[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61P 3/04
A61K 39/385

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03815102.2

[43] 公开日 2005 年 9 月 7 日

[11] 公开号 CN 1665565A

[22] 申请日 2003.7.18 [21] 申请号 03815102.2
[30] 优先权
[32] 2002. 7.19 [33] US [31] 60/396,638
[86] 国际申请 PCT/EP2003/007849 2003.7.18
[87] 国际公布 WO2004/009124 英 2004.1.29
[85] 进入国家阶段日期 2004.12.27

[71] 申请人 赛托斯生物技术公司
地址 瑞士施利伦
[72] 发明人 马丁·F·巴克曼
阿尔玛·富卢里贾

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
代理人 陈文平

权利要求书 12 页 说明书 86 页 序列表 52 页
附图 3 页

[54] 发明名称 GHRELIN－载体偶联物

[57] 摘要

本发明涉及分子生物学、病毒学、免疫学和医学领域。本发明提供一种组成物，其包含有序、重复的抗原或抗原决定簇阵列，特别是 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽的阵列。更具体而言，本发明提供一种组成物，其包含病毒样颗粒和至少一个与之结合的 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽。本发明也提供制备偶联物和有序、重复阵列的方法。本发明的组成物可用于疫苗的制备，该疫苗用于治疗肥胖症和与食物摄取增加或体重增加有关的其它疾病，以及有效诱导免疫应答，特别是抗体应答。此外，本发明的组成物尤其可用于在所述范围内有效诱导自身特异性免疫应答。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1. 一种组成物，其包含:

(a)核心颗粒，其含有至少一个第一附着位点；和

(b)至少一个抗原或抗原决定簇，其含有至少一个第二附着位点，

其中所述抗原或抗原决定簇是ghrelin或ghrelin肽，所述第二附着位点选自:

(i)所述抗原或抗原决定簇非天然存在的附着位点；和

(ii)所述抗原或抗原决定簇天然存在的附着位点，

其中所述第二附着位点能够与所述第一附着位点连接；所述ghrelin或ghrelin肽与所述核心颗粒通过所述连接相互作用，形成有序、重复的抗原阵列。

2. 权利要求1的组成物，其中所述核心颗粒选自:

i) 病毒;

ii) 病毒样颗粒;

iii)噬菌体;

iv) RNA噬菌体的病毒样颗粒;

v) 细菌菌毛;

vi) 病毒衣壳颗粒；和

vii) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)或(vi)的重组形式。

3. 权利要求1的组成物，其中所述核心颗粒包含，优选地是病毒样颗粒，其中优选所述病毒样颗粒是重组病毒样颗粒。

4. 权利要求2或3任一项的组成物，其中所述病毒样颗粒包含选自下列的重组蛋白或其片段:

(a) 重组乙型肝炎病毒蛋白;

(b) 重组麻疹病毒蛋白;

(c) 重组辛德毕斯病毒蛋白;

(d) 重组轮状病毒蛋白;

(e) 重组口蹄疫病毒蛋白;

(f) 重组逆转录病毒蛋白;

(g) 重组诺瓦克病毒蛋白;

(h) 重组甲病毒蛋白;

(i) 重组人乳头瘤病毒蛋白;

(j) 重组多瘤病毒蛋白;

(k) 重组噬菌体蛋白;

(l) 重组 RNA 噬菌体蛋白;

(m) 重组 Ty 蛋白;

(n) 重组 Qβ-噬菌体蛋白;

(o) 重组 GA-噬菌体蛋白;

(p) 重组 fr-噬菌体蛋白;

(q) 重组 AP205 噬菌体蛋白; 和

(q) (a)-(q)中任意重组蛋白的片段。

5. 权利要求 2 或 3 任一项的组成物，其中所述病毒样颗粒是乙型肝炎病毒核心抗原。

6. 权利要求 2 或 3 任一项的组成物，其中所述病毒样颗粒包含或者由 RNA 噬菌体的重组蛋白或其片段组成。

7. 权利要求 6 的组成物，其中所述 RNA 噬菌体选自:

(a)噬菌体 Qβ;

(b)噬菌体 R17;

(c)噬菌体 fr;

(d)噬菌体 GA;

(e)噬菌体 SP;

(f)噬菌体 MS2;

(g)噬菌体 M11;

(h)噬菌体 MX1;

(i)噬菌体 NL95;

(k)噬菌体 f2;

(l)噬菌体 PP7; 和

(m)噬菌体 AP205。

8. 权利要求 2-3 任一项的组成物，其中所述病毒样颗粒包含或者由 RNA 噬菌体 Qβ 的重组蛋白或其片段组成。

9. 权利要求 2-3 任一项的组成物，其中所述病毒样颗粒包含或者由 RNA 噬菌体 fr 的重组蛋白或其片段组成。

10. 权利要求 2-3 任一项的组成物，其中所述病毒样颗粒包含或者由 RNA 噬菌体 AP205 的重组蛋白或其片段组成。

11. 权利要求 3-10 任一项的组成物，其中所述重组蛋白包含或者基本由或者由 RNA 噬菌体的外壳蛋白组成。

12. 权利要求 11 的组成物，其中所述 RNA 噬菌体外壳蛋白具有选自如下的氨基酸序列：

(a) SEQ ID NO: 4;

(b) SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 的混合物;

(c) SEQ ID NO: 6;

(d) SEQ ID NO: 7;

(e) SEQ ID NO: 8;

(f) SEQ ID NO: 9;

(g) SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 的混合物;

(h) SEQ ID NO: 11;

(i) SEQ ID NO: 12;

(k) SEQ ID NO: 13;

(l) SEQ ID NO: 14;

(m) SEQ ID NO: 15;

(n) SEQ ID NO: 16; 和

(o) SEQ ID NO: 28。

13. 权利要求 3-10 任一项的组成物，其中所述重组蛋白包含或者基本由或者由 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白组成。

14. 权利要求 13 的组成物，其中所述 RNA 噬菌体选自：

(a)噬菌体 Qβ;

(b)噬菌体 R17;

(c)噬菌体 fr;

(d)噬菌体 GA;

(e)噬菌体 SP;

(f)噬菌体 MS2;

(g)噬菌体 M11;

(h)噬菌体 MX1;

(i)噬菌体 NL95;

(k)噬菌体 f2;

(l)噬菌体 PP7; 和

(m)噬菌体 AP205。

15. 权利要求 13-14 任一项的组成物，其中所述 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白通过置换去除至少一个赖氨酸残基进行了修饰。

16. 权利要求 13-14 任一项的组成物，其中所述 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白通过置换添加至少一个赖氨酸残基进行了修饰。

17. 权利要求 13-14 任一项的组成物，其中所述 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白通过缺失至少一个赖氨酸残基进行了修饰。

18. 权利要求 13-14 任一项的组成物，其中所述 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白通过插入添加至少一个赖氨酸残基进行了修饰。

19. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述第二附着位点能够与所述第一附着位点通过至少一个共价键连接。

20. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述第二附着位点能够与所述第一附着位点通过至少一个非肽键连接。

21. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述 ghrelin 或 ghrelin 肽与所述核心颗粒融合。

22. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述抗原或抗原决定簇是 ghrelin，其选自：

(a)人 ghrelin;

(b)牛 ghrelin;

(c)绵羊 ghrelin;

(d)狗 ghrelin;

(e)猫 ghrelin;

(f)小鼠 ghrelin;

(g)猪 ghrelin;

(h)马 ghrelin; 和

(k) (a)-(h)中任一种 ghrelin 的肽或其片段。

23. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述抗原或抗原决定簇是 ghrelin 肽，其选自:

(a)人 ghrelin 肽;

(b)牛 ghrelin 肽;

(c)绵羊 ghrelin 肽;

(d)狗 ghrelin 肽;

(e)猫 ghrelin 肽;

(f)小鼠 ghrelin 肽;

(g)猪 ghrelin 肽;

(h)马 ghrelin 肽; 和

(k) (a)-(h)中任一种 ghrelin 的肽或其片段。

24. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述抗原或抗原决定簇是 ghrelin 肽，优选人 ghrelin 肽或狗 ghrelin 肽。

25. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述 ghrelin 或 ghrelin 肽包含或者优选地具有选自下列的氨基酸序列:

(a) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 48)

(b) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 31)

(c) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 49)

(d) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 50)

(e) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 32)

(f) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 51)

(g) KKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 52)

(h) PPAKLQPR(SEQ ID NO: 53)

(i) AKLQPR(SEQ ID NO: 54)

(j) GSSFLSPEHQ(SEQ ID NO: 55)

(k) EHQRVQQRKE(SEQ ID NO: 56)

(l) KLQPR (SEQ ID NO: 59)

(m) GSSFLSPEHQRVQ (SEQ ID NO: 60)

(n) QRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 61)

(o) GSSFLSPEHQKLQ (SEQ ID NO: 62)

(p) QRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 63)

(q) EHQRVQQRKES (SEQ ID NO: 111)

(r) EHQKAQQRKE (SEQ ID NO: 112)

(s) EHQKAQQRKES (SEQ ID NO: 113)

(t) EHQKLQQRKE (SEQ ID NO: 114)

(u) EHQKLQQRKES (SEQ ID NO: 115)

(v) LSPEHQRVQQ (SEQ ID NO: 116)

(w) LSPEHQKAQQ (SEQ ID NO: 117)

(x) LSPEHQKLQQ (SEQ ID NO: 118),和

(y) GSSFLSP (SEQ ID NO: 119).

26. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述抗原或抗原决定族是具有至少一个 ghrelin 抗原性位点的 ghrelin 肽。

27. 前述权利要求中任一项的组成物，进一步含有氨基酸接头，其中所述氨基酸接头包含或者由所述第二附着位点组成。

28. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述第二附着位点或含有所述第二附着位点的氨基酸接头在 C 端或 N 端与所述 ghrelin 或 ghrelin 肽结合。

29. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述第二附着位点或含有所述第二附着位点的氨基酸接头选自：

(a) GGC;

(b) GGC-CONH2;

(c) GC;

(d) GC-CONH2;

(e) C; 和

(f) C-CONH2。

30. 前述权利要求中任一项的组成物，其中至少含有所述第二附

着位点的所述 ghrelin 或 ghrelin 肽包含、优选地由选自下列的氨基酸序列组成：

(a) CGSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 64)
(b) CGSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 65)
(c) CGSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 71)
(d) CGSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 72)
(e) CGSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 77)
(f) CGSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 106)
(g) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 66)
(h) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 120)
(i) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 67)
(j) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 121)
(k) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 73)
(l) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 123)
(m) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 74)
(n) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 124)
(o) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 105)
(p) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 107)
(q) CKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 108)
(r) CPPAKLQPR(SEQ ID NO: 70)
(s) CAKLQPR(SEQ ID NO: 109)
(t) GSSFLSPEHQC(SEQ ID NO: 110)
(u) CEHQRVQQRKE(SEQ ID NO: 76)
(v) GSSFLSPEHQRVQC (SEQ ID NO: 68)
(w) GSSFLSPEHQRVQGC (SEQ ID NO: 122)
(x) CQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 69)
(y) GSSFLSPEHQKLQC (SEQ ID NO: 75)
(z) GSSFLSPEHQKLQGC (SEQ ID NO: 125)
(aa) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRC (SEQ ID NO: 126)
(bb) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 127)
(cc) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC (SEQ ID NO: 128)
(dd) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 129)
(ee) GSSFLSPEHQKAQC (SEQ ID NO: 130)
(ff) GSSFLSPEHQKAQGC (SEQ ID NO: 131)

(gg) GGSSFLSPEHQGC (SEQ ID NO: 132)

(hh) CKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 133)

(ii) CEHQKAQQRKE (SEQ ID NO: 134)

(jj) CEHQKAQQRKES (SEQ ID NO: 135)

(kk) CLSPEHQKAQQ (SEQ ID NO: 136)

(ll) CEHQRVQQRKES (SEQ ID NO: 137) 和

(mm) CLSPEHQRVQQ (SEQ ID NO: 138).

31. 前述权利要求中任一项的组成物，其中所述抗原或抗原决定族是 ghrelin 或者优选 ghrelin 肽的无生物活性形式，不含 n-辛酰基修饰。

32. 一种药物组合物，其含有：

(a) 权利要求 1 的组成物；和

(b) 药物可接受的载体。

33. 权利要求 32 的药物组合物，进一步含有佐剂。

34. 权利要求 32 或 33 任一项的药物组合物，其中所述疫苗组合物不含佐剂。

35. 一种疫苗组合物，其含有前述权利要求中任一项的组成物。

36. 权利要求 35 的疫苗组合物，进一步含有佐剂。

37. 权利要求 35 或 36 任一项的疫苗组合物，其中所述疫苗组合物不含佐剂。

38. 权利要求 35-37 中任一项的疫苗组合物，其中所述病毒样颗粒包含 RNA 噬菌体 Qβ的重组蛋白或其片段。

39. 权利要求 35-38 中任一项的疫苗组合物，其中所述 ghrelin 或 ghrelin 肽选自：

(a) 人 ghrelin;

(b) 牛 ghrelin;

(c) 绵羊 ghrelin;

(d) 狗 ghrelin;

(e) 猫 ghrelin;

(f) 小鼠 ghrelin;

(g)猪 ghrelin;

(h)马 ghrelin; 和

(k) (a)-(h)中任一种 ghrelin 的肽或其片段。

40. 权利要求 35-39 中任一项的疫苗组合物，其中所述 ghrelin 或 ghrelin 肽包含、优选地具有选自下列的氨基酸序列:

(a) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 48)

(b) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 31)

(c) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 49)

(d) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 50)

(e) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 32)

(f) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 51)

(g) KKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 52)

(h) PPAKLQPR(SEQ ID NO: 53)

(i) AKLQPR(SEQ ID NO: 54)

(j) GSSFLSPEHQ(SEQ ID NO: 55)

(k) EHQRVQQRKE(SEQ ID NO: 56)

(l) KLQPR (SEQ ID NO: 59)

(m) GSSFLSPEHQRVQ (SEQ ID NO: 60)

(n) QRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 61)

(o) GSSFLSPEHQKLQ (SEQ ID NO: 62)

(p) QRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 63)

(q) EHQRVQQRKES (SEQ ID NO: 111)

(r) EHQKAQQRKE (SEQ ID NO: 112)

(s) EHQKAQQRKES (SEQ ID NO: 113)

(t) EHQKLQQRKE (SEQ ID NO: 114)

(u) EHQKLQQRKES (SEQ ID NO: 115)

(v) LSPEHQRVQQ (SEQ ID NO: 116)

(w) LSPEHQKAQQ (SEQ ID NO: 117)

(x) LSPEHQKLQQ (SEQ ID NO: 118), 和

(y) GSSFLSP (SEQ ID NO: 119).

41. 权利要求 35-39 中任一项的疫苗组合物，其中所述抗原或抗原决定簇是包含、优选地由选自下列的氨基酸序列组成的 ghrelin 肽:

(a) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 48)
(b) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 31)
(c) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 49)
(d) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 50)
(e) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 32)
(f) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 51)
(g) KKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 52)
(h) PPAKLQPR(SEQ ID NO: 53)
(i) AKLQPR(SEQ ID NO: 54)
(j) GSSFLSPEHQ(SEQ ID NO: 55)
(k) EHQRVQQRKE(SEQ ID NO: 56)
(l) KLQPR (SEQ ID NO: 59)
(m) GSSFLSPEHQRVQ (SEQ ID NO: 60)
(n) QRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 61)
(o) GSSFLSPEHQKLQ (SEQ ID NO: 62)
(p) QRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 63)
(q) EHQRVQQRKES (SEQ ID NO: 111)
(r) EHQKAQQRKE (SEQ ID NO: 112)
(s) EHQKAQQRKES (SEQ ID NO: 113)
(t) EHQKLQQRKE (SEQ ID NO: 114)
(u) EHQKLQQRKES (SEQ ID NO: 115)
(v) LSPEHQRVQQ (SEQ ID NO: 116)
(w) LSPEHQKAQQ (SEQ ID NO: 117)
(x) LSPEHQKLQQ (SEQ ID NO: 118), 和
(y) GSSFLSP (SEQ ID NO: 119).

42. 权利要求35-41中任一项的疫苗组合物，其中至少含有所述第二附着位点的所述抗原或抗原决定簇包含选自下列的氨基酸序列:

(a) CGSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 64)
(b) CGSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 65)
(c) CGSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 71)
(d) CGSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 72)
(e) CGSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 77)
(f) CGSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 106)
(g) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 66)
(h) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 120)
(i) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 67)
(j) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 121)
(k) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 73)
(l) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 123)
(m) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 74)
(n) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 124)
(o) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 105)
(p) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRC(SEQ ID NO: 107)
(q) CKKPPAKLQPR(SEQ ID NO: 108)
(r) CPPAKLQPR(SEQ ID NO: 70)
(s) CAKLQPR(SEQ ID NO: 109)
(t) GSSFLSPEHQC(SEQ ID NO: 110)
(u) CEHQRVQQRKE(SEQ ID NO: 76)
(v) GSSFLSPEHQRVQC (SEQ ID NO: 68)
(w) GSSFLSPEHQRVQGC (SEQ ID NO: 122)
(x) CQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 69)
(y) GSSFLSPEHQKLQC (SEQ ID NO: 75)
(z) GSSFLSPEHQKLQGC (SEQ ID NO: 125)
(aa) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRC (SEQ ID NO: 126)
(bb) GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 127)
(cc) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC (SEQ ID NO: 128)
(dd) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 129)
(ee) GSSFLSPEHQKAQC (SEQ ID NO: 130)
(ff) GSSFLSPEHQKAQGC (SEQ ID NO: 131)
(gg) GGSSFLSPEHQGC (SEQ ID NO: 132)
(hh) CKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 133)

(ii) CEHQKAQQRKE (SEQ ID NO: 134)

(jj) CEHQKAQQRKES (SEQ ID NO: 135)

(kk) CLSPEHQKAQQ (SEQ ID NO: 136)

(ll) CEHQRVQQRKES (SEQ ID NO: 137) 和

(mm) CLSPEHQRVQQ (SEQ ID NO: 138).

43. 一种生产前述权利要求中任一项的组成物的方法，其包括:

(a)提供含有至少一个第一附着位点的核心颗粒;

(b)提供含有至少一个第二附着位点的至少一个抗原或抗原决定簇，

其中所述抗原或抗原决定簇是ghrelin或ghrelin肽，其中所述第二附着位点选自:

(i)所述抗原或抗原决定簇非天然存在的附着位点；和

(ii)所述抗原或抗原决定簇天然存在的附着位点；和

其中所述第二附着位点能够与所述第一附着位点连接；和

(c)混合所述心颗粒与所述至少一个抗原或抗原决定簇，其中所述抗原或抗原决定簇与所述核心颗粒通过所述连接相互作用，形成有序、重复的抗原阵列。

44. 一种免疫方法，包括对动物或人施用前述权利要求中任一项的组成物或组合物。

45. 权利要求 44 的免疫方法，其中所述抗原或抗原决定簇是自身抗原。

46. 权利要求 44-45 中任一项的免疫方法，其中所述动物是人，其中所述抗原或抗原决定簇是人 ghrelin 或人 ghrelin 肽。

47. 权利要求 44-46 中任一项的免疫方法，其中所述动物来源于猫科，其中所述抗原或抗原决定簇是 ghrelin 或 ghrelin 肽。

48. 权利要求 44-47 中任一项的免疫方法，其中所述动物来源于犬科，其中所述抗原或抗原决定簇是猫科 ghrelin 或 ghrelin 肽。

49. 用作药物的权利要求 1-42 中任一项的组成物或组合物。

50. 权利要求 1-42 中任一项的组成物或组合物在生产治疗肥胖症的药物中的应用。

GHRELIN-载体偶联物

发明背景

发明领域

本发明涉及分子生物学、病毒学、免疫学和医学领域。本发明提供一种组成物，其包含有序、重复的抗原或抗原决定簇阵列，特别是ghrelin或ghrelin衍生肽的阵列。更具体而言，本发明提供一种组成物，其包含病毒样颗粒和至少一种与之结合的ghrelin或ghrelin衍生肽。

本发明也提供分别制备偶联物和有序、重复阵列的方法。本发明的组成物可用于制备疫苗，该疫苗用于治疗肥胖症和与食物摄取增加或体重增加有关的其它疾病，以及有效诱导免疫应答，特别是抗体应答。此外，本发明的组成物尤其可用于在所述范围内有效诱导自身特异性免疫应答。

相关技术

肥胖是影响全世界数百万人的一种疾病。尽管肥胖的原因可能多种多样，但是几乎所有类型的肥胖的一个共同原因是食物摄取增多。有许多因子可以调节饥饿和进食行为，包括leptin(瘦素)、生长激素(GH)、神经肽Y (NPY)、刺豚鼠(agouti)相关蛋白(AGRP)等。最近鉴定的一种重要的进食行为调节因子是ghrelin(胃饥饿素)，它是胃以及脑的某些部分(下丘脑)中产生的一种酰化肽(Kojima 等人. Nature 402:656-660 (1999))。Ghrelin由含有117个氨基酸的前蛋白原(prepro)形式酶切产生，获得在丝氨酸3处n-辛酰化的28个氨基酸长的肽。生物活性ghrelin需要在该位点n-辛酰化。已经鉴定了27个氨基酸的ghrelin第二同种型(Ghrelin-desQ14)，它在位点14

处缺乏一个谷氨酰胺(Q)，然而这个同种型只是循环 ghrelin 的一种次要组成。同全长 ghrelin 一样， Ghrelin-des-Q14 的生物活性依赖丝氨酸 3 上的 n-辛酰基。然而，最强的功能活性来自于 28 个氨基酸的 ghrelin 同种型(Hosoda 等人. Biochem. Biophys. Res. Commun. 279 (3):909-913 (2000))。Ghrelin 高度保守，人和大鼠 ghrelin 只有 2 个氨基酸不同(GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 31) 与 GSSFLSPEHQKAQQ-RKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 32)) (Kojima 等人. Nature 402:656-660(1999))。

ghrelin 受体(GHS-R)在大脑的不同区域表达，包括下丘脑中的弓状核 (Arc) 和腹内侧核以及脑垂体 (Howard 等人. Science 273:974-977 (1996))；McKee 等人. Mol Endokrin. 11:415-423 (1997)；Guan 等人，Mol brain research 48:23-29 (1997))，表明 ghrelin 主要在脑中起作用。除了刺激脑垂体释放 GH 之外(Kojima 等人. Nature 402:656-660 (1999))，最近还确定 ghrelin 是一种重要的中枢进食调节剂(Nakazato 等人，Nature 409:194-198 (2001))。具体而言，在脑室内施用后，ghrelin 显示可刺激进食。而且，脑室内施用抗 ghrelin 抗体可抑制进食。Ghrelin 注射诱导 NPY 释放的上调，抗 NPY 抗体以及 AGRP 拮抗剂阻断 ghrelin 诱导的进食，提示 ghrelin 通过增强 NPY 和 AGRP 的表达调节进食(Nakazato 等人，Nature 409:194-198 (2001))。此外，在小鼠和大鼠中，每日外周施用 ghrelin 可诱导体重增加，在禁食的大鼠中血清 ghrelin 浓度升高，进食可以降低其浓度，这进一步提示 ghrelin 在调节进食方面起重要作用(Tschop 等人，Nature 407:908-912)。在 Arc 中表达反义 GHS-R RNA 的转基因大鼠表现为较轻的体重和较少的脂肪组织，这支持 ghrelin 调节体重的观点(Shuto 等人，JCI 109:1429-1436 (2002))。也有证据表明 ghrelin 在人类进食行为中的重要作用。对人外周施用 ghrelin 可增强食欲，增加人的食物摄取(Wren 等人，J Clin Endocrinol Metab 86:5992-5998 (2001))。普拉德-威利综合征(Prader-Willi Syndrome)是人类综合性肥胖的最常见形式，其患

者显示显著升高的ghrelin水平(Cummings等人. Nat Med 8:643-644 (2002))。另外，在节食诱导的体重减轻后，人血浆ghrelin水平也强烈升高，这与人们在停止节食后体重快速恢复有关。相反，在行胃旁路术的患者中，在节食期间及以后ghrelin水平仍然较低，在这种情况下患者通常不恢复体重((Cummings等人，N Engl J Med 21:1623-1630 (2002))。因此，在人类，ghrelin似乎是食物摄取和体重的重要调节剂。

由于外周施用ghrelin能够提高食物摄取,导致体重增加(Tschop等人，Nature 407:908-912)，因此胃产生的ghrelin可能通过血流到达大脑，并触发进食。因此，在动物和人类中，可能可以通过阻断ghrelin从血液向大脑迁移，从而停止食物摄取。已经证明特异性抗体能够阻断ghrelin在脑中的作用(Nakazato等人，Nature 409:194-198 (2001))，外周抗体也可能能够阻断周围ghrelin的作用。另外，由于抗体无法穿过血脑屏障，因此ghrelin特异性抗体或许能够将ghrelin与大脑隔离，而不能作用于脑中的ghrelin。这是一个特别有吸引力的可能性，因为ghrelin也在脑中产生，可能发挥不同于调节食物摄取的功能(Nakazato等人，Nature 409:194-198 (2001))。因此，肥胖症的一种可能的治疗方法是在宿主中诱导ghrelin特异性抗体，使ghrelin被长期阻断，从而使食物摄取减少，这与行胃旁路术的患者中所见类似。

WO98/42840公开了ghrelin和ghrelin衍生片段对胃肠道的影响，特别是对胃动力和胃排空的影响。另外，US 6′420′521也公开了短ghrelin肽影响胃功能(包括胃排空、胃收缩性和葡萄糖吸收)的用途。

然而，通常难以诱导针对肽，特别是针对自身肽的抗体应答。提高接种效率的一种方法是提高所用抗原的重复程度。与分离的蛋白质不同，在不用任何佐剂、有及没有T细胞辅助的情况下，病毒均诱导快速、有效的免疫应答(Bachmann和Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15:235-270 (1997))。尽管病毒通常几乎不含蛋白质，但是它们比其

分离的成分能引发更强的免疫应答。对于 B 细胞应答，众所周知病毒免疫原性的一个关键因素是表面表位的重复性和秩序。许多病毒展示一种准晶体表面，其表面显示规则的表位阵列，可有效交联 B 细胞上表位特异性免疫球蛋白(Bachmann 和 Zinkernagel, Immunol. Today 17:553-558 (1996))。B 细胞上表面免疫球蛋白的这种交联是一种强激活信号，可直接诱导细胞周期的进展和 IgM 抗体的产生。进而，这些触发的 B 细胞能够激活 T 辅助细胞，随后诱导 B 细胞由产生 IgM 抗体向产生 IgG 抗体的转换，以及长期 B 细胞记忆的产生—这是所有接种的目标(Bachmann和Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15:235-270 (1997))。病毒结构甚至与自身免疫病中抗抗体的产生有关，是对病原体的自然应答的一部分(参见 Fehr, T.等人, J. Exp. Med. 185:1785-1792 (1997))。因此，高度组织的病毒表面所呈递的抗体能够诱导强烈的抗抗体应答。

然而，如上所述，免疫系统通常不能产生抗自身来源结构的抗体。对于低浓度存在的可溶性抗原，这是由于在 Th 细胞水平上的耐受。在这种情况下，将自身抗原与一种能够输送 T 辅助细胞的载体偶联可以打破这种耐受。对于高浓度存在的可溶性蛋白质或低浓度的膜蛋白，B 细胞和 Th 细胞可能耐受。然而，B 细胞耐受可能是可逆的(无反应性)，施用与外源载体偶联的高度组织形式的抗原能够打破这种耐受(Bachmann 和 Zinkernagel, Ann. Rev. Immunol. 15:235-270 (1997))。

发明概述

我们发现，ghrelin 或 ghrelin 肽，与具有内在重复组织结构的核心颗粒结合，特别是分别与病毒样颗粒(VLP)和 VLP 亚单位结合，所产生的高度有序、重复的偶联物是诱导特异性抗体的强免疫原。本发明提供了肥胖症和相关疾病的一种预防和治疗方法，该方法基于有序、重复的 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽核心颗粒阵列，具体而言分别基于 VLP-ghrelin/ghrelin 肽偶联物和阵列。这种预防和治疗组成物

在接种的动物和人中能够诱导高滴度的抗 ghrelin 抗体。因此，本发明集中于 ghrelin 及其脑相关特性。而且，本发明还集中于 ghrelin 在脑中的中枢效应，更重要的是对食欲、生长激素分泌和能量稳态的调节。因此，优选地，我们的接种策略诱导的抗体能够结合 ghrelin 的 n-辛酰化形式。如上所述，当与核心颗粒偶联时，或者优选地在佐剂中施用时，ghrelin 或较短的 ghrelin 肽片段也能够用来在人和动物中诱导 ghrelin 特异性抗体。

因此，ghrelin 的短肽片段，特别是在 C 端或 N 端分别与核心颗粒或病毒样颗粒偶联的残基 24-33、42-51、31-41 和 28-37 的相应较短肽，能够诱导高度特异性抗 ghrelin 抗体，这些抗体能够在外周循环的 ghrelin 进入 CNS 之前中和它们，并对生长激素从而对食物摄取发挥作用。

因此在本发明的一个优选实施方案中，抗原或抗原决定簇选自对应于 SEQ ID NO:144-146 所示任意序列的残基 24-33、42-51、31-41 和 28-37 的 ghrelin 肽，其中所述优选的 ghrelin 肽片段选自：(a)人 ghrelin；(b)牛 ghrelin；(c)绵羊 ghrelin；(d)狗 ghrelin；(e)猫 ghrelin；(f)小鼠 ghrelin；(g)猪 ghrelin；和(h)马 ghrelin。

更具体而言，在本发明中，我们令人惊讶地诱导了高水平的能够识别 ghrelin 的 n-辛酰化形式的抗体（如此处所述，特别是如实施例 17 所述）。而且，产生的抗体也识别另外一种同种型，Ghrelin-desQ14。因此，用 C 端或 N 端分别与核心颗粒或优选地与 VLP 连接的 ghrelin 和 ghrelin 肽接种产生的抗体能够阻断 n-辛酰化 ghrelin 进入脑内，调节小鼠的食物摄入。因此，本发明集中于针对活性 ghrelin 的接种策略，作为肥胖症及其它相关疾病的一种治疗方法。

如此处所述，特别是如实施例 18 所述，用 C 端或 N 端分别与核心颗粒或优选地与 VLP 连接的 ghrelin 和 ghrelin 肽接种可使小鼠的食物摄取减少，提示 ghrelin 和 ghrelin 肽分别是食物摄取的重要调节因子，针对 ghrelin 和 ghrelin 肽的抗体分别被认为是肥胖症和其它相关疾病的可能的治疗方法。

本发明因此提供一种组成物，其包含：(a)核心颗粒，其含有至少一个第一附着位点；(b)至少一种抗原或抗原决定簇，其含有至少一个第二附着位点，其中所述抗原或抗原决定簇是 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽，所述第二附着位点选自：(i)所述抗原或抗原决定簇非天然存在的附着位点；和(ii)所述抗原或抗原决定簇天然存在的附着位点，其中所述第二附着位点能够与第一附着位点连接；其中所述抗原或抗原决定簇与所述核心颗粒通过所述连接相互作用，形成有序、重复的抗原阵列。适用于本发明的核心颗粒的优选实施方案有病毒、病毒样颗粒、噬菌体、RNA 噬菌体的病毒样颗粒、细菌菌毛或鞭毛，或具有内在重复结构、能够形成本发明有序、重复抗原阵列的其它任何核心颗粒。

更具体而言，本发明提供一种组成物，其包含有序、重复的抗原或抗原决定簇阵列，特别是 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽 VLP 偶联物。更具体而言，本发明提供一种组成物，其包含病毒样颗粒和至少一种与之结合的 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽。本发明也提供分别制备偶联物和有序、重复阵列的方法。本发明的组成物可用于制备治疗肥胖症和相关疾病的疫苗，以及预防或治疗肥胖症和相关疾病并有效诱导免疫应答、特别是抗体应答的药物疫苗（pharmaccine）。而且，在所述范围内，本发明的组成物尤其可用于有效诱导自身特异性免疫应答。

在本发明中，ghrelin 或 ghrelin 衍生肽一般以定向方式分别与核心颗粒和 VLP 结合，产生有序、重复的 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽抗原阵列。而且，核心颗粒和 VLP 的高度重复、组织的结构分别介导 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽以高度有序、重复的方式展示，产生高度组织、重复的抗原阵列。此外，ghrelin 或 ghrelin 衍生肽分别与核心颗粒和 VLP 的结合还提供 T 辅助细胞表位，因为对于分别用核心颗粒-ghrelin 或 ghrelin 衍生肽阵列和 VLP-ghrelin 或 ghrelin 衍生肽阵列免疫的宿主而言，核心颗粒和 VLP 是外源的。这些阵列在其高度组织结构、大小和阵列表面的抗原重复性等方面不同于现有技术的偶

