcatat tcttgggtgcc acccacagtt	660
	gaacatcacc atcacttaga tggctcttat caacctacta catttacacc acctactgat	720
	tactggatac ttattaattc aaatacaaat ggagtagtat acgagagtac aaataatagt	780
	gacttttggc ctgcagtcac tgctgttgaa ccgcacgtca atccagtaga tagacaatat	840
	aatgtatttg gtgaaaataa acaatttaac gtaagaaatg attcagataa atggaagttt	900
	ttagaaatgt ttagaggcag tagtcaaaat gacttttata atagacgtac actaacttct	960
	gatactagac tcgtgggaat attaaaatat ggtggaagaa tatggacatt tcatggtgaa	1020

acaccgaggg ctactactga tagctcaaac actgcaaatt tgaacggtat atcaattaca 1080
 attcattcag aatTTtatat tattccaagg tccaagagt ctaagtgtaa tgaatatatt 1140
 aacaacggtc ta 1152

<210> 29

<211> 384

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SR69A-VP8 嵌合蛋白

<400> 29

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr Ala
 1 5 10 15

[0016] 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 Ala 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

Ile 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 Ser Thr Ile
 165 170 175

Lys Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ala Gly
 180 185 190

[0017]

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 His His His
 210 215 220

His Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Thr Pro Pro Thr Asp
 225 230 235 240

Tyr Trp Ile Leu Ile Asn Ser Asn Thr Asn Gly Val Val Tyr Glu Ser
 245 250 255

Thr Asn Asn Ser Asp Phe Trp Thr Ala Val Ile Ala Val Glu Pro His
 260 265 270

Val Asn Pro Val Asp Arg Gln Tyr Asn Val Phe Gly Glu Asn Lys Gln
 275 280 285

Phe Asn Val Arg Asn Asp Ser Asp Lys Trp Lys Phe Leu Glu Met Phe
 290 295 300

Arg Gly Ser Ser Gln Asn Asp Phe Tyr Asn Arg Arg Thr Leu Thr Ser
 305 310 315 320

Asp Thr Arg Leu Val Gly Ile Leu Lys Tyr Gly Gly Arg Ile Trp Thr
 325 330 335

Phe His Gly Glu Thr Pro Arg Ala Thr Thr Asp Ser Ser Asn Thr Ala
 340 345 350

Asn Leu Asn Gly Ile Ser Ile Thr Ile His Ser Glu Phe Tyr Ile Ile
 355 360 365

[0018]

Pro Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys Asn Glu Tyr Ile Asn Asn Gly Leu
 370 375 380

<210> 30

<211> 1152

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SR69A/V57C/M140C-VP8

<400> 30

atgaagatgg cgtcgaatga cgccagccca tctgatgggt ccacagccaa cctcgtccca 60

gaggtaaca atgaggttat ggctttggag cccgttggtg gtgccgctat tgcggcacct 120

gtggcgggcc aacaaaacgt aattgacccc tggattagga ataatttttg tcaagcccct 180

ggtggagagt ttacagtatc cctgcaaac gctccaggtg agatactatg gagcgcgccc 240

ttgggcctg atttgaacct ctacctttct catttggcca gaatgtacaa tggttatgca 300

ggtggttttg aagtgcaggt aatcctcgcg gggaacgcgt tcaccgccgg gaaagtcata	360
tttgcagcag tcccacaaa ttttccaact gaaggcttga gccccagcca ggttacttgt	420
ttccccata taatagtaga tgtaggcaa ttggaacctg tgtagatccc cttacctgat	480
gtaggaata acttctatca ttacaatcaa tcaaatgatt ctaccattaa attgatagca	540
atgctgtata caccacttag ggctaataat getggggatg atgtcttcac agtctcttgt	600
cgagtcctca cgaggccatc ccccattttt gatttcatat tcttggtgcc acccacagtt	660
gaacatcacc atcaacttaga tggctcctat caacctacta catttacacc acctactgat	720
tactggatac ttattaattc aaatacaaat ggagtagtat acgagagtac aaataatagt	780
gacttttga ctgcagtcac tgctgttgaa ccgcacgtca atccagtaga tagacaatat	840
aatgtatttg gtgaaaataa acaatttaac gtaagaaatg attcagataa atggaagttt	900
ttagaaatgt ttagaggcag tagtcaaaat gacttttata atagacgtac actaacttct	960
[0019] gatactagac tcgtgggaat attaaaatat ggtggaagaa tatggacatt tcatggtgaa	1020
acaccgaggg ctactactga tagtcaaac actgcaaatt tgaacggtat atcaattaca	1080
attcattcag aattttatat tattccaagg tccaagagt ctaagtgtaa tgaatatatt	1140
aacaacggtc ta	1152

<210> 31

<211> 384

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SR69A/V57C/M140C-VP8 的氨基酸序列

<400> 31

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr 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	Cys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gly	Glu	Phe				
																	50	55	60	
	Thr	Val	Ser	Pro	Ala	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	
[0020]	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	Cys	Phe	Pro	His	Ile				
																	130	135	140	
	Ile	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	Ser	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 His His His
 210 215 220

His Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Thr Pro Pro Thr Asp
 225 230 235 240

Tyr Trp Ile Leu Ile Asn Ser Asn Thr Asn Gly Val Val Tyr Glu Ser
 245 250 255

Thr Asn Asn Ser Asp Phe Trp Thr Ala Val Ile Ala Val Glu Pro His
 260 265 270

[0021] Val Asn Pro Val Asp Arg Gln Tyr Asn Val Phe Gly Glu Asn Lys Gln
 275 280 285

Phe Asn Val Arg Asn Asp Ser Asp Lys Trp Lys Phe Leu Glu Met Phe
 290 295 300

Arg Gly Ser Ser Gln Asn Asp Phe Tyr Asn Arg Arg Thr Leu Thr Ser
 305 310 315 320

Asp Thr Arg Leu Val Gly Ile Leu Lys Tyr Gly Gly Arg Ile Trp Thr
 325 330 335

Phe His Gly Glu Thr Pro Arg Ala Thr Thr Asp Ser Ser Asn Thr Ala
 340 345 350

Asn Leu Asn Gly Ile Ser Ile Thr Ile His Ser Glu Phe Tyr Ile Ile
 355 360 365

Pro Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys Asn Glu Tyr Ile Asn Asn Gly Leu
 370 375 380

<210> 32

<211> 1152

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SR69A/V57C/Q58C/S136C-VP8

<400> 32

atgaagatgg cgtcgaatga cgccagccca tctgatgggt ccacagccaa cctcgtccca 60

gaggtaaca atgaggttat ggctttggag cccgttggtg gtgccgctat tgcggcacct 120

gtggcgggcc acaaaaacgt aattgacccc tggattagga ataatttttg ttgtgccct 180

ggtggagagt ttacagtatc ccctgcaaac gctccagggt agatactatg gagegcgccc 240

[0022]

ttgggccctg atttgaacct ctacctttct catttggcca gaatgtacaa tggttatgca 300

ggtggttttg aagtcagggt aatcctcgcg gggaacgcgt tcaccgccgg gaaagtcata 360

tttgcagcag tcccacaaa ttttccaact gaaggcttga gccctgtca gtttactatg 420

ttccccata taatagtaga tgtaggcaa ttggaacctg tgttgatccc ctacctgat 480

gtaggaata acttctatca ttacaatcaa tcaaatgatt ctaccattaa attgatagca 540

atgctgtata caccacttag ggctaataat gctggggatg atgtcttcac agtctcttgt 600

cgagtcctca cgaggccatc ccccgatitg gatttcatat tcttgggtgcc acccacagtt 660

gaacatcacc atcacttaga tggctcttat caacctacta catttacacc acctactgat 720

tactggatac ttattaattc aaatacaaat ggagtagtat acgagagtac aaataatagt 780

gacttttggg ctgcagtcac tgctgttgaa cgcacgtca atccagtaga tagacaatat 840

aatgtatttg gtgaaaataa acaatttaat gtaagaaatg attcagataa atggaagttt 900

ttagaaatgt ttagaggcag tagtcaaaat gacttttata atagacgtac actaacttct 960
 gatactagac tcgtgggaat attaaaatat ggtggaagaa tatggacatt tcatggtgaa 1020
 acaccgaggg ctactactga tagctcaaac actgcaaatt tgaacggtat atcaattaca 1080
 attcattcag aattttatat tattccaagg tccaagagt ctaagtgtaa tgaatatatt 1140
 aacaacggtc ta 1152

<210> 33

<211> 385

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SR69A/V57C/Q58C/S136C-VP8

<400> 33

[0023] Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr 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 Cys Cys Gln Ala Pro Gly Gly Glu
 50 55 60

Phe Thr Val Ser Pro Ala Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Trp Ser Ala
 65 70 75 80

