



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102307591 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 200980156344.9

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2009.12.09

A61K 39/155(2006.01)

(30)优先权数据

(56)对比文件

61/121,126 2008.12.09 US

61/169,077 2009.04.14 US

61/224,787 2009.07.10 US

M.begona et.al.Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism.《Journal of general virology 》.2004,

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2011.08.09

M.begona et.al.Thermostability of the human respiratory syncytial virus fusion protein before and after activation: implications for the membrane-fusion mechanism.《Journal of general virology 》.2004,

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/067269 2009.12.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02010/077717 EN 2010.07.08

(73)专利权人 诺瓦瓦克斯股份有限公司

地址 美国马里兰州

Firestone et.al.AAC55970.1.《GENEBANK》.1996,

(72)发明人 P.普什科 Y.吴 M.马萨雷 Y.刘

G.史密斯 B.周

审查员 黄蕊

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

权利要求书1页 说明书33页

代理人 封新琴

序列表32页 附图24页

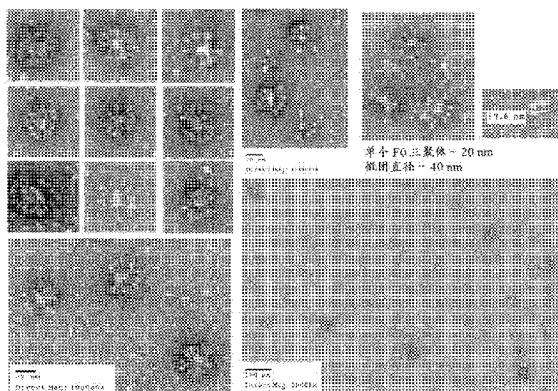
(54)发明名称

修饰的RSV F蛋白及其使用方法

(57)摘要

本发明一般地涉及经修饰或突变的呼吸道合胞病毒融合(F)蛋白及其制备和使用方法,包括免疫原性组合物如用于治疗 and/或预防RSV感染的疫苗。

经纯化的 RSV-F #683 微图 (玫瑰花结)



1. 一种呼吸道合胞病毒融合蛋白,其中所述呼吸道合胞病毒融合蛋白由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成。
2. 包含权利要求1的呼吸道合胞病毒融合蛋白和异源蛋白的融合蛋白。
3. 编码权利要求1的呼吸道合胞病毒融合蛋白的分离的核酸。
4. 包含权利要求3的核酸的载体。
5. 包含权利要求3的核酸的分离的细胞。
6. 包含权利要求1的呼吸道合胞病毒融合蛋白的微团或病毒样颗粒。
7. 一种免疫原性组合物,其包含权利要求1的呼吸道合胞病毒融合蛋白或权利要求6的微团或病毒样颗粒。
8. 一种药学上可接受的疫苗组合物,其包含权利要求1的呼吸道合胞病毒融合蛋白,或权利要求6的微团或病毒样颗粒,其中所述呼吸道合胞病毒融合蛋白能够在宿主中引发免疫应答。
9. 权利要求7的免疫原性组合物或权利要求8的疫苗组合物,其中所述组合物含有佐剂。
10. 权利要求9的免疫原性组合物或疫苗组合物,其中所述佐剂是明矾。
11. 在药学上可接受的配制物中的权利要求1的呼吸道合胞病毒融合蛋白或权利要求6的微团或病毒样颗粒在制备用在针对呼吸道合胞病毒感染对哺乳动物进行免疫接种的药物中的用途。
12. 权利要求11的用途,其中所述配制物包含佐剂。
13. 权利要求12的用途,其中所述佐剂是明矾。

修饰的RSV F蛋白及其使用方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2008年12月9日提交的美国临时申请序列号61/121,126,2009年4月14日提交的美国临时专利申请系列号61/169,077和2009年7月10日提交的美国临时申请系列号61/224,787的优先权,其每一个就所有目的均通过全文提述并入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般地涉及修饰或突变的呼吸道合胞病毒融合(F)蛋白及其制备和使用方法,包括免疫原性组合物如疫苗以供治疗和/或预防RSV感染。

[0004] 发明背景

[0005] 呼吸道合胞病毒(RSV)是副粘病毒科(Paramyxoviridae)肺病毒属(Pneumovirus)的成员。人RSV(HRSV)是幼儿中严重下呼吸道疾病的最主要原因,并在人中导致相当的发病率和死亡率。RSV还被认为是在免疫妥协的成人和老人中重要的致病原。由于天然感染之后感染宿主对RSV的不完全抗性,RSV可在儿童期和成人期多次感染。

[0006] 该病毒具有由单链反义RNA组成的基因组,其与病毒蛋白紧密相联形成核壳。病毒包膜由质膜来源、含有病毒编码的结构蛋白的脂双层组成。在病毒粒体中包裹病毒聚合酶,其将基因组RNA转录为mRNA。RSV基因组编码三个跨膜结构蛋白:F、G和SH,两个基质蛋白:M和M2,三个核壳蛋白:N、P和L,以及两个非结构蛋白:NS1和NS2。

[0007] 认为HRSV和细胞膜的融合发生于细胞表面,并为感染早期病毒核糖核蛋白转移至细胞质所必需的步骤。该过程是由融合(F)蛋白介导的,其还促进受感染细胞的膜与邻接细胞的膜融合以形成特征性的合胞体,其不仅为显著的细胞病变效果,而且还是病毒扩散的另外手段。相应地,中和融合活性在宿主免疫中是重要的。事实上,针对F蛋白开发的单克隆抗体已显示中和病毒的感染性并抑制膜融合(Calder等,2000,Virology 271:122-131)。

[0008] RSV的F蛋白与其他副粘病毒(paramyxovirus)的F糖蛋白分享结构特征,和有限但却显著的氨基酸序列同一性。其作为无活性的574个氨基酸的前体(F0)合成,所述前体在内质网中在天冬酰胺上在翻译的同时发生糖基化,在此处其装配为同寡聚体。在到达细胞表面之前,F0前体由蛋白酶剪切为来自N端的F2和来自C端的F1。F2和F1链仍由一个或多个二硫键共价连接。

[0009] 已发现免疫亲和纯化的全长F蛋白以微团形式聚集(也表现为玫瑰花结(rosette)),类似于对其他全长病毒膜糖蛋白所观察的一般(Wrigley等,1986,in Electron Microscopy of Proteins,Vol 5,p.103-163,Academic Press,London)。在电子显微镜下,玫瑰花结中的分子表现为或者是倒转的圆锥形杆状物(~70%)或棒棒糖形状(~30%)的结构,其较宽的端从玫瑰花结中央向外伸出。该杆状构象状态与融合前(pre-fusion)失活状态的F糖蛋白相关,而棒棒糖构象状态与融合后(post-fusion)、活性状态的F糖蛋白相关。

[0010] 电子显微术可用于区分融合前和融合后(或者命名为融合前的(prefusogenic)和融合的(fusogenic)构象,如Calder等,2000,Virology271:122-131所说明。融合前构象还

可与融合的(融合后)构象通过脂质体相关测定法来区分。此外,可使用特异性识别存在于RSV F蛋白的一种或另一种融合前或融合的形式,但不存在于其他形式的构象表位的抗体(例如单克隆抗体)来区分融合前和融合的构象。此种构象表位可为由于分子表面上抗原决定簇的偏好性暴露所致。或者,构象表位可来自在直链多肽上非连续的氨基酸的并列。

[0011] 之前已显示F前体在两个位点被剪切(位点I,在残基109之后,和位点II,在残基136之后),两者之前均为由弗林蛋白酶(furin)样蛋白酶识别的基序。位点II邻近融合肽,且F蛋白在两个位点的剪切对于膜融合是必需的。(Gonzalez-Reyes等,2001,PNAS 98(17):9859-9864)。当在两个位点剪切均完成时,认为杆状物从圆锥形状转变为棒棒糖形状。

发明内容

[0012] 如本文中所述,本发明已发现,当对RSV F蛋白的结构进行某些修饰时,可实现令人惊讶的高水平融合(F)蛋白的表达。此类修饰还令人意想不到地减少了RSV F蛋白在宿主细胞中的细胞毒性。此外,本发明经修饰的F蛋白表现改善的展示融合后“棒棒糖”形态而非融合前“杆状”形态的能力。因此,在一个方面,本发明经修饰的F蛋白还可展示与野生型F蛋白相比改善的免疫原性。这些修饰显然适用于疫苗的开发和使用该疫苗以供治疗和/或预防RSV的方法。本发明提供了与野生型RSV F蛋白相比表现表达增加,细胞毒性减少和/或免疫原性增强的重组RSV F蛋白。

[0013] 在一个方面,本发明提供了与野生型RSV F蛋白相比包含修饰的或突变的氨基酸序列的重组RSV F蛋白。一般而言,这些修饰或突变使所述RSV F蛋白与野生型RSV F蛋白相比增加表达,减少细胞毒性和/或增强免疫原性。在某些示例性实施方案中,所述RSV F蛋白为人RSV F蛋白。

[0014] 所述RSV F蛋白优选与野生型RSV F蛋白(例如示例于SEQ ID NO:2)相比包含修饰的或突变的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述RSV F蛋白含有在对应于野生型RSV F蛋白(SEQ ID NO:2)位置P102的氨基酸处的修饰或突变。在另一个实施方案中,所述RSV F蛋白含有在对应于野生型RSV F蛋白(SEQ ID NO:2)位置I379的氨基酸处的修饰或突变。在另一个实施方案中,所述RSV F蛋白含有在对应于野生型RSV F蛋白(SEQ ID NO:2)位置M447的氨基酸处的修饰或突变。

[0015] 在一个实施方案中,所述RSV F蛋白含有在对应于上述位置的氨基酸处的两个或更多个修饰或突变。在另一个实施方案中,所述RSV F蛋白含有在对应于上述位置的氨基酸处的三个修饰或突变。

[0016] 在一个具体实施方案中,本发明涉及其中位置102处的脯氨酸由丙氨酸取代的RSV F蛋白。在另一个具体实施方案中,本发明涉及其中位置379处的异亮氨酸由缬氨酸取代的RSV F蛋白。还在另一个具体实施方案中,本发明涉及其中位置447处的甲硫氨酸由缬氨酸取代的RSV F蛋白。在某些实施方案中,所述RSV F蛋白含有在对应于这些具体实施方案中所述的位置的氨基酸处的两个或更多个修饰或突变。在某些其他的实施方案中,所述RSV F蛋白含有在对应于这些具体实施方案中所述的位置的氨基酸处的三个修饰或突变。在一个示例性实施方案中,所述RSV蛋白具有SEQ ID NO:4中所述的氨基酸序列。

[0017] 在一个实施方案中,进一步优化所述RSV F蛋白的编码序列以增强其在合适宿主细胞中的表达。在一个实施方案中,所述宿主细胞是昆虫细胞。在一个示例性实施方案中,

所述昆虫细胞是Sf9细胞。

[0018] 在一个实施方案中,经密码子优化的RSV F基因的编码序列是SEQ ID NO:3。在另一个实施方案中,所述经密码子优化的RSV F蛋白具有SEQ ID NO:4中所述的氨基酸序列。

[0019] 在一个实施方案中,所述RSV F蛋白进一步在F2的隐含多聚(A)位点包含至少一个修饰。在另一个实施方案中,所述RSV F蛋白进一步在主要剪切位点(CS)包含一种或多种氨基酸突变。在一个实施方案中,所述RSV F蛋白在对应于野生型RSV F蛋白(SEQ ID NO:2)或经密码子优化的RSV F蛋白(SEQ ID NO:4)的位置R133处含有修饰或突变。在另一个实施方案中,所述RSV F蛋白在对应于野生型RSV F蛋白(SEQ ID NO:2)或经密码子优化的RSV F蛋白(SEQ ID NO:4)的位置R135处含有修饰或突变。还在另一个实施方案中,所述RSV F蛋白在对应于野生型RSV F蛋白(SEQ ID NO:2)或经密码子优化的RSV F蛋白(SEQ ID NO:4)的位置R136处含有修饰或突变。

[0020] 在一个具体实施方案中,本发明涉及其中位置133处的精氨酸由谷氨酰胺取代的RSV F蛋白。在另一个具体实施方案中,本发明涉及其中位置135处的精氨酸由谷氨酰胺取代的RSV F蛋白。还在另一个具体实施方案中,本发明涉及其中位置136处的精氨酸由谷氨酰胺取代的RSV F蛋白。在某些实施方案中,所述RSV F蛋白含有在对应于这些具体实施方案中所述的位置的氨基酸处的两个或更多个修饰或突变。在某些其他的实施方案中,所述RSV F蛋白含有在对应于这些具体实施方案中所述的位置的氨基酸处的三个修饰或突变。在一个示例性实施方案中,所述RSV蛋白具有SEQ ID NO:6中所述的氨基酸序列。

[0021] 在另一个实施方案中,所述RSV F蛋白进一步在融合域的N端一半(N-terminal half)中包含对应于SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:6的氨基酸137-146的缺失。在一个示例性实施方案中,所述RSV F蛋白具有SEQ ID NO:8中所述的氨基酸序列。在一个替代实施方案中,所述RSV F蛋白具有SEQ ID NO:10中所述的氨基酸序列。

[0022] 进一步包括在本发明范围内的是除了人RSV F蛋白(SEQ ID NO:2)之外的RSV F蛋白,其含有对应于那些如上所示的改变。此类RSV F蛋白可包括但不限于来自人RSV A株、人RSV B株、牛RSV株和禽RSV株的RSV F蛋白。

[0023] 在一些实施方案中,本发明涉及在宿主细胞中相比野生型RSV F蛋白如SEQ ID NO:2所示的蛋白表现表达增加的修饰的或突变的RSV F蛋白。在其他实施方案中,本发明涉及在宿主细胞中相比野生型RSV F蛋白(如SEQ ID NO:2所示的蛋白)表现细胞毒性减少的修饰的或突变的RSV F蛋白。还在其他实施方案中,本发明涉及相比野生型RSV F蛋白(如SEQ ID NO:2所示的蛋白)表现免疫原性增加的修饰的或突变的RSV F蛋白。

[0024] 在其他方面,本发明提供了包含一种或多种如本文中所述的修饰的或突变的RSV F蛋白的免疫原性组合物。在一个实施方案中,本发明提供了由一种或多种修饰的或突变的RSV F蛋白组成的微团(例如RSV F微团)。

[0025] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含修饰的或突变的RSV F蛋白的病毒样颗粒(VLP)。在一些实施方案中,所述VLP进一步包含一种或多种其他蛋白。

[0026] 在一个实施方案中,所述VLP进一步包含基质(M)蛋白。在一个实施方案中,所述M蛋白来源于人RSV株。在另一个实施方案中,所述M蛋白来源于牛RSV株。在其他实施方案中,所述基质蛋白可为来自流感病毒株的M1蛋白。在一个实施方案中,所述流感病毒株是禽流感病毒株。在其他实施方案中,所述M蛋白可来源于新城疫病毒(NDV)株。

[0027] 在其他实施方案中,所述VLP进一步包含RSV糖蛋白G。在另一个实施方案中,所述VLP进一步包含RSV糖蛋白SH。还在另一个实施方案中,所述VLP进一步包含RSV核壳N蛋白。

[0028] 所述修饰或突变的RSV F蛋白可用于预防和/或治疗RSV感染。因此,在另一个方面,本发明提供了用于引发针对RSV的免疫应答的方法。所述方法涉及将免疫学上有效量的含有修饰的或突变的RSV F蛋白的组合物施于受试者,如人或动物受试者。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了包含修饰的或突变的RSV F蛋白的药学上可接受疫苗组合物,包含修饰的或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含修饰的或突变的RSV F蛋白的VLP。

[0030] 在一个实施方案中,本发明包括包含至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白的免疫原性配制物。在另一个实施方案中,本发明包括包含至少一个有效剂量的包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团的免疫原性配制物。还在另一个实施方案中,本发明包括包含至少一个有效剂量的包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP的免疫原性配制物。

[0031] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含充满本发明的疫苗配制物的一种或多种成分的一个或多个容器的药物包或试剂盒。

[0032] 在另一个实施方案中,本发明提供了配制诱导针对对哺乳动物的感染或其至少一种疾病症状的免疫的疫苗或抗原性组合物的方法,包括将有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP添加至所述配制物。在一个优选实施方案中,所述感染是RSV感染。

[0033] 本发明经修饰或突变的RSV F蛋白可用于制备刺激赋予针对传染原的免疫或实体免疫的免疫应答的组合物。因此,在一个实施方案中,本发明提供了在受试者中诱导针对感染或其至少一种疾病症状的免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。

[0034] 还在另一个方面,本发明提供了在受试者中诱导针对RSV病毒感染或至少一种疾病症状的实体免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。

[0035] 本发明的组合物当施于脊椎动物(例如人)时可在该脊椎动物中诱导实体免疫。因此,在一个实施方案中,本发明提供了在受试者中诱导针对RSV病毒感染或至少一种疾病症状的实体免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。在另一个实施方案中,本发明提供了免疫接种哺乳动物免受RSV的方法,包括将诱导保护量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP施于所述哺乳动物。

[0036] 在另一个实施方案中,本发明包括在受试者中诱导针对感染或其至少一种症状的保护性抗体应答的方法,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。

[0037] 在另一个实施方案中,本发明包括在受试者中诱导针对RSV感染或其至少一种疾病症状的保护性细胞应答的方法,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白。在另一个实施方案中,本发明包括在受试者中诱导针对RSV感染或其至少一种疾病症状

的保护性细胞应答的方法,包括施用至少一个有效剂量的包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团。在另一个实施方案中,本发明包括在受试者中诱导针对RSV感染或其至少一种疾病症状的保护性细胞应答的方法,包括施用至少一个有效剂量的VLP,其中所述VLP包含经修饰或突变的RSV F蛋白。

[0038] 还在另一个方面,本发明提供了编码本发明经修饰或突变的RSV F蛋白的分离的核酸。在一个示例性实施方案中,所述编码经修饰或突变的RSV F蛋白的分离的核酸选自下组:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9。

[0039] 还在另一个方面,本发明提供了包含编码本发明经修饰或突变的RSV F蛋白的核酸的分离的细胞。在一个示例性实施方案中,所述编码经修饰或突变的RSV F蛋白的分离的核酸选自下组:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9。

[0040] 还在另一个方面,本发明提供了包含编码本发明经修饰或突变的RSV F蛋白的核酸的载体。在一个示例性实施方案中,所述编码经修饰或突变的RSV F蛋白的分离的核酸选自下组:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9。在一个实施方案中,所述载体是杆状病毒载体。

[0041] 还在另一个方面,本发明提供了制备RSV F蛋白的方法,包括(a)转化宿主细胞以表达编码本发明经修饰或突变的RSV F蛋白的核酸;和(b)在有助于产生所述RSV F蛋白的条件下培养所述宿主细胞。在一个实施方案中,所述编码经修饰或突变的RSV F蛋白的核酸选自下组:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9。在另一个实施方案中,所述宿主细胞是昆虫细胞。在进一步的实施方案中,所述宿主细胞是用包含本发明经修饰或突变的RSV F蛋白的杆状病毒载体转染的昆虫细胞。

[0042] 还在另一个方面,本发明提供了制备RSV F蛋白微团的方法,包括(a)转化宿主细胞以表达编码本发明经修饰或突变的RSV F蛋白的核酸;和(b)在有助于产生所述RSV F蛋白的条件下培养所述宿主细胞。在一个实施方案中,所述编码经修饰或突变的RSV F蛋白的核酸选自下组:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:9。在一个实施方案中,所述宿主细胞是昆虫细胞。在一个示例性实施方案中,所述宿主细胞是用包含本发明经修饰或突变的RSV F蛋白的杆状病毒载体转染的昆虫细胞。

附图说明

[0043] 图1描绘了野生型HRSV F₀蛋白的结构。

[0044] 图2描绘了具有实施例3中所述的剪切位点突变的修饰的RSV F₀蛋白的结构。

[0045] 图3描绘了修饰的HRSV F蛋白BV#541(SEQ ID NO:6)的主要剪切位点中的保守取代(R133Q、R135Q和R136Q)。

[0046] 图4描绘了修饰的HRSV F蛋白BV#541(SEQ ID NO:6)的序列和结构。

[0047] 图5描绘了修饰的HRSV F蛋白BV#622(SEQ ID NO:10)的序列和结构。

[0048] 图6描绘了经纯化的重组HRSV F蛋白BV#622存在或不存在BME时的SDS-PAGE考马斯染色的凝胶。

[0049] 图7描绘了修饰的HRSV F蛋白BV#683(SEQ ID NO:8)的结构。

[0050] 图8描绘了经纯化的重组HRSV F蛋白BV#622和BV#683存在或不存在BME时的SDS-PAGE考马斯染色的凝胶(左侧),和它们的结构。

[0051] 图9描绘了经纯化的重组HRSV F蛋白BV#683存在或不存在BME时的SDS-PAGE考马斯染色的凝胶(左侧)和Western印迹(右侧)分析。

[0052] 图10描绘了用于通过扫描光密度法(左侧)和Western印迹(右侧)对经纯化的重组HRSV F蛋白BV#683的纯度分析中的SDS-PAGE考马斯染色的凝胶。

[0053] 图11描绘了在负染电子显微镜中摄取的经纯化的重组HRSV F蛋白BV#683微团(玫瑰花结)的照片。

[0054] 图12描绘了HRSV F蛋白BV#683微团的颗粒大小分析。

[0055] 图13描绘了在粗细胞培养收获物(胞内)或通过30%蔗糖梯度分离所沉淀的样品中经修饰的HRSV F蛋白BV#622和BV#623(SEQ ID NO:21)与或不与HRSV N和BRSV M蛋白共同表达时的SDS-PAGE考马斯染色的凝胶(左侧)和Western印迹(右侧)分析,以及BV#622和BV#623的结构。

[0056] 图14描绘了在粗细胞培养收获物(胞内)样品中的经修饰的HRSV F蛋白BV#622、双串联(double tandem)嵌合BV#636(BV#541+BRSV M)、BV#683、BV#684(具有YIAL L-域的BV#541)以及BV#685(具有YKKL L-域的BV#541)与或不与HRSV N和BRSV M蛋白共同表达时的SDS-PAGE考马斯染色的凝胶(左侧)和Western印迹(右侧)分析,以及每一个经分析的经修饰的HRSV F蛋白的结构。

[0057] 图15描绘了在通过30%蔗糖梯度分离的沉淀的样品中的经修饰的RSV F蛋白BV#622(SEQ ID NO:10)、双串联嵌合BV#636(BV#541+BRSV M)、BV#683(SEQ ID NO:8)、BV#684(具有YIAL L-域的BV#541)以及BV#685(具有YKKL L-域的BV#541)与或不与HRSV N和BRSV M蛋白共同表达时的SDS-PAGE考马斯染色的凝胶(左侧)和Western印迹(右侧)分析,以及每一个经分析的经修饰的HRSV F蛋白的结构。

[0058] 图16描绘了实施例9中所述的每个经修饰的RSV F蛋白的结构、克隆名、描述、Western印迹和SDS-PAGE考马斯结果以及结论。

[0059] 图17描绘了实施例10中所述的RSV攻击研究的实验过程。

[0060] 图18描绘了在第31日和第46日用PBS、生活RSV、FI-RSV、1ug PFP、1ug PFP+Alum、10ug PFP、10ug PFP+Alum、30ug PFP和阳性对照(绵羊抗F)免疫接种的小鼠的RSV中和测定结果。

[0061] 图19描绘了在感染性RSV攻击之后4日,用PBS、生活RSV、FI-RSV、1ug PFP、1ug PFP+Alum、10ug PFP、10ug PFP+Alum和30ug PFP免疫接种的小鼠的肺组织中的RSV效价。

[0062] 图20描绘了在2-8℃储藏0、1、2、4和5周的纯化的重组RSV F蛋白BV#683的用考马斯染色的SDS-PAGE凝胶。

[0063] 图21描绘了用生活RSV(RSV)、福尔马林失活的RSV(FI-RSV)、具有或不具有铝的RSV-F蛋白BV#683(PFP和PFP+铝佐剂)和PBS对照免疫接种之后的RSVA和RSV B中和抗体应答。

[0064] 图22描绘了在用生活RSV(RSV)、福尔马林失活的RSV(FI-RSV)、具有或不具有铝的RSV-F蛋白BV#683(F-微团(30ug)和F-微团(30ug)+铝佐剂)和PBS对照免疫接种的大鼠中用RSV攻击之后的肺部病理状况(pathology)。

具体实施方式

[0065] 定义

[0066] 如用于本文,术语“佐剂”指当在配制物中与特定免疫原(例如经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP)组合使用时,会提高或者以其他方式改变或修饰所得的免疫应答的化合物。免疫应答的修饰包括加强或拓宽抗体和细胞免疫应答之一或两者皆是特异性。免疫应答的修饰亦可意指减少或抑制某些抗原特异性免疫应答。

[0067] 如用于本文,术语“抗原性配制物”或“抗原性组合物”指当施于脊椎动物特别是鸟或哺乳动物时,会诱导免疫应答的制备物。

[0068] 如用于本文,术语“禽流感病毒”指主要见于禽类但亦可感染人或其他动物的流感病毒。在一些情况下,禽流感病毒可从一个人传染或散布至另一个人。感染人的禽流感病毒具有引起流感流行,即人类发病和/或病死的潜力。当新的流感病毒株(人对其不具有天然免疫的病毒)出现时,发生流行,散布至个别区域之外,可能遍及全球,并同时感染许多人。

[0069] 如用于本文“有效量”一般指足以诱导免疫、预防或减轻感染或减少感染或疾病的至少一种症状和/或增强另一剂的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP效力的本发明经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP的量。有效剂量可指足以延迟或最小化感染或疾病发作的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP的量。有效剂量亦可指在治疗或控制感染或疾病中提供治疗益处的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP的量。此外,有效剂量是在治疗或控制感染或疾病中提供治疗益处的针对本发明的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP自身的量,或与其他治疗组合的量。有效剂量亦可为足以增强受试者(例如人)针对后续暴露于传染原或疾病的本身的免疫应答的量。免疫的水平可例如通过测量中和性的分泌和/或血清抗体(例如通过噬菌斑中和、补体结合、酶联免疫吸附或微中和测定),或通过测量细胞应答(如细胞毒性T细胞、抗原呈递细胞、辅助T细胞、树突状细胞和/或其他细胞应答,但不限于此)来进行监视。T细胞应答可通过例如使用特异性标记通过荧光流式细胞计数或T细胞测定法(如T细胞增殖测定、T细胞细胞毒性测定、TETRAMER测定和/或ELISPOT测定)来测量例如存在的CD4⁺和CD8⁺细胞的量来进行监视。在疫苗的情况下“有效剂量”是预防疾病和/或减少症状严重性的剂量。

[0070] 如用于本文,术语“有效量”指实现所需生物作用所必须的或足以实现所需生物作用的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP的量。组合物的有效量会是实现选定结果的量,且此种量可由本领域技术人员作为常规实验事项加以确定。举例而言,预防、治疗和/或减轻感染的有效量可为在暴露于本发明的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP时,造成免疫系统激活,导致抗原特异性免疫应答的发生所必需的量。该术语亦为“足量”的同义词。

[0071] 如用于本文,术语“表达”指多聚核酸转录为mRNA并翻译为肽、多肽或蛋白的过程。如果多聚核酸来源于基因组DNA,表达可包括mRNA的剪接(如果选取适当的真核宿主细胞或

生物)。在本发明的上下文中,该术语亦涵盖在其表达之后取得的RSV F基因mRNA和RSV F蛋白的产出。

[0072] 如用于本文,术语“F蛋白”或“融合蛋白”或“F蛋白多肽”或“融合蛋白多肽”指具有RSV融合蛋白多肽全部或部分氨基酸序列的多肽或蛋白。类似地,术语“G蛋白”或“G蛋白多肽”指具有RSV附接蛋白(attachment protein)多肽的全部或部分氨基酸序列的多肽或蛋白。已描述了多种RSV融合和附接蛋白,且其对于本领域技术人员是已知的。WO/2008/114149,其通过全文提述并入本文,列举了示例性F和G蛋白变体(例如,天然存在的变体)。

[0073] 如用于本文,术语“免疫原”或“抗原”指能够引发免疫应答的物质如蛋白、肽、肽、核酸。两个术语均涵盖表位,并可互换使用。

[0074] 如用于本文,术语“免疫刺激剂”指通过机体自身的化学信使(细胞因子)增强免疫应答的化合物。这些分子包括多种具有免疫刺激、免疫增强和促炎症活性的细胞因子、淋巴因子和趋化因子,如干扰素(IFN- γ)、白介素(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13);生长因子(例如,粒细胞-巨噬细胞(GM)集落刺激因子(CSF));和其他免疫刺激分子,如巨噬细胞炎症因子、Flt3配体、B7.1;B7.2等。所述免疫刺激剂分子可与本发明的VLP在相同配制物中施用,或可分别施用。可施用该蛋白或编码该蛋白的表达载体以产生免疫刺激作用。

[0075] 如用于本文,术语“免疫原性配制物”指当施于脊椎动物例如哺乳动物时,会诱导免疫应答的制备物。

[0076] 如用于本文,术语“传染原”指在脊椎动物中造成感染的微生物。通常所述生物为病毒、细菌、寄生虫、原生生物和/或真菌。

[0077] 如用于本文,术语“突变的”、“修饰的”、“突变”或修饰指任何导致核酸或多肽改变的对核酸和/或多肽的修饰。突变包括,例如在多核苷酸中的点突变、缺失或插入单一或多个残基,其包括在基因的蛋白编码区内出现的改变以及在蛋白编码序列之外的区(如调节或启动子序列,但不限于此)中的改变。遗传变化可以是任何类型的突变。举例而言,所述突变可包括点突变、移码突变、插入或缺失部分或整个基因。在一些实施方案中,所述突变为天然存在的。在其他实施方案中,所述突变为人工突变压力的结果。仍在其他实施方案中,RSV F蛋白中的突变是遗传工程的结果。

[0078] 如用于本文,术语“多价的”指具有一个或多个针对多种类型或株的传染原或疾病的抗原性蛋白/肽或免疫原的组合物。

[0079] 如用于本文,术语“药学上可接受的疫苗”指含有本发明的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP的配制物,其为能够施于脊椎动物并诱导足以诱导免疫以预防和/或减轻感染或疾病,和/或减少感染和/或疾病至少一种症状,和/或增强另一剂的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP的效力的保护性免疫应答的形式。通常而言,所述疫苗包含本发明组合物悬于或溶解于其中的常规的盐水或经缓冲的水溶液介质。以此形式,本发明的组合物可方便地用于预防、减轻或以其他方式治疗感染。当导入宿主时,所述疫苗能够激发包括但不限于产生抗体和/或细胞因子和/或激活细胞毒性T细胞、抗原呈递细胞、辅助T细胞、树突状细胞和/或其他细胞应答的免疫应答。