联物。

本发明的一个方面，ghrelin 或 ghrelin 衍生肽在合适的表达宿主中表达或者合成，而核心颗粒和 VLP 从分别适于核心颗粒和 VLP 折叠和装配的表达宿主中表达和纯化。ghrelin 或 ghrelin 衍生肽可以化学合成。由于生物活性 ghrelin 在位点 3 处含有一个 n-辛酰化丝氨酸，因此化学合成是制备用于含有生物活性形式 ghrelin 的疫苗制剂的 ghrelin 的优选方法。然后将 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽分别与核心颗粒和 VLP 结合，装配成 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽阵列。

另一方面，本发明提供一种组成物，其包含：(a) 病毒样颗粒，和 (b) 至少一种抗原或抗原决定簇，其中所述抗原或抗原决定簇是 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽，所述至少一种抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒结合。

另一方面，本发明提供一种药物组合物，其包含：(a) 本发明的组成物，和 (b) 药物可接受载体。

另一方面，本发明提供一种疫苗组合物，其包含含有下列成分的组成物：(a) 核心颗粒，其含有至少一个第一附着位点；(b) 至少一种抗原或抗原决定簇，其含有至少一个第二附着位点，其中所述抗原或抗原决定簇是 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽，所述第二附着位点选自：(i) 所述抗原或抗原决定簇非天然存在的附着位点；和 (ii) 所述抗原或抗原决定簇天然存在的附着位点，其中所述第二附着位点能够与第一附着位点连接；其中所述抗原或抗原决定簇与所述核心颗粒通过所述连接相互作用，形成有序、重复的抗原阵列。

另一方面，本发明提供一种疫苗组合物，其包含一种含有如下成分的组成物：(a) 病毒样颗粒；和 (b) 至少一种抗原或抗原决定簇，其中所述抗原或抗原决定簇是 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽；其中至少一种抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒结合。

另一方面，本发明提供一种生产权利要求 1 的组成物的方法，该方法包括：(a) 提供病毒样颗粒；(b) 提供至少一种抗原或抗原决定簇，其中所述抗原或抗原决定簇是 ghrelin 或 ghrelin 衍生肽；(c) 将所

述病毒样颗粒与所述至少一种抗原或抗原决定簇混合，使得所述至少一种抗原或抗原决定簇与所述病毒样颗粒结合。

类似地，本发明提供一种生产本发明组成物的方法，该方法包括：(a)提供含有至少一个第一附着位点的核心颗粒；(b)提供含有至少一个第二附着位点的至少一种抗原或抗原决定簇，其中所述抗原或抗原决定簇是ghrelin或ghrelin衍生肽，所述第二附着位点选自：(i) 所述抗原或抗原决定簇非天然存在的附着位点；和(ii) 所述抗原或抗原决定簇天然存在的附着位点；其中所述第二附着位点能够与第一附着位点连接；(c)将所述核心颗粒与所述至少一种抗原或抗原决定簇混合，其中所述抗原或抗原决定簇与所述核心颗粒通过所述连接相互作用，形成有序、重复的抗原阵列。

另一方面，本发明提供一种免疫方法，包括对动物或人施用权利要求1的组成物。

另一方面，本发明提供权利要求1的组成物在生产用于治疗肥胖症或相关疾病的药物中的应用。

另一方面，本发明提供权利要求1的组成物在制备用于治疗或预防肥胖症或相关疾病的药物中的应用。此外，另一方面，本发明也提供权利要求1的组成物单独或与其它试剂组合在生产用于治疗或预防肥胖症或相关疾病和/或刺激哺乳动物免疫系统的组成物、疫苗、药物或药剂中的应用。

因此，本发明具体提供适于预防和/或缓解或治疗肥胖症或相关疾病的疫苗组合物。本发明还提供免疫和接种方法，分别用于动物(特别是宠物如猫或狗)以及人类预防和/或缓解或治疗肥胖症或相关疾病。本发明的组合物可以用于预防或治疗目的。

在具体实施方案中，本发明提供预防、治疗和/或缓解由“自身”基因产物，即如此处所用的“自身抗原”引起或加重的肥胖症或相关疾病的方法。在相关实施方案中，本发明提供分别在动物和个体中诱导免疫应答的方法，可产生可预防、治疗和/或缓解由“自身”基因产物引起或加重的肥胖症或相关疾病的抗体。

本领域普通技术人员应当理解，当对动物或人施用本发明的组成物时，它们可以在含有盐、缓冲液、佐剂或希望用来提高组合物效能的其它物质的组合物之中。在大量资料中提供了适于制备药物组合物的材料的例子，包括《Remington 药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) (Osol, A 编著, Mack Publishing Co. (1990))。

如果接受个体能够耐受本发明的组合物的施用，则称该组合物是“药理学可接受的”。此外，本发明的组合物将以“治疗有效量”(即产生希望的生理学效应的量)施用。

本发明的组合物可以通过本领域公知的多种方法施用，但是通常通过注射、输液、吸入、口服或其它适当的物理方法施用。组合物也可肌肉内、静脉内或皮下施用。用于施用的组合物成分包括无菌水(例如生理盐水)或非水溶液和悬液。非水溶剂的例子包括丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油，和注射用有机酯如油酸乙酯。可以利用载体或封闭性包衣提高皮肤通透性并提高抗原吸收。

根据本领域所知、本发明的以下描述和权利要求书，本领域普通技术人员应当了解本发明的其它实施方案。

附图简述

图 1 显示鼠 C-Ghrelin (SEQ ID: No. 77)或鼠 Ghrelin-GC (SEQ ID: No. 105)与 Qβ衣壳蛋白反应产生的偶联产物。第 M 道是分子量标准，第 1 道显示衍生化的 Qβ VLP，第 2 道显示可溶性级分中的 Qβ-C-Ghrelin，第 3 道显示不可溶级分中的 Qβ-C-Ghrelin，第 4 道显示可溶性级分中的 Ghrelin-GC-Qβ，第 5 道显示不可溶级分中的 Ghrelin-GC-Qβ。在不可溶级分中只有极少的产物。

图 2 显示小鼠在第 0、14、21、42 天用鼠 Qβ-C-Ghrelin (Qb-cGhr)、鼠 Ghrelin-GC-Qβ (Qb-GhrC)或 PBS 免疫后，在合并的小鼠血清中检测到的 ghrelin 特异性 IgG 抗体的平均滴度。ELISA 滴度表示为在 ELISA 测定中达到半数最大 OD 的血清稀释度。ELISA 板用丝氨酸辛酰化的鼠 ghrelin (Bachem, 产品号 H-4862)以 20μg/ml 的浓度包被。

封闭平板，然后与连续稀释的第 14、21、42 天的小鼠血清一起孵育。用酶标记的抗小鼠 IgG 抗体检测结合的抗体。也检测同一小鼠的免疫前血清作为对照。

图 3 显示小鼠用鼠 Qβ-C-Ghrelin (Qb-cGhr)、鼠 Ghrelin-GC-Qβ (Qb-GhrC) 或 PBS 免疫后，小鼠的累积食物消耗。用 PBS 免疫小鼠作为对照。在第 0-14 天，所有小鼠都给予正常饮食。随后给予所有小鼠高脂肪(45%)饮食，以促进饮食诱导的肥胖的发展。食物和水随意给予。监测各个小鼠的体重变化，在免疫后(免疫后第 5、11、14、21、28、35、40、49 和 55 天)也定期监测每个笼子(即组)的食物与水的消耗。

发明详述

除非另外定义，此处所用的所有科技术语与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同。下文描述了优选的材料与方法，但是在本发明的实施与试验中可以使用与此处所述相似或相当的任何材料与方法。

1. 定义

佐剂：此处所用的术语“佐剂”指免疫应答的非特异性刺激物，或者可以在宿主中产生贮存的物质，当分别与本发明的疫苗和药物组合物混合时，可以引起更强的免疫应答。可以使用多种佐剂。例子包括：弗氏完全及不完全佐剂、氢氧化铝和修饰的胞壁酰二肽。其它佐剂包括：无机凝胶如氢氧化铝，表面活性物质如溶血卵磷脂、多聚醇、聚阴离子、肽、油状乳剂、匙孔血蓝蛋白、二硝基酚，以及潜在的可用于人的佐剂，如 BCG(卡介苗)和小棒状杆菌 (*Corynebacterium parvum*)。这些佐剂在本领域公知。能够与本发明的组成物一起施用的其它佐剂包括但不限于：单磷酰脂免疫调节剂、AdjuVax 100a、QS-21、QS-18、CRL1005、铝盐(明矾)、MF-59、OM-174、OM-197、OM-294 和病毒体佐剂技术。佐剂也可包括这些物质的混合物。

来源于南美树木 Quillaja Saponaria Molina 树皮的、具有佐剂

活性的免疫活性皂苷级分为本领域公知。例如，QS21，也被称为 QA21，是一种 HPLC 纯化的来自 Quillaja Saponaria Molina 树的级分，其生产方法在美国专利号 5,057,540 中公开(作为 QA21)。Scott 等人，Int. Archs. Allergy Appl. Immun.，1985,77,409 也公开了作为佐剂的 Quillaja 皂苷。单磷酰脂 A 及其衍生物为本领域公知。一种优选的衍生物是 3 脱氧酰化的单磷酰脂 A，由英国专利号 2220211 公开。进一步优选的佐剂在 WO00/00462 中描述，其公开内容在此引用作为参考。

然而，本发明的一个有利的特征是本发明组成物的高免疫原性。如此处已经概述的，或者随着本说明书下面将要说明的，在另外一个或优选的实施方案中，提供了不含佐剂的疫苗和药物组合物，形成不含佐剂的治疗 AD 的疫苗和药物组合物，从而具有出色的安全性，因为佐剂可引起副作用。如此处所用的术语“不含”在治疗 AD 的疫苗和药物组合物方面指不加佐剂使用的疫苗和药物组合物。

氨基酸接头：本说明书中的“氨基酸接头”，也被称为“接头”，在此使用时，将抗原或抗原决定簇与第二附着位点连接，或者更优选地，已经包含或含有第二附着位点，一般—但不是一定—是一个氨基酸残基，优选的是半胱氨酸残基。然而，此处所用的术语“氨基酸接头”并非意味着这种氨基酸接头只是由氨基酸残基组成，但是由氨基酸残基组成的氨基酸接头是本发明的一个优选实施方案。氨基酸接头的氨基酸残基优选地包含本领域公知的天然存在的氨基酸或非天然氨基酸，所有 L-或所有 D-氨基酸或其混合物。然而，本发明也包括含有具有巯基或半胱氨酸残基的分子的氨基酸接头。这样的分子优选地含有 C1-C6 烷基、环烷基(C5,C6)、芳基或杂芳基部分。然而，除了氨基酸接头外，本发明范围内也包括优选地含有 C1-C6 烷基、环烷基(C5,C6)、芳基或杂芳基部分且不含任何氨基酸的接头。抗原或抗原决定簇或任选地第二附着位点与氨基酸接头之间优选通过至少一个共价键，更优选通过至少一个肽键连接。

动物：此处所用的术语“动物”包括例如：人、绵羊、麋鹿、鹿、

黑尾鹿、水貂、哺乳动物、猴、马、牛、猪、山羊、狗、猫、大鼠、小鼠、鸟类、鸡、爬行动物、鱼、昆虫和蜘蛛类动物。

抗体：此处所用的术语“抗体”指能够结合表位或抗原决定簇的分子。该术语包括整个抗体及其抗原结合片段，包括单链抗体。最优选地，这些抗体是人抗原结合性抗体片段，包括但不限于：Fab、Fab’和 F(ab’)2、Fd、单链 Fvs(scFv)、单链抗体、二硫键连接的 Fvs(sdFv)，以及包含 V_L 或 V_H 域的片段。抗体可来自任何动物来源，包括鸟类和哺乳动物。优选地，抗体是人、鼠、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡抗体。此处所用的“人”抗体包括具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体，包括分离自人免疫球蛋白文库的抗体，或者来自一种或多种不表达内源免疫球蛋白的人免疫球蛋白转基因动物的抗体，如授予 Kucherlapati 等人的美国专利号 5,939,598 所述。

抗原：此处所用的术语“抗原”指如果被 MHC 分子呈递，即能够被抗体或 T 细胞受体(TCR)结合的分子。此处所用的术语“抗原”也包括 T 细胞表位。抗原还能够被免疫系统识别，以及/或者能够诱导体液免疫应答和/或细胞免疫应答，导致 B 和/或 T 淋巴细胞的激活。然而，至少在某些情况下，这可能需要抗原含有或者连接于 Th 细胞表位，并且包含于佐剂中。一种抗原可能包含一种或多种表位(B 和 T 表位)。上述特异性反应指抗原优选地一般以高选择性方式与其相应的抗体或 TCR 反应，而不与可能由其它抗原诱导的其它许多抗体或 TCR 反应。此处所用的抗原也可以是几种抗原的混合物。

抗原决定簇：此处所用的术语“抗原决定簇”指可被 B 或 T 淋巴细胞特异识别的抗原部分。B 淋巴细胞响应抗原决定簇产生抗体，而 T 淋巴细胞通过增殖和建立介导细胞和/或体液免疫所必须的效应功能来响应抗原决定簇。

连接（association）：此处所用的术语“连接”当用于第一和第二附着位点时，指第一与第二附着位点优选地通过至少一个非肽键结合。连接的性质可以是共价、离子、疏水、极性的或其任意组合，优选地，连接的性质是共价的。

第一附着位点：此处所用的短语"第一附着位点"指非天然或天然来源的一种元件，位于抗原或抗原决定簇上的第二附着位点可与之连接。第一附着位点可以是蛋白质、多肽、氨基酸、肽、糖、多核苷酸、天然或合成的聚合物、次级代谢物或化合物(生物素、荧光素、视黄醇、洋地黄毒苷、金属离子、苯甲基磺酰氟)或其组合，或者是其化学反应性基团。第一附着位点通常且优选地位于核心颗粒(优选地如病毒样颗粒)表面。核心和病毒样颗粒表面上分别存在多个一般为重复构型的第一附着位点。

第二附着位点：此处所用的短语"第二附着位点"是指与抗原或抗原决定簇有关的元件，位于核心颗粒和病毒样颗粒表面的第一附着位点分别可与之连接。抗原或抗原决定簇的第二附着位点可以是蛋白质、多肽、肽、糖、多核苷酸、天然或合成的聚合物、次级代谢物或化合物(生物素、荧光素、视黄醇、洋地黄毒苷、金属离子、苯甲基磺酰氟)或其组合，或者是其化学反应性基团。抗原或抗原决定簇上存在至少一个第二附着位点。因此，术语"包含至少一个第二附着位点的抗原或抗原决定簇"指至少含有抗原或抗原决定簇和第二附着位点的抗原或抗原性构建体。然而，特别是对于非天然来源(即在抗原或抗原决定簇内非天然存在)的第二附着位点，这些抗原或抗原性构建体含有 "氨基酸接头"。

结合（bound）：此处所用的术语"结合"指结合或附着，它们可以是共价的，例如通过化学偶联，或者是非共价的，例如离子相互作用、疏水相互作用、氢键等。共价键可以是，例如：酯、醚、磷酯、酰胺、肽、酰亚胺、碳-硫键、碳-磷键等。术语"结合"比术语如"偶联"、"融合"和"附着"范围更广，并且包括后者。

外壳蛋白：此处所用的术语"外壳蛋白"是指噬菌体或 RNA 噬菌体的蛋白质，能够参与噬菌体或 RNA 噬菌体的衣壳装配。然而，当指 RNA 噬菌体外壳蛋白基因的具体基因产物时，使用术语"CP"。例如，RNA 噬菌体 Qβ的外壳蛋白基因的具体基因产物被称为"Qβ CP"，而噬菌体 Qβ的"外壳蛋白"包含"Qβ CP"以及 A1 蛋白。噬菌体 Qβ的衣壳主要由

Qβ CP 组成，含有少量 A1 蛋白。同样，VLP Qβ外壳蛋白主要含有 Qβ CP，以及少量 A1 蛋白。

核心颗粒：此处所用的术语“核心颗粒”指具有固有重复组织的刚性结构。此处使用的核心颗粒可以是合成方法的产物或生物学方法的产物。

偶联的：此处所用的术语“偶联的”指通过共价键或通过强非共价相互作用附着，一般且优选地指通过共价键附着。本领域技术人员常用来偶联生物活性物质的任何方法都能在本发明中使用。

有效量：此处所用的术语“有效量”是指足以达到希望的生物学效应的量或必需的量。组合物的有效量是获得这种所选结果的量，此量可由本领域技术人员常规确定。例如，治疗免疫系统缺陷的有效量是引起免疫系统激活、在暴露于抗原后产生抗原特异性免疫应答所必需的量。该术语也与“足量”同义。

用于任何具体用途的有效量根据如下因素而不同：所治疗的疾病、具体施用的组合物、患者体重和/或疾病的严重程度。本领域普通技术人员能够根据经验确定本发明的具体组合物的有效量，而不需要过多的实验。

表位：此处所用的术语“表位”指在动物、优选地哺乳动物、最优选地人类中具有抗原或免疫原活性的多肽的连续或不连续部分。表位可被抗体或通过在 MHC 分子内的 T 细胞受体被 T 细胞识别。此处所用的“免疫原性表位”定义为能够在动物中引发抗体应答或诱导 T 细胞应答的多肽部分，这可通过本领域公知的任何方法测定。(参见，例如：Geysen 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1983))。此处所用的术语“抗原性表位”定义为抗体能够免疫特异地结合其抗原的蛋白质部分，这种特异性结合可通过本领域公知的任何一种方法测定。免疫特异性结合不包括非特异性结合，但是不一定排除与其它抗原的交叉反应性。抗原性表位不一定必须是免疫原性的。抗原性表位也可以是 T 细胞表位，此时它们能够被 MHC 分子内的 T 细胞受体免疫特异地结合。

一个表位可以以该表位唯一的空间构象包含 3 个氨基酸。一个表位通常由至少约 5 个这样的氨基酸组成，更常见地由至少约 8-10 个这样的氨基酸组成。如果表位是一种有机分子，它可以象硝基苯基一样小。

融合：此处所用的术语"融合"指不同来源的氨基酸序列通过其编码核苷酸序列的框内组合在一条多肽链中组合。除了与末端之一融合外，术语"融合"还包括内部融合，即不同来源的序列插入一条多肽链内。

Ghrelin：此处所用的术语"ghrelin"是指来源于 ghrelin 基因编码的蛋白质的肽。此处所用的 ghrelin 包括人、猫、狗和所有家畜以及其它一些动物中已知的所有形式的 ghrelin。此处所用的 Ghrelin 包括含有或者不含 n-辛酰基修饰的 ghrelin。而且，ghrelin 也包括 ghrelin 存在的所有剪接变体。另外，由于不同种的 ghrelin 之间存在高度序列同源性(在大鼠与人 ghrelin 之间只有两个氨基酸交换 (Kojima 等人. Nature 402: 656-660 (1999))，与人 ghrelin 具有 80%以上、优选地 90%以上、更优选地 95%以上、更优选地 99%以上同一性的 ghrelin 的所有天然变体在此都被称为"ghrelin"。

如此处所用的术语"ghrelin 衍生肽"或"ghrelin 肽"被广泛定义为任何如下所述的肽：它是 ghrelin 的一部分，含有原始 ghrelin 肽的至少 2 个、优选地至少 3 个、更优选地至少 4 个、更优选地至少 5 个、或者至少 6 个、更优选地至少 8 个或 9 个、甚至更优选地至少 10 个连续氨基酸。一般而言，"ghrelin 肽"和"ghrelin 片段"可以互换使用。而且，此处所用的术语"ghrelin 肽及其片段"除了 ghrelin 肽之外还包括所述 ghrelin 肽的任何部分，其中所述部分可以优选地通过在 N 端和/或 C 端缺失一个或多个氨基酸产生。通过在真核或原核表达系统中重组表达能够获得 Ghrelin 肽，它们表达为单独的 ghrelin 肽，或与其它氨基酸或蛋白质的融合体，例如为了利于 ghrelin 肽的折叠、表达或可溶性，或者利于 ghrelin 肽的纯化。为了利于或者使 ghrelin 肽与 VLP 或衣壳亚单位蛋白质的融合蛋白能够正确折叠，可

以向ghrelin肽的N端或C端添加一个或多个氨基酸。为了使ghrelin肽与 VLP 或衣壳或核心颗粒的亚单位蛋白质能够偶联，可以向ghrelin 肽添加至少一个第二附着位点。此外，ghrelin 肽也可以利用本领域公知的方法合成。这些肽甚至可以含有在相应的ghrelin蛋白中不存在的氨基酸。这些肽可以通过n-辛酰化修饰。

残基：此处所用的术语“残基”指多肽骨架或侧链中的具体氨基酸。

免疫应答：此处所用的术语“免疫应答”指导致 B 和/或 T 淋巴细胞和/或抗原呈递细胞激活或增殖的体液免疫应答和/或细胞免疫应答。然而，在某些情况下，免疫应答可能是低强度的，只有在使用至少一种根据本发明的物质时才能检测到。“免疫原性的”指用来刺激活生物免疫系统的试剂，使得免疫系统的一种或多种功能增强，并且针对该免疫原性剂。“免疫原性多肽”是能引发细胞和/或体液免疫应答的多肽，无论它是单独的还是与载体相连接，使用还是不使用佐剂。优选地，抗原呈递细胞可以被激活。

“增强”免疫应答的物质指这样一种物质：与不添加该物质时测得的相同的免疫应答相比，添加该物质时观察到更高或增强或偏离的免疫应答。例如利用 ^{51}Cr 释放试验，能够测定在免疫中使用及不使用该物质获得的样品中细胞毒性 T 细胞的裂解活性。与不使用该物质时的 CTL 裂解活性相比，CTL 裂解活性提高时的物质的量被称为足以增强动物对该抗原的免疫应答的量。在一个优选实施方案中，免疫应答至少提高约 2 倍，更优选地约 3 倍或更多。分泌的细胞因子的量或类型也可能改变。此外，诱导的抗体或其亚类的量也可能改变。

免疫：此处所用的术语“免疫”或“免疫作用”或相关术语指提供产生针对靶抗原或表位的基本免疫应答(包括抗体和/或细胞免疫，如效应 CTL)的能力。这些术语不要求产生完全免疫，而是产生大大高于基线的免疫应答。例如，如果在使用本发明的方法后哺乳动物产生针对靶抗原的细胞和/或体液免疫应答，则可认为该动物针对该靶抗原进行了免疫。

天然来源：此处所用的术语“天然来源”指其全部或部分不是合成的，而是自然存在或产生的。

非天然的：此处所用的术语通常指并非来源于自然，更具体而言，该术语指来自人工。

非天然来源：此处所用的术语“非天然来源”通常指合成的或者并非来源于自然；更具体而言，该术语是指来自人工。

有序、重复的抗原或抗原决定簇阵列：此处所用的术语“有序、重复的抗原或抗原决定簇阵列”通常指抗原或抗原决定簇的重复模式，其特征在于抗原或抗原决定簇分别相对于核心颗粒和病毒样颗粒一般且优选地均匀空间排列。在本发明的一个实施方案中，这种重复模式可能是一种几何模式。合适的有序、重复抗原或抗原决定簇阵列的典型和优选实例是具有严格重复的类结晶排列的抗原或抗原决定簇，优选地间隔 1-30 纳米，优选地 5-15 纳米。

菌毛：此处所用的术语“菌毛”指细菌细胞的胞外结构，它由蛋白质单体(例如菌毛单体)组成，这些单体组织成有序、重复的模式。此外，菌毛也是与多种过程的结构，如细菌细胞与宿主细胞表面受体的附着、细胞间基因交换和细胞-细胞识别。菌毛的例子包括 1 型菌毛、P-菌毛、F1C 菌毛、S-菌毛和 987P-菌毛。菌毛的其它例子在以下描述。

菌毛样结构：此处所用的短语“菌毛样结构”指具有类似于菌毛的特征、由蛋白质单体组成的结构。“菌毛样结构”的一个例子是由表达修饰的菌毛蛋白的细菌细胞形成的结构，这种修饰菌毛蛋白形成与天然菌毛不相同的有序、重复阵列。

多肽：此处所用的术语“多肽”指由单体(氨基酸)通过酰胺键(也称为肽键)线性连接而成的分子。它指氨基酸分子链，不是指特定长度的产物。因此，多肽的定义内包括肽、二肽、三肽、寡肽和蛋白质。该术语也指多肽的表达后修饰，例如：糖基化、乙酰化、磷酸化等。重组或衍生的多肽不一定由指定的核酸序列翻译而来。也可以用任何一种方法生产，包括化学合成。

自身抗原：此处所用的术语“自身抗原”指由宿主DNA编码的蛋白质，宿主DNA编码的蛋白质或RNA产生的产物被定义为自身的。另外，由两种或几种自身分子组合产生的蛋白质，或者代表一部分自身分子的蛋白质，以及与上述定义的两种自身分子具有高度同源性(＞95%，优选地＞97%，更优选地＞99%)的蛋白质也可以认为是自身的。

治疗：此处所用的术语“治疗”指预防和/或治疗。例如，当用于传染病时，该术语提高患者对病原体感染的抗性，或者换句话说，降低患者感染病原体或表现感染所致病症的可能性的预防处理，以及患者感染后的抗感染治疗，例如减轻或消除感染或阻止其恶化。当用于肥胖症或相关疾病时，术语“治疗”指提高患者对肥胖的抗性和/或逆转肥胖的预防或治疗性处理。

疫苗：此处所用的术语“疫苗”指含有本发明的组成物并且是能够对动物施用的形式的制剂。一般而言，疫苗包含常用的盐水或缓冲水溶液介质，本发明的组成物悬浮或溶解于其中。以这种形式，本发明的组成物能够方便地用来预防、改善或治疗疾病。在导入宿主后，疫苗能够引起免疫应答，包括但不限于抗体和/或细胞因子的产生和/或细胞毒性T细胞、抗原呈递细胞、辅助T细胞、树突细胞的激活和/或其它细胞应答。

任选地，本发明的疫苗还包含佐剂，与本发明的化合物相比，这种佐剂可能占一小部分或大部分。

病毒样颗粒(VLP)：此处所用的术语“病毒样颗粒”指类似于病毒颗粒的结构。而且，根据本发明的病毒样颗粒是非复制性和非传染性的，因为它缺乏病毒基因组的全部或部分，特别是病毒基因组的复制性和传染性部分。根据本发明的病毒样颗粒可能含有不同于其基因组的核酸。根据本发明的病毒样颗粒的一个典型的优选实施方案是病毒衣壳，如相应病毒、噬菌体或RNA噬菌体的病毒衣壳。术语“病毒衣壳”或“衣壳”在此可以互换使用，指由病毒蛋白质亚单位组成的大分子装配体。一般且优选地，病毒蛋白质亚单位分别装配为病毒衣壳和衣壳，它们具有固有的重复结构，这种结构一般是球形或管状。例如，

RNA 噬菌体或 HBcAg 的衣壳是二十面体对称的球形。此处所用的术语“衣壳样结构”指由病毒蛋白质亚单位组成的大分子装配体，它类似于上述衣壳形态，但是不同于典型的对称装配体，同时保持足够程度的顺序和重复性。

噬菌体的病毒样颗粒：此处所用的术语“噬菌体的病毒样颗粒”指类似于噬菌体的结构的病毒样颗粒，它是非复制性和非传染性的，至少缺乏编码噬菌体复制机制的基因，一般也缺乏编码负责病毒附着或进入宿主的蛋白质的基因。然而，该定义也包括这样的噬菌体病毒样颗粒，其中上述基因仍然存在但是无活性，从而产生非复制性和非传染性的噬菌体病毒样颗粒。

RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP：由 RNA 噬菌体外壳蛋白的 180 个亚单位自装配而成、任选地含有宿主 RNA 的衣壳结构，被称为“RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP”。一个具体例子是 Qβ外壳蛋白的 VLP。在此情况下，Qβ外壳蛋白的 VLP 可能仅仅由 Qβ CP 亚单位(通过 Qβ CP 基因的表达产生，该基因含有例如一个 TAA 终止密码子，通过抑制阻止任何更长 A1 蛋白的表达，参见 Kozlovska, T.M. 等人, Intervirology 39:9-15 (1996))装配而成，或者在衣壳装配体中还含有 A1 蛋白亚单位。

病毒颗粒：此处所用的术语“病毒颗粒”指病毒的形态学形状。某些病毒类型含有由蛋白质衣壳围绕的基因组；其它一些具有附加结构(例如包膜、尾等)。

一种（个）：术语“一种（个）”在本公开内容中使用时，除非另外说明，是指“至少一种（个）”或“一种（个）或一种（个）以上”。

本领域技术人员应当清楚，本发明的某些实施方案包括重组核酸技术的使用，如克隆、聚合酶链反应、DNA 和 RNA 的纯化、重组蛋白在原核和真核细胞中的表达等。这些方法为本领域技术人员公知，在出版的实验室方法手册中常见(例如，Sambrook, J. 等人编著，《分子克隆：实验室手册》（Molecular cloning, A Laboratory Manual），第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Habor, N.Y. (1989); Ausubel, F. 等人编著,《现代分子生物学方法》(Current

Protocols in Molecular Biology), John H. Wiley & Sons, Inc. (1997))。应用组织培养细胞系进行的基本实验室技术(Celis, J.编著,《细胞生物学》(Cell Biology), Academic Press, 第二版, (1988))和基于抗体的技术(Harlow, E.和 Lane, D., 《抗体: 实验室手册》(Antibodies: A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Habor, N.Y. (1988); Deutscher, M.P., “蛋白质纯化指南”(Guide to Protein Purification), Meth. Enzymol. 128, Academic Press San Diego (1990); Scopes, R.K., 《蛋白质纯化原理与实践》(Protein Purification Principles and Practice), 第三版, Springer-Verlag, New York (1994))在文献中也有大量描述, 这些文献全部在此引用作为参考。

2. 增强免疫应答的组成物和方法

本发明提供用于增强动物对 ghrelin 或 ghrelin 肽的免疫应答的组成物和方法。本发明的组成物包含或者由下列成分组成: (a)核心颗粒, 其含有至少一个第一附着位点; (b)至少一种抗原或抗原决定簇, 其含有至少一个第二附着位点, 其中所述抗原或抗原决定簇是 ghrelin 或 ghrelin 肽, 所述第二附着位点选自: (i)所述抗原或抗原决定簇非天然存在的附着位点; 和(ii)所述抗原或抗原决定簇中天然存在的附着位点, 其中所述第二附着位点能够与第一附着位点连接; 所述抗原或抗原决定簇与所述核心颗粒通过所述连接相互作用, 形成有序、重复的抗原阵列。更具体而言, 本发明的组成物包含或者由下列成分组成: 病毒样颗粒, 和至少一种抗原或抗原决定簇, 其中抗原或抗原决定簇是 ghrelin 或 ghrelin 肽, 至少一种抗原或抗原决定簇与病毒样颗粒结合, 形成有序、重复的抗原-VLP 阵列。而且, 本发明也能够使技术人员方便地构建这种组成物, 尤其用来治疗和/或预防肥胖症。

在一个实施方案中, 核心颗粒包括或者选自病毒、细菌菌毛、细菌菌毛蛋白形成的结构、噬菌体、病毒样颗粒、RNA 噬菌体的病毒样

颗粒、病毒衣壳颗粒或其重组形式。可以选择本领域公知的具有有序、重复外壳和/或核心蛋白结构的任何病毒作为本发明的核心颗粒；合适的病毒的例子包括：辛德毕斯病毒和其它甲病毒，弹状病毒(例如水泡性口炎病毒)，小RNA病毒(例如人鼻病毒、Aichi病毒)，披膜病毒(例如风疹病毒)，正粘病毒(例如索戈托病毒、贝特肯病毒、家禽流感病毒)，多瘤病毒(例如多瘤病毒BK、多瘤病毒JC、禽多瘤病毒BFDV)，细小病毒，轮状病毒，诺瓦克病毒，口蹄疫病毒，逆转录病毒，乙型肝炎病毒，烟草花叶病毒，禽兽棚病毒，和人乳头瘤病毒，以及优选地RNA噬菌体，噬菌体Qβ，噬菌体R17，噬菌体M11，噬菌体MX1，噬菌体NL95，噬菌体fr，噬菌体GA，噬菌体SP，噬菌体MS2，噬菌体f2，噬菌体PP7(例如，参见Bachman, M.F.和Zinkernagel, R.M., Immunol. Today 17:553-558 (1996)中的表1)。