Pro Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Arg Met
 85 90 95

	Tyr	Asn	Gly	Tyr	Ala	Gly	Gly	Phe	Glu	Val	Gln	Val	Ile	Leu	Ala	Gly
			100						105						110	
	Asn	Ala	Phe	Thr	Ala	Gly	Lys	Val	Ile	Phe	Ala	Ala	Val	Pro	Pro	Asn
			115						120						125	
	Phe	Pro	Thr	Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Gln	Val	Thr	Cys	Phe	Pro	His
			130					135							140	
	Ile	Ile	Val	Asp	Val	Arg	Gln	Leu	Glu	Pro	Val	Leu	Ile	Pro	Leu	Pro
	145					150					155					160
	Asp	Val	Arg	Asn	Asn	Phe	Tyr	His	Tyr	Asn	Gln	Ser	Asn	Asp	Ser	Thr
					165						170					175
[0024]	Ile	Lys	Leu	Ile	Ala	Met	Leu	Tyr	Thr	Pro	Leu	Arg	Ala	Asn	Asn	Ala
			180								185					190
	Gly	Asp	Asp	Val	Phe	Thr	Val	Ser	Cys	Arg	Val	Leu	Thr	Arg	Pro	Ser
			195							200						205
	Pro	Asp	Phe	Asp	Phe	Ile	Phe	Leu	Val	Pro	Pro	Thr	Val	Glu	His	His
			210					215								220
	His	His	Leu	Asp	Gly	Pro	Tyr	Gln	Pro	Thr	Thr	Phe	Thr	Pro	Pro	Thr
	225							230								240
	Asp	Tyr	Trp	Ile	Leu	Ile	Asn	Ser	Asn	Thr	Asn	Gly	Val	Val	Tyr	Glu
					245						250					255
	Ser	Thr	Asn	Asn	Ser	Asp	Phe	Trp	Thr	Ala	Val	Ile	Ala	Val	Glu	Pro
					260						265					270

His Val Asn Pro Val Asp Arg Gln Tyr Asn Val Phe Gly Glu Asn Lys
 275 280 285

Gln Phe Asn Val Arg Asn Asp Ser Asp Lys Trp Lys Phe Leu Glu Met
 290 295 300

Phe Arg Gly Ser Ser Gln Asn Asp Phe Tyr Asn Arg Arg Thr Leu Thr
 305 310 315 320

Ser Asp Thr Arg Leu Val Gly Ile Leu Lys Tyr Gly Gly Arg Ile Trp
 325 330 335

Thr Phe His Gly Glu Thr Pro Arg Ala Thr Thr Asp Ser Ser Asn Thr
 340 345 350

[0025] Ala Asn Leu Asn Gly Ile Ser Ile Thr Ile His Ser Glu Phe Tyr Ile
 355 360 365

Ile Pro Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys Asn Glu Tyr Ile Asn Asn Gly
 370 375 380

Leu
 385

<210> 34

<211> 477

<212> DNA

<213> Rotavirus Rotavirus A

<400> 34

ttagatggtc cttatcaacc tactacattt acaccaccta ctgattactg gatacttatt 60

aattcaaata caaatggagt agtatacgag agtacaaata atagtgactt ttggactgca 120

gtcattgctg ttgaaccgca cgtcaatcca gtagatagac aatataatgt atttggtgaa 180
 aataaacaat ttaatgtaag aaatgattca gataaatgga agtttttaga aatgtttaga 240
 ggcagtagtc aaaatgactt ttataataga cgtacactaa cttctgatac tagactcgtg 300
 ggaatattaa aatatgggtg aagaatatgg acatttcatg gtgaaacacc gagggctact 360
 actgatagct caaacactgc aaatttgaac ggtatatcaa ttacaattca ttcagaattt 420
 tatattatc caaggtccca agagtctaag tgtaatgaat atattaacaa cggctca 477

<210> 35
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Rotavirus Rotavirus A
 <400> 35

[0026]

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

Thr Arg Leu Val Gly Ile Leu Lys Tyr Gly Gly Arg Ile Trp Thr Phe
 100 105 110

His Gly Glu Thr Pro Arg Ala Thr Thr Asp Ser Ser Asn Thr Ala Asn
 115 120 125

Leu Asn Gly Ile Ser Ile Thr Ile His Ser Glu Phe Tyr Ile Ile Pro
 130 135 140

Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys Asn Glu Tyr Ile Asn Asn Gly Leu
 145 150 155

<210> 36

<211> 1152

<212> DNA

<213> 人工序列

[0027]

<220>

<223> SR69A/V57C/Q58C/S136C/M140C-VP8 嵌合蛋白 (通过将这些序列克隆到 pET-24 载体中制备表达构建体)

<400> 36

atgaagatgg cgtcgaatga cgccagccca tctgatgggt ccacagccaa cctcgtccca 60

gaggtaaca atgaggttat ggctttggag cccgttggtg gtgccgctat tgcggcacct 120

gtggcgggcc aacaaaacgt aattgacccc tggattagga ataatttttg ttgtgccct 180

ggtggagagt ttacagtatc ccctgcaaac gctccaggtg agatactatg gagcgcgcc 240

ttgggccctg atttgaacce ctacctttct catttggcca gaatgtacaa tggttatgca 300

ggtggttttg aagtgcaggt aatcctcgcg gggaacgcgt tcaccgccgg gaaagtcata 360

tttgcagcag tcccacaaa ttttccaact gaaggettga gccctgtca ggttacttgt 420

ttccccata taatagtaga tgttaggcaa ttggaacctg tgttgatccc ctacctgat 480

gttaggaata acttctatca ttacaatcaa tcaaatgatt ctaccattaa attgatagca 540

atgctgtata caccacttag ggctaataat gctggggatg atgtcttcac agtctcttgt	600
cgagtcctca cgaggccatc ccccgatttt gatttcatat tcttggtgcc acccacagtt	660
gaacatcacc atcacttaga tggtccttat caacctacta catttacacc acctactgat	720
tactggatac ttattaattc aaatacaaat ggagtagtat acgagagtac aaataatagt	780
gacttttggga ctgcagtcac tgctgttgaa ccgcacgtca atccagtaga tagacaatat	840
aatgtatttg gtgaaaataa acaatttaac gtaagaaatg attcagataa atggaagttt	900
ttagaaatgt ttagaggcag tagtcaaaat gacttttata atagacgtac actaacttct	960
gatactagac tcgtgggaat attaaaatat ggtggaagaa tatggacatt tcatggtgaa	1020
acaccgaggg ctactactga tagctcaaac actgcaaatt tgaacggtat atcaattaca	1080
attcattcag aattttatat tattccaagg tccaagagt ctaagtgtaa tgaatatatt	1140
aacaacggtc ta	1152

[0028]

<210> 37

<211> 385

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SR69A/V57C/Q58/S136C/M140C-VP8 的氨基酸序列

<400> 37

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr 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 Cys Cys Gln Ala Pro Gly Gly Glu
 50 55 60

Phe Thr Val Ser Pro Ala Asn Ala Pro Gly Glu Ile Leu Trp Ser Ala
 65 70 75 80

Pro Leu Gly Pro Asp Leu Asn Pro Tyr Leu Ser His Leu Ala Arg Met
 85 90 95

Tyr Asn Gly Tyr Ala Gly Gly Phe Glu Val Gln Val Ile Leu Ala Gly
 100 105 110

Asn Ala Phe Thr Ala Gly Lys Val Ile Phe Ala Ala Val Pro Pro Asn
 115 120 125

[0029] Phe Pro Thr Glu Gly Leu Ser Pro Ser Gln Val Thr Cys Phe Pro His
 130 135 140

Ile Ile Val Asp Val Arg Gln Leu Glu Pro Val Leu Ile Pro Leu Pro
 145 150 155 160

Asp Val Arg Asn Asn Phe Tyr His Tyr Asn Gln Ser Asn Asp Ser Thr
 165 170 175

Ile Lys Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ala
 180 185 190

Gly Asp Asp Val Phe Thr Val Ser Cys Arg Val Leu Thr Arg Pro Ser
 195 200 205

Pro Asp Phe Asp Phe Ile Phe Leu Val Pro Pro Thr Val Glu His His
 210 215 220

<210>	38	
<211>	1152	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	S-VP8 的核苷酸序列	
<400>	38	
	atgaagatgg cgtcgaatga cgccagccca tctgatgggt ccacagccaa cctcgtccca	60
	gaggtaaca atgaggttat ggctttggag cccgttggtg gtgccgctat tgcggcacct	120
	gtggcgggcc acaaaaacgt aattgacccc tggattagga ataattttgt acaagcccet	180
	ggtggagagt ttacagtatc ccctagaaac gctccagggt agatactatg gagcgcgccc	240
	ttgggccctg atttgaacce ctacctttct catttggcca gaatgtacaa tggttatgca	300
	ggtggttttg aagtcaggt aatcctcgcg gggaacgcgt tcaccgccgg gaaagtcata	360
[0031]	tttgcagcag tcccacaaa ttttccaact gaaggettga gccccagcca gttactatg	420
	ttccccata taatagtaga tgtaggcaa ttggaacctg tgttgatccc cttacctgat	480
	gtaggaata acttctatca ttacaatcaa tcaaatgatt ctaccattaa attgatagca	540
	atgctgtata caccacttag ggctaataat gctggggatg atgtcttcac agtctcttgt	600
	cgagtcctca cgaggccatc ccccgatttt gatttcatat tcttggtgcc acccacagtt	660
	gaacatcacc atcacttaga tggtccttat caacctacta catttacacc acctactgat	720
	tactggatac ttattaattc aaatacaaat ggagtagtat acgagagtac aaataatagt	780
	gacttttggc ctgcagtcac tgctgttgaa ccgcacgtca atccagtaga tagacaatat	840
	aatgtatttg gtgaaaataa acaatttaac gtaagaaatg attcagataa atggaagttt	900
	ttagaaatgt ttagaggcag tagtcaaaat gacttttata atagacgtac actaacttct	960
	gatactagac tcgtgggaat attaaaatat ggtggaagaa tatggacatt tcatggtgaa	1020