[0080] 如用于本文,短语“保护性免疫应答”或“保护性应答”指由针对传染原或疾病的抗

体介导的免疫应答,其由脊椎动物(例如人)所展示,预防或减轻感染,或减少其至少一种疾病症状。本发明的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP可刺激抗体的产生,所述抗体例如中和传染原、阻断传染原进入细胞、阻断传染原的复制和/或保护宿主细胞免受感染和破坏。该术语亦指由T淋巴细胞和/或其他白细胞介导针对免疫原或疾病的免疫应答,其由脊椎动物(例如人)展示,预防或减轻感染或疾病,或减少其至少一种症状。

[0081] 如用于本文,术语“脊椎动物”或“受试者”或“患者”指任何脊索动物亚门(subphylum chordata)的成员,包括但不限于人和其他灵长类,包括非人灵长类如黑猩猩和其他猿和猴物种。牲畜(farm animal)如牛、绵羊、猪、山羊和马;家养哺乳动物如犬和猫;实验室动物包括啮齿类如小鼠、大鼠(包括棉鼠)和豚鼠;禽类,包括家养、野生和猎禽如鸡、火鸡和其他鸡类、鸭、鹅等亦为非限定性实例。术语“哺乳动物”和“动物”包括在该定义中。旨在涵盖成体和新生个体两者。具体而言,婴幼儿为RSV疫苗的适当受试者或患者。

[0082] 如用于本文,术语“病毒样颗粒”(VLP)指至少一个属性类似病毒但不表现为感染性的结构。病毒样颗粒依照本发明并不携带编码病毒样颗粒的蛋白的遗传信息。一般而言,病毒样颗粒缺乏病毒基因组,并因此不具感染性。此外,病毒样颗粒经常通过异源表达大量产生,并可方便地纯化。

[0083] 如用于本文,术语“嵌合VLP”指含有来自至少两个传染原的蛋白(异源蛋白)或其部分的VLP。通常而言,一种蛋白来源于能够驱动从宿主细胞的VLP形成的病毒。就说明的目的的实例为BRSV M蛋白和/或HRSV G或F蛋白。术语RSV VLP和嵌合VLP在适当时可互换使用。

[0084] 如用于本文,术语“疫苗”指死的或减弱的病原体或衍生的抗原决定簇的制备物,其用于诱导针对该病原体的抗体或免疫的形成。给予疫苗以提供对疾病例如流感(其由流感病毒引起)的免疫。此外,术语“疫苗”亦指施于脊椎动物以产生保护性免疫(即预防或减少与感染相关的疾病严重性的免疫)的免疫原(例如,经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP)的悬液或溶液。本发明提供了具免疫原性并可提供针对与感染相关的疾病的保护的疫苗组合物。

[0085] RSV F蛋白

[0086] 两个结构膜蛋白,F和G蛋白表达于RSV的表面,并显示为中和抗体的靶标(Sullender,W.,2000,Clinical Microbiology Review 13,1-15)。这两个蛋白亦主要负责病毒识别和进入靶细胞;G蛋白结合于特定细胞受体,而F蛋白促进病毒与细胞的融合。F蛋白亦表达于感染细胞的表面,并负责其之后与其他细胞的融合,导致合胞体的形成。因此,针对F蛋白的抗体可中和病毒,或阻断病毒进入细胞或防止合胞体形成。尽管对G和F蛋白两者,已描述了A和B亚型之间的抗原性和结构差异,更显著的抗原性差异存在于G蛋白,其氨基酸序列仅为53%同源,而抗原相关性为5%(Walsh等(1987)J. Infect. Dis. 155,1198-1204;and Johnson等(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84,5625-5629)。与之相对,针对F蛋白培育的抗体在亚型A和B病毒中显示高度的交叉反应性。

[0087] RSV F蛋白指导RSV通过病毒粒体的包膜蛋白与宿主细胞质膜之间的融合进行的穿透。之后在感染过程中,表达于细胞表面的F蛋白可介导与相邻细胞的融合以形成合胞体。F蛋白是I型跨膜表面蛋白,其具有N端剪切的信号肽和靠近C端的膜锚着点(membrane

anchor)。RSV F是作为无活性的F₀前体合成的,其装配为同三聚体,并通过在反面高尔基复合体(trans-Golgi complex)中由细胞内肽酶剪切得到两个二硫键连接的亚基,F₁和F₂亚基而激活。由剪切产生的F₁亚基的N端含有直接插入靶标膜中以起始融合的疏水域(融合肽)。F₁亚基亦含有在融合中结合从而驱动使病毒和细胞膜彼此紧密接近的构象改变(conformational shift)的七重复,(Collins和Crowe,2007,Fields Virology,5th ed., D.M Kipe等,Lipincott,Williams and Wilkons,p.1604)。SEQ IDNO:2(GenBank登录号AAB59858)描绘了代表性RSV F蛋白,其由SEQ IDNO:1(GenBank登录号M11486)中所示的基因编码。

[0088] 自然界中,RSV F蛋白作为命名为F₀的长574个氨基酸的单一多肽前体表达。在体内,F₀在内质网中寡聚化,并由弗林蛋白酶在两个保守的弗林蛋白酶共同序列(弗林蛋白酶剪切位点)RARR(SEQ ID NO:23)(次要)和KKRKRR(SEQ ID NO:24)(主要)进行蛋白水解加工以生成由两个二硫键连接的片段组成的寡聚物。这些片段中较小的命名为F₂,其起源于F₀前体的N端部分。本领域技术人员会知道,缩写F₀、F₁和F₂在科学文献中常常命名为F₀、F₁和F₂。较大的C端F₁片段通过疏水性氨基酸的序列将F蛋白锚定于膜,所述疏水性氨基酸邻近24个氨基酸的细胞质尾部。三个F₂-F₁二聚体结合形成成熟F蛋白,其采用亚稳的融合前的(融合前)构象,在与靶细胞膜接触时受触发发生构象改变。该构象改变暴露称作融合肽的疏水序列,该序列与宿主细胞膜结合并促进病毒或感染细胞的膜与靶细胞膜的融合。

[0089] F₁片段含有至少两个七重复域,称为HRA和HRB,并分别处在靠近所述融合肽和跨膜锚定域的位置。在融合前构象中,F₂-F₁二聚体形成球状的头和柄(head and stalk)结构,其中所述HRA域处于球状头部中的分段(延伸)的构象。与之相对,HRB域形成从头部区延伸的三链的卷曲螺旋柄。在从融合前至融合后构象的转变过程中,HRA域折叠(collapse)并移至靠近HRB域处以形成反平行的六个螺旋束。在融合后状态,融合肽和跨膜域并排以促进膜融合。

[0090] 尽管上述对构象的描述是基于结晶学数据的分子建模,融合前和融合后构象之间的结构差异可无需诉诸结晶学即可进行监视。举例而言,可使用电子显微术以区分融合前和融合后(或者称为融合前的和融合的)构象,如Calder等,Virology,271:122-131(2000)和Morton等,Virology,311:275-288所阐明(就其技术教导的目的通过提述并入本文)。融合前构象也可以通过脂质体相关测定法(liposome association assay)而区别于融合的(融合后)构象,如Connolly等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:17903-17908(2006)(就其技术教导的目的通过提述并入本文)。此外,融合前和融合的构象可使用特异性识别RSV F蛋白的一种或另一种融合前或融合形式上存在,但不存在于其他形式的构象表位的抗体(例如单克隆抗体)进行区分。此类构象表位可为由于抗原决定簇在分子表面有偏好的暴露所致。或者,构象表位可来自直链多肽上非连续的氨基酸的并置。

[0091] 经修饰或突变的RSV F蛋白

[0092] 本发明人已发现当对RSV F蛋白的结构进行特定修饰时,可取得令人惊讶地高水平的融合(F)蛋白的表达。此类修饰亦令人意想不到地减少了RSV F蛋白在宿主细胞中的细胞毒性。此外,本发明的修饰的F蛋白表现了改善的展示融合后“棒棒糖”形态而非融合前“杆状”形态的能力。因此,在一个方面,本发明经修饰的F蛋白与野生型F蛋白(例如由SEQ ID NO:2所示例,其对应于GenBank登录号AAB59858)相比亦可显示改善的(例如增强的)免

疫原性。这些修饰显然适用于使用所述疫苗用于治疗 and/或预防RSV的疫苗和方法的开发。

[0093] 依照本发明,可对天然或野生型RSV F蛋白进行任何数量的突变,且在一个优选的方面,可进行多重突变以导致与天然或野生型RSV F蛋白相比改善的表达和/或免疫原性。此类突变包括点突变、移码突变、缺失和插入,优选一个或多个(例如一个、两个、三个或四个等)突变。

[0094] 所述天然F蛋白多肽可选自RSV A株、RSV B株、HRSV A株、HRSV B株、BRSV株或禽RSV株的任何的F蛋白,或其变体(如上所定义)。在某些示例性实施方案中,所述天然F蛋白多肽是由SEQ ID NO:2代表的F蛋白(GenBank登录号AAB59858)。为了协助理解本公开,所有氨基酸残基位置,无论是何种株,均针对(即所述氨基酸残基的位置相对于)示例性F蛋白的氨基酸位置给出。来自其他RSV株的F蛋白的相应氨基酸位置可由本领域普通技术人员容易地通过将选定的RSV株的氨基酸序列与示例性序列使用方便可得且公知的比对算法(如BLAST,例如使用缺省参数)进行比对来确定。来自不同RSV株的F蛋白多肽的多个其他实例公开于W0/2008/114149(其通过全文提述并入本文)。其他变体可通过遗传漂变发生,或可使用定点或随机诱变或通过重组两个或更多个已经存在的变体而人工产生。此类其他的变体亦适于本文中公开的经修饰或突变的RSV F蛋白的上下文。

[0095] 可使用任何本领域技术人员已知的方法将突变导入本发明的RSV F蛋白。突变可通过例如在作为二价金属离子辅因子的锰的存在下进行PCR反应而随机导入。或者,寡核苷酸导向的诱变可用于构建允许在沿编码DNA分子上任何决定的位点进行所有可能类型的碱基对变化的突变的或修饰的RSV F蛋白。一般而言,该技术涉及将互补于(除了一个或多个错配)编码目标RSV F蛋白的单链核苷酸序列的寡核苷酸退火。然后通过DNA聚合酶延伸错配的寡核苷酸,生成在一条链的序列中含有所需变化的双链DNA分子。该序列中的变化可例如导致氨基酸的缺失、取代或插入。然后可将双链多核苷酸插入适当的表达载体,并由此产生突变的或修饰的多肽。上述寡核苷酸导向的诱变可例如通过PCR实施。

[0096] 其他RSV蛋白

[0097] 本发明还涵盖包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV病毒样颗粒(VLP),其可配制为疫苗或抗原性配制物以供保护脊椎动物(例如人)免受RSV感染或其至少一种疾病症状。在一些实施方案中,所述包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP进一步包含其他的RSV蛋白,如M、N、G和SH。在其他实施方案中,所述包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP进一步包含来自异源的病毒株的蛋白,如流感病毒蛋白HA、NA和M1。在一个实施方案中,流感病毒蛋白M1来源于禽流感病毒株。

[0098] RSV N蛋白紧密结合于基因组RNA和复制中间物反义基因组RNA以形成抗RNase的核壳。SEQ ID NO:16(野生型)和SEQ ID NO:18(密码子优化的)描绘了RSV N蛋白的代表性氨基酸序列,而SEQ ID NO:15(野生型)和SEQ IDNO:17(密码子优化的)描绘了编码所述RSV N蛋白的代表性核酸序列。本发明中涵盖了与SEQ ID NO:18至少约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或者约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%相同的RSV N蛋白,及其所有的片段和变体(包括嵌合蛋白)。

[0099] RSV M蛋白是在质膜中积累的非糖基化的内部病毒粒体蛋白,其与RSVF蛋白和其他因子在病毒形态发生过程中相互作用。在某些优选的实施方案中,RSV M蛋白是牛RSV(BRSV)M蛋白。SEQ ID NO:12(野生型)和SEQ IDNO:14(密码子优化的)描绘了BRSV M蛋白的

代表性氨基酸序列,而SEQ IDNO:11(野生型)和SEQ ID NO:13(密码子优化的)描绘了编码所述BRSV M蛋白的代表性核酸序列。本发明中涵盖了与SEQ ID NO:12和14至少约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%相同的RSV(包括但不限于BRSV)M蛋白,及其所有的片段和变体(包括嵌合蛋白)。

[0100] RSV G蛋白是在接近N端具有单一疏水区的II型跨膜糖蛋白,其既充当未剪切的信号肽,还充当膜锚定点,留下分子C端的三分之二朝向外侧。RSVG亦表达为分泌蛋白,其来自ORF中第二个AUG(约在氨基酸48处)(其位于信号/锚定点之内)进行的翻译起始。RSV G外功能区的大部分在RSV株之间是高度分歧的(同前,1607页)。SEQ ID NO:26描绘了代表性RSV G蛋白,其由SEQ ID NO:25中所示的基因序列所编码。本发明中涵盖了与SEQ IDNO:26至少约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%相同的RSV G蛋白,及其所有的片段和变体(包括嵌合蛋白)。

[0101] RSV的SH蛋白是含有64个(RSV亚组A)或65个氨基酸残基(RSV亚组B)的II型跨膜蛋白。一些研究表明RSV SH蛋白可在病毒融合或在改变膜渗透性中起作用。然而,缺乏SH基因的RSV可以存活,导致合胞体形成并与野生型病毒一样良好地生长,表明SH蛋白对于病毒进入宿主细胞或合胞体形成并不是必需的。RSV的SH蛋白显示抑制TNF- α 信号传导的能力。SEQ IDNO:27描绘了RSV SH蛋白的代表性氨基酸序列。本发明中涵盖了与SEQ IDNO:27至少约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%相同的RSV SH蛋白,及其所有的片段和变体(包括嵌合蛋白)。

[0102] RSV疫苗

[0103] 目前,唯一批准用于预防RSV疾病的方法是被动免疫接种。表明IgG具有保护性作用的初始证据是从涉及雪貂(Prince,G.A.,Ph.D.diss.,University of California,Los Angeles,1975)中和人(Lambrecht等,(1976)J.Infect.Dis.134,211-217;和Glezen等(1981)J.Pediatr.98,708-715)中母体抗体的观察获得的。Hemming等(Morell等,eds.,1986,Clinical Use of Intravenous Immunoglobulins,Academic Press,London at pages 285-294)在涉及怀疑罹患新生儿败血症的新生儿中的静脉内免疫球蛋白(IVIG)的药物代谢动力学的研究过程中认识到RSV抗体可能可用于治疗或预防RSV感染。他们注意到一个呼吸系统分泌物产生RSV的婴儿在IVIG灌注之后迅速恢复。对于该IVIG批次的后续分析揭示了不寻常的高效价的RSV中和抗体。同一组的研究者随后检查了该富集了RSV中和抗体的超免疫的血清或免疫球蛋白保护棉鼠和灵长类免受RSV感染的能力(Prince等(1985)Virus Res.3,193-206;Prince等(1990)J.Virol.64,3091-3092)。这些研究的结果表明预防性给予的RSV中和抗体抑制RSV在棉鼠中的呼吸道复制。当治疗性给予时,RSV抗体既在棉鼠中还在非人灵长类模型中减少了肺部病毒复制。此外,免疫血清或免疫球蛋白的被动灌注并未在随后用RSV攻击的棉鼠中产生增强的肺部病理状态。

[0104] 因为RSV感染可通过将中和抗体提供给脊椎动物来防止,包含经修饰或突变的RSV F蛋白的疫苗当施于脊椎动物时,可在体内诱导中和抗体。偏好将经修饰或突变的RSV F蛋白用于预防和/或治疗RSV感染。因此,本公开的另一个方面涉及引发针对RSV的免疫应答的方法。该方法涉及将免疫学上有效量的含有经修饰或突变的RSV F蛋白的组合物施于受试者(如人或动物受试者)。免疫学上有效量的所述组合物的给药引发了对于所述经修饰或突

变的RSV F蛋白上存在的表位具有特异性的免疫应答。此种免疫应答可包括B细胞应答(例如中和抗体的产生)和/或T细胞应答(例如细胞因子的产生)。优选地,由经修饰或突变的RSV F蛋白引发的免疫应答包含对于所述经修饰或突变的RSV F蛋白上存在的至少一种构象表位具有特异性的要素。在一个实施方案中,所述免疫应答对于见于“棒棒糖”融合后活性状态的RSV F蛋白上存在的表位具有特异性。可将RSV F蛋白和组合物施于受试者而使其与RSV接触之后不增强病毒疾病。优选地,本文中公开的经修饰或突变的RSV F蛋白和适当配制的免疫原性组合物引发偏好Th1的免疫应答,其减少或预防RSV感染和/或减少或预防在RSV感染之后的病理应答。

[0105] 在一个实施方案中,本发明的RSV F蛋白见于微团形式(例如,玫瑰花结)。依照本发明可获得的微团由具有玫瑰花结样结构的免疫学上有活性的F突起蛋白(spike protein)的聚集体组成。所述玫瑰花结在电子显微镜下是可见的(Calder等,2000, *Virology* 271:122-131)。优选地,包含经修饰或突变的RSV F蛋白的本发明的微团展示表明融合后活性状态的“棒棒糖”形态。在一个实施方案中,在于宿主细胞中表达之后纯化微团。当施于受试者时,本发明的微团优选诱导中和抗体。在一些实施方案中,所述微团可与佐剂一同施用。在其他实施方案中,所述微团可无需佐剂施用。

[0106] 在另一个实施方案中,本发明涵盖了包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV病毒样颗粒(VLP),其可配制为疫苗或抗原性配制物以供保护脊椎动物(例如人)免受RSV感染或其至少一种疾病症状。本发明还涉及包含来源于不同株的RSV病毒的野生型和突变RSV基因或其组合的RSV VLP和载体,当将其转染入宿主细胞时,会产生包含RSV蛋白的病毒样颗粒(VLP)。

[0107] 在一些实施方案中,RSV病毒样颗粒可进一步包含至少一种病毒基质蛋白(例如RSV M蛋白)。在一个实施方案中,所述M蛋白来源于人RSV株。在另一个实施方案中,所述M蛋白来源于牛RSV株。在其他实施方案中,所述基质蛋白可为来自流感病毒株的M1蛋白。在一个实施方案中,所述流感病毒株是禽流感株。在一个优选实施方案中,所述禽流感株是H5N1株A/Indonesia/5/05。在其他实施方案中,所述基质蛋白可来自新城疫病毒(NDV)。

[0108] 在一些实施方案中,所述VLP可进一步包含RSV G蛋白。在一个实施方案中,所述G蛋白可来自HRSV组A。在另一个实施方案中,所述G蛋白可来自HRSV组B。还在另一个实施方案中,所述RSV G可来源于HRSV组A和/或组B。

[0109] 在一些实施方案中,所述VLP可进一步包含RSV SH蛋白。在一个实施方案中,所述SH蛋白可来自HRSV组A。在另一个实施方案中,所述SH蛋白可来自HRSV组B。还在另一个实施方案中,所述RSV SH可来源于HRSV组A和/或组B。

[0110] 在一些实施方案中,所述VLP可进一步包含RSV N蛋白。在一个实施方案中,所述N蛋白可来自HRSV组A。在另一个实施方案中,所述N蛋白可来自HRSV组B。还在另一个实施方案中,所述RSV N可来源于HRSV组A和/或组B。

[0111] 在进一步的实施方案中,本发明的VLP可包含一种或多种异源免疫原,如流感血凝素(HA)和/或神经氨酸酶(NA)。

[0112] 在一些实施方案中,本发明在一个或多个VLP中还包含来自相同的和/或不同的株的不同的RSV M、F、N、SH和/或G蛋白的组合。此外,所述VLP可包含一种或多种其他分子以供增强免疫应答。

[0113] 在本发明的另一个实施方案中,所述RSV VLP可携带药剂如核酸、siRNA、微RNA、化疗剂、成像剂和/或其他需递送至患者的药剂。

[0114] 本发明的VLP可用于制备疫苗和免疫原性组合物。VLP的一个重要特征是表达目标表面蛋白的能力,从而使得脊椎动物的免疫系统诱导针对目标蛋白的免疫应答。然而,并非所有蛋白可表达于VLP表面。为何某些蛋白在VLP表面不表达或表达不良可能有许多原因。一个原因是所述蛋白未被引导至宿主细胞膜或者所述蛋白没有跨膜域。作为一个实例,靠近流感血凝素羧基端的序列对于HA掺入成熟流感包膜核壳的脂双层和对于HA三聚体相互作用与流感基质蛋白M1装配可为重要的(Ali,等,(2000)J.Virol.74,8709-19)。

[0115] 因此,本发明的一个实施方案包括包含来自RSV的经修饰或突变的F蛋白和至少一种并不通常有效地表达于细胞表面或并非正常RSV蛋白的免疫原的VLP。在一个实施方案中,所述经修饰或突变的RSV F蛋白可与目标免疫原融合。在另一个实施方案中,所述经修饰或突变的RSV F蛋白与所述免疫原通过跨膜域和异源病毒表面膜蛋白例如MMTV包膜蛋白的细胞质尾部结合。

[0116] 本发明的其他嵌合VLP包括包含经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种来自异源传染原的蛋白的VLP。异源传染原的实例包括但不限于病毒、细菌、原生生物、真菌和/或寄生物。在一个实施方案中,来自另一个传染原的免疫原是异源病毒蛋白。在另一个实施方案中,来自异源传染原的蛋白是包膜相关蛋白。在另一个实施方案中,来自另一个异源传染原的蛋白是在VLP表面表达的。在另一个实施方案中,来自传染原的蛋白包含在脊椎动物中会生成保护性免疫应答的表位。在一个实施方案中,来自另一个传染原的蛋白与经修饰或突变的RSV F蛋白共同表达。在另一个实施方案中,来自另一个传染原的蛋白融合于经修饰或突变的RSV F蛋白。在另一个实施方案中,仅来自另一个传染原的蛋白的一部分融合于经修饰或突变的RSV F蛋白的一部分。在另一个实施方案中,融合于经修饰或突变的RSV F蛋白的所述来自另一个传染原的蛋白的部分在VLP表面表达。

[0117] 本发明还涵盖在本发明的VLP之上或之中表达的蛋白的变体。所述变体可在其组成蛋白的氨基酸序列中含有改变。针对蛋白的术语“变体”指相对参照序列改变了一个或多个氨基酸的氨基酸序列。所述变体可具有“保守”变化,其中取代的氨基酸具有类似的结构或化学性质,例如用异亮氨酸替代亮氨酸。或者,变体可具有“非保守”的变化,例如用色氨酸替代甘氨酸。类似的次要变异还可包括氨基酸缺失或插入,或两者皆是。确定可取代、插入或缺失哪些氨基酸残基而不会消除生物学或免疫性活性的指导可使用本领域公知的计算机程序例如DNASTAR软件来发现。

[0118] 天然变体可由于蛋白中的突变而出现。这些突变可在每组传染原例如流感中导致抗原性变异(variability)。因此,经例如流感株感染的个体针对该病毒产生抗体,随着新病毒株的出现,针对旧株的抗体不再识别新病毒,而可出现重新感染。本发明涵盖了来自传染原的蛋白的所有抗原性和遗传变异以供制备VLP。

[0119] 描述适用于本发明的分子生物学技术如克隆、突变、细胞培养等的通用文本包括Berger和Kimmel,Guide to Molecular Cloning Techniques,Methods in Enzymology volume 152 Academic Press,Inc.,San Diego,Calif.(Berger);Sambrook等,Molecular Cloning--A Laboratory Manual(3rd Ed.),Vol.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory,

Cold Spring Harbor, N.Y., 2000 (“Sambrook”)以及Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel等, eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (“Ausubel”)。这些文本描述了诱变、载体的使用、启动子和许多其他相关的主题, 涉及例如RSV的F和/或G分子的克隆和突变等。因此, 本发明还涵盖使用已知的蛋白质工程方法和重组DNA技术以改善或改变在本发明的VLP之上或之中表达的蛋白的特征。多种类型的诱变可用于产生和/或分离编码蛋白分子的变体核酸和/或进一步修饰/突变本发明VLP之中或之上的蛋白。其包括但不限于定位、随机点诱变、同源重组(DNA改组)、使用含有尿嘧啶的模板的诱变、寡核苷酸导向的诱变、硫代磷酸酯修饰的DNA诱变、使用有间隔的双链DNA的诱变等。其他合适的方法包括点错配修复、使用修复缺陷型宿主株的诱变、限制-选择和限制-纯化、缺失诱变、通过全基因合成的诱变、双链断裂修复等。诱变例如涉及嵌合构建体的诱变, 亦包括在本发明中。在一个实施方案中, 诱变可由天然存在的分子或经改变或突变的天然存在的分子已知的信息例如序列、序列比较、物理性质、晶体结构等所指导。

[0120] 本发明进一步包括显示实质生物学活性例如当表达于本发明的VLP之上或之中时, 能够引发有效的抗体应答的蛋白变体。此类变体包括根据本领域已知的一般规则选定使其对活性几乎无作用的缺失、插入、倒位、重复和取代。

[0121] 克隆蛋白的方法在本领域是已知的。举例而言, 编码具体RSV蛋白的基因可通过RT-PCR从来自经RSV病毒感染的细胞提取的多聚腺苷酸化mRNA来分离。所得的产物基因可作为DNA插入克隆入载体。术语“载体”指通过其核酸可增殖和/或在生物、细胞或细胞组分之间转移的物事。载体包括自主复制或可整合入宿主染色体的质粒、病毒、细菌噬菌体、原病毒、噬菌粒、转座子、人工染色体等。载体亦可为并不自主复制的裸RNA多核苷酸、裸DNA多核苷酸、由在同一链中DNA和RNA两者组成的多核苷酸、多赖氨酸缀合的DNA或RNA、肽缀合的DNA或RNA、脂质体缀合的DNA等。在许多但非所有的常见实施方案中, 本发明的载体是质粒或杆粒。

[0122] 因此, 本发明包括编码蛋白的核苷酸, 包括嵌合分子, 其克隆入可在细胞中表达诱导本发明VLP生成的表达载体。“表达载体”是能够促进表达以及掺入其中的核酸的复制载体如质粒。通常, 所述待表达的核酸“可操作地连接于”启动子和/或增强子, 并受该启动子和/或增强子转录调节调控。在一个实施方案中, 所述核苷酸编码经修饰或突变的RSV F蛋白(如上所讨论)。在另一个实施方案中, 所述载体进一步包含编码M和/或G RSV蛋白的核苷酸。在另一个实施方案中, 所述载体进一步包含编码M和/或N RSV蛋白的核苷酸。在另一个实施方案中, 所述载体进一步包含编码M、G和/或N RSV蛋白的核苷酸。在另一个实施方案中, 所述载体进一步包含编码BRSV M蛋白和/或N RSV蛋白的核苷酸。在另一个实施方案中, 所述载体进一步包含编码BRSV M和/或G蛋白, 或流感HA和/或NA蛋白的核苷酸。在另一个实施方案中, 所述核苷酸编码经修饰的或突变的RSV F和/或RSV G蛋白与流感HA和/或NA蛋白。在另一个实施方案中, 所述表达载体是杆状病毒。

[0123] 在本发明的一些实施方案中, 蛋白可包含含有产生沉默取代、插入或缺失, 但并不改变编码蛋白的性质或活性或该蛋白如何制备的突变。可由于多种原因产生核苷酸变体, 例如, 为了对于特定宿主优化密码子表达(将人mRNA中的密码子变为昆虫细胞如Sf9细胞优选的那些)。参见美国专利公开2005/0118191, 就所有目的通过全文提述并入本文。

[0124] 此外,可对所述核苷酸进行测序以确保克隆了正确的编码区,且其不含有任何不希望有的突变。该核苷酸可亚克隆入表达载体(例如杆状病毒)以供在任何细胞中进行表达。上述仅为如何可克隆RSV病毒蛋白的一个实例。本领域技术人员理解其他方法是可获得并为可能的。

[0125] 本发明还提供了包含编码RSV结构基因包括F、M、G、N、SH,或其一部分,和/或任何上述的嵌合分子的RSV核苷酸的构建体和/或载体。所述载体可为,例如噬菌体、质粒、病毒或逆转录病毒载体。所述包含RSV结构基因,包括F、M、G、N、SH,或其一部分,和/或任何上述的嵌合分子的构建体和/或载体,应可操作地连接于适当的启动子,如AcMNPV多角体蛋白启动子(或其他杆状病毒)、噬菌体lambda PL启动子,大肠杆菌lac、phoA和tac启动子,SV40早期和晚期启动子,和逆转录病毒LTR的启动子为非限定性实例。其他合适的启动子根据宿主细胞和/或所需的表达速率对本领域技术人员是已知的。表达构建体会进一步含有转录起始、终止位点,并在转录区中,含有用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的转录物的编码部分优选会在起始处含有翻译起始密码子而在待翻译的多肽末端适当位置含有终止密码子。

[0126] 表达载体优选会包含至少一个选择性标记。此类标记包括二氢叶酸还原酶、G418或新霉素抗性(对于真核细胞培养);和四环素、卡那霉素或氨苄西林抗性基因(对于大肠杆菌和其他细菌的培养)。优选的载体包括病毒载体如杆状病毒、痘病毒(例如牛痘病毒、禽痘病毒、犬痘病毒、鸡痘病毒、浣熊痘病毒、猪痘病毒等)、腺病毒(例如犬类腺病毒)、疱疹病毒和逆转录病毒。其他可用于本发明的载体包括用于细菌的载体,其包括pQE70、pQE60和pQE-9,pBluescript载体、Phagescript载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5。优选的真核载体包括pFastBac 1pWINEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG、pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL。其他合适的载体对本领域技术人员而言是容易想到的。在一个实施方案中,包含编码RSV基因包括经修改或突变的RSV F基因,以及M、G、N、SH的基因或其部分,和/或任何上述的嵌合分子的核苷酸的载体,是pFastBac。

[0127] 上述提及的重组构建体可用于转染、感染或转化,并可表达RSV蛋白,包括经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种免疫原。在一个实施方案中,所述重组构建体包含经修饰或突变的RSV F、M、G、N、SH或其部分,和/或任何上述的分子进入真核细胞和/或原核细胞。因此,本发明提供了宿主细胞,其包含含有编码RSV结构基因包括经修饰或突变的RSV F和至少一种免疫原例如但不限于RSV G、N或SH或其部分和/或任何上述的分子的核酸,并允许基因包括RSV F、G、N、M或SH或其部分和/或任何上述分子在宿主细胞中在允许VLP形成的条件下表达的载体。

