



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101952321 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 19

- (21) 申请号 200880127407. 3 *A61K 39/00* (2006. 01)
- (22) 申请日 2008. 12. 23 *A61K 39/155* (2006. 01)
- (30) 优先权数据 *A61K 39/295* (2006. 01)
- 61/016, 524 2007. 12. 24 US *A61K 9/107* (2006. 01)
- 61/056, 206 2008. 05. 27 US *A61K 9/127* (2006. 01)
- (85) PCT申请进入国家阶段日 *A61P 31/14* (2006. 01)
- 2010. 08. 24 *A61P 37/04* (2006. 01)
- (86) PCT申请的申请数据 *C07K 14/135* (2006. 01)
- PCT/CA2008/002277 2008. 12. 23 *C12N 15/45* (2006. 01)
- C12N 15/62* (2006. 01)
- (87) PCT申请的公布数据
- W02009/079796 EN 2009. 07. 02

(71) 申请人 魁北克益得生物医学公司  
 地址 加拿大魁北克  
 申请人 葛兰素史密斯克莱生物公司

(72) 发明人 让-皮埃尔·鲍杜克斯  
 诺曼德·布莱斯  
 帕特里克·雷奥尔特  
 让-路易斯·鲁尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
 11105  
 代理人 岑晓东

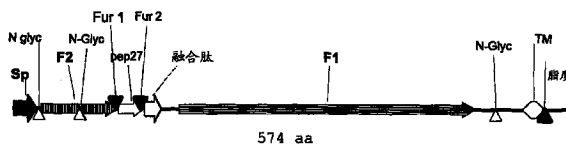
(51) Int. Cl.  
*C07K 19/00* (2006. 01)

权利要求书 5 页 说明书 37 页 序列表 16 页  
 附图 9 页

(54) 发明名称  
 重组 RSV 抗原

(57) 摘要

本公开内容提供了重组呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗原及其制备和使用方法, 包括用于治疗 和 / 或预防 RSV 感染的免疫原性组合物 (例如疫苗)。



1. 一种重组呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗原,其包含可溶性 F 蛋白多肽,该可溶性 F 蛋白多肽包含至少一处稳定所述 F 蛋白的融合前构象的修饰。

2. 一种重组呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗原,其包含可溶性 F 蛋白多肽,该 F 蛋白多肽包含至少一处选自下组的修饰:

(i) 添加包含异源三聚化域的氨基酸序列;

(ii) 删除至少一个弗林蛋白酶切割位点;

(iii) 删除至少一个非弗林蛋白酶切割位点;

(iv) 删除 pep27 域的一个或多个氨基酸;和

(v) 所述 F 蛋白胞外域的疏水域中的至少一处亲水性氨基酸替代或添加。

3. 权利要求 1 或 2 的重组 RSV 抗原,其中所述可溶性 F 蛋白多肽包含 RSV F 蛋白多肽的 F<sub>2</sub> 域和 F<sub>1</sub> 域。

4. 权利要求 1-3 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述至少一处修饰包含添加包含异源三聚化域的氨基酸序列。

5. 权利要求 4 的重组 RSV 抗原,其中所述异源三聚化域位于所述 F<sub>1</sub> 域的 C 端。

6. 权利要求 1-5 任一项的重组 RSV 抗原,其包含没有居间弗林蛋白酶切割位点的 F<sub>2</sub> 域和 F<sub>1</sub> 域。

7. 一种融合 (F) 蛋白类似物,其包含 RSV F 蛋白多肽的 F<sub>2</sub> 域和 F<sub>1</sub> 域,其中所述 F<sub>2</sub> 域与所述 F<sub>1</sub> 域之间没有弗林蛋白酶切割位点,并且其中所述多肽进一步包含位于所述 F<sub>1</sub> 域 C 端的异源三聚化域。

8. 权利要求 1-7 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 RSV 抗原装配成三聚体。

9. 权利要求 3-8 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 F<sub>2</sub> 域至少包含 RSV F 蛋白多肽中与参照 F 蛋白前体多肽 (F<sub>0</sub>)SEQ ID NO:2 的氨基酸 26-105 对应的一部分。

10. 权利要求 3-9 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 F<sub>1</sub> 域至少包含 RSV F 蛋白多肽中与参照 F 蛋白前体多肽 (F<sub>0</sub>)SEQ ID NO:2 的氨基酸 137-516 对应的一部分。

11. 权利要求 3-10 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 F<sub>2</sub> 域包含与参照 F 蛋白前体多肽 (F<sub>0</sub>)SEQ ID NO:2 的氨基酸 26-105 对应的 RSV F 蛋白多肽和 / 或其中所述 F<sub>1</sub> 域包含与参照 F 蛋白前体多肽 (F<sub>0</sub>)SEQ ID NO:2 的氨基酸 137-516 对应的 RSV F 蛋白多肽。

12. 权利要求 9-11 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 RSV 抗原选自下组:

a) 包含 SEQ ID NO:6 的多肽;

b) 在严格条件下在基本上其整个长度里与 SEQ ID NO:6 杂交的多肽,所述多肽包含与天然存在的 RSV 株对应的氨基酸序列;

c) 与 SEQ ID NO:6 具有至少 95% 序列同一性的多肽,所述多肽包含不与天然存在的 RSV 株对应的氨基酸序列。

13. 权利要求 1-12 任一项的重组 RSV 抗原,其进一步包含信号肽。

14. 权利要求 1-13 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 F<sub>2</sub> 域包含 RSV F 蛋白多肽的氨基酸 1-105。

15. 权利要求 3-14 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 F<sub>2</sub> 域和所述 F<sub>1</sub> 域在没有居间 pep27 域的情况中定位。

16. 权利要求 4-15 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述异源三聚化域包含卷曲螺旋域。

17. 权利要求 16 的重组 RSV 抗原,其中所述多聚化域包含异亮氨酸拉链。
18. 权利要求 17 的重组 RSV 抗原,其中所述异亮氨酸拉链域包含氨基酸序列 SEQ ID NO:11。
19. 权利要求 1-18 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 RSV 抗原包含所述 F 蛋白胞外域的疏水域中的至少一处亲水性氨基酸替代或添加。
20. 权利要求 19 的重组 RSV 抗原,其中所述疏水域是所述 F 蛋白胞外域的 HRB 卷曲螺旋域。
21. 权利要求 20 的重组 RSV 抗原,其中所述 HRB 卷曲螺旋域在与参照 F 蛋白前体 (F<sub>0</sub>) SEQ ID NO:2 的氨基酸 512 对应的位置处包含用带电荷的残基替换中性残基的替代。
22. 权利要求 21 的 RSV 抗原,其中所述 HRB 卷曲螺旋域在与参照 F 蛋白前体 (F<sub>0</sub>) SEQ ID NO:2 的氨基酸 512 对应的位置处包含用赖氨酸对亮氨酸的替代。
23. 权利要求 19 的重组 RSV 抗原,其中所述疏水域是所述 F 蛋白胞外域的 HRA 域。
24. 权利要求 23 的重组 RSV 抗原,其中所述 HRA 域包含在与参照 F 蛋白前体 (F<sub>0</sub>) SEQ ID NO:2 的氨基酸 105 对应的位置后添加带电荷的残基。
25. 权利要求 24 的重组 RSV 抗原,其中所述 HRA 域包含在与参照 F 蛋白前体 (F<sub>0</sub>) SEQ ID NO:2 的氨基酸 105 对应的位置后添加赖氨酸。
26. 权利要求 19-25 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 RSV 抗原包含所述 F 蛋白胞外域的 HRA 域中的至少第一处亲水性氨基酸替代或添加和 HRB 域中的至少第二处亲水性氨基酸替代或添加。
27. 权利要求 1-26 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 RSV 抗原包含至少一处消除天然存在的 F 蛋白前体 (F<sub>0</sub>) 中存在的弗林蛋白酶切割位点的氨基酸添加、删除或替代。
28. 权利要求 27 的重组 RSV 抗原,其中所述 RSV 抗原在与所述参照 F 蛋白前体 (F<sub>0</sub>) SEQ ID NO:2 的氨基酸 105-109 对应的位置、与氨基酸 133-136 对应的位置、或与氨基酸 105-109 和 133-136 对应的两个位置处包含消除弗林蛋白酶切割位点的氨基酸添加、删除或替代。
29. 权利要求 1-28 任一项的重组 RSV 抗原,其进一步包含 G 蛋白多肽,该 G 蛋白多肽包含 RSV G 蛋白多肽的氨基酸位置 149 至 229。
30. 权利要求 29 的重组 RSV 抗原,其中所述 RSV 抗原选自下组:
  - a) 包含 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:10 的多肽;
  - b) 在严格条件下在基本上其整个长度里与 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:10 中至少一项杂交的多肽,所述多肽包含与天然存在的 RSV 株对应的氨基酸序列;
  - c) 与 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:10 中至少一项具有至少 95% 序列同一性的多肽,所述多肽包含不与天然存在的 RSV 株对应的氨基酸序列。
31. 权利要求 29 或 30 的重组 RSV 抗原,其中所述 G 蛋白多肽包含与参照 G 蛋白序列 SEQ ID NO:4 的氨基酸位置 149 至 229 对应的氨基酸序列。
32. 权利要求 31 的重组 RSV 抗原,其中所述 G 蛋白多肽包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸 149-229。
33. 权利要求 29 或 30 的重组 RSV 抗原,其中所述 G 蛋白多肽包含相对于天然存在的 RSV 多肽的至少一处氨基酸替代,所述氨基酸替代与减轻或预防疫苗增强性病毒疾病有关。

34. 权利要求 33 的重组 RSV 抗原,其中所述增强性病毒疾病在没有佐剂的情况中对受试者施用所述 RSV 抗原时得到减轻或预防。

35. 权利要求 33 的重组 RSV 抗原,其中所述疫苗增强性病毒疾病在对人受试者施用所述 RSV 抗原时得到减轻或预防。

36. 权利要求 33 的重组 RSV 抗原,其中所述 G 蛋白多肽包含 G 蛋白的第 191 位用丙氨酸对天冬酰胺的替代 (N191A)。

37. 权利要求 1-36 任一项的重组 RSV 抗原,其进一步包含接头。

38. 权利要求 37 的重组 RSV 抗原,其中所述接头包含氨基酸序列 GG。

39. 权利要求 38 的重组 RSV 抗原,其中所述接头包含氨基酸序列 GGS GGS GGS。

40. 权利要求 39 的重组 RSV 抗原,其中所述接头选自下组氨基酸序列:GG 和 GGS GGS GGS。

41. 权利要求 1-40 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 F 蛋白多肽在序列上与 RSV A Long 株对应。

42. 权利要求 1-41 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 F 蛋白多肽进一步包含多组氨酸标签。

43. 权利要求 1-42 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 RSV 抗原包含多肽的多聚体。

44. 权利要求 1-43 任一项的重组 RSV 抗原,其中所述 RSV 抗原包含多肽的三聚体。

45. 一种免疫原性组合物,其包含权利要求 1-44 任一项的重组 RSV 抗原和药学可接受载体或赋形剂。

46. 权利要求 45 的免疫原性组合物,其中所述载体或赋形剂包含缓冲剂。

47. 权利要求 45 或 46 的免疫原性组合物,其进一步包含佐剂。

48. 权利要求 47 的免疫原性组合物,其中所述佐剂引发 Th1 偏爱性免疫应答。

49. 权利要求 48 的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含 3D-MPL、QS21、水包油乳剂、和明矾中至少一项。

50. 权利要求 49 的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含水包油乳剂。

51. 权利要求 49 或 50 的免疫原性组合物,其中所述水包油乳剂包含母育酚。

52. 权利要求 49-51 任一项的免疫原性组合物,其进一步包含 3D-MPL。

53. 权利要求 49 的免疫原性组合物,其中所述佐剂包含 3D-MPL。

54. 权利要求 53 的免疫原性组合物,其进一步包含明矾。

55. 权利要求 53 的免疫原性组合物,其进一步包含 QS21。

56. 权利要求 55 的免疫原性组合物,其中所述 3D-MPL 和 QS21 在脂质体制剂中。

57. 权利要求 47 或 48 的免疫原性组合物,其中所述佐剂适合于对新生儿施用。

58. 权利要求 45-57 任一项的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物减轻或预防感染呼吸道合胞病毒 (RSV)。

59. 权利要求 45-58 任一项的免疫原性组合物,其中所述免疫原性组合物减轻或预防 RSV 感染后的病理学应答。

60. 权利要求 45-59 任一项的免疫原性组合物,其中在所述免疫原性组合物包含权利要求 1-28 任一项的重组 RSV 抗原时,所述免疫原性组合物进一步包含 G 蛋白多肽,该 G 蛋白多肽包含与 RSV G 蛋白多肽的氨基酸位置 149 至 229 对应的氨基酸序列。

61. 权利要求 60 的免疫原性组合物,其中所述 G 蛋白多肽包含与 RSV G 蛋白多肽的氨基酸位置 128-229 对应的氨基酸序列。

62. 权利要求 60 或 61 的免疫原性组合物,其中所述 G 蛋白多肽包含与参照 G 蛋白序列 SEQ ID NO :4 的氨基酸位置 149 至 229 对应的氨基酸序列。

63. 权利要求 62 的免疫原性组合物,其中所述 G 蛋白多肽包含 SEQ ID NO :4 的氨基酸 149-229。

64. 权利要求 60 或 61 的免疫原性组合物,其中所述 G 蛋白多肽包含相对于天然存在的 RSV 多肽的至少一处氨基酸替代,所述氨基酸替代与减轻或预防疫苗增强性病毒疾病有关。

65. 权利要求 60 或 64 的免疫原性组合物,其中所述 G 蛋白多肽包含全长 G 蛋白多肽或至少包含 G 蛋白多肽的一部分的融合蛋白。

66. 权利要求 45-65 任一项的免疫原性组合物,其进一步包含与 RSV 不同的病原性生物体的至少一种别的抗原。

67. 权利要求 66 的免疫原性组合物,其中所述至少一种别的抗原是与 RSV 不同的病毒的。

68. 权利要求 67 的免疫原性组合物,其中所述病毒选自:乙肝病毒(HBV)、副流感病毒(PIV)、脊髓灰质炎病毒和流感病毒。

69. 权利要求 66 的免疫原性组合物,其中所述至少一种别的抗原选自:白喉、破伤风、百日咳、流感嗜血菌、和肺炎球菌。

70. 一种重组核酸,其包含编码权利要求 1-44 任一项的重组 RSV 抗原的多核苷酸序列。

71. 权利要求 70 的重组核酸,其中对所述编码 RSV 抗原的多核苷酸序列进行密码子优化以在选定的宿主细胞中表达。

72. 一种载体,其包含权利要求 70 或 71 的重组核酸。

73. 权利要求 72 的载体,其中所述载体包括原核或真核表达载体。

74. 一种宿主细胞,其包含权利要求 70 或 71 的核酸或权利要求 72 或 73 的载体。

75. 权利要求 74 的宿主细胞,其中所述宿主细胞选自下组:细菌细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。

76. 一种免疫原性组合物,其包含权利要求 70 或 71 的核酸和药学可接受载体或赋形剂。

77. 权利要求 1-44 任一项的 RSV 抗原或权利要求 70 或 71 的核酸在制备用于治疗 RSV 感染的药物中的用途。

78. 权利要求 76 的 RSV 抗原或核酸的用途,其中为了预防性处理 RSV 感染的目的而施用所述药物。

79. 一种用于引发针对呼吸道合胞病毒(RSV)的免疫应答的方法,该方法包括:对受试者施用包含权利要求 1-44 任一项的重组 RSV 抗原的组合物或权利要求 45-69 任一项的免疫原性组合物。

80. 权利要求 79 的方法,其中施用所述包含 RSV 抗原的组合物引发对 RSV 特异性的免疫应答,而不在与 RSV 接触后增强病毒疾病。

81. 权利要求 79 或 80 的方法,其中所述免疫应答包含 Th1 偏爱性免疫应答。

82. 权利要求 79-81 任一项的方法,其中所述免疫应答包含减轻或预防感染 RSV 和 / 或

减轻或预防 RSV 感染后的病理学应答的保护性免疫应答。

83. 权利要求 79-82 任一项的方法,其中所述受试者是人受试者。

84. 权利要求 79-83 任一项的方法,包括施用所述包含 RSV 抗原的组合物包括经由鼻内路径的施用。

85. 权利要求 79-83 任一项的方法,包括施用所述包含 RSV 抗原的组合物包括经由肌内路径的施用。

86. 权利要求 1-44 任一项的重组 RSV 抗原或权利要求 45-69 任一项的免疫原性组合物,其用于在药物中使用。

87. 权利要求 1-44 任一项的重组 RSV 抗原或权利要求 45-69 任一项的免疫原性组合物,其用于预防或治疗 RSV 相关疾病。

## 重组 RSV 抗原

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 12 月 24 日提交的美国临时申请号 61/016, 524 和 2008 年 5 月 27 日提交的美国临时申请号 61/056, 206 的较早提交日期的权益, 通过提及而将其公开内容收入本文。

[0003] 按照 37C. F. R. § 1. 71 (E) 的版权通知

[0004] 本专利文件的公开内容的一部分含有受到版权保护的材料。版权拥有人不反对任何人拓制专利文件或专利公开内容, 就像其出现在专利商标局专利文件或记录中的那样, 但是在其它情况中保留无论什么的所有版权权利。

[0005] 发明背景

[0006] 本公开内容关注免疫学领域。更具体而言, 本公开内容涉及用于引发对呼吸道合胞病毒 (RSV) 特异性的免疫应答的组合物和方法。

[0007] 人呼吸道合胞病毒 (RSV) 是小于 6 个月龄的婴儿和怀孕期小于或等于 35 周的早产儿中下呼吸道感染 (LRI) 的最常见的全球性原因。RSV 疾病谱包括从鼻炎 (rhinitis) 和耳炎 (otitis) 至肺炎 (pneumonia) 和细支气管炎 (bronchiolitis) 的一大批呼吸症状, 后两种疾病与相当高的发病率和死亡率有关。人是 RSV 唯一已知的贮主。自受污染的鼻分泌物扩散病毒经由大的呼吸飞沫发生, 因此传播需要与受感染个体或受污染表面紧密接触。RSV 能在玩具或其它物体上持续数小时, 这解释了医院 RSV 感染的高比率, 特别是在儿科病房中。

[0008] 估计全球每年的 RSV 感染和死亡数字分别是 6400 万和 16 万。仅在美国, 估计 RSV 每年造成 18, 000 至 75, 000 例住院和 90 至 1900 例死亡。在温带气候, RSV 被较好地证明为急性 LRI (包括细支气管炎和肺炎) 的每年冬季流行病的一个原因。在美国, 几乎所有儿童到两岁时都感染过 RSV。RSV 相关 LRI 在其它方面健康的儿童中的发生率计算为生命前两年中 37/1000 名儿童 - 年 (小于 6 个月龄的婴儿中 45/1000 名儿童 - 年), 而住院风险为 6/1000 名儿童 - 年 (生命前 6 个月中每 1000 名儿童 - 年)。发生率在患有心肺疾病的儿童和早产儿中较高, 在美国这些儿童构成几乎半数的 RSV 相关医院收治。经受由 RSV 引起的更严重的 LRI 的儿童以后具有升高的儿童哮喘发生率。这些研究表明患有严重 LRI 及其后遗症的患者的护理花费巨大的工业化国家普遍需要 RSV 疫苗及其使用。RSV 还日益被公认为老年人中流感样病的发病率的一个重要原因。

[0009] 已经尝试了多种办法来努力产生安全且有效的 RSV 疫苗, 其在健康的和有风险的群体中产生持久的且保护性的免疫应答。然而, 迄今所评估的候选物无一证明作为疫苗用于预防 RSV 感染和 / 或减轻或预防 RSV 疾病 (包括下呼吸道感染 (LRI)) 是安全且有效的。