在另外一个实施方案中，本发明利用病毒的基因工程产生有序、重复的病毒包膜蛋白与第一附着位点的融合体，所述第一附着位点包含于或者优选地是异源蛋白质、肽、抗原决定簇或选择的反应性氨基酸残基。在构建本发明的组成物中可以使用本领域公知的其它基因操作；例如，可以通过基因突变限制重组病毒的复制能力。此外，由于化学或物理灭活，或者如上所述由于缺乏可复制的基因组，用于本发明的病毒不能复制。为了与第一附着位点融合而选择的病毒蛋白应当具有组织的、重复的结构。在病毒表面上，这种组织的、重复的结构包括类晶体结构，其间距为5-30 nm，优选地5-15 nm。这类融合蛋白的产生将在病毒表面产生多个有序、重复的第一附着位点，反映原始病毒蛋白的正常组织结构。本领域技术人员应当理解，第一附着位点可以是任何合适的蛋白质、多肽、糖、多核苷酸、肽(氨基酸)、天然或合成聚合物、次级代谢物或其组合，或者是它们的一部分，它们可以用来特异性地附着抗原或抗原决定簇，产生有序、重复的抗原阵列。

在本发明的另一个实施方案中，核心颗粒是重组甲病毒，更具体而言，是重组辛德毕斯病毒。甲病毒是正链RNA病毒，它们在感染的

细胞的细胞质中完整复制其基因组 RNA，而不需要 DNA 中间物(Strauss, J.和 Strauss, E., Microbiol. Rev. 58:491-562 (1994))。甲病毒科的几个成员，辛德毕斯病毒(Xiong, C.等人, Science 243:1188-1191 (1989); Schlesinger, S., Trends Biotechnol. 11:18-22 (1993))、西门利启森林病毒(SFV)(Liljeström, P. & Garoff, H., Bio/Technology 9:1356-1361 (1991))及其它病毒(Davis, N.L.等人, Virology 171:189-204 (1989))，在作为基于病毒的多种不同蛋白质的表达载体(Lundstrom, K., Curr. Opin. Biotechnol. 8:578-582 (1997); Liljeström, P., Curr. Opin. Biotechnol. 5:495-500 (1994))以及作为疫苗研制的候选物方面已经受到极大关注。最近，公布了涉及甲病毒在异源蛋白质表达和疫苗研制中的用途的大量专利(参见美国专利号 5,766,602; 5,792,462; 5,739,026; 5,789,245; 5,814,482)。本发明的甲病毒核心颗粒的构建可以利用重组 DNA 技术领域公知的方法进行，如上述文章所述，在此引用作为参考。

可以利用多种不同的重组宿主细胞制备用于抗原或抗原决定簇附着的基于病毒的核心颗粒。例如，已知甲病毒具有较广的宿主谱；辛德毕斯病毒感染培养的哺乳动物、爬行动物和两栖动物细胞，以及某些昆虫细胞(Clark, H., J. Natl. Cancer Inst. 51:645 (1973); Leake, C., J. Gen. Virol. 35:335 (1977); Stollar, V.《披膜病毒》(The Togaviruses) R.W. Schlesinger 编著, Academic Press, (1980), pp. 583-621)。因此，有大量重组宿主细胞能够在本发明的实施中使用。BHK、COS、Vero、HeLa 和 CHO 细胞特别适于异源蛋白质的制备，因为它们能够以类似于人细胞的方式糖基化异源蛋白质(Watson, E.等人, Glycobiology 4:227 (1994))，并且能够被筛选(Zang, M.等人, Bio/Technology 13:389 (1995))或遗传改造(Renner W.等人, Biotech. Bioeng, 4:476 (1995); Lee K.等人, Biotech. Bioeng. 50:336 (1996))，以便在无血清培养基及悬液中生长。

向宿主细胞中引入多核苷酸载体能够用标准实验室手册所述的

方法实现(参见，例如：Sambrook, J.等人编著，《分子克隆：实验室手册》(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Habor, N.Y. (1989)，第 9 章；Ausubel, F.等人编著，《现代分子生物学方法》(Current Protocols in Molecular Biology)，John H. Wiley & Sons, Inc. (1997)，第 16 章)，包括如电穿孔、DEAE-葡聚糖介导的转染、转染、显微注射、阳离子脂介导的转染、转导、刮刀载入、冲击导入和感染等方法。向宿主细胞内导入外源 DNA 序列的方法在 Felgner, P. 等人的美国专利号 5,580,859 中有描述。

也可以用包装的 RNA 序列感染宿主细胞。通过将这些包装的 RNA 序列添加到培养基中而将它们导入宿主细胞内。例如，多篇文献资料中描述了非传染性甲病毒颗粒的制备，包括《辛德毕斯表达系统》(Sindbis Expression System)，C 版(Invitrogen 目录号 K750-1)。

当利用哺乳动物细胞作为重组宿主细胞生产基于病毒的核心颗粒时，这些细胞通常在组织培养基中培养。在培养基中培养细胞的方法在本领域中公知(参见，例如：Celis, J.编著，《细胞生物学》(Cell Biology)，Academic Press，第二版，(1998)；Sambrook, J.等人编著，《分子克隆：实验室手册》(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Habor, N.Y. (1989)；Ausubel, F.等人编著，《现代分子生物学方法》(Current Protocols in Molecular Biology)，John H. Wiley & Sons, Inc. (1997)；Freshney, R.,《动物细胞培养》(Culture of Animal Cells)，Alan R. Liss, Inc. (1983))。

在本发明中适于作为核心颗粒的 RNA 病毒的其它例子包括但不限于：呼肠孤病毒科的成员，包括正呼肠孤病毒属(哺乳动物和禽逆转录病毒的多个血清型)，环状病毒属(蓝舌病毒、Eugenangee 病毒、克米罗沃病毒、非洲马疫病毒和科罗拉多蜱热病毒)，轮状病毒属(人轮状病毒、内布拉斯加牛腹泻病毒、鼠轮状病毒、猿轮状病毒、牛或绵羊轮状病毒、禽轮状病毒)；小 RNA 病毒科，包括肠道病毒属(脊髓灰

质炎病毒，柯萨奇病毒A和B，人肠道孤(ECHO)病毒，甲、丙、丁、戊、庚型肝炎病毒，猿肠道病毒，鼠脑脊髓炎(ME)病毒，脊髓灰质炎病毒，牛肠道病毒，猪肠道病毒)，心肌病毒属(脑心肌炎病毒(EMC)，门戈病毒)，鼻病毒属(人鼻病毒，包括至少113个亚型；其它鼻病毒)，鹅口疮病毒属(口蹄疫病毒(FMDV))；杯状病毒科，包括猪水泡疹病毒、圣米格尔海狮病毒、猫小RNA病毒和诺瓦克病毒；披膜病毒科，包括甲病毒属(东方马脑炎病毒，塞姆利基森林病毒，辛德毕斯病毒，屈曲病毒，阿尼昂尼昂病毒，罗斯河病毒，委内瑞拉马脑炎病毒，西方马脑炎病毒)，黄病毒属(蚊传黄热病毒，登革热病毒，日本脑炎病毒，圣路易脑炎病毒，摩莱河谷脑炎病毒，西尼罗河病毒，库宁病毒，中欧蜱传脑炎，远东蜱传脑炎，科萨努尔森林病毒，跳跃病病毒，波沃森病毒，鄂木斯克出血热病毒)，风疹病毒属(风疹病毒)，瘟病毒属(粘膜病病毒，猪霍乱病毒，边界病病毒)；布亚病毒科，包括布亚病毒属(布尼亚维拉病毒及相关病毒，加利福尼亚脑炎病毒)，静脉病毒属(白蛉热西西里岛病毒，裂谷热病毒)，内罗病毒属(克里米亚-刚果出血热病毒，内罗毕羊疾病病毒)，乌库病毒属(Uukuniemi 病毒及相关病毒)；正粘病毒科，包括流感病毒属(甲型流感病毒，多种人亚型)，猪流感病毒，禽及马流感病毒，乙型流感(多个人亚型)，丙型流感(可能分离的属)；副粘液病毒科，包括副粘病毒属(1型副流感病毒，仙台病毒，血细胞吸附病毒，2-5型副流感病毒，新城疫病毒，腮腺炎病毒)，麻疹病毒属(麻疹病毒，亚急性硬化性全脑炎病毒，瘟热病毒，牛瘟病毒)，肺病毒属(呼吸道合胞体病毒(RSV)，牛呼吸道合胞体病毒和小鼠肺炎病毒)；森林病毒，辛德毕斯病毒，屈曲病毒，阿尼昂尼昂病毒，罗斯河病毒，委内瑞拉马脑炎病毒，西方马脑炎病毒)；黄病毒属(蚊传黄热病毒，登革热病毒，日本脑炎病毒，圣路易脑炎病毒，摩莱河谷脑炎病毒，西尼罗河病毒，库宁病毒，中欧蜱传脑炎，远东蜱传脑炎，科萨努尔森林病毒，跳跃病病毒，波沃森病毒，鄂木斯克出血热病毒)，风疹病毒属(风疹病毒)，瘟病毒属(粘膜病病毒，猪霍乱病毒，边界病病毒)；布亚病毒科，包括布亚病毒属(布尼亚维

拉病毒及相关病毒，加利福尼亚脑炎病毒），静脉病毒属（白蛉热西西里岛病毒，裂谷热病毒），内罗病毒属（克里米亚-刚果出血热病毒，内罗毕羊疾病病毒），乌库病毒属（Uukuniemi 病毒及相关病毒）；正粘病毒科，包括流感病毒属（甲型流感病毒，多个人亚型），猪流感病毒，禽及马流感病毒，乙型流感（多个人亚型），丙型流感（可能分离的属）；副粘液病毒科，包括副粘病毒属（1 型副流感病毒，仙台病毒，血细胞吸附病毒，2-5 型副流感病毒，新城疫病毒，腮腺炎病毒），麻疹病毒属（麻疹病毒，亚急性硬化性全脑炎病毒，瘟热病毒，牛瘟病毒），肺病毒属（呼吸道合胞体病毒（RSV），牛呼吸道合胞体病毒和小鼠肺炎病毒）；弹状病毒科，包括水泡性病毒属（VSV），钱迪普拉病毒，佛朗德-哈特公园病毒，狂犬病病毒属（狂犬病病毒），鱼弹状病毒，丝状病毒（马堡病毒和埃博拉病毒）；砂粒样病毒科，包括淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（LCM），塔卡里伯病毒复合物，拉萨病毒；冠状病毒科，包括传染性支气管炎病毒（IBV），小鼠肝炎病毒，人肠道冠状病毒，猫传染性腹膜炎病毒（猫冠状病毒）。

可以用作核心颗粒的 DNA 病毒的实例包括但不限于：痘病毒科，包括正痘病毒属（重型天花病毒、轻型天花病毒、猴痘病毒、牛痘病毒、水牛痘病毒、兔痘病毒、小鼠脱脚病病毒），野兔痘病毒属（粘液瘤病毒，纤维瘤病毒），禽痘病毒属（鸡痘病毒，其它禽痘病毒），羊痘病毒属（绵羊痘病毒，山羊痘病毒），猪痘病毒属（猪痘病毒），副痘病毒属（触染性脓疮性皮炎病毒，假牛痘病毒，牛丘疹性口炎病毒）；虹彩病毒科（非洲猪瘟病毒，蛙病毒 2 和 3，鱼淋巴囊肿病毒）；疱疹病毒科，包括α-疱疹病毒（1 型和 2 型单纯疱疹病毒，水痘-带状疱疹病毒，马流产病毒，马疱疹病毒 2 和 3，假狂犬病病毒，传染性牛角膜结膜炎病毒，传染性牛鼻气管炎病毒，猫鼻气管炎病毒，传染性喉气管炎病毒）和β-疱疹病毒（人巨细胞病毒和猪、猴、啮齿动物巨细胞病毒）；γ-疱疹病毒（EB 病毒（EBV），马雷克病病毒，松鼠猴疱疹病毒，蛛猴疱疹病毒，兔疱疹病毒，豚鼠疱疹病毒，勒克肿瘤病毒）；腺病毒科，包括乳腺病毒属（人 A、B、C、D、E 亚群和未分群的；猿腺病

毒(至少 23 个血清型)，传染性犬肝炎病毒，牛、猪、绵羊、蛙和其它许多种的腺病毒，禽腺病毒属(禽腺病毒)；不可培养的腺病毒；乳头多瘤空泡病毒科，包括乳头瘤病毒属(人乳头状瘤病毒，牛乳头瘤病毒，兔乳头瘤病毒，其它种的多种致病性乳头瘤病毒)，多瘤病毒属(多瘤病毒，猿猴空泡病毒(SV-40)，兔空泡病毒(RKV)，K 病毒，BK 病毒，JC 病毒，以及其它灵长类动物多瘤病毒，如亲淋巴乳头瘤病毒)；细小病毒科，包括腺伴随病毒属，细小病毒属(猫全血细胞减少症病毒，牛细小病毒，犬细小病毒，阿留申水貂病病毒等)。最后，DNA 病毒可包括如慢性传染性神经性病原体(CHINA 病毒)的病毒。

在其它实施方案中，细菌菌毛蛋白、细菌菌毛蛋白的亚部分，或含有细菌菌毛蛋白或其亚部分的融合蛋白，可以用来分别制备本发明的组成物和疫苗组合物。菌毛蛋白的例子包括下列细菌产生的菌毛蛋白：大肠杆菌、流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)、脑膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。适用于本发明的菌毛蛋白的氨基酸序列包括 GenBank 报告 AJ000636、AJ132364、AF229646、AF051814、AF051815 和 X00981 所述的序列，其完整内容在此引用作为参考。

细菌菌毛蛋白在输入细菌周质之前，通常被加工，除去 N 端前导序列。此外，本领域技术人员应当认识到，分别用来制备本发明的组成物和疫苗组合物的细菌菌毛蛋白通常不含天然存在的前导序列。

适用于本发明的菌毛蛋白的一个具体例子是大肠杆菌的 P-菌毛蛋白(GenBank 报告 AF237482 (SEQ ID NO: 1))。适用于本发明的大肠杆菌 1 型菌毛蛋白的一个例子是含有 GenBank 报告 P04128 所述氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)的菌毛蛋白，它由具有 GenBank 报告 M27603 所示核苷酸序列(SEQ ID NO: 3)的核酸编码。这些 GenBank 报告的完整公开内容在此引用作为参考。另外通常也用上述蛋白质的成熟形式分别制备本发明的组成物和疫苗组合物。

适于在本发明的实施中使用的细菌菌毛蛋白或菌毛蛋白亚部分通常能够结合形成有序、重复的抗原阵列。

在体外制备菌毛和菌毛样结构的方法在本领域公知。例如，Bullitt等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12890-12895 (1996)描述了大肠杆菌P-菌毛亚单位的体外重建。此外，Eshdat等人(J. Bacteriol. 148:308-314 (1981))也描述了适于裂解大肠杆菌1型菌毛和菌毛重建的方法。简言之，这些方法如下：通过在饱和盐酸胍中37℃孵育裂解菌毛。然后通过层析纯化菌毛蛋白，之后用5 mM tris(羟甲基)盐酸氨基甲烷(pH 8.0)透析，形成菌毛蛋白二聚体。Eshdat等人还发现，在用含有5 mM $MgCl_2$的5 mM 三(羟甲基)氨基甲烷(pH 8.0)透析后，菌毛蛋白二聚体重装配形成菌毛。

另外，例如使用常规基因工程和蛋白质修饰方法，可以修饰菌毛蛋白，使之含有第一附着位点，抗原或抗原决定簇通过第二附着位点与第一附着位点连接。此外，抗原或抗原决定簇也可以通过第二附着位点与这些蛋白质中天然存在的氨基酸残基直接连接。这些修饰的菌毛蛋白然后可以在本发明的疫苗组合物中使用。

分别用来制备本发明的组成物和疫苗组合物的细菌菌毛蛋白可以用类似于此处对于HBcAg所述的方法修饰。例如，可以将半胱氨酸和赖氨酸残基缺失或者置换为其它氨基酸残基，并且可以向这些蛋白质中添加第一附着位点。此外，菌毛蛋白也可以表达为修饰形式，或者可以在表达后化学修饰。类似地，也可以从细菌中收获完整的菌毛，然后化学修饰。

在另一个实施方案中，从细菌(例如大肠杆菌)中收获菌毛或菌毛样结构，用来形成本发明的组成物和疫苗组合物。适于制备组成物和疫苗组合物的一个例子是大肠杆菌1型菌毛，它由具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的菌毛蛋白单体构成。

本领域公知一些收获细菌菌毛的方法。例如，Bullitt和Makowski (Biophys. J. 74:623-632 (1998))描述了一种从大肠杆菌中收获P-菌毛的菌毛纯化方法。根据该方法，从含有P-菌毛质粒的多菌毛大肠

杆菌上剪切菌毛，通过溶解和 $MgCl_2$ (1.0 M)沉淀的循环纯化。

收获后，菌毛或菌毛样结构可用多种方法修饰。例如，可以向菌毛中添加第一附着位点，抗原或抗原决定簇可通过第二附着位点与之附着。换句话说，可以收获并修饰细菌菌毛或菌毛样结构，产生有序、重复的抗原阵列。

抗原或抗原决定簇能够与菌毛或菌毛样结构中天然存在的半胱氨酸残基或赖氨酸残基连接。在这些情况下，天然存在的氨基酸残基的高度有序和重复性将引导抗原或抗原决定簇与菌毛或菌毛样结构偶联。例如，使用异双功能交联剂，菌毛或菌毛样结构能够与抗原或抗原决定簇的第二附着位点连接。

当利用生物天然合成的结构(例如菌毛)制备本发明的组成物和疫苗组合物时，遗传工程改造这些生物使它们产生具有希望的特征的结构通常是有利的。例如，当使用大肠杆菌 1 型菌毛时，可以修饰从中收获菌毛的大肠杆菌，使之产生具有特定特征的结构。可能的菌毛蛋白修饰的例子包括插入一个或多个赖氨酸残基、缺失或置换一个或多个天然存在的赖氨酸残基、缺失或置换一个或多个天然存在的半胱氨酸残基(例如 SEQ ID NO: 2 中位点 44 和 84 处的半胱氨酸残基)。

另外也可以对菌毛蛋白基因进行其它修饰，产生含有并非赖氨酸残基的第一附着位点的表达产物(例如 *FOS* 或 *JUN* 域)。当然，合适的第一附着位点通常仅限于不妨碍菌毛蛋白形成适于在本发明的疫苗组合物中使用的菌毛或菌毛样结构的位点。

可以在体内修饰(例如通过同源重组)细菌细胞中天然存在的菌毛蛋白基因，或者可以将具有特定特征的菌毛蛋白基因插入这些细胞内。例如，可以将菌毛蛋白基因导入细菌细胞中，作为复制型克隆载体或插入细菌染色体内的载体的一种组分。插入的菌毛蛋白基因也可以与表达调节控制序列(例如 *lac* 操纵基因)连接。

在大多数情况下，在本发明的组成物和疫苗组合物中使用的菌毛或菌毛样结构分别由单一类型的菌毛蛋白亚单位构成。通常使用由相同亚单位组成的菌毛或菌毛样结构，因为预期它们能够形成表现为高

度有序、重复抗原阵列的结构。

然而，本发明的组合物也包括包含由不同菌毛蛋白亚单位构成的菌毛或菌毛样结构的组成物和疫苗。形成这些菌毛或菌毛样结构的菌毛蛋白亚单位可以由细菌细胞中天然存在的基因表达，或者由导入细胞内的基因表达。当天然存在的菌毛蛋白基因和导入的基因都在形成菌毛或菌毛样结构的细胞中表达时，结果通常是由这些菌毛蛋白的混合物形成的结构。此外，当两种或多种菌毛蛋白基因在一种细菌细胞中表达时，每种菌毛蛋白基因的相对表达通常是决定菌毛或菌毛样结构中不同菌毛蛋白亚单位比例的因素。

当希望获得具有混合菌毛蛋白亚单位特定组成的菌毛或菌毛样结构时，至少一种菌毛蛋白基因的表达可以由一种异源诱导型启动子调节。这些启动子以及其它基因元件可以用来调节细菌细胞中产生的不同菌毛蛋白亚单位的相对含量，从而调节菌毛或菌毛样结构的组成。

另外，抗原或抗原决定簇也能通过并非肽键的键与细菌菌毛或菌毛样结构连接，在本发明的组成物中使用的产生菌毛或菌毛样结构的细菌细胞能够被基因改造，产生与抗原或抗原决定簇融合的菌毛蛋白。形成菌毛或菌毛样结构的这类融合蛋白适于在本发明的疫苗组合物中使用。

本申请中的病毒样颗粒指类似于病毒颗粒但是不致病的结构。病毒样颗粒通常缺乏病毒基因组，因此是非传染性的。病毒样颗粒也能通过异源表达大量生产，并且易于纯化。

在一个优选实施方案中，核心颗粒是一种病毒样颗粒，并且该病毒样颗粒是一种重组病毒样颗粒。熟练技术人员能够利用重组 DNA 技术和公众易于获得的病毒编码序列生产 VLP。例如，为了在病毒启动子的调节控制下利用可以作为商品获得的杆状病毒载体表达，可以改造病毒包膜或核心蛋白的编码序列，对序列进行适当修饰，以使该编码序列与调节序列功能性连接。例如，为了在细菌表达载体中表达，也可以改造病毒包膜或核心蛋白的编码序列。

VLP的例子包括但不限于:乙型肝炎病毒(Ulrich等人, Virus Res. 50:141-182 (1998))、麻疹病毒(Warnes 等人, Gene 160:173-178 (1995))、辛德毕斯病毒、轮状病毒(美国专利号 5,071,651 和 5,374,426)、口蹄疫病毒(Twomey 等人, Vaccine 13:1603-1610 (1995))、诺瓦克病毒(Jiang, X.等人, Science 250:1580-1583 (1990); Matsui, S.M.等人, J. Clin. Invest. 87:1456-1461 (1991))的衣壳蛋白,逆转录病毒GAG蛋白(WO 96/30523),逆转录转座子Ty蛋白p1,乙型肝炎病毒(WO 92/11291)、人乳头瘤病毒(WO 98/15631)、RNA噬菌体、Ty、fr-噬菌体、GA-噬菌体和Qβ-噬菌体的表面蛋白。

本领域技术人员应当理解,本发明的VLP不限于任何具体形式。该颗粒可以被化学合成或通过生物学方法生产,可以是天然的或是非天然的。例如,这类实施方案包括病毒样颗粒或其重组形式。

在一个更具体的实施方案中,VLP可包含或者基本由或者由选自下列的重组多肽或其片段组成:重组轮状病毒多肽,重组诺瓦克病毒多肽,重组甲病毒多肽,重组口蹄疫病毒多肽,重组麻疹病毒多肽,重组辛德毕斯病毒多肽,重组多瘤病毒多肽,重组逆转录病毒多肽,重组乙型肝炎病毒多肽(例如HBcAg),重组烟草花叶病毒多肽,重组禽兽棚病毒多肽,重组人乳头瘤病毒多肽,重组噬菌体多肽,重组RNA噬菌体多肽,重组Ty多肽,重组fr-噬菌体多肽,重组GA-噬菌体多肽和重组Qβ-噬菌体多肽。病毒样颗粒还可以进一步包含或者基本由或者由这些多肽的一种或多种片段以及这些多肽的变体组成。多肽的变体与其野生型对应物在氨基酸水平上例如具有至少80%、85%、90%、95%、97%或99%的同一性。

在一个优选实施方案中,病毒样颗粒包含、基本由或者由RNA噬菌体的重组蛋白或其片段组成。优选地,RNA噬菌体选自:a)噬菌体Qβ; b)噬菌体R17; c)噬菌体fr; d)噬菌体GA; e)噬菌体SP; f)噬菌体MS2; g)噬菌体M11; h)噬菌体MX1; i)噬菌体NL95; k)噬菌体f2; l)噬菌体PP7; 和m)噬菌体AP205。

在本发明的另外一个优选实施方案中,该病毒样颗粒包含、基本

由或者由 RNA 噬菌体 Qβ或 RNA 噬菌体 fr 或 RNA 噬菌体 AP205 的重组蛋白或其片段组成。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，重组蛋白包含、基本由或者由 RNA 噬菌体的外壳蛋白组成。

因此，构成衣壳或 VLP 的 RNA 噬菌体外壳蛋白，或者适于自装配为衣壳或 VLP 的噬菌体外壳蛋白的片段，是本发明的进一步优选的实施方案。例如，噬菌体 Qβ外壳蛋白能够在大肠杆菌中重组表达。进而，这些蛋白质在表达后自发形成衣壳。另外，这些衣壳也能形成具有固有重复组织的结构。

能够用来制备本发明的组成物的噬菌体外壳蛋白的具体优选实例包括如下 RNA 噬菌体的外壳蛋白：噬菌体 Qβ(SEQ ID NO: 4; PIR 数据库，登录号 VCBPQβ 指 Qβ CP，和 SEQ ID NO: 5; 登录号 AAA16663 指 Qβ A1 蛋白)，噬菌体 R17(SEQ ID NO: 6; PIR 登录号 VCBPR7)，噬菌体 fr(SEQ ID NO: 7; PIR 登录号 VCBPFR)，噬菌体 GA(SEQ ID NO: 8; GenBank 登录号 NP-040754)，噬菌体 SP(SEQ ID NO: 9; GenBank 登录号 CAA30374 指 SP CP，和 SEQ ID NO: 10; 登录号 NP 695026 指 SP A1 蛋白)，噬菌体 MS2(SEQ ID NO: 11; PIR 登录号 VCBPM2)，噬菌体 M11(SEQ ID NO: 12; GenBank 登录号 AAC06250)，噬菌体 MX1(SEQ ID NO: 13; GenBank 登录号 AAC14699)，噬菌体 NL95(SEQ ID NO: 14; GenBank 登录号 AAC14704)，噬菌体 f2(SEQ ID NO: 15; GenBank 登录号 P03611)，噬菌体 PP7(SEQ ID NO: 16)，噬菌体 AP205 (SEQ ID NO: 28)。此外，噬菌体 Qβ 的 A1 蛋白(SEQ ID NO: 5)或 C 端丢失多达 100、150 或 180 个氨基酸的 C 端截短形式可能掺入 Qβ 外壳蛋白的衣壳装配体中。为了确保衣壳形成，通常限制衣壳装配体中 A1 蛋白相对于 Qβ CP 的百分比。

也发现 Qβ 外壳蛋白当在大肠杆菌中表达时自装配为衣壳(Kozlovska TM. 等人, GENE 137: 133-137 (1993))。获得的衣壳或病毒样颗粒显示二十面体噬菌体样衣壳结构，其直径为 25 nm，T=3 半对称。此外，噬菌体 Qβ 的晶体结构已经解析。该衣壳含有 180 个外

壳蛋白拷贝，它们通过二硫键连接成共价五聚体和六聚体(Golmohammadi R.等人，Structure 4:543-5554 (1996))，使Qβ外壳蛋白的衣壳具有显著的稳定性。然而，由重组Qβ外壳蛋白构成的衣壳或VLP可能含有与衣壳内的其它亚单位不是通过二硫键连接或者不完全连接的亚单位。然而，在VLP内一般有超过约80%的亚单位彼此通过二硫键连接。因此，在重组Qβ衣壳加样到非还原性SDS-PAGE上之后，可见对应于单体Qβ外壳蛋白的带以及对应于Qβ外壳蛋白五聚体或六聚体的带。不完全二硫键连接的亚单位在非还原性SDS-PAGE中能够表现为二聚体、三聚体乃至四聚体带。Qβ衣壳蛋白也显示对有机溶剂和变性剂的不同寻常的抗性。我们惊奇地发现，高至30%的DMSO和乙腈浓度和高至1M的胍盐浓度不影响衣壳的稳定性。Qβ外壳蛋白的衣壳的高稳定性是一个有利的特征，特别是对于根据本发明免疫和接种哺乳动物和人的用途来说。

在大肠杆菌中表达后，Qβ外壳蛋白的N端甲硫氨酸通常被除去，这可以通过如Stoll, E.等人，J. Biol. Chem. 252:990-993 (1977)所述的N端Edman测序观察到。本发明的范围内也包括由未去除N端蛋氨酸的Qβ外壳蛋白组成的VLP，或者含有N端蛋氨酸已被切除或仍然存在的Qβ外壳蛋白混合物的VLP。

根据本发明进一步优选的RNA噬菌体，特别是Qβ的病毒样颗粒在WO 02/056905中公开，其公开内容在此全文引用作为参考。

其它一些RNA噬菌体外壳蛋白在细菌宿主中表达后也显示自装配(Kastelein, RA等人，Gene 23:245-254 (1983)，Kozlovskaya, TM.等人，Dokl. Akad. Nauk SSSR 287:452-455 (1986)，Adhin, MR.等人，Virology 170:238-242 (1989)，Ni, CZ.等人，Protein Sci. 5:2485-2493 (1996)，Priano, C.等人，J. Mol. Biol. 249:283-297 (1995))。Qβ噬菌体衣壳除了外壳蛋白外还含有所谓的连读蛋白A1和成熟蛋白A2。A1通过在UGA终止密码子处抑制而产生，长度为329个氨基酸。本发明中使用的噬菌体Qβ重组外壳蛋白的衣壳缺乏A2裂解蛋白，而含有来自宿主的RNA。RNA噬菌体的外壳蛋白是一种RNA

结合蛋白，与复制酶基因的核糖体结合位点的茎环相互作用，作为病毒生命周期中的一种翻译抑制物。这种相互作用的序列和结构元件已知(Witherell, GW. & Uhlenbeck, OC. Biochemistry 28:71-76 (1989); Lim F.等人, J. Biol. Chem. 271:31839-31845 (1996))。已知这种茎环和 RNA 通常参与病毒装配(Golmohammadi, R.等人, Structure 4:543-5554 (1996))。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，病毒样颗粒包含或者基本由或者由 RNA 噬菌体的重组蛋白或其片段组成，其中该重组蛋白包含、基本由或者由 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白，优选地由上述 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白组成。在另外一个优选实施方案中，通过置换除去至少一个或者至少两个赖氨酸残基，或者通过置换添加至少一个赖氨酸残基，修饰 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白；此外，也能通过缺失至少一个或者至少两个赖氨酸残基，或者通过插入添加至少一个赖氨酸残基，修饰 RNA 噬菌体的突变外壳蛋白。缺失、置换或添加至少一个赖氨酸残基可以改变偶联程度，即每个 RNA 噬菌体 VLP 亚单位的 Aβ1-6 肽的量，特别是用来匹配和适应疫苗的要求。

在另外一个优选实施方案中，病毒样颗粒包含、基本由或者由 RNA 噬菌体 Qβ 的重组蛋白或其片段组成，其中该重组蛋白包含、基本由或者由下列成分组成：具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的外壳蛋白，或具有 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的外壳蛋白的混合物，或 SEQ ID NO:5 的突变体，其中 N 端甲硫氨酸优选地被切除。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，病毒样颗粒包含、基本由或者由 Qβ 的重组蛋白或其片段组成，其中该重组蛋白包含、基本由或者由突变 Qβ 外壳蛋白组成。在另外一个优选实施方案中，通过置换去除至少一个赖氨酸残基，或者通过置换添加至少一个赖氨酸残基，修饰这些突变外壳蛋白。或者，也可以通过缺失至少一个赖氨酸残基，或者通过插入添加至少一个赖氨酸残基，修饰这些突变外壳蛋白。

有 4 个赖氨酸残基暴露于 Qβ 外壳蛋白的衣壳表面。本发明也可

以使用以精氨酸替换暴露的赖氨酸残基的 Qβ 突变体。在本发明的实施中能够使用下列 Qβ 外壳蛋白突变体和突变 Qβ VLP：“Qβ-240”(Lys13-Arg; SEQ ID NO: 17)，“Qβ-243”(Asn 10-Lys; SEQ ID NO: 18)，“Qβ-250”(Lys 2-Arg，Lys13-Arg；SEQ ID NO: 19)，“Qβ-251”(SEQ ID NO: 20)和“Qβ-259”(Lys 2-Arg，Lys16-Arg; SEQ ID NO: 21)。因此，在本发明的进一步优选的实施方案中，病毒样颗粒包含、基本由或者由突变 Qβ 外壳蛋白的重组蛋白组成，其包含具有选自下列的氨基酸序列的蛋白质: a) SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列; b) SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列; c) SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列; d) SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列; e) SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列。上述 Qβ 外壳蛋白、突变 Qβ 外壳蛋白 VLP 和衣壳的构建、表达和纯化分别在 WO 02/056905 中描述。具体参照上述申请的实施例 18。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，病毒样颗粒包含或者基本由或者由 Qβ 的重组蛋白或其片段组成，其中该重组蛋白包含、基本由或者由上述 Qβ 突变体之一和相应 A1 蛋白的混合物组成。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，病毒样颗粒包含或者基本由或者由 RNA 噬菌体 AP205 的重组蛋白或其片段组成。