[0128] 真核宿主细胞包括酵母、昆虫、禽类、植物、秀丽隐杆线虫(*C.elegans*)(或线虫)和哺乳动物宿主细胞。昆虫细胞的非限定性实例为草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)(Sf)细胞,例如Sf9、Sf21,粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)细胞,例如High Five细胞,和果蝇属(*Drosophila*)S2细胞。真菌(包括酵母)宿主细胞的实例为酿酒酵母(*S.cerevisiae*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)(*K.lactis*)、假丝酵母属(*Candida*)菌种包括白色假丝酵母(*C.albicans*)和光滑假丝酵母(*C.glabrata*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*(*S.pombe*))、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)和解脂西洋蓍霉(*Yarrowia lipolytica*)。哺乳动物细胞的实例为COS

细胞、幼仓鼠肾细胞、小鼠L细胞、LNCaP细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,人胚肾(HEK)细胞和非洲绿猴细胞、CV1细胞、HeLa细胞、MDCK细胞、Vero和Hep-2细胞。亦可使用非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞或两栖类来源的其他细胞。原核宿主细胞的实例包括细菌细胞例如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)和分枝杆菌。

[0129] 载体,例如包含经修饰的或突变的RSV F蛋白,和至少一种免疫原包括但不限于RSV G、N或SH或其部分,和/或任何上述的嵌合分子的多核苷酸的载体,可依照本领域公知方法转染入宿主细胞。举例而言,将核酸导入真核细胞可通过磷酸钙共沉淀、电穿孔、微注射、lipofection和采用多胺转染剂的转染。在一个实施方案中,上述载体是重组杆状病毒。在另一个实施方案中,上述重组杆状病毒转染入真核细胞。在一个优选实施方案中,上述细胞是昆虫细胞。在另一个实施方案中,上述昆虫细胞是Sf9细胞。

[0130] 该发明还提供了增加VLP产生效率的构建体和方法。举例而言,将前导序列添加至RSV F、M、G、N、SH或其部分,和/或任何上述嵌合或异源分子,可改善蛋白在细胞内转运的效率。举例而言,可将异源信号序列融合于F、M、G、N、SH或其部分,和/或上述任何嵌合或异源分子。在一个实施方案中,所述信号序列可来源于昆虫细胞的基因并融合于M、F、G、N、SH或其部分和/或上述任何嵌合或异源分子。在另一个实施方案中,所述信号肽是壳多糖酶信号肽,其在杆状病毒表达系统中有效运作。

[0131] 另一个增加VLP产生效率的方法是针对具体细胞类型密码子优化编码RSV包括经修饰或突变的RSV F蛋白、M、G、N、SH或其部分和/或上述任何嵌合或异源分子的核苷酸。对于密码子优化核酸以供在Sf9细胞中表达的实例,参见SEQ ID No:3、5、7、9、13、17、19和25。

[0132] 本发明还提供了产生VLP的方法,所述方法包括在允许VLP形成的条件下表达RSV基因包括经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种其他蛋白包括但不限于RSV M、G、N、SH或其部分,和/或上述任何嵌合或异源分子。取决于选定的表达系统和宿主细胞,在重组蛋白表达和VLP形成的条件下通过培养由表达载体转化的细胞来产生VLP。在一个实施方案中,本发明包括产生VLP的方法,包括将编码至少一种经修饰或突变的RSV F蛋白的载体转染入合适的宿主细胞并在允许VLP形成的条件下表达经修饰和突变的RSV F蛋白。在另一个实施方案中,真核细胞选自下组:酵母、昆虫、两栖类、禽类或哺乳动物细胞。适当生长条件的选择在本领域的技术和本领域一般技术人员的技术范围内。

[0133] 培养经工程改造产生本发明VLP的细胞的方法包括但不限于分批、分批补料、连续和灌注细胞培养技术。细胞培养意指细胞在细胞增殖并表达蛋白(例如重组蛋白)以供纯化和分离的生物反应器(发酵室)中的生长和增殖。通常而言,在灭菌、受控的温度和大气条件下在生物反应器中进行细胞培养。生物反应器是可监视环境条件如温度、大气、搅拌和/或pH的用于培养细胞的室。在一个实施方案中,所述生物反应器是不锈钢的室。在另一个实施方案中,所述生物反应器是预灭菌的塑料袋(例如Cellbag[®], Wave Biotech, Bridgewater, NJ)。在其他实施方案中,所述经预灭菌的塑料袋为约50L至1000L的袋。

[0134] 然后使用保存VLP完整性的方法如梯度离心例如氯化铯、蔗糖和碘克沙醇,以及标准纯化技术包括例如离子交换和凝胶过滤层析来分离VLP。

[0135] 下述是如何制备、分离和纯化的本发明的VLP的实例。通常而言VLP是从经工程改造在细胞培养中培养细胞时产生VLP的重组细胞系产生的(见上)。本领域技术人员会知道有其他可用于制备和纯化本发明VLP的方法,因此本发明并不限于所述方法。

[0136] 本发明VLP的产生可通过将Sf9细胞(非感染的)接种入摇瓶来起始,允许细胞随着细胞生长和繁殖而扩展并规模放大(scale up)(例如从125ml烧瓶至50L Wave袋)。将用于生长细胞的培养基对于适当的细胞系进行配制(优选无血清培养基,例如昆虫培养基EXCell-420, JRH)。之后,以最有效的感染复数(multiplicity of infection)用重组杆状病毒感染细胞(例如每细胞约1至约3个空斑形成单位)。一旦发生感染,经修饰或突变的RSV F蛋白, M、G、N、SH或其部分,和/或任何上述嵌合或异源分子从病毒基因组表达,自主装配入VLP,并在感染后大约24至72小时从细胞分泌。通常而言,当细胞处于对数生长中期($4-8 \times 10^6$ 个细胞/ml)并至少约90%存活时感染最为有效。

[0137] 本发明的VLP可在感染后大约48至96小时,当细胞培养基中VLP的水平接近最大值,但在大量细胞裂解之前时进行收获。收获时点Sf9细胞密度和存活性可为约 0.5×10^6 个细胞/ml至约 1.5×10^6 个细胞/ml与至少20%存活性,如染色排阻测定显示。之后,去除并澄清培养基。将NaCl添加至培养基至浓度为约0.4至约1.0M,优选至约0.5M,以避免VLP聚集。从含有本发明VLP的细胞培养基去除细胞和细胞碎片可通过具有一次性使用的、经预灭菌的中空纤维0.5或1.00 μ m过滤筒的切向流过滤(TTF)或类似装置来达成。

[0138] 之后,在澄清的培养基中的VLP可通过超滤使用一次性、经预灭菌的500,000分子量截取值中空纤维筒来浓缩。浓缩的VLP可针对含有0.5M NaCl的10体积的pH 7.0至8.0磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析过滤以去除残余的培养基组分。

[0139] 浓缩的、透析过滤的VLP可进一步在20%至60%不连续蔗糖梯度上在含0.5M NaCl的pH 7.2PBS缓冲液中通过以6500x g在约4 $^{\circ}$ C至约10 $^{\circ}$ C离心18小时来纯化。通常而言,VLP会在约30%至约40%蔗糖之间或在界面(以20%和60%分步梯度)形成明显可见的条带,其可从该梯度收集并储藏。可稀释该产物至包含200mM NaCl的制备物以供纯化工艺的下一个步骤。该产物含有VLP并可含有完整的杆状病毒颗粒。

[0140] VLP的进一步纯化可通过阴离子交换层析或44%等密度蔗糖垫(cushion)离心来达成。在阴离子交换层析中,将来自蔗糖梯度的样品(见上)加载入含有具有阴离子(例如Matrix Fractogel EMD TMAE)的介质的柱,并通过可将VLP从其他污染物(例如杆状病毒和DNA/RNA)分离的盐梯度(从约0.2M至约1.0M NaCl)来洗脱。在蔗糖垫方法中,将包含VLP的样品添加至44%蔗糖垫,并以30000g离心约18小时。VLP在44%蔗糖顶部形成条带,而杆状病毒沉淀在底部,而其他的污染蛋白停留在顶部的0%蔗糖层。收集VLP峰或条带。

[0141] 视需要,可将完整的杆状病毒失活。失活可通过化学方法例如福尔马林或 β -丙内酯(BPL)来达成。完整杆状病毒的去除和/或失活亦大体上可通过使用上述例示的本领域已知的选择性沉淀和层析方法来达成。失活方法包括将含有所述VLP的样品在0.2%BPL中在约25 $^{\circ}$ C至约27 $^{\circ}$ C温育3小时。杆状病毒也可通过将含有所述VLP的样品在0.05%BPL中在4 $^{\circ}$ C温育3日,然后在37 $^{\circ}$ C温育1小时来失活。

[0142] 在失活/去除步骤之后,可将包含VLP的产物经过另一个透析过滤步骤运行以去除任何来自失活步骤的试剂和/或任何残余的蔗糖,并将VLP置于所需的缓冲液(例如PBS)中。包含VLP的溶液可通过本领域已知方法灭菌(例如无菌过滤)并储藏于冷藏箱(refrigerator)或冷冻箱(freezer)。

[0143] 上述技术可以多种规模进行实践。举例而言,T-烧瓶、摇瓶、旋转瓶(spinner bottle),直至工业大小的生物反应器。所述生物反应器可包括不锈钢罐或经预灭菌的塑料

袋(例如,由Wave Biotech,Bridgewater,NJ出售的系统)。本领域技术人员会知道就其目的最需要的是什么。

[0144] 杆状病毒表达载体的表达和产生和用重组杆状病毒感染细胞以产生重组RSV VLP如前所述可在昆虫细胞例如Sf9昆虫细胞中达成。在一个实施方案中,所述细胞为经工程改造产生RSV VLP的重组杆状病毒感染的SF9。

[0145] 药物或疫苗配制物和给药

[0146] 可用于本文的药物组合物含有药学上可接受的载体,包括任何合适的稀释剂或赋形剂,其包括任何自身并不诱导有害于接受该组合物的脊椎动物的免疫应答产生并可不带来不必要的毒性地施用医药试剂,以及本发明的经修饰或突变的RSV F蛋白,包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。如用于本文,术语“药学上可接受”意指由联邦或州政府的管理机构批准,或列于美国药典、欧洲药典或其他一般接受的药典供用于哺乳动物特别是人。这些组合物可用作疫苗和/或抗原性组合物以供在哺乳动物中诱导保护性免疫应答。

[0147] 本发明涵盖了包含VLP的药学上可接受的疫苗组合物,所述VLP包含至少一种经修饰或突变的RSV F蛋白,以及至少一种其他蛋白,包括但不限于RSV M、G、N、SH或其部分,和/或任何上述的嵌合或异源分子。在一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP包含至少一种经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种其他免疫原。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP包含至少一种经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种RSV M蛋白。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP包含至少一种经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种BRSV M蛋白。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP包含至少一种经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种流感M1蛋白。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP包含至少一种经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种禽流感M1蛋白。

[0148] 在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP进一步包含RSV G蛋白,包括但不限于HRSV、BRSV或禽RSV G蛋白。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP进一步包含RSV N蛋白,包括但不限于HRSV、BRSV或禽RSV N蛋白。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP进一步包含RSV SH蛋白,包括但不限于HRSV、BRSV或禽RSV SH蛋白。

[0149] 在另一个实施方案中,本发明涵盖了包含嵌合VLP的药学上可接受的疫苗组合物,如包含BRSV M和经修饰或突变的RSV F蛋白和/或来自RSV的G、H或SH蛋白和任选地来源于流感病毒的HA或NA蛋白的VLP,其中所述HA或NA蛋白融合于RSV F和/或G蛋白的跨膜域和细胞质尾部。

[0150] 本发明还涵盖了如上所述包含经修饰或突变的RSV F蛋白,包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP的药学上可接受的疫苗组合物。

[0151] 在一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP包含经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种其他蛋白。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP进一步包含RSV M蛋白,如BRSV M蛋白但不限于此。在另一个实

施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP进一步包含RSV G蛋白,包括但不限于HRSV G蛋白。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP进一步包含RSV N蛋白,包括但不限于HRSV、BRSV或禽RSV N蛋白。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP进一步包含RSV SH蛋白,包括但不限于HRSV、BRSV或禽RSV SH蛋白。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP包含BRSV M蛋白和来自HRSV组A的F和/或G蛋白。在另一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP包含BRSV M蛋白和来自HRSV组B的F和/或G蛋白。在另一个实施方案中,本发明涵盖了包含嵌合VLP如包含来自BRSV的嵌合M蛋白和任选地来源于流感病毒的HA蛋白的VLP的药学上可接受的疫苗组合物,其中所述M蛋白融合于所述流感HA蛋白。在另一个实施方案中,本发明涵盖了包含嵌合VLP如包含BRSV M和来自RSV的嵌合F和/或G蛋白和任选地来源于流感病毒的HA蛋白的VLP的药学上可接受的疫苗组合物,其中所述嵌合流感HA蛋白融合于RSV F和/或G蛋白的跨膜域和细胞质尾部。在另一个实施方案中,本发明涵盖了包含嵌合VLP如包含BRSV M和来自RSV的嵌合F和/或G蛋白和任选地来源于流感病毒的HA或NA蛋白的VLP的药学上可接受的疫苗组合物,其中所述HA或NA蛋白融合于RSV F和/或G蛋白的跨膜域和细胞质尾部。

[0152] 本发明还涵盖了包含嵌合VLP的药学上可接受的疫苗组合物,所述VLP包含至少一种RSV蛋白。在一个实施方案中,所述药学上可接受的疫苗组合物包含VLP,所述VLP包含经修饰或突变的RSV F蛋白或至少一种来自异源传染原或患病细胞的免疫原。在另一个实施方案中,所述来自异源传染原的免疫原是病毒蛋白。在另一个实施方案中,所述来自异源传染原的病毒蛋白是包膜相关蛋白。在另一个实施方案中,所述来自异源传染原的病毒蛋白表达于VLP表面。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白包含在脊椎动物中产生保护性免疫应答的表位。

[0153] 本发明还涵盖了用于免疫接种脊椎动物如人受试者的包含VLP的试剂盒,所述VLP包含至少一种RSV蛋白。在一个实施方案中,所述试剂盒包含的VLP包含经修饰或突变的RSV F蛋白。在一个实施方案中,所述试剂盒进一步包含RSV M蛋白如BRSV M蛋白。在另一个实施方案中,所述试剂盒进一步包含RSV G蛋白。在另一个实施方案中,本发明涵盖了包含VLP的试剂盒,其包含来自BRSV的嵌合M蛋白和任选地来源于流感病毒的HA蛋白,其中所述M蛋白融合于BRSV M。在另一个实施方案中,本发明涵盖了包含VLP的试剂盒,其包含来自BRSV的嵌合M蛋白、RSV F和/或G蛋白和来自异源传染原的免疫原。在另一个实施方案中,本发明涵盖了包含VLP的试剂盒,其包含来自BRSV的M蛋白、嵌合RSV F和/或G蛋白和任选地来源于流感病毒的HA蛋白,其中所述HA蛋白融合于RSV F或G蛋白的跨膜域和细胞质尾部。在另一个实施方案中,本发明涵盖了包含VLP的试剂盒,其包含来自BRSV的M蛋白,嵌合RSV F和/或G蛋白和任选地来源于流感病毒的HA或NA蛋白,其中所述HA蛋白融合于RSV F和/或G蛋白的跨膜域和细胞质尾部。

[0154] 在一个实施方案中,本发明包含免疫原性配制物,其包含至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白。在另一个实施方案中,本发明包含免疫原性配制物,其包含至少一个有效剂量的包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团。还在另一个实施方案中,本发明包含免疫原性配制物,其包含至少一个有效剂量的如上所述的包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。

[0155] 本发明的免疫原性配制物包含经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP,和药学上可接受的载体或赋形剂。药学上可接受的载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、无菌等张水性缓冲液及其组合。对药学上可接受的载体、稀释剂和其他赋形剂的详尽讨论呈现于Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub.Co.N.J.目前版本)。配制物应适合给药模式。在一个优选实施方案中,所述配制物适于对人给药,优选是无菌的,非颗粒的和/或非致热原性的。

[0156] 所述组合物,视需要,还可含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。所述组合物可为固体形式,如适于重构的冻干粉、液体溶液、悬液、乳液、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放配制物或散剂。经口配制物可包括标准载体如医药级别甘露醇、乳糖、淀粉、硫酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0157] 本发明还提供了包含一种或多种充以本发明疫苗组合物的一种或多种成分的容器的医药包或试剂盒。在一个优选实施方案中,所述试剂盒包含两个容器,一个含有经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP,而另一个含有佐剂。与此种(类)容器相配套的可为管理药物或生物产品的制造、使用和销售的政府机构规定的通告,该通告反映了该机构批准用于人给药的制造、使用和销售。

[0158] 本发明还提供了将该配制物包装于指示组合物量的密封的容器如安瓿瓶或小袋(sachette)。在一个实施方案中,将组合物作为液体提供,在另一个实施方案中,作为置于密封容器中的干燥的经灭菌的冻干粉或无水浓缩物提供,并可用例如水或盐水重构至适当浓度以供施于受试者。

[0159] 在另一个实施方案中,将组合物以液体形式置于指示组合物量和浓度的密封容器中提供。优选地,组合物的液体形式是在密封容器中以至少约50 μ g/ml,更优选至少约100 μ g/ml,至少约200 μ g/ml,至少500 μ g/ml,或至少1mg/ml提供的。

[0160] 作为一个实例,包含本发明经修饰或突变的RSV F蛋白的嵌合RSV VLP以足以刺激免疫应答的有效量或数量(如上所定义)施用,每个均为针对一个或多个RSV株的应答。本发明经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或VLP的施用引发针对RSV的免疫。通常而言,可在该范围之内基于例如年龄、生理状况、体重、性别、食谱、给药时间和其他临床因素来调整剂量。预防性疫苗配制物是通过例如皮下或肌肉内注射使用针头和注射器,或无针头的注射装置进行系统性施用。或者,将所述疫苗配制物通过滴剂、大颗粒气雾剂(大于约10微米)或喷雾而鼻内施用进入上呼吸道。尽管所有上述递送途径导致免疫应答,鼻内给药赋予了在许多病毒包括RSV和流感病毒进入位点引发粘膜免疫的附加益处。

[0161] 因此,本发明还包括配制对哺乳动物诱导针对感染或其至少一种疾病症状的免疫的疫苗或抗原性组合物的方法,包括将有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP添加至所述配制物。在一个实施方案中,所述感染是RSV感染。

[0162] 尽管用单一剂量刺激免疫是可能的,可通过相同或不同的途径施用额外的剂量以取得所需的效果。在新生儿和婴儿中,例如,可能需要多次施用以引发充足水平的免疫。可

在整个儿童期(childhood)视需要按间隔施用,以维持充足水平的针对感染例如RSV感染的保护。类似地,特别易感于重复或严重感染的成人,如例如健康护理工作者、日托工作者、幼儿的家庭成员、老年人和具有缺损心肺功能的个体,可能需要多次免疫接种以确立和/或维持保护性免疫应答。可监视所诱导的免疫的水平,例如通过测量中和性分泌和血清抗体的量,并视需要调整剂量或重复接种以引发并维持所需水平的保护。

[0163] 施用包含经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP的组合物(例如疫苗和/或抗原性配制物)的方法包括但不限于肠胃外给药(例如皮内、肌肉内、静脉内和皮下)、硬膜外和粘膜(例如鼻内和经口或肺部途径或通过栓剂)。在一个具体实施方案中,本发明的组合物是肌肉内、静脉内、皮下、经皮或皮内施用的。所述组合物可通过任何方便的途径施用,例如通过灌注或推注注射,通过经由上皮或粘膜皮肤膜的吸收(例如,口粘膜、结肠、结膜、鼻咽、口咽、阴道、尿道、膀胱、和肠粘膜等),并可与其他生物活性剂一同施用。在一些实施方案中,本发明组合物的鼻内或其他粘膜施用途径可诱导实质上高于其他给药途径的抗体或其他免疫应答。在另一个实施方案中,本发明的鼻内或其他粘膜给药途径可诱导会诱导针对其他RSV株交叉保护的抗体或其他免疫应答。给药可为系统性的或局部的。

[0164] 还在另一个实施方案中,所述疫苗和/或免疫原性配制物以为了在免疫接种位点引发免疫应答而靶向粘膜组织的方式施用。举例而言,可靶向粘膜组织如肠相关淋巴组织(GALT)以通过使用经口施用含有具有特定粘膜靶向性质的佐剂的组合物进行免疫接种。亦可靶向其他粘膜组织,如鼻咽淋巴组织(NALT)和支气管相关淋巴组织(BALT)。

[0165] 本发明的疫苗和/或免疫原性配制物亦可以剂量日程施用,例如,起始的疫苗组合物给药与后续的增强给药。在具体实施方案中,第二剂的组合物是在起始给药之后从两周至一年,优选从约1、约2、约3、约4、约5至约6个月的任何时点施用的。此外,第三剂可在第二剂之后和起始给药之后从约三个月至约两年,或甚至更长,优选约4、约5,或约6个月,或约7个月至约一年时施用。当在第二剂之后在受试者的血清和/或尿或粘膜分泌物中检测不出具体免疫球蛋白或检测出低水平的具体免疫球蛋白时,可任选地施用第三剂。在一个优选实施方案中,第二剂是在第一次给药之后约一个月施用的,而第三剂是在第一次给药之后约六个月施用的。在另一个实施方案中,第二剂是在第一次给药之后约六个月施用的。在另一个实施方案中,本发明的组合物可作为联合疗法的一部分施用。举例而言,本发明的组合物可与其他免疫原性组合物;抗病毒剂和/或抗生素一同配制。

[0166] 药物组合物的剂量可方便地由本领域技术人员来确定,例如通过首先鉴定有效引发预防性或治疗性免疫应答的剂量,例如通过测量病毒特异性免疫球蛋白的血清效价或通过测量血清样品或尿样或粘膜分泌物中抗体的抑制比。所述剂量可从动物研究确定。用于研究疫苗效力的动物的非限定性列表包括豚鼠、仓鼠、雪貂、南美栗鼠、小鼠和棉鼠。大多数动物并非传染原的天然宿主,但仍可用于疾病多种方面的研究。举例而言,任何上述动物可按剂量给药疫苗候选例如经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP,以部分表征诱导的免疫应答,和/或确定是否产生了任何中和抗体。举例而言,许多研究是在小鼠模型中进行的,因为小鼠具有较小的大小,且其较低的成本允许研究者以较大规模进行研究。

[0167] 此外,本领域技术人员可进行人的临床研究以确定对于人的优选有效剂量。此类

临床研究在本领域是常规的和公知的。待采用的准确剂量亦取决于给药途径。有效剂量可来源于体外或动物测试系统的剂量-应答外推。

[0168] 如本领域中亦公知的,具体组合物的免疫原性可通过使用称作佐剂的免疫应答的非特异性刺激剂来增强。佐剂实验性用于促进针对未知抗原的免疫的一般性增长(例如,美国专利4,877,611号)。免疫接种实验方案已使用佐剂刺激应答多年,故此,佐剂对于本领域一般技术人员是公知的。一些佐剂影响抗原呈递的方式。举例而言,当用明矾沉淀蛋白抗原时,免疫应答增加。抗原的乳化亦延长了抗原呈递的持续时间。本发明的范围涵盖了包含任何描述于Vogel等,“A Compendium of Vaccine Adjuvants and Excipients (2nd Edition)”(就所有目的通过全文提述并入本文)中的佐剂。

[0169] 示例性的佐剂包括完全弗氏佐剂(含有被杀灭的结核分枝杆菌的非特异性免疫应答刺激剂)、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。其他佐剂包括GMCSF、BCG、氢氧化铝、MDP化合物如thur-MDP或nor-MDP、CGP(MTP-PE)、脂质A和单磷酰基脂质A(MPL)。涵盖了RIBI,其含有三个提取自细菌的组分,即MPL、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)在2%鲨烯/Tween 80中的乳剂。亦可使用MF-59、Novasomes[®]、MHC抗原。

[0170] 在本发明的一个实施方案中,佐剂是具有约二至十个双层以由水层分隔的实质上为球形壳的形式排列,围绕不含脂双层的较大无定形中央空腔的少片层(paucilamellar)脂质小囊。少片层脂质小囊可以以几种方式起作用刺激免疫应答,作为非特异性刺激剂,作为抗原载体,作为其他佐剂的载体及其组合。当例如通过将抗原与完成的(performed)小囊相互混合从而使得抗原相对小囊保持在胞外时,少片层脂质小囊作为非特异性免疫刺激剂起作用。通过将抗原包埋于小囊的中央空腔内,所述小囊作为免疫刺激剂和抗原载体起作用。在另一个实施方案中,所述小囊主要由非磷脂小囊构成。在其他实施方案中,所述小囊为Novasomes[®]。Novasomes[®]为范围为约100nm至约500nm的少片层非磷脂小囊。其包括Brij 72、胆固醇、油酸和鲨烯。已显示Novasomes为对于流感抗原的有效佐剂(参见美国专利5,629,021、6,387,373和4,911,928,就所有目的通过全文提述并入本文)。

[0171] 本发明的组合物亦可用“免疫刺激剂”配制。其为机体用于增加免疫系统应答的自身化学信使(细胞因子)。免疫刺激剂包括但不限于多种具有免疫刺激、免疫增强和促炎活性的细胞因子、淋巴因子和趋化因子,如白介素(例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12、IL-13);生长因子(例如粒细胞-巨噬细胞(GM)集落刺激因子(CSF));和其他免疫刺激分子,如巨噬细胞炎症因子,F1t3配体,B7.1;B7.2等。所述免疫刺激分子可在与本发明的组合物相同的配制物中施用,或可单独施用。可施用蛋白或编码蛋白的表达载体以产生免疫刺激作用。因此在一个实施方案中,本发明包括抗原性和疫苗配制物,所述配制物包含佐剂和/或免疫刺激剂。

[0172] 刺激免疫应答的方法

[0173] 本发明的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或VLP可用于制备刺激免疫应答的组合物,所述免疫应答赋予针对传染原的免疫或实质免疫。粘膜和细胞免疫可促进对传染原和疾病的免疫。在上呼吸道局部分泌的抗体为对天然感染抗性的主要因素。分泌型免疫球蛋白A(sIGA)涉及上呼吸道的保护,而血清IgG涉及下呼吸道的保护。由感染诱导的免疫应答保护免受相同病毒或抗原性类似的病毒株的再次感染。举例而言,RSV发生频繁和不可预测的变化;因此,在自然感染之后,由宿主的免疫提

供的保护有效期针对在社区中传播的新病毒株可能仅有效几年。

[0174] 因此,本发明涵盖了诱导受试者中对感染或其至少一种疾病症状的免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。在一个实施方案中,所述方法包括施用包含经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种其他蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述方法包括施用进一步包含RSV M蛋白例如BRSV M蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述方法包括施用进一步包含RSV N蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述方法包括施用进一步包含RSV G蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述方法包括施用进一步包含RSV SH蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述方法包括施用进一步包含来自HRSV组A和/或组B的F和/或G蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述方法包括施用包含来自BRSV的M蛋白和嵌合RSV F和/或G蛋白或MMTV包膜蛋白,例如来源于流感病毒的HA或NA蛋白的VLP,其中所述HA和/或NA蛋白融合于RSV F和/或RSV G蛋白或MMTV包膜蛋白的跨膜域和细胞质尾部。在另一个实施方案中,所述方法包括施用包含来自BRSV的M蛋白和嵌合RSV F和/或G蛋白和任选地包含来源于流感病毒的HA或NA蛋白的VLP,其中所述HA或NA蛋白融合于RSV F和/或RSV G蛋白的跨膜域和细胞质尾部。在另一个实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在另一个实施方案中,所述哺乳动物是人。在另一个实施方案中,RSV VLP与佐剂或免疫刺激剂一同配制。

[0175] 在一个实施方案中,本发明包括诱导针对受试者中RSV感染或其至少一种疾病症状的免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白。在另一个实施方案中,本发明包括诱导针对受试者中RSV感染或其至少一种疾病症状的免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团。还在另一个实施方案中,本发明包括诱导针对受试者中RSV感染或其至少一种疾病症状的免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的RSV VLP,其中所述VLP包含经修饰或突变的RSV F蛋白,M、G、SH和/或N蛋白。在另一个实施方案中,诱导针对受试者中RSV感染或其至少一种疾病症状的免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的RSV VLP,其中所述VLP基本上由BRSV M(包括嵌合M)和RSV F、G和/或N蛋白组成。所述VLP可以以可忽略的浓度包含其他RSV蛋白和/或蛋白污染物。在另一个实施方案中,诱导针对受试者中RSV感染或其至少一种疾病症状的免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的RSV VLP,其中所述VLP由BRSV M(包括嵌合M)、RSV G和/或F组成。在另一个实施方案中,诱导针对受试者中RSV感染或其至少一种疾病症状的免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的包含RSV蛋白的RSV VLP,其中所述RSV蛋白由BRSVM(包括嵌合M)、F、G和/或N蛋白组成,包括嵌合F、G和/或N蛋白。这些VLP含有BRSV M(包括嵌合M)、RSV F、G和/或N蛋白,并可含有其他细胞成分如细胞蛋白、杆状病毒蛋白、脂质、糖类等,但并不含有其他RSV蛋白(除了BRSV M的片段(包括嵌合M),BRSV/RSV F、G和/或N蛋白之外)。在另一个实施方案中,所述受试者是脊椎动物。在一个实施方案中,所述脊椎动物是哺乳动物。在另一个实施方案中,所述哺乳动物是人。在另一个实施方案中,所述方法包括通过将所述配制物以一剂施用来诱导针对RSV感染或至少一种疾病症状的免疫。在另一个实施方案中,所述方法包括通过将所述配制物以多剂施用来诱导针对RSV感染或至少一种疾病症状的免疫。

[0176] 本发明亦涵盖诱导针对受试者中由传染原造成的感染或其至少一种症状的免疫,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白

的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。在一个实施方案中,所述方法包括施用包含经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种来自异源传染原的VLP。在一个实施方案中,所述方法包括施用包含经修饰或突变的RSV F蛋白和至少一种来自相同或异源传染原的蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述来自异源传染原的蛋白是病毒蛋白。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白是包膜相关蛋白。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白可为在VLP表面上表达的传染原。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白包含在脊椎动物中产生保护性免疫应答的表位。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白可与RSV M蛋白如BRSV M蛋白、RSV F、G和/或N蛋白相结合。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白融合于RSV蛋白如BRSV M蛋白、RSV F、G和/或N蛋白。在另一个实施方案中,仅仅来自所述传染原的一部分融合于RSV蛋白如BRSV M蛋白、RSV F、G和/或N蛋白。在另一个实施方案中,仅仅来自所述传染原的蛋白的一部分融合于RSV蛋白的一部分如BRSV M蛋白、RSV F、G和/或N蛋白。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白融合于所述RSV蛋白的部分表达于VLP的表面。在其他实施方案中,所述融合于来自传染原的蛋白的RSV蛋白或其部分与RSV M蛋白结合。在其他实施方案中,所述RSV蛋白或其部分来源于RSV F、G、N和/或P。在另一个实施方案中,所述嵌合VLP进一步包含来自RSV的N和/或P蛋白。在另一个实施方案中,所述嵌合VLP包含多于一个来自相同和/或异源传染原的蛋白。在另一个实施方案中,所述嵌合VLP包含多于一个传染原蛋白,从而构建多价VLP。