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

Ile 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 Ser Thr Ile
 165 170 175

Lys Leu Ile Ala Met Leu Tyr Thr Pro Leu Arg Ala Asn Asn Ala Gly
 180 185 190

[0033]

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 His His His
 210 215 220

His Leu Asp Gly Pro Tyr Gln Pro Thr Thr Phe Thr Pro Pro Thr Asp
 225 230 235 240

Tyr Trp Ile Leu Ile Asn Ser Asn Thr Asn Gly Val Val Tyr Glu Ser
 245 250 255

Thr Asn Asn Ser Asp Phe Trp Thr Ala Val Ile Ala Val Glu Pro His
 260 265 270

Val Asn Pro Val Asp Arg Gln Tyr Asn Val Phe Gly Glu Asn Lys Gln
 275 280 285

Phe Asn Val Arg Asn Asp Ser Asp Lys Trp Lys Phe Leu Glu Phe Arg
290 295 300

Gly Ser Ser Gln Asn Asp Phe Tyr Asn Arg Arg Thr Leu Thr Ser Asp
305 310 315 320

Thr Arg Leu Val Gly Ile Leu Lys Tyr Gly Gly Arg Ile Trp Thr Phe
325 330 335

His Gly Glu Thr Pro Arg Ala Thr Thr Asp Ser Ser Asn Thr Ala Asn
340 345 350

Leu Asn Gly Ile Ser Ile Thr Ile His Ser Glu Phe Tyr Ile Ile Pro
355 360 365

[0034] Arg Ser Gln Glu Ser Lys Cys Asn Glu Tyr Ile Asn Asn Gly Leu
370 375 380

<210> 40

<211> 1149

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> SR69A/V57C/Q58C/S136C-mVP8 的核苷酸序列 (通过将这些序列克隆到 pET-24 载体中制备表达构建体)

<400> 40

atgaagatgg cgtcgaatga cgccagccca tctgatgggt ccacagccaa cctcgtccca 60

gaggtcaaca atgaggttat ggctttggag cccgttggtg gtgccgetat tgcggcacct 120

gtggcggggc aacaaaacgt aattgacccc tggattagga ataatttttg ttgtgccect 180

ggtggagagt ttacagtatc ccctgcaaac gctccaggtg agatactatg gagcgcgccc 240

ttgggccctg atttgaacce ctacctttct catttggcca gaatgtacaa tggttatgca 300

ggtggttttg aagtgcaggt aatcctcgcg gggaacgcgt tcaccgccgg gaaagtcata	360
tttgcagcag tcccacaaa ttttccaact gaaggcttga gccctgtca gttactatg	420
ttccccata taatagtaga tgtaggcaa ttggaacctg tgttgatccc cttacctgat	480
gtaggaata acttctatca ttacaatcaa tcaaatgatt ctaccattaa attgatagca	540
atgctgtata caccacttag ggctaataat getggggatg atgtcttcac agtctcttgt	600
cgagtcctca cgaggccatc ccccatttt gatttcatat tcttggtgcc acccacagtt	660
gaacatcacc atcaccttga tggaccatac caaccaatag cgttcagtcc gccgccagag	720
tactatattc tactctcccc gactgcacce ggagtaatcg ctgaatgtac gaatactgtc	780
aaccgctgga tagcaatcat agctatagag ccaaactgtt caccaacaaa tcgtacctac	840
acattgttcg gaattactga acagctaaca gtagaaaaca gctccgtgga taaatggaag	900
tttatagact tcatgaaaac tccaacaact ggcagctac tccgttataa cattttgttg	960
[0035] tctagcacta agctatgcgc agtggcgaag cacacggaca atttatactc ctatggttga	1020
gaaacgccta ctgcaggtca ggcatactac tcttctttca atatatttaa cctaaccgcg	1080
cactgtgact tctacattat accatggtcg cagcaatcgt tgtgcacgca atacgttaat	1140
aacgatta	1149

<210> 41

<211> 383

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> SR69A/V57C/Q58C/S136C-mVP8 的氨基酸序列

<400> 41

Met Lys Met Ala Ser Asn Asp Ala Ser Pro Ser Asp Gly Ser Thr 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	Cys	Cys	Ala	Pro	Gly	Gly	Glu	Phe				
																	50	55	60	
	Thr	Val	Ser	Pro	Ala	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	
[0036]	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	Cys	Gln	Val	Thr	Met	Phe	Pro	His	Ile				
																	130	135	140	
	Ile	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	Ser	Thr	Ile				
																	165	170	175	
	Lys	Leu	Ile	Ala	Met	Leu	Tyr	Thr	Pro	Leu	Arg	Ala	Asn	Asn	Ala	Gly				
																	180	185	190	

Trp Ser Gln Gln Ser Leu Cys Thr Gln Tyr Val Asn Asn Gly Leu
 370 375 380

<210> 42

<211> 498

<212> DNA

<213> Orthohepevirus Orthohepevirus A

<400> 42

cctaccccgt cacctgcccc ctcccgccct ttttcagttc ttcgtgccaa tgacgttctg 60

tggctctctc tcaactgccgc tgagtacgac cagaccacgt atgggtcgtc caccaacccc 120

atgtatgtct ctgacacggt cacgtttggt aatgtggcca ctggtgetca ggccgttgcc 180

cgctctcttg actggctctaa agtcaccctg gatggtcgtc ctcttaccac tattcagcag 240

tattctaaga cattttatgt tctcccgtt cgcgggaaac tttccttctg ggaggctagc 300

[0038] acgactaagg ccggctaccc gtataactat aatactactg ctagtacca aattttgatt 360

gagaacgcgg ccggtcaccg tgcgctatt tctacttata ccactagtct ggggtcccgc 420

cctacctoga tctctgcggt cgggtgtgcta gccccacatt cggcccttgc cgtcttgag 480

gacaccgttg attacctt 498

<210> 43

<211> 166

<212> PRT

<213> Orthohepevirus Orthohepevirus A

<400> 43

Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val Leu Arg Ala
 1 5 10 15

Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr Asp Gln Thr
 20 25 30

Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Asn Pro Met Tyr Val Ser Asp Thr Val Thr
 35 40 45

Phe Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg Ser Leu Asp
 50 55 60

Trp Ser Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Thr Thr Ile Gln Gln
 65 70 75 80

Tyr Ser Lys Thr Phe Tyr Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys Leu Ser Phe
 85 90 95

Trp Glu Ala Ser Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn Tyr Asn Thr
 100 105 110

[0039] Thr Ala Ser Asp Gln Ile Leu Ile Glu Asn Ala Ala Gly His Arg Val
 115 120 125

Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro Thr Ser Ile
 130 135 140

Ser Ala Val Gly Val Leu Ala Pro His Ser Ala Leu Ala Ala Leu Glu
 145 150 155 160

Asp Thr Val Asp Tyr Pro
 165

<210> 44

<211> 624

<212> DNA

<213> Avastrovirus Avastrovirus 2

<400> 44

tccatctatt tgccactacc acaagcagat gaccaataca caccctactt tgtctataat	60
tttcaagggg aaaggggtgc aaccaccgag actggggtat tttgtctggc agccatacca	120
gctgcgacta catctagtag gtataataat cagatcacca ctccatcaat tggtacagg	180
aatgctagtg gtacaggaac atcattccta ctagatgctg catcatggtg gaatatattg	240
gatgtaactc agactggagt gctttttgga caaccaagat tgggtgttgg tgatcatgcag	300
acaatgaaga ctctcaaca gcatatcaag gattacacag agcctgcaat acagaaatat	360
tatcctggaa caactaacct tgatgagcag ttgaagcaga gattgaacct ggagagggt	420
gacccggtca tctcaatggg ggacacaaac ggtaggaggg ctgcactctt ttataggact	480
agtgatgaaa aatatatattt atttttctca accacagaag atccaggggc acagtatcaa	540
aatctgaaaa tgttgtactt ctggaactgg tcctattctg acacaaaaca gcaatTTTTG	600
gaccacctta gaacagtgca gttt	624

[0040]