[0010] 发明概述

[0011] 本公开内容关注重组呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗原。更具体而言, 本公开内容关注包含已经进行过修饰以稳定三聚体融合前构象的重组 F 蛋白的抗原。所公开的重组抗原展现出卓越的免疫原性, 而且作为针对 RSV 感染和 / 或疾病提供保护的免疫原性组合物 (例如疫苗) 的成分而被采用是特别有利的。还公开了编码重组抗原的核酸、含有所述抗原的

免疫原性组合物、及用于生成和使用所述抗原的方法。

[0012] 附图简述

[0013] 图 1A 是突出显示 RSV F 蛋白的结构特征的示意图。图 1B 是例示性 RSV 融合前 F (PreF) 抗原的示意图。

[0014] 图 2 是一幅线图,其显示了对 PreF 的不对称场流分级 (asymmetrical fieldflow fractionation, AFF-MALS) 分析的代表性结果。

[0015] 图 3 是一幅柱形图,其显示了 PreF 抗原对人血清的中和抑制。

[0016] 图 4A 和图 4B 是柱形图,其显示了小鼠中响应 PreF 抗原而引发的血清 IgG 滴度。

[0017] 图 5A 和图 5B 是柱形图,其显示了由 PreF 抗原引发的对 RSV 特异性的中和性抗体的滴度。

[0018] 图 6A 和图 6B 是显示在小鼠中由 RSV PreF 抗原提供的针对攻击的保护的图。

[0019] 图 7 是免疫和攻击后评估 BAL 白细胞的图。

[0020] 发明详述

[0021] 导言

[0022] 由于宿主免疫应答表现出在疾病的发病机制中起作用的实情而使开发疫苗来预防 RSV 感染变得复杂。二十世纪 60 年代的早期研究显示,与未接种疫苗的对照受试者相比,接种用福尔马林灭活的 RSV 疫苗的儿童在随后暴露于病毒后遭受更严重的疾病。这些早期试验导致 80% 的接种疫苗者住院和 2 例死亡。增强的疾病严重性已经在动物模型中得到再现,而且认为其源自血清中和性抗体的水平不足、缺乏局部免疫、和 2 型辅助 T 细胞样 (Th2) 免疫应答的诱导过量,其伴有肺嗜酸粒细胞增多及 IL-4 和 IL-5 细胞因子的生成增加。比较而言,针对 RSV 感染提供保护的成功疫苗诱导 Th1 偏爱性免疫应答,其特点在于 IL-2 和  $\gamma$ -干扰素 (IFN) 的生成。

[0023] 本公开内容关注重组呼吸道合胞病毒 (RSV) 抗原,其解决先前在疫苗中使用 RSV 抗原遇到的问题,而且改善抗原的免疫学特性以及制备特性。本文所公开的重组 RSV 抗原牵涉一种融合 (F) 蛋白类似物,其包含可溶性 F 蛋白多肽,该可溶性 F 蛋白多肽已经进行过修饰以稳定 F 蛋白的融合前构象,即成熟的装配好的 F 蛋白在与宿主细胞膜融合前的构象。为了清晰和简单,这些 F 蛋白类似物称作“PreF”或“PreF 抗原”。本文所公开的 PreF 抗原以如下未预见到的发现为基础,即已经通过掺入异源三聚化域来修饰的可溶性 F 蛋白类似物展现出改良的免疫原性特征,而且在受试者体内施用是安全且高度保护性的。

[0024] 本文参照本领域中广泛接受的术语和名称来提供 RSV F 蛋白结构的详情,并在图 1A 中示意性显示。图 1B 中提供了例示性 PreF 抗原的示意图。本领域技术人员会了解,依照本文所提供的教导,可以修饰任何 RSV F 蛋白来稳定融合前构象。因此,为了便于理解指导 PreF 抗原生成的原则,各个结构构件会参照例示性 F 蛋白来指明,所述例示性 F 蛋白的多核苷酸和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO :1 和 2 中提供。类似地,在可适用的情况中,G 蛋白抗原参照例示性 G 蛋白来描述,所述例示性 G 蛋白的多核苷酸和氨基酸序列分别在 SEQ ID NO :3 和 4 中提供。

[0025] 参照 F 蛋白多肽的一级氨基酸序列 (图 1A),利用下列术语来描述 PreF 抗原的结构特征。

[0026] 术语 F0 指全长翻译的 F 蛋白前体。F0 多肽可以细分成由称作 pep27 的居间肽分



开的 F2 域和 F1 域。成熟过程中, F0 多肽在位于 F2 和 F1 之间且在 pep27 侧翼的两个弗林蛋白酶位点处经历蛋白水解切割。为了随后的讨论, F2 域包含 F 蛋白氨基酸 1-109 的至少一部分, 并且多达所有, 而 F1 域的可溶性部分包含 F 蛋白氨基酸 137-526 的至少一部分, 并且多达所有。如上文所指明的, 这些氨基酸位置 (和本文指明的所有随后的氨基酸位置) 参照例示性 F 蛋白前体多肽 (F0) SEQ ID NO :2 给出。

[0027] 融合前 F (或“PreF”) 抗原是一种可溶性 (即不是膜结合的) F 蛋白类似物, 其包含至少一处稳定 F 蛋白的融合前构象的修饰, 从而 RSV 抗原保留 F 蛋白的融合前构象的至少一个免疫优势表位。可溶性 F 蛋白多肽包含 RSV F 蛋白的 F2 域和 F1 域 (但是不包含 RSV F 蛋白的跨膜域)。在例示性的实施方案中, F2 域包含 F 蛋白的氨基酸 26-105, 而 F1 域包含 F 蛋白的氨基酸 137-516。然而, 也可以使用更小的部分, 只要稳定化的 PreF 抗原的三维构象得到维持。类似地, 也可以使用包含额外结构构件的多肽 (例如融合多肽) 来替换例示性 F2 和 F1 域, 只要所述额外构件不破坏三维构象, 或者在其它方面不会不利地影响稳定性、生成或加工, 或者降低抗原的免疫原性。F2 和 F1 域以 N 端至 C 端取向定位, 设计成复制 F 蛋白类似物折叠和装配成成熟的融合前构象。为了增强生成, F2 域之前可以有分泌信号肽, 诸如天然 F 蛋白信号肽或异源信号肽, 其选择用于在要表达重组 PreF 抗原的宿主细胞中增强生成和分泌。

[0028] 通过引入一处或多处修饰, 诸如一个或多个氨基酸的添加、删除或替代来稳定 PreF 抗原 (处于三聚体融合前构象)。一种此类稳定化修饰是添加包含异源稳定化域的氨基酸序列。在例示性的实施方案中, 所述异源稳定化域是蛋白质多聚化域。此类蛋白质多聚化域的一个特别有利的例子是卷曲螺旋域, 诸如异亮氨酸拉链域, 其促进多个具有此类域的多肽的三聚化。SEQ ID NO :11 中描述了一种例示性异亮氨酸拉链域。典型地, 所述异源稳定化域定位于 F1 域的 C 端。

[0029] 任选地, 经由短的氨基酸接头序列 (诸如序列 GG) 将多聚化域连接至 F1 域。所述接头也可以是更长的接头 (例如包括序列 GG, 诸如氨基酸序列 :GGSGGSGGS ; SEQ ID NO : 14)。许多构象中性接头是本领域中已知的, 其可以在这种背景中使用而不破坏 PreF 抗原的构象。

[0030] 另一种稳定化修饰是消除弗林蛋白酶识别和切割位点, 其位于天然 F0 蛋白中 F2 和 F1 域之间。可以通过删除或替代弗林蛋白酶识别位点的一个或多个氨基酸来消除一个或两个弗林蛋白酶识别位点 (位于第 105 位 - 第 109 位和第 133 位 - 第 136 位), 从而该蛋白酶不能将 PreF 多肽切割成其构成域。任选地, 也可以除去或用例如接头肽替代居间 pep27 肽。另外, 或任选地, 可以除去或替代接近融合肽的非弗林蛋白酶切割位点 (例如第 112 位 - 第 113 位的金属蛋白酶位点)。

[0031] 稳定化突变的另一个例子是将亲水性氨基酸添加或替代入 F 蛋白的疏水域中。典型地, 会在疏水区中添加带电荷的氨基酸诸如赖氨酸或者用其替代中性残基诸如亮氨酸。例如, 可以将 / 用亲水性氨基酸添加至或替代 F 蛋白胞外域的 HRB 卷曲螺旋域内的疏水性或中性氨基酸。举例而言, 可以用带电荷的氨基酸残基诸如赖氨酸替代 F 蛋白的第 512 位处存在的亮氨酸。或者 / 另外, 可以将 / 用亲水性氨基酸添加至或替代 F 蛋白的 HRA 域内的疏水性或中性氨基酸。例如, 可以在 PreF 抗原的第 105 位 - 第 106 位处或者接近第 105 位 - 第 106 位处 (例如在与参照 SEQ ID NO :2 的残基 105 对应的氨基酸后, 诸如在氨基酸

105 和 106 之间) 插入一个或多个带电荷的氨基酸诸如赖氨酸。任选地, 可以在 HRA 和 HRB 域两者中添加亲水性氨基酸或者用亲水性氨基酸替代。或者, 可以删除一个或多个疏水性残基, 只要 PreF 抗原的总体构象没有受到不利影响。

[0032] 可以个别地和 / 或与本文所公开的任何其它稳定化修饰组合地使用任何和 / 或所有稳定化修饰来生成 PreF 抗原。在例示性的实施方案中, PreF 蛋白包含如下多肽, 其包含 F2 域和 F1 域, F2 域与 F1 域之间没有居间弗林蛋白酶切割位点, 并且有位于 F1 域 C 端的异源稳定化域 (例如三聚化域)。在某些实施方案中, PreF 抗原还包括一处或多处将 / 用亲水性残基添加和 / 或替代入疏水性 HRA 和 / 或 HRB 域中。任选地, PreF 抗原具有至少一个非弗林蛋白酶切割位点 (诸如金属蛋白酶位点) 的修饰。

[0033] 任选地, PreF 抗原可以包括额外的多肽构件, 其至少包含 RSV G 蛋白的免疫原性部分。也就是说, 在某些实施方案中, PreF 抗原是包含 F 蛋白和 G 蛋白构件两者的嵌合蛋白。F 蛋白构件可以是上文所描述的任何 PreF 抗原, 而 G 蛋白构件选择为 RSV G 蛋白的免疫学活性部分 (多至和 / 或包括全长 G 蛋白)。在例示性的实施方案中, G 蛋白多肽包含 G 蛋白的氨基酸 149-229 (其中氨基酸位置参照 SEQ ID NO:4 中表示的 G 蛋白序列指明)。本领域技术人员会领会, 可以使用 G 蛋白的更小部分或片段, 只要选定的部分保留较大 G 蛋白片段的优势免疫学特征。具体地, 选定的片段保留在约氨基酸位置 184-198 (例如氨基酸 180-200) 之间的免疫学优势表位, 而且长得足以折叠和装配成展现出免疫优势表位的稳定构象。也可以使用更长的片段, 例如自约氨基酸 128 至约氨基酸 229, 多达全长 G 蛋白。只要选定的片段在嵌合蛋白的背景中折叠成稳定的构象, 并且在宿主细胞中重组生成时不干扰生成、加工或稳定性。任选地, 经由短的氨基酸接头序列诸如序列 GG 将 G 蛋白构件连接至 F 蛋白构件。所述接头也可以是更长的接头 (诸如氨基酸序列 :GGSGGSGGS:SEQ ID NO:14)。许多构象中性的接头是本领域中已知的, 其可以在不破坏 PreF 抗原构象的情况中在这种背景中使用。

[0034] 任选地, G 蛋白构件可以包括在 RSV 疾病的动物模型中减轻或预防增强性病毒疾病的一处或多处氨基酸替代。也就是说, G 蛋白可以包括如下氨基酸替代, 从而在对选自公认动物模型 (例如 RSV 的小鼠模型) 的受试者施用包含 PreF-G 嵌合抗原的免疫原性组合物时, 与接受疫苗 (包括含有未修饰 G 蛋白的疫苗) 的对照动物相比, 受试者展现出疫苗增强性病毒疾病 (例如嗜酸粒细胞增多、中性白细胞增多) 的症状减轻或没有症状。疫苗增强性病毒疾病的减轻和 / 或预防在没有佐剂的情况中施用免疫原性组合物时 (而不是在例如存在强烈的 Th1 诱导性佐剂的情况中施用抗原时) 可以是明显的。另外, 在对人受试者施用疫苗时, 氨基酸替代可以减轻或预防疫苗增强性病毒疾病。合适氨基酸替代的一个例子是用丙氨酸替换第 191 位的天冬酰胺 (氨基酸 191 处 Asn → Ala :N191A)。

[0035] 任选地, 上文所描述的任何 PreF 抗原可以包含起有助于纯化的作用的额外序列。一个例子是多组氨酸标签。若想要的话, 可以自最终产物除去此类标签。

[0036] 在表达时, PreF 抗原经受分子内折叠, 并装配成成熟蛋白, 其包括多肽的多聚体。有利地, PreF 抗原多肽装配成三聚体, 其类似于成熟的、加工过的 RSV F 蛋白的融合前构象。

[0037] 为了引发针对 RSV 的保护性免疫应答, 可以在免疫原性组合物中有利地使用本文所公开的任何 PreF 抗原 (包括 PreF-G 抗原)。此类免疫原性组合物通常包含药学可接受

载体和 / 或赋形剂诸如缓冲剂。为了增强施用后产生的免疫应答,免疫原性组合物通常还包含佐剂。在用于引发针对 RSV 的保护性免疫应答的免疫原性组合物(例如疫苗)的情况下,有利的是,组合物包含主要引发 Th1 免疫应答的佐剂(Th1 偏爱性佐剂)。典型地,佐剂选择为适合于对要施用组合物的目标群体施用。如此,根据应用,佐剂选择为适合于对例如新生儿或老年人施用。

[0038] 有利地,采用本文所描述的免疫原性组合物作为疫苗来减轻或预防感染 RSV,而在施用或暴露于 RSV 后不诱导病理学应答(诸如疫苗增强性病毒疾病)。

[0039] 在一些实施方案中,免疫原性组合物包含 PreF 抗原(诸如由 SEQ ID NO :6 显示的例示性实施方案)和包含 G 蛋白构件的第二多肽。G 蛋白构件通常至少包含 G 蛋白的氨基酸 149-229。虽然可以使用 G 蛋白的更小部分,但是此类片段应当最低限度包含氨基酸 184-198 的免疫学优势表位。或者,G 蛋白可以包含 G 蛋白的更大部分,诸如氨基酸 128-229 或 130-230,任选地,作为更大蛋白质诸如全长 G 蛋白或嵌合多肽的元件。

[0040] 在其它实施方案中,免疫原性组合物包含作为嵌合蛋白的 PreF 抗原,所述嵌合蛋白还包含 G 蛋白构件(诸如由 SEQ ID NO :8 和 10 显示的例示性实施方案)。此类嵌合 PreF(或 PreF-G) 抗原的 G 蛋白构件通常至少包含 G 蛋白的氨基酸 149-229。如上文所指明的,也可以使用 G 蛋白的更小或更大片段(诸如氨基酸 129-229 或 130-230),只要免疫优势表位得到保留,并且 PreF-G 抗原的构象没有受到不利影响。

[0041] 任选地,免疫原性组合物还可以包含与 RSV 不同的病原性生物体的至少一种别的抗原。例如,病原性生物体是与 RSV 不同的病毒,诸如副流感病毒(PIV)、麻疹、乙肝、脊髓灰质炎病毒、或流感病毒。或者,病原性生物体可以是细菌,诸如白喉、破伤风、百日咳、流感嗜血菌、和肺炎球菌。

[0042] 编码任何 PreF 抗原(包括 PreF-G 抗原)的重组核酸也是本公开内容的特征。在一些实施方案中,优化编码 PreF 抗原的核酸的多核苷酸序列以在选定的宿主(诸如 CHO 细胞、其它哺乳动物细胞、或昆虫细胞)中表达。因而,载体(包括表达载体,包括原核和真核表达载体)是本公开内容的特征。同样地,包含此类核酸和载体的宿主细胞是本公开内容的特征。此类核酸也可以在对受试者施用的免疫原性组合物的背景中使用以引发对 RSV 特异性的免疫应答。

[0043] 有利地,使用 PreF 抗原来预防和 / 或治疗 RSV 感染。如此,本公开内容的另一方面关注一种用于引发针对 RSV 的免疫应答的方法。该方法牵涉对受试者(诸如人或动物受试者)施用免疫学有效量的含有 PreF 抗原的组合物。施用免疫学有效量的组合物引发对 PreF 抗原上存在的表位特异性的免疫应答。此类免疫应答可以包括 B 细胞应答(例如中和性抗体的生成)和 / 或 T 细胞应答(例如细胞因子的生成)。有利地,由 PreF 抗原引发的免疫应答包括对 RSVF 蛋白的融合前构象上存在的至少一个构象表位特异性的要件。可以对受试者施用 PreF 抗原和组合物,而在与 RSV 接触后不增强病毒疾病。有利地,本文所公开的 PreF 抗原和适当配制的免疫原性组合物引发 Th1 偏爱性免疫应答,其减轻或预防感染 RSV 和 / 或减轻或预防感染 RSV 后的病理学应答。

[0044] 可以经由多种路径来施用免疫原性组合物,包括直接将 PreF 抗原放置得与上呼吸道的粘膜接触的路径,诸如鼻内的。或者,可以采用更传统的施用路径,诸如肌肉施用路径。

[0045] 如此,还涵盖任何所公开的 RSV 抗原(或核酸)在制备用于治疗 RSV 感染(例如预防性处理或预防 RSV 感染)的药物中的用途。因而,本公开内容提供了在药物中使用的所公开重组 RSV 抗原或免疫原性组合物,以及其用于预防或治疗 RSV 相关疾病的用途。

[0046] 在下文描述和实施例中呈现了关于 PreF 抗原及其使用方法的其它详情。

[0047] 术语

[0048] 为了便于审阅本公开内容的各个实施方案,提供了术语的下列解释。可以在本公开内容的语境中提供别的术语和解释。

[0049] 除非另有解释,本文所使用的所有技术和科学术语与本公开内容所属领域普通技术人员的通常理解具有相同含义。分子生物学中的常见术语的定义可以参见 Benjamin Lewin, *Genes V*, 由 Oxford University Press 出版,1994(ISBN 0-19-854287-9); Kendrew 等(编), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, 由 Blackwell Science Ltd. 出版,1994(ISBN 0-632-02182-9); 及 Robert A. Meyers(编), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 由 VCH Publishers, Inc. 出版,1995(ISBN 1-56081-569-8)。

[0050] 除非上下文另有明确指明,单数术语“一个”、“一种”和“所述”包括复数所指物。类似地,除非上下文另有明确指明,词语“或”意图包括“和”。术语“多个/种”指两个/种或更多个/种。应当进一步理解的是,对核酸或多肽给出的所有碱基大小或氨基酸大小,和所有分子量或分子质量值是近似的,并且为了描述而提供。另外,关于物质诸如抗原的浓度或水平给出的数值限制意图为近似的。如此,若指明浓度是至少(例如)200pg,则意图该浓度被理解为至少约(或“大约”或“~”)200pg。

[0051] 虽然与本文所描述的方法和材料类似或等同的方法和材料可以在本公开内容的实践或测试中使用,下文描述了合适的方法和材料。术语“包含”意味着“包括”。如此,除非上下文另有要求,词语“包含”及其变化形式应当理解为暗示包括规定的化合物或组合物(例如核酸、多肽、抗原)或步骤,或者化合物或步骤的组,但是不排除任何其它化合物、组合物、步骤,或其组。缩写“例如”(e. g.) 衍生自拉丁语 *exemplify gratia*, 并且在本文中用于指明非限制性例子。如此,缩写“例如”(e. g.) 与术语“例如”(for example) 是同义的。