[0177] 本发明的组合物当施于脊椎动物(例如人)时,可在脊椎动物中诱导实质免疫。该实质免疫产生自针对本发明组合物的,在脊椎动物中保护或减轻感染或至少减轻感染的症状的免疫应答。在一些实例中,如果所述脊椎动物受感染,该感染会是无症状的。该应答可能不是完全保护性的应答。在此情况下,如果所述脊椎动物受传染原感染,所述脊椎动物与未经免疫接种的脊椎动物相比会经受减少的症状或较短期间的症状。

[0178] 在一个实施方案中,本发明包括诱导受试者中针对RSV病毒感染或至少一种疾病症状的实质免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。在另一个实施方案中,本发明包括接种哺乳动物针对RSV的方法,包括将诱导保护量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP施于所述哺乳动物。在一个实施方案中,所述方法包括施用进一步包含RSV M蛋白如BRSV M蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述方法进一步包括施用包含RSV G蛋白例如HRSV G蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述方法进一步包括施用包含来自HRSV组A的N蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述方法进一步包括施用包含来自HRSV组B的N蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述方法包括施用包含来自BRSV的嵌合M蛋白和来源于RSV的F和/或G蛋白的VLP,其中所述F和/或G蛋白融合于M蛋白的跨膜和细胞质尾部。在另一个实施方案中,所述方法包括施用包含来自BRSV的M蛋白和嵌合RSV F和/或G蛋白的VLP,其中所述F和/或G蛋白融合于流感HA和/或NA蛋白的跨膜域和细胞质尾部。在另一个实施方案中,所述方法包括施用包含来自BRSV的M蛋白和嵌合RSV F和/或G蛋白和任选地包含流感HA和/或NA蛋白的VLP,其中所述F和/或G蛋白融合于HA蛋白的跨膜域和细胞质尾部。在另一个实施方案中,所述方法包括施用包含来自BRSV的M蛋白和嵌合RSV F和/或G蛋白和任选地包含流感HA和/或NA蛋白的VLP,其中所述HA和/或NA蛋白融合于RSV F和/或G蛋白的跨膜域和细胞质尾

部。

[0179] 本发明还涵盖了诱导受试者中针对由传染原造成的感染或至少一种疾病症状的实质免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白、包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。在一个实施方案中,所述方法包括施用进一步包含RSV M蛋白如BRSV M蛋白和至少一种来自另一种传染原的蛋白的VLP。在一个实施方案中,所述方法包括施用进一步包含BRSV M蛋白和至少一种来自相同或异源传染原的蛋白的VLP。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白是病毒蛋白。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白是包膜相关蛋白。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白表达于VLP表面。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白包含在脊椎动物中会产生保护性免疫应答的表位。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白可与RSV M蛋白结合。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白可与BRSV M蛋白结合。在另一个实施方案中,所述来自传染原的蛋白融合于RSV蛋白。在另一个实施方案中,仅来自所述传染原的蛋白的一部分融合于RSV蛋白。在另一个实施方案中,仅来自所述传染原的蛋白的一部分融合于RSV蛋白的一部分。在另一个实施方案中,融合于所述RSV蛋白的来自所述传染原的蛋白的部分表达于VLP表面。在其他实施方案中,所述融合于来自传染原的蛋白的RSV蛋白或其部分与RSV M蛋白结合。在其他实施方案中,所述融合于来自传染原的蛋白的RSV蛋白或其部分与BRSV M蛋白结合。在其他实施方案中,所述RSV蛋白或其部分来源于RSV F、G、N和/或P蛋白。在另一个实施方案中,所述VLP进一步包含来自RSV的N和/或P蛋白。在另一个实施方案中,所述VLP包含来自传染原的多于一种蛋白。在另一个实施方案中,所述VLP包含多于一种传染原蛋白,从而构建多价VLP。

[0180] 在另一个实施方案中,本发明包括诱导受试者中针对感染或其至少一种症状的保护性抗体免疫的方法,包括施用至少一个有效剂量的如上所述的经修饰或突变的RSV F蛋白,包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团或包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。

[0181] 如用于本文,“抗体”是包含由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因的片段实质或部分编码的一种或多种多肽的蛋白。识别的免疫球蛋白基因包括kappa、lambda、alpha、gamma、delta、epsilon和mu恒定区基因,以及繁多的免疫球蛋白可变区基因。轻链归类为kappa或lambda。重链归类为gamma、mu、alpha、delta或epsilon,其随之分别限定免疫球蛋白类型IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。典型的免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚体。每个四聚体由两个相同对的多肽链组成,每对具有一个“轻”(约25kD)和一个“重”链(约50-70kD)。每个链的N端限定约100至110或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。抗体作为完整的免疫球蛋白或通过用多种肽酶消化产生的多种充分表征的片段存在。

[0182] 在一个实施方案中,本发明包括诱导受试者中针对RSV感染或至少一种疾病症状的保护性细胞应答的方法,包括施用至少一个有效剂量的经修饰或突变的RSV F蛋白。在另一个实施方案中,本发明包括诱导受试者中针对RSV感染或至少一种疾病症状的保护性细胞应答的方法,包括施用至少一个有效剂量的包含经修饰或突变的RSV F蛋白的RSV F微团。在另一个实施方案中,本发明包括诱导受试者中针对RSV感染或至少一种疾病症状的保护性细胞应答的方法,包括施用至少一个有效剂量的VLP,其中所述VLP包含如上所述的经修饰或突变的RSV F蛋白。细胞介导的免疫还在从RSV感染恢复中起作用,并可预防RSV相关的并发症。RSV特异性细胞性淋巴细胞在受感染的受试者的血中和下呼吸道分泌物中检测

出。RSV感染细胞的细胞溶解是通过CTL与RSV特异性抗体和补体协同介导的。在受感染或经接种的个体中主要的细胞毒性应答在血中在6-14日之后可检测出,并在第21日消失(Ennis等,1981)。细胞介导的免疫亦可在从RSV感染恢复中起作用,并可预防RSV相关的并发症。RSV特异性细胞性淋巴细胞在受感染的受试者的血中和下呼吸道分泌物中检测出。

[0183] 如上所提及,本发明免疫原性组合物预防或减少受试者中RSV感染的至少一种症状。RSV的症状在本领域是公知的。其包括鼻漏、咽喉痛、头疼、声嘶、咳嗽、痰、发热、哨音、喘鸣和呼吸困难。因此本发明的方法包括预防或减少至少一种与RSV感染相关的症状。症状的减少可主观或客观地确定,例如由受试者自我评价,通过医师的评价或通过进行适当的测定法或测量(例如体温),包括例如生活品质评价,RSV感染或其他症状的进行减慢,RSV症状的严重程度减少,或合适的测定法(例如抗体效价和/或T细胞激活测定法)。客观评价包括动物和人评价。

[0184] 本发明进一步通过下述实施例加以说明,其不应认为是限制性的。所有本申请中引用的参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图和序列列表,就所有目的通过全文提述并入本文。

[0185] 实施例

[0186] 实施例1

[0187] 生成重组杆粒,转染昆虫细胞以制备重组病毒原种,空斑纯化,和用初级病毒原种感染昆虫细胞

[0188] 为了构建重组病毒,将目标病毒基因密码子优化以供Sf9昆虫细胞表达,并克隆入pFastBac™载体。

[0189] 一旦确证并纯化了所需的构建体,对于每个构建体,将一个小瓶的MAX Efficiency®DH10Bac™感受态细胞在冰上融化。将大约1ng(5μl)所需的pFastBac™构建体质粒DNA添加至细胞并轻柔混合。将细胞在冰上温育30分钟。接着,将细胞在42℃不振荡热激45秒。之后,将试管转移至冰上,并冰冻2分钟。随后将900μl室温S.O.C.培养基添加至每个试管。将试管置于振荡器上在37℃以225rpm振荡4小时。对于每个pFastBac™转化,使用S.O.C.培养基制备10倍系列稀释的细胞(10^{-1} , 10^{-2} 和 10^{-3})。之后,将100μl的每个稀释铺板于含有50μg/ml卡那霉素、7μg/ml庆大霉素、10μg/ml四环素、100μg/ml Bluo-gal和40μg/ml IPTG的LB琼脂板上。将该板在37℃温育48小时。挑取白色集落以供分析。

[0190] 对于每个构建体制备来自上述的不同杆粒DNA,并将其分离。将这些DNA沉淀并添加至Sf9细胞5小时。

[0191] 之后,将30ml的Sf9昆虫细胞(2×10^6 个细胞/ml)用0.3ml的空斑洗脱物用表达目标病毒蛋白的杆粒感染,并温育48-72小时。保存大约1ml的粗培养物(细胞+培养基)和澄清的培养收获物以供表达分析,并将剩余物保存以供纯化目的。

[0192] 实施例2

[0193] 经修饰的HRSV F蛋白的表达、纯化和分析

[0194] 将编码经修饰的目标HRSV F蛋白的基因作为重叠的寡核苷酸在体外合成,并在宿主细胞中克隆和表达。经修饰的RSV F基因的克隆和表达是依照本领域已知方法达成的。

[0195] 挑取并确证含有目标病毒蛋白的重组空斑。然后将重组病毒通过Sf9昆虫细胞的感染进行扩增。在一些情况下,将Sf9昆虫细胞由表达经修饰的F蛋白的重组病毒和另一个

表达其他病毒蛋白(例如BRSV M蛋白和/或HRSVN蛋白)的重组病毒共同感染。将昆虫细胞的培养物用携带多种构建体的杆状病毒以~3MOI(感染复数=病毒ffu或pfu/细胞)感染。在感染后48-72小时收获培养物和上清。将粗收获物,大约30mL,通过以大约800x g离心15分钟来澄清。将所得的含有经修饰的HRSV F蛋白的粗细胞收获物如下所述进行纯化。

[0196] 将经修饰的目标HRSV F蛋白从感染的Sf9昆虫细胞培养收获物纯化。将非离子型表面活性剂Tergitol®NP-9(壬基苯酚乙氧化物,Nonylphenol Ethoxylate)用于膜蛋白提取实验方案。将粗提取物通过经由阴离子交换层析、小扁豆凝集素亲和/HIC和阳离子交换层析来进一步纯化。

[0197] 蛋白表达通过SDS-PAGE并用考马斯染色对总蛋白进行染色来进行分析。以大约15至20 μ l(约7.5 μ l至10 μ l培养物)/泳道将等体积的来自粗收获物的细胞样品和含有BME(β -巯基乙醇)2x样品缓冲液加载至SDS Laemmli凝胶。

[0198] 在一些情况下,替代层析法,将粗细胞收获物中的经修饰的HRSV F蛋白通过30%蔗糖梯度分离方法浓缩,然后通过用考马斯染色的SDS-PAGE,或使用抗RSV F单克隆抗体的Western印迹进行分析。

[0199] 含有经修饰的重组F蛋白的粗细胞收获物,纯化的重组F蛋白或通过蔗糖梯度浓缩的重组F蛋白可进一步通过使用抗RSV F单克隆抗体和/或抗RSVF多克隆抗体的Western印迹进行分析。

[0200] 实施例3

[0201] 编码F蛋白BV#541的经修饰的HRSV F基因

[0202] 表达全长HRSV F蛋白的最初尝试证明无法成功地获得高表达水平。用于该表达中的F基因序列为SEQ ID NO:1(野生型HRSV F基因,GenBank登录号M11486)。其编码574aa的无活性前体(F₀)。该前体在成熟过程中由弗林蛋白酶样蛋白酶剪切两次以得到两个二硫键连接的多肽,来自N端的亚基F₂和来自C端的F₁(图1)。该两个剪切位点在残基109和136,在其之前是由弗林蛋白酶识别基序(RARR,aa 106-109(SEQ ID NO:23)和KKRKRR,aa131-136(SEQ ID NO:24))。SEQ ID NO:1的F基因序列对于在Sf9昆虫细胞中表达含有欠佳的密码子使用,并携带3个错误,产生展示非最优的折叠(SEQID NO:2,GenBank登录号AAB59858)的蛋白。此外,在编码F₂亚基的区鉴定了可能的多聚(A)腺苷酸化位点(ATAAAA)。而且,野生型F基因序列富含大约65%的AT,而Sf9昆虫细胞表达系统中基因序列理想的GC-AT比为大约1:1。

[0203] 为了尝试克服HRSV F蛋白的不良表达水平,设计了新的F基因序列,从而使得:

[0204] (a)修正了所述三个GenBank测序的错误;

[0205] (b)修饰了编码F₂亚基的区的隐含多聚(A)位点;

[0206] (c)优化了F基因密码子;和

[0207] (d)该F基因编码具有失活的主要剪切位点的修饰的F蛋白。

[0208] 所述三个经修正的氨基酸错误为P102A、I379V和M447V。修正了HRSVF基因中的隐含多聚(A)位点而未改变其氨基酸序列。

[0209] 密码子优化方案是基于下述标准的:(1)在鳞翅类物种的昆虫细胞中对于如Levin,D.B.等(Journal of General Virology,2000,vol.81,pp.2313-2325)所述的给定氨基酸,其特定密码子的氨酰tRNA的丰度,(2)维持基因序列中的GC-AT比为大约1:1,(3)最

低限的回文或茎环DNA结构的导入,和(4)最低限的转录和后转录阻遏子(repressor)元件序列的导入。经优化的F基因的序列的实例示为SEQ ID NO:19(RSV-F BV#368)。

[0210] 为了失活HRSV F蛋白的主要剪切位点(1° CS, KKRKRR, aa 131-136),将弗林蛋白酶识别位点突变为KKQKQQ(SEQ ID NO:28)或GRRQQR(SEQ IDNO:29)。衡量了几种具有此类剪切位点突变的修饰的F蛋白以确定防止剪切的效率。图2显示了经衡量的几种经修饰的F蛋白。结果表明HRSV F蛋白的主要剪切位点可由三个保守氨基酸变化R133Q、R135Q和R136Q失活。这些从极性带电荷分子的精氨酸(R)至极性中性分子的谷氨酰胺(Q)的保守氨基酸变化,改变了这些位点的电荷状态,并防止弗林蛋白酶样蛋白酶的剪切(参见图3),而仍然保留F蛋白的3D结构。防止 1° CS处的剪切导致F蛋白的膜融合活性减少。

[0211] 非限定的示例性经修饰以具有所有上述提及的修饰的HRSV F基因序列示于图4。该经修饰的F基因(SEQ ID NO:5, RSV-F BV#541)编码SEQ IDNO:6的经修饰的F蛋白。该基因序列在体外作为重叠的寡核苷酸合成,在宿主细胞中克隆和表达。从受感染的Sf9昆虫细胞培养收获物纯化经修饰的HRSV F蛋白BV#541,并将其通过由考马斯染色的SDS-PAGE进行分析。纯化和SDS-PAGE分析的方法描述于实施例2。在Sf9昆虫细胞中,F蛋白RSV-F BV#541(例如F蛋白541)的表达水平与野生型F₀蛋白相比得到改善。

[0212] 实施例4

[0213] 具有F₁亚基融合域部分缺失的经修饰的HRSV F蛋白

[0214] 为了进一步改善RSV F蛋白的表达,设计了包含下述修饰的额外修饰的HRSV F基因:

[0215] (a)修正了所述三个GenBank测序错误;

[0216] (b)修饰了编码F2亚基的区处的隐含多聚(A)位点;

[0217] (c)优化了F基因密码子;和

[0218] (d)部分缺失了编码F₁亚基融合域的核苷酸序列。在一个实验中,缺失了编码F₁亚基融合域前10个氨基酸的核苷酸序列(对应于SEQ ID NO:2的氨基酸137-146)。

[0219] 包含所述修饰的非限制性示例性经修饰的RSV F基因示于图5,命名为SEQ ID NO:9(RSV-F BV#622,例如F蛋白622),编码SEQ ID NO:10的经修饰的F蛋白。从受感染的Sf9昆虫细胞培养收获物纯化经修饰的HRSV F蛋白BV#622,并通过考马斯染色的SDS-PAGE进行分析。纯化和SDS-PAGE分析的方法描述于实施例2。观察到HRSV F蛋白BV#622的高表达水平,如示于图6中的SDS-PAGE。

[0220] 实施例5

[0221] 具有失活的主要剪切位点和F₁融合域部分缺失的经修饰的HRSV F蛋白

[0222] 为了确定失活的主要剪切位点和F₁融合域部分缺失的组合可否进一步促进RSV F蛋白的表达,特别是在Sf9昆虫细胞中的表达,设计了另一种包含下述修饰的经修饰的RSV F基因:

[0223] (a)修正了所述三个GenBank测序错误;

[0224] (b)修饰了编码F2亚基的区处的隐含多聚(A)位点;

[0225] (c)优化了F基因密码子;

[0226] (d)失活了主要剪切位点;和

[0227] (e)部分缺失了编码F₁亚基融合域的核苷酸序列。在一个实验中,缺失了编码所述

F₁亚基融合域的前10个氨基酸的核苷酸序列(对应于SEQ ID NO:2的氨基酸137-146)。

[0228] 包含所述修饰的非限制性示例性经修饰的RSV F基因示于图7,命名为SEQ ID NO:7(RSV-F BV#683,例如F蛋白683),编码SEQ ID NO:8的经修饰的F蛋白。从受感染的Sf9昆虫细胞培养收获物纯化经修饰的RSV F蛋白BV#683(例如F蛋白683),并通过考马斯染色的SDS-PAGE进行分析。纯化和SDS-PAGE分析的方法描述于实施例2。取得了表达水平的进一步增强,如示于图8中的SDS-PAGE。

[0229] 实施例6

[0230] 经修饰的HRSV F蛋白BV#683的表达和纯化

[0231] 如实施例1中所述将经修饰的HRSV F蛋白BV#683(例如F蛋白683,SEQ ID NO:8)表达于杆状病毒表达系统,并挑取和确证表达HRSV F蛋白BV#683的重组空斑。然后通过感染Sf9昆虫细胞扩增所述重组病毒。将昆虫细胞的培养物以~3MOI(感染复数=病毒ffu或pfu/细胞)用杆状病毒感染。在感染后48-72小时收获培养物和上清。将粗收获物,大约30mL,通过以大约800x g离心15分钟进行澄清。如下所述纯化了所得的含有HRSV F蛋白BV#683的粗细胞收获物。

[0232] 将HRSV F蛋白BV#683从受感染的Sf9昆虫细胞培养收获物纯化。将非离子型表面活性剂Tergitol®NP-9(壬基苯酚乙氧化物)用于膜蛋白提取实验方案。将粗提取物进一步通过经由阴离子交换层析、小扁豆凝集素亲和/HIC和阳离子交换层析纯化。

[0233] 将经纯化的HRSV F蛋白BV#683如实施例2中所述通过用考马斯染色的SDS-PAGE和使用抗RSV F单克隆抗体的Western印迹进行分析。结果示于图9。取得了HRSV F蛋白BV#683的优异表达水平(例如F蛋白683,SEQ ID NO:8)。预计粗细胞培养中表达水平为高于10mg/L,而回收的F蛋白BV#683为约3.5mg/L细胞培养。在一些情况下,取得了高于20mg/L的表达水平,并回收了约5mg/L的经修饰的F蛋白BV#683(参见图10)。如通过扫描光密度法确定,经回收的F蛋白BV#683的纯度达到高于98%(参见图10)。

[0234] 实施例7

[0235] 经纯化的HRSV F蛋白BV#683微团(玫瑰花结)

[0236] 通过负染电子显微术分析纯化的HRSV F蛋白BV#683(参见图11)。F蛋白以微团(玫瑰花结)的形式聚集,类似于对于野生型HRSV F蛋白观察到的那些(Calder等,2000, Virology 271,pp.122-131),和其他全长病毒膜糖蛋白(Wrigley等,Academic Press, London,1986,vol.5,pp.103-163)。在电子显微镜下,F突起展示棒棒糖形状的杆状形态,其较宽端从玫瑰花结的中心向外伸出。单个三聚体的长度为约20nm,而微团颗粒的直径为约40nm(参见图12)。这些结果表明HRSV F蛋白BV#683具有天然、活性蛋白的正确3D结构。

[0237] 总而言之,设计、表达并纯化了经修饰的重组HRSV F蛋白(例如BV#683)。该修饰的全长F经糖基化。主要剪切位点和融合域的修饰一起极大地增强了F蛋白的表达水平。此外,该经修饰的F蛋白可剪切二硫键连接的F₁和F₂亚基。F₁和F₂亚基的三聚体形成棒棒糖形状的19.6nm的突起和40.2nm的颗粒。而且,该经修饰的F蛋白在Sf9昆虫细胞中高度表达。在纯化之后取得了>98%的微团纯度。该修饰的蛋白的突起具有棒棒糖形态(其可进一步从40nm的微团颗粒形成)的事实,表明经修饰的F蛋白BV#683具有天然蛋白的3D结构。

[0238] 实施例8

[0239] 在VLP产生中经修饰的HRSV F蛋白与BRSV M和/或HRSV N的共表达

[0240] 本发明还提供了包含经修饰或突变的RSV F蛋白的VLP。此类VLP可用于诱导针对病毒蛋白抗原的中和抗体,并由此可施用以确立针对RSV的免疫。举例而言,此类VLP可包含经修饰的RSV F蛋白,和BRSV M和/或HRSVN蛋白。编码BRSV M(SEQ ID NO:14)或HRSV N(SEQ ID NO:18)蛋白的基因的密码子可针对在昆虫细胞中的表达进行优化。举例而言,经优化的BRSVM基因序列示于SEQ ID NO:13,而经优化的RSV N基因序列示于SEQ IDNO:17。

[0241] 在一个实验中,经修饰的F蛋白BV#622和另一种经修饰的F蛋白BV#623(SEQ ID NO:21,经修饰使得两个剪切位点均失活)单独表达或与HRSVN蛋白和BRSV M蛋白共同表达。含有VLP的粗细胞收获物或从30%蔗糖梯度分离收集的VLP沉淀两者均通过用考马斯染色的SDS-PAGE,和使用抗RSV F单克隆抗体的Western印迹进行分析。图13显示了经修饰的F蛋白BV#622和BV#623的结构,以及SDS-PAGE和Western印迹分析的结果。BV#622自身高度表达或与HRSV N蛋白和BRSV M蛋白共同表达,而BV#623具有非常不良的表达,表明两个剪切位点的失活均抑制F蛋白表达。

[0242] 在另一个实验中,将修饰的F蛋白BV#622,双重串联基因BV#636(BV#541+BRSV M),BV#683,BV#684(具有YIAL L-域导入C端的BV#541)和BV#685(具有YKKL L-域导入C端的BV#541)单独表达,或与HRSV N蛋白和BRSV M蛋白共同表达。在逆转录病毒中,L域(晚期域)是保守序列,并存在于Gag内与细胞蛋白一同作用以有效地将病毒粒体从细胞表面释放(Ott等,2005,Journal of Virology 79:9038-9045)。每个经修饰的F蛋白的结构示于图14。将含有VLP的粗细胞收获物(胞内)和从30%蔗糖梯度分离收集的VLP沉淀通过用考马斯染色的SDS-PAGE和使用抗RSV F单克隆抗体的Western印迹进行分析。图14显示含有VLP的粗细胞收获物(胞内)的SDS-PAGE和Western印迹分析的结果,而图15显示从30%蔗糖梯度分离收集的VLP沉淀的SDS-PAGE和Western印迹分析的结果。BV#622和BV#683自身高度表达,或与HRSV N蛋白和BRSV M蛋白共同表达,而BV#636、BV#684和BV#685具有不良表达。

[0243] 实施例9

[0244] 筛选具有高表达的嵌合HRSV F蛋白

[0245] 进行了筛选其他可以可溶形式在昆虫细胞中高度表达并可形成具有更佳产率的VLP的RSV F蛋白的努力。设计、表达和分析了多种F基因。Western印迹和SDS-PAGE均用于衡量所述表达。

[0246] 图16a至图16d总结了对于每个嵌合HRSV F克隆的结构、克隆名、描述、Western印迹/考马斯分析结果和结论。

[0247] 如结果所示,野生型全长F蛋白表达不良。含有F₁但非F₂亚基的嵌合HRSV F蛋白可良好表达,但产物或者是不可溶的(可能是由于错折叠),或者在共同感染之后无法与其他病毒蛋白装配形成具有良好产率的VLP。主要剪切位点的失活本身并不导致表达的实质增加,但当主要剪切位点的失活与其他修饰如隐含多聚(A)位点的缺失和GenBank aa错误的修正组合(例如BV#541)时取得了更好的表达。YKKL L域导入BV#541的C端在与BRSV M和HRSV N蛋白的共同表达中增强了含有经修饰的F蛋白的VLP的分泌约2-3倍。结果进一步显示由BV#541基因和BRSV M基因组成的双重串联的嵌合基因与BV#541和BRSV M蛋白的共同感染相比,显示改善的胞内和VLP产率,表明当串联表达时,BRSV M蛋白可促进含有经修饰的HRSV F蛋白的VLP在昆虫细胞中的产生。由BV#541、BRSV M和HRSV N组成的三重串联嵌合基因与上述提及的双重串联的嵌合基因或BV#541、BRSV M和HRSV N蛋白的共同感染相比具

有甚至更高的胞内和远为更佳的VLP产率。此外,结果表明嵌合HRSV F蛋白BV#683(例如F蛋白683,SEQ ID NO:8)具有最佳的胞内表达。由BV#683和BRSV M基因组成的双重串联的嵌合基因或由BV#683、BRSV M和HRSV N基因组成的三重串联的嵌合基因的表达亦为本文中的实施方案。这些双重或三重串联的嵌合基因与共同感染相比会进一步改善VLP产生。

[0248] 实施例10

[0249] 小鼠中的RSV中和测定法和RSV攻击研究

[0250] 为了测试包含经修饰的HRSV F蛋白BV#683的疫苗对于阻止RSV感染的效率,在小鼠中进行了中和测定法和RSV攻击研究。实验过程示于图17。

[0251] 对各小鼠组(n=10)在第0日和第21日肌肉内注射(生活RSV除外)安慰剂(PBS溶液)、生活RSV(鼻内给药)、福尔马林失活的RSV疫苗(FI-RSV)、1 μ g纯化的F颗粒(PFP,经修饰的F蛋白BV#683)、1 μ g经纯化的F颗粒与明矾(PFP+明矾)、10 μ g经纯化的F颗粒、10 μ g经纯化的F颗粒与明矾(PFP+明矾)或30 μ g经纯化的F颗粒。在第42日(第二次免疫接种之后21日)用生活RSV攻击每个经免疫接种的组。将来自每个组的小鼠血清在第0日、第31日(第二次免疫接种之后10日)和第46日(用生活RSV攻击之后的4日)收获。

[0252] 将来自每个处理组的小鼠血清就抗RSV中和抗体的存在进行测定。将来自经免疫接种的小鼠的血清的稀释与感染性RSV在96孔微滴定板中进行温育。将血清从1:20稀释至1:2560。将50 μ l经稀释的血清与50 μ l生活RSV病毒(400pfu)在每个孔中进行混合。病毒/血清混合物在室温首先温育60分钟,然后与100 μ l HEp-2细胞混合,并温育4日。然后在用结晶紫染色之后对感染性病毒空斑的数量进行计数。每个血清样品的中和效价定义为产生100% RSV中和(例如,无空斑)的血清最大稀释的倒数,并对于每个动物进行确定。将第31日(增强接种之后10日)和第46日(用生活RSV攻击之后4日)的血清中和抗体效价的几何平均值对于每个疫苗组进行作图。图18显示了中和测定法的结果。该结果表明10 μ g或30 μ g经纯化的F蛋白产生远高于生活RSV的中和效价。此外,与明矾佐剂共同施用增强了PFP的中和效价。

[0253] 进行了RSV攻击研究以确定免疫接种是否可在经免疫接种的动物的肺中预防和/或抑制RSV复制。在经免疫接种的小鼠的肺中的RSV的量通过空斑测定使用HEp-2细胞进行确定。上述提及的经免疫接种的小鼠组用1x 10⁶pfu的感染性长RSV株在第42日(第二次免疫接种之后11日)进行鼻内感染。在第46日(RSV感染之后4日),将小鼠肺移除、称重并匀浆。澄清经匀浆的肺组织。将经澄清的溶液的上清稀释并对其进行使用HEp-2细胞的空斑测定以确定肺组织中的RSV效价(计算为pfu/g肺组织)。结果示于图19,表明所有用重组RSV F蛋白BV#683免疫接种的小鼠在肺中具有无法检测到的RSV,而甚至1 μ g不含佐剂的经纯化的重组HRSV F蛋白BV#683也展示优异的抑制RSV复制的效力(与安慰剂相比减少超过1000倍)。

[0254] 为了确定上述使用的RSV PFP疫苗的稳定性,将疫苗在2-8 $^{\circ}$ C储藏0、1、2、4和5周,然后通过经考马斯染色的SDS-PAGE进行分析(图20)。结果显示该RSV PVP疫苗在2-8 $^{\circ}$ C非常稳定,且并无可检测的降解。

[0255] 实施例11

[0256] 在棉鼠中的重组RSV F微团活性

[0257] 在该实施例中,动物组包括在第0日和第21日用生活RSV(RSV)、福尔马林失活的RSV(FI-RSV),含和不含铝的RSV-F蛋白BV#683(PFP和PFP+铝佐剂)和PBS对照进行的免疫接种。

[0258] 如图21所示,用30ug的F微团疫苗(RSV-F蛋白BV#683,即F蛋白683,SEQ ID NO:8)的免疫接种,无论含不含铝,均在暴露于RSVA和RSVB两者之后产生了强烈的中和抗体应答。此外,观察到铝显著增强了抗体应答。而且,分别在RSV A和RSV B中在第46或第49日进行的增强免疫之后,中和抗体增加。

[0259] 尽管在用福尔马林失活的RSV(FI-RSV)免疫接种的大鼠中观察到显著的肺部病理状况,用F微团疫苗未观察到疾病的增强(图22)。F微团疫苗和含佐剂的F微团疫苗的使用产生了比初次RSV感染(PBS+RSV攻击)对照组(5.8)低的炎症评分(分别为4.0和2.8)。如上所示,经FI-RSV处理的组具有与初次RSV感染(PBS+RSV攻击)对照组相比更高的炎症评分(9.0对5.8)。而且,经FI-RSV处理的组与未经攻击的安慰剂对照、生活RSV+RSV攻击、F微团+RSV攻击、和F微团+铝+RSV攻击相比具有显著较高的平均炎症评分(9.0)。

[0260] 前述详细描述仅为清楚理解目的而给出,并不应由其理解出不必要的限制,因为其改良对于本领域技术人员是显而易见的。任何本文中提供的信息均非承认其为现有技术或与现要求保护的发明相关,亦非承认任何特别或隐含引用的公开文献为现有技术。

[0261] 除非另行定义,本文中使用的所有科技术语具有与本发明所属的领域中一般技术人员通常理解相同含意。

[0262] 尽管本申请划分为章节以引导读者对具体实施方案的注意,此类章节不应视为对实施方案的分割。各个章节和其中描述的实施方案的教导均适用于其他章节。

[0263] 尽管本发明是与其特定实施方案相联系进行描述,应理解的是能够对其进行进一步改良,且该申请旨在涵盖一般地遵循本发明的原理的任何本发明的变体、应用或转用,并包括下述与本公开有所不同的方案,其符合本发明所述领域内的已知或惯用的实践,并可适用于上文所示并如所附权利要求书的范围的基本特征。

序列表

<110> 诺瓦瓦克斯股份有限公司 (Novavax, Inc.)