<210> 45

<211> 208

<212> PRT

<213> Avastrovirus Avastrovirus 2

<400> 45

Ser	Ile	Tyr	Leu	Pro	Gln	Ala	Asp	Asp	Gln	Tyr	Thr	Pro	Tyr
1			5				10					15	

Phe	Val	Tyr	Asn	Phe	Gln	Gly	Glu	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Glu	Thr	Gly
			20					25					30		

Val	Phe	Cys	Leu	Ala	Ala	Ile	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Ser	Ser	Arg	Tyr
		35				40						45			

Asn	Asn	Gln	Ile	Thr	Thr	Pro	Ser	Ile	Gly	Tyr	Arg	Asn	Ala	Ser	Gly
		50				55					60				

	tgctctaaag gtaaactgac cgttgacctg ggtcagtgcg gtctgctggg taccatcacc	60
	ggfccgccc agtgcgacca gttcctggaa ttctctgctg acctgatcat cgaacgtcgt	120
	gaaggttctg acgtttgcta cccgggtaaa ttcgttaacg aagaagctct gcgtcagatc	180
	ctgcgtgaat ctggtggtat cgacaaagaa accatggggt tcacctacaa cggtatccgt	240
	accaacgggtg ttacctctgc ttgcaaactg tctggttctt ctttctacgc tgaatgaaa	300
	tggctgctgt ctaacaccga caacgctgct ttcccgcaga tgaccaaate ttacaaaaac	360
	accgtaaat ctccggctat catcgtttgg ggtatccacc actctgtttc taccgctgaa	420
	cagaccaaac tgtacggttc tgtaacaaa ctggttaccg ttggttcttc taactaccag	480
	cagtctttcg ttccgtctcc gggctgctgt ccgcaggta acggtctgtc tggctgatac	540
	gacttccact ggctgatcct gaacccgaac gacaccgta ctttctctt caacgggtgct	600
[0042]	ttcatcgctc cggaccgtgc ttctttctg cgtggtaaata ctatgggtat ccagtctggt	660
	gttcaggtg acgctaac	678

<210> 47

<211> 226

<212> PRT

<213> Influenzavirus A Influenza A 病毒

<400> 47

Cys Ser Lys Gly Lys Arg Thr Val Asp Leu Gly Gln Cys Gly Leu Leu

1 5 10 15

Gly Thr Ile Thr Gly Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu Phe Ser

20 25 30

Ala Asp Leu Ile Ile Glu Arg Arg Glu Gly Ser Asp Val Cys Tyr Pro

35 40 45

Gly Lys Phe Val Asn Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg Glu Ser
 50 55 60

Gly Gly Ile Asp Lys Glu Thr Met Gly Phe Thr Tyr Asn Gly Ile Arg
 65 70 75 80

Thr Asn Gly Val Thr Ser Ala Cys Lys Arg Ser Gly Ser Ser Phe Tyr
 85 90 95

Ala Glu Met Lys Trp Leu Leu Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ala Phe Pro
 100 105 110

Gln Met Thr Lys Ser Tyr Lys Asn Thr Arg Lys Ser Pro Ala Ile Ile
 115 120 125

[0043] Val Trp Gly Ile His His Ser Val Ser Thr Ala Glu Gln Thr Lys Leu
 130 135 140

Tyr Gly Ser Gly Asn Lys Leu Val Thr Val Gly Ser Ser Asn Tyr Gln
 145 150 155 160

Gln Ser Phe Val Pro Ser Pro Gly Ala Arg Pro Gln Val Asn Gly Leu
 165 170 175

Ser Gly Arg Ile Asp Phe His Trp Leu Ile Leu Asn Pro Asn Asp Thr
 180 185 190

Val Thr Phe Ser Phe Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asp Arg Ala Ser
 195 200 205

Phe Leu Arg Gly Lys Ser Met Gly Ile Gln Ser Gly Val Gln Val Asp
 210 215 220

Ala Asn
225

<210> 48

<211> 198

<212> DNA

<213> 恶性疟原虫

<400> 48

gaaccgtctg acaaacacat caaagaatac ctgaacaaaa tccagaactc tctgtctacc 60

gaatggtctc cgtgctctgt tacctgcggt aacggtatcc aggttcgtat caaacgggt 120

tctgctaaca aaccgaaaga cgaactggac tacgctaacg acatcgaaaa aaaaatctgc 180

aaaatggaaa aatgctct 198

<210> 49

<211> 66

<212> PRT

<213> 恶性疟原虫

<400> 49

Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn
1 5 10 15

Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly
20 25 30

Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu
35 40 45

Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys
50 55 60

Cys Ser
65

[0044]

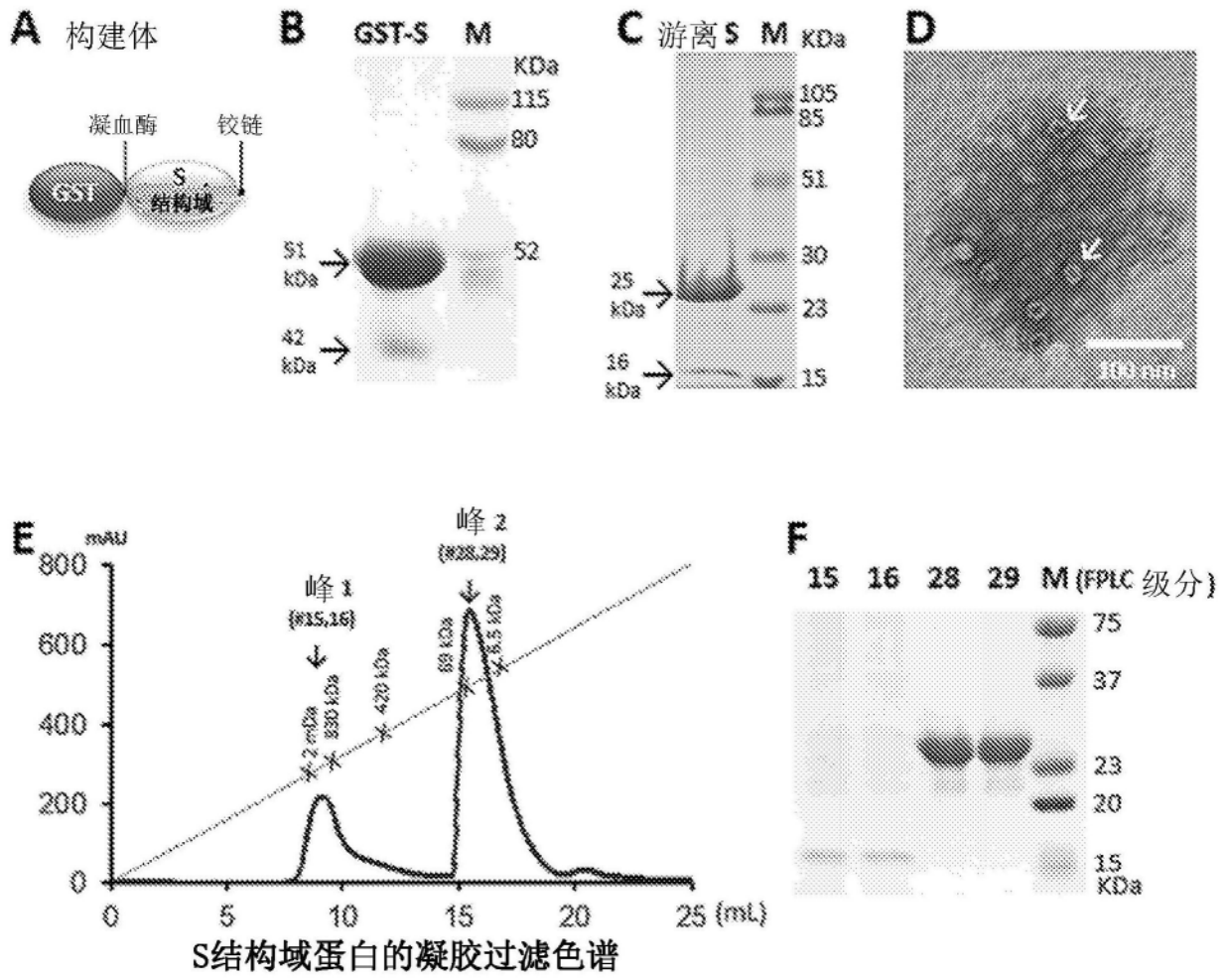


图1

A N-末端测序结果: NAPGE

B MKMASNDASPSDGSTANLVPEVNNEVMALEPVVGAIAAPVAGQQNVIDPWIR
 NNFVQAPGGGFTVSPR*NAPGEILWSAPLGPDLNPYLSHLARMYNGYAGGFEVQ
 VILAGNAFTAGKVFIAAVPPNFPTEGLSPSQVTMFPHIIVDVRQLEPVLIPDPVRNN
 FYHYNQSNDSSTIKLIAMLYTPLRANNAGDDVFTVSCRVLTRPSPDFDFILVPPTE-
 GGGG-HHHHHH (Calculated MW of S_{R69A}=24585.89 Da) (SEQ ID NO 1)