[0052] 呼吸道合胞病毒(RSV)是副粘病毒科(Paramyxoviridae)、肺病毒亚科(Pneumovirinae)、肺病毒属(Pneumovirus)的一种病原性病毒。RSV的基因组是负义RNA分子,其编码11种蛋白质。RNA基因组与病毒N蛋白的紧密联合形成包在病毒包膜内部的核壳。基于G糖蛋白的抗原性差异,已经描述了两组人RSV毒株,即A和B组。迄今已经分离出多种RSV毒株。由GenBank和/或EMBL登录号指明的例示性毒株可以参见W02008114149,通过提及而将其收入本文,以便披露适合于在PreF抗原(包括嵌合PreF-G抗原)中使用,和与PreF抗原联合使用的RSV F和G蛋白的核酸和多肽序列。别的RSV毒株可能会得到分离,并且涵盖在RSV属内。类似地,RSV属涵盖通过遗传漂变、或人工合成和/或重组,源于天然存在的变体(例如以前或以后鉴定的毒株)。

[0053] 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融合蛋白多肽的整个或部分氨基酸序列的多肽或蛋白质。类似地,术语“G蛋白”或“G蛋白多肽”指具有RSV附着蛋白多肽的整个或部分氨基酸序列的多肽或蛋白质。已经描述了许多RSV融合和附着蛋白,并且是本领域技术人员已知的。W02008114149列出了此公开内容提

交日时公众可获得的例示性 F 和 G 蛋白变体（例如天然存在的变体）。

[0054] “变体”在提及核酸或多肽（例如 RSV F 或 G 蛋白核酸或多肽，或 PreF 核酸或多肽）时指与参照核酸或多肽不同的核酸或多肽。通常，变体与参照核酸或多肽之间的差异构成与所指物相比小比例的差异。

[0055] 多肽或蛋白质的“域”或“结构域”指多肽或蛋白质内结构限定的元件。例如，“三聚化域”指多肽内促进多肽装配成三聚体的氨基酸序列。例如，三聚化域能促进经由与（具有相同或不同氨基酸序列的别的多肽的）其它三聚化域的联合而装配成三聚体。该术语也用于指编码此类肽或多肽的多核苷酸。

[0056] 术语“天然的”和“天然存在的”指以与其在自然界中相同状态存在的元件，诸如蛋白质、多肽或核酸。也就是说，该元件没有进行过人工修饰。应当理解的是，在本公开内容的语境中，RSV 蛋白或多肽有许多天然的 / 天然存在的变体，例如自不同的天然存在的 RSV 毒株或分离物获得的。

[0057] 术语“多肽”指其中单体是经由酰胺键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。如本文中使用的，术语“多肽”或“蛋白质”意图涵盖任何氨基酸序列，而且包括经修饰的序列诸如糖蛋白。术语“多肽”明确意图涵盖天然存在蛋白质，以及重组或合成生成的蛋白质。术语“片段”提到多肽时指多肽的一部分（即亚序列）。术语“免疫原性片段”指多肽的保留全长参照蛋白质或多肽的至少一个优势免疫原性表位的所有片段。多肽内的取向一般以 N 端至 C 端方向叙述，由各个氨基酸的氨基和羧基模块的取向限定。多肽从 N 或氨基端朝向 C 或羧基端翻译。

[0058] “信号肽”是一种短的氨基酸序列（例如长度为约 18-25 个氨基酸），其将新合成的分泌性蛋白质或膜蛋白引导至膜及穿过膜，例如内质网的。信号肽常常但不普遍位于多肽的 N 端，并且常常在蛋白质穿过膜后被信号肽酶切去。信号序列通常含有三种常见的结构特征：N 端极性碱性区（n 区）、疏水性核心、和亲水性 c 区。

[0059] 术语“多核苷酸”和“核酸序列”指长度为至少 10 个碱基的核苷酸聚合形式。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、或任一核苷酸的经修饰形式。该术语包括单一和双重形式 DNA。“分离的多核苷酸”指与编码序列两者均不紧密相邻的多核苷酸，它与所述编码序列在正是衍生其的生物体的天然存在的基因组中紧密相邻（一个在 5' 端上，而一个在 3' 端上）。在一个实施方案中，多核苷酸编码多肽。核酸的 5' 和 3' 方向通过参照各个核苷酸单元的连接性来限定，并依照脱氧核糖（或核糖）糖环的碳位置来指派。以 5' 至 3' 方向阅读多核苷酸序列的信息（编码）内容。

[0060] “重组”核酸指具有非天然存在序列或者具有通过人工组合两个在其它情况中分开的序列区段生成的序列的核酸。可以通过化学合成或者，更常见地，通过人工操作分离的核酸区段，例如通过遗传工程技术来实现此人工组合。“重组”蛋白指由已经导入宿主细胞诸如细菌或真核细胞中的异源（例如重组）核酸编码的蛋白质。可以在具有能够表达由所导入核酸编码的蛋白质的信号的表达载体上导入核酸，或者可以将核酸整合入宿主细胞染色体中。

[0061] 术语“异源的”就核酸、多肽或其它细胞成分而言指明存在如下成分，其在自然界中通常找不到和 / 或其源自不同来源或物种。

[0062] 术语“纯化”（例如就病原体或含有病原体的组合物而言）指自组合物除去成分

(其存在不是想要的)的方法。纯化是一个相对术语,并且不要求从组合物除去不想要的成分的所有痕迹。在疫苗生产的语境中,纯化包括诸如离心、透析、离子交换层析、和大小排阻层析、亲和纯化或沉淀等工艺。如此,术语“纯化的”并不要求绝对纯度;相反,其意图为一个相对术语。如此,例如纯化的核酸制备物是指定蛋白质比该核酸在其生成环境中(例如在细胞内或在生化反应室中)得到更多富集的核酸制备物。可以纯化基本上纯的核酸或蛋白质的制备物,使得想要的核酸占制备物总核酸含量的至少50%。在某些实施方案中,基本上纯的核酸会占制备物总核酸或蛋白质含量的至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%或更多。

[0063] “分离的”生物学成分(诸如核酸分子、蛋白质或细胞器)已经与该成分天然存在的生物体的细胞中的其它生物学成分,诸如其它染色体和染色体外DNA和RNA、蛋白质和细胞器基本上分开或已经基本上纯化除去与该成分天然存在的生物体的细胞中的其它生物学成分,诸如其它染色体和染色体外DNA和RNA、蛋白质和细胞器。已经“分离的”核酸和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白质以及化学合成的核酸和蛋白质。

[0064] “抗原”指能在动物中刺激抗体生成和/或T细胞应答的化合物、组合物、或物质,包括注射、吸附、或别的方式导入动物中的组合物。术语“抗原”包括所有相关抗原性表位。术语“表位”或“抗原决定簇”指抗原上由B和/或T细胞应答的位点。“优势抗原性表位”或“优势表位”指针对其产生功能上显著的宿主免疫应答(例如抗体应答或T细胞应答)的那些表位。如此,关于针对病原体的保护性免疫应答,优势抗原性表位指在被宿主免疫系统识别时产生保护免于由该病原体引起的疾病的那些抗原性模块。术语“T细胞表位”指在与合适的MHC分子结合时被T细胞特异性结合(经由T细胞受体)的表位。“B细胞表位”指被抗体(或B细胞受体分子)特异性结合的表位。

[0065] “佐剂”指以非特异性方式增强免疫应答产生的药剂。常见的佐剂包括将抗原吸附至其上的矿物(明矾、氢氧化铝、磷酸铝)的悬液液;乳剂,包括油包水、和水包油(及其变体,包括双重乳剂和可逆乳剂)、脂糖、脂多糖、免疫刺激性核酸(诸如CpG寡核苷酸)、脂质体、Toll样受体激动剂(特别是TLR2、TLR4、TLR7/8和TLR9激动剂),和此类成分的各种组合。

[0066] “免疫原性组合物”指适合于对人或动物受试者施用(例如在实验背景中)的物质组合物,其能够引发特异性免疫应答,例如针对病原体诸如RSV。因此,免疫原性组合物包含一种或多种抗原(例如多肽抗原)或抗原性表位。免疫原性组合物还可以包含一种或多种能够引发或增强免疫应答的别的成分,诸如赋形剂、载体、和/或佐剂。在某些例子中,施用免疫原性组合物来引发保护受试者免于由病原体诱导的症状或状况的免疫应答。在一些情况中,在受试者被暴露于病原体后通过抑制病原体(例如RSV)的复制来预防(或减轻或改善)由病原体引起的症状或疾病。在本公开内容的语境中,术语免疫原性组合物应当理解成涵盖意图用于对受试者或受试者群体施用以引发针对RSV的保护性或姑息性免疫应答的组合物(即疫苗组合物或疫苗)。

[0067] “免疫应答”指免疫系统细胞诸如B细胞、T细胞、或单核细胞对刺激物的应答。免疫应答可以是B细胞应答,其导致特异性抗体诸如抗原特异性中和性抗体的生成。免疫应答也可以是T细胞应答,诸如CD4+应答或CD8+应答。在一些情况中,应答对特定抗原是特

异性的（即“抗原特异性应答”）。若抗原衍生自病原体，则抗原特异性应答是“病原体特异性应答”。“保护性免疫应答”指抑制病原体的有害功能或活性、减轻病原体感染、或减轻源于病原体感染的症状（包括死亡）的免疫应答。可以例如通过在噬斑减少测定法或 ELISA 中和测定法中抑制病毒复制或噬斑形成，或者通过在体内测量对病原体攻击的抗性来测量保护性免疫应答。

[0068] “Th1”偏爱性免疫应答的特征在于存在生成 IL-2 和 IFN- $\gamma$  的 CD4+T 辅助细胞，并且如此，特征在于分泌或存在 IL-2 和 IFN- $\gamma$ 。比较而言，“Th2”偏爱性免疫应答的特征在于生成 IL-4、IL-5、和 IL-13 的 CD4+ 辅助细胞占优势。

[0069] “免疫学有效量”是用于在受试者中引发针对组合物或针对组合物中抗原的免疫应答的组合物（典型地，免疫原性组合物）数量。通常，想要的结果是产生抗原（例如病原体）特异性免疫应答，其能够或促成保护受试者免于所述病原体。然而，为了获得针对病原体的保护性免疫应答，可需要免疫原性组合物的多次施用。如此，在本公开内容的语境中，术语免疫学有效量涵盖与先前或随后施用联合促成获得保护性免疫应答的分数剂量。

[0070] 形容词“药学可接受的”指明所指物适合于对受试者（例如人或动物受试者）施用。Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第 15 版 (1975) 描述了适合于治疗性和 / 或预防性组合物（包括免疫原性组合物）的药学投递的组合物和配制剂（包括稀释剂）。

[0071] 术语“调控”提到应答诸如免疫应答时指改变或变更应答的开始、幅度、持续时间或特征。调控免疫应答的药剂在其施用后改变下列至少一项：免疫应答的开始、幅度、持续时间或特征，或者与参照药剂相比改变下列至少一项：开始、幅度、持续时间或特征。

[0072] 术语“减轻”是一个相对术语，从而若应答或状况在施用药剂后得到定量减弱，或者若与参照药剂相比，它在施用药剂后得到减弱，则所述药剂减轻应答或状况。类似地，术语“预防”不必然意味着药剂完全消除应答或状况，只要应答或状况的至少一项特征得到消除。如此，减轻或预防感染或应答诸如病理学应答（例如疫苗增强性病毒疾病）的免疫原性组合物可以但不必然完全消除此类感染或应答，只要所述感染或应答可测量地减弱例如至少约 50%，诸如至少约 70%，或约 80%，或甚至约 90%（即减弱至 10% 或更小）的感染或应答（在没有药剂的情况中，或者与参照药剂相比）。

[0073] “受试者”指活的多细胞脊椎动物生物体。在本公开内容的语境中，受试者可以是实验受试者，诸如非人动物，例如小鼠、棉鼠、或非人灵长类。或者，受试者可以是人受试者。

[0074] PreF 抗原

[0075] 在自然界中，RSV F 蛋白表达为长度为 574 个氨基酸的单一多肽前体，称作 F0。在体内，F0 在内质网中寡聚化，并且在两种保守的弗林蛋白酶共有序列（弗林蛋白酶切割位点），即 RARR<sup>109</sup>(SEQ ID NO:15) 和 RKRR<sup>136</sup>(SEQ IDNO:16) 处被弗林蛋白酶蛋白水解加工以产生由两个二硫化物连接的片段组成的寡聚物。这些片段中较小者称作 F2，并且源于 F0 前体的 N 端部分。本领域技术人员应当认可的是，缩写 F0、F1 和 F2 在科学文献中通常称作 F<sub>0</sub>、F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub>。较大的、C 端 F1 片段经由疏水性氨基酸序列锚定膜中的 F 蛋白，所述疏水性氨基酸与 24 个氨基酸的胞质尾部相邻。三个 F2-F1 二聚物结合以形成成熟的 F 蛋白，其采用亚稳性融原前 (prefusogenic) (“融合前”) 构象，该构象在与靶细胞膜接触后得到触发以经受构象变化。此构象变化暴露疏水性序列（称为融合肽），其与宿主细胞膜结合，并促进

病毒或受感染细胞的膜与靶细胞膜融合。

[0076] F1 片段至少含有两种七价重复域,称作 HRA 和 HRB,并且分别位于融合肽和跨膜锚定域附近。处于融合前构象,F2-F1 二聚物形成球状头部和茎结构,其中 HRA 域在球状头部中处于分段的(延伸的)构象。比较而言,HRB 域形成自头部区域延伸的三链卷曲螺旋茎。从融合前向融合后构象转变期间,HRA 域倒塌(collapse),并使其接近 HRB 域以形成反平行的六螺旋束。处于融合后状态,融合肽和跨膜域并列以便于膜融合。

[0077] 虽然上文所提供的构象描述基于晶体学数据的分子建模,但是可以在不诉诸于晶体学的情况中监测融合前与融合后构象之间的结构差别。例如,可以使用电子显微照相术来区别融合前和融合后(或者称作融原前和融原)构象,如由 Calder 等, *Virology*, 271 : 122-131 (2000) 和 Morton 等, *Virology*, 311 : 275-288 所演示的,为了它们的技术教导,通过提及而将它们收入本文。也可以通过脂质体结合测定法来区别融合前构象与融原(融合后)构象,如由 Connolly 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 : 17903-17908 (2006) 所描述的,为了其技术教导,也通过提及而将其收入本文。另外,可以使用如下抗体(例如单克隆抗体)来区别融合前与融原构象,所述抗体特异性识别 RSV F 蛋白的融合前或融原形式之一或另一种上存在,而另一种形式上不存在的构象表位。此类构象表位可以是由于分子表面上抗原决定簇的优先暴露。或者,构象表位可以源于线性多肽中非连续氨基酸的并列。

[0078] 将本文所公开的 PreF 抗原设计成稳定并维持 RSV F 蛋白的融合前构象,从而在所表达蛋白质的群体中,实质部分的所表达蛋白质群体处于融原前(融合前)构象(例如通过结构和/或热力学建模所预测的或者如通过上文所公开的一种或多种方法所评估的)。将稳定化修饰引入天然的(或合成的)F 蛋白诸如 SEQ ID NO : 2 的例示性 F 蛋白中,使得 F 蛋白的融合前构象的主要免疫原性表位在将 PreF 抗原导入细胞或细胞外环境中后(例如在体内,例如在对受试者施用后)得到维持。

[0079] 第一,可以在构建体的 C 末端末端放置异源稳定化域以替换 F0 多肽的膜锚定域。预测此稳定化域补偿 HRB 不稳定性,有助于稳定融合前构象异构体。在例示性的实施方案中,异源稳定化域是蛋白质多聚化域。此类蛋白质多聚化域的一个特别有利的例子是三聚化域。例示性三聚化域折叠成卷曲螺旋,其促进装配成具有此类卷曲螺旋域的多个多肽的三聚体。三聚化域的一个有利的例子是异亮氨酸拉链。一种例示性异亮氨酸拉链域是由 Harbury 等 *Science* 262 : 1401-1407 (1993) 所描述的经工程化改造的酵母 GCN4 异亮氨酸变体。以 SEQ ID NO : 11 表示一种合适的异亮氨酸拉链域的序列,虽然保留形成卷曲螺旋稳定化域的能力的此序列变体是同样合适的。备选的稳定化卷曲螺旋三聚化域包括: TRAF2 (GENBANK® 登录号 Q12933 [gi : 23503103] ; 氨基酸 299-348) ; 血小板反应蛋白 1 (登录号 P07996 [gi : 135717] ; 氨基酸 291-314) ; 胞外基质蛋白 -4 (登录号 095460 [gi : 14548117] ; 氨基酸 594-618) ; CMP (胞外基质蛋白 -1) (登录号 NP\_002370 [gi : 4505111] ; 氨基酸 463-496) ; HSF1 (登录号 AAX42211 [gi : 61362386] ; 氨基酸 165-191) ; 和 Cubilin (登录号 NP\_001072 [gi : 4557503] ; 氨基酸 104-138)。预期合适的三聚化域导致实质部分的所表达蛋白质装配成三聚体。例如,至少 50% 的具有三聚化域的重组 PreF 多肽会装配成三聚体(例如如通过 AFF-MALS 所评估的)。典型地,至少 60%,更有利地,至少 70%,并且最想要地,至少约 75% 或更多的所表达多肽以三聚体存在。

[0080] 为了使 HRB 更稳定,可以用赖氨酸替代位于 PreF 的第 512 位(相对于天然的 F0



蛋白)的亮氨酸残基(例示性 PreF 抗原多肽 SEQ ID NO :6 的 L482K)。此替代改善卷曲螺旋疏水性残基周期性。类似地,可以在第 105 位氨基酸后添加赖氨酸。

[0081] 第二,可以除去 pep27。对处于融合前状态的 RSV F 蛋白的结构模型的分析提示 pep27 在 F1 和 F2 之间产生大的无约束环。此环并不促成融合前状态的稳定化,并且在弗林蛋白酶切割天然蛋白质后被除去。

[0082] 第三,可以删除两个弗林蛋白酶切割基序之一或两者。凭借此设计,不从 F2 切割融合肽,这阻止从融合前构象异构体的球状头部释放和与邻近膜的可接近性。预测融合肽与膜界面之间的相互作用是融合前状态不稳定性主要问题。融合过程期间,融合肽与靶膜之间的相互作用导致融合肽从球状头部结构内暴露,增强融合前状态的不稳定性,并折叠成融合后构象异构体。此构象变化实现膜融合过程。预测除去两个弗林蛋白酶切割位点之一或两者阻止膜与融合肽 N 端部分的可接近性,这稳定融合前状态。

[0083] 任选地,还可以通过例如替代一个或多个氨基酸来除去至少一个非弗林蛋白酶切割位点。例如,实验证据提示,在有助于某些金属蛋白酶进行切割的条件下,可以在氨基酸 110-118 附近切割 PreF 抗原(例如其中切割在 PreF 抗原的氨基酸 112 和 113 之间;在参照 F 蛋白多肽 SEQ ID NO :2 的第 142 位亮氨酸和第 143 位甘氨酸之间发生)。因而,对此区域内的一个或多个氨基酸的修饰能降低对 PreF 抗原的切割。例如,可以用不同氨基酸诸如异亮氨酸或色氨酸替代第 112 位亮氨酸。或者/另外,可以用丝氨酸或丙氨酸替代第 113 位甘氨酸。

[0084] 天然的 F 蛋白多肽可以选自 RSV A 或 RSV B 毒株的任何 F 蛋白,或者选自其变体(如上文所定义的)。在某些例示性的实施方案中,F 蛋白多肽是以 SEQ ID NO :2 表示的 F 蛋白。为了便于理解本公开内容,所有氨基酸残基位置(不管毒株)相对于(即氨基酸残基位置对应于)例示性 F 蛋白的氨基酸位置给出。本领域普通技术人员可以通过使用容易地可获得且公知的比对算法(诸如 BLAST,例如使用缺省参数)来比对选定 RSV 毒株的氨基酸序列与例示性序列的氨基酸序列,从而容易地确定任何其它 RSV A 或 B 毒株的可比氨基酸位置。WO2008114149 中披露了来自不同 RSV 毒株的 F 蛋白多肽的许多别的例子(为了提供 RSV F 和 G 蛋白序列的别的例子,通过提及而将其收入本文)。别的变体可以经由遗传漂变生成,或者可以使用定点或随机诱变,或者通过重组两种或更多种先前存在的变体来人工生成。此类别的变体在本文所公开的 PreF(和 PreF-G)抗原的背景中也是合适的。