<120> 修饰的 RSV F 蛋白及其使用方法

<130> NOV-034/02W0

<150> US 61/121,126

<151> 2008-12-09

<150> US 61/169,077

<151> 2009-04-14

<150> US 61/224,787

<151> 2009-07-10

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1725

<212> DNA

<213> 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus)

<400> 1

```

atggagllgc laatccleca agcaaatgca atlaccacaa lecleactgc aglcacattt    60
tgttttgctt ctggtaaaa catcactgaa gaattttatc aatcaaatg cagtgcagtt    120
agcaauggct atcttagtgc lctgagaact gglggllala ccaglllat aactatagaa    180
llaaglaata lcaaggaaaa laaglglaat ggaacagatg ctaagglaaa allgataaaa    240
caagaullag ataaalataa aaalgctgla acagaatlgc agllgclcat gcaaaagcaca    300
ccaccaacaa acaatcgagc cagaagagaa claccaaggl llatgaatta tacactcaac    360
aatgccaaaa aaaccaatgt aacattaagc aagaaaagga aaagaagatt tottggtttt    420
llgllaggig lggalctgc aatcgccagt ggcglgclg tatctaaaggt cctgcacct    480
gaaggggaag tgaacaagat caaaagtgct ctactatcca caaacaaggc tgtagtcagc    540
ttatcaaatg gagttagtgt ctaaccagc aaagtgttag acctcaaaaa ctatatagat    600
aaacaattgt tacctattgt gaacaagcaa agctgcagca tatcaaatat agaaactgtg    660
atagagticc aacaaaagaa caacagacta ctagagatta ccaggggaatt tagtgtaaat    720
gcagggtgta ctacacctgt aagcacttac atgttaacta atagtgaatt atgtcatta    780
atcaatgata tgcctataac aaatgatcag aaaaagttaa tgtccaacaa tgttcaata    840
gttagacagc aaagttactc tatcatgtcc ataataaaag aggaagtctt agcatatgta    900
gtacaattac cactatattg tttatagat acacctgtt ggaaactaca cacatcccct    960
ctatgtacaa ccaacacaaa agaagggtcc aacatctgtt taacaagaac tgacagagga    1020
tggtagctgt acaatgcagg atcagtatct ttcttccac aagetgaac atgtaaagtt    1080
caatcaaatc gagtatattg tgacacaatg aacagtttaa cattaccaag tgaataaat    1140
ctctgcaatg ttgacatatt caaccccaaa tatgattgta aaattatgac ttcaaaaaca    1200
gatgtaagca gctccgltat cacatctcta ggagccattg tgtcatgcta tggcaaaact    1260
aaatgtacag catccaataa aaatcgtgga atcataaaga cttttctaa cgggtgcgat    1320
tatgtatcaa ataagggat ggacactgtg tctgtaggta acacattata ttatglaaat    1380

```

[0001]

aagcaagaag gtaaaagct ctatgtaaaa ggigaaccaa taataaattt ctatgaccca 1440
 ttagtattcc cctcigtatga attgatgca tcaatactc aagtcaacga gaagattaac 1500
 cagagcctag catttattcg taaatccgat gaattattac ataatglaaa tgctggtaaa 1560
 tccaccacaa atatcatgat aactactata attatagtga ttataglaa atgttatca 1620
 ttaattgctg ttggactgct cttatactgt aaggccagaa gcacaccagt cacactaagc 1680
 aaagatcaac tgagtgtat aaataatatt gcatttagta actaa 1725

<210> 2

<211> 574

<212> PRT

<213> 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus)

<400> 2

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

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

[0002]

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

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Pro Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

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

[0003]

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 565 570

<210> 3
 <211> 1725
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> F 蛋白 576

[0004]

<400> 3
 atggagctgc tcattctttaa ggctaacgcc attaccacta tccttacagc ggtgacgttc 60
 tgctttgcat cgggicagaa tattaccgaa gagttctacc aatctacttg tagcgctgic 120
 tcaaaaggct atctgtcggc cctccgtaca ggatgttaca cgagtgttat caccatcgaa 180
 ttgtccaaca ttaaggagaa caagtgaac ggtactgacg cgaaggtaaa gcttatcaaa 240
 caggaactgg ataagtacaa gaacgcagtg acagagctcc aattgctgat gcagcttacc 300
 cccgctacga ataaccgcgc taggagagaa ctccacgat tcattgaacta tactctcaat 360
 aacgccaaaa agaccaacgt cacattgagc aaaaagcgtg agcgcaggtt tctgggcttc 420
 ctccctgggag ttggttcagc tatggcgtcg ggcgtagccg tgagtaaagt ccttcacttg 480
 gagggagaag ttaataagat caagtcgccg ctctgtctta ctaacaaagc tgtggtcagc 540
 ttgtcaaacg gtgtatccgt gctgacctcg aaggttcttg acctcaaaaa ttacatcgat 600
 aagcaattgc tgccgattgt caacaagcag agttgttcta tcagcaatat tgagacggtg 660
 atcgagttcc aacagaaaaa caacagactc ctggaaatca cacgtgagtt tcagtaaat 720
 gccggcgctt ctacccccgt ctccacgtac atgcttaca acctcggaatt gctcagctcg 780
 attaacgaca tgccatcac taatgatcag aagaagctta tgcttaacaa cgtgcaaatt 840
 gtccgccagc aaagctattc catcatgtca atcattaaag aggaagtgtt ggcgtacgta 900
 gttcagctcc cactgtacgg agtcacgac accccgtgct ggaagcttca tacctgccc 960
 ttgtgtacga caaatactaa agagggttct aacatttgc tcaccaggac ggatcgaggc 1020
 tggatttgcg ataacgttgg aaggtgagc ttcttccctc aagcagaaac atgtaaggta 1080
 cagtcacaat gagllllllg cgacaciatg aactcaciga ccttccalc tgaggtaaat 1140
 ttgtgtaacg tcgatattct caaccgaag tacgactgca aaattatgac gtccaagaca 1200
 gatgtgtcga gtagcgtaat cacttcaactc ggtgccatcg tttcttgcga cggcaagacc 1260

```

aaatgtacgg ctccaataa gaaccgigga attatcaaaa caticcggaa cggltgcgac    1320
tatgtcagca ataagggcgt ggacactgtg agtgtaggaa acaccctgia ctacgttaac    1380
aagcaagaag gtaaatcact giatgtcaag ggcgagccca ttatcaattt ttaecatcct    1440
cttgtgttcc catccgacga gtccgatgcg tctatcagcc aggtaaacga aaagattaac    1500
cagtccttgg catttatccg caaatcggac gagctcctgc acaatgttaa cgccggaag    1560
agtaagacaa acattatgat cactaccatc attatcgtca ttatcgtgat ccttttgta    1620
ctcattgctg taggtctgct ttgtactgtt aaagcgaggt ctacgccctg tacactcagc    1680
aaggatcaac tgtccggcat caataacatt gccttctcga attaa                    1725

```

<210> 4
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> F 蛋白 576

<400> 4

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

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

[0005]

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

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

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
 145 150 155 160

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val

	180	185	190
	Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn 195 200 205		
	Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln 210 215 220		
	Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn 225 230 235 240		
	Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu 245 250 255		
	Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys 260 265 270		
	Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile 275 280 285		
	Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro 290 295 300		
	Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro 305 310 315 320		
[0006]	Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg 325 330 335		
	Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe 340 345 350		
	Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp 355 360 365		
	Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val 370 375 380		
	Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr 385 390 395 400		
	Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys 405 410 415		
	Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile 420 425 430		
	Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp 435 440 445		
	Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly 450 455 460		
	Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro		


```

cagtccaala gagttttttg cgacactatg aactcactga ccccttccatc tgagggtcaat    1140
ttgtgtaacg tccatattct caacccgaag tacgactgca aaattatgac gtccaagaca    1200
gagtgtcga gtagcgtaat cacttcactc ggtgccatcg tttcttgcta cggcaagacc    1260
aaatgtacgg cttccaataa gaaccgtgga attatcaaaa cattctcgaa cggttgcgac    1320
taigtcagca ataagggcgt ggacactgtg agttaggaa acaccctgta ctacgttaac    1380
aagcaagaag glaaalcact gtagtcaag ggcgagccca ttalcaaitt ttacgatcct    1440
cttgtgttcc catccgacga gttcgatcgc tctatcagcc aggtaaacga aaagattaac    1500
cagtccttgg catttatccg caaatcggac gagctcctgc acaatgttaa cgcggaaag    1560
agtaagaaa acattatgat cactaccatc attatcgtca ttatcgtgat ccttttgta    1620
ctcattgctg taggtctgct ttgtactgt aaagcgaggt ctacgccctg tacactcagc    1680
aaggatcaac tgtccggcat caataacatt gccttctcga attaa    1725

```

```

<210> 6
<211> 574
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> F 蛋白 541

<400> 6

```

[0008]

```

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

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
20          25          30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
35          40          45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
50          55          60

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

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
85          90          95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
100         105         110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
115         120         125

Leu Ser Lys Lys Gln Lys Gln Gln Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val
130         135         140

Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu
145         150         155         160

```

Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys
 165 170 175

Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val
 180 185 190

Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn
 195 200 205

Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln
 210 215 220

Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn
 225 230 235 240

Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu
 245 250 255

Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys
 260 265 270

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile
 275 280 285

Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro
 290 295 300

[0009]

Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 325 330 335

Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 340 345 350

Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 355 360 365

Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 370 375 380

Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 405 410 415

Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 420 425 430

Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly Val Asp
 435 440 445

Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 450 455 460

Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 465 470 475 480

Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 485 490 495

Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 500 505 510

Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 515 520 525

Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 530 535 540

Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
 545 550 555 560

Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 565 570

[0010]

<210> 7
 <211> 1695
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> F 蛋白 683

<400> 7
 atggagctgc tcattctgaa ggctaacgcc attaccacta tccttacagc ggtgacgttc 60
 tgctttgcat ceggtcagaa tattaccgaa gaggttacc aatctacttg tagcgctgtc 120
 tcaaaaggct atctgtcggc cctccgtaca ggatggtaca cgagtgttat caccatcgaa 180
 ttgtccaaca ttaaggagaa caagtgaac ggtactgacg cgaaggtaaa gcttatcaaa 240
 caggaactgg ataagtacaa gaacgcagtg acagagctcc aattgctgat gcagictacc 300
 cccgctacga ataaccgcgc taggagagaa cticcacgat tcatgaacta tactctcaat 360
 aacgcaaaa agaccaactg cacattgagc aaaaagcaga agcaacaggc tattgcgtcg 420
 ggcgtagccg tgagtaaagt ccttcacttg gagggagaag tlaataagat caagtccgca 480
 ctctgtcta ctaacaagc tgtggtcagc ttgtcaaagc gigtatccgt gctgacctcg 540
 aaggttcttg acctcaaaa ttacatgat aagcaattgc tgccgattgt caacaagcag 600
 agttgttcta tcagcaatat tgagacggtg atcgagtcc aacagaaaa caacagactc 660
 ctggaaatca cactgagttt ttcagtaaat gccggcgtta ctaccccgct ctccacgtac 720
 algcttcaaa actcggaaat gctcagctcg allaacgaca tgccctacac laalgatcag 780
 aagaagctta tgtctacaaa cgtgcaaatt gtcgccagc aaagctattc catcatgtca 840
 atcattaaag aggaagtgtt ggcgtacgta gttcagctcc cactgtacgg agtcatcgac 900

```

accccgltct ggaagcttca tacctcgecc ttggttacga caaalaclaa agagggltct    960
aacatttgcc tcaccaggac ggatcgaggc tggatttgcg ataacgctgg aagtgtgagc    1020
ttcttccctc aagcagaaac atgtaaggta cagtcnata gagttttttg cgacactatg    1080
aactcactga ccttccatc tgaggtaaat ttgtgtaacg tcgatatctt caaccggaag    1140
tacgactgca aaattatgac gtccaagaca gatgtgtcga gtagcgaat cacttctctc    1200
ggtgccatcg tttcttgcga cggcaagacc aaatgtacgg ctccaataa gaaccgtgga    1260
attatcaaaa cattctcgaa cggttgcgac tatgtcagca ataagggcgt ggacactgtg    1320
agigtaggaa acaccctgta ctacgttaac aagcaagaag gtaatcact gtagtcaag    1380
ggcgagccca ttatcaattt ttacgatect cttgtgttcc catccgacga gttcgatgcg    1440
tctatcagcc aggtaaacga aaagattaac cagtccttgg catttatccg caaatcggac    1500
gagctcctgc acaatgltaa cgccggaaag agtacgaca acattatgat cactaccatc    1560
attatcgtca ttatcgtgat cttttgtca ctattgctg taggtctgct tttgtactgt    1620
aaagcgaggt ctacgcccgt tacactcagc aaggatcaac tgtccggcat caataacatt    1680
gccttctcga attaa    1695

```

```

<210> 8
<211> 564
<212> PRT
<213> 人工序列

```

[0011]

```

<220>
<223> F 蛋白 683
<400> 8

```

```

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

```

```

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
                20           25           30

```

```

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
          35           40           45

```

```

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
          50           55           60

```

```

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

```

```

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
          85           90           95

```

```

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
          100           105           110

```

```

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
          115           120           125

```

```

Leu Ser Lys Lys Gln Lys Gln Gln Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val

```


	420		425		430
Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr	435		440		445
Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile	450		455		460
Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala	465		470		475
					480
Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile	485		490		495
Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr	500		505		510
Thr Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu	515		520		525
Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser	530		535		540
Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile	545		550		555
					560

[0013] Ala Phe Ser Asn

<210> 9
 <211> 1695
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> F 蛋白 622

<400> 9
 atggagctgc tcattttgaa ggctaacgcc attaccacta tccttacagc ggtgacgttc 60
 tgctttgcat cccgtcagaa tattaccgaa gatttctacc aatctacttg tagcgtgtc 120
 tcaaaaggct atctgtcgcc cctccgtaca ggatgggtaca cgagtgttat caccatcgaa 180
 ttgtccaaca ttaaggagaa caagtgcaac ggtactgacg cgaaggtaaa gcttatcaaa 240
 caggaactgg ataagtacaa gaacgcagtg acagagctcc aattgctgat gcagctctacc 300
 cccgctacga ataaccgccc taggagagaa ctccacgat tcattgaacta tactctcaat 360
 aacgccaaaa agaccaactg cacattgagc aaaaagcgtg agcgcagggc tattgctgtc 420
 ggcgtagccc tgagtaaagt ccttcaactg gagggagaag ttaataagat caagtccgca 480
 ctctgtctca ctaacaaage tgggtcagc ttgtcaaacg gtgtatccgt gctgaccteg 540
 aaggttcttg acctcaaaaa tcacatcgat aagcaattgc tgccgattgt caacaagcag 600
 agttgtticia tcagcaatat tgagacggtg atcgagttcc aacagaaaaa caacagactc 660
 ctggaaatca cacgtgagtt ttcagtaaat gccggcggtta ctacccccgt ctccacgtac 720


```

atgcttacaa actcggaaatt gctcagtcig attaacgaca tgcctatcac taatgatcag      780
aagaagcttia tgtctaacaa cgtgcaaatt gtccgccagc aaagctatcc catcatgtca      840
atcattaaag aggaagtgtt ggcgtacgta gtccagctcc cactgtacgg agtcatcgac      900
accccgctgt ggaagcttca tacctcgccc ttgtgtacga caaatactaa agagggttct      960
aacatttggc tcaccaggac ggatcgaggc tggatttgcg ataacgctgg aagtgtgagc     1020
llcllccclc aagcagaaac atglaaggla caglcacaala gagllllllg cgacactatg     1080
aactcactga cccctccatc tgaggatcaat ttgtgtaacg tcgatatctt caaccggaag     1140
tagcactgca aaattatgac gtccaagaca gatgtgtcga gtagcgtaat cacttcactc     1200
ggigccatcg tttcttgcta cggcaagacc aaatgtacgg ctccaataa gaaccgtgga     1260
attatcaaaa cactctcgaa cggttgcgac tatgtcagca ataagggcgt ggacactgtg     1320
agigtaggaa acaccctgta ctacgttaac aagcaagaag gtaaatcact gtatgtcaag     1380
ggcagcccca ttatcaatit ttacgatcct ctgtgttcc catccgacga gttcgatgcg     1440
tctatcagcc aggtaaaega aaagattaac cagtccttgg catttatecg caaatcggac     1500
gagctctctc acaatgttaa cgcggaaag agtacgacaa acattatgat cactaccatc     1560
attatcgtca ttatcgtgat cctlltltca clcatlgtcg taggtctgct ttgtactgtt     1620
aaagcgaggt ctacgcccgt tacactcagc aaggatcaac tgtccggcat caataacatt     1680
gccttctcga attaa      1695
    
```

[0014]

```

<210> 10
<211> 564
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> P 蛋白 622

<400> 10

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

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
                20           25           30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
            35           40           45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
            50           55           60

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

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
            85           90           95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro
            100          105          110
    
```

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val
 130 135 140

Ser Lys Val Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala
 145 150 155 160

Leu Leu Ser Thr Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser
 165 170 175

Val Leu Thr Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn His Ile Asp Lys Gln
 180 185 190

Leu Leu Pro Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu
 195 200 205

Thr Val Ile Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr
 210 215 220

Arg Glu Phe Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr
 225 230 235 240

Met Leu Thr Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile
 245 250 255

[0015]

Thr Asn Asp Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg
 260 265 270

Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala
 275 280 285

Tyr Val Val Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp
 290 295 300

Lys Leu His Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser
 305 310 315 320

Asn Ile Cys Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala
 325 330 335

Gly Ser Val Ser Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser
 340 345 350

Asn Arg Val Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu
 355 360 365

Val Asn Leu Cys Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys
 370 375 380

Ile Met Thr Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu
 385 390 395 400

Gly Ala Ile Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn
 405 410 415

Lys Asn Arg Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val
 420 425 430

Ser Asn Lys Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr
 435 440 445

Val Asn Lys Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile
 450 455 460

Ile Asn Phe Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala
 465 470 475 480

Ser Ile Ser Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile
 485 490 495

Arg Lys Ser Asp Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr
 500 505 510

Thr Asn Ile Met Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu
 515 520 525

Leu Ser Leu Ile Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser
 530 535 540

[0016]

Thr Pro Val Thr Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile
 545 550 555 560

Ala Phe Ser Asn

<210> 11
 <211> 771
 <212> DNA
 <213> 牛呼吸道合胞病毒(Bovine respiratory syncytial virus)

<400> 11
 atggagacat acgtgaacaa actccatgaa ggatcaactt acacagctgc tgttcagtac 60
 aatgcatag aaaaagatga tgatcctgca tctctcaca tatgggttcc tatgttccaa 120
 tcatccatct ctgctgattt gccatataaa gaaclaatca atgigaacat attagltcga 180
 caaatttcta ctctgaaagg tcttcattg aagattatga taaactcaag aagtctgta 240
 ctageccaaa tgcccagcaa attaccata agtgcaaatg tatcattgga tgaacgaagc 300
 aaattagcat atgacataac tactccttgt gaaattaagg cttgtagitt aacatgitta 360
 aaggtagaaa atatgctcac aactgtgaaa gatctacca tgaaaacatt caatcctacc 420
 catgagatca ttgactgtg tgaattgaa aatatcatga catccaaaag agttgttata 480
 ccaactttct taaggtaaat caatgtaaaa gcaaaggatt tggactcact agagaatata 540
 gctaccacag agttcaaaaa tgccatcact aatgctaaaa ttatacctta tgcctgggtg 600
 gtattagtta tcactgtaac tgacaataaa ggggcattca agtacattaa accacaaagt 660

caatttatag tagaicttgg tgcatatcta gagaagaga gcatatatta tgtaactaca 720
 aattggaaac acacggccac taaattctcc attaagccta tagaggactg a 771

<210> 12
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> 牛呼吸道合胞病毒 (Bovine respiratory syncytial virus)

<400> 12

Met Glu Thr Tyr Val Asn Lys Leu His Glu Gly Ser Thr Tyr Thr Ala
 1 5 10 15

Ala Val Gln Tyr Asn Val Ile Glu Lys Asp Asp Asp Pro Ala Ser Leu
 20 25 30

Thr Ile Trp Val Pro Met Phe Gln Ser Ser Ile Ser Ala Asp Leu Leu
 35 40 45

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

Leu Lys Gly Pro Ser Leu Lys Ile Met Ile Asn Ser Arg Ser Ala Val
 65 70 75 80

Leu Ala Gln Met Pro Ser Lys Phe Thr Ile Ser Ala Asn Val Ser Leu
 85 90 95

[0017]

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

Lys Ala Cys Ser Leu Thr Cys Leu Lys Val Lys Asn Met Leu Thr Thr
 115 120 125

Val Lys Asp Leu Thr Met Lys Thr Phe Asn Pro Thr His Glu Ile Ile
 130 135 140

Ala Leu Cys Glu Phe Glu Asn Ile Met Thr Ser Lys Arg Val Val Ile
 145 150 155 160

Pro Thr Phe Leu Arg Ser Ile Asn Val Lys Ala Lys Asp Leu Asp Ser
 165 170 175

Leu Glu Asn Ile Ala Thr Thr Glu Phe Lys Asn Ala Ile Thr Asn Ala
 180 185 190

Lys Ile Ile Pro Tyr Ala Gly Leu Val Leu Val Ile Thr Val Thr Asp
 195 200 205

Asn Lys Gly Ala Phe Lys Tyr Ile Lys Pro Gln Ser Gln Phe Ile Val
 210 215 220

Asp Leu Gly Ala Tyr Leu Glu Lys Glu Ser Ile Tyr Tyr Val Thr Thr
 225 230 235 240

Asn Trp Lys His Thr Ala Thr Lys Phe Ser Ile Lys Pro Ile Glu Asp
 245 250 255

<210> 13
 <211> 771
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 经密码子优化的牛 RSV M

<400> 13
 atggagactt acgtgaacaa gctgcacgag ggittcacct acaccgctgc tgtgcagtac 60
 aacgtgatcg agaaggacga cgaccccgct tccttgacca tctgggtgcc catgttccag 120
 tcctccatct ccgctgacct gctgatcaag gagctgatca acgtcaacat cctcgtgcgt 180
 cagatctcca cccitgaagg tcccagcctg aagatcatga tcaactcccg ttccgctgtg 240
 ctggctcaga tgcctccaa gttaccatc tccgccaacg tgcctctgga cgagcgttcc 300
 aagctggcct acgacatcac caccctctgc gagatcaagg ctgtctccct gacctgcctg 360
 aaggtaaga acatgctgac caccgtgaag gacctgacca tgaagacctt caaccccacc 420
 cacgagatca tcgctctgtg cgagttcgag aacatcatga cctccaagcg tgtggtcadc 480
 cccaccttcc tccgctccat caacgtgaag gctaaggacc tggactccct cgagaacatc 540
 gctaccaccg agttcaagaa cgtatcacc aacgctaaga tcatccctta cgtggcctg 600
 gigtgtgtca tcaccgtgac cgacaacaag ggcgctttca agtacatcaa gcccagttcc 660
 [0018] cagttcatcg tggacctggg cgtttacctc gagaaggagt ccatctacta cgtcaccacc 720
 aactggaagc acaccgctac caagttctcc atcaagccca tcgaggacta a 771

<210> 14
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 经密码子优化的牛 RSV M

<400> 14

Met Glu Thr Tyr Val Asn Lys Leu His Glu Gly Ser Thr Tyr Thr Ala
 1 5 10 15

Ala Val Gln Tyr Asn Val Ile Glu Lys Asp Asp Asp Pro Ala Ser Leu
 20 25 30

Thr Ile Trp Val Pro Met Phe Gln Ser Ser Ile Ser Ala Asp Leu Leu
 35 40 45

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

Leu Lys Gly Pro Ser Leu Lys Ile Met Ile Asn Ser Arg Ser Ala Val
 65 70 75 80

Leu Ala Gln Met Pro Ser Lys Phe Thr Ile Ser Ala Asn Val Ser Leu

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

[0019]

Asp Leu Gly Ala Tyr Leu Glu Lys Glu Ser Ile Tyr Tyr Val Thr Thr		
225	230	235
Asn Trp Lys His Thr Ala Thr Lys Phe Ser Ile Lys Pro Ile Glu Asp		
245	250	255

<210> 15
 <211> 1176
 <212> DNA
 <213> 呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus)

<400> 15

atggctctta gcaaagtc aa gttgaatgat acactcaaca aagatcaact tctgtcatcc	60
agcaaataca ccatccaacg gagcacagga gatagtattg atactcctaa ttatgatgtg	120
cagaaacaca tcaataagtt atgtggcaig ttattaatca cagaagatgc taatcataaa	180
ttcactgggt taataggtat gttatcatcg atgictaggt taggaagaga agacaccata	240
aaaatactca gagatgctgg atatcatgta aaagcaaatg gactagatgt aacaacacat	300
cgtaagaca ttaatggaaa agaaatgaaa ttggaagtg taacattggc aagcttaaca	360
actgaaatc aaatcaacat tgagatagaa tctagaaaa cctacaaaa aatgctaaaa	420
gaaatgggag aggtagctcc agaatacagg catgactctc ctgattgtgg gatgataata	480
ttatgtatag cagcattagt aataactaaa tttagcagcag gggacagatc tggctttaca	540
gccgtgatta ggagagctaa taatgctca aaaaatgaaa tgaacgtta caaaggctta	600
ctaccaagg acatagccaa cagcttctat gaagtgttg aaaaacatcc ccactttata	660
gatgtttttg ttcattttgg tatagcacia tcttctacca gaggtggcag tagagttgaa	720

```

gggatitttt caggattgtt tatgaatgcc taiggtgcag ggcaagtgat gitacggtag 780
ggagtcttag caaaatcagt taaaatatt atgttaggac atgctagtgt gcaagcagaa 840
atggaacaag ttgttigaggt ttatgaatat gcccaaaaat tgggtggtag agcaggattc 900
taccatatai tgaacaaccc aaaagcatca ttattatctt tgactcaatt tctcacttc 960
tccagigttag tattaggcaa tgctgctggc ctaggcataa tgggagagta cagaggtaaa 1020
ccgaggaatc aagatctata tgatgcagca aaggcatatg ctgaacaact caaagaaaat 1080
ggtgtgatta actacagtgt actagacttg acagcagaag aactagagge tatcaaacat 1140
cagcttaatc caaaagataa tgatgtagag ctttga 1176

```

```

<210> 16
<211> 391
<212> PRT
<213> 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus)
<400> 16

```

```

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

```

```

Leu Leu Ser Ser Ser Lys Tyr Thr Ile Gln Arg Ser Thr Gly Asp Ser
          20          25          30

```

```

Ile Asp Thr Pro Asn Tyr Asp Val Gln Lys His Ile Asn Lys Leu Cys
          35          40          45

```

[0020]

```

Gly Met Leu Leu Ile Thr Glu Asp Ala Asn His Lys Phe Thr Gly Leu
          50          55          60

```

```

Ile Gly Met Leu Tyr Ala Met Ser Arg Leu Gly Arg Glu Asp Thr Ile
65          70          75          80

```

```

Lys Ile Leu Arg Asp Ala Gly Tyr His Val Lys Ala Asn Gly Val Asp
          85          90          95

```

```

Val Thr Thr His Arg Gln Asp Ile Asn Gly Lys Glu Met Lys Phe Glu
          100         105         110

```

```

Val Leu Thr Leu Ala Ser Leu Thr Thr Glu Ile Gln Ile Asn Ile Glu
          115         120         125

```

```

Ile Glu Ser Arg Lys Ser Tyr Lys Lys Met Leu Lys Glu Met Gly Glu
          130         135         140

```

```

Val Ala Pro Glu Tyr Arg His Asp Ser Pro Asp Cys Gly Met Ile Ile
145          150         155         160

```

```

Leu Cys Ile Ala Ala Leu Val Ile Thr Lys Leu Ala Ala Gly Asp Arg
          165         170         175

```

```

Ser Gly Leu Thr Ala Val Ile Arg Arg Ala Asn Asn Val Leu Lys Asn
          180         185         190

```

Glu Met Lys Arg Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Lys Asp Ile Ala Asn Scr
 195 200 205

Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys His Pro His Phe Ile Asp Val Phe Val
 210 215 220

His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val Glu
 225 230 235 240

Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val
 245 250 255

Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu
 260 265 270

Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr
 275 280 285

Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu
 290 295 300

Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His Phe
 305 310 315 320

Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu
 325 330 335

Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala
 340 345 350

Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu
 355 360 365

Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn Pro
 370 375 380

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu
 385 390

[0021]

<210> 17
 <211> 1176
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 经密码子优化的 RSV N

<400> 17
 atggctctgt ccaaggtcaa gctgaacgac accctgaaca aggaccagct gctgtcctcc 60
 tccaagtaca ccatecagcg ttccaccggt gactccateg acacecccaa ctacgacgtg 120
 cagaagcaca tcaacaagct gtgcggcatg ctgctgalca ccgaggacgc taaccacaag 180
 ttccaccggtc tgateggcat gctgtacgct atgtcccgtc tgggtcgtga ggacaccatc 240
 aagatcctgc gtgacgctgg ttaccacgtg aaggctaacg gtgtcgacgt gaccaccac 300

cgicaggaca tcaacggcaa ggagatgaag ttcgaggtcc tgacctggc ttcctgacc 360
 accgagatcc agatcaacat cgagatcgag tcccgtlaagt cctacaagaa gatgctgaag 420
 gagatgggcg aggtcgcccc cgagtaccgt cagcactccc cegactcgcg caigatcatc 480
 ctgtgcatcg ctgctctcgt catcaccaag ctggctgctg gtagccgttc cggctgacc 540
 gcigtgatcc gtcgtgctaa caacgtgctg aagaacgaga tgaagcgcta caaggtctg 600
 ctgcccgaag acatcgctaa cagcttctac gagggttctc agaagcacc ccacttcatc 660
 gacgtgttcg tgcacttcgg tatcctcag tctccacc ccgtgtggag 720
 ggcatcttcg ctggctgctt catgaacgt tacggtgctg gccaggtcat gctcgttgg 780
 ggigtgctgg ctaagtcctg gaagaacatc atgctgggtc acgcttcctg gcaggtgag 840
 atggagcagg tgggtgaggt gtacgagtac gctcagaagc tgggcggcga ggctggttcc 900
 taccacatcc tgaacaacc caagcttcc ctgctgtccc tgacctggt cccccattc 960
 tctccctgg tgcctggtaa cgtctggtt ctgggataca tggcgagta ccgtggcacc 1020
 ccccgaacc aggacctgta cgacgtgct aagcttacg ccgagcagct caaggagaac 1080
 ggctcatca actactcctg gctggacctg accgtgagg agctggagcc tatcaagcac 1140
 cagctgaacc ccaaggacaa cgacgtggag ctgtaa 1176