C	GII.4-AY038600	EFTVSPRNAPGEILWSAP (SEQ ID NO 2)
	GII.20-EU373815	EFTVSPRNAPGEVLLNLP (SEQ ID NO 3)
	GII.1-U07611	EFTVSPRNAPGEILLNLE (SEQ ID NO 4)
	GII.12-AJ277618	XFTVSPRNAPGEVLLNLE (SEQ ID NO 5)
	GII.16-AY502010	EFTVSPRNAPGEILLNLE (SEQ ID NO 6)
	GII.22-AB083780	EFTVSPRNAPGEILLNME (SEQ ID NO 7)
	GII.2-AY134748	EFTVSPRNAPGEVLLNLE (SEQ ID NO 8)
	GII.5-AF397156	EFTVSPRNAPGEILLVNL (SEQ ID NO 9)
	GII.10-AF427118	EFTVSPRNAPGEVLLNLE (SEQ ID NO 10)
	GII.13-AY113106	EFTVSPRNAPGEILLNLE (SEQ ID NO 11)
	GII.21-AY675554	EFTVSPRNAPGEILLMNL (SEQ ID NO 12)
	GII.17-AY502009	EFTVSPRNAPGEILLNLE (SEQ ID NO 13)
	GII.11-AB074893	EFTVSPRNAPGEILLDLE (SEQ ID NO 14)
	GII.19-AY823306	EFTVSPRNAPGEILLDLE (SEQ ID NO 15)
	GII.18-AY823305	EFTVSPRNAPGEVLLNLE (SEQ ID NO 16)
	GII.3-U22498	EFTVSPRNAPGEVLLNLE (SEQ ID NO 17)
	GII.6-AF414407	EFTVSPRNAPGEMLLNLE (SEQ ID NO 18)
	GII.8-AF195848	EFTVSPRNAPGEFLLDLE (SEQ ID NO 19)
	GII.9-AAK84676	EFTVSPRNAPGEFLLDLE (SEQ ID NO 20)
	GII.14-AY130761	EFTVSPRNAPGELLLDLE (SEQ ID NO 21)
	GII.7-AJ277608	EFTVSPRNAPGEILLDLE (SEQ ID NO 22)
	GII.15-AY130762	EFTVSPRNAPGEVLIDLE (SEQ ID NO 23)

48
70
70
 :**:***,*



图2

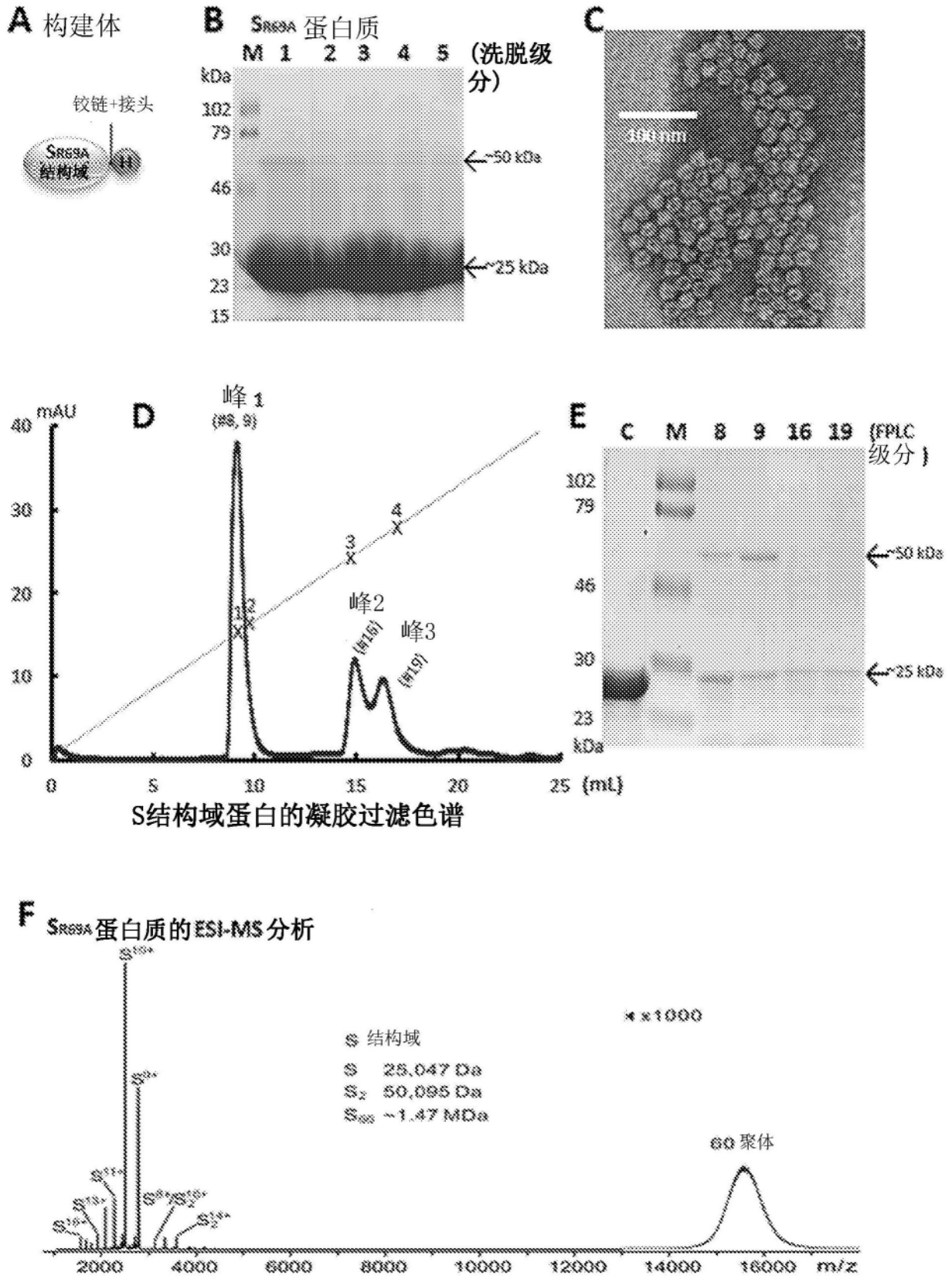


图3

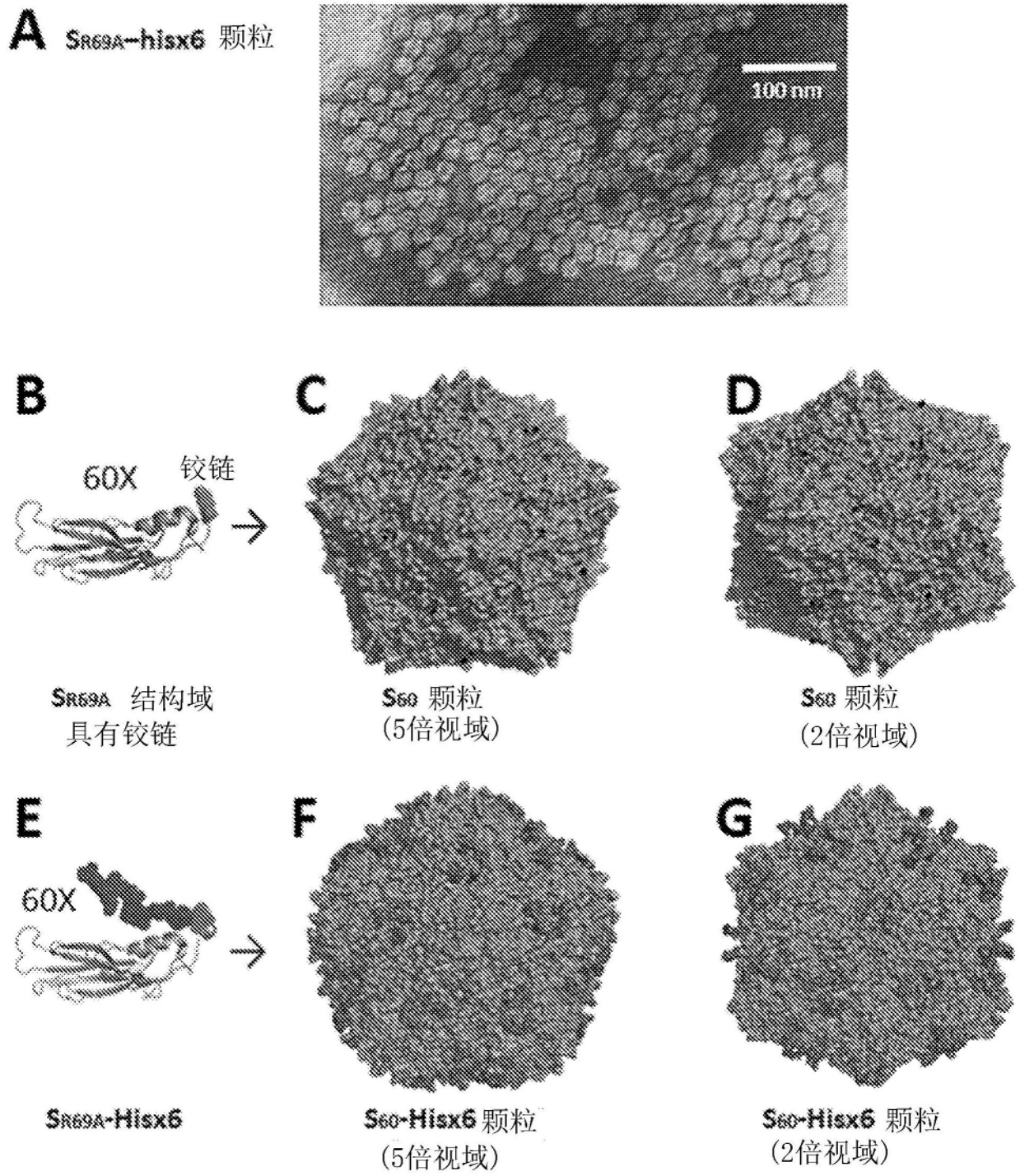
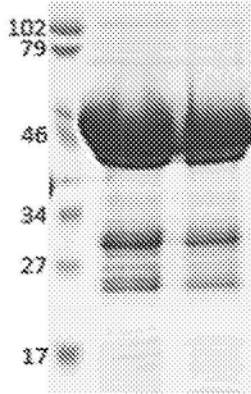