[0085] 在选择 F 蛋白的 F2 和 F1 域时,本领域技术人员会认可,包含整个 F2 和/或 F1 域不是严格必要的。典型地,构象考虑在选择 F2 域的亚序列(或片段)时是重要的。如此,F2 域通常包含 F2 域中促进多肽装配和稳定性的部分。在某些例示性的变体中,F2 域包含氨基酸 26-105。然而,在长度上具有微小修饰(通过添加或删除一个或多个氨基酸)的变体也是有可能的。

[0086] 典型地,至少选择 F1 域的亚序列(或片段),并将其设计成维持包含 F 蛋白的免疫优势表位的稳定构象。例如,一般想要选择 F1 多肽域中包含氨基酸 262-275(帕利珠单抗(palivizumab)中和)和 423-436(Centocor 的 ch101F 单抗)的区域中由中和性抗体识别的表位的亚序列。另外,想要包含 T 细胞表位,例如在氨基酸 328-355 的区域中。最常见地,作为 F1 亚基的单一连续部分(例如跨越氨基酸 262-436),但是表位可以在包含作为以稳定构象装配的不连续元件的这些免疫优势表位的合成序列中得到保留。如此,F1 域多肽

包含 RSV F 蛋白多肽的至少约氨基酸 262-436。在本文提供的一个非限制性例子中, F1 域包含天然 F 蛋白多肽的氨基酸 137 至 516。本领域技术人员会认可, 别的更短的亚序列可以任凭从业人员使用。

[0087] 在选择 F2 或 F1 域的亚序列时(或者如会在下文就某些 PreF-G 抗原的 G 蛋白构件进行讨论), 在构象考虑外, 基于包含别的免疫原性表位来选择序列(例如变体、亚序列等)可以是想要的。例如, 可以使用本领域中已知的锚基序或其它方法诸如神经网络或多项式确定来鉴定别的 T 细胞表位, 参见例如 RANKPEP(在万维网上于:mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html 可获得); ProPredI(在万维网上于:imtech.res.in/raghava/propredI/index.html 可获得); Bimas(在万维网上于:www-bimas.dcrn.nih.gov/molbi/hla\_bind/index.html 可获得); 和 SYFPEITH(在万维网上于:syfpeithi.bmi-heidelberg.com/scripts/MHCServer.dll/home.htm 可获得)。例如, 使用算法来测定肽的“结合阈值”, 并选择那些具有给予它们 MHC 或抗体以某种亲和力结合的高概率的得分的。算法或是基于对 MHC 结合特定位置处的特定氨基酸的影响、对抗体结合特定位置处的特定氨基酸的影响、或是对结合含有基序的肽中的特定替代的影响。在免疫原性肽的背景内, “保守残基”指在肽中特定位置处以比通过随机分布会预期的频率显著更高的频率出现的残基。锚残基是保守残基, 其提供与 MHC 分子的接触点。由此类预测方法鉴定出的 T 细胞表位可以通过测量它们对特定 MHC 蛋白的结合及通过其在 MHC 蛋白的背景中呈递时刺激 T 细胞的能力来确认。

[0088] 有利地, PreF 抗原(包括 PreF-G 抗原, 如下文所讨论的)包括与表达系统对应的信号肽, 例如哺乳动物或病毒信号肽, 诸如 RSV F0 天然信号序列(例如 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-25 或 SEQ ID NO:6 的氨基酸 1-25)。典型地, 信号肽选择为与选择用于重组表达的细胞相容。例如, 可以用信号肽(诸如杆状病毒信号肽, 或蜂毒肽信号肽)替代以在昆虫细胞中表达。合适的植物信号肽是本领域中已知的, 若植物表达系统是优选的话。许多例示性信号肽是本领域中已知的(参见例如, 参见 Zhang 和 Henzel, Protein Sci., 13: 2819-2824(2004), 其描述了许多人信号肽), 并列入例如 SPdb 信号肽数据库, 其包括古细菌、原核生物和真核生物的信号序列(<http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/>)。任选地, 任何前述抗原可以包含别的序列或标签诸如 His 标签来促进纯化。

[0089] 任选地, PreF 抗原可以包含别的免疫原性构件。在某些特别有利的实施方案中, PreF 抗原包含 RSV G 蛋白抗原性构件。具有 PreF 和 G 构件的例示性嵌合蛋白包括下列 PreF\_V1(以 SEQ ID NO:7 和 8 表示)和 PreF\_V2(以 SEQ ID NO:9 和 10 表示)。

[0090] 在 PreF-G 抗原中, 在构建体的 C 末端末端处添加 G 蛋白的抗原性部分(例如截短的 G 蛋白, 诸如氨基酸残基 149-229)。典型地, 经由柔性接头序列将 G 蛋白构件连接至 F 蛋白构件。例如, 在例示性 PreF\_V1 设计中, 通过 -GGSGGSGGS- 接头(SEQ ID NO:14)将 G 蛋白连接至 PreF 构件。在 PreF\_V2 设计中, 接头较短。代替具有 -GGSGGSGGS- 接头(SEQ ID NO:14), PreF\_V2 具有用于接头的 2 个甘氨酸(-GG-)。

[0091] 在存在的情况下, G 蛋白多肽域可以包含选自任何 RSV A 或 RSV B 毒株的 G 蛋白的整个或部分。在某些例示性的实施方案中, G 蛋白是以 SEQ ID NO:4 表示的 G 蛋白(或者与其 95% 相同)。合适的 G 蛋白序列的别的例子可以参见 W02008114149(通过提及而将其收入本文)。

[0092] G 蛋白多肽构件选择为至少包含 G 蛋白中保留免疫优势 T 细胞表位（例如在氨基酸 183-197 的区域中）的亚序列（或片段），诸如包含天然 G 蛋白的氨基酸 151-229、149-229、或 128-229 的 G 蛋白片段。在一个例示性的实施方案中，G 蛋白多肽是天然 G 蛋白多肽中包含天然 G 蛋白多肽氨基酸残基 149 至 229 整个或部分的亚序列（或片段）。本领域技术人员会容易领会的是，也可以使用更长或更短的 G 蛋白部分，只要选定的部分不在构象上使 PreF-G 抗原不稳定或者破坏 PreF-G 抗原的表达、折叠或加工。任选地，G 蛋白域包含第 191 位的氨基酸替代，先前已经显示了其牵涉减轻和 / 或预防以与福尔马林灭活的 RSV 疫苗有关的嗜酸粒细胞增多为特征的增强性疾病。天然存在的和替代的 (N191A)G 蛋白的属性的全面描述可以参见例如美国专利公开文本 No. 2005/0042230，通过提及而将其收入本文。

[0093] 例如，关于选择与天然存在的毒株对应的序列，一个或多个域可以在序列上对应于 RSV A 或 B 毒株，诸如称作 A2 或 Long 的常见实验室分离物，或任何其它天然存在的毒株或分离物（如上述 W02008114149 中所披露的）。在此类天然存在的和分离的变体外，也可以在 PreF（包括 PreF-G）抗原的背景中采用与上述序列共享序列相似性的经工程化改造的变体。本领域技术人员应当理解的是，PreF 抗原多肽（和多核苷酸序列，如下文所描述的）之间的相似性就多肽（和一般而言，核苷酸序列）而言可以关于序列间的相似性（在其它情况中称为序列同一性）表示。序列同一性常常关于百分比同一性（或相似性）测量；百分比越高，两种序列的一级结构越相似。一般而言，两种氨基酸（或多核苷酸）序列的一级结构越相似，源于折叠和装配的更高级结构越相似。PreF 多肽（和多核苷酸）序列的变体通常具有一处或少量氨基酸删除、添加或替代，但是仍然会共享非常高百分比的其氨基酸，和一般而言其多核苷酸序列。更重要的是，变体保留本文所公开的参照序列的结构属性和如此，构象属性。

[0094] 测定序列同一性的方法是本领域中公知的，并且可适用于 PreF 抗原多肽，以及编码它们的核酸（例如如下文所描述的）。多种程序和比对算法记载于 Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2 :482, 1981 ;Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48 :443, 1970 ;Higgins 和 Sharp, *Gene* 73 :237, 1988 ;Higgins 和 Sharp, *CABIOS* 5 :151, 1989 ;Corpet 等, *Nucleic Acids Research* 16 :10881, 1988 ; 及 Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 2444, 1988。Altschul 等, *Nature Genet.* 6 :119, 1994 呈现了序列比对方法和同源性计算的详细考虑。NCBI 基本的局部比对搜索工具 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) (Altschul 等, *J. Mol. Biol.* 215 :403, 1990) 可获自数个来源，包括（美国）国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI, Bethesda, MD) 及在因特网上，用于与序列分析程序 blastp、blastn、blastx、tblastn 和 tblastx 组合使用。如何使用此程序来测定序列同一性的描述在因特网上 NCBI 网站上可获得。

[0095] 在一些例子中，PreF 抗原相对于衍生其的天然存在的毒株的氨基酸序列具有一处或多处氨基酸修饰（例如在上述稳定化修饰外）。此类差异可以是一个或多个氨基酸的添加、删除或替代。变体通常相差不超过约 1%、或 2%、或 5%、或 10%、或 15%、或 20% 的氨基酸残基。例如，与例示性 PreF 抗原多肽序列 SEQ ID NO :6、8、和 / 或 10 相比，变体 PreF 抗原（包括 PreF-G）多肽序列可以包含 1、或 2、或多至 5、或多至约 10、或多至约 15、或多至约 50、或多至约 100 处氨基酸的差异。如此，RSV F 或 G 蛋白，或 PreF 抗原（包括 PreF-G

抗原)背景中的变体通常与参照蛋白(例如 SEQ ID NO :2、4、6、8 和 / 或 10 中显示的参照序列,或本文所公开的任何例示性 PreF 抗原)共享至少 80%、或 85%,更常见地,至少约 90%或更多,诸如 95%,或甚至 98%或 99%序列同一性。作为本公开内容特征包括的别的变体是包含选自 W02008114149 中所披露的天然存在变体的核苷酸或氨基酸序列整个或部分的 PreF 抗原(包括 PreF-G 抗原)。别的变体可以经由遗传漂变生成,或者可以使用定点或随机诱变,或者通过重组两种或更多种先前存在的变体来人工生成。此类别的变体在本文所公开的 PreF(和 PreF-G)抗原的背景中也是合适的。例如,修饰可以是一个或多个氨基酸(诸如两个氨基酸、三个氨基酸、四个氨基酸、五个氨基酸、多至约十个氨基酸,或更多个)的替代,其不改变所得 PreF 抗原的构象或免疫原性表位。

[0096] 或者 / 另外,修饰可以包括一个或多个氨基酸的删除和 / 或一个或多个氨基酸的添加。确实,若想要的话,一个或多个多肽域可以是合成的多肽,其不对应于任何单一毒株,但是包含来自多个毒株,或者甚至来自通过比对多种 RSV 病毒株多肽推导的共有序列的构件亚序列。在某些实施方案中,通过添加构成标签的氨基酸序列来修饰一个或多个多肽域,所述标签便于随后的加工或纯化。此类标签可以是抗原性或表位标签、酶标签或多组氨酸标签。通常,标签位于蛋白质的一端或另一端,诸如在抗原或融合蛋白的 C 端或 N 端。

#### [0097] 编码 PreF 抗原的核酸

[0098] 本公开内容的另一方面关注编码如上文所描述的 PreF 抗原的重组核酸。在某些实施方案中,对重组核酸进行密码子优化以在选定的原核或真核宿主细胞中表达。例如,SEQ ID NO :5 和 12 是编码 PreF 抗原的序列的两种不同例示性、非限制性例子,它们已经进行过密码子优化以在哺乳动物(例如 CHO)细胞中表达。为了便于复制和表达,可以将核酸掺入载体诸如原核或真核表达载体中。包含重组 PreF 抗原编码核酸的宿主细胞也是本公开内容的特征。有利的宿主细胞包括原核(即细菌)宿主细胞,诸如大肠杆菌(E. coli),以及许多真核宿主细胞,包括真菌(例如酵母)细胞、昆虫细胞、和哺乳动物细胞(诸如 CHO、VERO 和 HEK293 细胞)。

[0099] 为了便于复制和表达,可以将核酸掺入载体诸如原核或真核表达载体中。虽然本文所公开的核酸可以包含在许多载体(包括例如细菌质粒;噬菌体 DNA;杆状病毒;酵母质粒;自质粒和噬菌体 DNA 的组合衍生的载体;病毒 DNA 诸如牛痘、腺病毒、禽痘病毒、伪狂犬病、腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒等)之任一种中,但是最常见地,载体会是适合于生成多肽表达产物的表达载体。在表达载体中,编码 PreF 抗原的核酸通常以对于合适的转录控制序列(启动子,和任选地,一种或多种增强子)的接近和取向排列以指导 mRNA 合成。也就是说,感兴趣的多核苷酸序列可操作连接至合适的转录控制序列。此类启动子的例子包括:CMV 的立即早期启动子、LTR 或 SV40 启动子、杆状病毒的多角体蛋白启动子、大肠杆菌 lac 或 trp 启动子、噬菌体 T7 和  $\lambda P_L$  启动子、和已知在原核或真核细胞或其病毒中控制基因表达的其它启动子。表达载体通常还含有用于翻译起始的核糖体结合位点和转录终止子。任选地,载体包含适合于扩增表达的序列。另外,任选地,表达载体包含一种或多种选择标志基因以提供供选择经转化的宿主细胞用的表型性状,诸如供真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,或者诸如大肠杆菌中的卡那霉素、四环素或氨苄青霉素抗性。

[0100] 表达载体还可以含有别的表达元件,例如以改善翻译的效率。这些信号可以包含例如 ATG 起始密码子和相邻序列。在一些情况中,例如与感兴趣的多核苷酸序列(例如天

然的起始密码子)同时将翻译起始密码子和相关序列元件插入合适的表达载体中。在此类情况中,不需要别的翻译控制信号。然而,在仅插入多肽编码序列或其部分的情况中,提供外源翻译控制信号(包括 ATG 起始密码子)来翻译编码 PreF 抗原的核酸。以正确读码框的方式放置起始密码子以确保翻译感兴趣的多核苷酸序列。外源转录元件和起始密码子可以是多种起源的(天然的和合成的两者)。若想要的话,可以通过包含适合于使用中的细胞系统的增强子来进一步提高表达效率(Scharf 等(1994)Results Probl Cell Differ 20:125-62;Bitter 等(1987)Methods in Enzymol153:516-544)。

[0101] 在一些例子中,编码 PreF 抗原的核酸(诸如载体)包含为了在导入宿主细胞中时提高和/或优化 PreF 编码核酸的表达而选择的一种或多种别的序列元件。例如,在某些实施方案中,编码 PreF 抗原的核酸包含内含子序列,诸如人疱疹病毒 5 内含子序列(参见例如 SEQ ID NO:13)。已经反复证明了,内含子在重组构建体中合适定位时增强同源和异源核酸的表达。另一类表达增强序列包括外遗传元件诸如基质附着区(或 MAR),或类似的外遗传元件,例如 STAR 元件(例如诸如 Otte 等,Biotechnol. Prog. 23:801-807,2007 中披露的那些 STAR 元件)。不限于理论,认为 MAR 介导靶 DNA 序列锚定至细胞核基质,产生染色质环域,其自异染色质核心向外延伸。虽然 MAR 不含任何明显的共有或可识别序列,但是它们最一致的特征表现为总体上高的 A/T 含量,和另一条链上占优势的 C 碱基。这些区域表现为形成弯曲的二级结构,其可能倾向于链分开,而且可以包含能充当链分开的成核点的核心解旋元件(CUE)。已经将数个简单的富含 AT 的序列基序与 MAR 序列联系起来:例如 A 框、T 框、DNA 解链基序、SATB1 结合位点(H 框,A/T/C25)和脊椎动物或果蝇属(*Drosophila*)的共有拓扑异构酶 II 位点。例示性 MAR 序列记载于已公布的美国专利申请 No. 20070178469 和国际专利申请 No. W002/074969(通过提及而将其收入本文)。可以用于增强编码 PreF 抗原的核酸表达的别的 MAR 序列包括鸡溶菌酶 MAR、MARp1-42、MARp1-6、MARp1-68、和 MARpx-29,其记载于 Girod 等,Nature Methods,4:747-753,2007(分别以 GenBank 登录号 EA423306、DI107030、DI106196、DI107561、和 DI106512 披露)。技术人员会领会,可以通过选择产生中间水平增强的 MAR(如关于 MAR 1-9 报告的)来进一步调控表达。若想要的话,可以通过搜索序列数据库,例如使用诸如 MAR-Finder(在网络上于 futuresoft.org/MarFinder 可获得)、SMARTest(在网络上于 genomatix.de 可获得)、或 SMARScan I(Levitsky 等,Bioinformatics15:582-592,1999)等软件来鉴定用于提高 PreF 抗原表达的备选 MAR 序列。在某些实施方案中,在与 PreF 抗原编码序列相同的核酸(例如载体)上将 MAR 导入(例如转染)宿主细胞中。在一个备选的实施方案中,在不同的核酸上(例如反式)将 MAR 导入,并且任选地,它可以与 PreF 抗原编码多核苷酸序列共整合。

[0102] 足以指导本领域普通技术人员完成重组 PreF 抗原核酸生成的例示性规程可以参见 Sambrook 等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第 2 版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989;Sambrook 等,Molecular Cloning:ALaboratory Manual,第 3 版,Cold Spring Harbor Press,2001;Ausubel 等,Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates,1992(和至 2003 年的增补);及 Ausubel 等,Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,第 4 版,Wiley & Sons,1999。

[0103] 编码 PreF 抗原多肽的例示性核酸以 SEQ ID NO:5、7、9、12 和 13 表示。可以通过

装配选自任何已知的（或随后）发现的 RSV 毒株的类似的 F 和 G 蛋白多肽序列来生成别的变体，例如如 W02008114149 中所披露的。本领域技术人员可以生成与例示性变体共享序列同一性的别的序列变体。典型地，核酸变体会编码相差不超过 1%、或 2%、或 5%、或 10%、或 15%、或 20% 的氨基酸残基的多肽。也就是说，编码的多肽共享至少 80%、或 85%、更常见地，至少约 90% 或更多，诸如 95%，或者甚至 98% 或 99% 序列同一性。本领域技术人员会立即理解的是，编码 PreF 多肽的多核苷酸序列本身可以由于遗传密码冗余而共享较少的序列同一性。在一些例子中，PreF 抗原相对于衍生其的天然存在的毒株的氨基酸序列具有一处或多处氨基酸修饰（例如在上述稳定化修饰外）。此类差异可以分别是一个或多个核苷酸或氨基酸的添加、删除或替代。变体通常相差不超过约 1%、或 2%、或 5%、或 10%、或 15%、或 20% 的核苷酸残基。例如，与例示性 PreF 抗原核酸 SEQ ID NO :5、7、9、12 和 / 或 13 相比，变体 PreF 抗原（包括 PreF-G）核酸可以包含 1、或 2、或多至 5、或多至约 10、或多至约 15、或多至约 50、或多至约 100 处核苷酸差异。如此，RSV F 或 G 蛋白，或 PreF 抗原（包括 PreF-G 抗原）核酸背景中的变体通常与参照序列（例如 SEQ ID NO :1、3、5、7、9、12 或 13 中显示的参照序列，或本文所公开的任何其它例示性 PreF 抗原核酸）共享至少 80%、或 85%，更常见地，至少约 90% 或更多，诸如 95%，或甚至 98% 或 99% 序列同一性。作为本公开内容特征包括的别的变体是包含选自 W02008114149 中所披露的天然存在变体的核苷酸序列整个或部分的 PreF 抗原（包括 PreF-G 抗原）。别的变体可以经由遗传漂变生成，或者可以使用定点或随机诱变，或者通过重组两种或更多种先前存在的变体来人工生成。此类别的变体在本文所公开的 PreF（和 PreF-G）抗原的背景中也是合适的。