<210> 18
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0022]

<220>
 <223> 经密码子优化的 RSV N
 <400> 18

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

Leu Leu Ser Ser Ser Lys Tyr Thr Ile Gln Arg Ser Thr Gly Asp Ser
20 25 30

Ile Asp Thr Pro Asn Tyr Asp Val Gln Lys His Ile Asn Lys Leu Cys
35 40 45

Gly Met Leu Leu Ile Thr Glu Asp Ala Asn His Lys Phe Thr Gly Leu
50 55 60

Ile Gly Met Leu Tyr Ala Met Ser Arg Leu Gly Arg Glu Asp Thr Ile
65 70 75 80

Lys Ile Leu Arg Asp Ala Gly Tyr His Val Lys Ala Asn Gly Val Asp
85 90 95

Val Thr Thr His Arg Gln Asp Ile Asn Gly Lys Glu Met Lys Phe Glu
100 105 110

Val Leu Thr Leu Ala Ser Leu Thr Thr Glu Ile Gln Ile Asn Ile Glu
115 120 125

Ile Glu Ser Arg Lys Ser Tyr Lys Lys Met Leu Lys Glu Met Gly Glu
 130 135 140

Val Ala Pro Glu Tyr Arg His Asp Ser Pro Asp Cys Gly Met Ile Ile
 145 150 155 160

Leu Cys Ile Ala Ala Leu Val Ile Thr Lys Leu Ala Ala Gly Asp Arg
 165 170 175

Ser Gly Leu Thr Ala Val Ile Arg Arg Ala Asn Asn Val Leu Lys Asn
 180 185 190

Glu Met Lys Arg Tyr Lys Gly Leu Leu Pro Lys Asp Ile Ala Asn Ser
 195 200 205

Phe Tyr Glu Val Phe Glu Lys His Pro His Phe Ile Asp Val Phe Val
 210 215 220

His Phe Gly Ile Ala Gln Ser Ser Thr Arg Gly Gly Ser Arg Val Glu
 225 230 235 240

Gly Ile Phe Ala Gly Leu Phe Met Asn Ala Tyr Gly Ala Gly Gln Val
 245 250 255

Met Leu Arg Trp Gly Val Leu Ala Lys Ser Val Lys Asn Ile Met Leu
 260 265 270

[0023]

Gly His Ala Ser Val Gln Ala Glu Met Glu Gln Val Val Glu Val Tyr
 275 280 285

Glu Tyr Ala Gln Lys Leu Gly Gly Glu Ala Gly Phe Tyr His Ile Leu
 290 295 300

Asn Asn Pro Lys Ala Ser Leu Leu Ser Leu Thr Gln Phe Pro His Phe
 305 310 315 320

Ser Ser Val Val Leu Gly Asn Ala Ala Gly Leu Gly Ile Met Gly Glu
 325 330 335

Tyr Arg Gly Thr Pro Arg Asn Gln Asp Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Ala
 340 345 350

Tyr Ala Glu Gln Leu Lys Glu Asn Gly Val Ile Asn Tyr Ser Val Leu
 355 360 365

Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu Glu Ala Ile Lys His Gln Leu Asn Pro
 370 375 380

Lys Asp Asn Asp Val Glu Leu
 385 390

<210> 19
 <211> 1725
 <212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> F 蛋白 368	
	<400> 19	
	atggagctgc tcatcttgaa ggctaacgcc attaccacta tccttacagc ggtgacgttc	60
	tgctttgcat cgggtcagaa tattaccgaa gagttctacc aatctacttg tagcgctgtc	120
	tcaaaaggct atctatcggc cttacgtaca ggatggtaca cgagtgttat caccatcgaa	180
	ctgtccaaca ttaaggagaa taatgcaac ggtactgacg cgaaggtaaa gctcatcaaa	240
	caggaattgg ataagtacaa gaacgcagtg acagagcttc aactgctaata gcagcttacc	300
	ccccctacga ataaccgcgc taggagagaa cccccacgal tcatgaacla laclllaaa	360
	aacgccaaaa agaccaacgt cacattgagc aaaaagcgtc agcgcaggtt tctgggcttc	420
	cttctcggag ttggttcagc tattgcgtcg ggcgtagccg tgagtaaagt cttgcacctg	480
	gagggagaag ttaataagat caagtcggc ctcctgtcta ctaacaaagc tgtggtcagc	540
	ctatcaaacg gtgtatccgt gttaacctcg aaggttcttg acttgaaaa ttacatcgat	600
	aagcaactcc tgcgattgt caacaagcag agttgttcta tcagcaatat tgagacggtg	660
	atcgagttcc aacagaaaa caacagattg ctggaaatca cacgtgagtt ttcagtaaat	720
	gcccggctta ctacccccgt ctccacgtac atgctaacaa actcgggaatt acttagtctc	780
	atfaacgaca tgcctatcac taatgatcag aagaagtga tgtctaacaa cgtgcaaat	840
	gtccgccagc aaagctattc catcatgtca atcattaaag aggaagtgtc ggcgtacgta	900
[0024]	gttcagctcc cactgtacgg agtcatcgac accccgtgct ggaagctaca tacctcgccc	960
	ttatgtacga caaatactaa agagggttct aacatttggc ttaccaggac ggatcgaggc	1020
	tggtattgagc ataacgctgg aagtgtgagc ttcttccctc aagcagaaac atgtaaggta	1080
	cagtccaata gagttttttg cgacactatg aactcattga cctcctccatc tgagatcaat	1140
	ctgtgtaacg tcgatactt caaccggaag tacgactgca aaattatgac gtccaagaca	1200
	gagtgtcga gtagcgtaat cacttcaacta ggtgccatcg ttctttgcta cggcaagacc	1260
	aaatglacgg ctccaalaa gaaccgtgga attalcaaaa catctcga cggllgcgac	1320
	tatgtcagca ataagggcat ggacactgtg agigtaggaa acaccttata ctacgttaac	1380
	aagcaagaag gtaaatcact ttatgtcaag ggcgagccca ttatcaattt ttacgatcct	1440
	ttggtgttcc catccgacga gttcgatcg tctatcagcc aggtaaacga aaagattaac	1500
	cagtccctcg caittatccg caaatcggac gagctgtac acaatgttaa cgccggaag	1560
	agtacgacaa acattatgat cactaccatc attatcgtca ttatcgtgat ccttttgta	1620
	ctcattgctg taggtctgtt actatactgt aaagcgaggt ctacgccctg tacacttagc	1680
	aaggatcaat tgtccggcat caataacatt gccctctcga attaa	1725
	<210> 20	
	<211> 574	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> F 蛋白 368	

<400> 20

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

[0025]

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

Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile

	275	280	285		
	Met Ser Ile Ile Lys Glu	Glu Val Leu Ala Tyr	Val Val Gln Leu Pro		
	290	295	300		
	Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr	Pro Cys Trp Lys	Leu His Thr Ser Pro		
	305	310	315	320	
	Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys	Glu Gly Ser Asn	Ile Cys Leu Thr Arg		
		325	330	335	
	Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys	Asp Asn Ala Gly Ser	Val Ser Phe Phe		
		340	345	350	
	Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys	Val Gln Ser Asn	Arg Val Phe Cys Asp		
		355	360	365	
	Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu	Pro Ser Glu Ile	Asn Leu Cys Asn Val		
		370	375	380	
	Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr	Asp Cys Lys Ile	Met Thr Ser Lys Thr		
		385	390	395	400
	Asp Val Ser Ser Ser Val Ile	Thr Ser Leu Gly Ala	Ile Val Ser Cys		
		405	410	415	
[0026]	Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr	Ala Ser Asn Lys	Asn Arg Gly Ile Ile		
		420	425	430	
	Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys	Asp Tyr Val Ser	Asn Lys Gly Met Asp		
		435	440	445	
	Thr Val Ser Val Gly Asn Thr	Leu Tyr Tyr Val	Asn Lys Gln Glu Gly		
		450	455	460	
	Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly	Glu Pro Ile Ile	Asn Phe Tyr Asp Pro		
		465	470	475	480
	Leu Val Phe Pro Ser Asp	Glu Phe Asp Ala Ser	Ile Ser Gln Val Asn		
		485	490	495	
	Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu	Ala Phe Ile Arg	Lys Ser Asp Glu Leu		
		500	505	510	
	Leu His Asn Val Asn Ala Gly	Lys Ser Thr Thr	Asn Ile Met Ile Thr		
		515	520	525	
	Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile	Val Ile Leu Leu Ser	Leu Ile Ala Val		
		530	535	540	
	Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys	Ala Arg Ser Thr	Pro Val Thr Leu Ser		
		545	550	555	560
	Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile	Asn Asn Ile Ala Phe	Ser Asn		

565

570

<210> 21

<211> 560

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ⅱ蛋白 623

<400> 21

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

Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Gly Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe
 20 25 30

Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu
 35 40 45

Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile
 50 55 60

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

Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu
 85 90 95

[0027]

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Arg Ala Asn Asn Glu Leu Pro
 100 105 110

Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Ala Lys Lys Thr Asn Val Thr
 115 120 125

Leu Ser Arg Arg Ala Ile Ala Ser Gly Val Ala Val Ser Lys Val Leu
 130 135 140

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr
 145 150 155 160

Asn Lys Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser
 165 170 175

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn His Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile
 180 185 190

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu
 195 200 205

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser
 210 215 220

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn
 225 230 235 240

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln
 245 250 255

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr
 260 265 270

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln
 275 280 285

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr
 290 295 300

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu
 305 310 315 320

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser
 325 330 335

Phe Phe Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe
 340 345 350

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys
 355 360 365

Asn Val Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser
 370 375 380

[0028]

Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val
 385 390 395 400

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly
 405 410 415

Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys Gly
 420 425 430

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln
 435 440 445

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr
 450 455 460

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln
 465 470 475 480

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp
 485 490 495

Glu Leu Leu His Asn Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met
 500 505 510

Ile Thr Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile
 515 520 525

Ala Val Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr
530 535 540

Leu Ser Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
545 550 555 560

<210> 22

<211> 252

<212> PRT

<213> 禽流感病毒(Avian influenza virus)

<400> 22

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile Ile Pro
1 5 10 15

Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Lys Leu Glu Asp Val Phe
20 25 30

Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu Lys Thr
35 40 45

Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg Phe Val
65 70 75 80

[0029]

Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp Arg Ala
85 90 95

Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His Gly Ala
100 105 110

Lys Glu Val Ser Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Cys Met
115 120 125

Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val Ala Phe
130 135 140

Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln His Arg
145 150 155 160

Ser His Arg Gln Met Ala Thr Ile Thr Asn Pro Leu Ile Arg His Glu
165 170 175

Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu Gln Met
180 185 190

Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala Asn Gln
195 200 205

Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His Pro Asn
210 215 220

Ser Ser Ala Gly Leu Arg Asp Asn Leu Leu Glu Asn Leu Gln Ala Tyr
 225 230 235 240

Gln Lys Arg Met Gly Val Gln Met Gln Arg Phe Lys
 245 250

<210> 23
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 次要剪切位点

<400> 23

Arg Ala Arg Arg
 1

<210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 主要剪切位点

<400> 24

Lys Lys Arg Lys Arg Arg
 1 5

[0030]

<210> 25
 <211> 897
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 经密码子优化的 RSV G

<400> 25
 atgtccaaga acaaagacca gcgtaccgct aagactctgg agegcacatg ggatacgcctc 60
 aatcacttgc ttttcacttc tagctgccctg tacaacctca acttgaagtc agtggcccaa 120
 attaccctlll cgatccctggc gatgattalc agtactlccc tcatcattgc agctatcatt 180
 tttatcgctt ctgcgaatca taaggtcaca cccacgaccg caatcattca ggacgctact 240
 agccaaatca aaaacacaac ccttacgtat ttgactcaga acccacaact gggtatttca 300
 ccgtcgaalc ccaglgaaat cacclecccag atcacaacta ttcttgccctc taccacgcct 360
 ggcgttaaga gcacactcca atcaactacc gtaaagacga aaaacacaac taccaccag 420
 acgcagccat ccaagccgac aactaaaca aggcagaaca agcccccttc gaagccaaat 480
 aacgatllec actlegaggi glltaacttc glectcgiga glatctgctc laataacccc 540
 acctgttggg ctatttgcga aagaatccct aacaagaagc caggaaaaaa gacgacaact 600
 aaaccaccca agaagcctac gtltgaaaca actaagaagg acccgaaacc acaaacccag 660
 aagagcaaaag aagllcccac aactlaagcct accgaggaac cgacgatcau lacaactlaag 720
 accaacatta tcacgacact gctcacttca aataccactg gtaaccacaga gctgacctcc 780
 cagatggaaa ccttccattc gacgagttct gagggcaacc ccagcccttc ccaagtatca 840

acaacttcgg aatacccatc tcagcccagc agccctccga ataccccagc acaataa

897

<210> 26

<211> 298

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 经密码子优化的 RSV G

<400> 26

Met Ser Lys Asn Lys Asp Gln Arg Thr Ala Lys Thr Leu Glu Arg Thr
1 5 10 15

Trp Asp Thr Leu Asn His Leu Leu Phe Ile Ser Ser Cys Leu Tyr Lys
20 25 30

Leu Asn Leu Lys Ser Val Ala Gln Ile Thr Leu Ser Ile Leu Ala Met
35 40 45

Ile Ile Ser Thr Ser Leu Ile Ile Ala Ala Ile Ile Phe Ile Ala Ser
50 55 60

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

Ser Gln Ile Lys Asn Thr Thr Pro Thr Tyr Leu Thr Gln Asn Pro Gln
85 90 95

[0031]

Leu Gly Ile Ser Pro Ser Asn Pro Ser Glu Ile Thr Ser Gln Ile Thr
100 105 110

Thr Ile Leu Ala Ser Thr Thr Pro Gly Val Lys Ser Thr Leu Gln Ser
115 120 125

Thr Thr Val Lys Thr Lys Asn Thr Thr Thr Thr Gln Thr Gln Pro Ser
130 135 140

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Ser Lys Pro Asn
145 150 155 160

Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys
165 170 175

Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys
180 185 190

Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Leu
195 200 205

Lys Thr Thr Lys Lys Asp Pro Lys Pro Gln Thr Thr Lys Ser Lys Glu
210 215 220

Val Pro Thr Thr Lys Pro Thr Glu Glu Pro Thr Ile Asn Thr Thr Lys
225 230 235 240

Thr Asn Ile Ile Thr Thr Leu Leu Thr Ser Asn Thr Thr Gly Asn Pro
245 250 255

Glu Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr Phe His Ser Thr Ser Ser Glu Gly
260 265 270

Asn Pro Ser Pro Ser Gln Val Ser Thr Thr Ser Glu Tyr Pro Ser Gln
275 280 285

Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr Pro Arg Gln
290 295

<210> 27

<211> 65

<212> PRT

<213> 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus)

<400> 27

Met Gly Asn Thr Ser Ile Thr Ile Glu Phe Thr Ser Lys Phe Trp Pro
1 5 10 15

Tyr Phe Thr Leu Ile His Met Ile Leu Thr Leu Ile Ser Leu Leu Ile
20 25 30

Ile Ile Thr Ile Met Ile Ala Ile Leu Asn Lys Leu Ser Glu His Lys
35 40 45

[0032]

Thr Phe Cys Asn Asn Thr Leu Glu Leu Gly Gln Met His Gln Ile Asn
50 55 60

Thr
65

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 弗林蛋白酶识别位点突变

<400> 28

Lys Lys Gln Lys Gln Gln
1 5

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 弗林蛋白酶识别位点突变

<400> 29

Gly Arg Arg Gln Gln Arg
1 5

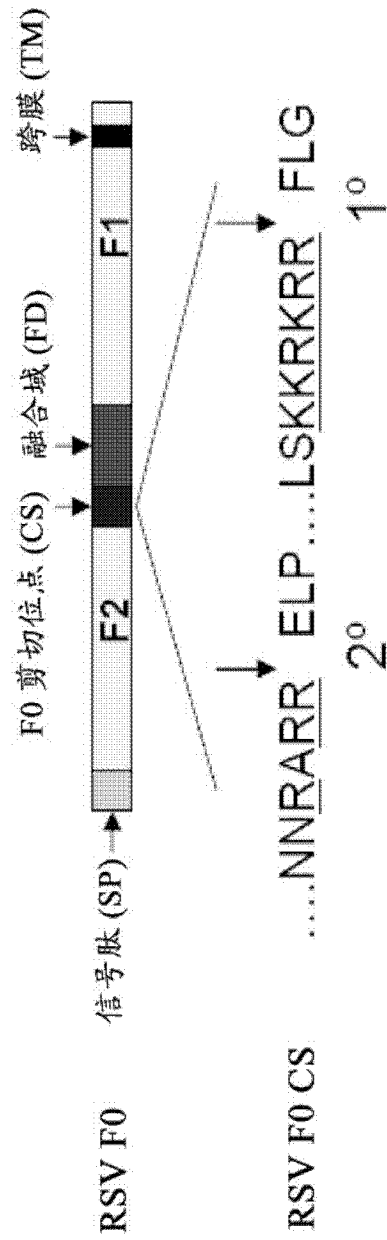


图1

衡量的剪切位点突变

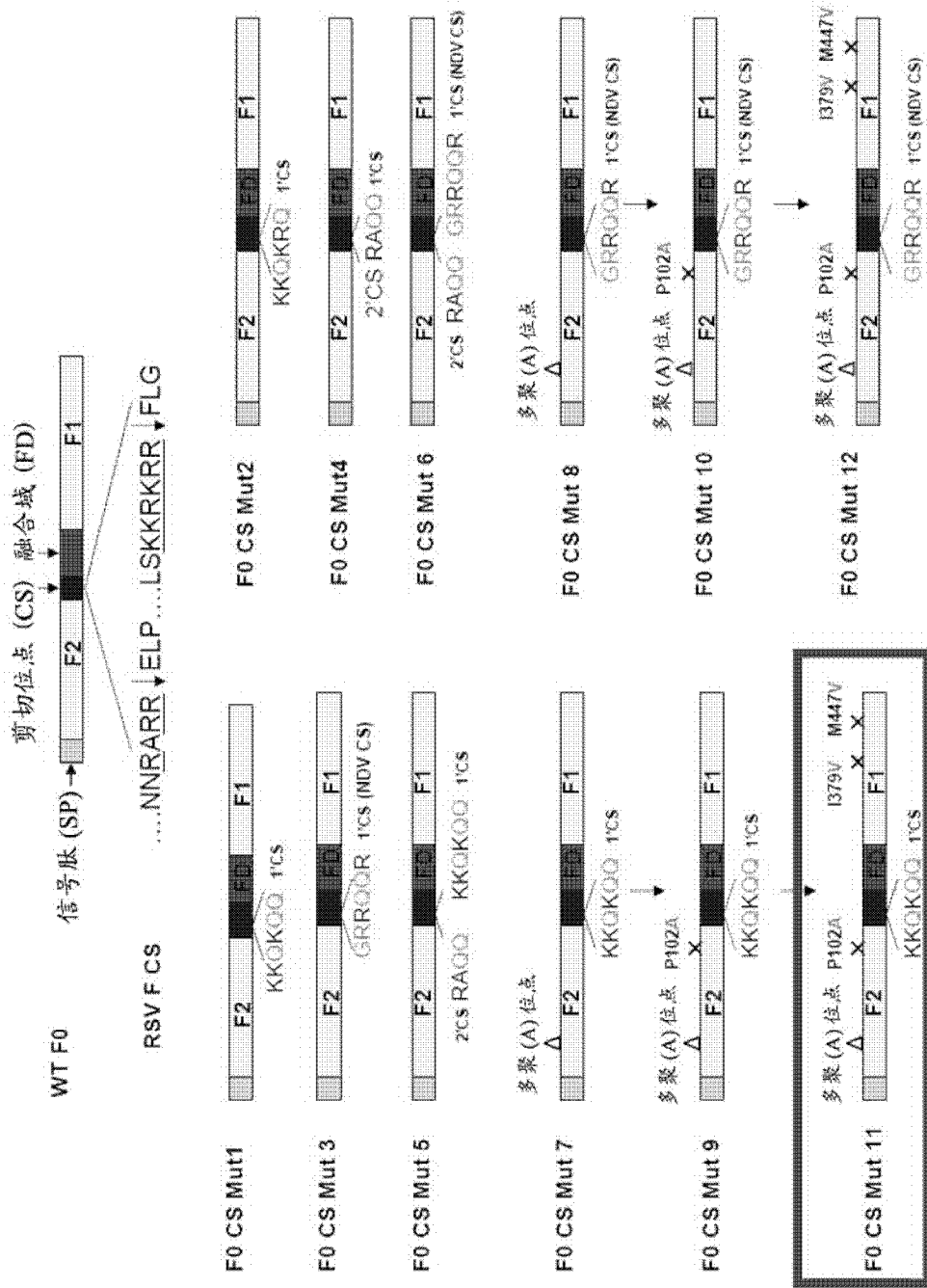


图2

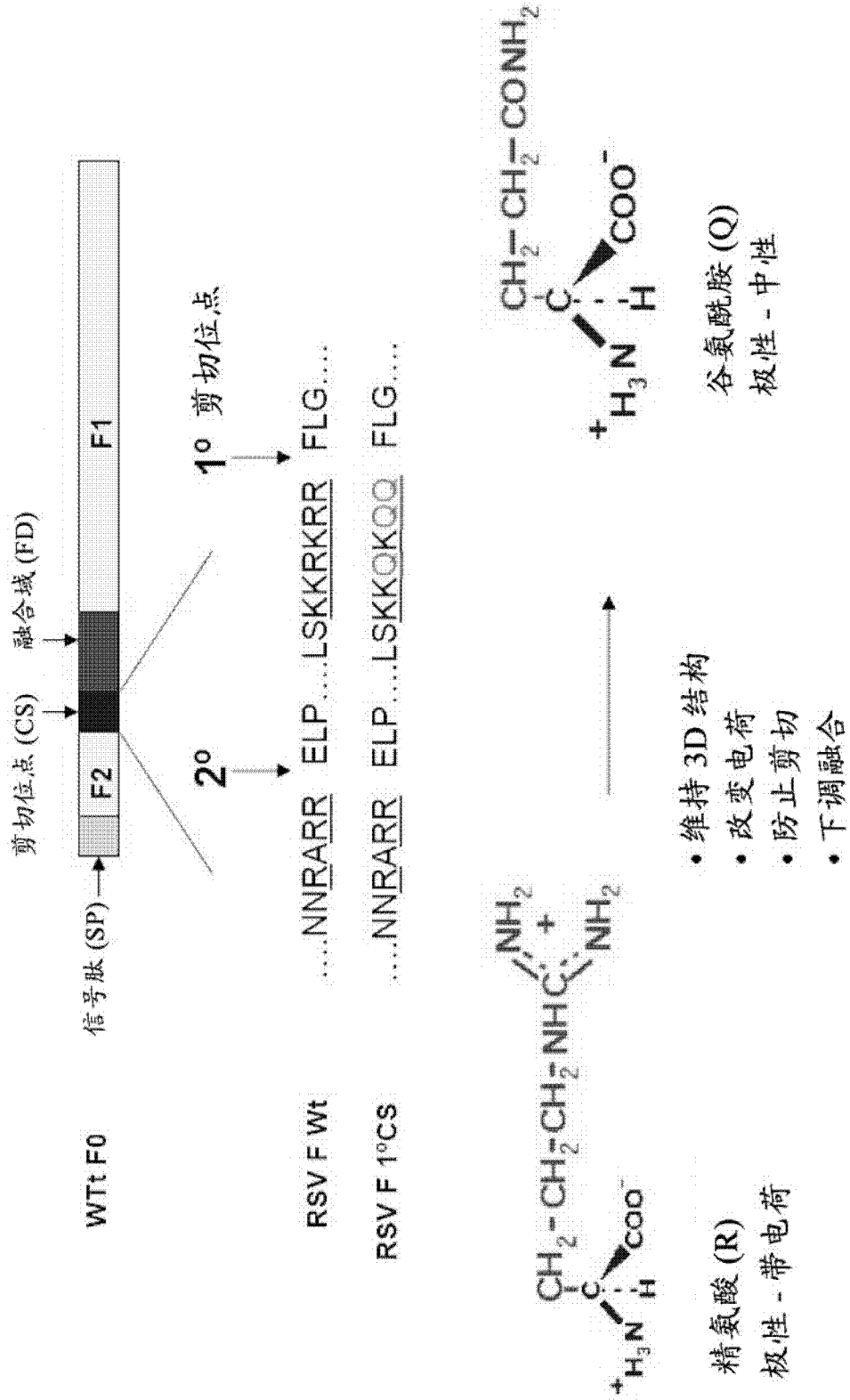


图3

修饰的 RSV F0 (登录号 AAB59858): pNVAX 2023 克隆

```

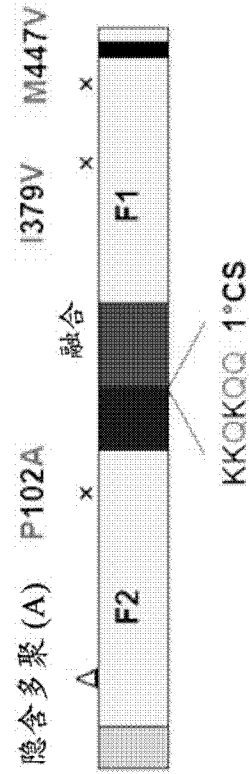
MELLILKANA ITTILTAVTF CFASGQNITE EFYQSTCSAV SKGYLSALRT
GWYTSVITIE LSNIKENKCN GDAKVKLIK QELDKYKNAV TELQLLMQST
PATNN E LPRFMNYTLN NAKKTNVTLN FLGF LLGVSSALAS
GVASKVLHL EGEVNIKISA LLSTNKAVVS LSVGVSVLTS KVLDDLKNYID
KQLLPIVVKQ SCSISNIETV IEFQKNNRL LEITREFSVN AGVITPEVSTY
MLTNSSELLSL INDMPIINDQ KKLMSNNVQI VRQDSYSIMS IIKEEVLAYV
VQLPLYGVID TECWKLHTSP LCTTNTKEGS NICLTRDRG WYCDNAGSVS
FFPQAETCKV QSNRVECDTM NSLTLPSEVN LCNVDIFNPK YDCKIMTSKT
DVSSSVIISL GAIVSCYGKT KCTASKNRG IIKLFSNGCD YVSNKGVDTV
SVGNTLYVNV KQEGKSLYVK GEPIINEFYDP LVFSPSEFDA SISQVNEKIN
QSLAFIRKSD ELLHNVNAGK STTNIMITTI IIVLIVILLS LIAVGLLLYC
KARSTPEVTLN KDQLSGINNI AFSN

```

2° 剪切位点

1° 剪切位点

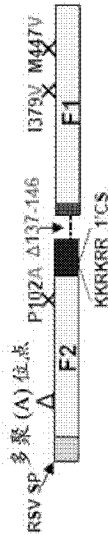
融合域



F0 CS Mut 11
 pNVAX2023
 杆状病毒 No. 541

图4

F 融合域的部分缺失 (Δ 137-146)



病毒 No: 622

Δ 137-146 WT FO	HELLLAKAAITITLTAVTFCFASGQITEEFQSTCSAVSFGYLSAINTSNTSITIE 60 HELLLAKAAITITLTAVTFCFASGQITEEFQSTCSAVSFGYLSAINTSNTSITIE 60 *****
Δ 137-146 WT FO	LSMIKEMKGDYKVKLIKQELDKYNAVTLEQLDMOSTPATMFAKSELFRPMTLM 120 LSMIKEMKGDYKVKLIKQELDKYNAVTLEQLDMOSTPATMFAKSELFRPMTLM 120 *****
Δ 137-146 WT FO	NAKKTIVTLSKRRKPS-----AIASGVAVSKVHLEGEVNRKIKSALLSTKAVYS 170 NAKKTIVTLSKRRKPS-----AIASGVAVSKVHLEGEVNRKIKSALLSTKAVYS 170 *****
Δ 137-146 WT FO	LSHEVSVLTSKVDLEEMHDKQLLPVNRKSSISNIETVIEFQKMRLELITFEFSN 230 LSHEVSVLTSKVDLEEMHDKQLLPVNRKSSISNIETVIEFQKMRLELITFEFSN 230 *****
Δ 137-146 WT FO	AGVTTFVSTYMLTNSLELLSINMPITNDQKINSRNVQIVRQQSYSINSIHEEVLAVY 290 AGVTTFVSTYMLTNSLELLSINMPITNDQKINSRNVQIVRQQSYSINSIHEEVLAVY 290 *****
Δ 137-146 WT FO	VQLFLGVADTPCKLHTSP LCTTNTKESNICLITDRGWTCDNAGSYFFQAEIKRV 350 VQLFLGVADTPCKLHTSP LCTTNTKESNICLITDRGWTCDNAGSYFFQAEIKRV 350 *****
Δ 137-146 WT FO	QSHVFCDTNNSLTLFSEVNLQMDLFRPKYCKIKTIDYSSVITSLGAIVSCYGT 410 QSHVFCDTNNSLTLFSEVNLQMDLFRPKYCKIKTIDYSSVITSLGAIVSCYGT 420 *****
Δ 137-146 WT FO	KCTASMRGLITFSGCDVYSKGDVYSQNTLYVNRKESLTVNGEPIINFTFP 470 KCTASMRGLITFSGCDVYSKGDVYSQNTLYVNRKESLTVNGEPIINFTFP 480 *****
Δ 137-146 WT FO	LVFSDFFASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNFAKSTINMIIIVIVIVILLS 530 LVFSDFFASISQVNEKINQSLAFIRKSDLELHNFAKSTINMIIIVIVIVILLS 540 *****
Δ 137-146 WT FO	LIAGVLLVCKAESTVTLISKDQLSGHMIAFSN- 564 LIAGVLLVCKAESTVTLISKDQLSGHMIAFSN- 574 *****