图4

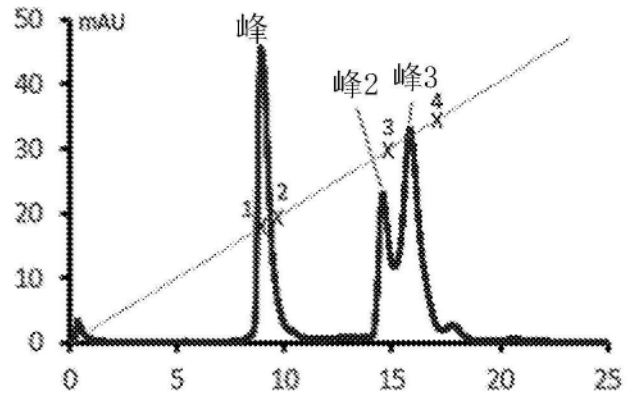
A 质粒构建体



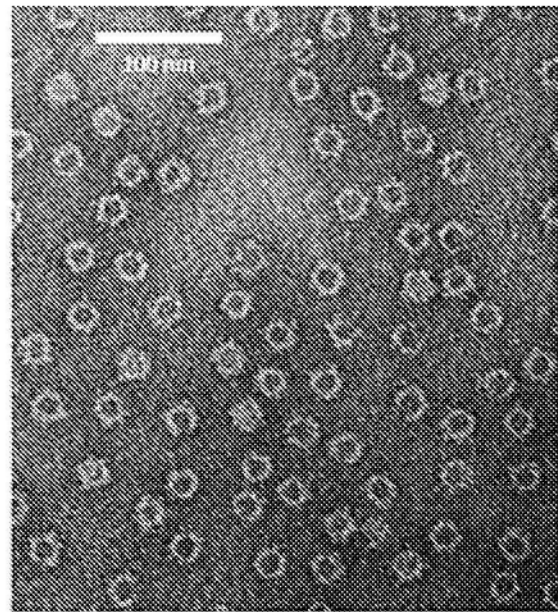
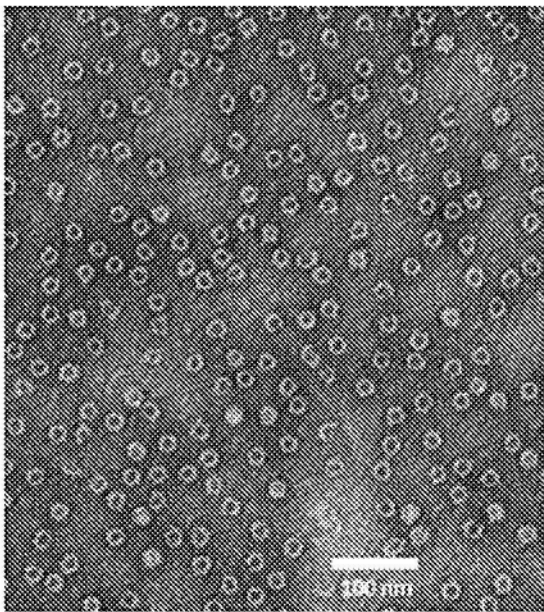
B M S_{60a}-VP8 蛋白质