[0104] 在先前所描述的变体核酸外，还可以使用与以 SEQ ID NO :1、3、5、7、9、12 和 13 表示的一种或多种例示性核酸杂交的核酸来编码 PreF 抗原。本领域技术人员会领会，在上文所描述的 % 序列同一性测量外，两种核酸间的序列相似性的另一项指示是杂交能力。两种核酸的序列越相似，它们会杂交的条件越严格。杂交条件的严格性是序列依赖性的，并且在不同环境参数下是不同的。如此，产生特定程度的严格性的杂交条件会随选择的杂交方法的性质和杂交的核酸序列的组成和长度而变化。一般而言，杂交温度和杂交缓冲液的离子强度（尤其是  $\text{Na}^+$  和 / 或  $\text{Mg}^{++}$  浓度）会决定杂交的严格性，虽然清洗时间也影响严格性。一般而言，严格条件选择为比特定序列在规定离子强度和 pH 的热解链温度 ( $T_m$ ) 低约 5°C 至 20°C。  $T_m$  是 50% 的靶序列与完全匹配的探针杂交的温度（在规定的离子强度和 pH 下）。用于核酸杂交的条件和严格性的计算可以参见例如 Sambrook 等, *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001 ;Tijssen, *Hybridization With Nucleic Acid Probes, Part I :Theory and Nucleic Acid Preparation*, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993 ; 和 Ausubel 等 *Short Protocols in Molecular Biology*, 第 4 版, John Wiley & Sons, Inc., 1999。

[0105] 出于本公开内容的目的，“严格条件”涵盖杂交仅会在杂交分子与靶序列之间有小于 25% 的错配时发生的条件。为了更精确的定义，“严格条件”可以分成特定的严格性水平。如此，如本文中所使用的，“中等严格性”条件指具有超过 25% 序列错配的分子不会杂交的条件；“中间严格性”条件指错配超过 15% 的分子不会杂交的条件，而“高严格性”条件指错配超过 10% 的序列不会杂交的条件。“非常高的严格性”条件指错配超过 6% 的序列不会杂

交的条件。比较而言,在“低严格性条件”下杂交的核酸包括具有少得多的序列同一性,或仅在核酸的短的亚序列里具有序列同一性的核酸。因此,应当理解,由本公开内容所涵盖的核酸的各种变体能够在基本上其整个长度里与 SEQ ID NO :1、3、5、7、9、和 / 或 12 的至少一项杂交。

#### [0106] 生成 RSV 抗原性多肽的方法

[0107] 使用用于表达和纯化重组蛋白的完善建立的规程来生成本文所公开的 PreF 抗原 (包括 PreF-G 抗原,和在可适用的情况中还包括 G 抗原)。足以指导本领域技术人员的规程可以参见下列参考文献: Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 200; 及 Ausubel 等 *Short Protocols in Molecular Biology*, 第 4 版, John Wiley & Sons, Inc., 1999。下文提供了另外的和具体的详情。

[0108] 通过许多公知的规程之任一种,诸如电穿孔、脂质体介导的转染 (例如使用商品化脂质体转染试剂诸如 LIPOFECTAMINE™2000 或 TRANSFECTIN™)、磷酸钙沉淀、感染、转染等 (这取决于载体和宿主细胞的选择) 来将编码 PreF 抗原的重组核酸导入宿主细胞中。SEQ ID NO :5、7、9、12 和 13 中提供了编码 PreF 抗原 (包括 PreF-G 抗原) 的例示性核酸。本领域技术人员会领会, SEQ ID NO :5、7、9、12 和 13 是例示性的,并不意图是限制性的。例如,可以容易地使用与 SEQ ID NO :5、7 和 9 编码相同蛋白质 (例如以 SEQ ID NO :6、8 和 10 表示),但是差别仅在于遗传密码冗余 (诸如备选密码子优化,如 SEQ ID NO :12 中所显示) 的多核苷酸序列来代替例示性序列 SEQ ID NO :5、7、和 9。类似地,可以采用包含表达增强元件诸如内部定位的内含子 (或者通过添加启动子、增强子、内含子或其它类似的元件) 的多核苷酸序列,如 SEQ ID NO :13 中所显示。本领域普通技术人员会认可,此类修饰的组合是同样合适的。类似地,也可以使用选自任何 RSV A 或 RSV B 毒株的同源序列和 / 或共享实质的序列同一性的其它序列 (如上文所讨论的) 来表达 PreF 抗原。确实,可以合适地将先前所公开的任何变体核酸导入宿主细胞中,并用于生成 PreF 抗原 (包括 PreF-G 抗原) 和可适用情况中的 G 多肽。

[0109] 如此,包含重组 PreF 抗原编码核酸的宿主细胞也是本公开内容的特征。有利的宿主细胞包括原核 (即细菌) 宿主细胞诸如大肠杆菌,以及许多真核宿主细胞,包括真菌 (例如酵母诸如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)) 细胞、昆虫细胞、植物细胞、和哺乳动物细胞 (诸如 CHO 和 HEK293 细胞)。将重组 PreF 抗原核酸导入 (例如转导、转化或转染) 宿主细胞中,例如经由载体诸如表达载体。如上文所描述的,载体最通常是质粒,但是此类载体也可以是例如病毒颗粒、噬菌体等。合适的表达宿主的例子包括:细菌细胞诸如大肠杆菌、链霉菌属 (*Streptomyces*)、和鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*);真菌细胞,诸如酿酒酵母、巴斯德毕赤酵母、和粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*);昆虫细胞诸如果蝇属和草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*);哺乳动物细胞诸如 3T3、COS、CHO、BHK、HEK293 或 Bowes 黑素瘤;植物细胞,包括藻类细胞等。

[0110] 可以在为了激活启动子、选择转化体、或者扩增所插入的多核苷酸序列而酌情修饰的常规营养培养基中培养宿主细胞。培养条件诸如温度、pH 等通常是那些先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的条件,而且对于本领域技术人员会是显而易见的,并且在本

文所引用的参考文献中,包括例如 Freshney(1994)Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique,第三版, Wiley-Liss, New York 及其中所引用的参考文献。也可以非动物细胞诸如植物、酵母、真菌、细菌等中生成与本发明的核酸对应的表达产物。在 Sambrook, Berger 和 Ausubel 外,关于细胞培养的详情可以参见 Payne 等 (1992)Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg 和 Phillips(编)(1995)Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag(Berlin Heidelberg New York) 及 Atlas 和 Parks(编)The Handbook of Microbiological Media(1993) CRC Press, Boca Raton, FL。

[0111] 在细菌系统中,可以根据所表达产物预期的用途来选择许多表达载体。例如,当需要大量多肽或其片段来生成抗体时,有利地采用指导容易纯化的融合蛋白高水平表达的载体。此类载体包括但不限于多功能大肠杆菌克隆和表达载体诸如 BLUESCRIPT(Stratagene),其中可以将感兴趣的编码序列(例如如上文所描述的本发明的多核苷酸)与氨基端翻译起始甲硫氨酸和随后  $\beta$ -半乳糖苷酶的 7 个残基的序列以符合读码框方式连接入载体中,生成有催化活性的  $\beta$ -半乳糖苷酶融合蛋白;pIN 载体 (Van Heeke 和 Schuster(1989) J Biol Chem 264 :5503-5509); pET 载体 (Novagen, Madison WI),其中将氨基端甲硫氨酸以符合读码框方式与组氨酸标签连接;等。

[0112] 类似地,在酵母诸如酿酒酵母中,可以使用许多含有组成性或诱导型启动子诸如  $\alpha$  因子、醇氧化酶和 PGH 的载体来生成想要的表达产物。关于综述,参见 Berger、Ausubel、和例如 Grant 等 (1987; Methods in Enzymology 153 :516-544)。在哺乳动物宿主细胞中,可以利用许多表达系统,包括质粒和基于病毒的系统两者。

[0113] 任选地,对宿主细胞选择其调控所插入序列表达或者以想要的方式加工所表达蛋白质的能力。对蛋白质的此类修饰包括但不限于糖基化(以及例如乙酰化、羧基化、磷酸化、脂质化 (lipidation) 和酰化)。任选地,在宿主细胞的背景中实施翻译后加工,例如其将前体形式切割成蛋白质的成熟形式(例如通过弗林蛋白酶)。不同宿主细胞诸如 3T3、COS、CHO、HeLa、BHK、MDCK、293、WI38 等针对此类翻译后活性具有特定的细胞机器 (machinery) 和特征性机制,并且可以进行选择以确保对所导入的、外来蛋白质的正确修饰和加工。

[0114] 为了本文所公开的重组 PreF 抗原的长期的、高产量生成,通常使用稳定的表达系统。例如,使用含有病毒复制起点或内源表达元件和选择标志基因的表达载体来将稳定表达 PreF 抗原多肽的细胞系引入宿主细胞中。导入载体后,容许细胞在滋养培养基中生长 1-2 天,之后将其转换至选择培养基。选择标志的目的是赋予对选择的抗性,并且其存在容许成功表达所导入序列的细胞的生长和回收。例如,可以使用适合于细胞类型的组织培养技术来增殖稳定转化细胞的抗性组或集落。任选地,在适合于自细胞培养物表达和回收所编码蛋白质的条件下培养用编码 PreF 抗原的核酸转化的宿主细胞。

[0115] 转导合适的宿主细胞系并将宿主细胞培养至合适的细胞密度后,通过合适的手段(例如温度变动或化学诱导)来诱导选定的启动子,并将细胞再培养一段时间。任选地,培养基包含降低蛋白酶降解所表达蛋白质的成分和/或添加剂。例如,用于培养细胞以生成 PreF 抗原的培养基可以包含蛋白酶抑制剂,诸如螯合剂或小分子抑制剂(例如



AZ11557272、AS111793 等) 以降低或消除由细胞、或细胞外(例如基质)蛋白酶进行的不想要的切割。

[0116] 然后自培养液回收所分泌的多肽产物。或者,可以通过离心来收获细胞,通过物理或化学手段来破坏细胞,并保留所得的粗制提取物用于进一步纯化。可以通过任何便利的方法来破坏蛋白质表达中所采用的真核或微生物细胞,包括冷冻-融化循环、超声处理、机械破坏、或者使用细胞裂解剂、或者其它方法,其对于本领域技术人员是公知的。

[0117] 可以通过本领域公知的许多方法之任一种来从重组细胞培养物回收和纯化所表达的 PreF 抗原,包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、过滤、超滤、离心、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水性相互作用层析、亲和层析(例如使用本文所记录的任何加标签系统)、羟磷灰石层析、和凝集素层析。根据需要,可以在完成成熟蛋白质的构型中使用蛋白质重折叠步骤。最后,可以在最终的纯化步骤中采用高效液相层析(HPLC)。在上文所记录的参考文献外,多种纯化方法是本领域公知的,包括例如下列文献列出的:Sandana(1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; 和 Bollag 等(1996) Protein Methods, 第2版 Wiley-Liss, NY; Walker (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris 和 Angal(1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, U. K.; Scopes(1993) Protein Purification: Principles and Practice 第3版 Springer Verlag, NY; Janson 和 Ryden(1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, 第二版 Wiley-VCH, NY; 及 Walker(1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ。

[0118] 在某些例子中,经由适合于在原核细胞(例如大肠杆菌细胞)中导入和表达的载体来将核酸导入细胞中。例如,可以将包含编码 PreF 抗原的多核苷酸序列的核酸导入多种商品化或专有载体诸如 pET 表达载体系列(例如 pET9b 和 pET2d)之任一种中。IPTG 可诱导编码序列的表达,产生高水平的蛋白质表达。在噬菌体 T7 启动子下转录编码 PreF 抗原的多核苷酸序列。备选的载体诸如包含热诱导型  $\lambda$  pL 启动子的 pURV22 也是合适的。

[0119] 将表达载体导入(例如通过电穿孔)合适的细菌宿主中。许多合适的大肠杆菌菌株是可用的,并且可以由本领域技术人员进行选择(例如,已经证明了 Rosetta 和 BL21(DE3) 菌株对于表达含有编码 PreF 抗原的多核苷酸序列的重组载体是有利的)。

[0120] 更典型地,将编码 PreF 抗原的多核苷酸掺入适合于在真核(例如昆虫或哺乳动物细胞)中导入和表达的载体中。有利地,对此类核酸进行密码子优化以在选定的载体/宿主细胞中表达(例如,对 SEQ ID NO:5、7、9 和 12 中显示的序列进行密码子优化以在 CHO 细胞中表达)。在一个例示性的实施方案中,将编码 PreF 抗原的多核苷酸序列导入载体中,诸如由 Lonza Biologicals 公司开发的 pEE14 载体。在组成性启动子诸如立即早期 CMV(巨细胞病毒)启动子下表达多肽。基于经转染的细胞在没有谷氨酰胺来源的情况中生长的能力来进行对表达多肽的经稳定转染的细胞的选择。已经成功整合 pEE14 的细胞能够在没有外源谷氨酰胺的情况中生长,因为 pEE14 载体表达 GS(谷氨酰胺合成酶)酶。可以对选定的细胞进行克隆扩充,并表征想要的 PreF 多肽的表达。

[0121] 在另一个例子中,使用杆状病毒表达载体系统(BEVS)来将编码 PreF 抗原的多核苷酸序列导入昆虫细胞中。可以使用商品化载体、试剂盒和/或系统,诸如来自 BD BioScience 的 BD BaculoGold 系统来生成能够感染昆虫细胞的重组杆状病毒。简言之,

将编码抗原的多核苷酸序列插入 pAcSG2 转移载体中。然后,通过 pAcSG2 嵌合质粒和 BD BaculoGold(含有杆状病毒苜蓿银蚊夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 的线性化基因组 DNA) 共转染宿主细胞 SF9(草地夜蛾)。转染后,pAcSG2 质粒与杆状病毒基因组之间发生同源重组以生成重组病毒。在一个例子中,在多角体蛋白启动子 (pH) 的调节控制下表达 PreF 抗原。可以使用其它启动子诸如基本的 (Ba) 和 p10 启动子来生成类似的转移载体。类似地,可以采用备选的昆虫细胞,诸如与 Sf9 紧密相关的 SF21,和自甘蓝尺蠖,即粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 衍生的 High Five 细胞系。

[0122] 转染和诱导表达(依照选定的启动子和/或增强子或其它调节元件)后,将所表达的多肽回收(例如纯化或富集),并复性以确保折叠成有抗原性活性的融合前构象。

#### [0123] 免疫原性组合物和方法

[0124] 还提供了免疫原性组合物,其包含上文所公开的任何 PreF 抗原(诸如那些以 SEQ ID NO:6、8 和 10 例示的)和药学可接受载体或赋形剂。

[0125] 在某些实施方案中,典型地,在 PreF 抗原不包含 G 蛋白构件(诸如 SEQ IDNO:6)的实施方案中,免疫原性组合物可以包含分离的、重组的和/或纯化的 G 蛋白。本领域中已经描述了许多合适的 G 蛋白,并且包括全长重组 G 蛋白和由 G 蛋白的一部分(诸如氨基酸 128-229 或 130-230)和融合配偶(诸如硫氧还蛋白)、或信号和/或前导序列(其便于表达和/或纯化)构成的嵌合蛋白。与 PreF 抗原混合使用的例示性 G 蛋白可以参见 W02008114149、美国专利 No. 5,149,650、美国专利 No. 6,113,911、美国已公布的申请 No. 20080300382、和美国专利 No. 7,368,537,通过提及而将每篇收入本文。如关于嵌合 PreF-G 蛋白所指明的,可以在牵涉 PreF(没有 G)和 G 的混合物的背景中有利地采用 G 蛋白的更小片段,诸如氨基酸 149-229 之间的部分,或约 128 至约 229 之间的部分。如上文所讨论的,重要的考虑是免疫优势表位的存在,例如包含在氨基酸 183-197 的区域内的。或者,可以在此类组合物中采用全长 G 蛋白。

[0126] 药学可接受载体和赋形剂是公知的,并且可以由本领域技术人员进行选择。例如,载体或赋形剂可以有利地包括缓冲剂。任选地,载体或赋形剂还含有至少一种稳定溶解度和/或稳定性的成分。增溶剂/稳定剂的例子包括去污剂,例如月桂树肌氨酸和/或 Tween。备选的增溶剂/稳定剂包括精氨酸和玻璃形成多元醇(诸如蔗糖、海藻糖等)。许多药学可接受载体和/或药学可接受赋形剂是本领域已知的,并且记载于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第 5 版 (975)。

[0127] 因而,本领域技术人员可以选择合适的赋形剂和载体以产生适合于通过选定的施用路径向受试者投递的配制剂。

[0128] 合适的赋形剂包括但不限于:甘油、聚乙二醇 (PEG)、山梨糖醇、海藻糖、N-月桂酰肌氨酸钠盐、L-脯氨酸、非去污剂磺基甜菜碱、盐酸胍、脲、三甲胺氧化物、KCl、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和其它二价阳离子相关盐、二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇 (Dithioerytrol)、和 β-巯基乙醇。其它赋形剂可以是去污剂(包括:Tween80、Tween20、Triton X-00、NP-40、Empigen BB、辛基葡糖苷、月桂酰麦芽糖苷、Zwittergent 3-08、Zwittergent 3-0、Zwittergent3-2、Zwittergent 3-4、Zwittergent 3-6、CHAPS、去氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠、溴化十六烷基三甲铵)。

[0129] 任选地,免疫原性组合物还包含佐剂。在适合于对受试者施用以引发针对 RSV 的

保护性免疫应答的免疫原性组合物的背景中,对佐剂进行选择以引发 Th1 偏爱性免疫应答。

[0130] 通常对佐剂进行选择以在接受组合物施用的受试者或受试者群体中增强 Th1 偏爱性免疫应答。例如,在要对 RSV 感染易感(或者有升高风险的)的特定年龄组的受试者施用免疫原性组合物时,佐剂选择为在受试者或受试者群体中是安全且有效的。如此,在配制含有 RSV PreF 抗原的免疫原性组合物以在老年受试者(诸如年龄大于 65 岁的受试者)中施用,佐剂选择为在老年受试者中是安全且有效的。类似地,在含有 RSV PreF 抗原的免疫原性组合物意图用于在新生儿或婴儿受试者(诸如在出生和年龄为两岁之间的受试者)中施用,佐剂选择为在新生儿和婴儿中是安全且有效的。

[0131] 另外,通常对佐剂进行选择以在经由施用免疫原性组合物的施用路径施用,增强 Th1 免疫应答。例如,在配制含有 PreF 抗原的免疫原性组合物用于鼻施用,蛋白体和 Protollin 是有利的 Th1 偏爱性佐剂。比较而言,在将免疫原性组合物配制用于肌肉施用,有利地选择包括下列一项或多项的佐剂:3D-MPL、鲨烯(例如 QS21)、脂质体、和/或油和水乳剂。

[0132] 一种适合于与 PreF 抗原组合使用的佐剂是非毒性细菌脂多糖衍生物。合适的脂质 A 非毒性衍生物的例子是单磷酸脂质 A 或者更具体的是,3-脱酰单磷酸(monophosphoryl)脂质 A(3D-MPL)。3D-MPL 由 GlaxoSmithKline Biologicals N.A. 以名称 MPL 出售,并且贯穿整个文件称为 MPL 或 3D-MPL。参见例如,美国专利 No. 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 和 4,912,094。3D-MPL 主要促进具有 IFN- $\gamma$  (Th1) 表型的 CD4+T 细胞应答。可以依照 GB2220211A 中所披露的方法来生成 3D-MPL。在化学上,它是具有 3、4、5 或 6 条酰化链的 3-脱酰单磷酸脂质 A 的混合物。在本发明的组合物中,可以使用小颗粒 3D-MPL。小颗粒 3D-MPL 具有如下颗粒大小,使得其可以无菌过滤流过 0.22  $\mu\text{m}$  滤器。此类制备物记载于 W094/21292。