AP205 基因组由成熟蛋白质、外壳蛋白、复制酶和相关噬菌体中不存在的两个开放阅读框组成；裂解基因和开放阅读框在成熟基因的翻译中起作用 (Klovins, J. 等人, J. Gen. Virol. 83:1523-33 (2002))。AP205 外壳蛋白可以由质粒 pAP283-58 (SEQ ID NO: 27) 表达，该质粒是 pQb10 的衍生物 (Kozlovska, T.M. 等人, Gene 137:133-37 (1993))，含有一个 AP205 核糖体结合位点。此外，AP205 外壳蛋白也可以被克隆到 pQb185 内，位于载体中核糖体结合位点的下游。这两种方法都导致蛋白质的表达和衣壳的形成，如本申请人于 2002 年 7 月 17 日提交的标题为“分子抗原阵列”的共同未决的美国临时专利申请所述，在此全文引用作为参考。载体 pQb10 和 pQb185 是由 pGEM 载体衍生的载体，克隆基因在这些载体中的表达受 *trp* 启动子控制 (Kozlovska, T.M. 等人, Gene 137:133-37 (1993))。质粒

pAP283-58(SEQ ID NO: 27)在下列序列中包含一个推断的 AP205 核糖体结合位点，位于 AP205 外壳蛋白的 XbaI 位点下游和 ATG 起始密码子的直接上游：tctagaATTTTCTGCGCACCCATCCCGGGTGGCGCCCAAA-GTGAGGAAAATCACatg(SEQ ID NO: 57)。载体 pQb185 在 XbaI 位点下游和起始密码子上游包含一个 SD 序列(tctagaTTAACCCAACGCGTAGGAGTCAGGCCatg，(SEQ ID NO: 58)，SD 序列以下划线标出)。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，病毒样颗粒包含或者基本由或者由 RNA 噬菌体 AP205 的重组外壳蛋白或其片段组成。

本发明的这一优选实施方案包含可构成衣壳的 AP205 外壳蛋白。这些蛋白质是重组表达或从天然来源制备。电子显微镜检查(EM)和免疫扩散证实，在细菌中产生的 AP205 外壳蛋白自发形成衣壳。在 EM 中可见，AP205 外壳蛋白(SEQ ID NO: 28)形成的衣壳与 AP205 RNA 噬菌体外壳蛋白形成的衣壳的结构特征几乎无法区别。AP205 VLP 具有高度免疫原性，能够与抗原和/或抗原决定簇连接，产生展示以重复方式定向的抗原和/或抗原决定簇的疫苗构建体。能够产生针对这样展示的抗原的高滴度抗体，表明结合的抗原和/或抗原决定簇能够与抗体分子相互作用，并且具有免疫原性。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，病毒样颗粒包含或者基本由或者由 RNA 噬菌体 AP205 的重组突变外壳蛋白或其片段组成。

AP205 VLP 的可装配突变形式，包括第 5 位氨基酸脯氨酸被置换为苏氨酸的 AP205 外壳蛋白(SEQ ID NO: 29)，也可以在本发明的实施中使用，形成本发明的一个进一步优选的实施方案。这些 VLP、来自天然来源的 AP205 VLP 或 AP205 病毒颗粒可以与抗原结合，产生本发明的有序、重复的抗原阵列。

AP205 P5-T 突变外壳蛋白可以由质粒 pAP281-32(SEQ ID NO: 30)表达，该质粒由 pQb185 直接衍生，含有突变 AP205 外壳蛋白基因而不是 Qβ 外壳蛋白基因。为了表达 AP205 外壳蛋白，用表达 AP205 外壳蛋白的载体转染大肠杆菌。

分别表达外壳蛋白和突变外壳蛋白、导致自装配为 VLP 的方法，在实施例 20 和 21 中描述。合适的大肠杆菌株包括但不限于：大肠杆菌 K802、JM 109、RR1。合适的载体和菌株及其组合可以如下鉴定：通过 SDS-PAGE 分别检测外壳蛋白和突变外壳蛋白的表达，如下鉴定衣壳的形成和装配：任选地首先通过凝胶过滤纯化衣壳，随后用免疫扩散试验(Ouchterlony 试验)或电子显微镜检查(Kozlovska, T.M.等人, Gene 137:133-137 (1993))检测。

由载体 pAP283-58 和 pAP281-32 表达的 AP205 外壳蛋白由于在大肠杆菌细胞质中加工，可能缺乏初始的甲硫氨酸。AP205 VLP 的切割形式、未切割形式或其混合物是本发明的进一步优选的实施方案。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，病毒样颗粒包含或者基本由或者由 RNA 噬菌体 AP205 的重组外壳蛋白或其片段和 RNA 噬菌体 AP205 的重组突变外壳蛋白或其片段的混合物组成。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，病毒样颗粒包含或者基本由或者由 RNA 噬菌体 AP205 的重组外壳蛋白或重组突变外壳蛋白的片段组成。

在本发明的实施中也可以使用能够分别装配为 VLP 和衣壳的重组 AP205 外壳蛋白片段。这些片段可以通过分别在外壳蛋白和突变外壳蛋白的内部或末端删除产生。适合装配为 VLP 的向外壳蛋白和突变外壳蛋白序列中的插入或者抗原序列与外壳蛋白和突变外壳蛋白序列的融合，是本发明的另外的实施方案，分别产生嵌合 AP205 外壳蛋白和颗粒。插入、缺失以及与外壳蛋白序列融合的结果，以及是适合装配为 VLP，能够通过电子显微镜检查确定。

由上述 AP205 外壳蛋白、外壳蛋白片段和嵌合外壳蛋白形成的颗粒能够分离为纯化形式，分离方法是联合使用利用沉淀的分级分离步骤和利用凝胶过滤的纯化步骤，例如使用 Sepharose CL-4B、Sepharose CL-2B、Sepharose CL-6B 柱及其组合，分离病毒样颗粒的其它一些方法在本领域公知，可以用来分离噬菌体 AP205 的病毒样颗粒(VLP)。例如，美国专利号 4,918,166 描述了利用超速离心分离酵

母逆转录转座子 Ty 的 VLP，在此全文引用作为参考。

几种 RNA 噬菌体的晶体结构已经被测定(Golmohammadi, R. 等人, Structure 4:543-554 (1996))。利用这些信息，可以鉴定表面暴露的残基，并修饰 RNA 噬菌体外壳蛋白，使得通过插入或置换可以插入一个或多个反应性氨基酸残基。因此，噬菌体外壳蛋白的这些修饰形式也可以用于本发明。因此，也可以利用形成衣壳或衣壳样结构的蛋白质变体(例如噬菌体 Qβ、噬菌体 R17、噬菌体 fr、噬菌体 GA、噬菌体 SP、噬菌体 MS2 和噬菌体 AP 205 的外壳蛋白)制备本发明的组成物。

尽管上述变异蛋白质的序列与其野生型不同，但是这些变异蛋白质通常保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。因此，本发明还包括：进一步包含可形成衣壳或衣壳样结构的蛋白质变体的组成物和疫苗组合物，以及分别制备这些组成物和疫苗组合物的方法，用来制备这些组成物的各种蛋白质亚单位，和编码这些蛋白质亚单位的核酸分子。因此，本发明的范围内包括野生型蛋白质的变体形式，它们可形成衣壳或衣壳样结构，保留结合并形成衣壳或衣壳样结构的能力。

因此，本发明还包括分别含有如下蛋白质的组成物和疫苗组合物，该蛋白质包含或者基本由或者由与野生型蛋白质至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%相同的氨基酸序列组成，它们分别可形成有序的阵列，具有固有的重复结构。

本发明的范围内还包括编码用来制备本发明组成物的蛋白质的核酸分子。

在其它实施方案中，本发明还包括含有如下蛋白质的组成物，该蛋白质包含或者基本由或者由与 SEQ ID NO:4-21 所示任何一种氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%相同的氨基酸序列组成。

适用于本发明的蛋白质也包括可形成衣壳或衣壳样结构或 VLP 的蛋白质的 C 端截短突变体。这类截短突变体的具体例子包括具有 SEQ ID NO:4-21 任一所示氨基酸序列的蛋白质，其中已经从 C 端除去 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸。这些 C 端截短突变体一般保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。

适用于本发明的其它蛋白质也包括可形成衣壳或衣壳样结构的蛋白质的N端截短突变体。这类截短突变体的具体例子包括具有SEQ ID NO:4-21任一所示氨基酸序列的蛋白质，其中已经从N端除去1、2、5、7、9、10、12、14、15或17个氨基酸。这些N端截短突变体一般保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。

适用于本发明的其它蛋白质包括可形成衣壳或衣壳样结构的N端和C端截短突变体。合适的截短突变体包括具有SEQ ID NO:4-21任一所示氨基酸序列的蛋白质，其中已经从N端除去1、2、5、7、9、10、12、14、15或17个氨基酸，从C端除去1、2、5、7、9、10、12、14、15或17个氨基酸。这些N端和C端截短突变体一般保留形成衣壳或衣壳样结构的能力。

本发明还包括含有如下蛋白质的组成物，这些蛋白质包含或者基本由或者由与上述截短突变体至少80%、85%、90%、95%、97%或99%相同的氨基酸序列组成。

因此，本发明包括由可形成衣壳或VLP的蛋白质制备的组成物和疫苗组合物，由各种蛋白质亚单位和VLP或衣壳制备这些组成物的方法，制备这些蛋白质亚单位的方法，编码这些亚单位的核酸分子，以及利用本发明的这些组成物接种个体和/或引发免疫应答的方法。

在一个实施方案中，本发明提供一种疫苗组合物，其进一步含有佐剂。在另外一个实施方案中，疫苗组合物不含佐剂。在本发明的另一个实施方案中，疫苗组合物含有本发明的核心颗粒，其中该核心颗粒包含、优选地是病毒样颗粒，其中优选地所述病毒样颗粒是重组病毒样颗粒。优选地，病毒样颗粒包含或者基本由或者由下列成分组成：RNA噬菌体的重组蛋白或其片段，优选RNA噬菌体外壳蛋白的重组蛋白或其片段。在一个优选实施方案中，RNA噬菌体的外壳蛋白具有选自下列的氨基酸：(a) SEQ ID NO:4；(b) SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的混合物；(c) SEQ ID NO:6；(d) SEQ ID NO:7；(e) SEQ ID NO:8；(f) SEQ ID NO:9；(g) SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的混合物；(h) SEQ ID NO:11；(i) SEQ ID NO:12；(k) SEQ ID NO:13；(l) SEQ ID

NO:14; (m) SEQ ID NO:15; (n) SEQ ID NO:16; (o) SEQ ID NO:28。此外，本发明疫苗组合物的病毒样颗粒的重组蛋白包含或者基本由或者由RNA噬菌体的突变外壳蛋白组成，其中该RNA噬菌体选自：(a)噬菌体Qβ; (b)噬菌体R17; (c)噬菌体fr; (d)噬菌体GA; (e)噬菌体SP; (f)噬菌体MS2; (g)噬菌体M11; (h)噬菌体MX1; (i)噬菌体NL95; (k)噬菌体f2; (l)噬菌体PP7; 和(m)噬菌体AP205。

在一个优选实施方案中，通过去除，或者通过置换添加至少一个赖氨酸残基，修饰所述RNA噬菌体的突变外壳蛋白。在另外一个优选实施方案中，通过缺失至少一个赖氨酸残基，或者通过插入添加至少一个赖氨酸残基，修饰所述RNA噬菌体的突变外壳蛋白。在一个优选实施方案中，病毒样颗粒含有RNA噬菌体Qβ或RNA噬菌体fr或RNA噬菌体AP205的重组蛋白或其片段。

如前所述，本发明包括病毒样颗粒或其重组形式。在一个进一步优选的实施方案中，在本发明组成物中使用的颗粒包含乙型肝炎核心蛋白(HBcAg)或HBcAg的片段。在另外一个实施方案中，在本发明组成物中使用的颗粒包含下述乙型肝炎核心蛋白(HBcAg)或HBcAg的片段，它们经过修饰除去或减少了游离半胱氨酸残基的数量。Zhou等人(J. Virol. 66:5393-5398 (1992))证实，修饰后除去天然存在的半胱氨酸残基的HBcAg保留结合并形成衣壳的能力。因此，适于在本发明组成物中使用的VLP包括那些包含修饰的HBcAg或其片段的VLP，其中一个或多个天然存在的半胱氨酸残基已经缺失或者被替换为另一种氨基酸残基(例如丝氨酸残基)。

HBcAg是通过加工乙型肝炎核心抗原前体蛋白产生的一种蛋白质。HBcAg的一些同种型已经被鉴定，本领域技术人员能够容易地获得其氨基酸序列。在大多数情况下，本发明的组成物和疫苗组合物分别用HBcAg的加工形式(即已经除去乙型肝炎核心抗原前体蛋白的N端前导序列的HBcAg)制备。

另外，当在不发生加工的条件下制备HBcAg时，HBcAg通常以“加工的”形式表达。例如，当利用将蛋白质表达定向于细胞质的大肠杆

菌表达系统制备本发明的 HBcAg 时，表达的这些蛋白质通常不含乙型肝炎核心抗原前体蛋白的 N 端前导序列。

可以用于本发明的乙型肝炎病毒样颗粒的制备在下列专利中公开，例如：WO 00/32227，具体见实施例 17-19 和 21-24，以及 WO 01/85208，具体见实施例 17-19、21-24、31 和 41，和 WO 02/056905。最后一个申请具体参照实施例 23、24、31 和 51。全部这三篇文献在此均引用作为参考。

本发明还包括经修饰后缺失或置换了一个或多个其它半胱氨酸残基的 HBcAg 变体。本领域公知，游离半胱氨酸残基能够参与一些化学副反应。这些副反应包括二硫键交换，与例如在与其它物质联合治疗中注射或形成的化学物质或代谢物反应，或暴露于紫外线后的直接氧化以及与核苷酸的反应。因而可能产生毒性加合物，特别是考虑到 HBcAg 具有结合核酸的强烈倾向。毒性加合物以多种种类分布，它们单个均以低浓度存在，但同时存在时达到毒性水平。

鉴于上述，在疫苗组合物中使用经修饰除去天然存在的半胱氨酸残基的 HBcAg 的一个优点是，当抗原或抗原决定簇附着时，毒性物质能够结合的位点数量减少或者完全消失。

适用于实施本发明的一些天然存在的 HBcAg 变体已经被鉴定。例如，Yuan 等人(J. Virol. 73:10122-10128 (1999))描述了在对应于 SEQ ID NO:22 中位点 97 的位点处异亮氨酸残基被置换为亮氨酸残基或苯丙氨酸残基的变体。一些 HBcAg 变体以及几种乙型肝炎核心抗原前体变体的氨基酸序列在下列 GenBank 报告中公开：AAF121240、AF121239、X85297、X02496、X85305、X85303、AF151735、X85259、X85286、X85260、X85317、X85298、AF043593、M20706、X85295、X80925、X85284、X85275、X72702、X85291、X65258、X85302、M32138、X85293、X85315、U95551、X85256、X85316、X85296、AB033559、X59795、X85299、X85307、X65257、X85311、X85301(SEQ ID NO:23)、X85314、X85287、X85272、X85319、AB010289、X85285、AB010289、AF121242、M90520(SEQ ID NO:24)、P03153、AF110999 和 M95589，其公开内容均在此引用作

为参考。上述乙型肝炎核心抗原前体变体的序列还在 WO 01/85208 中的 SEQ ID NO:89-138 中公开。这些 HBcAg 变体在氨基酸序列多个位点处不同，包括对应于位于 SEQ ID NO:25 中位点 12、13、21、22、24、29、32、33、35、38、40、42、44、45、49、51、57、58、59、64、66、67、69、74、77、80、81、87、92、93、97、98、100、103、105、106、109、113、116、121、126、130、133、135、141、147、149、157、176、178、182 和 183 处的氨基酸残基。在 WO 00/198333、WO 00/177158 和 WO 00/214478 中描述了适于在本发明组成物中使用，并且可根据本申请书公开内容进一步修饰的其它一些 HBcAg 变体。

如上所述，本发明组成物和疫苗组合物中分别使用一般为加工的 HBcAg(即缺乏前导序列的)。本发明包括使用上述变体 HbcAg 的疫苗组合物，以及使用这些组合物的方法。

一种多肽是否具有与上述野生型氨基酸序列之一或其亚部分至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%相同的氨基酸序列，可以利用公知的计算机程序如 Bestfit 程序常规测定。当利用 Bestfit 或其它任何序列比对程序确定一种具体序列与参照氨基酸序列是否例如 95%相同时，参数设置为在参照氨基酸序列的全长计算同一性百分数，并且使同源性缺口可达参照序列中氨基酸残基总数的 5%。

上述 HBcAg 变体和前体的氨基酸序列彼此相对地相似。因此，HBcAg 变体中位于对应于 SEQ ID NO:25 中特定位点的位点处的氨基酸残基，指在 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列中该位点处的氨基酸残基。在感染哺乳动物的乙型肝炎病毒之间，这些 HBcAg 变体之间的同源性在很大程度上足够高，使得本领域技术人员不难验证分别如 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列，以及一种具体 HBcAg 变体的氨基酸序列，并鉴定“相应的”氨基酸残基。此外，SEQ ID NO:24 所示的 HBcAg 氨基酸序列，显示来源于感染土拨鼠的病毒的 HBcAg 的氨基酸序列，与含有 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列的 HBcAg 有足够的同源性，显然在 SEQ ID NO:23 中存在 3 个氨基酸残基的插入，位于 SEQ ID NO:25 的氨基酸残基 155 与 156 之间。

本发明还包括包含感染鸟类的乙型肝炎病毒的HBcAg变体的疫苗组合物，以及包含这些 HBcAg 变体的片段的疫苗组合物。对于这些 HBcAg 变体，在应用到本发明的疫苗组合物中之前，这些多肽中天然存在的 1、2、3 个或更多的半胱氨酸残基可被置换为另外一种氨基酸残基或者缺失。

如上所述，去除游离半胱氨酸残基减少了毒性成分能够与 HBcAg 结合的位点数，也除去了相同或相邻 HBcAg 分子的赖氨酸与半胱氨酸残基交联的位点。因此，在本发明的另一个实施方案中，乙型肝炎病毒衣壳蛋白的一个或多个半胱氨酸残基缺失或者被替换为另一种氨基酸残基。

在其它实施方案中，本发明的组成物和疫苗组合物分别含有已经除去 C 端区(例如 SEQ ID NO: 25 的氨基酸残基 145-185 或 150-185)的 HBcAg。因此，适于在实施本发明中使用的其它修饰的 HBcAg 包括 C 端截短突变体。合适的截短突变体包括已经从 C 端除去 1、5、10、15、20、25、30、34、35 个氨基酸的 HBcAg。

适于在实施本发明中使用的 HBcAg 还包括 N 端截短突变体。合适的截短突变体包括已经从 N 端除去 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸的修饰 HBcAg。

适于在实施本发明中使用的HBcAg还包括N端和C端截短突变体。合适的截短突变体包括已经从 N 端除去 1、2、5、7、9、10、12、14、15 或 17 个氨基酸并且从 C 端除去 1、5、10、15、20、25、30、34、35 个氨基酸的 HBcAg。

本发明还包括包含具有以下特征的HBcAg多肽的组成物和疫苗组合物，该多肽包含或者基本由或者由与上述截短突变体至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%相同的氨基酸序列组成。

在本发明的某些实施方案中，向 HBcAg 多肽内引入一个赖氨酸残基，以介导 ghrelin 或 ghrelin 肽与 HBcAg VLP 的结合。在优选实施方案中，用一种具有以下特征的 HBcAg 制备本发明的组成物，该 HBcAg 包含或者由 SEQ ID NO: 25 的氨基酸 1-144 或 1-149、1-185 组成，它

经过修饰，使得对应于位点 79 和 80 的氨基酸被替换为具有氨基酸序列 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33) 的肽，产生具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 26 的 HBcAg 变体。在进一步优选的实施方案中，SEQ ID NO: 25 的位点 48 和 107 处的半胱氨酸残基突变为丝氨酸。本发明还包括包含具有以下特征的相应多肽的组成物，该多肽具有上述任一乙型肝炎核心抗原前体变体所示的氨基酸序列，也有上述氨基酸改变。本发明的范围内还包括能够结合形成衣壳或 VLP 并且具有上述氨基酸改变的其它 HBcAg 变体。因此，本发明还包括分别包含具有以下特征的 HBcAg 多肽的组成物，该多肽包含或者由与任何一种野生型氨基酸序列至少 80%、85%、90%、95%、97%或 99%相同的氨基酸序列组成，以及必要时加工除去 N 端前导序列并且通过上述改变修饰的这些蛋白质的形式。

本发明的组成物或疫苗组合物可以包含不同 HBcAg 的混合物。因此，这些疫苗组合物可以由氨基酸序列不同的 HBcAg 组成。例如，可以制备包含“野生型”HBcAg 和一个或多个氨基酸残基已经改变(例如缺失、插入或置换) 的修饰 HbcAg 的疫苗组合物。此外，本发明优选的疫苗组合物是呈现高度有序、重复的抗原阵列的组合物，其中该抗原是 ghrelin 或 ghrelin 肽。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，至少一种 ghrelin 或 ghrelin 肽通过至少一个共价键分别与所述核心颗粒和病毒样颗粒结合。优选地，至少一种 ghrelin 或 ghrelin 肽通过至少一个共价键分别与所述核心颗粒和病毒样颗粒结合，所述共价键是一种非肽键，分别产生核心颗粒-ghrelin 的有序、重复阵列和 ghrelin-VLP 阵列或偶联物。这种 ghrelin-VLP 阵列和偶联物一般且优选地分别具有重复、有序的结构，因为至少一个、通常一个以上的 ghrelin 或 ghrelin 肽以定向方式与 VLP 和核心颗粒结合。优选地，120 个以上，180 个以上，优选地 270 个以上，优选地 360 个以上 ghrelin 或 ghrelin 肽与 VLP 结合。根据下文应当理解，至少一种 ghrelin 或 ghrelin 肽分别与 VLP 和核心颗粒的定向、直接以及明确的结合和附着，分别确保了

重复、有序的 ghrelin-VLP 和核心颗粒阵列和偶联物的形成。此外，VLP 和核心颗粒的典型、固有的高度重复、组织的结构分别有助于以高度有序、重复的方式展示 ghrelin 或 ghrelin 肽，分别产生高度组织、重复的 ghrelin-VLP/核心颗粒阵列和偶联物。

因此，本发明优选的偶联物和阵列在高度组织化结构、大小和阵列表面抗原重复性等方面分别不同于现有的偶联物。而且，本发明优选的实施方案还允许颗粒和抗原在表达宿主中表达，保证抗原(即至少一种 ghrelin 或 ghrelin 肽)的正确折叠，和 VLP 的正确折叠和装配。

本发明公开了 ghrelin 或 ghrelin 肽分别与核心颗粒和 VLP 结合的方法。如上所述，在本发明的一个方面，一般且优选地使用异双功能交联剂，通过化学交联使 ghrelin 或 ghrelin 肽分别与核心颗粒和 VLP 结合。有几种异双功能交联剂在本领域公知。在优选实施方案中，异双功能交联剂含有一个能够与优选的第一附着位点(即分别与核心颗粒和 VLP 或至少一个 VLP 亚单位的赖氨酸残基的侧链氨基)反应的官能团，并且含有另外一个能够与优选的第二附着位点(即在 ghrelin 或 ghrelin 肽上天然存在的，通过还原可供反应的半胱氨酸残基；或在 ghrelin 或 ghrelin 肽上构建的，任选地通过还原可供反应的半胱氨酸残基)反应的官能基团。该方法的第一步，一般称为衍生化，是核心颗粒或 VLP 与交联剂反应。反应产物是活化的核心颗粒或活化的 VLP，也被称为活化的载体。第二步，用常用方法如凝胶过滤或透析除去未反应的交联剂。第三步，ghrelin 或 ghrelin 肽与活化的载体反应，该步骤一般被称为偶联步骤。未反应的 ghrelin 或 ghrelin 肽任选地可以在第四步例如通过透析除去。有几种异双功能交联剂在本领域公知，包括优选的交联剂 SMPH (Pierce)、Sulfo-MBS、Sulfo-EMCS、Sulfo-GMBS、Sulfo-SIAB、Sulfo-SMPB、Sulfo-SMCC、SVSB、SIA 和其它例如可从 Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA) 获得的含有一个氨基反应性官能团和一个半胱氨酸残基反应性官能团的交联剂。上述交联剂在与氨基反应后均能导致酰胺键的形

成，与半胱氨酸反应后形成硫醚键。适于在本发明的实施中使用的另一类交联剂，其特征在于偶联后在 ghrelin 或 ghrelin 肽与核心颗粒或 VLP 之间引入一个二硫键。属于这一类的优选交联剂包括，例如 SPDP 和 Sulfo-LC-SPDP (Pierce)。交联剂分别衍化核心颗粒和 VLP 的程度可能受不同实验条件影响，如每个反应物的浓度、一种试剂相对于另一种试剂的过量程度、pH、温度和离子强度。偶联程度，即分别在每个核心颗粒和 VLP 亚单位上的 ghrelin 或 ghrelin 肽的数量，可通过改变上述实验条件调节，以满足疫苗的要求。ghrelin 或 ghrelin 肽的溶解度可能限制能够在每个亚单位上偶联的 ghrelin 或 ghrelin 肽的数量，当获得的疫苗不可溶时，减少每个亚单位上 ghrelin 或 ghrelin 肽的数量是有利的。

ghrelin 或 ghrelin 肽分别与核心颗粒和 VLP 结合的一种特别有利的方法是核心颗粒和 VLP 表面上的赖氨酸残基分别与 ghrelin 或 ghrelin 肽上的半胱氨酸残基连接。因此，在本发明的一个优选实施方案中，第一附着位点是赖氨酸残基，第二附着位点是半胱氨酸残基。在某些实施方案中，为了分别与核心颗粒和 VLP 偶联，可能需要在 ghrelin 或 ghrelin 肽上构建一个氨基酸接头，该接头含有半胱氨酸残基作为第二附着位点或者作为第二附着位点的一部分。此外，也可以通过 ghrelin 或 ghrelin 肽内的插入或突变引入半胱氨酸。此外，也可以通过化学偶联引入半胱氨酸残基。

氨基酸接头的选择分别取决于抗原和自身抗原的性质，即取决于 ghrelin 或 ghrelin 肽的性质，其生化性质，如 pI、电荷分布和糖基化。柔性的氨基酸接头通常是有利的。氨基酸接头的优选实施方案选自：(a) CGG；(b) N-端γ-1 接头；(c) N-端γ-3 接头；(d) Ig 铰链区；(e) N-端甘氨酸接头；(f) $(G)_kC(G)_n$，其中 n=0-12，k=0-5 (SEQ ID NO: 34)；(g) N-端甘氨酸-丝氨酸接头；(h) $(G)_kC(G)_m(S)_l(GGGGS)_n$，其中 n=0-3，k=0-5，m=0-10，l=0-2 (SEQ ID NO: 35)；(i) GGC；(k) GGC-NH2；(l) C 端γ-1 接头；(m) C-端γ-3 接头；(n) C-端甘氨酸接头；(o) $(G)_nC(G)_k$，其中 n=0-12，k=0-5 (SEQ ID NO: 36)；(p) C-

端甘氨酸-丝氨酸接头；(q) $(G)_m(S)_l(GGGGS)_n(G)_oC(G)_k$，其中 n=0-3, k=0-5, m=0-10, l=0-2, o=0-8 (SEQ ID NO: 37)。

氨基酸接头的进一步优选的例子包括免疫球蛋白的铰链区、甘氨酸丝氨酸接头$(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 38)和甘氨酸接头$(G)_n$，它们均进一步含有半胱氨酸残基作为第二附着位点，任选地还含有其它的甘氨酸残基。一般来说，这类氨基酸接头的优选实例是：N-端γ1: CGDKTHTSPP (SEQ ID NO: 39)；C-端γ1: DKTHTSPPCG (SEQ ID NO: 40)；N-端γ3: CGGPKPSTPPGSSGGAP (SEQ ID NO: 41)；C-端γ3: PKPSTPPGSSGGAPGGCG (SEQID NO: 42)；N-端甘氨酸接头: GCGGGG (SEQ ID NO: 43)；C-端甘氨酸接头: GGGGCG (SEQ ID NO: 44)；C端甘氨酸-赖氨酸接头: GGKKGC (SEQ ID NO: 45)；N端甘氨酸-赖氨酸接头: CGKKGG (SEQ ID NO: 46)。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，特别是当抗原是ghrelin肽时，在肽的C端优选GGCG (SEQ ID NO: 47)、GGC或GGC-NH2 (“NH2”表示酰胺化)接头，或者在其N端优选CGG，作为氨基酸接头。甘氨酸残基通常插入体积庞大的氨基酸与作为第二附着位点的半胱氨酸之间，以避免偶联反应中体积较大氨基酸的潜在空间位阻。

ghrelin或ghrelin肽上的半胱氨酸残基必须是还原状态，才能与活化的VLP上的异双功能交联剂反应，即必须有含有游离巯基的游离半胱氨酸或半胱氨酸残基。当作为结合位点的半胱氨酸残基是氧化形式时，例如，如果形成二硫桥键，则需要用例如DTT、TCEP或β-巯基乙醇还原该二硫桥键。

根据上述优选方法，利用异双功能交联剂使ghrelin或ghrelin肽分别与核心颗粒和VLP结合，可使ghrelin或ghrelin肽以定向方式分别与核心颗粒和VLP偶联。ghrelin或ghrelin肽分别与核心颗粒和VLP结合的其它方法包括使用碳二亚胺EDC和NHS分别交联ghrelin或ghrelin肽与核心颗粒和VLP的方法。ghrelin或ghrelin肽也可以首先通过反应硫醇化，例如使用SATA、SATP或iminothiolane。必要时，在去保护之后，ghrelin或ghrelin肽可以

分别与核心颗粒和 VLP 偶联，如下所述。在分离过量的硫醇化试剂之后，ghrelin 或 ghrelin 肽分别与预先用含有半胱氨酸反应性基团的异双功能交联剂活化的核心颗粒和 VLP 反应，活化的核心颗粒和 VLP 展示至少一个或几个半胱氨酸残基反应性的功能基团，如上所述的硫醇化的 ghrelin 或 ghrelin 肽能够与它反应。任选地，在反应混合物中含有少量的还原剂。另外一些方法使用同型双功能剂，如戊二醛、DSG、BM[PEO]$_4$、BS^3 (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA)，或含有分别对核心颗粒和 VLP 的胺基或羧基有反应性的功能基团的其它已知同型双功能交联剂，使 ghrelin 或 ghrelin 肽分别附着于核心颗粒和 VLP。

结合 VLP 与 ghrelin 或 ghrelin 肽的其它方法包括核心颗粒和 VLP 分别被生物素化，ghrelin 或 ghrelin 肽表达为链霉亲和素融合蛋白的方法，或者 ghrelin 或 ghrelin 肽和核心颗粒和 VLP 分别都被生物素化的方法，如 WO 00/23955 所述。在这种情况下，通过调节 ghrelin 或 ghrelin 肽与链霉亲和素的比例，首先使 ghrelin 或 ghrelin 肽与链霉抗亲和素或亲和素蛋白结合，使得仍有自由结合位点可以分别与下一步添加的核心颗粒和 VLP 结合。此外，也可以在“一锅”反应中混合所有成分。其它能够分别与核心颗粒和 VLP 或者 ghrelin 或 ghrelin 肽交联的配体-受体对(其中存在受体和配体的可溶形式并可利用)，也可以作为使 ghrelin 或 ghrelin 肽与核心颗粒和 VLP 结合的结合剂。或者，配体或受体也可以与 ghrelin 或 ghrelin 肽融合，从而介导分别与化学结合或融合有受体或配体的核心颗粒和 VLP 的结合。融合也可以通过插入或置换实现。

如前所述，在本发明的一个优选实施方案中，VLP 是 RNA 噬菌体的 VLP，在一个更优选的实施方案中，VLP 是 RNA 噬菌体 Qβ外壳蛋白的 VLP。

如果空间上允许，一个或几个抗原分子，即 ghrelin 或 ghrelin 肽，可以被附着于 RNA 噬菌体外壳蛋白的衣壳或 VLP 的一个亚单位上，优选地通过 RNA 噬菌体 VLP 的暴露的赖氨酸残基附着。RNA 噬菌体外

壳蛋白的 VLP，特别是 Qβ外壳蛋白 VLP 的一个具体特征是每个亚单位偶联几个抗原的可能性。这能够产生密集的抗原阵列。

在本发明的一个优选实施方案中，至少一个 ghrelin 或 ghrelin 肽分别与核心颗粒和病毒样颗粒的结合和附着分别是通过病毒样颗粒的至少一个第一附着位点与抗原或抗原决定簇的至少一个第二附着位点之间的相互作用和连接而实现的。