C S_{60a}-VP8 蛋白质的凝胶过滤



D S₆₀-VP8 嵌合蛋白的EM显微照片



E S_{60a}-VP8 蛋白质的ESI-MS分析

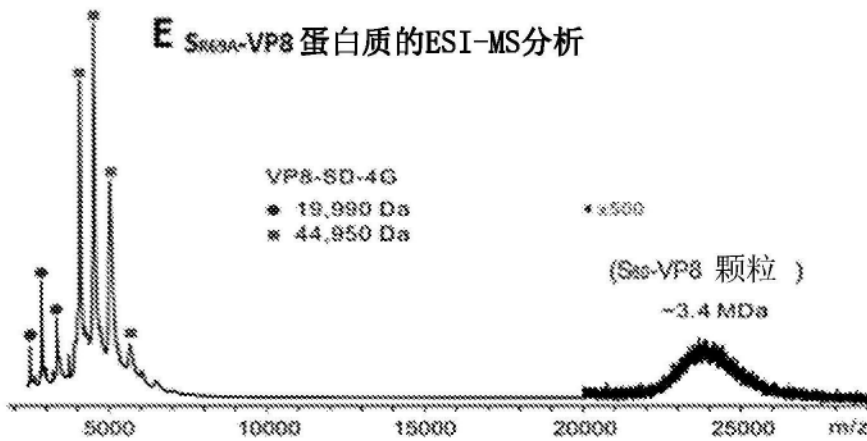


图5

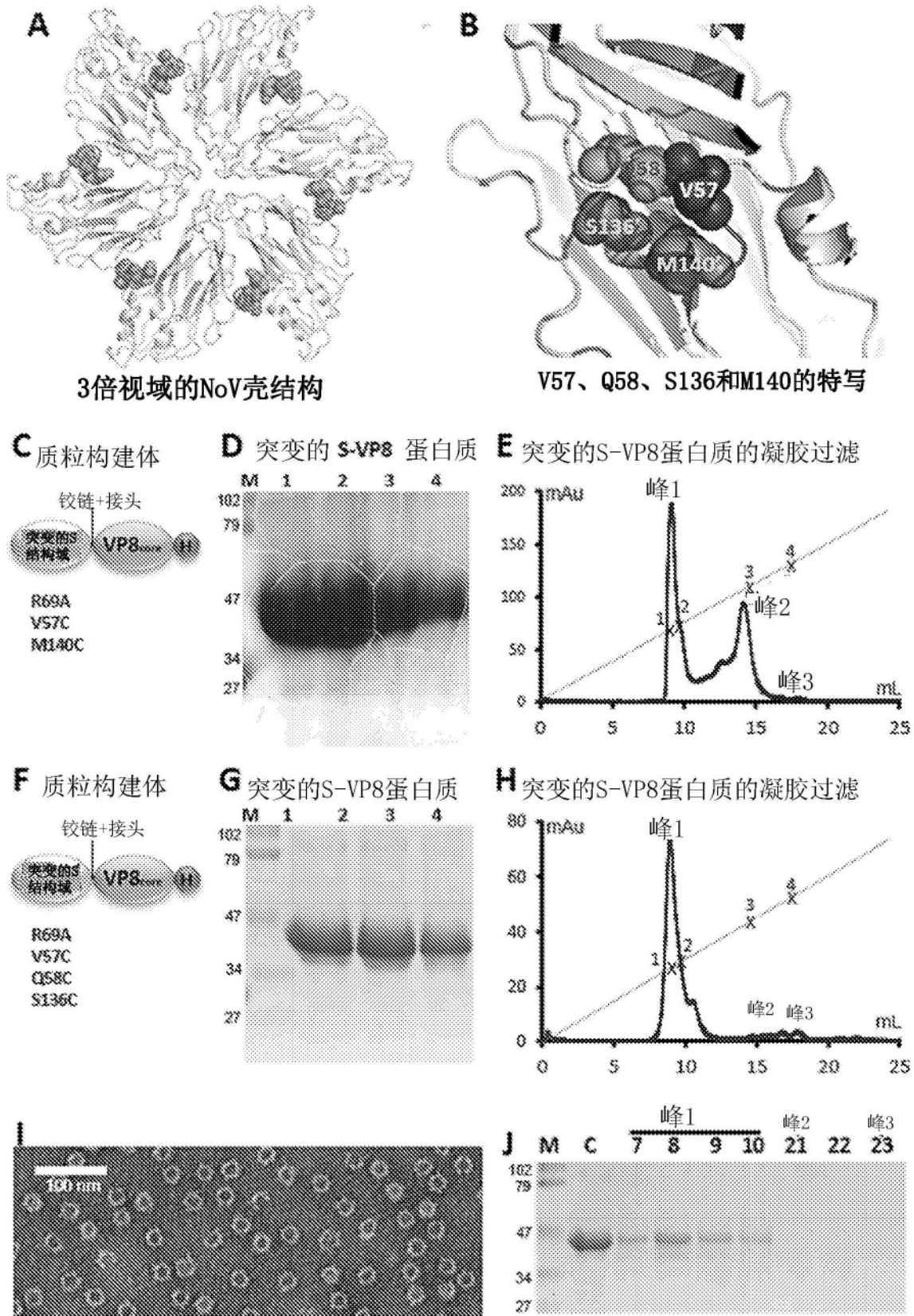


图6

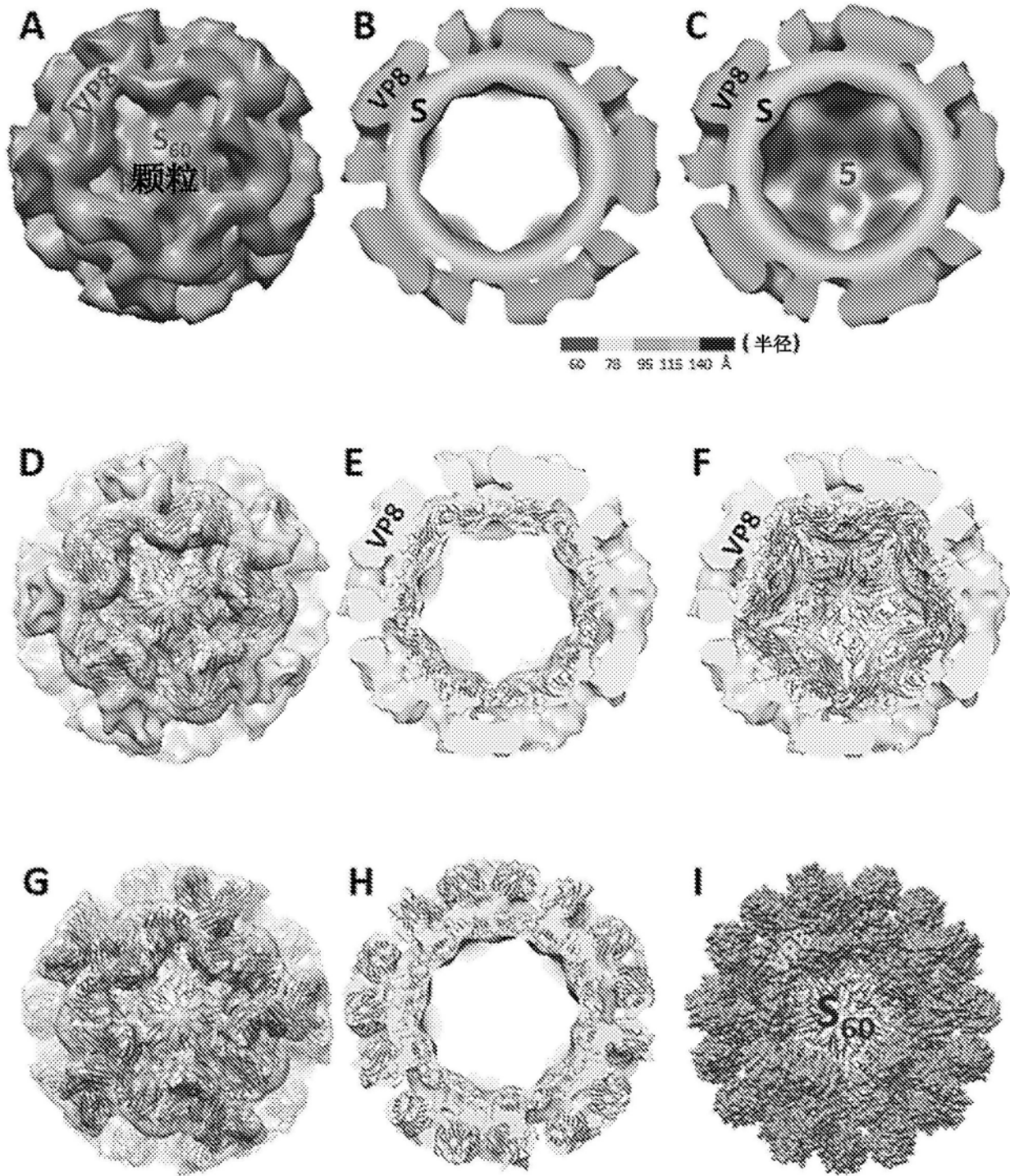


图7

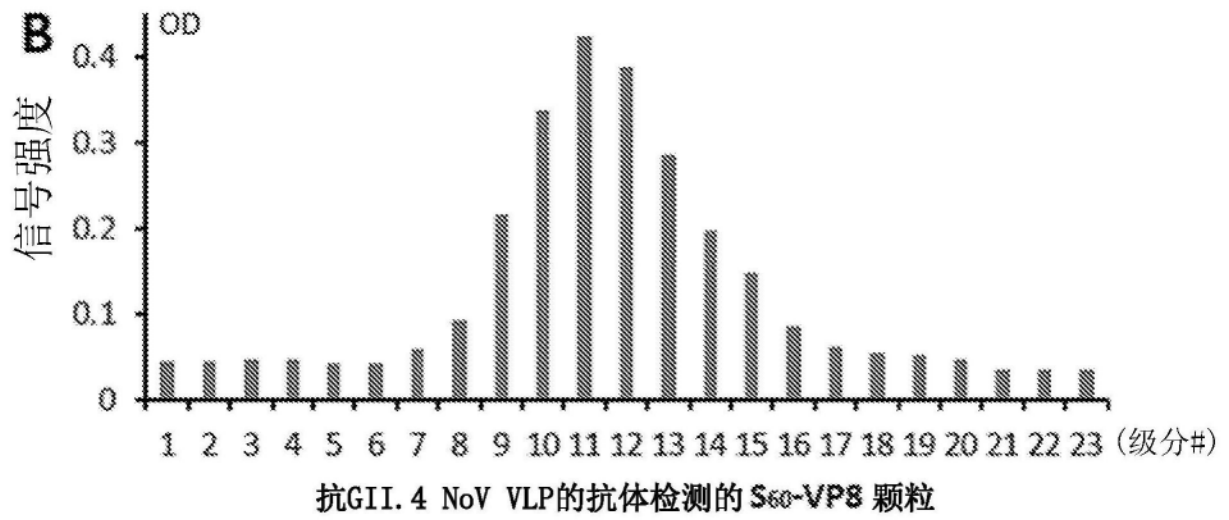
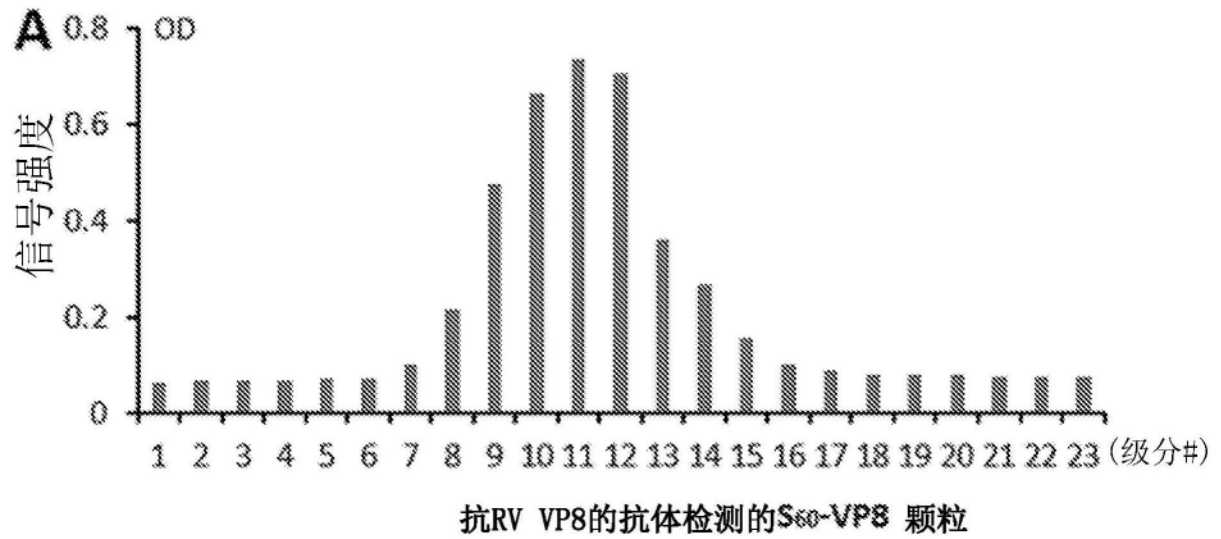