[0133] 可以以每人剂量的免疫原性组合物 1 和 50  $\mu\text{g}$  之间的量使用脂多糖诸如 3D-MPL。可以以约 25  $\mu\text{g}$ , 例如 20-30  $\mu\text{g}$  之间,合适地 21-29  $\mu\text{g}$  之间或 22 和 28  $\mu\text{g}$  之间或 23 和 27  $\mu\text{g}$  之间或 24 和 26  $\mu\text{g}$  之间,或 25  $\mu\text{g}$  的水平使用此 3D-MPL。在另一个实施方案中,人剂量的免疫原性组合物包含在约 10  $\mu\text{g}$ , 例如 5 和 15  $\mu\text{g}$  之间,合适地 6 和 14  $\mu\text{g}$  之间,例如 7 和 13  $\mu\text{g}$  之间或 8 和 12  $\mu\text{g}$  之间或 9 和 11  $\mu\text{g}$  之间,或 10  $\mu\text{g}$  的水平使用 3D-MPL。在又一个实施方案中,人剂量的免疫原性组合物包含在约 5  $\mu\text{g}$ , 例如 1 和 9  $\mu\text{g}$  之间,或 2 和 8  $\mu\text{g}$  之间或者合适地 3 和 7  $\mu\text{g}$  之间或 4 和  $\mu\text{g}$  之间,或 5  $\mu\text{g}$  的 3D-MPL。

[0134] 在其它实施方案中,脂多糖可以是  $\beta$  (1-6) 葡糖胺二糖,如记载于美国专利 No. 6,005,099 和 EP 专利 No. 0 729 473 B1。基于这些参考文献的教导,本领域技术人员会容易地能够生成各种脂多糖,诸如 3D-MPL。尽管如此,通过提及而将每篇这些参考文献收入本文。在前述免疫刺激物(其在结构上与 LPS 或 MPL 或 3D-MPL 类似)外,作为上述 MPL 结构的亚部分的酰化单糖和二糖衍生物也是合适的佐剂。在其它实施方案中,佐剂是脂质 A 的合成衍生物,其中一些被描述为 TLR-4 激动剂,并且包括但不限于: OM174(2-脱氧-6-o-[2-脱氧-2-[(R)-3-十二烷酰基氧基四-癸酰基氨基]-4-o-磷酸基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基]-2-[(R)-3-羟基四癸酰基氨基]- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖基磷酸二氢酯)(W095/14026); OM 294DP(3S,9R)-3--[(R)-十二烷酰基氧基四癸酰基氨

基]-4-氧-5-氮-9(R)-[(R)-3-羟基四癸酰基氨基]癸-1,10-二醇,1,10-二(磷酸二氢酯)(W099/64301和W000/0462);和OM197MP-AcDP(3S-,9R)-3-[(R)-十二烷酰基氧基四-癸酰基氨基]-4-氧-5-氮-9-[(R)-3-羟基四癸酰基氨基]癸-1,10-二醇,1-磷酸二氢酯10-(6-氨基己酸酯)(W001/46127)。

[0135] 可以使用的其它TLR4配体是羟基氨基葡萄糖苷磷酸酯(AGP)诸如那些在W098/50399或美国专利No.6,303,347(还披露了用于制备AGP的方法)中披露的,合适地,RC527或RC529或AGP的药学可接受盐,如美国专利No.6,764,840中所披露的。一些AGP是TLR4激动剂,而一些是TLR4拮抗剂。认为两者作为佐剂都是有用的。

[0136] 能够经由TLR-4引起信号传导应答(Sabroe等,JI2003p1630-5)的其它合适的TLR-4配体是例如来自革兰氏阴性细菌的脂多糖及其衍生物,或其片段,特别是LPS的非毒性衍生物(诸如3D-MPL)。其它合适的TLR激动剂是:热休克蛋白(HSP)10、60、65、70、75或90;表面活性剂蛋白A、乙酰透明质酸寡糖、硫酸乙酰肝素片段、纤连蛋白片段、血纤蛋白原肽和b-防卫素-2、和胞壁酰二肽(MDP)。在一个实施方案中,TLR激动剂是HSP60、70或90。其它合适的TLR-4配体如记载于W02003/011223和W02003/099195,诸如W02003/011223的第4页-第5页上或W02003/099195的第3页-第4页上披露的化合物I、化合物II和化合物III和特别是W02003/011223中披露为ER803022、ER803058、ER803732、ER804053、ER804057、ER804058、ER804059、ER804442、ER804680、和ER804764的那些化合物。例如,一种合适的TLR-4配体是ER804057。

[0137] 别的TLR激动剂作为佐剂也是有用的。术语“TLR激动剂”指能够经由TLR信号传导途径引起信号传导应答(或是作为直接的配体或是间接地经由生成内源或外源配体)的药剂。可以使用此类天然的或合成的TLR激动剂作为备选的或别的佐剂。Kaisho和Akira, *Biochimica et Biophysica Acta*1589:1-13,2002中提供了TLR作为佐剂受体的作用的简短综述。这些潜在佐剂包括但不限于TLR2、TLR3、TLR7、TLR8和TLR9的激动剂。因而,在一个实施方案中,佐剂和免疫原性组合物进一步包含选自下组的佐剂:TLR-1激动剂、TLR-2激动剂、TLR-3激动剂、TLR-4激动剂、TLR-5激动剂、TLR-6激动剂、TLR-7激动剂、TLR-8激动剂、TLR-9激动剂、或其组合。

[0138] 在本发明的一个实施方案中,使用能够经由TLR-1引起信号传导应答的TLR激动剂。合适地,能够经由TLR-1引起信号传导应答的TLR激动剂选自:三酰化脂肽(LP);酚可溶性调控蛋白(modulin);结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)LP;三盐酸S-(2,3-二(棕榈酰基氧基)-(2-RS)-丙基)-N-棕榈酰基-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH(Pam3Cys)LP(其模拟细菌脂蛋白的乙酰化氨基端)和来自布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)的OspALP。

[0139] 在一个备选的实施方案中,使用能够经由TLR-2引起信号传导应答的TLR激动剂。合适地,能够经由TLR-2引起信号传导应答的TLR激动剂是下列一项或多项:来自结核分枝杆菌、布氏疏螺旋体或苍白密螺旋体(*T pallidum*)的脂蛋白、肽聚糖、细菌脂肽;来自包括金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的物种的肽聚糖;脂磷壁酸质类、甘露糖醛酸类、奈瑟氏球菌(*Neisseria*)孔蛋白、细菌菌毛、耶尔森氏菌(*Yersinia*)毒力因子、CMV病毒体、麻疹血细胞凝集素、和来自酵母的酵母聚糖。

[0140] 在一个备选的实施方案中,使用能够经由TLR-3引起信号传导应答的TLR激动剂。

合适地,能够经由 TLR-3 引起信号传导应答的 TLR 激动剂是双链 RNA (dsRNA)、或聚肌苷酸胞苷酸 (Poly IC),一种与病毒感染有关的分子核酸样式。

[0141] 在一个备选的实施方案中,使用能够经由 TLR-5 引起信号传导应答的 TLR 激动剂。合适地,能够经由 TLR-5 引起信号传导应答的 TLR 激动剂是细菌鞭毛蛋白。

[0142] 在一个备选的实施方案中,使用能够经由 TLR-6 引起信号传导应答的 TLR 激动剂。合适地,能够经由 TLR-6 引起信号传导应答的 TLR 激动剂是分枝杆菌脂蛋白、二酰化 LP、和酚可溶性调控蛋白。别的 TLR6 激动剂记载于 WO 2003/043572。

[0143] 在一个备选的实施方案中,使用能够经由 TLR-7 引起信号传导应答的 TLR 激动剂。合适地,能够经由 TLR-7 引起信号传导应答的 TLR 激动剂是单链 RNA (ssRNA)、洛索立宾 (loxoribine)、在位置 N7 和 C8 的鸟苷类似物、或咪唑喹啉化合物、或其衍生物。在一个实施方案中,TLR 激动剂是咪喹莫特 (imiquimod)。别的 TLR7 激动剂记载于 WO 2002/085905。

[0144] 在一个备选的实施方案中,使用能够经由 TLR-8 引起信号传导应答的 TLR 激动剂。合适地,能够经由 TLR-8 引起信号传导应答的 TLR 激动剂是单链 RNA (ssRNA)、具有抗病毒活性的咪唑喹啉分子,例如瑞喹莫德 (resiquimod, R848);瑞喹莫德也能够被 TLR-7 识别。可以使用的其它 TLR-8 激动剂包括记载于 WO 2004/071459 的。

[0145] 在一个备选的实施方案中,使用能够经由 TLR-9 引起信号传导应答的 TLR 激动剂。在一个实施方案中,能够经由 TLR-9 引起信号传导应答的 TLR 激动剂是 HSP90。或者,能够经由 TLR-9 引起信号传导应答的 TLR 激动剂是细菌或病毒 DNA、含有未甲基化的 CpG 核苷酸的 DNA,特别是称为 CpG 基序的序列背景。含有 CpG 的寡核苷酸主要诱导 Th1 应答。此类寡核苷酸是公知的,并且记载于例如 WO 96/02555、WO 99/33488 和美国专利 No. 6,008,200 和 5,856,462。合适地,CpG 核苷酸是 CpG 寡核苷酸。在本发明的免疫原性组合物中使用的合适的寡核苷酸是含有 CpG 的寡核苷酸,任选地,其含有由至少三个,合适地,至少六个或更多个核苷酸分开的两个或更多个二核苷酸 CpG 基序。CpG 基序是胞嘧啶核苷酸后面跟着鸟嘌呤核苷酸。本发明的 CpG 寡核苷酸通常是脱氧核苷酸。在一个具体的实施方案中,寡核苷酸中的核苷酸间键是二硫代磷酸酯,或者合适的是硫代磷酸酯键,虽然磷酸二酯和其它核苷酸间键在本发明的范围内。还包括在本发明的范围内的是具有混合的核苷酸间连接的寡核苷酸。用于产生硫代磷酸酯寡核苷酸或二硫代磷酸酯的方法记载于美国专利 No. 5,666,153、5,278,302 和 WO 95/26204。

[0146] 可以在具有 PreF 抗原的免疫原性组合物中使用(例如单独地或者与 3D-MPL 或本文所描述的其它佐剂组合地)的其它佐剂是皂苷类,诸如 QS21。

[0147] 皂苷类参见:Lacaille-Dubois, M 和 Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* 第2卷第 363 页 - 第 386 页)。皂苷类是植物和海洋动物王国中广泛分布的类固醇或三萜糖苷。皂苷类记录用于在水中形成胶体溶液(其在摇动时起泡沫)及用于沉淀胆固醇。当皂苷类接近细胞膜时,它们在膜上产生引起膜爆裂的孔样结构。红细胞溶血是此现象的一个例子,其是某些但不是所有皂苷类的特性。

[0148] 已知皂苷类为供系统施用的疫苗中的佐剂。本领域中已经广泛研究了各种皂苷的佐剂和溶血活性(Lacaille-Dubois 和 Wagner, 见上文)。例如,QuilA(衍生自南美乔木皂皮树(*Quillaja Saponaria* Molina)的树皮)及其级分记载于 US 5,057,540 和

“Saponins as vaccine adjuvants”, Kensil, C.R., Crit Rev TherDrug Carrier Syst, 1996, 12(1-2):1-55; 及 EP 0 362 279 B1。包含 Quil A 级分的颗粒结构 (称作免疫刺激性复合物 (ISCOMS)) 是溶血的, 并且已经在疫苗的制造中使用 (Morein, B., EP 0 109 942 B1; WO 96/11711; WO 96/33739)。溶血性皂苷类 QS21 和 QS17 (HPLC 纯化的 Quil A 级分) 已经被描述为有力的系统佐剂, 并且其生产方法披露于美国专利 No. 5, 057, 540 和 EP 0 362 279 B1, 通过提及而将其收入本文。已经在系统疫苗接种研究中使用的其它皂苷类包括衍生自其它植物物种诸如丝石竹 (*Gypsophila*) 和肥皂草 (*Saponaria*) 的 (Bomford 等, *Vaccine*, 10(9):572-577, 1992)。

[0149] QS21 是皂皮树树皮衍生的 Hplc 纯化的非毒性级分。美国专利 No. 5, 057, 540 中披露了用于生成 QS21 的方法。含有 QS21 的非反应原性佐剂配制剂记载于 WO 96/33739。通过提及而将前述参考文献收入本文。可以以每人剂量的免疫原性组合物 1 和 50  $\mu$ g 之间的量使用所述免疫学活性皂苷诸如 QS21。有利地, 以约 25  $\mu$ g, 例如 20-30  $\mu$ g 之间, 合适地, 21-29  $\mu$ g 之间或 22-28  $\mu$ g 之间或 23-27  $\mu$ g 之间或 24-26  $\mu$ g 之间, 或 25  $\mu$ g 的水平使用 QS21。在另一个实施方案中, 人剂量的免疫原性组合物包含在约 10  $\mu$ g, 例如 5 和 15  $\mu$ g 之间, 合适地 6-14  $\mu$ g 之间, 例如 7-13  $\mu$ g 之间或 8-12  $\mu$ g 之间或 9-11  $\mu$ g 之间, 或 10  $\mu$ g 的水平使用 QS21。在又一个实施方案中, 人剂量的免疫原性组合物包含在约 5  $\mu$ g, 例如 1-9  $\mu$ g 之间, 或 2-8  $\mu$ g 之间或者合适地 3-7  $\mu$ g 之间或 4-6  $\mu$ g 之间, 或 5  $\mu$ g 的 QS21。已经显示了包含 QS21 和胆固醇的此类配制剂在与抗原一起配制时是成功的 Th1 刺激性佐剂。如此, 例如, 可以在具有佐剂的免疫原性组合物中有利地采用 PreF 多肽, 所述佐剂包含 QS21 和胆固醇的组合。

[0150] 任选地, 佐剂还可以包括矿物盐诸如铝或钙盐, 特别是氢氧化铝、磷酸铝和磷酸钙。例如, 含有与铝盐 (例如氢氧化铝或“明矾”) 组合的 3D-MPL 的佐剂适合于在含有 PreF 抗原的免疫原性组合物中配制用于对人受试者施用。

[0151] 另一类适合于在具有 PreF 抗原的配制剂中使用的 Th1 偏爱性佐剂包括基于 OMP 的免疫刺激性组合物。基于 OMP 的免疫刺激性组合物作为粘膜佐剂例如用于鼻内施用是特别合适的。基于 OMP 的免疫刺激性组合物是一类来自革兰氏阴性细菌诸如但不限于奈瑟氏球菌物种的外膜蛋白 (OMP, 包括一些孔蛋白) 的制备物 (参见例如 Lowell 等, *J. Exp. Med.* 167:658, 1988; Lowell 等, *Science* 240:800, 1988; Lynch 等, *Biophys. J.* 45:104, 1984; Lowell, 于 “New Generation Vaccines” 第 2 版, Marcel Dekker, Inc., New York, Basil, Hong Kong, 第 193 页, 1997; 美国专利 No. 5, 726, 292; 美国专利 No. 4, 707, 543), 其作为载体或者在免疫原诸如细菌或病毒抗原的组合物中是有用的。一些基于 OMP 的免疫刺激性组合物可以称为“蛋白体”, 其是疏水性的, 并且供人使用是安全的。蛋白体具有自动装配成约 20nm 至约 800nm 的小囊泡或小囊泡样 OMP 簇的能力, 及非共价地与蛋白质抗原 (Ag), 特别是具有疏水性模块的抗原合并、协调、结合 (例如静电地或疏水地)、或以其它方式协作的能力。产生处于小囊泡或小囊泡样形式的外膜蛋白成分 (包括一种或多种 OMP 的多分子膜性结构或熔球样 OMP 组合物) 的任何制备方法包括在蛋白体的定义内。可以制备蛋白体, 例如如本领域中所描述的 (参见例如美国专利 No. 5, 726, 292 或美国专利 No. 5, 985, 284)。蛋白体还可以含有源于用于生成 OMP 孔蛋白的细菌 (例如奈瑟氏球菌物种) 的内源脂多糖或脂寡糖 (分别为 LPS 或 LOS), 其一般会小于 2% 的总 OMP 制备物。

[0152] 蛋白体主要由通过去污剂维持在溶液中的来自脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*) 的化学提取外膜蛋白 (OMP) (主要为孔蛋白 A 和 B 以及 4 类 OMP) 组成 (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. 于: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS 编, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206)。蛋白体可以与多种抗原诸如自病毒来源衍生的纯化的或重组的蛋白质 (包括本文所公开的 PreF 多肽) (例如通过渗滤或传统的透析方法得到) 一起配制。逐渐除去去污剂容许直径约 100-200nm 的颗粒疏水性复合物的形成 (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. 于: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS 编, New Generation Vaccines. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206)。

[0153] 如本文中所使用的, “蛋白体: LPS 或 Protollin” 指与至少一类脂多糖混合 (例如通过外源添加) 以提供 OMP-LPS 组合物 (其能发挥免疫刺激性组合物的功能) 的蛋白体制备物。如此, OMP-LPS 组合物可以由 Protollin 基本成分之两种构成, 其包括 (1) 自革兰氏阴性细菌诸如脑膜炎奈瑟氏球菌制备的蛋白体 (例如 Projuvant) 的外膜蛋白制备物, 和 (2) 一种或多种脂糖的制备物。脂寡糖可以是内源的 (例如与 OMP 蛋白体制备物天然包含在一起), 可以与来自外源制备的脂寡糖 (例如自与 OMP 制备物不同的培养物或微生物制备) 的 OMP 制备物混合或组合, 或者可以是其组合。此类外源添加的 LPS 可以来自制备 OMP 制备物的相同革兰氏阴性细菌或者来自不同革兰氏阴性细菌。还应当理解, 任选地, Protollin 包含脂质、糖脂、糖蛋白、小分子等, 及其组合。可以制备 Protollin, 例如如记载于美国专利申请公开文本 No. 2003/0044425 的。

[0154] 也可以在具有 PreF 抗原的组合物中使用不同佐剂诸如上文所提及的佐剂的组合。例如, 如已经记录的, 可以将 QS21 与 3D-MPL 配制在一起。QS21 : 3D-MPL 的比率通常会是大致 1 : 10 至 10 : 1; 诸如 1 : 5 至 5 : 1, 和经常基本上为 1 : 1。典型地, 比率在 2.5 : 1 至 1 : 1 3D-MPL : QS21 的范围中。另一种组合佐剂配制剂包含 3D-MPL 和铝盐, 诸如氢氧化铝。在组合配制时, 此组合能增强抗原特异性 Th1 免疫应答。

[0155] 在一些例子中, 佐剂配制剂包含水包油乳剂, 或矿物盐诸如钙或铝盐, 例如磷酸钙、磷酸铝或氢氧化铝。

[0156] 水包油乳剂的一个例子在水性载体中包含可代谢油, 诸如鲨烯、母育酚诸如生育酚 (例如  $\alpha$ -生育酚), 和表面活性剂诸如 Polysorbate 80 或 Tween 80, 并且不含任何别的免疫刺激物, 特别是它不含非毒性脂质 A 衍生物 (诸如 3D-MPL) 或皂苷 (诸如 QS21)。水性载体可以是例如磷酸盐缓冲盐水。另外, 水包油乳剂可以含有 Span 85 和 / 或卵磷脂和 / 或三辛酸甘油酯。

[0157] 在本发明的另一个实施方案中, 提供了一种疫苗组合物, 其包含抗原或抗原组合物和佐剂组合物, 所述佐剂组合物包含水包油乳剂和任选地, 一种或多种别的免疫刺激物, 其中所述水包油乳剂包含 0.5-10mg 可代谢油 (合适的是鲨烯)、0.5-11mg 母育酚 (合适的是生育酚, 诸如  $\alpha$ -生育酚) 和 0.4-4mg 乳化剂。

[0158] 在一个具体的实施方案中, 佐剂配制剂包含以乳剂诸如水包油乳剂形式制备的 3D-MPL。在一些情况中, 乳剂具有直径小于 0.2  $\mu$ m 的小颗粒大小, 如 WO 94/21292 中所披露的。例如, 3D-MPL 颗粒可以小得足以无菌过滤流过 0.22 微米膜 (如记载于欧洲专利号 0