Qβ外壳蛋白的 VLP 或衣壳在其表面展示数量确定的赖氨酸残基，具有确定的布局，有 3 个赖氨酸残基指向衣壳内部，并与 RNA 相互作用，另外 4 个赖氨酸残基暴露于衣壳外面。这些明确的特性有利于抗原附着于颗粒外部，而不是赖氨酸残基与 RNA 相互作用的颗粒内部。其它 RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP 在其表面也有数量确定的赖氨酸残基，这些赖氨酸残基有确定的布局。

在本发明的进一步优选的实施方案中，第一附着位点是赖氨酸残基，并且/或者第二附着位点包含巯基或半胱氨酸残基。在本发明的一个非常优选的实施方案中，第一附着位点是赖氨酸残基，第二附着位点是半胱氨酸残基。

在本发明的一个非常优选的实施方案中，ghrelin 或 ghrelin 肽通过 ghrelin 或 ghrelin 肽上天然存在的或构建的半胱氨酸残基与 RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP 的赖氨酸残基结合，特别是与 Qβ 外壳蛋白的 VLP 结合。

来源于 RNA 噬菌体的 VLP 的另一个优点是它们在细菌中的高表达量，这允许以较低的成本生产大量的材料。

如上所述，本发明的偶联物和阵列在高度组织化结构、大小以及阵列表面抗原重复性等方面分别不同于现有的偶联物。而且，用 VLP 作为载体可以分别形成具有不同抗原密度的坚固的抗原阵列和偶联物。具体而言，使用 RNA 噬菌体的 VLP，尤其是使用 RNA 噬菌体 Qβ 外壳蛋白的 VLP，能够获得极高的表位密度。具有高表位密度的 RNA 噬菌体外壳蛋白 VLP 组成物的制备可以根据本申请所述实现。在本发明优选的实施方案中，当 ghrelin 肽优选地与 Qβ 外壳蛋白的 VLP 偶

联时，优选地每个亚单位的 ghrelin 肽的平均数量为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4 2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 或更高。

如此处定义的第二附着位点可以天然存在或非天然存在于抗原或抗原决定簇内。如果抗原或抗原决定簇上没有合适的天然存在的第二附着位点，则必须为该抗原构建非天然的第二附着位点。

如上所述，有 4 个赖氨酸残基暴露于 Qβ 外壳蛋白的 VLP 表面。这些残基一般在与交联剂分子反应后被衍化。在不是所有暴露的赖氨酸残基都能与抗原偶联的情况中，在衍化步骤后，已经与交联剂反应的赖氨酸残基的ε-氨基上附着有交联剂分子。这导致一个或几个正电荷丢失，可能不利于 VLP 的可溶性和稳定性。如下文所述的公开的 Qβ 外壳蛋白突变体中，通过用精氨酸代替一些赖氨酸残基，我们防止了正电荷的过多丢失，因为精氨酸残基不与交联剂反应。而且，用精氨酸代替赖氨酸残基可产生更确定的抗原阵列，因为可以与抗原反应的位点变少了。

因此，在本申请公开的下列 Qβ 外壳蛋白突变体和突变 Qβ VLP 中，用精氨酸替换了暴露的赖氨酸残基：Qβ-240 (Lys13-Arg; SEQ ID NO: 17)、Qβ-250 (Lys2-Arg, Lys13-Arg; SEQ ID NO: 19) 和 Qβ-259 (Lys2-Arg, Lys16-Arg; SEQ ID NO: 21)。克隆这些构建体，表达蛋白质，纯化 VLP，并与肽和蛋白质抗原偶联。也构建了 Qβ-251 (SEQ ID NO: 20)，在本申请中能够找到关于如何表达、纯化和偶联 Qβ-251 外壳蛋白的 VLP 的指南。

在另外一个实施方案中，我们公开了含有另一个额外赖氨酸残基的 Qβ 突变外壳蛋白，它适用于获得更高密度的抗原阵列。克隆该突变 Qβ 外壳蛋白 Qβ-243 (Asn10-Lys; SEQ ID NO: 18)，表达该蛋白质，分离并纯化衣壳或 VLP，显示额外赖氨酸残基的引入不妨碍亚单位自装配为衣壳或 VLP。因此，可以用 Qβ 外壳蛋白突变体的 VLP 分别制备 ghrelin 或 ghrelin 肽阵列和偶联物。抗原与 VLP 附着、特别是与 RNA 噬菌体外壳蛋白 VLP 附着的一种特别优选的方法是连接 RNA 噬菌体外

壳蛋白 VLP 表面上存在的赖氨酸残基与抗原(即 ghrelin 或 ghrelin 肽)上天然存在的或构建的半胱氨酸残基。为了使半胱氨酸残基能够有效地作为第二附着位点，必须有一个巯基能够用于偶联。因此，半胱氨酸残基必须是还原状态，即，必须有可供利用的游离半胱氨酸或含有游离巯基的半胱氨酸残基。如果作为第二附着位点的半胱氨酸残基是氧化形式，例如，如果它形成二硫桥键，则需要使用如 DTT、TCEP 或β-巯基乙醇还原该二硫桥键。必须根据每种抗原调节还原剂的浓度和还原剂超过抗原的摩尔数。必要时需要检测滴定范围，从低至 10μM 或更低的浓度，到可达 10-20mM 或更高，并估计抗原与载体的偶联。尽管如 WO 02/056905 所述，低浓度还原剂适于偶联反应，但是技术人员应当知道，较高的浓度抑制偶联反应，此时必须通过透析或凝胶过滤除去还原剂。透析或平衡缓冲液的 pH 通常低于 7，优选地低于 6。必须检测低 pH 缓冲液与抗原活性或稳定性的相容性。

通过选择交联剂和其它反应条件，可以调节 RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP 上的表位密度。例如，交联剂 Sulfo-GMBS 和 SMPH 一般能够获得高表位密度。高浓度反应物正向影响衍化，可以通过操纵反应条件来控制与 RNA 噬菌体外壳蛋白的 VLP 偶联、特别是与 Qβ 外壳蛋白的 VLP 偶联的抗原数量。

在设计非天然的第二附着位点之前，必须选择融合、插入或一般构建的位置。因此这样选择第二附着位点的位置，使其避免第二附着位点或含有它的任何氨基酸接头的空间位阻。在其它一些实施方案中，希望产生针对不同于自身抗原与其天然配体的相互作用位点的抗体应答。在这些实施方案中，第二附着位点的选择应防止产生针对自身抗原与其天然配体的相互作用位点的抗体。

在最优选的实施方案中，ghrelin 或 ghrelin 肽仅包含一个第二附着位点或一个反应性附着位点，它们能够与分别位于核心颗粒和 VLP 或 VLP 亚单位上的第一附着位点连接。这确保了至少 1 个、一般 1 个以上、优选地超过 10、20、40、80、120、150、180、210、240、270、300、360、400、450 个抗原分别与核心颗粒和 VLP 确定、均匀

地结合和连接。因此，抗原上含有单一第二附着位点或单一反应性附着位点确保了单一、均匀类型的结合和连接，分别产生高度有序、重复的阵列。例如，如果通过赖氨酸(作为第一附着位点)和半胱氨酸(作为第二附着位点)相互作用分别实现结合和连接，根据本发明该优选实施方案，确保了每个抗原只有一个半胱氨酸残基能够分别与VLP和核心颗粒的第一附着位点结合和连接，而无论该半胱氨酸残基在抗原上是天然存在还是非天然存在。

在一些实施方案中，在抗原上构建第二附着位点需要融合一个含有根据本发明的公开内容适于作为第二附着位点的氨基酸的氨基酸接头。因此，在本发明的一个优选实施方案中，氨基酸接头通过至少一个共价键与抗原或抗原决定簇结合。优选地，该氨基酸接头包含或者由第二附着位点组成。在一个进一步优选的实施方案中，氨基酸接头包含巯基或半胱氨酸残基。在另一个优选实施方案中，该氨基酸接头是半胱氨酸。氨基酸接头的一些选择标准以及本发明氨基酸接头的进一步优选实施方案在上文中已经提及。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，至少一个抗原或抗原决定簇，即ghrelin或ghrelin肽，分别与核心颗粒和病毒样颗粒融合。如上所述，VLP一般由至少一种可装配为VLP的亚单位组成。因此，在本发明的一个进一步优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇，优选地至少一个ghrelin或ghrelin肽，与病毒样颗粒或能够掺入VLP内的蛋白质的至少一个亚单位融合，产生嵌合VLP-亚单位-ghrelin或ghrelin肽融合蛋白。

ghrelin或ghrelin肽的融合可以按如下实现：插入VLP亚单位序列内，或与VLP亚单位或能够掺入VLP内的蛋白质的N端或C端融合。在下文中，当指肽与VLP亚单位的融合蛋白时，包括该肽与亚单位序列任一端的融合或向亚单位序列内的内部插入。

融合也可以如下实现：向VLP亚单位变体内插入ghrelin或ghrelin肽序列，其中亚单位序列的一部分缺失，被称为截短突变体。截短突变体可能包括VLP亚单位序列的N端或C端缺失或内部部分缺

失。例如，氨基酸残基 79-81 缺失的具体 VLP HBcAg 是含有内部缺失的截短突变体。ghrelin 或 ghrelin 肽与截短突变体 VLP 亚单位的 N 端或 C 端的融合也是本发明的实施方案。同样，也可以通过置换实现表位融合到 VLP 亚单位序列内，例如对于具体 VLP HBcAg，用一种外源表位代替氨基酸 79-81。因此，如下文所述，实现融合的方法包括：向 VLP 亚单位的序列中插入 ghrelin 或 ghrelin 肽序列，用 ghrelin 或 ghrelin 肽序列置换 VLP 亚单位序列的一部分，或者缺失、置换或插入的组合。

嵌合的 ghrelin 或 ghrelin 肽 VLP 亚单位通常能够自装配为 VLP。展示与其亚单位融合的表位的 VLP 在此也被称为嵌合 VLP。如上所述，病毒样颗粒包含或者由至少一种 VLP 亚单位组成。在本发明的另一个实施方案中，病毒样颗粒包含或者由嵌合 VLP 亚单位和非嵌合 VLP 亚单位(即不含与之融合的抗原的 VLP 亚单位)的混合物组成，产生所谓的镶嵌颗粒。这可能有利于确保 VLP 的形成和装配。在这些实施方案中，嵌合 VLP-亚单位的比例可以是 1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、95%或更高。

可以向与 VLP 亚单位序列任一端融合的肽或表位序列的任一端添加侧翼氨基酸残基，或者向插入 VLP 亚单位序列内部的这种肽序列的任一端添加侧翼氨基酸残基。在向待融合的 ghrelin 或 ghrelin 肽添加的侧翼序列中特别优选使用甘氨酸和丝氨酸残基。甘氨酸残基提供额外的柔韧性，这可降低外源序列向 VLP 亚单位序列内融合时可能的去稳定作用。

在本发明的一个具体实施方案中，VLP 是乙型肝炎核心抗原 VLP。已经报道了与 HBcAg N 端融合的融合蛋白(Neyrinck, S.等人, Nature Med. 5:1157-1163 (1999))或向所谓的主要免疫显性区(MIR)中的插入 (Pumpens, P.和 Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001), WO 01/98333)，它们是本发明的优选实施方案。MIR 中存在缺失的 HBcAg 的天然存在的变体也已经有报道(Pumpens, P.和 Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001)，在此全文引用作为参考)，与 N

端或C端的融合，以及与野生型HBcAg相比在对应于缺失位点的MIR位点处的插入，也是本发明的实施方案。与C端的融合也已经有报道(Pumpens, P.和Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001))。本领域技术人员能够容易地找到如何利用经典分子生物学技术构建融合蛋白的指南(Sambrook, J.等人编著，《分子克隆：实验室手册》(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)，第二版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Habor, N.Y. (1989); Ho等人, Gene 77:51 (1989))。编码HBcAg和HBcAg融合蛋白并且可用于表达HBcAg和HBcAg融合蛋白的载体和质粒已经有报道(Pumpens, P.和Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001), Neyrinck, S.等人, Nature Med. 5:1157-1163 (1999))，可以在本发明的实施中使用。通过实施例(实施例6)，我们也描述了向HBcAg的MIR内插入表位，产生嵌合的自装配HBcAg。优化自装配效率和展示插入HBcAg MIR内的表位的一个重要因素是插入位点的选择，以及插入时从MIR内HBcAg序列上删除的氨基酸数量(Pumpens, P.和Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001); EP 0 421 635; US 6,231,864)，即HBcAg的哪些氨基酸将被置换为新的表位。例如，已经报道了用外源表位置换HBcAg氨基酸76-80、79-81、79-80、75-85或80-81(Pumpens, P.和Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001); EP0421635; US 6,231,864)。HBcAg含有一个长精氨酸尾(Pumpens, P.和Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001))，它不是衣壳装配所必需的，能够结合核酸(Pumpens, P.和Grens, E., Intervirology 44:98-114 (2001))。包含或缺乏这一精氨酸尾的HbcAg都是本发明的实施方案。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，VLP是RNA噬菌体的VLP。在细菌、特别是在大肠杆菌中表达后，RNA噬菌体的主要外壳蛋白自发装配为VLP。能够用来制备本发明组成物的噬菌体外壳蛋白的具体例子包括RNA噬菌体如噬菌体Qβ (SEQ ID NO:4; PIR数据库，登录号VCBPQβ指Qβ CP，和SEQ ID NO:5; 登录号AAA16663指Qβ A1

蛋白)和噬菌体 fr (SEQ ID NO: 7; PIR 登录号 VCBPFR)的外壳蛋白。

在一个更优选的实施方案中，至少一个 ghrelin 或 ghrelin 肽与一个 Qβ 外壳蛋白融合。已经报道了下述融合蛋白构建体，其中表位与 Qβ A1 蛋白截短形式的 C 端融合，或者插入 A1 蛋白内(Kozlovska, T.M. 等人, Intervirology, 39:9-15 (1996))。A1 蛋白是通过 UGA 终止密码子的抑制产生的，长度为 329 个氨基酸，或者如果考虑 N 端甲硫氨酸的切除，为 328 个氨基酸。丙氨酸(Qβ CP 基因编码的第二个氨基酸)之前 N 端甲硫氨酸的切除在大肠杆菌中常常发生，Qβ 外壳蛋白 CP 的 N 端也是如此。位于 UGA 琥珀密码子 3’的 A1 基因部分编码长度为 195 个氨基酸的 CP 延伸。在 CP 延伸的位点 72 与 73 之间插入至少一个 ghrelin 或 ghrelin 肽产生本发明的其它实施方案(Kozlovska, T.M. 等人, Intervirology 39:9-15 (1996))。ghrelin 或 ghrelin 肽在 C 端截短的 Qβ A1 蛋白 C 端的融合为本发明的进一步优选的实施方案。例如，Kozlovska 等人(Intervirology 39:9-15 (1996))描述了 Qβ A1 融合蛋白，其中表位与在位点 19 处截短的 Qβ CP 延伸的 C 端融合。

如 Kozlovska 等人(Intervirology 39:9-15 (1996))所述，展示融合表位的颗粒的装配一般需要同时存在 A1 蛋白-ghrelin 或 ghrelin 肽融合和野生型 CP，才能形成镶嵌颗粒。然而，本发明的范围内也包括包含病毒样颗粒、特别是 RNA 噬菌体 Qβ 外壳蛋白的 VLP 的实施方案，其仅仅由融合了至少一个 ghrelin 或 ghrelin 肽的 VLP 亚单位组成。

镶嵌颗粒的产生可以用多种方法实现。Kozlovska 等人, Intervirology 39:9-15 (1996)描述了两种方法，它们均能在本发明的实施中使用。第一种方法，通过在大肠杆菌株中（携带编码克隆的 UGA 抑制子 tRNA 的质粒，使 UGA 密码子翻译为 Trp : pISM3001 质粒(Smiley B.K.等人, Gene 134:33-40 (1993))表达编码 Qβ A1 融合蛋白（在 CP 与 CP 延伸之间含有一个 UGA 终止密码子）的质粒，介导 VLP 上融合表位的有效展示。另一种方法，将 CP 基因终止密码子修饰为

UAA，与表达A1蛋白-ghrelin或ghrelin肽融合体的第二种质粒共转化。第二种质粒编码不同的抗生素抗性，其复制起点与第一种质粒相一致(Kozlovska, T.M.等人, Intervirology 39:9-15 (1996))。第三种方法，CP和A1蛋白-ghrelin或ghrelin肽融合体以双顺反子的形式编码，与一种启动子如Trp启动子有效连接，如Kozlovska等人, Intervirology 39:9-15 (1996)的图1所示。

在另外一个实施方案中，ghrelin或ghrelin肽插入fr CP的氨基酸2与3之间(切割的CP的编号，其中N端甲硫氨酸已经切除)，从而产生ghrelin或ghrelin肽-fr CP融合蛋白。用于构建和表达可自装配为VLP的fr CP融合蛋白并且在本发明的实施中可以使用的载体和表达系统已经有报道(Pushko P.等人, Prot. Eng. 6:883-891 (1993))。在一个具体实施方案中，ghrelin或ghrelin肽序列插入fr CP缺失变体内氨基酸2之后，其中fr CP的残基3和4已经删除(Pushko P.等人, Prot. Eng. 6:883-891 (1993))。

表位在RNA噬菌体MS-2外壳蛋白的N端突起β-发夹中的融合，以及随后融合表位在RNA噬菌体MS-2的自装配VLP上的呈递，也已经有报道(WO 92/13081)，ghrelin或ghrelin肽通过插入或置换融合到MS-2 RNA噬菌体的外壳蛋白内也属于本发明的范围。

在本发明的另一个实施方案中，ghrelin或ghrelin肽与乳头瘤病毒的衣壳蛋白融合。在一个更具体的实施方案中，ghrelin或ghrelin肽与1型牛乳头瘤病毒(BPV-1)的主要衣壳蛋白L1融合。已经报道了用于构建及在杆状病毒/昆虫细胞系统中表达BPV-1融合蛋白的载体和表达系统(Chackerian, B.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2373-2378 (1999), WO 00/23955)。用ghrelin或ghrelin肽置换BLV-1 L1的氨基酸130-136，产生BPV-1 L1-ghrelin或ghrelin肽融合蛋白，是本发明的一个优选实施方案。已报道了在杆状病毒载体中克隆以及在杆状病毒感染的Sf9细胞中的表达，可以在本发明的实施中应用(Chackerian, B.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2373-2378 (1999), WO 00/23955)。展示融合的ghrelin或ghrelin

肽的装配颗粒能够用多种方法纯化，如凝胶过滤或蔗糖梯度超速离心(Chackerian, B.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2373-2378 (1999), WO 00/23955)。

在本发明的另一个实施方案中，ghrelin 或 ghrelin 肽与能够掺入 Ty VLP 内的 Ty 蛋白融合。在一个更具体的实施方案中，ghrelin 或 ghrelin 肽与 TYA 基因编码的 p1 或衣壳蛋白融合(Roth, J.F., Yeast 16:785-795 (2000))。酵母逆转录转座子 Ty1、2、3、4 已经从酿酒酵母中分离，而逆转录转座子 Tf1 已经从粟酒裂殖酵母中分离(Boeke, J.D.和 Sandmeyer, S.B.,“酵母转座元件”,《酵母的分子和细胞生物学:基因组动力学、蛋白质合成和能量学》(The molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome dynamics, Protein Synthesis, and Energetics), p.193, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1991))。逆转录转座子 Ty1 和 2 与植物和动物元件的 *copia* 类别有关，而 Ty3 属于逆转录转座子的 *gypsy* 家族，它与植物和动物逆转录病毒有关。在 Ty1 逆转录转座子中，p1 蛋白，也被称为 Gag 或衣壳蛋白，长度为 440 个氨基酸。在 VLP 的成熟过程中 p1 在位点 408 处被切割，产生 p2 蛋白，后者是 VLP 的基本成分。

已经报道了与 p1 的融合蛋白和在酵母中表达该融合蛋白的载体(Adams, S.E.等人, Nature 329:68-70 (1987))。例如，通过向 pMA5620 质粒的 BamHI 位点内插入编码 ghrelin 或 ghrelin 肽的序列，该 ghrelin 或 ghrelin 肽可以与 p1 融合(Adams, S.E.等人, Nature 329:68-70 (1987))。将编码外源表位的序列克隆到 pMA5620 载体内导致融合蛋白的表达，该融合蛋白包含 Ty1-15 的 p1 的氨基酸 1-381，其 C 端与外源表位的 N 端融合。同样，ghrelin 或 ghrelin 肽的 N 端融合，或向 p1 序列内的内部插入，或将 p1 序列部分置换，也属于本发明的范围。具体而言， 在 Ty 序列内位于 Ty 蛋白 p1(EP0677111) 的氨基酸 30-31、67-68、113-114 和 132-133 之间插入 ghrelin 或 ghrelin 肽，为本发明的优选实施方案。

适于 ghrelin 或 ghrelin 肽融合的其它 VLP 有，例如：逆转录病毒样颗粒(WO9630523)、HIV2 Gag (Kang, Y.C.等人, Biol. Chem. 380:353-364 (1999))、豇豆花叶病毒(Taylor, K.M.等人, Biol. Chem. 380:387-392 (1999))、细小病毒 VP2 VLP (Rueda, P.等人, Virology 263:89-99 (1999))、HBsAg (US 4,722,840, EP0020416B1)。

适于实施本发明的嵌合 VLP 的例子也包括 Intervirology 39:1 (1996)所述的 VLP。预期可在本发明中使用的 VLP 的其它例子有：HPV-1、HPV-6、HPV-11、HPV-16、HPV-18、HPV-33、HPV-45、CRPV、COPV、HIV GAG、烟草花叶病毒。也已经制备了 SV40、多瘤病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒、轮状病毒和诺瓦克病毒的病毒样颗粒，这些 VLP 的嵌合 VLP 也属于本发明的范围。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇是 ghrelin 或 ghrelin 肽。

在本发明的另外一个非常优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇选自：a)人 ghrelin; b)猫 ghrelin; c)狗 ghrelin; d)牛 ghrelin; e)绵羊 ghrelin; f)马 ghrelin; g)猪 ghrelin; h) a)-g)中任何一种 ghrelin 的肽或其片段。

在本发明的另外一个非常优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇包含、基本由或者由选自下列的氨基酸序列组成：

(a) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 48)
(b) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 31)
(c) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 49)
(d) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 50)
(e) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 32)
GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 51)
KKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 52)
PPAKLQPR (SEQ ID NO: 53)
AKLQPR (SEQ ID NO: 54)
GSSFLSPEHQ (SEQ ID NO: 55)
EHQRVQQRKE (SEQ ID NO: 56)
EHQRVQQRKES (SEQ ID NO: 111)
EHQKAQQRKE (SEQ ID NO: 112)
EHQKAQQRKES (SEQ ID NO: 113)
EHQKLQQRKE (SEQ ID NO: 114)
EHQKLQQRKES (SEQ ID NO: 115)
LSPEHQRVQQ (SEQ ID NO: 116)
LSPEHQKAQQ (SEQ ID NO: 117)
(s) LSPEHQKLQQ (SEQ ID NO: 118).

在本发明的另外一个非常优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇分别是人、猫、猪、马、绵羊、牛、豚鼠、狗或小鼠 ghrelin 和 ghrelin 肽。Ghrelin 和 ghrelin 肽分别能够通过在强启动子控制下表达编码 ghrelin 和 ghrelin 肽的 DNA 来制备。优选地，该 DNA 不编码 preproghrelin，而只编码活性 n-辛酰基修饰肽的肽骨架。文献中已经描述了各种实施例，在修饰后可以用于表达任何希望的种的 ghrelin。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇是 ghrelin 衍生肽或其片段。优选地，该 ghrelin 肽选自：a) 人 ghrelin 肽；b) 牛 ghrelin 肽；c) 猫 ghrelin 肽；d) 狗 ghrelin 肽；e) 猪 ghrelin 肽；f) 鸡 ghrelin 肽；g) 小鼠 ghrelin 肽；h) 马 ghrelin 肽；i) 绵羊 ghrelin 肽；和 j) a)-i) 中任何一种 ghrelin 肽的片段。

这些 ghrelin 肽或其片段可以用标准分子生物学技术产生，其中

编码目的片段的核苷酸序列通过 PCR 扩增，并且克隆为与多肽尾(如组氨酸尾、Flag 尾、myc 尾)或抗体恒定区(Fc 区)融合的融合体。通过在 ghrelin 片段与尾之间引入肠激酶切割位点，纯化后该 ghrelin 片段通过肠激酶消化可以与该标签分离。另外一种方法，可以用本领域技术人员周知的标准肽合成反应在体外合成含或不含 n-辛酰基修饰的 ghrelin 片段。另一种方法，通过蛋白酶消化或化学切割全长 ghrelin，可以产生 ghrelin 片段，这两种方法都是本领域技术人员公知的。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，ghrelin 肽包含至少一个 ghrelin 的抗原性位点。本领域技术人员知道如何分别鉴定相应的肽和氨基酸序列。优选的片段可以含有 ghrelin 的 N 端或 C 端。C 端可能特别有用，因为 n-辛酰基修饰靠近 N 端，这种修饰也许会干扰未修饰形式的特异性抗体的结合。

优选的人 ghrelin 肽可包含:

KKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 52)
PPAKLQPR (SEQ ID NO: 53)
AKLQPR (SEQ ID NO: 54)
KLQPR (SEQ ID NO: 59)
GSSFLSPEHQ (SEQ ID NO: 55)
EHQRVQQRKES (SEQ ID NO: 111)
LSPEHQRVQQ (SEQ ID NO: 116)
GSSFLSP (SEQ ID NO: 119)

然而，来自 ghrelin 内部位点的肽可能也是疫苗的有吸引力的候选者。因为各个种的 ghrelin 高度同源，因此可能诱导交叉反应性抗体应答。因此，针对狗或小鼠 ghrelin 的抗体应答也可能识别人 ghrelin，反之亦然。因此，在本发明的范围内，与人 ghrelin 的氨基酸同一性大于 80%、优选地大于 85%、更优选地大于 90%、或者更优选地大于 95%、97%甚至 99%的所有 ghrelin 分子及其衍生的肽都可用于接种。

具体而言，如何修饰人 ghrelin 或 ghrelin 肽以结合病毒样颗粒

的指南已在本申请中给出。使用本发明的组成物针对 ghrelin 进行免疫可提供一种治疗肥胖症的方法，该组成物优选地含有与核心颗粒和 VLP 结合的人 ghrelin 或 ghrelin 肽。

在本发明的另外一个非常优选的实施方案中，抗原或抗原决定簇是 ghrelin 或 ghrelin 肽，其包含或者基本由或者由选自下列的氨基酸序列组成：

(a) GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR（人）(SEQ ID NO: 48)

(b) GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR（人）(SEQ ID NO: 31)

(c) GSSFLSPEHQRVQ（人）(SEQ ID NO: 60)

(d) QRKESKKPPAKLQPR（人）(SEQ ID NO: 61)

(e) PPAKLQPR（人）(SEQ ID NO: 53)

(f) GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR（狗）(SEQ ID NO: 49)

(g) GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR（狗）(SEQ ID NO: 50)

(h) GSSFLSPEHQKLQ（狗）(SEQ ID NO: 62)

(i) QRKESKKPPAKLQPR（狗）(SEQ ID NO: 63)

(k) EHQRVQQRKE（人）(SEQ ID NO: 56)

(l) GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR（小鼠）(SEQ ID NO: 32)

(n) (a)-(l)任一项的任何片段的氨基酸序列。

在本发明的一个进一步优选的实施方案中，抗原或抗原簇还包含至少一个第二附着位点，该位点选自：(i)所述抗原或抗原决定簇非天然存在的附着位点；和(ii)所述抗原或抗原决定簇中天然存在的附着位点。在一个优选实施方案中，所述附着位点含有本发明的氨基酸接头，优选 C、CG 或 CGG 接头序列。优选地，至少含有所述第二附着位点的抗原或抗原决定簇包含或者基本由或者由选自下列的氨基酸序列组成：

CGSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPR （人） (SEQ ID NO: 64)
CGSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR （人） (SEQ ID NO: 65)
GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRC （人） (SEQ ID NO: 66)
GSSFLSPEHQRVQRKESKKPPAKLQPRGC （人） (SEQ ID NO: 120)
GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRC （人） (SEQ ID NO: 67)
GSSFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRGC （人） (SEQ ID NO: 121)
GSSFLSPEHQRVQC （人） (SEQ ID NO: 68)
GSSFLSPEHQRVQGC （人） (SEQ ID NO: 122)
CQRKESKKPPAKLQPR （人） (SEQ ID NO: 69)
CPPAKLQPR （人） (SEQ ID NO: 70)
CGSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPR（狗）(SEQ ID NO: 71)
CGSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPR（狗）(SEQ ID NO: 72)
GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRC（狗）(SEQ ID NO: 73)
GSSFLSPEHQKLQQRKESKKPPAKLQPRGC（狗）(SEQ ID NO: 123)
GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPRC（狗）(SEQ ID NO: 74)
GSSFLSPEHQKLQRKESKKPPAKLQPRGC（狗）(SEQ ID NO: 124)
GSSFLSPEHQKLQC (SEQ ID NO: 75)
GSSFLSPEHQKLQGC (SEQ ID NO: 125)
CEHQRVQQRKE (SEQ ID NO: 76)
CGSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR（小鼠）(SEQ ID NO: 77)
GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRC（小鼠）(SEQ ID NO: 126)
GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRGC（小鼠）(SEQ ID NO: 127)
GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRC（小鼠）(SEQ ID NO: 128)
GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRGC（小鼠）(SEQ ID NO: 129)
GSSFLSPEHQKAQC（小鼠）(SEQ ID NO: 130)
GSSFLSPEHQKAQGC（小鼠）(SEQ ID NO: 131)
GGSSFLSPEHQGC (SEQ ID NO: 132)
CKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 133)
CEHQKAQQRKE (SEQ ID NO: 134)
CEHQKAQQRKES (SEQ ID NO: 135)
CLSPEHQKAQQ (SEQ ID NO: 136)
CEHQRVQQRKES (SEQ ID NO: 137)
CLSPEHQRVQQ (SEQ ID NO: 138)

(a)-(ee)中任一项的任何片段的氨基酸序列。

实例 13 描述了一些非常优选的 ghrelin 肽，其中具体提供了相应的鼠肽。为了与 VLP 和菌毛偶联，这些肽含有 N 端或 C 端半胱氨酸残基作为添加的第二附着位点。这些非常优选的短 ghrelin 肽片段当分别与 VLP 和核心颗粒偶联时能够具有非常强的免疫原性。而且，优选的 ghrelin 片段也能够克服当靶向自身蛋白时出现的安全性问题，因为较短的片段更不太可能含有 T 细胞表位。一般而言，肽越短，对于 T 细胞活化越安全。然而，肽太短也可能无法诱导可以在溶液中牢固结合 ghrelin 的高亲和力抗体。

选择对应于残基 1-10 的鼠 ghrelin 片段的非常优选的 ghrelin 肽片段(GSSFLSPEHQ) (SEQ ID NO:55)，主要是因为在所有已知的种中，ghrelin 的 N 端片段相同。另外，在 ghrelin 尚未鉴定的种中也可能相同。而且，C 端残基谷氨酰胺当分别与 VLP 和核心颗粒偶联时，可提高溶解度，有利于制备可溶性疫苗产物。实际上，肽的溶解度通常是偶联效率和疫苗稳定性的一个限制因素。其它原因包括避免潜在的 T 细胞表位。选择较小的肽片段可降低存在 T 细胞表位的可能性。鼠 ghrelin 残基 1-10 通过 C 端与 VLP 偶联，当免疫小鼠时可诱导 N 端特异性抗体，这些抗体能够结合活性 ghrelin，从而防止它通过血脑屏障，使食物摄取减少。

由于与以上类似的原因，选择对应于残基 42-51(KKPPAKLQPR) (SEQ ID NO:52)的鼠 ghrelin 肽片段的非常优选的 ghrelin 肽片段。唯一的差别是，通过 N 端偶联的这种肽片段当免疫小鼠时能够诱导 ghrelin 的 C 端部分特异性抗体。而且，能够增强抗体识别，因为丝氨酸 3 上的 n-辛酰基可以避免，因而降低了干扰的可能性。通过 N 端与 VLP 偶联的鼠 ghrelin 残基 42-51 可诱导能够中和活性 ghrelin 的抗体，从而防止它通过血脑屏障，使食物摄取减少。

此外，另外选择了以下一些非常优选的 ghrelin 肽片段，其对应于残基 31-41(EHQKAQQRKES) (SEQ ID NO:113) 和残基 28-37 (LSPEHQKAQQ) (SEQ ID NO:117)的鼠 ghrelin 肽片段，它们含有 ghrelin 的中心片段。类似地，这些 ghrelin 片段可避免潜在的 T 细