图8

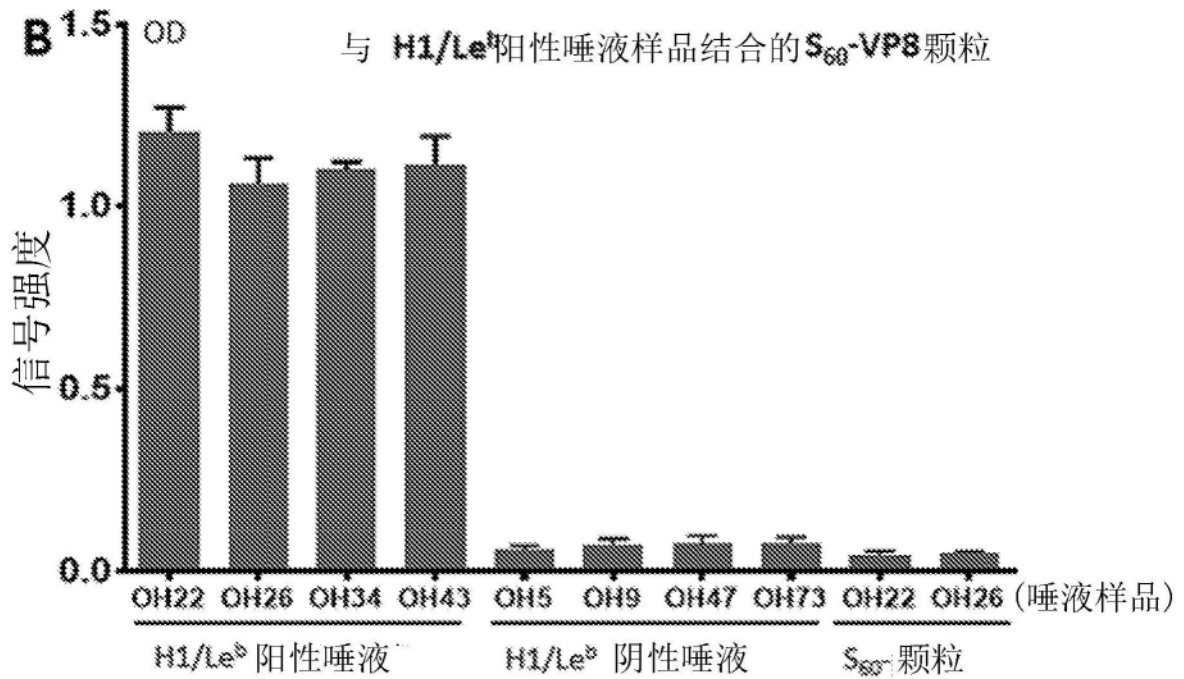
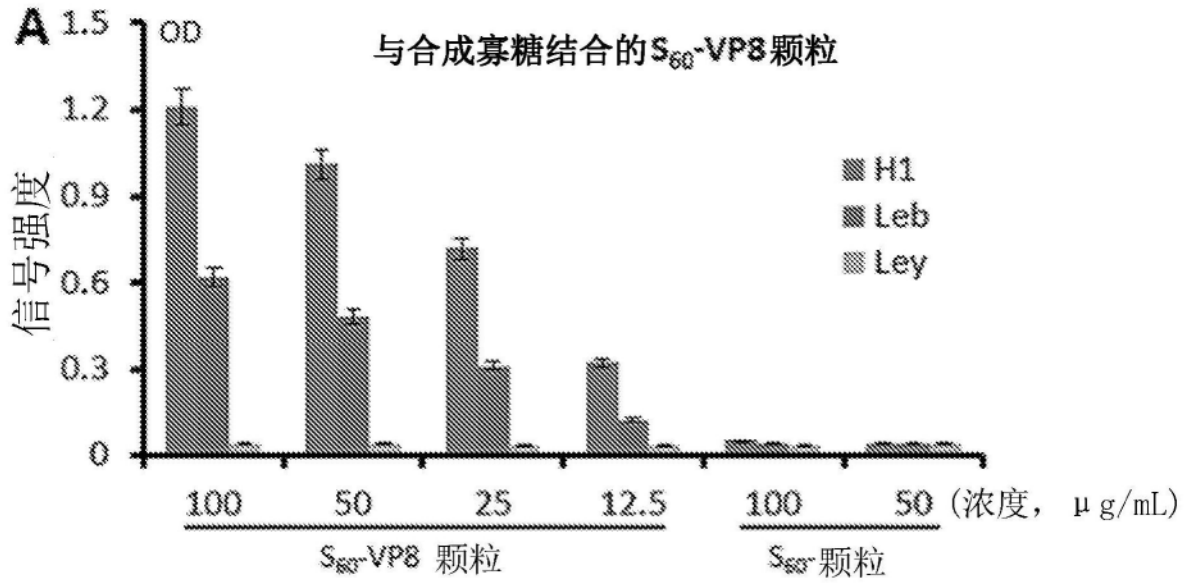


图9

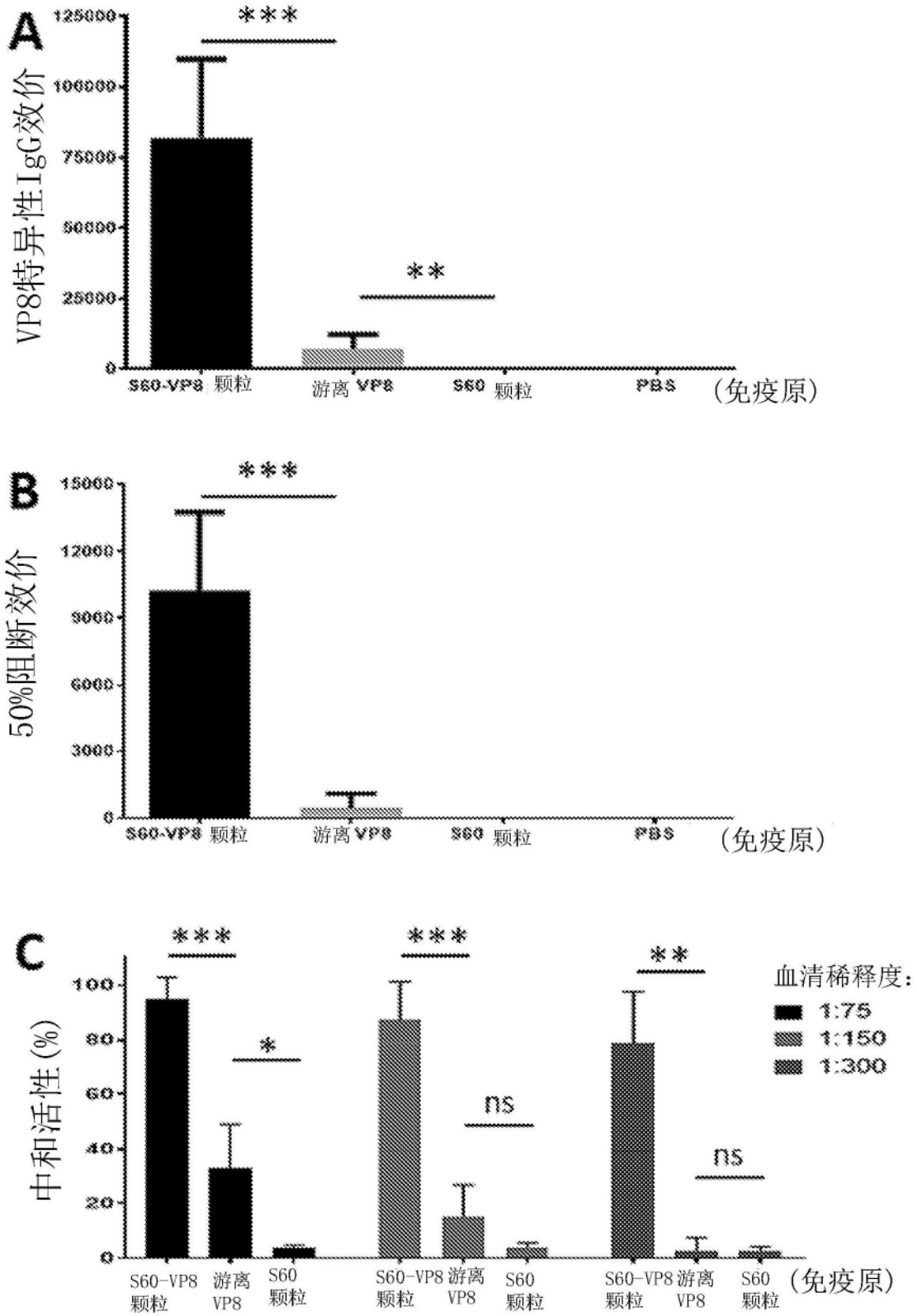


图10