689 454 的)。或者,可以在脂质体制剂中制备 3D-MPL。任选地,含有 3D-MPL(或其衍生物)的佐剂还包含别的免疫刺激性成分。

[0159] 例如,在将具有 PreF 多肽抗原的免疫原性组合物配制用于对婴儿施用,佐剂的剂量确定为在婴儿受试者中是有效且相对非反应原性的。一般而言,婴儿配制剂中的佐剂剂量低于设计用于对成人(例如年龄为 65 岁或更年长的成人)施用的配制剂中使用的剂量。例如,3D-MPL 的量通常在每剂  $1\ \mu\text{g}$ - $200\ \mu\text{g}$ , 诸如  $10$ - $100\ \mu\text{g}$ , 或  $10\ \mu\text{g}$ - $50\ \mu\text{g}$  的范围中。婴儿剂量通常在此范围(例如约  $1\ \mu\text{g}$  至约  $50\ \mu\text{g}$ , 诸如约  $2\ \mu\text{g}$ 、或约  $5\ \mu\text{g}$ 、或约  $10\ \mu\text{g}$  至约  $25\ \mu\text{g}$ 、或约  $50\ \mu\text{g}$ ) 的下端。典型地,在配制剂中使用 QS21 的情况中,范围是相当的(并且依照上文所指明的比率)。对于成人和老年人群体,配制剂通常包含比婴儿配制剂中通常找到的佐剂成分更多的佐剂成分。在使用水包油乳剂的特定配制剂中,此类乳剂可以包含别的成分,例如诸如胆固醇、鲨烯、 $\alpha$ -生育酚、和/或去污剂,诸如 Tween 80 或 Span 85。在例示性配制剂中,此类成分可以以下列量存在:约  $1$ - $50\text{mg}$  胆固醇、 $2$  至  $10\%$  鲨烯、 $2$  至  $10\%$   $\alpha$ -生育酚和  $0.3$  至  $3\%$  Tween 80。典型地,鲨烯: $\alpha$ -生育酚的比率等于或小于  $1$ , 因为这提供较稳定的乳剂。在一些情况中,配制剂还可以含有稳定剂。在存在明矾(例如与 3D-MPL 组合)的情况中,量通常在每剂约  $100\ \mu\text{g}$  和  $1\text{mg}$  之间,诸如约  $100\ \mu\text{g}$  或约  $200\ \mu\text{g}$  至约  $750\ \mu\text{g}$ , 诸如约  $500\ \mu\text{g}$ 。

[0160] 免疫原性组合物通常含有免疫保护数量(或其分数剂量)的抗原,并且可以通过常规技术来制备。免疫原性组合物(包括用于对人受试者施用的免疫原性组合物)的制备一般记载于 Pharmaceutical Biotechnology, 第 61 卷 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, Powell 和 Newman 编, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, Voller 等编, University Park Press, Baltimore, Maryland, U. S. A. 1978。例如, Fullerton, 美国专利 4, 235, 877 描述了脂质体内的包囊。例如, Likhite, 美国专利 4, 372, 945 和 Armor 等, 美国专利 4, 474, 757 披露了蛋白质与大分子的偶联。

[0161] 典型地,每剂免疫原性组合物中的蛋白质量选择为在典型的受试者中诱导免疫保护性应答而没有显著的、不利的副作用的量。在此语境中的免疫保护性的并不必然意味着针对感染的完全保护的;它意味着提供保护免于症状或疾病,尤其是与病毒有关的严重疾病。抗原量可以随哪种特定的免疫原被采用而变化。一般而言,预期每个人剂量会包含  $1$ - $1000\ \mu\text{g}$  的蛋白质, 诸如约  $1\ \mu\text{g}$  至约  $100\ \mu\text{g}$ , 例如约  $1\ \mu\text{g}$  至约  $50\ \mu\text{g}$ , 诸如约  $1\ \mu\text{g}$ 、约  $2\ \mu\text{g}$ 、约  $5\ \mu\text{g}$ 、约  $10\ \mu\text{g}$ 、约  $15\ \mu\text{g}$ 、约  $20\ \mu\text{g}$ 、约  $25\ \mu\text{g}$ 、约  $30\ \mu\text{g}$ 、约  $40\ \mu\text{g}$ 、或约  $50\ \mu\text{g}$ 。基于受试者群体(例如婴儿或老年人)来选择免疫原性组合物中利用的量。可以通过牵涉在受试者中观察抗体滴度和其它应答的标准研究来确定特定组合物的最佳量。初始疫苗接种后,受试者可以在约 4 周中接受加强免疫。

[0162] 应当注意到,不管选定的佐剂,最终配制剂中的浓度计算为在靶标群体中是安全且有效的。例如,有利地对婴儿(例如,出生和 1 岁,诸如 0 和 6 个月之间的婴儿,在初始剂量的年龄时)施用用于在人中引发针对 RSV 的免疫应答的免疫原性组合物。也有利地对老年人施用用于引发针对 RSV 的免疫应答的免疫原性组合物(例如单独地或与 COPD 有关的其它病原体的抗原组合地)。应当领会的是,佐剂的选择在这些不同应用中可以是不同的,并且本领域技术人员可以凭经验确定每种情况的最佳佐剂和浓度。



[0163] 在某些实施方案中,免疫原性组合物是减轻或预防 RSV 感染的疫苗。在一些实施方案中,免疫原性组合物是 RSV 感染后减轻或预防病理应答的疫苗。任选地,将含有 PreF 抗原的免疫原性组合物与不同于 RSV 的病原性生物体的至少一种别的抗原一起配制。例如,病原性生物体可以是呼吸道病原体(诸如引起呼吸道感染的病毒或细菌)。在某些情况中,免疫原性组合物含有自与 RSV 不同的病原性病毒诸如引起呼吸道感染诸如流感或副流感的病毒衍生的抗原。在其它实施方案中,选择别的抗原来便于施用或减少保护受试者免于多种感染性生物体所需要的接种数目。例如,抗原可以衍生自下列任何一项或多项:流感、乙肝、白喉、破伤风、百日咳、流感嗜血菌(*Hemophilus influenzae*)、脊髓灰质炎病毒、链球菌属(*Streptococcus*)或肺炎球菌属(*Pneumococcus*)等。

[0164] 因而,PreF 抗原或编码它们的核酸在制备用于处理(或是之后治疗性地或是之前预防性地)暴露于 RSV 或 RSV 感染的药物中的用途也是本公开内容的特征。同样地,用于在受试者中引发针对 RSV 的免疫应答的方法是本公开内容的特征。此类方法包括对受试者诸如人受试者施用免疫学有效量的包含 PreF 抗原的组合物。通常,组合物包含引发 Th1 偏爱性免疫应答的佐剂。对组合物进行配制以引发对 RSV 特异性的免疫应答,而不在接触 RSV 后增强病毒疾病。也就是说,对组合物进行配制,并且该组合物产生 Th1 偏爱性免疫应答,其减轻或预防 RSV 感染和/或在 RSV 感染后减轻或预防病理应答。虽然可以通过多种不同路径来施用组合物,但是最通常,通过肌内或鼻内施用路径来投递免疫原性组合物。

[0165] 免疫原性组合物通常含有免疫保护数量(或其分数剂量)的抗原,并且可以通过常规技术来制备。免疫原性组合物(包括用于对人受试者施用的免疫原性组合物)的制备一般记载于 *Pharmaceutical Biotechnology*, 第 61 卷 *Vaccine Design—the subunit and adjuvant approach*, Powell 和 Newman 编, Plenum Press, 1995. *New Trends and Developments in Vaccines*, Voller 等编, University Park Press, Baltimore, Maryland, U. S. A. 1978。例如, Fullerton, 美国专利 4, 235, 877 描述了脂质体内的包囊。例如, Likhite, 美国专利 4, 372, 945 和 Armor 等, 美国专利 4, 474, 757 披露了蛋白质与大分子的偶联。

[0166] 典型地,每剂免疫原性组合物中的蛋白质量选择为在典型的受试者中诱导免疫保护性应答而没有显著的、不利的副作用的量。在此语境中的免疫保护性的并不必然意味着针对感染的完全保护的;它意味着保护免于症状或疾病,尤其是与病毒有关的严重疾病。抗原量可以随哪种特定的免疫原被采用而变化。一般而言,预期每个人剂量会包含 1-1000  $\mu\text{g}$  的蛋白质,诸如约 1  $\mu\text{g}$  至约 100  $\mu\text{g}$ , 例如约 1  $\mu\text{g}$  至约 50  $\mu\text{g}$ , 诸如约 1  $\mu\text{g}$ 、约 2  $\mu\text{g}$ 、约 5  $\mu\text{g}$ 、约 10  $\mu\text{g}$ 、约 15  $\mu\text{g}$ 、约 20  $\mu\text{g}$ 、约 25  $\mu\text{g}$ 、约 30  $\mu\text{g}$ 、约 40  $\mu\text{g}$ 、或约 50  $\mu\text{g}$ 。基于受试者群体(例如婴儿或老年人)来选择免疫原性组合物中利用的量。可以通过牵涉在受试者中观察抗体滴度和其它应答的标准研究来确定特定组合物的最佳量。初始疫苗接种后,受试者可以在约 4-12 周中接受加强免疫。例如,在对婴儿受试者施用含有 PreF 抗原的免疫原性组合物时,可以施用初始接种和后续接种以与此期间施用的其它疫苗一致。

[0167] 提供了以下实施例来例示某些具体的特征和/或实施方案。这些实施例不应解释为将本发明限制于所描述的具体的特征或实施方案。

## 实施例

### [0168] μg 实施例 1:例示性 PreF 抗原

[0169] 与天然的 RSV F 蛋白相比,对 PreF 抗原进行修饰以稳定化处于其融合前构象的蛋白质,这基于如下预测来进行,即针对 F 的融合前构象所产生的免疫应答会优先包括会阻止结合、构象转变和 / 或牵涉膜融合的其他事件的抗体,由此提高保护性应答的功效。

[0170] 图 1A 和图 1B 示意性显示了 RSV F0 和例示性 PreF 重组抗原的特征。图 1A 是 RSV F0 蛋白的表示。F0 是由 574 个氨基酸组成的前蛋白。翻译后对 F0 前蛋白进行蛋白水解加工和糖基化。信号肽(其随后被信号肽酶除去)将 F0 前蛋白的翻译靶向至内质网(RE)。然后在多个位点(通过三角形表示)对 RE 中的新生肽进行 N 糖基化。弗林蛋白酶对 F0 的切割生成 F2 和 F1 肽域,它们被折叠并装配在一起,作为 F2-F1 异二聚物的三聚体(即 3 倍 F2-F1)。在其天然状态,F 蛋白通过 C 端区域中的跨膜螺旋而锚定至膜。F0 多肽的别的特征包括 15 个半胱氨酸残基、4 个经表征的中和性表位、2 个卷曲螺旋区、和脂质化基序。图 1B 显示了例示性 PreF 抗原的特征。为了构建 PreF 抗原,修饰 F0 多肽以稳定 F 蛋白的融合前构象,由此保留 F 蛋白的优势免疫原性表位,如与宿主细胞结合和融合前由 RSV 病毒呈现的。相对于 F0 多肽,将下列稳定化突变引入 PreF 抗原中。第一,在 F0 多肽的胞外域的 C 末端末端放置稳定化卷曲螺旋域,替换 F0 的膜锚定域。第二,除去 pep27 肽(位于天然蛋白质中的 F2 和 F1 域之间)。第三,消除两个弗林蛋白酶基序。在备选的实施方法(称作 PreF\_V1 和 PreF\_V2)中,将 RSV G 蛋白的免疫学活性部分(例如氨基酸 149-229)添加至 C 端域。

### [0171] 实施例 2:自 CHO 细胞生成和纯化 PreF 重组蛋白

[0172] 将编码例示性 PreF 抗原的重组多核苷酸序列导入宿主 CHO 细胞中以生成 PreF 抗原。将包含所导入多核苷酸序列的瞬时转染的宿主细胞或扩充的稳定群体在培养基中并在适合于生长的条件下以对于想要目的可接受的规模培养(例如,如一般记载于 Freshney(1994)Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique,第三版, Wiley-Liss, New York 及其中引用的参考文献)。典型地,将细胞在无血清培养基中在摇瓶中于 37°C 在 5% CO<sub>2</sub> 的情况中培养,并以 2-3 天的时间间隔传代,或者在生物反应器中于 29°C 在以 20% 维持的 pO<sub>2</sub> 的情况中培养。

[0173] 为了回收重组 PreF 抗原,离心细胞培养物,并于 80°C 贮存细胞培养上清液,直至进一步使用。为了进一步分析,用纯化水将 2 升等分试样的细胞培养上清液稀释 2x,并用 NaOH 调节至 pH 9.5。以 14ml/ 分钟的速率将上清液加载至在 20mM 哌嗪 pH 9.5 中平衡的 Q Sepharose FF 离子交换柱(60ml, 11.3cm)上。用起始缓冲液清洗该柱后,用 0 至 0.5M NaCl 的 NaCl 梯度在 20 个柱体积中实施洗脱(级分大小 10ml)。在 SDS PAGE 凝胶上通过银染色和 Western 印迹来分析级分。然后合并含有实质性 PreF 蛋白的级分,之后进一步加工。

[0174] 使用具有 Pellicon XL PES Biomax 100(MWCO 10,000Da)膜盒的来自 Millipore 的工作台规模 TFF 系统将 Q 步骤的合并洗脱(约 130ml)进行缓冲液交换,进入 10mM 磷酸盐, pH 7.0 中。所得的材料具有 7.0 的 pH 和 1.8mS/cm 的电导率。在用 10mM PO<sub>4</sub>(Na) 缓冲液 pH 7.0 平衡的 10ml 羟磷灰石 II 型(HA TII)凝胶(XK 16, 高度=5cm)上以 5ml/ 分钟加载 100ml 此样品。用起始缓冲液清洗该柱后,用 10mM 至 200mM PO<sub>4</sub>(Na) pH 7.0 的梯度在 20 个柱体积中实施洗脱。在 SDS PAGE 上用银染色和考马斯蓝再次分析级分,并合并阳性级分。

[0175] 亲和层析后,浓缩合并的级分,并使用 Vivaspin 20 浓缩器单元,10,000DaMWC0 将其缓冲液交换入 DPBS (pH 约 7.4) 中。最终产物是约 13ml。蛋白质浓度是 195  $\mu$ g/ml,其通过 Lowry 测定法来评估。纯度大于 95%。将此纯化的 PreF 抗原制备物进行滤器除菌,并在使用前于 -20 $^{\circ}$ C 贮存。

#### [0176] 实施例 3:CHO 细胞中生成的 PreF 重组蛋白的表征

[0177] 通过不对称场流分级 (AFF-MALS) 来表征 CHO 细胞中生成的 PreF 重组蛋白,并与包含 RSV F 和 G 蛋白构件的嵌合抗原进行比较。AFF-MALS 容许蛋白质种类在具有最低限度基质相互作用的液体流动中依照其分子大小分开,并通过多角度光散射来进一步分析以测定精确的分子量。图 2A 显示了,发现超过 65%的纯化的 FG 材料在其最终的 PBS 缓冲液中为高分子量寡聚物 (1000-100 000KDa),而 3%仍然处于单体形式。

[0178] 图 2B 显示了,纯化的 PreF 蛋白以其三聚体形式在 PBS 缓冲液中以 73%的比例折叠。发现 10%的材料为 1000 至 20 000KDa 寡聚物。这些结果指明,CHO 细胞中表达的重组 PreF 蛋白折叠为三聚体,如对天然状态所预测的。

[0179] 出于下列双重目的,还将纯化的 PreF 蛋白用戊二醛交联:确认蛋白质在磷酸盐缓冲液溶液中的可溶性质及生成聚集体来与 FG 蛋白进行比较性体内评估(参见下文的实施例 7)。已知戊二醛交联用于提供对蛋白质四级结构的良好评估,并且记载于 (Biochemistry, 36 :10230-10239 (1997) ;Eur. J. Biochem. , 271 :4284-4292 (2004))。

[0180] 将蛋白质与 1%、2%和 5%的戊二醛交联剂于 4 $^{\circ}$ C 一起温育 4 小时,并通过添加 NaBH<sub>4</sub> 来阻断反应。通过在 PBS 缓冲液中进行柱脱盐来除去过量的戊二醛。通过在 280nm 的吸光度来量化所得的蛋白质,并通过在变性和还原性条件中的 SDS PAGE 来评估。大部分纯化的重组 PreF 测定为在 PBS 溶液中作为三聚体迁移。需要将温育温度提高至 23 $^{\circ}$ C 来将大部分三聚体蛋白质转变成高分子质量聚集体,如通过 SDS PAGE 所确认的。

#### [0181] 实施例 4:由 PreF 抗原进行的体外中和抑制

[0182] 通过 ELISA 对自愿者获得的人血清筛选针对 RSV A 的反应性,并基于先前对每份血清样品建立的 RSV 中和潜力滴定以相关稀释度在中和抑制 (NI) 测定法中使用。简言之,将血清与在具有 50% 199-H 培养基 (其具有 0.5% FBS、2mM 谷氨酰胺、50  $\mu$ g/ml 庆大霉素,均为 Invitrogen) 的 DMEM 中的 25  $\mu$ g/ml 浓度的抑制剂蛋白质 (PreF 或基本上与美国专利 No. 5, 194, 595 中所披露的嵌合 FG 对应的对照蛋白质,称作 RixFG) 混合,并于 37 $^{\circ}$ C 在转轮上温育 1.5 至 2 小时。将 20  $\mu$ l 连续稀释的血清和蛋白质在圆底 96 孔板中与为每份血清样品优化抑制范围而滴定的 RSV A 混合。将所得的混合物于 33 $^{\circ}$ C 在 5% CO<sub>2</sub> 下温育 20 分钟以维持 pH。

[0183] 然后将血清 - 抑制剂 - 病毒混合物放置入先前经 Vero 细胞接种的平底 96 孔板中,并于 33 $^{\circ}$ C 温育 2 小时,之后添加 160  $\mu$ l 培养基。将平板于 33 $^{\circ}$ C 在 5% CO<sub>2</sub> 的情况下再温育 5-6 天,直至进行免疫荧光测定法来检测 NI 滴度。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的 1% 低聚甲醛固定 1 小时后,用 2% 奶 /PBS 和封闭缓冲液来封闭平板。在不漂洗的情况下将山羊抗 RSV 抗体 (Bioscience International ;1 : 400) 添加至每孔,并于室温 (RT) 温育 2 小时。用 PBS 清洗样品 2x,并将封闭缓冲液中的抗山羊 IgG-FITC (Sigma ;1 : 400) 添加至各孔。将平板于 RT 再温育 2 小时,并如上文那样清洗 2x,之后读数。当检测出  $\geq$  1 个荧光合胞体时,认为孔呈阳性。使用 Spearman-Kärber (SK) 方法来实施 50% 组织培养物感染剂量

(TCID<sub>50</sub>) 计算,并如下计算 NI 的百分比:  $[(0 \mu\text{g/ml 抑制剂的中和滴度} - 25 \mu\text{g/ml 抑制剂的中和滴度}) / 0 \mu\text{g/ml 抑制剂的中和滴度}] \times 100$ 。图 3 中显示的例示性结果指明 PreF 在 NI 中在 16/21 名所测试供体中优于 FG。

#### [0184] 实施例 5:PreF 抗原是免疫原性的

[0185] 为了证明 PreF 抗原的免疫原性,以两周时间间隔用 preF(6.5、3.1、0.63、0.13、和 0.025  $\mu\text{g/ml}$ ) 和 1/20 人剂量的含有 3D MPL 和 QS21 的 Th1 佐剂 (“AS01E”) 或 preF(1、0.2 和 0.04  $\mu\text{g/ml}$ ) 和 1/10 人剂量的含有 3D MPL 和明矾的 Th1 佐剂 (“AS04C”) IM 免疫小鼠两次,并在 3 周后收集血清。