胞表位，也可避免丝氨酸上的 n-辛酰基。这些肽通过 N 端或 C 端与 VLP 偶联可诱导能够中和活性 ghrelin 的抗体，从而防止它通过血脑屏障，使食物摄取减少。

适用于本发明的进一步优选的ghrelin肽可以利用现有的或未来的单克隆或多克隆抗体鉴定。

未来可能在尚未获得序列信息的种中发现进一步优选的 ghrelin 分子和来源于这些分子的肽。

相关领域的普通技术人员应当理解，对此处所述的方法和用途进行其它适当的修饰和改变是显而易见的，可以在不背离本发明的范围或其任何实施方案的情况下进行这种修饰和改变。现在已经详细描述了本发明，通过下列实施例将能更清楚地理解本发明，这些实施例只是用于说明，并非意在限制本发明。

实施例

实施例 1

突变 Qβ外壳蛋白的构建和表达，突变 Qβ外壳蛋白 VLP 或衣壳的纯化

质粒构建和突变外壳蛋白的克隆

pQβ-240 的构建:

质粒 pQβ10 (Kozlovska, TM 等人, Gene137:133-137)作为构建 pQβ-240 的原始质粒。突变 Lys13→Arg 通过反向 PCR 产生。反向引物以反向尾-尾方向设计:

5′-GGTAACATCGG**TCG**AGATGGAAAACAAACTCTGGTCC-3′ (SEQ ID NO:78)

和

5′-GGACCAGAGTTTGTTTTCCATCT**CGA**CCGATGTTACC-3′ (SEQ ID NO:79)。

第一次 PCR 的产物作为第二次 PCR 反应的模板，第二次 PCR 使用上游引物

5′-AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3′ (SEQ ID NO:80)

和下游引物

5′-CGATGCATTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTCAG-3′ (SEQ ID NO:81)。

第二次 PCR 的产物用 *XbaI* 和 *Mph1103I* 消化，克隆到用相同限制性内切酶酶切的 pQβ10 表达载体中。PCR 反应用 PCR 试剂盒的试剂按照厂商的方案进行(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)。

使用直接标记掺入法进行测序证实了希望的突变。携带 pQβ-240 的大肠杆菌细胞支持 14-kD 蛋白质的高效合成，该蛋白质在 SDS-PAGE 上与从 Qβ噬菌体颗粒分离的对照 Qβ外壳蛋白共迁移。

获得的氨基酸序列：(SEQ ID NO:17)

AKLETVTLGNIGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSFTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

pQβ-243 的构建：

质粒 pQβ10 作为构建 pQβ-243 的原始质粒。突变 Asn10→Lys 通过反向 PCR 产生。反向引物以反向尾-尾方向设计：

5′-GGCAAAATTAGAGACTGTTACTTTAGGTAAGATCGG-3′ (SEQ ID NO:82)

和

5′-CCGATCTTACCTAAAGTAACAGTCTCTAATTTTGCC-3′ (SEQ ID NO:83)。

第一次 PCR 的产物作为第二次 PCR 反应的模板，第二次 PCR 使用上游引物

5′-AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3′ (SEQ ID NO:80)

和下游引物

5′-CGATGCATTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTCAG-3′ (SEQ ID

NO: 81)。第二次 PCR 的产物用 *XbaI* 和 *Mph1103I* 消化，克隆到用相同限制性内切酶酶切的 pQβ10 表达载体中。 PCR 反应用 PCR 试剂盒的试剂按照厂商的方案进行(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)。

使用直接标记掺入法进行测序证实了希望的突变。携带 pQβ-243 的大肠杆菌细胞支持 14-kD 蛋白质的高效合成，该蛋白质在 SDS-PAGE 上与从 Qβ噬菌体颗粒分离的对照 Qβ外壳蛋白共迁移。

获得的氨基酸序列：(SEQ ID NO: 18)

AKLETVTLGKIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSFTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

pQβ-250 的构建：

质粒 pQβ-240 作为构建 pQβ-250 的原始质粒。突变 Lys2→Arg 通过定点诱变产生。用上游引物

5′-GGCCATGGCACGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3′ (SEQ ID NO: 84)

和下游引物

5′-GATTTAGGTGACACTATAG-3′ (SEQ ID NO: 85)

合成突变 PCR 片段，将其导入 pQβ-185 表达载体内单一的限制酶切位点 *NcoI* 和 *HindIII* 处。PCR 反应用 PCR 试剂盒的试剂按照厂商的方案进行(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)。

使用直接标记掺入法进行测序证实了希望的突变。携带 pQβ-250 的大肠杆菌细胞支持 14-kD 蛋白质的高效合成，该蛋白质在 SDS-PAGE 上与从 Qβ噬菌体颗粒分离的对照 Qβ外壳蛋白共迁移。

获得的氨基酸序列：(SEQ ID NO: 19)

ARLETVTLGNIGRDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSFTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

pQβ-251 的构建：

质粒 pQβ10 作为构建 pQβ-251 的原始质粒。突变 Lys16→Arg 通过反向 PCR 产生。反向引物以反向尾-尾方向设计:

5′-GATGGACGTCAAACTCTGGTCCTCAATCCGCGTGGGG-3′ (SEQ ID NO: 86)

和

5′-CCCCACGCGGATTGAGGACCAGAGTTTGACGTCCATC-3′ (SEQ ID NO: 87)。

第一次 PCR 的产物作为第二次 PCR 反应的模板，第二次 PCR 使用上游引物

5′-AGCTCGCCCGGGGATCCTCTAG-3′ (SEQ ID NO: 80)

和下游引物

5′-CGATGCATTTCATCCTTAGTTATCAATACGCTGGGTTCAG- 3′ (SEQ ID NO: 81)。第二次 PCR 的产物用 *XbaI* 和 *Mph1103I* 消化，克隆到用相同限制性内切酶酶切的 pQβ10 表达载体中。PCR 反应用 PCR 试剂盒的试剂按照厂商的方案进行(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)。

使用直接标记掺入法进行测序证实了希望的突变。携带 pQβ-251 的大肠杆菌细胞支持 14-kD 蛋白质的高效合成,该蛋白质在 SDS-PAGE 上与从 Qβ噬菌体颗粒分离的对照 Qβ外壳蛋白共迁移。获得的由该构建体编码的氨基酸序列如 SEQ. ID NO: 20 所示。

pQβ-259 的构建:

质粒 pQβ-251 作为构建 pQβ-259 的原始质粒。突变 Lys2→Arg 通过定点诱变产生。用上游引物

5′-GGCCATGGCACGACTCGAGACTGTTACTTTAGG-3′ (SEQ ID NO: 84)

和下游引物

5′-GATTTAGGTGACACTATAG-3′ (SEQ ID NO: 85)合成突变 PCR 片段，将其导入 pQβ-185 表达载体中单一的限制酶切位点 *NcoI* 和 *HindIII* 处。PCR 反应用 PCR 试剂盒的试剂按照厂商的方案进行(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)。

使用直接标记掺入法进行测序证实了希望的突变。携带 pQβ-259 的大肠杆菌细胞支持 14-kD 蛋白质的高效合成，该蛋白质在 SDS-PAGE 上与从 Qβ噬菌体颗粒分离的对照 Qβ外壳蛋白共迁移。

获得的氨基酸序列：(SEQ ID NO:21)

AKLETVTLGNIGKDGKQTLVLNPRGVNPTNGVASLSQAGAVP
ALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQVKIQNPTACTANGSCDPSVTRQ
KYADVTFSFTQYSTDEERAFVRTELAALLASPLLIDAIDQLNPAY

Qβ和 Qβ突变体的表达与纯化的一般方法

表达

用 Qβ外壳蛋白表达质粒转化大肠杆菌 JM109。在含 20 μg/ml 氨苄青霉素的 5 ml LB 液体培养基中接种用 Qβ外壳蛋白表达质粒转化的克隆。接种的培养物不加振摇在 37℃下孵育 16-24 小时。制备的接种物随后用含有 20 μglml 氨苄青霉素的 100-300 ml 新鲜 LB 培养基 1:100 稀释，并且不加振摇在 37℃下孵育过夜。获得的二次接种物在摇瓶中用含有 1%酪蛋白氨基酸和 0.2%葡萄糖的 M9 培养基 1:50 稀释，并在 37℃振摇下孵育过夜。

纯化

纯化程序使用的溶液和缓冲液：

1. 裂解缓冲液 LB

50mM Tris-HCl pH8.0，含 5mM EDTA，0.1% tritonX100 和新鲜制备的 5 μg/ml 的 PMSF。不含溶菌酶和 DNAse。

2. SAS

饱和硫酸铵水溶液。

3. 缓冲液 NET

20 mM Tris-HCl，pH 7.8，含 5mM EDTA 和 150 mM NaCl。

4. PEG

NET 中的 40% (w/v)聚乙二醇 6000

破碎与裂解

将冷冻细胞以 2 ml/g 的浓度重悬浮于 LB 中。混合物以 22 KH 超声处理 5 次各 15 秒，间隔 1 分钟，在冰上冷却溶液。然后用 Janecki K 60 转子以 14 000 rpm 离心裂解液 1 小时。除非另外说明，以下描述的离心步骤全都用同一转子进行。上清液贮存于 4℃，而细胞碎片用 LB 洗涤 2 次。离心后合并裂解液的上清液和洗涤级分。

分级分离

在搅拌下，向上述合并的裂解液中逐滴加入饱和硫酸铵溶液。调节 SAS 的体积为总体积的 1/5，获得 20%的饱和度。溶液静置过夜，次日以 14 000 rpm 离心 20 分钟。沉淀用少量 20%硫酸铵洗涤，再次离心。合并获得的上清液，逐滴加入 SAS，获得 40%的饱和度。溶液静置过夜，次日以 14 000 rpm 离心 20 分钟。将获得的沉淀溶解于 NET 缓冲液中。

层析

将溶解于 NET 缓冲液中的衣壳或 VLP 蛋白上样到 Sepharose CL-4B 柱上。在层析过程中洗脱出 3 个峰。第一个峰主要含有膜和膜片段，不予收集。衣壳含于第二个峰中，而第三个峰含有其它大肠杆菌蛋白质。

合并峰级分，将 NaCl 浓度调节至终浓度为 0.65 M。在搅拌下逐滴加入体积相当于合并峰级分一半的 PEG 溶液。该溶液不加搅拌静置过夜。以 14 000 rpm 离心 20 分钟沉淀衣壳蛋白。然后溶解于最小体积的 NET 中，再次上样到 Sepharose CL-4B 柱上。合并峰级分，用 60% 饱和(w/v)的硫酸铵沉淀。离心并溶解于 NET 缓冲液后，将衣壳蛋白上样到 Sepharose CL-6B 柱上进行层析。

透析和干燥

合并以上获得的峰级分，对无菌水充分透析，冻干保存。

Qβ240 的表达与纯化

将细胞(质粒 QP-240 转化的大肠杆菌 JM 109)重悬浮于 LB 中，超声处理 5 次各 15 秒(水冰夹套)，13000 rpm 离心 1 小时。上清液贮存于 4℃，直到进一步处理，而碎片用 9 ml LB 洗涤 2 次，最后用 9 ml 0.7 M 尿素 LB 溶液洗涤。合并所有上清液，上样到 Sepharose CL-4B 柱上。用硫酸铵沉淀合并的峰级分并离心。然后用 Sepharose 2B 柱，最后用 Sepharose 6B 柱进一步纯化重新溶解的蛋白质。衣壳峰最后用水充分透析，如上所述冻干。通过电子显微镜检查证实外壳蛋白装配为衣壳。

Qβ-243 的表达与纯化

将细胞(大肠杆菌 RR1)重悬浮于 LB 中，如一般方法所述处理。用 Sepharose CL-4B 柱，最后用 Sepharose CL-2B 柱，通过连续两次凝胶过滤步骤纯化该蛋白质。合并峰级分，如上所述冻干。通过电子显微镜检查证实外壳蛋白装配为衣壳。

Qβ-250 的表达与纯化

将细胞(pQβ-250 转化的大肠杆菌 JM109)重悬浮于 LB 中，如上所述处理。用 Sepharose CL-4B 柱，最后用 Sepharose CL-2B 柱，通过凝胶过滤纯化该蛋白质，如上所述冻干。通过电子显微镜检查证实外壳蛋白装配为衣壳。

Qβ-259 的表达与纯化

将细胞(pQβ-259 转化的大肠杆菌 JM109)重悬浮于 LB 中并超声处理。碎片用 10 ml LB 洗涤 1 次，第二次用 10 ml 0.7 M 尿素 LB 溶液洗涤。用 Sepharose CL-4B 柱通过两次凝胶过滤层析步骤纯化该蛋白

质。如上所述透析并冻干该蛋白质。通过电子显微镜检查证实外壳蛋白装配为衣壳。

实施例 2

含有赖氨酸残基的肽向 HBcAg c/e1 表位(1-149)内的插入

HBcAg 的 c/e1 表位(残基 72-88)位于乙型肝炎病毒衣壳表面(HBcAg)的顶端区中。通过基因工程方法用肽 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33)置换该区的一部分(脯氨酸 79 和丙氨酸 80),获得 HBcAg-Lys 构建体(SEQ ID NO: 26)。引入的赖氨酸残基在其侧链上含有反应性氨基,能够用于 HBcAg 颗粒与含有游离半胱氨酸基团的任何抗原的分子间化学交联。

具有 SEQ ID NO: 78 所示氨基酸序列的 HBcAg-Lys DNA 通过 PCR 产生:分别 PCR 扩增编码 HBcAg 片段(氨基酸残基 1-78 和 81-149)的两条片段。这些 PCR 使用的引物也引入编码 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly 肽(SEQ ID NO: 33)的 DNA 序列。HBcAg (1-78)片段用引物 EcoRIHBcAg(s)和 Lys-HBcAg(as)从 pEco63 扩增。HBcAg (81-149)片段用引物 Lys-HBcAg(s)和 HBcAg(1-149)Hind(as)从 pEco63 扩增。引物 Lys-HBcAg(as)和 Lys-HBcAg(s)在两种 PCR 产物的末端引入互补 DNA 序列,使得两种 PCR 产物在随后的装配 PCR 中融合。装配的片段用引物 EcoRIHBcAg(s)和 HBcAg(1-149)Hind(as)通过 PCR 扩增。

对于这些 PCR,在含有 2 单位 Pwo 聚合酶、0.1 mM dNTPs 和 2 mM $MgSO_4$ 的 50 ml 反应混合物中使用 100 pmol 每种 oligo 和 50 ng 模板 DNA。对于这两个反应,温度循环如下进行:94 ℃ 2 分钟;94℃ (1 分钟),50℃ (1 分钟),72℃ (2 分钟) 30 个循环。

引物序列:

EcoRIHBcAg(s):

(5'-CCGGAATTCATGGACATTGACCCTTATAAAG-3') (SEQ ID NO: 88);

Lys-HBcAg(as):

(5'-CCTAGAGCCACCTTTGCCACCATCTTCTAAATTAGTACCCACCCAGGTAGC

-3') (SEQ ID NO:89);

Lys-HBcAg(s):

(5'-GAAGATGGTGGCAAAGGTGGCTCTAGGGACCTAGTAGTCAGTTATGTC-3') (SEQ ID NO:90);

HBcAg(1-149)Hind(as):

(5'-CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAG-3') (SEQ ID NO:91)。

为了通过PCR融合这两条PCR片段，在含有2单位Pwo聚合酶、0.1 mM dNTPs和2 mM $MgSO_4$的50 ml反应混合物中使用100 pmol引物EcoRIHBcAg(s)和HBcAg(1-149)Hind(as)，以及100 ng两种纯化的PCR片段。PCR循环条件为：94℃ 2分钟；94℃（1分钟），50℃（1分钟），72℃（2分钟）30个循环。装配的PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳分析，纯化，在适当缓冲液中用限制性内切酶EcoRI和HindIII消化19小时。将消化的DNA片段连接于EcoRI/HindIII-消化的pKK载体中，产生pKK-HBcAg-Lys表达载体。通过EcoRI/HindIII限制酶切分析和插入片段的DNA测序对PCR产物向载体内的插入进行分析。

实施例3

HBcAg-Lys的表达与纯化

用pKK-HBcAg-Lys转化大肠杆菌K802或JM109株。用1 ml细菌过夜培养物接种100 ml含100 μg/ml氨苄青霉素的LB培养基。培养液在37℃下培养4小时，直到600 nm的OD值大约达到0.8。添加IPTG至终浓度为1 mM诱导HBcAg-Lys的合成。诱导后，细菌在37℃下再振摇4小时。以5000×g离心15分钟收集细菌。将沉淀冻存于-80℃。融解沉淀，重悬浮于添加了200 μg/ml溶菌酶和10 μl Benzonase (Merck)的细菌裂解缓冲液(10 mM Na_2HPO_4, pH 7.0, 30 mM NaCl, 0.25% Tween-20, 10 mM EDTA)中。将细胞在室温下孵育30分钟，通过超声处理破碎。在IPTG诱导HBcAg-Lys表达中使用携带pKK-HBcAg-Lys表达质粒或对照质粒的大肠杆菌细胞。在加入IPTG之前，从携带

pKK-HBcAg-Lys 质粒的细菌培养液和携带对照质粒的培养液中采集样品。加入 IPTG 4 小时后，再次从含有 pKK-HBcAg-Lys 的培养液和对照培养液中采集样品。通过 SDS-PAGE，随后考马斯蓝染色，监测蛋白质的表达。

然后以 12,000×g 离心裂解液 30 分钟，除去不可溶的细胞碎片。使用抗 HBcAg 单克隆抗体(YVS1841，购自 Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, NY, USA)，通过 Western blotting 分析上清液和沉淀，表明显著量的 HBcAg-Lys 蛋白是可溶的。简言之，以 14,000 × g 离心来自表达 HBcAg-Lys 的大肠杆菌细胞和来自对照细胞的裂解液 30 分钟。分离上清液(=可溶级分)和沉淀(=不可溶级分)，用 SDS 样品缓冲液稀释至相同体积。通过 SDS-PAGE，随后用抗-HBcAg 单克隆抗体 YVS 1841 进行 Western blotting 分析样品。

对澄清的细胞裂解液进行分级梯度离心，其中使用的蔗糖分级梯度由 4 ml 65%蔗糖溶液、覆盖于其上的 3 ml 15%蔗糖溶液、以及随后的 4 ml 细菌裂解液组成。样品在 4℃下以 100,000×g 离心 3 小时。离心后，从梯度顶部采集 1 ml 级分，通过 SDS-PAGE，随后通过考马斯蓝染色分析。用考马斯蓝染色检测 HBcAg-Lys 蛋白。

HBcAg-Lys 蛋白在 15%与 65%蔗糖之间的界面处富集，表明已经形成衣壳颗粒。大多数细菌蛋白质仍存在于该梯度的不含蔗糖的上层中，因此 HBcAg-Lys 颗粒的分级梯度离心导致颗粒的富集和部分纯化。

HBcAg-Lys 的大规模表达和纯化如下进行。制备过夜培养物，方法是将单菌落接种到 100 ml LB（含 100 μg/ml 氨苄青霉素）中，37℃培养过夜。次日用 800 ml LB 氨苄青霉素培养基稀释 25 ml 预培养液，培养液生长到光密度 OD^{600} 为 0.6-0.8。然后用 1 mM IPTG 诱导培养液，再培养 4 小时。收集细胞，基本如上所述裂解。

然后纯化 HBcAg-Lys，方法是首先用硫酸铵(30%饱和)从澄清的细胞裂解液中沉淀蛋白质，然后将重新溶解的沉淀上样到凝胶过滤柱(Sephacryl S-400, Pharmacia)上。合并的级分再次用硫酸铵沉淀，重新溶解沉淀，再次上样到同一凝胶过滤柱上。最后合并级分并浓缩，

用 Bradford 试验(BioRad)测定其浓度。

实施例 4

不含游离半胱氨酸残基、含有插入的赖氨酸残基的 HBcAg 的构建

用下列方法构建如下肝炎核心抗原(HBcAg)，在此称为 HBcAg-lys-2cys-Mut，它在对应于 SEQ ID NO:25 中 48 和 107 的位点处不含半胱氨酸残基，而含有一个插入的赖氨酸残基。

如下引入所述两个突变，首先应用下列 PCR 引物组合分别扩增如实施例 2 所述制备的 HBcAg-Lys 基因的 3 个片段。用 PCR 方法和常规克隆技术制备 HBcAg-lys-2cys-Mut 基因。

简言之，用下列引物制备片段 1:

引物 1: EcoRIHBcAg(s)

CCGGAATTCATGGACATTGACCCTTATAAAG (SEQ ID NO:88)

引物 2: 48as

GTGCAGTATGGTGAGGTGAGGAATGCTCAGGAGACTC (SEQ ID NO:92)

用下列引物制备片段 2:

引物 3: 48s

GAGTCTCCTGAGCATTCCTCACCTCACCATACTGCAC (SEQ ID NO:93)

引物 4: 107as

CTTCCAAAAGTGAGGGAAGAAATGTGAAACCAC (SEQ ID NO:94)

用下列引物制备片段 3:

引物 5: HBcAg149hind-as

CGCGTCCCAAGCTTCTAAACAACAGTAGTCTCCGGAAGCGTTGATAG (SEQ ID NO:95)

引物 6: 107s

GTGGTTTCACATTTCTTCCCTCACTTTTGGAAG (SEQ ID NO:96)

然后用 PCR 引物 EcoRIHBcAg(s)和 107as 组合片段 1 和 2，产生片段 4。然后用引物 EcoRIHBcAg(s)和 HBcAg149hind-as 组合片段 4 和片段 3，产生全长基因。全长基因用 EcoRI (GAATTC)和 HindIII

(AAGCTT)酶消化，克隆到在相同限制酶切位点酶切的 pKK 载体(Pharmacia)中。HBcAg-lys-2cys-Mut 的表达与纯化如实施例 3 所述进行。

实施例 5

HBcAg1-185-Lys 的构建

肝炎核心抗原(HBcAg) 1-185 如实施例 2 所述进行修饰。通过基因工程方法用肽 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly (SEQ ID NO: 33)替换 c/e1 表位(残基 72-88)区的一部分(脯氨酸 79 和丙氨酸 80)，获得 HBcAg1-185-Lys 构建体(SEQ ID NO: 26)。引入的赖氨酸残基在其侧链上含有一个反应性氨基，可以用于 HBcAg 颗粒与含有游离半胱氨酸基团的任何抗原的分子间化学交联。用 PCR 方法和常规克隆技术制备 HBcAg1-185-Lys 基因。

如下插入 Gly-Gly-Lys-Gly-Gly 序列(SEQ ID NO: 33)：如以上实施例 2 所述，从 pEco63 扩增 HBcAg 基因的两条不同片段，随后通过 PCR 融合这两条片段，装配为全长基因。使用下列 PCR 引物组合：

片段 1:

引物 1: EcoRIHBcAg(s) ((SEQ ID NO: 88)，见实施例 2)

引物 2: Lys-HBcAg(as) ((SEQ ID NO: 89)，见实施例 2)

片段 2:

引物 3: Lys-HBcAg(s) ((SEQ ID NO: 90)，见实施例 2)

引物 4: HBcAgwtHindIIII

CGCGTCCCAAGCTTCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG (SEQ ID NO: 97)

装配:

引物 1: EcoRIHBcAg(s) ((SEQ ID NO: 88)，见实施例 2)

引物 2: HBcAgwtHindIIII (SEQ ID NO: 97)

装配的全长基因用 EcoRI (GAATTC)和 HindIII(AAGCTT)酶消化，克隆到用相同限制酶切位点酶切的 pKK 载体(Pharmacia)中。

实施例 6

肽表位在 HBcAg 的 MIR 区中的融合

将 HBcAg1-185 的残基 79 和 80 置换为具有序列 VNLTWSRASG (SEQ ID NO: 98)的表位 CεH3。CεH3 序列来源于人 IgE 重链第三恒定区的序列。用装配 PCR 法将该表位插入 HBcAg1-185 序列中。第一个 PCR 步骤中，用来源于 ATCC 克隆 pEco63 并用引物 HBcAg-wt EcoRI fwd 和 HBcAg-wt Hind III rev 扩增的 HBcAg1-185 基因作为两个不同反应的模板，扩增含有编码 CεH3 序列的序列元件的两条片段。然后在装配 PCR 反应的第二个 PCR 步骤中装配这两条片段。

第一个 PCR 步骤的引物组合：CεH3fwd 与 HBcAg-wt Hind III rev，和 HBcAg-wt EcoRI fwd 与 CεH3rev。在装配 PCR 反应中，第一个 PCR 步骤中分离的两条片段首先通过 3 个 PCR 循环装配，这一步不需要外部引物，之后将外部引物添加到反应混合物中进行下 25 个循环。外部引物：HBcAg-wt EcoRI fwd 和 HBcAg-wt Hind III rev。

为了在大肠杆菌中表达，利用 EcoRI 和 HindIII 位点将 PCR 产物克隆到 pKK223.3 中(见实施例 2)。嵌合 VLP 如实施例 2 所述在大肠杆菌中表达并纯化。从凝胶过滤中洗脱出 HBcAg1-185-CεH3 的洗脱体积显示融合蛋白装配为嵌合 VLP。

引物序列：

CεH3fwd:

5′ *GTT AAC TTG ACC TGG TCT CGT GCT TCT GGT* GCA TCC AGG GAT CTA GTA GTC 3′ (SEQ ID NO: 99)

V N L T W S R A S G A80 S R D L V V86

(SEQ ID NO: 100)

CεH3rev:

5′ *ACC AGA AGC ACG AGA CCA GGT CAA GTT AAC* ATC TTC CAA ATT ATT ACC CAC 3′

(SEQ ID NO: 101)

D78 E L N N G V72

(SEQ ID NO: 102)

HBcAg-wt EcoRI fwd:

5' *CCG*gaattcATGGACATTGACCCTTATAAAG (SEQ ID NO:103)

HBcAg-wt Hind III rev:

5' *CGCGTCC*CaagcttCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG (SEQ ID NO:104)

实施例 7

ghrelin 肽表位在 HBcAg 的 MIR 区中的融合

将 HBcAg1-185 的残基 79 和 80 置换为序列为 EHQRVQQRKE(SEQ ID NO: 56)的 ghrelin 肽表位。用如实施例 6 所述相同的策略设计两条重叠引物，通过装配 PCR 构建融合蛋白。将 PCR 产物克隆到 pKK223.3 载体内，并在大肠杆菌 K802 中表达。嵌合 VLP 如实施例 3 所述表达并纯化。

实施例 8

ghrelin 肽表位向 CP 延伸位点 19 处截短的 Qβ A1 蛋白 C 端的融合

在 pQβ10 作为模板的 PCR 反应中使用可与 Qβ A1 基因的 5'端退火的一条引物和可与 A1 基因的 3'端退火的一条引物，后者还含有编码序列为 KKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 52) 的 ghrelin 片段的额外序列元件。将 PCR 产物克隆到 pQβ10 内(Kozlovska T.M. 等人, Gene 137:133-37 (1993))，嵌合 VLP 如实施例 1 所述表达并纯化。

实施例 9

ghrelin 肽表位向 fr 外壳蛋白位点 2 与 3 之间的插入

利用标准分子生物学技术向 pFrd8 载体的 Bsp119I 位点中插入互补引物，该引物编码序列为 EHQRVQQRKE (SEQ ID NO: 56)的 ghrelin 肽序列，并且含有 Bsp119I 相容的末端和允许框内插入的其它核苷酸

(Pushko, P.等人, Prot. Eng. 6:883-91 (1993))。或者，在用 Bsp119I 消化后用 Klenow 补平 pFrd8 载体的突出端，在 Klenow 处理后将编码 ghrelin 肽鼠 ghrelin 肽序列的核苷酸和用于框内克隆的其它核苷酸连接到 pFrd8 中。通过测序对含有正确方向插入的克隆进行分析。嵌合融合蛋白在大肠杆菌 JM109 或大肠杆菌 K802 中的表达和纯化如 Pushko, P.等人, Prot. Eng. 6:883-91 (1993)所述进行，不同之处在于层析步骤用 Sepharose CL-4B 或 Sephacryl S-400 (Pharmacia) 进行。类似于实施例 1 中关于 Qβ所述的方法，细胞裂解液用硫酸铵沉淀，通过连续两个凝胶过滤纯化步骤纯化。

实施例 10

ghrelin 肽表位在载体 pOGS8111 中 Ty1 蛋白 p1 的位点 67 与 68 之间的插入

合成两条编码序列为 EHQRVQQRKE 的人 ghrelin 肽(SEQ ID NO:56)的互补寡核苷酸，其末端与 pOGS8111 的 NheI 位点相容。根据 EP06777111 所述添加额外核苷酸，用以框内插入编码鼠 ghrelin 表位的序列。位于插入表位侧翼的氨基酸 AS 和 SS 由改变的 NheI 位点(由于在 pOGS8111 的 TyA(d)基因中插入寡核苷酸产生的）编码。

为了如 EP0677111 和此处的参考文献所述表达嵌合 Ty VLP，用 POGS8111 转化酿酒酵母 MC2 株。如 EP0677111 所述通过蔗糖梯度超速离心纯化嵌合 Ty VLP。

实施例 11

ghrelin 肽表位向 1 型乳头瘤病毒(BPV-1)的主要衣壳蛋白 L1 中的插入

用编码序列为 EHQRVQQRKE (SEQ ID NO:56)的 ghrelin 表位序列置换 BPV-1 L1 基因的编码氨基酸 130-136 的序列，该基因 克隆在 pFastBac1 (GIBCO/BRL)载体内(Chackerian, B.等人, Proc. Natl. Acad. USA 96 : 2373-2378 (1999)) 。该构建体的序列通过核苷酸

序列分析证实。利用GIBCO/BRL杆状病毒系统，如厂商所述产生重组杆状病毒。如Kirnbauer, R.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 89:12180-84 (1992)和Greenstone, H.L.等人, Proc. Natl. Acad.Sci. 95:1800-05 (1998)所述从感染杆状病毒的Sf9细胞中纯化嵌合VLP。

实施例12

用与VLP融合的ghrelin-肽免疫小鼠

如实施例15所述用实施例7、9、10、11中产生的展示序列为EHQRVQQRKE (SEQ ID NO:56)的鼠ghrelin表位的嵌合VLP来免疫小鼠。如实施例14所述，用ghrelin特异的ELISA分析从免疫小鼠中获得的血清。

通过跟踪小鼠的体重增加及测量食物摄取检查该疫苗的效果。

实施例13

鼠ghrelin和鼠ghrelin肽与Qβ衣壳蛋白的偶联：ghrelin肽疫苗

化学合成下列ghrelin肽：

cGhrel: CGSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 77)
GhrelC: GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 105)
cGhrQ14: CGSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 106)
GhrQ14C: GSSFLSPEHQKAQRKESKKPPAKLQPRGC (SEQ ID NO: 107)
Ghrel24-33C GGSSFLSPEHQGC (SEQ ID NO: 132)
cGhrel42-51 CKKPPAKLQPR (SEQ ID NO: 133)
cGhrel31-40 CEHQKAQQRKE (SEQ ID NO: 134)
cGhrel31-41 CEHQKAQQRKES (SEQ ID NO: 135)
cGhrel28-37 CLSPEHQKAQQ (SEQ ID NO: 136)

它们含有添加的N端或C端半胱氨酸残基，以便与VLP和菌毛偶联，和如下所述用来与Qβ化学偶联。

5 ml 140μM Qβ衣壳蛋白在20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.4

中的溶液与 108 μl 65 mM SMPH (Pierce)水溶液在 25℃摇床上反应 30 分钟。反应溶液随后在 4℃下用 5 L 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2 透析两次各 2 小时。100 μl 透析的反应混合物然后与 28.6 μl 10 mM ghrelin 肽贮存液(DMSO 中)(肽/Qβ衣壳蛋白比为 1:10)反应。偶联反应在 15℃水浴中进行 2 小时。反应混合物随后在 4℃下用 5 L 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2 透析两次各 24 小时。