图5

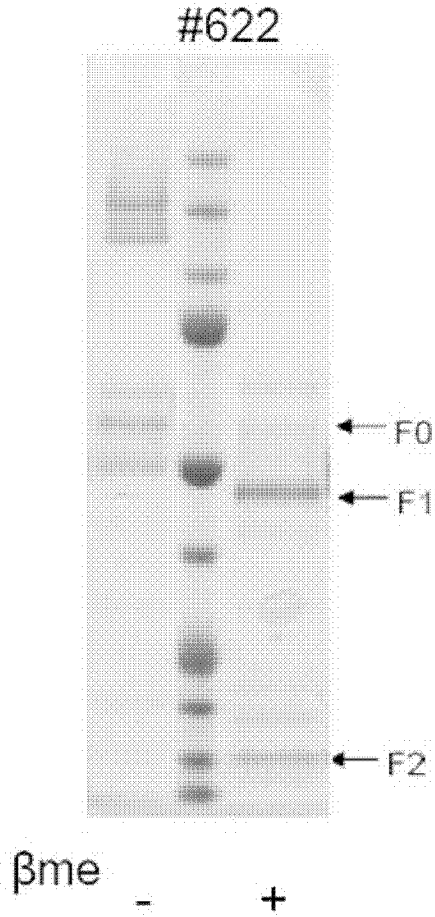


图6

BV #683 经修饰的 RSV F0

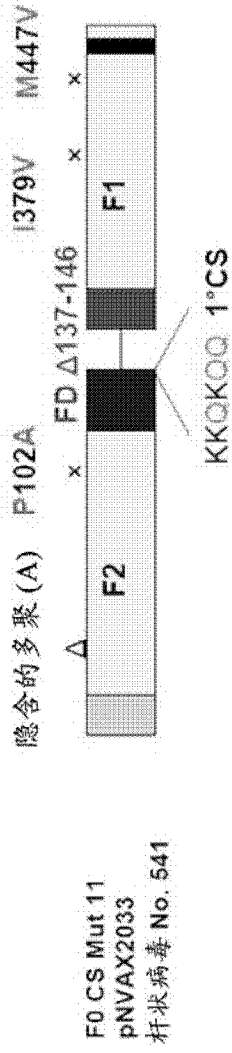


图7

- 经密码子优化
- 1° 剪切位点失活 (3 个保守的 aa 变化)
- F2 中隐含的多聚 (A) 去除
- 对 GenBank 序列的 3 个 aa 修正
- F1 融合域的 N 端一半的缺失

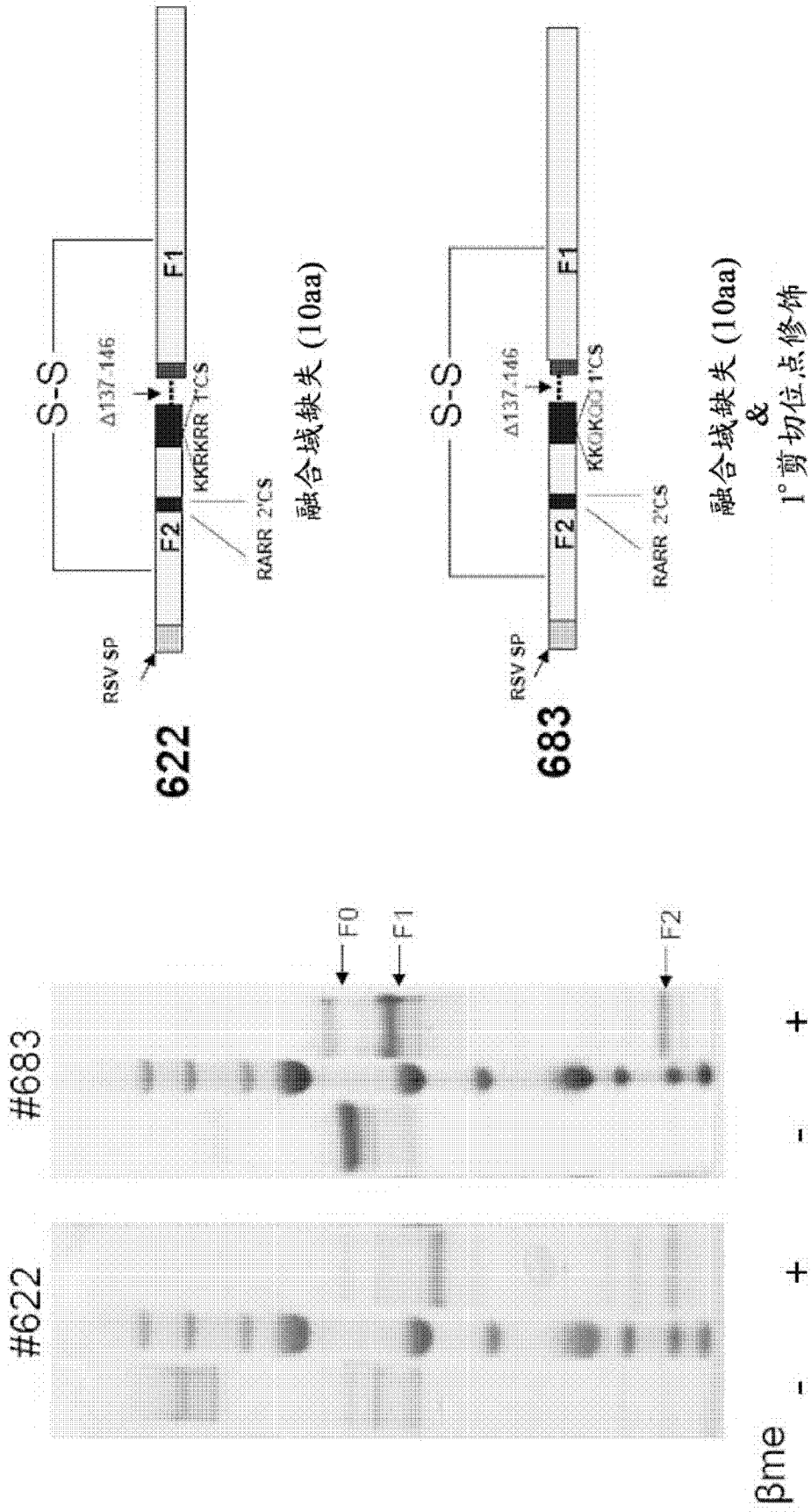


图8

经纯化的 BV #683 RSV F

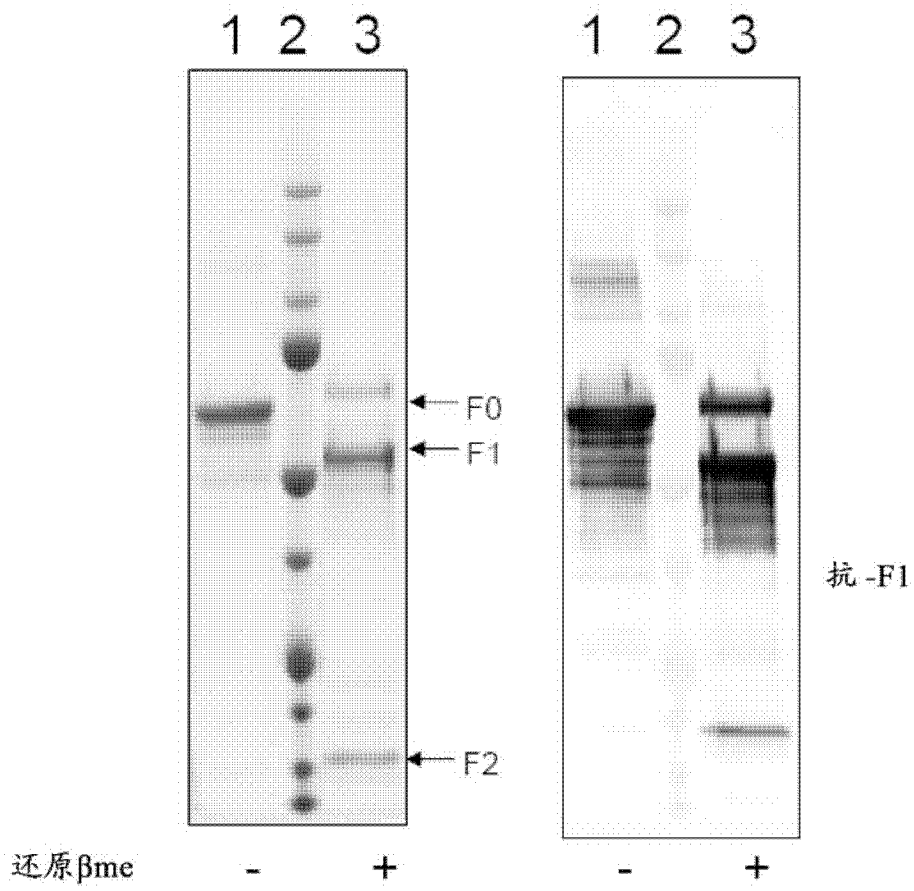


图9

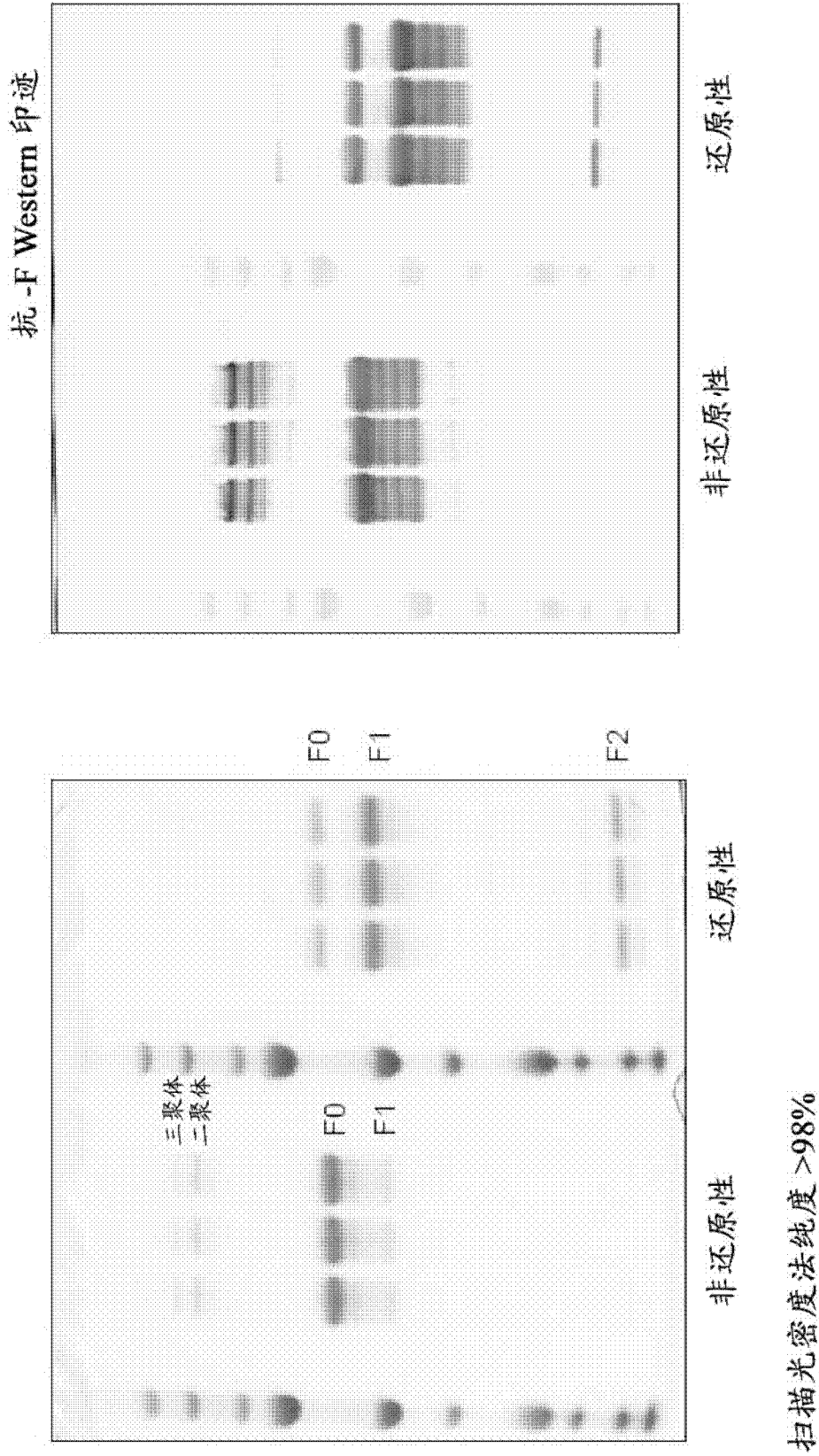


图10

经纯化的 RSV-F #683 微团 (玫瑰花结)

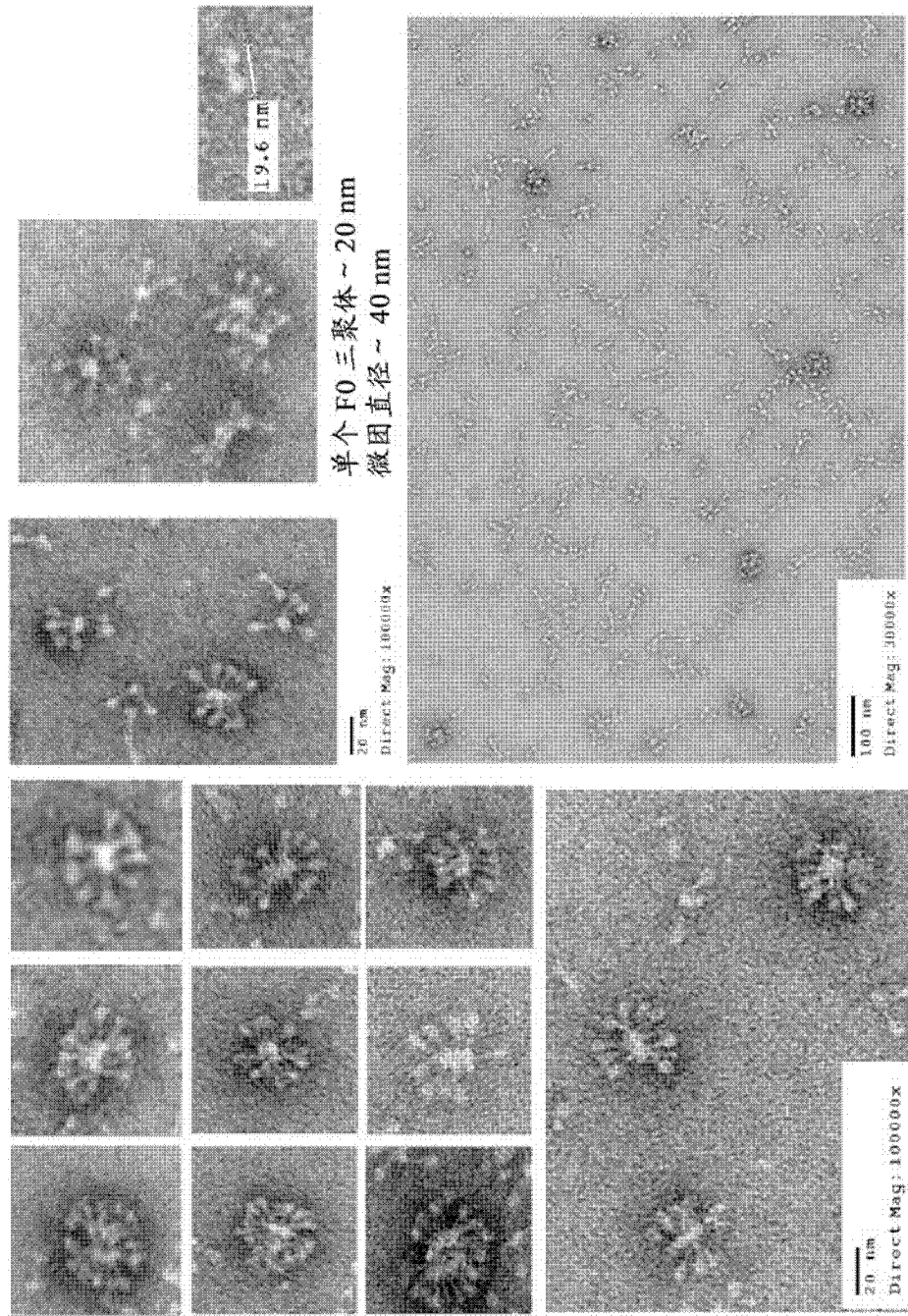


图11

颗粒大小分析显示 RSV 683 F0 形成 40nm 颗粒

结果

Z-平均 (d.nm): 40.2		直径 (nm)		强度 %		宽度 (nm)	
峰 1:	91.3	峰 1:	91.3	峰 1:	98.4	峰 1:	155
Pdl:	0.383	峰 2:	4390	峰 2:	1.6	峰 2:	938
截距:	0.823	峰 3:	0.00	峰 3:	0.0	峰 3:	0.00

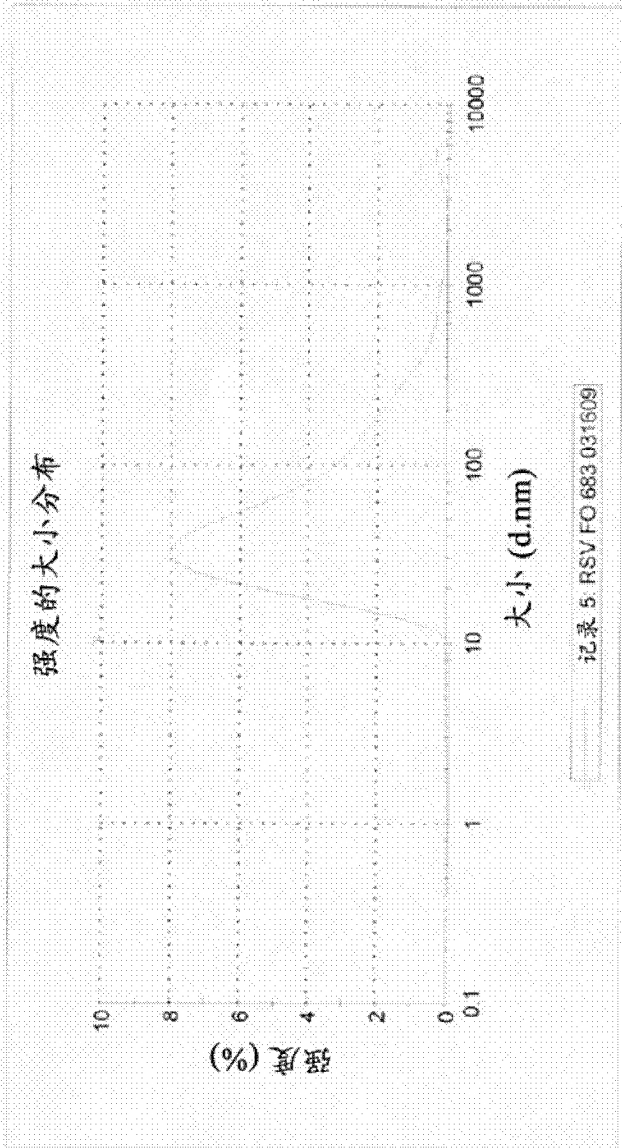


图12

经修饰的 RSF F: BV #622 和 #623

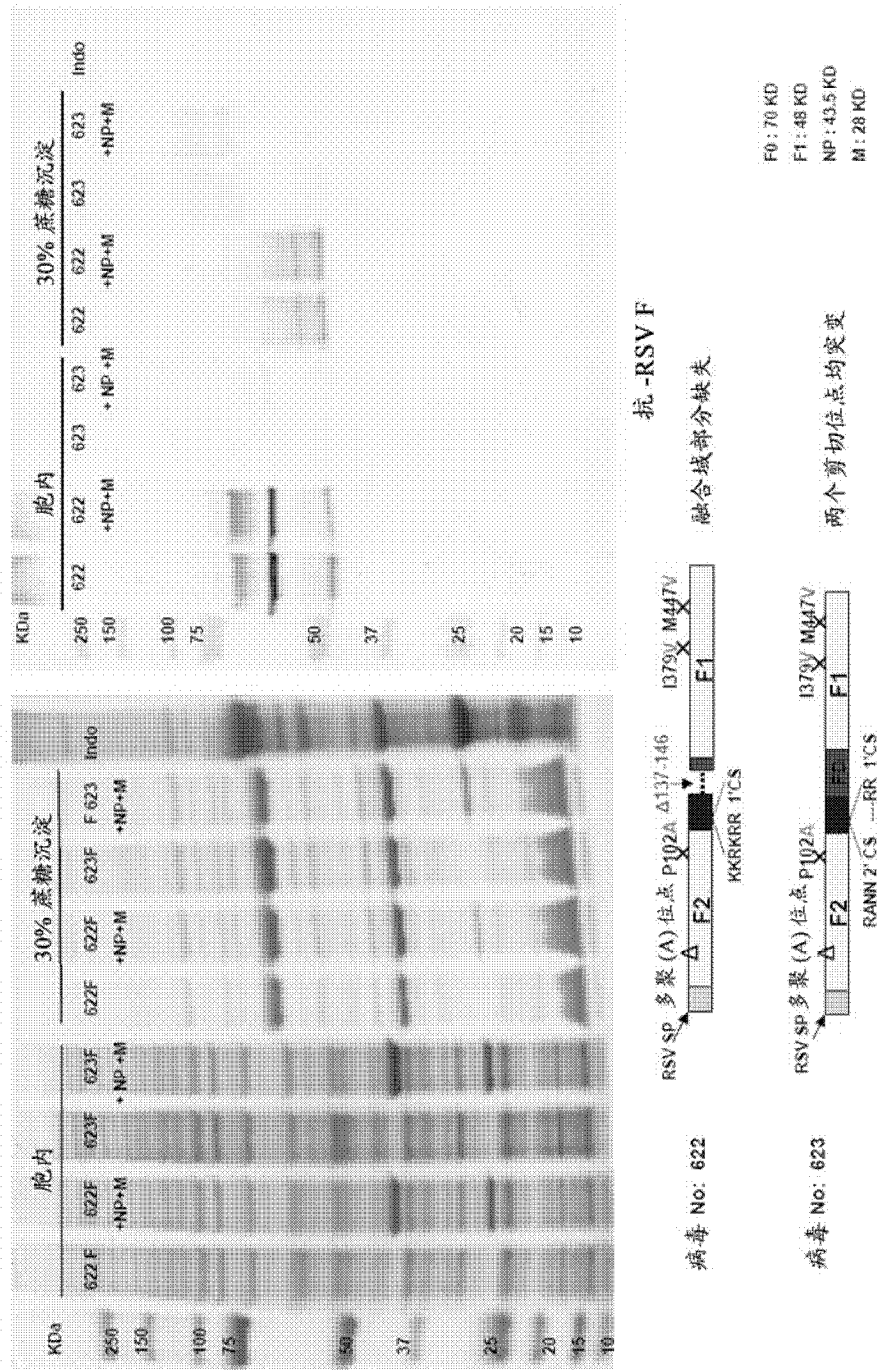


图13

HRSV 突变体的胞内表达，与 BRSV M 和 HRSV N 共同感染

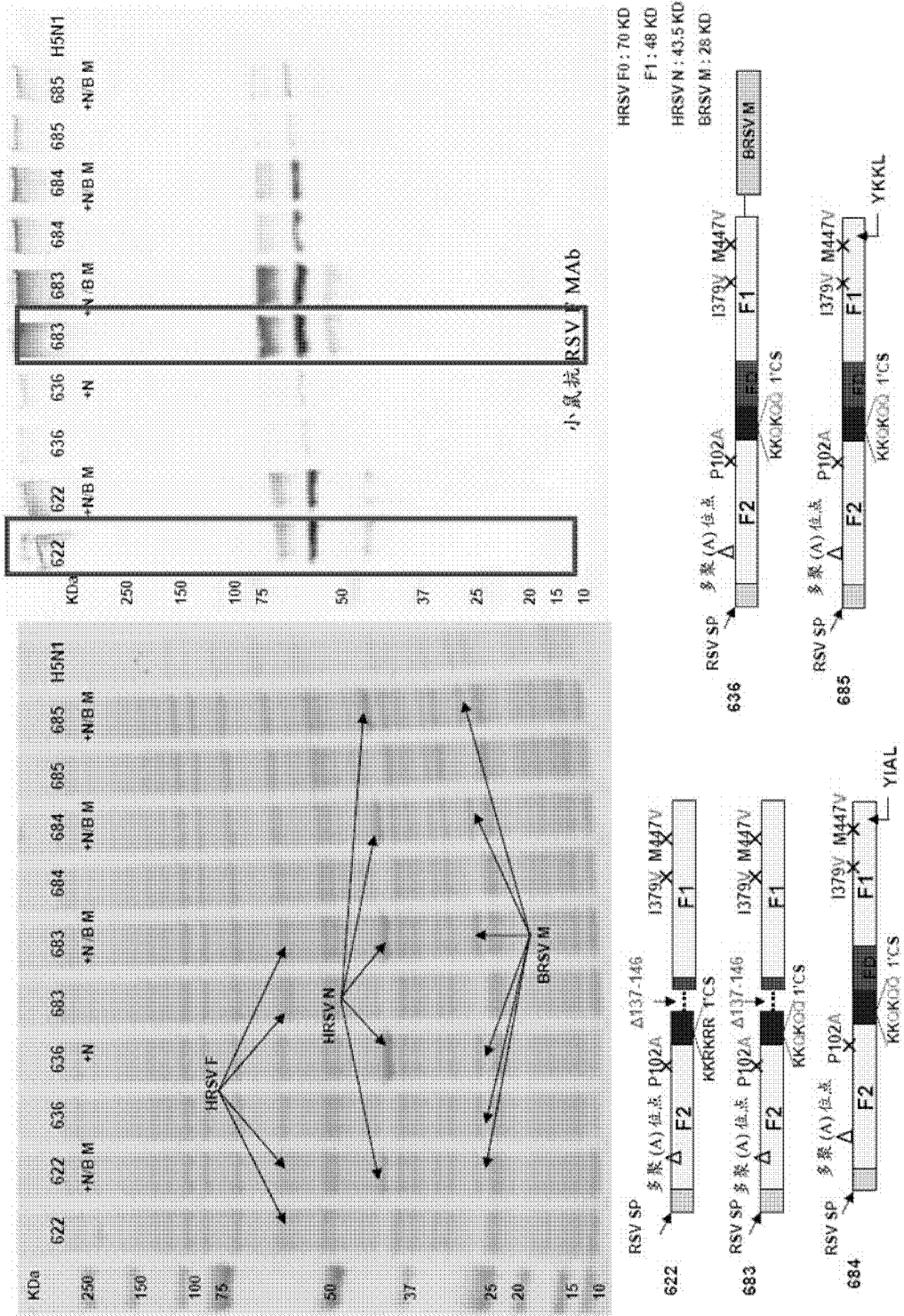


图14

30% 蔗糖 VLP HRSV 突变体，与 BRSV M 和 HRSV N 共同感染

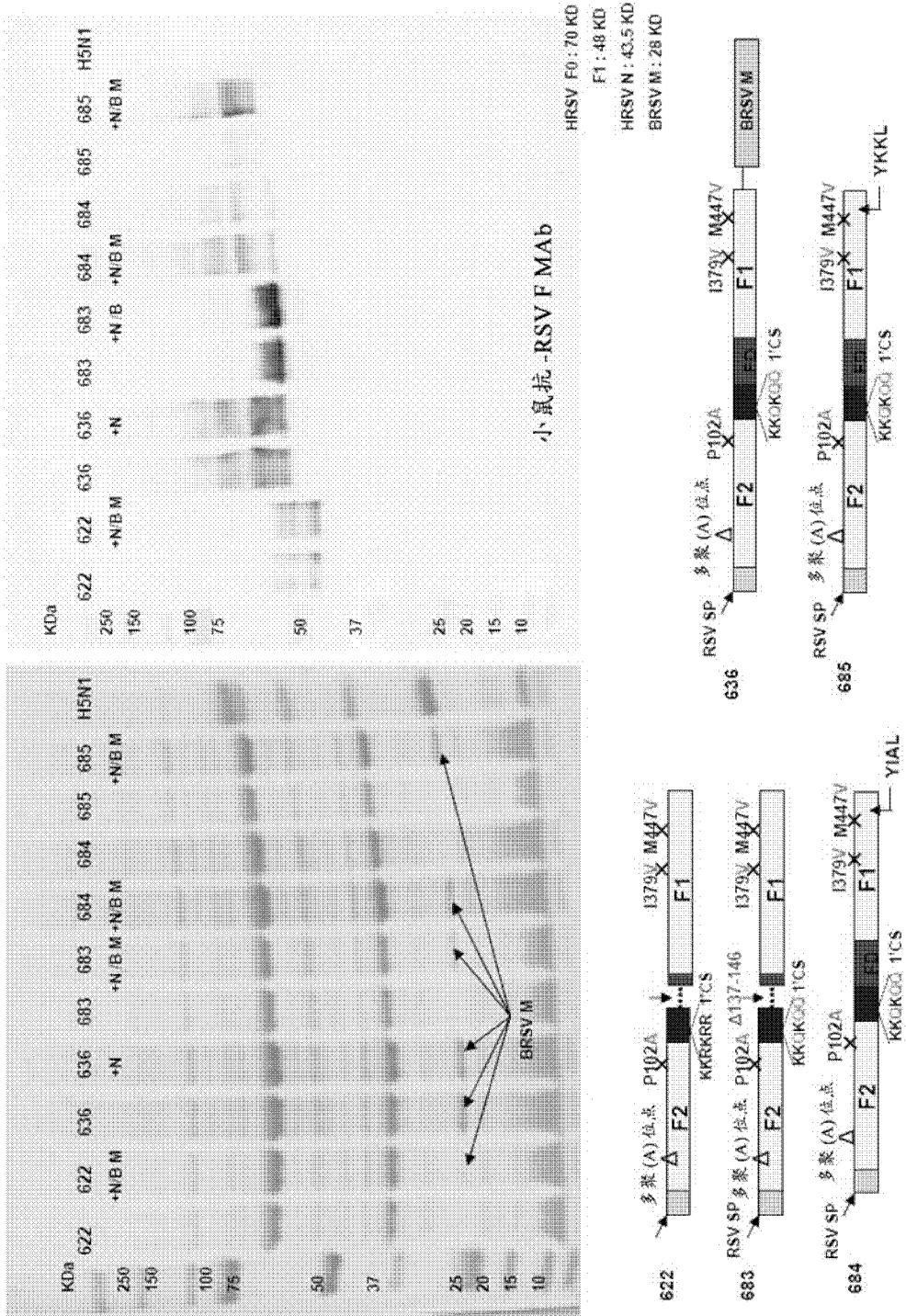


图15

克隆名	描述	WB/考马斯	结论
WT HRSV F0	Genebank	* / -	表达非常不好
F1-SP	ΔF2	++++ / +++++	表达良好但不可溶, 可能错折叠
F1 w/ Indo TMCT	ΔF2, 嵌合 F1 No SP	+++ / +++++	表达良好但不可溶, 可能错折叠
F1-SP w/ Indo TMCT	ΔF2, 嵌合 F1 w Indo TMCT	+++ / +++++	表达良好但不可溶, 可能错折叠
F1-SP w/ Indo	ΔF2, 具有 TMCT+2AA 的嵌合 F1	+++ / +++++	表达良好但不可溶, 可能错折叠
F1-SP w/ Indo	ΔF2, 具有 TMCT+16AA 的嵌合 F1	+++ / +++++	表达良好但不可溶, 可能错折叠
F0 Δ CS	用 GASGAG 取代 CS (KKRKR)	- / -	无蛋白表达
F1-SP w/	具有 NDV HA NDV TMCT 的嵌合 F1	+++ / +++++	表达良好但无法与 NDV M 良好装配
F1-SP w/NDV TMCT+16AA	具有 NDV HA TMCT+ 上游 16AA 的嵌合 F1	+++ / +++++	表达良好但无法与 NDV M 良好装配
F1-SP ΔPalm	在 F1 中缺失棕榈酰化位点, 改善 F1 的溶解性	+++ / +++++	表达良好但仍不可溶
MF1 串联	F1+ HRSV M	F1+++ / M+++ / F1, M+	F1 和 M 均在串联中表达良好, 但 VLP 产率不好, 当与 F1 共同感染时, 抑制 M 表达
GbMF1 串联	F1+ HRSV M+ Gb	F1++, M++ / F1, M+	F1 和 M 均在三重串联中比共同感染表达更好, 但 VLP 产率非常不好

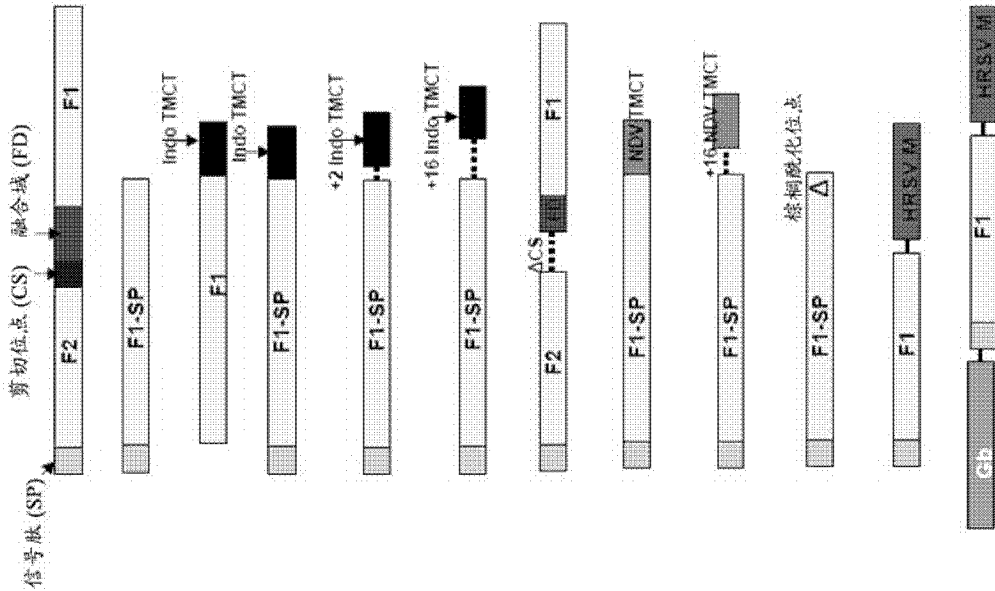


图 16a

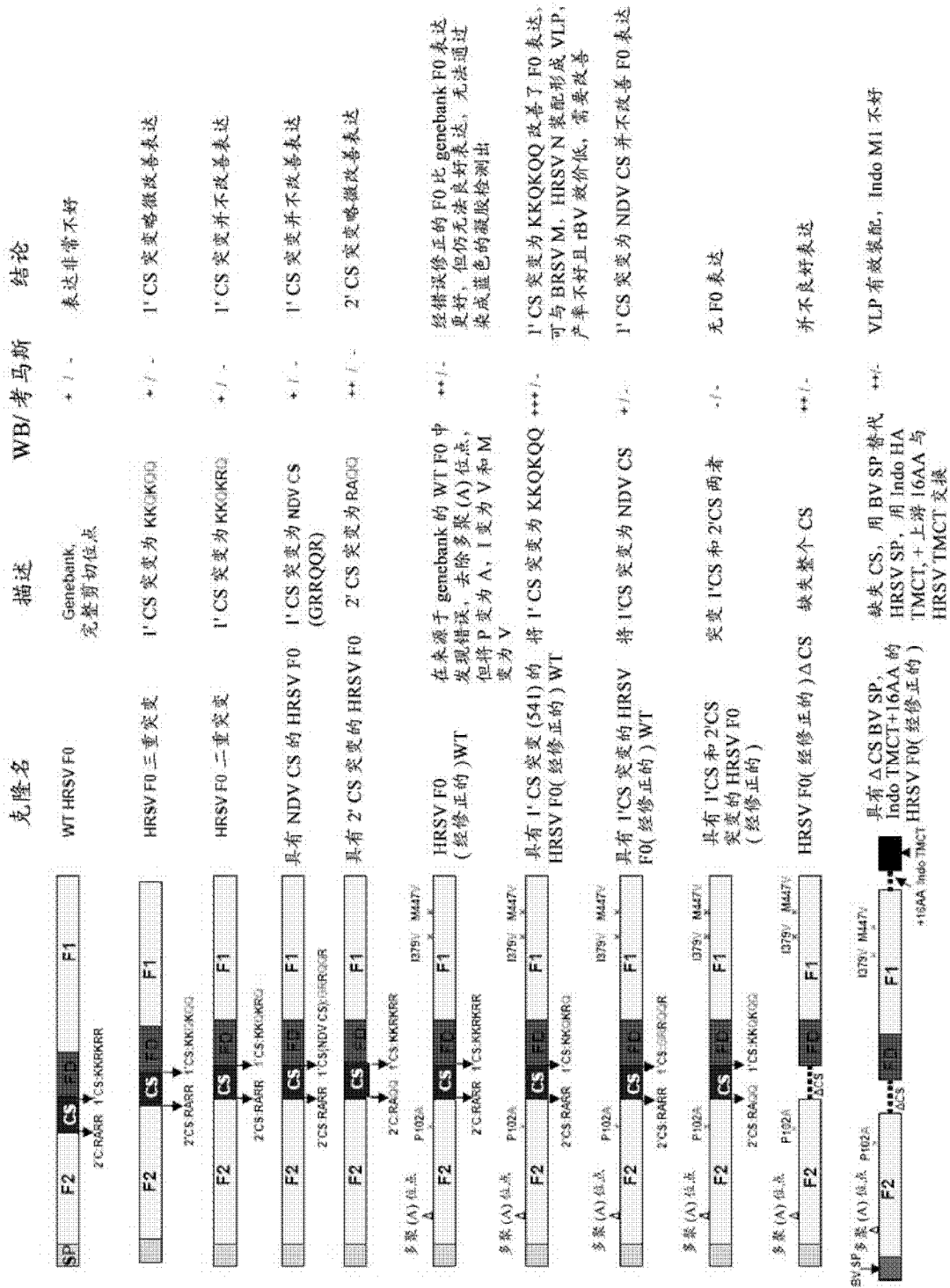


图 16b

克隆名	描述	WB/考马斯	结论
	HRSV F0(541)W/ BRSV F0 CT 由BRSV F0 CT 替换的 HRSV F0 CT	+++	胞内水平类似于 541, 但当共同感染时抑制 BRSV M. VLP 产率不如 541 好
	HRSV F0(541)+BRSV M	F+++ M+++ F, M++	胞内和 VLP 产率均比与 BRSV M 共同感染的 541 好
	HRSV F0(541)W/BRSV F0 CT+BRSV M	F+++ M+++ F, M++	胞内和 VLP 产率均比共同感染更好, 解决了 BRSV M 的抑制
	HRSV F0 FD(G139K)	++	将 G139K 点突变 (G139K) 并未改善 F0 表达 导入融合域
	HRSV F0 FD(G143K)	++	将 G143K 点突变 (G139K) 并未改善 F0 表达 导入融合域
	HRSV F0 FD(S150K)	++	将 S150K 点突变 (G139K) 并未改善 F0 表达 导入融合域
	HRSV F0 FD(S153K)	++	将 S153K 点突变 (G139K) 并未改善 F0 表达 导入融合域
	HRSV F0 FD(S146K)	++	将 S146K 点突变 (G139K) 并未改善 F0 表达 导入融合域
	HRSV F0 CS mut	+++	缺失 1'CS 中的 4AA, 将 2'CS 从 RARR 变为 RANN
	HRSV F0 CS mut (622)	++++/+++	F0 融合域部分缺失 (10AA), 完整的剪切位点
	HRSV F0 CS mut (683)	++++/++++	F0 融合域部分缺失 (10AA), 完整的剪切位点

图16c

克隆名	描述	WB/考马斯	结论
	三基因串联	F+++ F-, M+++	具有三基因的rBV-具有比双重串联和 541 好得多的效价。VLP 产率比双重串联共同感染 N 或 541 共同感染 BRSV M, N 好
	在 541 TM 中引入 YIAL L 域	+++ / -	当共同感染 BRSV M, N 时, 引入的 YIAL L 域不影响 541 的胞内表达, 不改善 VLP 的分泌
	在 541 TM 中引入 YKKL L 域	+++ / -	当共同感染 BRSV M, N 时, 引入的 YKKL L 域不影响 541 的胞内表达, 但使 VLP 的分泌增强 2~3 倍
	双基因串联	进行中	进行中
	双基因串联	进行中	进行中
	三基因串联	进行中	进行中
	具有 Indo H/A TMCT+ 上游 16AA 的嵌合 HRSV F0(683)	进行中	进行中

图 16d

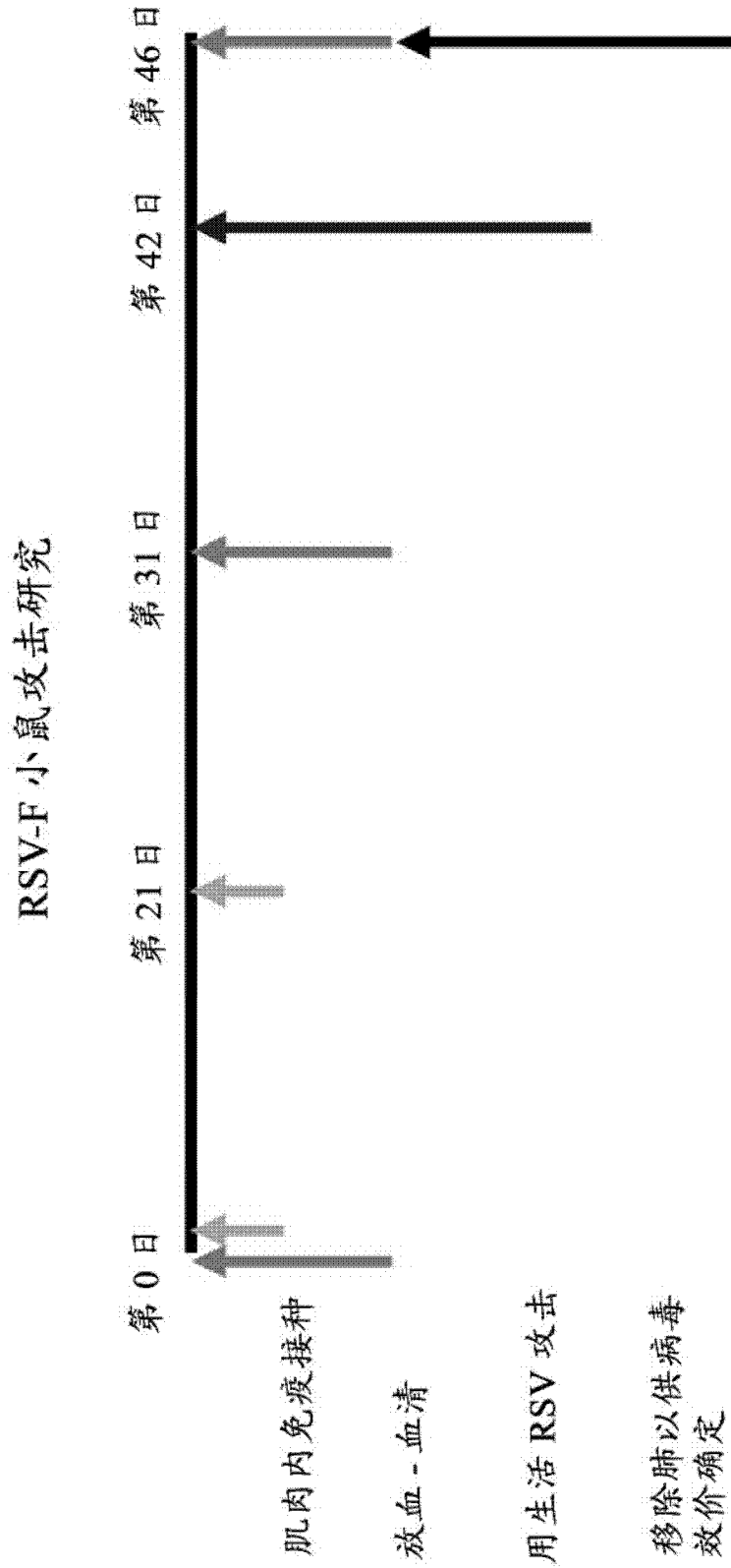


图17

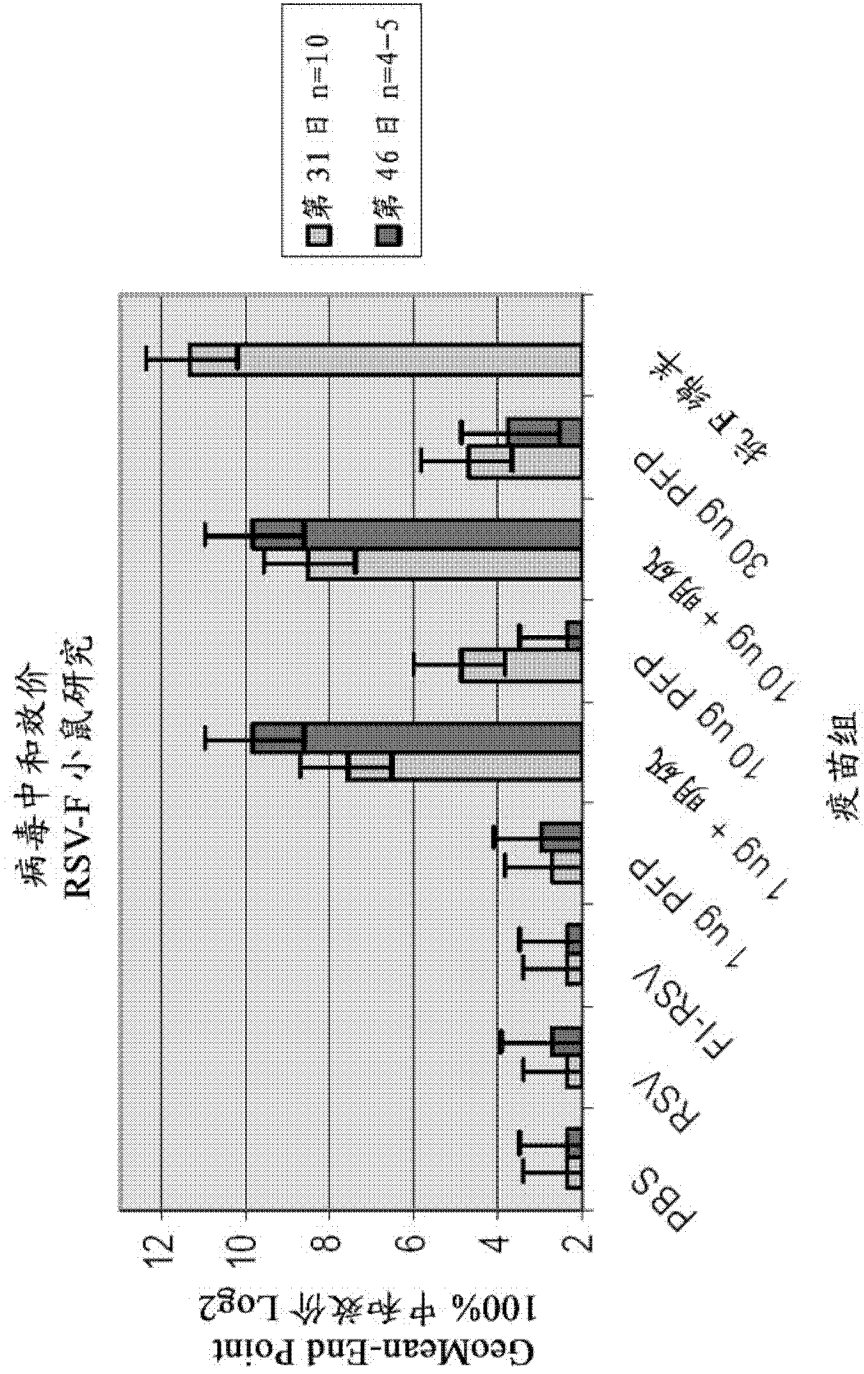


图18

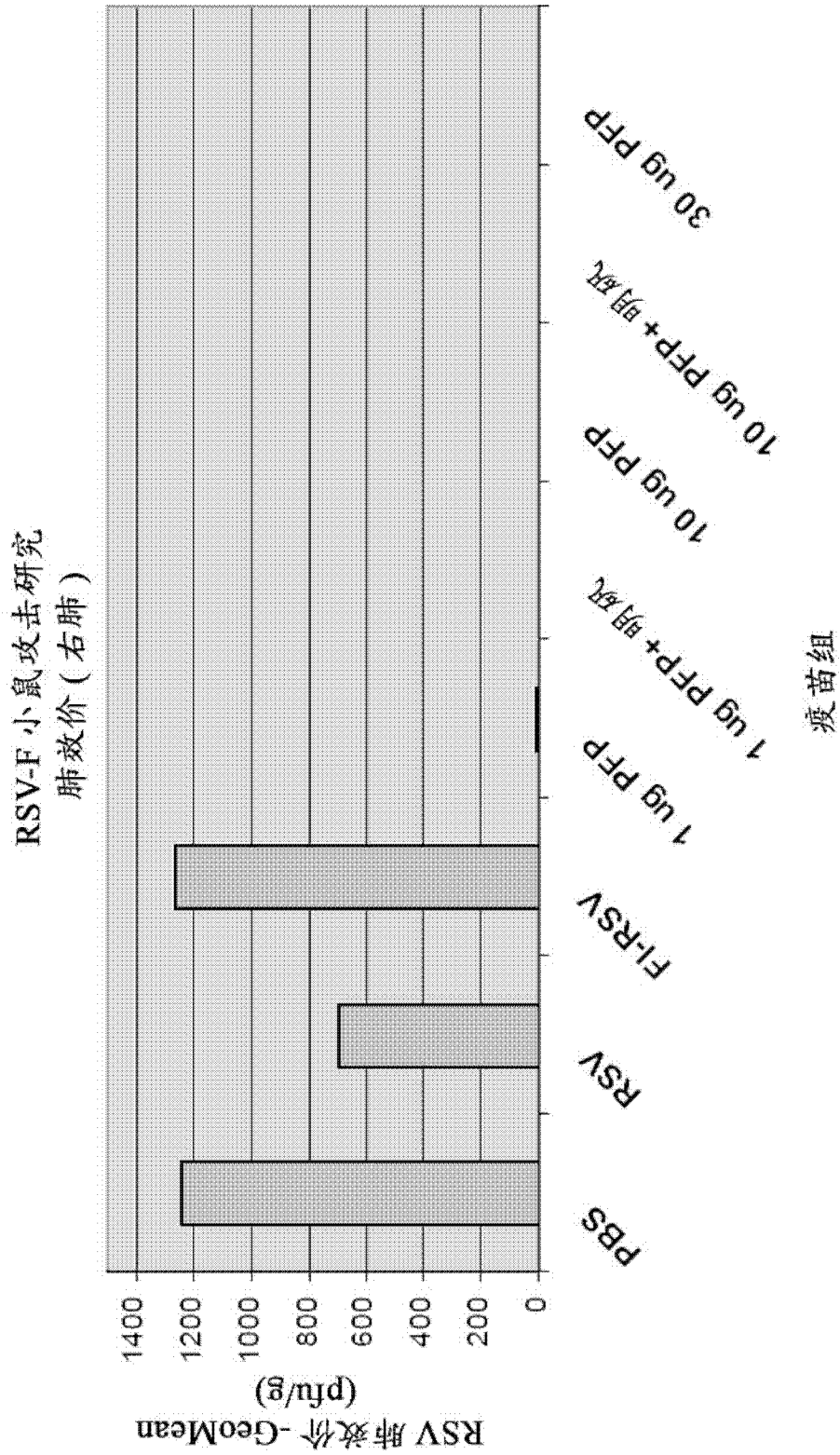


图19

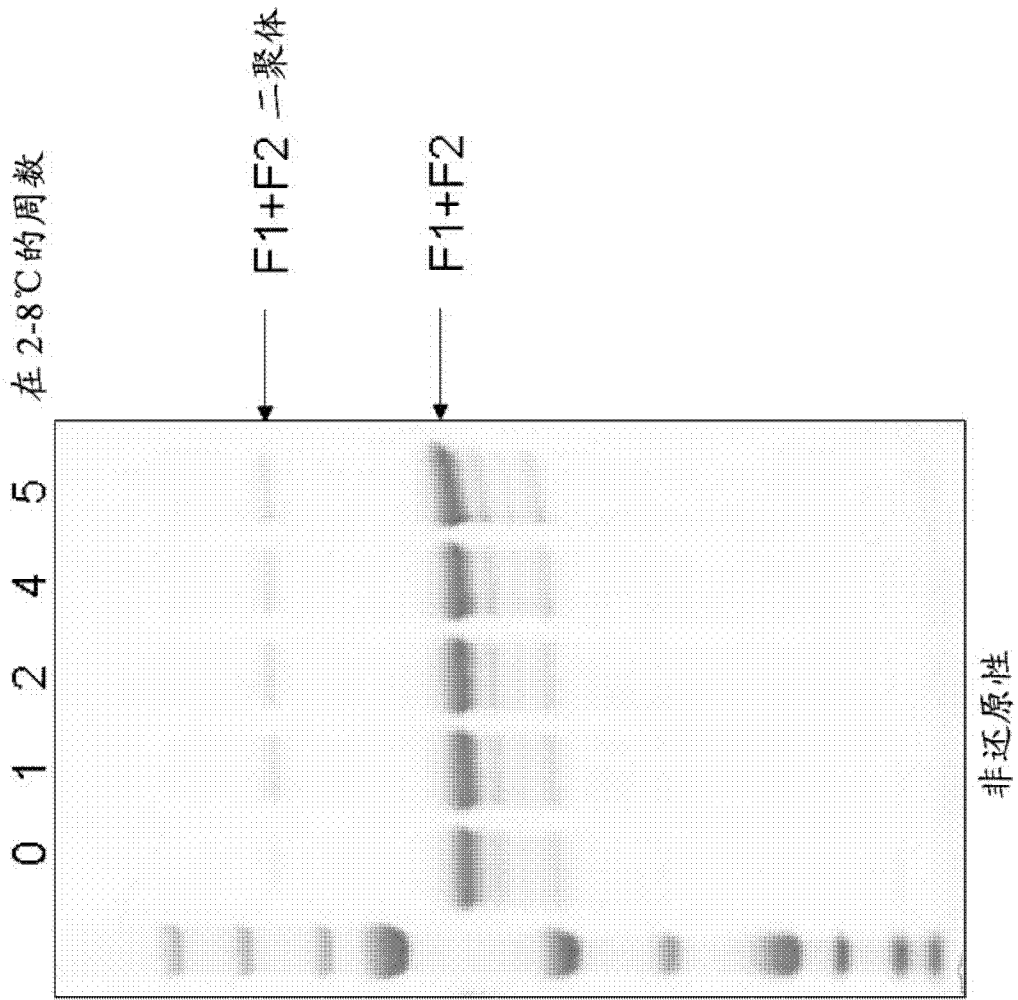


图20

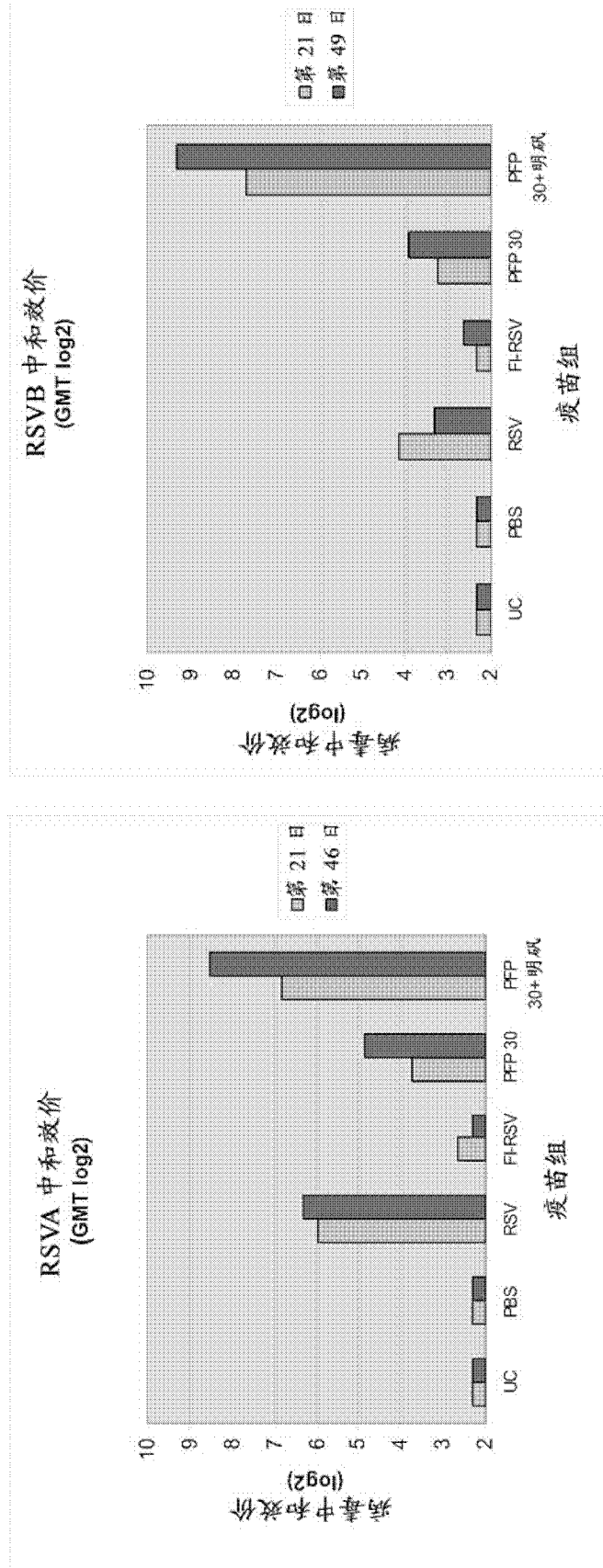


图21

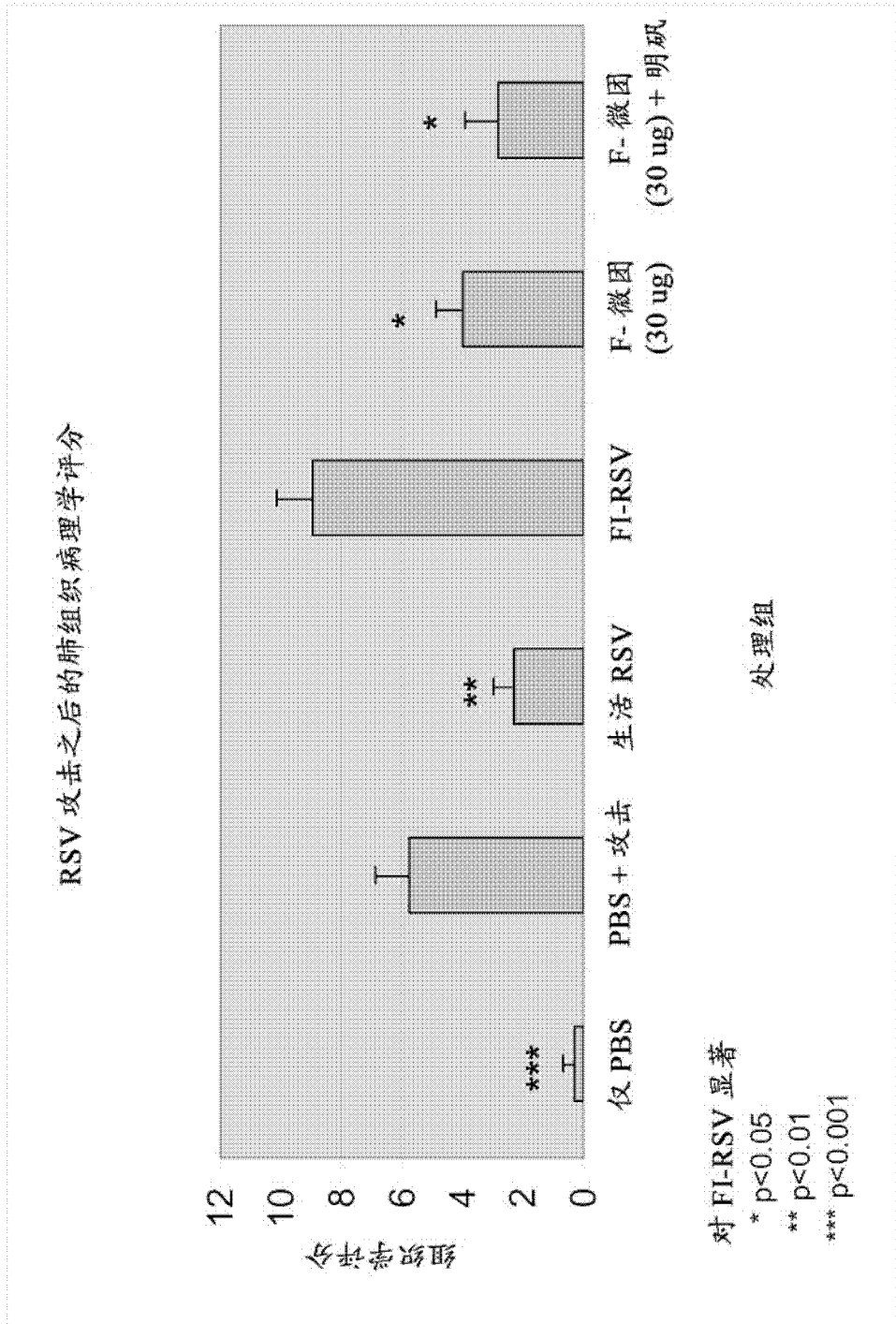


图22