离心偶联产物，在还原性条件下用 16% SDS-PAGE 分析上清液和沉淀。凝胶用考马斯亮蓝染色。

ghrelin 肽与 fr 衣壳蛋白的偶联

120 μM fr 衣壳蛋白在 20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.2 中的溶液与 10 倍摩尔过量的由 DMSO 贮存液稀释的 SMPH (Pierce) 在 25℃摇床上反应 30 分钟。反应溶液随后在 4℃下用 1 L 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2 透析两次各 2 小时。透析的 fr 反应混合物然后与等摩尔浓度的 ghrelin 肽，或者以 1:2 的 ghrelin 肽/fr 比，在 16℃摇床上反应过夜。偶联产物通过 SDS-PAGE 分析。

ghrelin 肽与 HBcAg-Lys-2cys-Mut 的偶联

120 μM HBcAg-Lys-2cys-Mut 衣壳在 20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.2 中的溶液与 10 倍摩尔过量的由 DMSO 贮存液稀释的 SMPH (Pierce) 在 25℃摇床上反应 30 分钟。反应溶液随后在 4℃下用 1 L 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2 透析两次各 2 小时。透析的 HBcAg-Lys-2cys-Mut 反应混合物然后与等摩尔浓度的 ghrelin 肽，或者以 1:2 的 ghrelin 肽/HBcAg-Lys-2cys-Mut 比，在 16℃摇床上反应过夜。偶联产物通过 SDS-PAGE 分析。

ghrelin 肽与菌毛的偶联

125 μM 大肠杆菌 1 型菌毛在 20 mM Hepes, pH 7.2 中的溶液与 50 倍摩尔过量的由 DMSO 贮存液稀释的交联剂 SMPH 在摇床上室温反应 60 分钟。反应混合液在 PD-10 柱(Amersham-Pharmacia Biotech)上脱盐。合并从柱上洗脱下来的含蛋白质级分，脱盐、衍化的菌毛蛋白以等摩尔或者以 1:2 肽菌毛比与 ghrelin 肽在 16℃摇床上反应过夜。偶

联产物通过 SDS-PAGE 分析。

实施例 14

用 VLP-ghrelin 肽偶联物免疫小鼠

用与 Qβ偶联的 ghrelin 肽免疫小鼠

将实施例 13 所列的与 Qβ偶联的鼠 ghrelin 肽与明矾混合、在 IFA 中乳化，或者不含佐剂，用来免疫雌性 C57BL/6 小鼠。在第 0 天、第 14 天、第 28 天皮下注射 50 μg。免疫后，小鼠在第 14、21、28、42 天眼眶后采血，随后以一个月的间隔采血。血清用 ghrelin 蛋白特异的 ELISA 分析。

为了便于清楚地理解，已经通过说明和实施例详细地描述了本发明，本领域普通技术人员应当理解，在不影响本发明或其任何具体实施方案的范围的情况下，能够在较广或等同范围的条件、制剂和其它要素范围内修饰或改变本发明，这些修饰或改变包括在所附权利要求书的范围之内。

本说明书中提到的所有公开文件、专利和专利申请都代表本发明所属领域中技术人员的水平，均在此引用作为参考，如同具体、单独地引用每个公开文本、专利和专利申请作为参考。

实施例 15

C-Ghrelin 和 Ghrelin-GC 与 Qβ衣壳蛋白的偶联

2 ml 2.0 mg/ml Qβ衣壳蛋白在 20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.2 中的溶液与 114.4 μl SMPH (Pierce)溶液(来自溶于 DMSO 的 50 mM 贮存液)在 25℃下反应 30 分钟。反应溶液随后在 4℃下用 2 L 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.2 透析两次各 2 小时。

透析、衍化的 Qβ VLP 随后与鼠 C-Ghrelin (SEQ ID NO: 77)或鼠 Ghrelin-GC 肽(SEQ ID NO: 105)在 20 mM Hepes, 150 mMNaCI pH 7.2 中 15℃反应 2 小时。偶联反应以多个等份进行，其中 1 ml 衍化的 Qβ VLP (浓度为 2 mg/ml)与 286 μl 10 mM 肽溶液反应。向偶联反应中

加入10%乙腈。反应溶液在4℃下用2 L 20 mM Hepes，150 mM NaCl，pH 7.2透析一次2小时，然后透析过夜。

偶联产物用16% SDS-PAGE凝胶分析。凝胶用考马斯亮蓝染色。结果显示在图1中。在考马斯亮蓝染色的凝胶中能够检测到偶联产物，并清楚地证明C-Ghrelin或Ghrelin-GC与Qβ衣壳蛋白的共价偶联。对应于每个亚单位偶联1、2、3或4个肽的偶联带用箭头指出。

图1显示鼠C-Ghrelin或鼠Ghrelin-GC与Qβ衣壳蛋白反应产生的偶联产物。第2道和第4道分别显示Qβ-C-Ghrelin和Ghrelin-GC-Qβ的可溶性级分中的偶联产物。在不可溶级分中几乎没有产物。

实施例16

用与Qβ衣壳蛋白偶联的C-Ghrelin或Ghrelin-GC免疫小鼠

对雌性C57BL/6小鼠(每组5只)接种与Qβ衣壳蛋白偶联的鼠C-Ghrelin (SEQ ID: No. 77)或鼠Ghrelin-GC (SEQ ID: No. 105)。50 μg来自每个样本的透析的疫苗用PBS稀释到200 μl的体积，在第0、14、42天皮下注射(腹部两侧各100 μl)。该疫苗不加其它任何佐剂施用。一组小鼠用PBS免疫作为对照。对小鼠在第0、14、21、42天眼眶后采血，血清用Ghrelin特异的ELISA分析(实施例17概述)。此外，在实验过程中定期监测小鼠的体重和食物消耗(实施例18概述)。

实施例17

用ELISA检测ghrelin特异性抗体

ELISA板用浓度为20 μg/ml的丝氨酸-辛酰化的鼠ghrelin (Bachem，产品号H-4862)包被。封闭平板，然后与连续稀释的第14、21、42天的小鼠血清一起孵育。用酶标记的抗小鼠IgG抗体检测结合的抗体。也检测同一小鼠的免疫前血清作为对照(图2)。

在用Qβ-C-Ghrelin或Ghrelin-CG-Qβ免疫的小鼠中，第21天分

别达到13000和8000的平均滴度(图2)。免疫前血清或来自PBS免疫小鼠的血清显示与ghrelin没有任何反应性。这清楚地证明，ghrelin-VLP偶联物即使是自身蛋白质仍然能够诱导针对ghrelin的高抗体滴度。

实施例18

使用与Qβ衣壳蛋白偶联的C-Ghrelin或Ghrelin-GC

进行的效能实验

如实施例16所述，对雌性C57BL/6小鼠(每组5只)接种与Qβ衣壳蛋白偶联的鼠C-Ghrelin或Ghrelin-GC。用PBS免疫小鼠作为对照。在第0-14天，所有小鼠都给予正常饮食。随后给予所有小鼠高脂肪(45%)饮食，以促进饮食诱导的肥胖的发展。食物和水随意给予。监测各小鼠的体重变化，在免疫后也定期监测(免疫后第5、11、14、21、28、35、40、49和55天)每个笼子(即组)中食物与水的消耗(见图3)。

在用鼠Qβ-C-Ghrelin或鼠Ghrelin-CG-Qβ免疫的小鼠中，与PBS免疫的对照小鼠相比，食物摄入平均减少约30-40%(图3)。这清楚地证明，ghrelin-VLP偶联物能够抑制食欲并减少食物消耗。

实施例19

使用与Qβ衣壳蛋白偶联的C-Ghrelin或Ghrelin-GC

在肥胖症动物模型中进行的效能实验

对雌性C57BL/6 ob/ob小鼠(每组5只)接种与Qβ衣壳蛋白偶联的鼠C-Ghrelin或Ghrelin-GC。对照小鼠用PBS或单独的Qβ VLP免疫。50 μg透析的疫苗或对照蛋白质用200 μl体积的PBS稀释，在第0天皮下注射(腹部两侧各100 μl)，其中含有或不含明矾。对小鼠在第14、28、42天用相应的制剂加强。

对小鼠在第0、14、21、42、56、70天眼眶后采血，然后以一个月的间隔采血。如实施例17所述，用Ghrelin特异的ELISA分析血清中的ghrelin特异性抗体。如果在实验期间ghrelin特异性抗体滴

度显著下降，则对小鼠进行加强免疫。如实施例 18 所述，通过测量随意摄取条件下的食物消耗及跟踪小鼠的体重增加确定疫苗的效果。

实施例 20

AP205 外壳蛋白基因的克隆

AP205 外壳蛋白(CP)的 cDNA (SEQ ID NO: 28)由两条 cDNA 片段装配而成，这两条片段利用反转录 PCR 技术由噬菌体 AP205 RNA 产生，并且克隆到商品化质粒 pCR 4-TOPO 内进行测序。反转录技术为相关领域普通技术人员所周知。质粒 p205-246 中所含的第一条片段含有位于 CP 序列上游的 269 个核苷酸和编码 CP 前 24 个 N 端氨基酸的 74 个核苷酸。质粒 p205-262 中所含的第二条片段含有编码 CP 的氨基酸 12-131 的 364 个核苷酸和位于 CP 序列下游的另外 162 个核苷酸。p205-246 和 p205-262 均由 J. Klovins 惠赠。

质粒 283.-58 由两步 PCR 设计，是为了将来自质粒 p205-246 和 p205-262 的两条 CP 片段融合于一个全长 CP 序列内。

为了向质粒 pQb185 内克隆，使用含有 NcoI 位点的上游引物 p1.44，或者为了向质粒 pQb10 内克隆，使用含有 XbaI 位点的上游引物 p1.45，和含有 HindIII限制位点下游引物 p1.46(限制性内切酶识别序列用下划线标出)：

p1.44 5′-AA<u>CC ATG G</u>CA AAT AAG CCA ATG CAA CCG-3′ (SEQ ID NO: 139)

p1.45 5′-AA<u>TCTAGA</u>ATTTTCTGCGCACCCATCCCGG-3′ (SEQ ID NO: 140)

p1.46 5′-AA<u>AAGC TT</u>A AGC AGT AGT ATC AGA CGA TAC G-3′ (SEQ ID NO: 141)

在第一个 PCR 中使用了另外两条引物，在 p205-262 所含片段的 5′端退火的 p1.47，和在质粒 p205-246 所含片段的 3′端退火的 p1.48，用来扩增这些片段。引物 p1.47 和 p1.48 彼此互补。

p1.47: 5′-GAGTGATCCAACTCGTTTATCAACTACATTTTCAGCAAGTCTG-3′

(SEQ ID NO:142)

p1.48: 5′-CAGACTTGCTGAAAATGTAGTTGATAAACGAGTTGGATCACTC-3′ (SEQ ID NO:143)

前两个PCR反应产生两条片段。第一条片段用引物p1.45和p1.48和模板p205-246产生。第二条片段用引物p1.47和p1.46和模板p205-262产生。这两条片段都作为模板用于第二个PCR反应，即剪接重叠延伸，其中使用引物组合p1.45和p1.46或p1.44和p1.46。这两个二步PCR反应的产物分别用XbaI或NcoI和HindIII消化，利用相同的限制酶切位点将其分别克隆到pQb10或pQb185内，这是在大肠杆菌色氨酸操纵子启动子控制下的两种pGEM衍生的表达载体。

获得两种质粒，pAP283-58 (SEQ ID NO:27)和pAP281-32 (SEQ ID NO:30)，前者在pQb10中含有编码野生型AP205 CP (SEQ ID NO:28) 的基因，后者在pQb185中含有突变Pro5→Thr (SEQ ID NO:29)。外壳蛋白序列通过DNA测序证实。pAP283-58含有位于CP的ATG密码子上游和XbaI位点下游的49个核苷酸，并且含有推断的外壳蛋白mRNA的原始核糖体结合位点。

实施例21

重组AP205 VLP的表达与纯化

A. 重组AP205 VLP的表达

大肠杆菌JM109用质粒pAP283-58转化。在5 ml含有20 μg/ml氨苄青霉素的LB液体培养基中接种单菌落，不加振摇在37℃下孵育16-24小时。

制备的接种物用100-300 ml含有20 μg/ml氨苄青霉素的LB培养基1:100稀释，不加振摇在37℃下孵育过夜。获得的第二种接种物用含有0.2%葡萄糖和缓冲磷酸盐的2TY培养基1:50稀释，并且在摇床上37℃孵育过夜。离心收集细胞，冻存于-80℃。

B. 重组AP205 VLP的纯化

溶液与缓冲液:

裂解缓冲液

50mM Tris-HCl pH 8.0，含 5mM EDTA, 0.1% tritonX100 和 5 mg/ml PMSF。

SAS

饱和硫酸铵水溶液。

缓冲液 NET

20 mM Tris-HCl, pH 7.8，含 5mM EDTA 和 150 mM NaCl。

PEG

40% (w/v)聚乙二醇 6000，溶于 NET

裂解:

将冷冻细胞以 2 ml/g 细胞的浓度重悬浮于裂解缓冲液中。将混合物以 22 KH 超声处理 5 次各 15 秒，间隔 1 分钟，在冰上冷却该溶液。然后用 F34-6-38 转子(Ependorf)以 12 000 rpm 离心裂解液 20 分钟。除非另外说明，以下所述的离心步骤全都使用同一转子进行。上清液贮存于 4℃，而细胞碎片用裂解缓冲液洗涤 2 次。离心后合并裂解液的上清液和洗涤级分。

可以进一步利用硫酸铵沉淀纯化 AP205 VLP。第一步，选择 AP205 VLP 不会沉淀的硫酸铵浓度。弃去获得的沉淀。第二步，选择 AP205 VLP 定量沉淀的硫酸铵浓度，通过离心(14 000 rpm，20 分钟)从该沉淀步骤获得的沉淀中分离 AP205 VLP。将获得的沉淀溶解于 NET 缓冲液中。

层析:

将来自合并上清液的衣壳蛋白上样到 Sepharose 4B 柱(2.8×70 cm)上，用 NET 缓冲液以 4 ml/小时/级分的速度洗脱。合并级分 28-40，用 60%饱和的硫酸铵沉淀。这些级分在沉淀之前使用 AP205 特异性抗血清通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 分析。将离心分离的沉淀重新溶解于 NET 缓冲液中，上样到 Sepharose 2B 柱(2.3×65 cm)，以 3 ml/小时/级分的流速洗脱。这些级分通过 SDS-PAGE 分析，收集级分 44-50，合并，用 60%饱和的硫酸铵沉淀。将离心分离的沉淀重新溶解于 NET 缓冲液中，用 Sepharose 6B 柱(2.5×47 cm)纯化，以 3 ml/小

时/级分的流速洗脱。这些级分通过 SDS-PAGE 分析。合并级分 23-27，将盐浓度调节为 0.5 M，用 PEG 6000 沉淀（加入 40%贮存水溶液，至终浓度为 13.3%）。将离心分离的沉淀重新溶解于 NET 缓冲液中，上样到与以上相同的 Sepharose 2B 柱上，以相同的方式洗脱。合并级分 43-53，用 60%饱和的硫酸铵沉淀。将离心分离的沉淀重新溶解于水中，获得的蛋白质溶液用水充分透析。每克细胞能够分离约 10 mg 纯化的蛋白质。

用电子显微镜检查病毒样颗粒，显示它们与噬菌体颗粒相同。

为了便于清楚地理解，在此已经通过举例说明和实施例全面详细地描述了本发明，本领域普通技术人员应当理解，在不影响本发明或其任何具体实施方案的范围的情况下，能够在较广或等同范围的条件、制剂和其它参数内修饰或改变本发明，这些修饰或改变包括在所附权利要求书的范围之内。

本说明书中提到的所有公开文件、专利和专利申请表明了本发明所属领域中技术人员的水平，均在此引用作为参考，如同具体、单独地引用每个公开文本、专利和专利申请作为参考。

<110> 赛托斯生物技术公司
马丁·F·巴克曼 (Bachmann, Martin F)
阿尔玛·富卢里贾 (Fulurija, Alma)

<120> Grehlin-载体偶联物

<130> PA040WO

<150> US 60/396,638
<151> 2002-07-19

<160> 146

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 172
<212> PRT
<213> 大肠杆菌

<400> 1

Met Ala Val Val Ser Phe Gly Val Asn Ala Ala Pro Thr Thr Pro Gln
1 5 10 15

Gly Gln Gly Arg Val Thr Phe Asn Gly Thr Val Val Asp Ala Pro Cys
20 25 30

Ser Ile Ser Gln Lys Ser Ala Asp Gln Ser Ile Asp Phe Gly Gln Leu
35 40 45

Ser Lys Ser Phe Leu Ala Asn Asp Gly Gln Ser Lys Pro Met Asn Leu
50 55 60

Asp Ile Glu Leu Val Asn Cys Asp Ile Thr Ala Phe Lys Asn Gly Asn
65 70 75 80

Ala Lys Thr Gly Ser Val Lys Leu Ala Phe Thr Gly Pro Thr Val Ser
85 90 95

Gly His Pro Ser Glu Leu Ala Thr Asn Gly Gly Pro Gly Thr Ala Ile
100 105 110

Met Ile Gln Ala Ala Gly Lys Asn Val Pro Phe Asp Gly Thr Glu Gly
115 120 125

Asp Pro Asn Leu Leu Lys Asp Gly Asp Asn Val Leu His Tyr Thr Thr
130 135 140

Val Gly Lys Lys Ser Ser Asp Gly Asn Ala Gln Ile Thr Glu Gly Ala
145 150 155 160

Phe Ser Gly Val Ala Thr Phe Asn Leu Ser Tyr Gln
165 170

<210> 2
<211> 182
<212> PRT
<213> 大肠杆菌

<400> 2

Met Lys Ile Lys Thr Leu Ala Ile Val Val Leu Ser Ala Leu Ser Leu
1 5 10 15

Ser Ser Thr Ala Ala Leu Ala Ala Ala Thr Thr Val Asn Gly Gly Thr
20 25 30

Val His Phe Lys Gly Glu Val Val Asn Ala Ala Cys Ala Val Asp Ala
35 40 45

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

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

Leu Asn Asp Cys Asp Thr Asn Val Ala Ser Lys Ala Ala Val Ala Phe
85 90 95

Leu Gly Thr Ala Ile Asp Ala Gly His Thr Asn Val Leu Ala Leu Gln
100 105 110

Ser Ser Ala Ala Gly Ser Ala Thr Asn Val Gly Val Gln Ile Leu Asp
115 120 125

Arg Thr Gly Ala Ala Leu Thr Leu Asp Gly Ala Thr Phe Ser Ser Glu
130 135 140

Thr Thr Leu Asn Asn Gly Thr Asn Thr Ile Pro Phe Gln Ala Arg Tyr
145 150 155 160

Phe Ala Thr Gly Ala Ala Thr Pro Gly Ala Ala Asn Ala Asp Ala Thr
165 170 175

Phe Lys Val Gln Tyr Gln
180

<210> 3
<211> 853
<212> DNA
<213> 大肠杆菌

<400> 3
acgtttctgt ggctcgacgc atcttcctca ttcttctctc caaaaaccac ctcatgcaat 60

ataaacatct ataaataaag ataacaaata gaatattaag ccaacaaata aactgaaaaa 120

gtttgtccgc gatgctttac ctctatgagt caaaatggcc ccaatgtttc atcttttggg 180

ggaaactgtg cagtgttggc agtcaaactc gttgacaaac aaagtgtaca gaacgactgc 240

ccatgtcgat ttagaaatag ttttttgaaa ggaaagcagc atgaaaatta aaactctggc 300

aatcgttgtt ctgtcggctc tgtccctcag ttctacgacg gctctggccg ctgccacgac 360

ggttaatggt gggaccgttc actttaaagg ggaagttgtt aacgccgctt gcgcagttga 420

tgcaggctct gttgatcaaa ccgttcagtt aggacaggtt cgtaccgcat cgctggcaca 480

ggaaggagca accagttctg ctgtcggttt taacattcag ctgaatgatt gcgataccaa 540

tgttgcatct aaagccgctg ttgccttttt aggtacggcg attgatgcgg gtcataccaa 600

cgttctggct ctgcagagtt cagctgcggg tagcgcaaca aacgttggtg tgcagatcct 660

ggacagaacg ggtgctgcgc tgacgctgga tggtgcgaca tttagttcag aaacaaccct 720

gaataacgga accaatacca ttccgttcca ggcgcgttat tttgcaaccg ggccgcaac 780

cccgggtgct gctaatgcgg atgcgacctt caaggttcag tatcaataac ctacctaggt 840

tcagggacgt tca 853

<210> 4
<211> 132
<212> PRT
<213> 噬菌体Qβ

<400> 4

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Lys
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 5

<211> 329
<212> PRT
<213> 噬菌体Qβ

<400> 5

Met Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly
1 5 10 15

Lys Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu
100 105 110

Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln
115 120 125

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

Ser Lys Pro Asp Pro Val Ile Pro Asp Pro Pro Ile Asp Pro Pro Pro
145 150 155 160

Gly Thr Gly Lys Tyr Thr Cys Pro Phe Ala Ile Trp Ser Leu Glu Glu
165 170 175

Val Tyr Glu Pro Pro Thr Lys Asn Arg Pro Trp Pro Ile Tyr Asn Ala
180 185 190

Val Glu Leu Gln Pro Arg Glu Phe Asp Val Ala Leu Lys Asp Leu Leu
195 200 205

Gly Asn Thr Lys Trp Arg Asp Trp Asp Ser Arg Leu Ser Tyr Thr Thr
210 215 220

Phe Arg Gly Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Ala Thr Tyr
225 230 235 240

Leu Ala Thr Asp Gln Ala Met Arg Asp Gln Lys Tyr Asp Ile Arg Glu
245 250 255

Gly Lys Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asn Ile Glu Arg Phe Ile Tyr Leu
260 265 270

Lys Ser Ile Asn Ala Tyr Cys Ser Leu Ser Asp Ile Ala Ala Tyr His
275 280 285

Ala Asp Gly Val Ile Val Gly Phe Trp Arg Asp Pro Ser Ser Gly Gly
290 295 300

Ala Ile Pro Phe Asp Phe Thr Lys Phe Asp Lys Thr Lys Cys Pro Ile
305 310 315 320

Gln Ala Val Ile Val Val Pro Arg Ala
325

<210> 6
<211> 129
<212> PRT
<213> 噬菌体 R17

<400> 6

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
115 120 125

Tyr

<210> 7
<211> 130
<212> PRT

<213> 噬菌体 fr

<400> 7

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

Gly Asp Val Lys Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Asn Asn Arg Lys Tyr Thr Val Lys Val Glu
50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Val Gln Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Met Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Val Phe
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Cys Ala Leu Ile Val Lys Ala Leu Gln Gly Thr
100 105 110

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

Ile Tyr
130

<210> 8
<211> 130
<212> PRT
<213> 噬菌体 GA

<400> 8

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

Asn Val Thr Val Val Pro Val Ser Asn Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20 25 30

Leu Ser Asn Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Arg Val Thr Ala Ser Tyr
35 40 45

Arg Ala Ser Gly Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Ala Ile Lys Leu Glu Val
50 55 60

Pro Lys Ile Val Thr Gln Val Val Asn Gly Val Glu Leu Pro Gly Ser
65 70 75 80

Ala Trp Lys Ala Tyr Ala Ser Ile Asp Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala

85 90 95

Ala Thr Asp Asp Val Thr Val Ile Ser Lys Ser Leu Ala Gly Leu Phe
100 105 110

Lys Val Gly Asn Pro Ile Ala Glu Ala Ile Ser Ser Gln Ser Gly Phe
115 120 125

Tyr Ala
130

<210> 9
<211> 132
<212> PRT
<213> 噬菌体 SP

<400> 9

Met Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly
1 5 10 15

Asp Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys
50 55 60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe
85 90 95

Thr Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 10
<211> 329
<212> PRT
<213> 噬菌体 SP

<400> 10

Ala Lys Leu Asn Gln Val Thr Leu Ser Lys Ile Gly Lys Asn Gly Asp
1 5 10 15

Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Phe Lys Val
50 55 60

Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Arg Asp Ala Cys Asp
65 70 75 80

Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Phe Ala Asp Val Thr Leu Ser Phe Thr
85 90 95

Ser Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu Ala
100 105 110

Ala Leu Leu Ala Asp Pro Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu Asn
115 120 125

Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Val Ala Ser Ser Gly Gly Gly Asp
130 135 140

Asn Pro Ser Asp Pro Asp Val Pro Val Val Pro Asp Val Lys Pro Pro
145 150 155 160

Asp Gly Thr Gly Arg Tyr Lys Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Leu Gly
165 170 175

Ser Ile Tyr Glu Val Gly Lys Glu Gly Ser Pro Asp Ile Tyr Glu Arg
180 185 190

Gly Asp Glu Val Ser Val Thr Phe Asp Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
195 200 205

Gly Asn Thr Asn Trp Arg Asn Trp Asp Gln Arg Leu Ser Asp Tyr Asp
210 215 220

Ile Ala Asn Arg Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Ile Asp Leu Asp
225 230 235 240

Ala Thr Ala Met Gln Ser Asp Asp Phe Val Leu Ser Gly Arg Tyr Gly
245 250 255

Val Arg Lys Val Lys Phe Pro Gly Ala Phe Gly Ser Ile Lys Tyr Leu
260 265 270

Leu Asn Ile Gln Gly Asp Ala Trp Leu Asp Leu Ser Glu Val Thr Ala
275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Gln Phe Asn Ser Ala Asn Cys Pro
305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Ile Ile Pro Ser
325

<210> 11
<211> 130

<212> PRT
<213> 噬菌体 MS2

<400> 11

Met Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asp Asn Gly Gly Thr
1 5 10 15

Gly Asp Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu
20 25 30

Trp Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser
35 40 45

Val Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu
50 55 60

Val Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val
65 70 75 80

Ala Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Met Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe
85 90 95

Ala Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu
100 105 110

Leu Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly
115 120 125

Ile Tyr
130

<210> 12
<211> 133
<212> PRT
<213> 噬菌体 M11

<400> 12

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Lys Gly
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asp Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly

20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ser Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Val Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
100 105 110

Leu Gln Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Val Asn Ala Ile Asp Asn
115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 13
<211> 133
<212> PRT
<213> 噬菌体 MX1

<400> 13

Met Ala Lys Leu Gln Ala Ile Thr Leu Ser Gly Ile Gly Lys Asn Gly
1 5 10 15

Asp Val Thr Leu Asn Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
20 25 30

Val Ala Ala Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
50 55 60

Val Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ser Cys Thr Ala Ser Gly Thr
65 70 75 80

Cys Asp Pro Ser Val Thr Arg Ser Ala Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser
85 90 95

Phe Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Leu Val Arg Thr Glu
100 105 110

Leu Lys Ala Leu Leu Ala Asp Pro Met Leu Ile Asp Ala Ile Asp Asn
115 120 125

Leu Asn Pro Ala Tyr
    130

<210> 14
<211> 330
<212> PRT
<213> 噬菌体 NL95

<400> 14

Met Ala Lys Leu Asn Lys Val Thr Leu Thr Gly Ile Gly Lys Ala Gly
1   5   10   15

Asn Gln Thr Leu Thr Leu Thr Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly
            20   25   30

Val Ala Ser Leu Ser Glu Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg
        35   40   45

Val Thr Val Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys
    50   55   60

Val Gln Ile Lys Leu Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Lys Asp Ala Cys
65   70   75   80

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

Thr Ser Tyr Ser Thr Glu Arg Glu Arg Ala Leu Ile Arg Thr Glu Leu
            100   105   110

Ala Ala Leu Leu Lys Asp Asp Leu Ile Val Asp Ala Ile Asp Asn Leu
        115   120   125

Asn Pro Ala Tyr Trp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Gly
    130   135   140

Asn Asn Pro Tyr Pro Gly Val Pro Asp Ser Pro Asn Val Lys Pro Pro
145   150   155   160

Gly Gly Thr Gly Thr Tyr Arg Cys Pro Phe Ala Cys Tyr Arg Arg Gly
                165   170   175

Glu Leu Ile Thr Glu Ala Lys Asp Gly Ala Cys Ala Leu Tyr Ala Cys
            180   185   190

Gly Ser Glu Ala Leu Val Glu Phe Glu Tyr Ala Leu Glu Asp Phe Leu
        195   200   205

Gly Asn Glu Phe Trp Arg Asn Trp Asp Gly Arg Leu Ser Lys Tyr Asp
    210   215   220

Ile Glu Thr His Arg Arg Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Val Asp Leu Asp
225 230 235 240

Ala Ser Val Met Gln Ser Asp Glu Tyr Val Leu Ser Gly Ala Tyr Asp
245 250 255

Val Val Lys Met Gln Pro Pro Gly Thr Phe Asp Ser Pro Arg Tyr Tyr
260 265 270

Leu His Leu Met Asp Gly Ile Tyr Val Asp Leu Ala Glu Val Thr Ala
275 280 285

Tyr Arg Ser Tyr Gly Met Val Ile Gly Phe Trp Thr Asp Ser Lys Ser
290 295 300

Pro Gln Leu Pro Thr Asp Phe Thr Arg Phe Asn Arg His Asn Cys Pro
305 310 315 320

Val Gln Thr Val Ile Val Ile Pro Ser Leu
325 330

<210> 15
<211> 129
<212> PRT
<213> 噬菌体 f2

<400> 15

Ala Ser Asn Phe Thr Gln Phe Val Leu Val Asn Asp Gly Gly Thr Gly
1 5 10 15

Asn Val Thr Val Ala Pro Ser Asn Phe Ala Asn Gly Val Ala Glu Trp
20 25 30

Ile Ser Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ala Tyr Lys Val Thr Cys Ser Val
35 40 45

Arg Gln Ser Ser Ala Gln Asn Arg Lys Tyr Thr Ile Lys Val Glu Val
50 55 60

Pro Lys Val Ala Thr Gln Thr Val Gly Gly Val Glu Leu Pro Val Ala
65 70 75 80

Ala Trp Arg Ser Tyr Leu Asn Leu Glu Leu Thr Ile Pro Ile Phe Ala
85 90 95

Thr Asn Ser Asp Cys Glu Leu Ile Val Lys Ala Met Gln Gly Leu Leu
100 105 110

Lys Asp Gly Asn Pro Ile Pro Ser Ala Ile Ala Ala Asn Ser Gly Ile
115 120 125

Tyr

<210> 16
<211> 128
<212> PRT
<213> 噬菌体 PP7

<400> 16

Met Ser Lys Thr Ile Val Leu Ser Val Gly Glu Ala Thr Arg Thr Leu
1 5 10 15

Thr Glu Ile Gln Ser Thr Ala Asp Arg Gln Ile Phe Glu Glu Lys Val
20 25 30

Gly Pro Leu Val Gly Arg Leu Arg Leu Thr Ala Ser Leu Arg Gln Asn
35 40 45

Gly Ala Lys Thr Ala Tyr Arg Val Asn Leu Lys Leu Asp Gln Ala Asp
50 55 60

Val Val Asp Cys Ser Thr Ser Val Cys Gly Glu Leu Pro Lys Val Arg
65 70 75 80

Tyr Thr Gln Val Trp Ser His Asp Val Thr Ile Val Ala Asn Ser Thr
85 90 95

Glu Ala Ser Arg Lys Ser Leu Tyr Asp Leu Thr Lys Ser Leu Val Ala
100 105 110

Thr Ser Gln Val Glu Asp Leu Val Val Asn Leu Val Pro Leu Gly Arg
115 120 125

<210> 17
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 噬菌体 Qβ240 突变体

<400> 17

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 18
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 噬菌体 Qβ243 突变体

<400> 18

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Lys Ile Gly Lys Asp Gly Lys
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 19

<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 噬菌体 Qβ250 突变体

<400> 19

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Arg Asp Gly Lys
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 20
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 噬菌体 Qβ251 突变体

<400> 20

Ala Lys Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val

50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 21
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 噬菌体 Qβ259 突变体

<400> 21

Ala Arg Leu Glu Thr Val Thr Leu Gly Asn Ile Gly Lys Asp Gly Arg
1 5 10 15

Gln Thr Leu Val Leu Asn Pro Arg Gly Val Asn Pro Thr Asn Gly Val
20 25 30

Ala Ser Leu Ser Gln Ala Gly Ala Val Pro Ala Leu Glu Lys Arg Val
35 40 45

Thr Val Ser Val Ser Gln Pro Ser Arg Asn Arg Lys Asn Tyr Lys Val
50 55 60

Gln Val Lys Ile Gln Asn Pro Thr Ala Cys Thr Ala Asn Gly Ser Cys
65 70 75 80

Asp Pro Ser Val Thr Arg Gln Lys Tyr Ala Asp Val Thr Phe Ser Phe
85 90 95

Thr Gln Tyr Ser Thr Asp Glu Glu Arg Ala Phe Val Arg Thr Glu Leu
100 105 110

Ala Ala Leu Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ile Asp Ala Ile Asp Gln Leu
115 120 125

Asn Pro Ala Tyr
130

<210> 22
<211> 185
<212> PRT
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 22

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
100 105 110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg
145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180 185

<210> 23
<211> 212
<212> PRT
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 23

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr
1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile

20 25 30

Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu
35 40 45

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser
50 55 60

Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His
65 70 75 80

His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp Leu Met Asn
85 90 95

Leu Ala Thr Trp Val Gly Gly Asn Leu Glu Asp Pro Val Ser Arg Asp
100 105 110

Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Thr Thr Val Gly Leu Lys Phe Arg Gln
115 120 125

Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val
130 135 140

Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala
145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr
165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro
180 185 190

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Arg
195 200 205

Glu Ser Gln Cys
210

<210> 24
<211> 188
<212> PRT
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 24

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ser Ser Tyr Gln Leu Leu
1 5 10 15

Asn Phe Leu Pro Leu Asp Phe Phe Pro Asp Leu Asn Ala Leu Val Asp
20 25 30

Thr Ala Thr Ala Leu Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Gly Arg Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Cys Trp Asp Glu
50 55 60

Leu Thr Lys Leu Ile Ala Trp Met Ser Ser Asn Ile Thr Ser Glu Gln
65 70 75 80

Val Arg Thr Ile Ile Val Asn His Val Asn Asp Thr Trp Gly Leu Lys
85 90 95

Val Arg Gln Ser Leu Trp Phe His Leu Ser Cys Leu Thr Phe Gly Gln
100 105 110

His Thr Val Gln Glu Phe Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Glu His Thr Val Ile Arg Arg Arg Gly Gly Ala Arg Ala Ser Arg Ser
145 150 155 160

Pro Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro
165 170 175

Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Ser Thr Asn Cys
180 185

<210> 25
<211> 185
<212> PRT
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 25

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala
65 70 75 80

Ser Arg Asp Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
85 90 95

Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
100 105 110

Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
115 120 125

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
130 135 140

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg
145 150 155 160

Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg
165 170 175

Arg Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
180 185

<210> 26
<211> 152
<212> PRT
<213> 乙型肝炎病毒

<400> 26

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp
20 25 30

Thr Ala Ala Ala Leu Tyr Arg Asp Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
35 40 45

Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Asp
50 55 60

Leu Met Thr Leu Ala Thr Trp Val Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65 70 75 80

Lys Gly Gly Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Val
85 90 95

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

Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp
115 120 125

Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser
130 135 140

Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val
145 150

<210> 27
<211> 3635
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒 pAP283-58

<400> 27
cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga 60

gctcgcccgg ggatcctcta gaattttctg cgcacccatc ccgggtggcg cccaaagtga 120

ggaaaatcac atggcaaata agccaatgca accgatcaca tctacagcaa ataaaattgt 180

gtggtcggat ccaactcgtt tatcaactac attttcagca agtctgttac gccaacgtgt 240

taaagttggt atagccgaac tgaataatgt ttcaggtcaa tatgtatctg tttataagcg 300

tcctgcacct aaaccggaag gttgtgcaga tgcctgtgtc attatgccga atgaaaacca 360

atccattcgc acagtgattt cagggtcagc cgaaaacttg gctaccttaa aagcagaatg 420

ggaaactcac aaacgtaacg ttgacacact cttcgcgagc ggcaacgccg gtttgggttt 480

ccttgaccct actgcggcta tcgtatcgtc tgatactact gcttaagctt gtattctata 540

gtgtcaccta aatcgtatgt gtatgataca taaggttatg tattaattgt agccgcgttc 600

taacgacaat atgtacaagc ctaattgtgt agcatctggc ttactgaagc agaccctatc 660

atctctctcg taaactgccg tcagagtcgg tttggttgga cgaaccttct gagtttctgg 720

taacgccgtt ccgcaccccg gaaatggtca ccgaaccaat cagcagggtc atcgctagcc 780

agatcctcta cgccggacgc atcgtggccg gcatcaccgg cgcacacagt gcggttgctg 840

gcgcctatat cgccgacatc accgatgggg aagatcgggc tcgccacttc gggctcatga 900

gcgcttgttt cggcgtgggt atggtggcag gccccgtggc cgggggactg ttgggcgcca 960

tctccttgca tgcaccattc cttgcggcgg cggtgcttca acggcctcaa cctactactg 1020

ggctgcttcc taatgcagga gtcgcataag ggagagcgtc gatatggtgc actctcagta 1080

caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc aactccgcta tcgctacgtg actgggtcat 1140

ggctgcgccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt gtctgctccc 1200

ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc 1260

accgtcatca ccgaaacgcg cgaggcagct tgaagacgaa agggcctcgt gatacgccta 1320

tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg 1380

ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 1440

ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 1500

attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgcct tcctgttttt 1560

gctcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg 1620

ggttacatcg aactggatct caacagcggt aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa 1680

cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt 1740
gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag 1800
tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 1860
gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac ttctgacaac gatcggagga 1920
ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt 1980
tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta 2040
gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg 2100
caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc 2160
cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt 2220
atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg 2280
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 2340
attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa 2400
cttcattttt aatttaaaag gatctaggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaaa 2460
atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga 2520
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg 2580
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact 2640
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac 2700
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagtg 2760
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg 2820
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga 2880
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgcgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc 2940
gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg 3000
agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc 3060
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc 3120
agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt 3180
cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc 3240
gctcgccgca gccgaacgac gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc 3300
caatacgcaa accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc tgtggtgtca 3360
tggtcggtga tcgccagggt gccgacgcgc atctcgactg catggtgcac caatgcttct 3420
ggcgtcaggc agccatcgga agctgtggta tggccgtgca ggtcgtaaat cactgcataa 3480
ttcgtgtcgc tcaaggcgca ctcccgttct ggataatgtt ttttgcgccg acatcataac 3540
ggttctggca aatattctga aatgagctgt tgacaattaa tcatcgaact agttaactag 3600
tacgcaagtt cacgtaaaaa gggtatcgcg gaatt 3635

<210> 28
<211> 131
<212> PRT
<213> 噬菌体 AP205

<400> 28

Met Ala Asn Lys Pro Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile
1 5 10 15

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

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

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp
115 120 125

Thr Thr Ala
130

<210> 29
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AP205 外壳蛋白

<400> 29

Met Ala Asn Lys Thr Met Gln Pro Ile Thr Ser Thr Ala Asn Lys Ile
1 5 10 15

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

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

Gly Gln Tyr Val Ser Val Tyr Lys Arg Pro Ala Pro Lys Pro Glu Gly
50 55 60

Cys Ala Asp Ala Cys Val Ile Met Pro Asn Glu Asn Gln Ser Ile Arg
65 70 75 80

Thr Val Ile Ser Gly Ser Ala Glu Asn Leu Ala Thr Leu Lys Ala Glu
85 90 95

Trp Glu Thr His Lys Arg Asn Val Asp Thr Leu Phe Ala Ser Gly Asn
100 105 110

Ala Gly Leu Gly Phe Leu Asp Pro Thr Ala Ala Ile Val Ser Ser Asp
115 120 125

Thr Thr Ala
130

<210> 30
<211> 3607
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 质粒 pAP281-32

<400> 30
cgagctcgcc cctggcttat cgaaattaat acgactcact atagggagac cggaattcga 60

gctcgcccgg ggatcctcta gattaaccca acgcgtagga gtcaggccat ggcaaataag 120

acaatgcaac cgatcacatc tacagcaaat aaaattgtgt ggtcggatcc aactcgttta 180

tcaactacat tttcagcaag tctgttacgc caacgtgtta aagttggtat agccgaactg 240

aataatgttt caggtcaata tgtatctgtt tataagcgtc ctgcacctaa accgaaggtc 300

agatgcctgt gtcattatgc cgaatgaaaa ccaatccatt cgcacagtga tttcagggtc 360

agccgaaaac ttggctacct taaaagcaga atgggaaact cacaaacgta acgttgacac 420

actcttcgcg agcggcaacg ccggtttggg tttccttgac cctactgcgg ctatcgtatc 480

gtctgatact actgcttaag cttgtattct atagtgtcac ctaaatcgta tgtgtatgat 540

acataaggtt atgtattaat ggtagccgcg ttctaacgac aatatgtaca agcctaattg 600

tgtagcatct ggcttactga agcagaccct atcatctctc tcgtaaactg ccgtcagagt 660

cggttgggtt ggacagacct ctgagtttct ggtaacgccg ttccgcaccc cggaaatggt 720

caccgaacca ttcagcaggg tcatcgctag ccagatcctc tacgccggac gcatcgtggc 780

ccgcatcacc ggcgccacag gtgcggtgct ggcgcctata tcgccgacat caccgatggg 840

gaagatcggg ctcgccactt cgggctcatg atcgctggtt tccgcctggg tatggtggca 900

ggccccgtgg cccgggggac tgttgggcgc catctccttg catgcaccat tccttgcggc 960

ggcggtgctc aacggcctca acctactact gggctgcttc ctaatgcagg agtcgcataa 1020

gggagagcgt cgatatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc 1080

caactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacacccg ccaacacccg 1140

ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgcttc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg 1200
tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgaggcagc 1260
ttgaagacga aagggcctcg tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat 1320
ggtttcttag acgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggacccc ctatttgttt 1380
atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct 1440
tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc 1500
cttttttgcg gcattttgcc ttcctgtttt tgctcaccca gaaacgctgg tgaaagtaaa 1560
agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg 1620
taagatcctt gagagttttc gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt 1680
tctgctatgt ggcgcggtat tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg 1740
catacactat tctcagaatg acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac 1800
ggatggcatg acagtaagag aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc 1860
ggccaactta cttctgacaa cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgcacaa 1920
catgggggat catgtaactc gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc 1980
aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt 2040
aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga 2100
taaagttgca ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa 2160
atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa 2220
gccctcccgt atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa 2280
tagacagatc gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt 2340
ttactcatat atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt 2400
gaagatcctt tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg 2460
agcgtcagac cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt 2520
aatctgctgc ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca 2580
agagctacca actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac 2640
tgtccttcta gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac 2700
atacctcgct ctgctaatcc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct 2760
taccgggttg gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg 2820
gggttcgtgc acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca 2880
gcgtgagcat tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt 2940
aagcggcagg gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta 3000
tctttatagt cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc 3060
gtcagggggg cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc 3120
cttttgctgg ccttttgctc acatgttctt tcctgcgtta tcccctgatt ctgtggataa 3180

gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctcgccgcag ccgaacgacc gacggcgcag 3240

cgagtcagtg agcgaggaag cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg 3300

ttggccgatt cattaatgca gctgtggtgt catggtcggt gatcgccagg gtgccgacgc 3360

gcatctcgac tgcatggtgc accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg 3420

tatggccgtg caggtcgtaa atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactcccgtt 3480

ctggataatg ttttttgcgg cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct 3540

ggtgacaatt aatcatcgaa ctagttaact agtacgcaag ttcacgtaaa aagggtatcg 3600

cggaatt 3607

<210> 31
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 32
<211> 28
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 32

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 33

Gly Gly Lys Gly Gly
1 5

<210> 34
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N 端甘氨酸接头

<220>
<221> 重复
<222> (1)..(1)
<223> 甘氨酸可以被重复 0 到 5 次

<220>
<221> 重复
<222> (3)..(3)
<223> 甘氨酸可以被重复 0 到 12 次

<400> 34

Gly Cys Gly
1

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N 端甘氨酸丝氨酸接头

<220>
<221> 重复
<222> (1)..(1)
<223> 甘氨酸可以被重复 0 到 5 次

<220>
<221> 重复
<222> (3)..(3)
<223> 甘氨酸可以被重复 0 到 10 次

<220>
<221> 重复
<222> (4)..(4)
<223> 丝氨酸可以被重复 0 到 2 次

<220>
<221> 重复
<222> (5)..(9)
<223> 这些残基作为一组可以被重复 0 到 3 次

<400> 35

Gly Cys Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1   5

<210> 36
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端甘氨酸接头

<220>
<221> 重复
<222> (1)..(1)
<223> 甘氨酸可以被重复 0 到 12 次

<220>
<221> 重复
<222> (3)..(3)
<223> 甘氨酸可以被重复 0 到 5 次

<400> 36

Gly Cys Gly
1

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端甘氨酸丝氨酸接头

<220>
<221> 重复
<222> (1)..(1)
<223> 甘氨酸可以被重复 0 到 10 次

<220>
<221> 重复
<222> (2)..(2)
<223> 丝氨酸可以被重复 0 到 2 次

<220>
<221> 重复
<222> (3)..(7)
<223> 这些残基作为一组可以被重复 0 到 3 次

<220>
<221> 重复
<222> (8)..(8)
<223> 甘氨酸可以被重复 0 到 8 次

<220>
<221> 重复
<222> (10)..(10)
<223> 甘氨酸可以被重复 0 到 5 次

<400> 37

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Cys Gly
1   5   10

<210> 38
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 甘氨酸丝氨酸接头

<220>
<221> 重复
<222> (1)..(5)
<223> 这些残基作为一组可以被重复任意次

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N 端γ1

<400> 39

Cys Gly Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro
1 5 10

<210> 40
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端γ1

<400> 40

Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Gly
1 5 10

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N 端γ3

<400> 41

Cys Gly Gly Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala
1 5 10 15

Pro

<210> 42
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端γ3

<400> 42

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Gly
1 5 10 15

Cys Gly

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N 端甘氨酸接头

<400> 43

Gly Cys Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端甘氨酸接头

<400> 44

Gly Gly Gly Gly Cys Gly
1 5

<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端甘氨酸赖氨酸接头

<400> 45

Gly Gly Lys Lys Gly Cys
1 5

<210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> N 端甘氨酸赖氨酸接头

<400> 46

Cys Gly Lys Lys Gly Gly
1 5

<210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> C 端接头

<400> 47

Gly Gly Cys Gly
1

<210> 48
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Grehlin 前体突变体

<400> 48

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 49
<211> 28
<212> PRT
<213> 狗

<400> 49

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 50
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 狗 ghrelin 突变体

<400> 50

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 51
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 ghrelin 突变体

<400> 51

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5 10

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5

<210> 54
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln
1 5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu

1 5 10

<210> 57
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> AP205 核糖体结合位点

<400> 57
tctagaattt tctgcgcacc catcccgggt ggcgcccaaa gtgaggaaaa tcacatg 57

<210> 58
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 载体 pQβ185 的 SD 序列

<400> 58
tctagattaa cccaacgcgt aggagtcagg ccatg 35

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59

Lys Leu Gln Pro Arg
1 5

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
1 5 10

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 61

Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5 10 15

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> 狗

<400> 62
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln
1 5 10

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> 狗

<400> 63

Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5 10 15

<210> 64
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 ghrelin 肽突变体

<400> 64

Cys Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 65
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 ghrelin 肽 24-51 突变体

<400> 65

Cys Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg
1 5 10 15

Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 66
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 ghrelin 肽突变体

<400> 66

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys
20 25

<210> 67
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 ghrelin 肽 24-51 突变体

<400> 67

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys
20 25

<210> 68
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 ghrelin 肽 24-36 突变体

<400> 68

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Cys
1 5 10

<210> 69
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 ghrelin 肽 37-51 突变体

<400> 69

Cys Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5 10 15

<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 ghrelin 肽 44-51 突变体

<400> 70

Cys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5

<210> 71
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 狗 ghrelin 肽 24-51 突变体

<400> 71

Cys Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg
1 5 10 15

Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 72
<211> 28
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 狗 ghrelin 肽突变体

<400> 72

Cys Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 73
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 狗 ghrelin 肽 24-51 突变体

<400> 73

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys
20 25

<210> 74
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 狗 ghrelin 突变体

<400> 74

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys
20 25

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 狗 ghrelin 肽 24-36 突变体

<400> 75

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Cys
1 5 10

<210> 76
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人 ghrelin 肽 31-40 突变体

<400> 76

Cys Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu
1 5 10

<210> 77
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 ghrelin 肽 24-51 突变体

<400> 77

Cys Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg
1 5 10 15

Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 78
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 78
ggtaacatcg gtcgagatgg aaaacaaact ctggtcc 37

<210> 79
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 79
ggaccagagt ttgttttcca tctcgaccga tgttacc 37

<210> 80
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 80
agctcgcccg gggatcctct ag 22

<210> 81
<211> 40
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 81
cgatgcattt catccttagt tatcaatacg ctgggttcag 40

<210> 82
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 82
ggcaaaatta gagactgtta ctttaggtaa gatcgg 36

<210> 83
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 83
ccgatcttac ctaaagtaac agtctctaat tttgcc 36

<210> 84
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 84
ggccatggca cgactcgaga ctgttacttt agg 33

<210> 85
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 85
gatttaggtg acactatag 19

<210> 86
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 86
gatggacgtc aaactctggt cctcaatccg cgtgggg 37

<210> 87
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸引物

<400> 87
ccccacgcgg attgaggacc agagtttgac gtccatc 37

<210> 88
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> EcoRIHBcAg(s) 引物

<400> 88
ccggaattca tggacattga cccttataaa g 31

<210> 89
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Lys-HBcAg(as) 引物

<400> 89
cctagagcca cctttgccac catcttctaa attagtaccc acccaggtag c 51

<210> 90
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Lys-HBcAg(s) 引物

<400> 90
gaagatggtg gcaaaggtgg ctctagggac ctagtagtca gttatgtc 48

<210> 91
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HBcAg(1-149)Hind(as) 引物

<400> 91
cgcgtcccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaag 38

<210> 92
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 48as 引物

<400> 92
gtgcagtatg gtgaggtgag gaatgctcag gagactc 37

<210> 93
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 48s 引物

<400> 93
gagtctcctg agcattcctc acctcaccat actgcac 37

<210> 94
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 107as 引物

<400> 94
cttccaaaag tgagggaaga aatgtgaaac cac 33

<210> 95
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HBcAg149hind-as

<400> 95
cgcgtcccaa gcttctaaac aacagtagtc tccggaagcg ttgatag 47

<210> 96
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 107s 引物

<400> 96
gtggtttcac atttcttccc tcacttttgg aag 33

<210> 97
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HBcAgwtHindIII 引物

<400> 97
cgcgtcccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg 38

<210> 98
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 表位 CeH3

<400> 98

Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly
1 5 10

<210> 99
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CeH3fwd 引物

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(51)

<400> 99
gtt aac ttg acc tgg tct cgt gct tct ggt gca tcc agg gat cta gta 48
Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Ala Ser Arg Asp Leu Val
1 5 10 15

gtc 51
Val

<210> 100
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CeH3fwd 引物

<400> 100

Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Ala Ser Arg Asp Leu Val
1 5 10 15

Val

<210> 101
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CeH3rev 引物

<400> 101
accagaagca cgagaccagg tcaagttaac atcttccaaa ttattaccca c 51

<210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CeH3rev 引物肽

<400> 102

Asp Glu Leu Asn Asn Gly Val
1 5

<210> 103
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> HBcAg-wt EcoRI fwd 引物

<400> 103
ccggaattca tggacattga cccttataaa g 31

<210> 104
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> HBcAg-wt Hind III rev 引物

<400> 104
cgcgtcccaa gcttctaaca ttgagattcc cgagattg 38

<210> 105
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GhrelC 突变体

<400> 105

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys
20 25 30

<210> 106
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> cGhrQ14 突变体

<400> 106

Cys Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
20 25

<210> 107
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GhrQ14C 突变体

<400> 107

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys
20 25

<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ghrelin 肽突变体

<400> 108

Cys Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5 10

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ghrelin 肽突变体

<400> 109

Cys Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ghrelin 肽突变体

<400> 110

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Cys
1 5 10

<210> 111
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 111

Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser
1 5 10

<210> 112
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 112

Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu
1 5 10

<210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 113

Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
1 5 10

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> 狗

<400> 114

Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys Glu
1 5 10

<210> 115
<211> 11
<212> PRT
<213> 狗

<400> 115

Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys Glu Ser
1 5 10

<210> 116
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116

Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln

1 5 10

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 117

Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln

1 5 10

<210> 118
<211> 10
<212> PRT
<213> 狗

<400> 118

Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln
1 5 10

<210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 119

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro
1 5

<210> 120
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ghrelin 肽突变体

<400> 120

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys
20 25

<210> 121
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ghrelin 肽突变体

<400> 121

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys
20 25 30

<210> 122
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ghrelin 肽突变体

<400> 122

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gly Cys
1 5 10 15

<210> 123
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ghrelin 肽突变体

<400> 123

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys
20 25 30

<210> 124
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ghrelin 肽突变体

<400> 124

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys
20 25

<210> 125
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> ghrelin 肽突变体

<400> 125

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gly Cys
1 5 10 15

<210> 126
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 ghrelin 肽突变体

<400> 126

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu

1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys
20 25

<210> 127
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 ghrelin 肽突变体

<400> 127

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu
1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys
20 25

<210> 128
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 ghrelin 肽突变体

<400> 128

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Cys
20 25

<210> 129
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 ghrelin 肽突变体

<400> 129

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys
1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Gly Cys
20 25 30

<210> 130
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 ghrelin 肽突变体

<400> 130

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Cys
1 5 10

<210> 131
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 小鼠 ghrelin 肽突变体

<400> 131

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gly Cys
1 5 10 15

<210> 132
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ghrel24-33C

<400> 132

Gly Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Gly Cys
1 5 10

<210> 133
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> cGhrel42-51

<400> 133

Cys Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg
1 5 10

<210> 134
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> cGhrel31-40

<400> 134

Cys Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu
1 5 10

<210> 135
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> cGhrel31-41

<400> 135

Cys Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser
1 5 10

<210> 136
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> cGhrel28-37

<400> 136

Cys Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln
1 5 10

<210> 137
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 ghrelin 肽突变体

<400> 137

Cys Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser
1 5 10

<210> 138
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 ghrelin 肽突变体

<400> 138

Cys Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln
1 5 10

<210> 139
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 p1.44

<400> 139
aaccatggca aataagccaa tgcaa 25

<210> 140
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 p1.45

<400> 140
aatctagaat tttctgcgca cccatcccgg 30

<210> 141
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 p1.46

<400> 141
aaaagcttaa gcagtagtat cagacgatac g 31

<210> 142
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 p1.47

<400> 142
gagtgatcca actcgtttat caactacatt ttcagcaagt ctg 43

<210> 143
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 p1.48

<400> 143
cagacttgct gaaaatgtag ttgataaacg agttggatca ctc 43

<210> 144
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 144

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
1 5 10 15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
20 25 30

Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln
50 55 60

Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe
65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln
85 90 95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu
100 105 110

Ala Pro Ala Asp Lys
115

<210> 145
<211> 117
<212> PRT
<213> 狗

<400> 145

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
1 5 10 15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
20 25 30

Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln
50 55 60

Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe
65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln
85 90 95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu
100 105 110

Ala Pro Ala Asp Lys
115

<210> 146
<211> 117
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 146

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
1 5 10 15

Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
20 25 30

Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
35 40 45

Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln
50 55 60

Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe
65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln
85 90 95

Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu
100 105 110

Ala Pro Ala Asp Lys
115

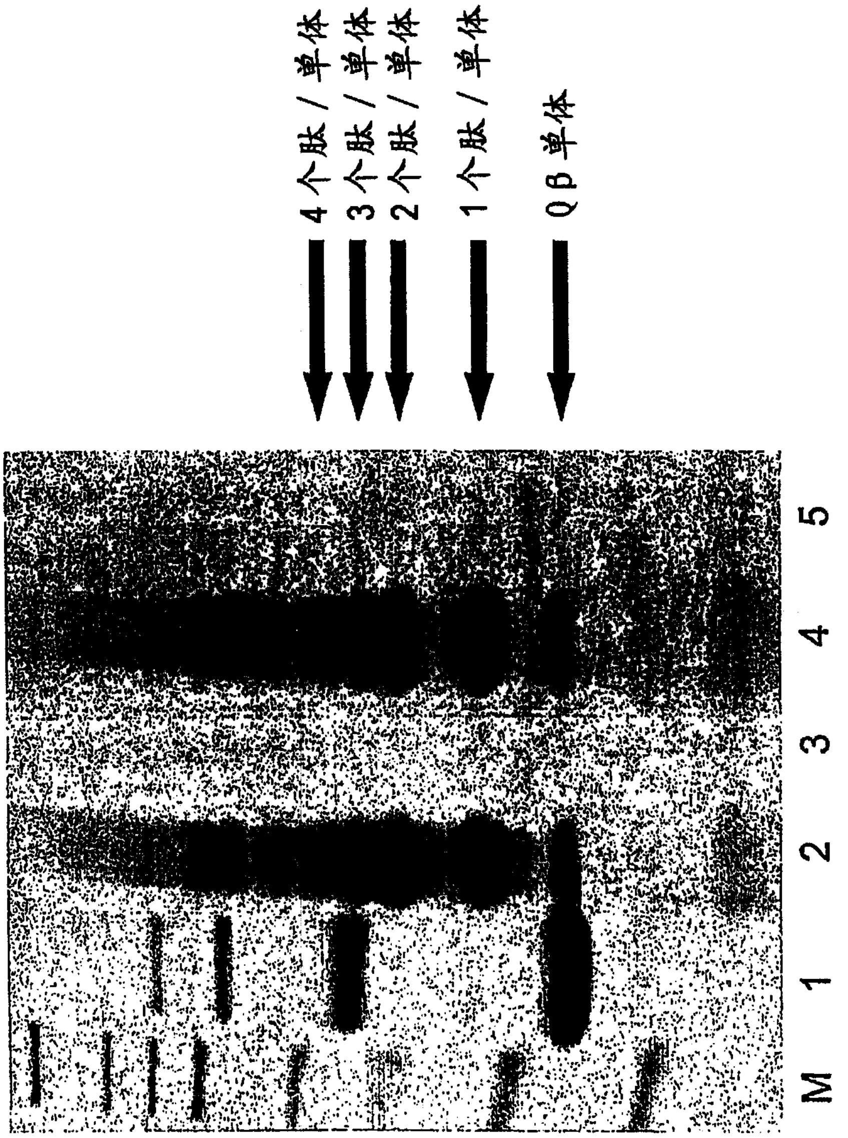

图1

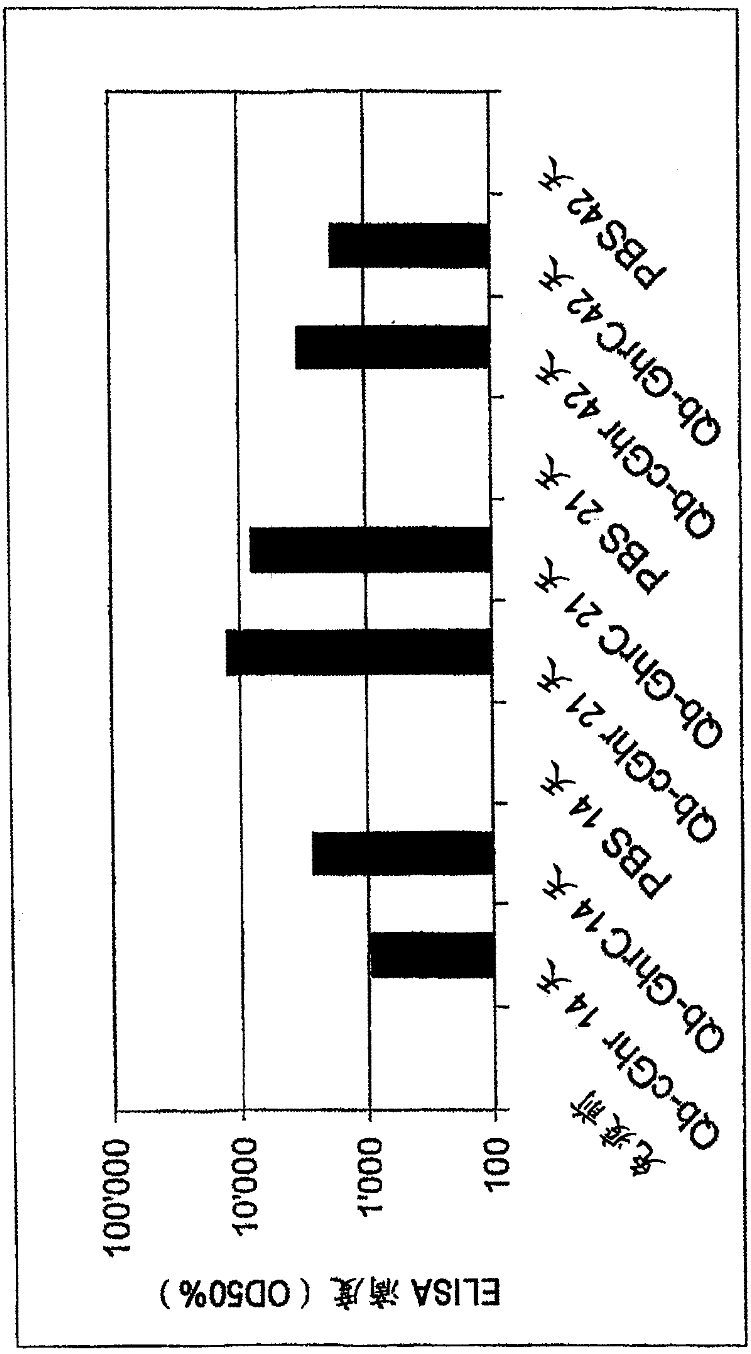
ELISA 滴度（OD50%）
100'000
10'000
1'000
100
免疫前
Qb-cGhr 14 天
Qb-GhrC 14 天
PBS 14 天
Qb-cGhr 21 天
Qb-GhrC 21 天
PBS 21 天
Qb-cGhr 42 天
Qb-GhrC 42 天
PBS 42 天

图 2

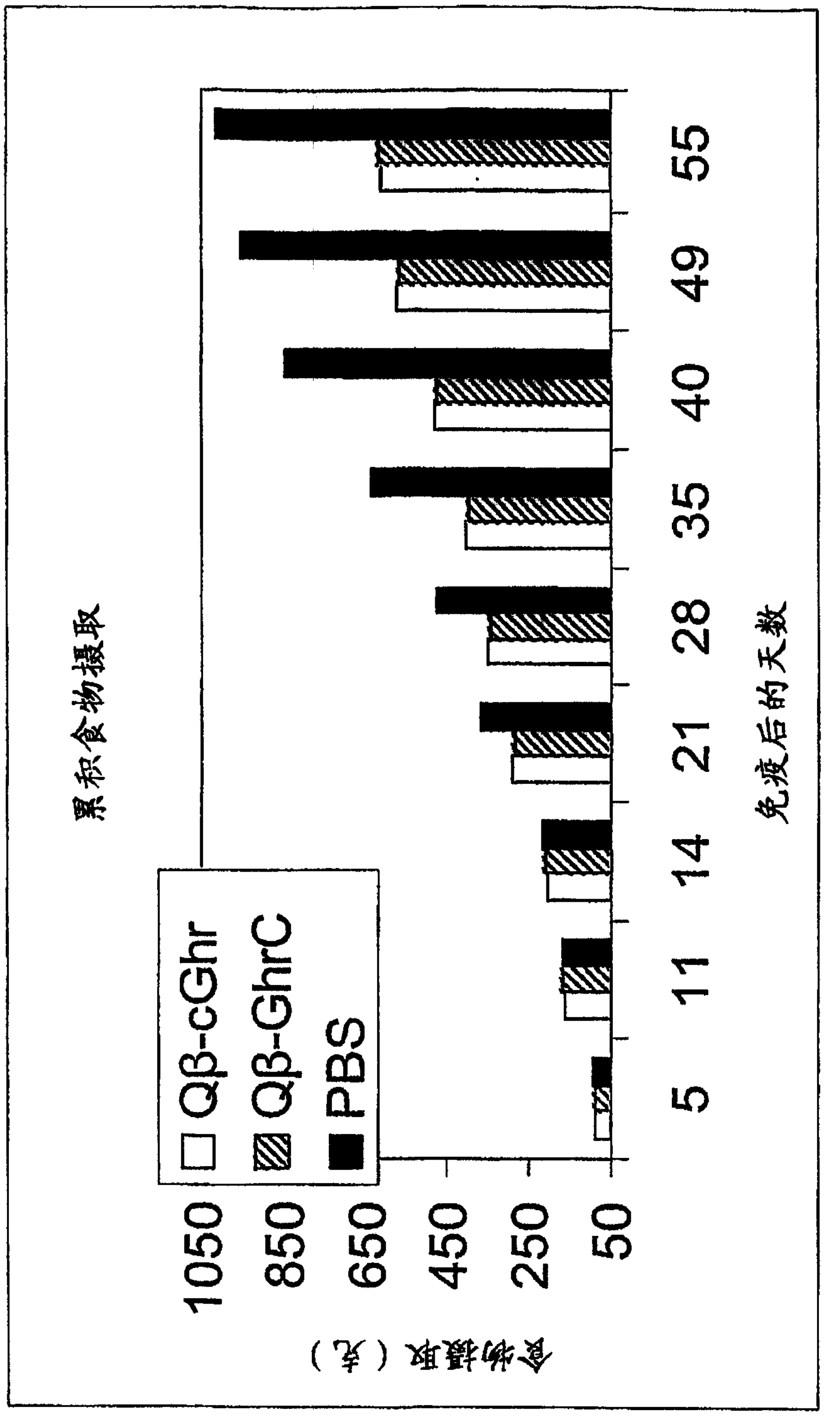
累积食物摄取
食物摄取（克）
1050
850
650
450
250
50
Qβ-cGhr
Qβ-GhrC
PBS
5
11
14
21
28
35
40
49
55
免疫后的天数

图 3