[0186] 通过 ELISA 依照标准规程对合并的血清样品测定抗原特异性 IgG 抗体滴度。简言之,用纯化的、灭活的 RSVA、RSV B 和同源 preF 蛋白包被 96 孔板,并于 4°C 温育过夜。与 200ng/ml 起始浓度的纯化的小鼠 IgG(Sigma, ON) 一起将血清样品在封闭缓冲液中连续稀释,以 1 : 50 的起始浓度开始,并于室温温育 2 小时。用偶联有辣根过氧化物酶 (HRP) 的抗小鼠 IgG(Sigma, ON) 检测结合的抗体。使用 3,3A,5,5A- 四甲基联苯胺 (TMB, BD Opt EIATM, BD Biosciences, ON) 作为 HRP 的底物。将 50  $\mu\text{l}$  1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 添加至每孔以停止反应。用 MolecularDevices 微板读板仪 (Molecular Devices, USA) 于 450nm 检测每孔的吸光度值。

[0187] 图 4A 和 4B 中详述的代表性结果显示了,在用 PreF 抗原免疫后,针对 RSVA 和 RSV B 两者均引发强烈的滴度。

#### [0188] 实施例 6:PreF 引发中和性抗体

[0189] 在如上文实施例 5 中所描述的那样免疫的小鼠的血清样品中评估中和性抗体的存在和量。将来自经免疫动物的合并血清自 1 : 8 的起始稀释度在 RSV 培养基中在 96 孔板 (20  $\mu\text{l}$ /孔) 中连续稀释。对照孔仅含有 RSV 培养基,或者 1 : 50 的山羊抗 RSV 抗体 (Biodesign international)。将 500-1000 个感染剂量的代表性 RSV A 或 B 毒株添加至孔,并将平板于 33°C, 5% CO<sub>2</sub> 温育 20 分钟,之后将混合物转移至先前用  $1 \times 10^5$  个细胞 /mL Vero 细胞接种的 96 孔平底板。将细胞于 33°C, 5% CO<sub>2</sub> 温育约 2 小时,并再喂养,之后在相同温度温育 5-6 天。取出上清液;用 PBS 清洗平板,并用 PBS 中的 1% 低聚甲醛将粘附细胞固定 1 小时,接着进行间接免疫荧光 (IFA),其使用山羊抗 RSV 一抗和抗山羊 IgG-FITC 来检测。

[0190] 图 5A 和图 5B 中显示的代表性结果分别证明了,在用 preF 免疫的动物的血清中检测出显著的针对两种 RSV 毒株的中和性抗体。

#### [0191] 实施例 7:PreF 针对 RSV 攻击提供保护

[0192] 如上文所描述的那样以两周时间间隔 IM 免疫小鼠两次,并在第二次注射 RSVA 后 3 周进行攻击。通过测量攻击后肺中存在的病毒来评估针对 RSV 的保护。简言之,安乐死后在无菌条件下取出来自经免疫动物的肺,并在 15ml 管中使用 2 个体积的 10ml/肺在 RSV 培养基中清洗。然后对肺称重,并在 RSV 培养基中用自动化 Potter 匀浆器 (Fisher, Nepean ON) 个别均浆化,并以 2655xg 于 4°C 离心 2 分钟。通过在 96 孔板中先前接种的 Vero 细胞 (ATCC#CCL-81) 单层上进行连续稀释 (8 次重复,以 1 : 10 开始) 来滴定上清液中存在的病毒,并温育 6 天。通过在 1% 低聚甲醛 /PBS pH7.2 中固定后用山羊抗 RSV 一抗和经 FITC 标记的抗山羊 IgG 二抗进行的间接 IFA 来检测 RSV。

[0193] 图 6A 和图 6B 中显示的代表性结果证明,在存在佐剂的情况中给予时等于或高于

0.04  $\mu$ g 的剂量引发针对 RSV 的强烈保护。

[0194] 实施例 8 :PreF 在攻击后不诱导嗜曙红细胞募集

[0195] 为了评估 PreF 抗原在免疫和随后的攻击后激起疾病加重的潜力,每次用 (a) 10  $\mu$ g 经戊二醛处理的 preF, (b) 10  $\mu$ g preF 或 (c) 10  $\mu$ g 没有佐剂的 FG 免疫小鼠组 (5 只小鼠 / 组) 两次。加强免疫后 3 周用 RSV A 攻击小鼠,并在攻击后 4 天实施支气管肺泡灌洗 (BAL)。对每只小鼠的 BAL 中的总白细胞浸润计数以及基于巨噬细胞 / 单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜曙红细胞和淋巴细胞的细胞形态学进行区别计数 (300 个细胞)。

[0196] 将总细胞数目乘以每只动物的嗜曙红细胞的百分比。所表示的是每组的几何均值,置信限度 95%。图 7 中显示的代表性结果证明,嗜曙红细胞在用 preF 免疫和攻击后并不募集至肺。此外,这些结果提示,与 preF 的有意聚集形式 (戊二醛处理) 或 FG 抗原 (天然聚集的) 相比,PreF 抗原的可溶性质不偏爱嗜曙红细胞。

[0197] 序列表

[0198] SEQ ID NO :1

[0199] 编码 RSV 参照融合蛋白的核苷酸序列

[0200] 毒株 A2 GenBank 登录号 U50362

[0201] atggagttgctaactcctcaaagcaaatgcaattaccacaatcctcactgcagtcacatttgTTTTGCTTCTG

[0202] gtcaaacatcactgaagaattttatcaatcaacatgcagtagcagtagcaaggctatcttagtgctctgag

[0203] aactggttggtataaccagtgttataactatagattaagtaatatcaaggaaaataagtgtaatggaacagat

[0204] gctaaggtaaaattgataaacaagaattagataaaataaaaaatgctgtaacagaattgcagttgctcatgc

[0205] aaagcaccagcaacaacaatcgagccagaagagaactaccaaggttatgaattatacactcaaaatgcc

[0206] aaaaaaccaatgtaacattaagcaagaaaaggaaaagaagatttcttggtttttgtaggtggttgatctg

[0207] caatcgccagtgccgttgctgtatctaaggtcctgcacctgaaggggaagtgaacaagatcaaaagtgcct

[0208] actatccacaacaaggctgtagtcagttatcaaatggagttagtgcttaaccagcaaaagtgttagacct

[0209] aaaaactatatagaaaacaattgttacctattgtgaacaagcaaaagtcgcagcatatcaaatatagcaactg

[0210] tatagagttccaacaaaagaacaacagactactagagattaccagggaaatttagtgtaagcaggtgtaact

[0211] acacctgtaagcacttacatgtaactaatagtgtaattattgtcattatcaatgatatgcctataacaaatg

[0212] atcagaaaaagttaatgtccaacaatgttcaaatgttagacagcaaaagtactctatcatgtccataataaa

[0213] agaggaagtccttagcatalgtgtacaattaccactatatgggtttatagatacaccctgttggaactacac

[0214] acatccccctatgtacaaccaacacaaaagaagggtccaacatctgtttaacaagaactgcagaggtggta

[0215] ctgtgacaatgcaggatcagtatctttcttccacaagctgaaacatgtaaagtcaaatcaaatcgagtat

[0216] tgtgacacaatgaacagtttaacattaccaagtgaagtaaactctgcaatgttgacatattcaaccccaat

[0217] atgattgtaaaattatgacttcaaaaacgatgtaagcagctccgttatcacatctctaggagccattgtgtc

[0218] atgctatggcaaaaacaaatgtacagcatccaataaaaatcgtggaatcataaagacattttctaacgggtgc

[0219] gatatgtatcaaaataaagggtggacactgtgtctgttaggtaacacattatattatgtaaaaagcaagaagg

[0220] taaaagtctctatgtaaaagggtgaaccaataataaatttctatgacccttagtatccccctctgatgaattt

[0221] gatgcatcaatatctcaagtcaacgagaagattaacagagcctagcatttatctgtaaatccgatgaattat

[0222] tacataatgtaaatgctggtaatccaccataaataatcatgataactactataattatagtgattatagtaat

[0223] attgttatcttaattgctgttgactgctcttataactgtaaggccagaagcacaccagtcacactaagaaag

[0224] atcaactgagtggtataaataatattgcatttagtaactaa

- [0225] SEQ ID NO :2
- [0226] RSV 参照 F 蛋白前体 F0 的氨基酸序列
- [0227] 毒株 A2 GenBank 登录号 AAB86664
- [0228] -----
- [0229] MELLILKANAITTILTAVTFCFASGQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT
- [0230] DAKVKLIKQELDKYKNAVTELQLLMQSTPATNNRARRELPRFMNYTLNNAKKTNVTLSKKRKRRLFLGFLLG
- [0231] GSAIASGVAVSKVLHLEGEVNIKIKSALLSTNKAVVSLNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVNVKQSCSISN
- [0232] IATVIEFQKNNRLEITREFSVNAGVTPVSTYMLTNSSELLSLINDMPTNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSI
- [0233] MSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPQAETCKV
- [0234] QSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNVDIFNPKYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGTKCTASKNRGI I
- [0235] KTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNLTYVVKQEGKSLYVKGEPIINFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLA
- [0236] FIRKSDELLHNVNAGKSTINIMITTIIIVIIVILLSLIAVGLLLYCKARSTPVTL SKDQLSGINNI AFSN
- [0237] SEQ ID NO :3
- [0238] 编码 RSV 参照 G 蛋白的核苷酸序列
- [0239] 毒株 Long
- [0240] Atgtccaaaacaaggaccaacgcaccgctaagacactagaaaagacctgggacactctcaatcatttatta
- [0241] ttcatatcatcgggettataataagttaaatcttaaactatagcacaatcacattatccattctggcaatg
- [0242] ataatctcaacttacttataattacagccatcatattcatagcctcggcaaacacaaagtcacactaaca
- [0243] actgcaatcatacaagatgcaacaagccagatcaagaacacaacccccacatacctcactcaggatcctcag
- [0244] cttggaatcagcttctccaatctgtctgaaattacatcacaaccaccaccatactagcttcaacaacacca
- [0245] ggagtcaagtcaaactgcaaccacacagctcaagactaaaaacacaacaacaacccaaacacaaccagc
- [0246] aagcccactacaaaacaacgccaaaacaaccaccaacaacccaataatgatcttcacttccaagtgttt
- [0247] aactttgtacctgcagcatatgcagcaacaatccaactgctgggctatctgcaaaaagaataccaacaaa
- [0248] aaaccaggaaagaaaaccaccaccaagcctacaaaaaaccaacttcaagacaacaaaaaagatctcaaa
- [0249] cctcaaacactaaacaaaaggaagtaccaccaccaagcccacagaagagccaaccatcaacaccacaaa
- [0250] acaaacatcacaactaactgctcaccaacaacaccacaggaaatccaaaactcacaagtcaaatggaacc
- [0251] ttccactcaactcctccgaaggcaatctaagccttctcaagctccacaacatccgagcaccatcaaa
- [0252] cctcatctccaccaacacaacagccagtag
- [0253] SEQ ID NO :4
- [0254] RSV 参照 G 蛋白的氨基酸序列
- [0255] -----
- [0256] MSKNKQRTAKTLEKTWDTLNHLLFISSGLYKLNLSIAQITLSILAMIISTSLIITAIIFIASANHKVTLT
- [0257] TAI IQDATSQIKNTTPTYLTQDPQLGISFSNLSEITSQTTTILASTTPGVKSNLQPTTVKTKNTTTTQTQPS
- [0258] KPTTKQRQNKPPNPNDFHFEVFNFPVPCSI CSNNPTCWAICKRIPNKKPGKTTTKPTKPTFKTTKKDLK
- [0259] -----
- [0260] PQTTPKEVPTTKPTEEPTINTTKTNI TTTLLTNNTGNPKLTSQMETFHSTSSSEGNLSPSQVSTTSEHPSQ
- [0261] PSSPNTTRQ
- [0262] Seq ID NO :5
- [0263] 针对 CHO 优化的 PreF 类似物的核苷酸序列

[0264] aagcttgccaccatggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccgccatcctggccgccgtgaccctg  
[0265] tgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaggagtctaccagtcacctgctccgccgtgtccaagggctac  
[0266] ctgtccgccctgctggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaag  
[0267] tgcaacggcaccgacccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgccgtgaccgaa  
[0268] ctccagctgctgatgcagtcaccacctgccaccaacaacaagttctgggcttctgctgggcgtgggctcc  
[0269] gccatcgctccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgcc  
[0270] ctgctgtccaccaacaagccgtggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaaggtgctggat  
[0271] ctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatcgag  
[0272] accgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccgcgagttctccgtgaacgccggc  
[0273] gtgaccacctctgtgtccacctacatgctgaccaactccgagctgctgtccctgatcaacgacatgcctatc  
[0274] accaacgaccagaaaaactgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatgagc  
[0275] atcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacaccttctgctgg  
[0276] aagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaggagggtccaacatctgectgacctggaccgac  
[0277] cggggctggtactgcgacaacgccggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcagtc  
[0278] aaccgggtgttctgcgacaccatgaactcctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatc  
[0279] ttcaacccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctg  
[0280] ggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaagacc  
[0281] ttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgtggacacctgtccgtgggcaacacactgtactac  
[0282] gtgaataagcaggaggcaagacctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctgggtg  
[0283] ttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtgaacgagaagatcaaccagtcctggccttcatc  
[0284] cggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatc  
[0285] gagaacgagatcgcccgatcaagaagctgatcggcgaggcctgataatctaga  
[0286] SEQ ID NO :6  
[0287] PreF 类似物的氨基酸序列  
[0288] MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT  
[0289] DAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNNKFLGFLLVGSAIASG IAVSKVLHLEGEVNIKISALLST  
[0290] NKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLP I VNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTTP  
[0291] VSTYMLTNSSELLSLINDMPI TNDQKKLMSNNVQIVRQQSYSIMSI IKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLHT  
[0292] SPLCTTNTKEGSNICL TRTD R GWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSL TLPSEVNL CNIDIFNPK  
[0293] YDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAI VSCYGKTKCTASNKNRGI IKTF SNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYV NKQ  
[0294] EGKSLYVKGEPI INFYDPLVFP SDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENEI  
[0295] ARIKKLIGEA  
[0296] Seq ID NO :7  
[0297] 针对 CHO 优化的编码 PreF\_V1 的核苷酸序列 \_  
[0298] aagcttgccaccatggagctgctgatcctcaagaccaacgccatcaccgccatcctggccgccgtgaccctg  
[0299] tgcttcgcctcctcccagaacatcaccgaagagtctaccagtcacctgctccgccgtgtccaagggctac  
[0300] ctgtccgccctgctggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaagaaaacaag  
[0301] tgcaacggcaccgacccaaggtcaagctgatcaagcaggaaactggacaagtacaagagcgccgtgaccgaa  
[0302] ctccagctgctgatgcagtcaccacctgccaccaacaacaagaagttctgggcttctgctgggcgtgggc

[0303] tccgccatcgectccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagc  
[0304] gccctgctgtccaccaacaaggccgtgggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaaggtgctg  
[0305] gatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatc  
[0306] gagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccgcgagttctccgtgaacgcc  
[0307] ggcgtgaccaccctgtgtccacctacatgctgacaaactccgagctgctctccctgatcaacgacatgcct  
[0308] atcaccaacgacaaaaaaagctgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatg  
[0309] agcatcatcaaggaagaagtccctggcctacgtcgtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacacccttgc  
[0310] tggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaaagagggtccaacatctgectgaccggacc  
[0311] gaccggggctggactgcgacaacgcggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcag  
[0312] tccaaccgggtgttctgcgacacatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgac  
[0313] atcttcaacccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgtcctccagcgtgatcacctcc  
[0314] ctgggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaag  
[0315] accttctccaacggctgcgactacgtgtccaataaggcgtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtac  
[0316] tacgtgaataagcaggaaggcaagagcctgtacgtgaaggcgagcctatcatcaacttctacgacctctg  
[0317] gtgttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccagtcctggccttc  
[0318] atccggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccac  
[0319] atcgagaacgagatcgccggatcaagaagctgatcggcgaggctggcggctctggcggcagcggcggtcc  
[0320] aagcagcggcagaacaagcctcctaacaagcccaacaacgacttccacttcgaggtgttcaacttctgctgct  
[0321] tgctccatctgctccaacaacctacctgctgggccatctgcaagagaatccccaacaagaagcctggcaag  
[0322] aaaaccaccaccaagcctaccaagaagcctaccttcaagaccaccaagaaggaccacaagcctcagaccaca  
[0323] aagcctaaggaagtgcccaaccaccaagcaccaccaccatcaccactgataatcta  
[0324] Seq ID NO :8  
[0325] 用于 CHO 的 PreF\_V1 肽  
[0326] MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT  
[0327] DAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNKKFLGFLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKISALLS  
[0328] TNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT  
[0329] PVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKCLMSNNVQIVRQQSYMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLH  
[0330] TSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNIDIFNP  
[0331] KYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNK  
[0332] QEGKSLYVKGEPIINFDPLVFPSPDEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEEILSKIYHIENE  
[0333] IARIKKLIGEAGSGSGGSKQRQNKPPNPNDFHFEVFNVPSCSICSNNPTCWAICKRIPNKKPGKKTIT  
[0334] KPTKKPTFKTTKDKHPOTTTPKEVPTTK  
[0335] Seq ID NO :9  
[0336] 用于 CHO 的 PreF\_V2 肽  
[0337] aagcttgccaccatggagctgctgatcctcaagaccaacgccatcaccgccatcctggcgcctgacacctg  
[0338] tgcttgcctctctccagaacatcaccgaagagttctaccagtcacctgctccgctggtccaagggctac  
[0339] ctgtccgcctgctggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaagaaaacaag  
[0340] tgcaacggcaccgacccaaggtcaagctgatcaagcaggaactggacaagtacaagagcgcctgacccgaa  
[0341] ctccagctgctgatgcagtcaccacctgccaccaacaacaagaagttctgggcttctgctgggcgtgggc



- [0342] tccgccatcgectccggcatcgccgtgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagagc  
[0343] gccctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacggcgtgtccgtgctgacctccaaggtgctg  
[0344] gatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtgaacaagcagtcctgctccatctccaacatc  
[0345] gagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctggagatcaccgcgagttctccgtgaacgcc  
[0346] ggcgtgaccaccctgtgtccacctacatgctgacaaactccgagctgctctccctgatcaacgacatgcct  
[0347] atcaccaacgacaaaaaaagctgatgtccaacaacgtgcagatcgtgcggcagcagtcctacagcatcatg  
[0348] agcatcatcaaggaagaagtctggcctacgtcgtgcagctgcctctgtacggcgtgatcgacacccttgc  
[0349] tggaagctgcacacctccccctgtgaccaccaacaccaaagagggtccaacatctgectgaccggacc  
[0350] gaccggggctggtactgcgacaacgcggctccgtgtccttcttccctctggccgagacctgcaaggtgcag  
[0351] tccaaccgggtgttctgcgacacatgaactccctgacctgccttccgaggtgaacctgtgcaacatcgac  
[0352] atcttcaacccaagtacgactgcaagatcatgaccagcaagaccgacgtgctctccagcgtgatcacctcc  
[0353] ctggggcgcctcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccgcctccaacaagaaccggggaatcatcaag  
[0354] accttctccaacggctgcgactacgtgtccaataaggcgtggacaccgtgtccgtgggcaacacactgtac  
[0355] tacgtgaataagcaggaaggcaagagcctgtacgtgaaggcgcagcctatcatcaacttctacgacctctg  
[0356] gtgttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtcaacgagaagatcaaccagtccttggccttc  
[0357] atccggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaagatcgaagagatcctgtccaaaatctaccac  
[0358] atcgagaacgagatcgccggatcaagaagctgatcggcggaggtggcggcaagcagcggcagaacaagcct  
[0359] ctaacaagcccaacaacgacttccacttccaggtgttcaacttctgtccttgccttccatctgctccaacaac  
[0360] cctacctgctgggcatctgcaagagaatccccaacaagaagcctggcaagaaaaccaccaccaagcctacc  
[0361] aagaagcctaccttcaagaccaccaagaaggaccacaagcctcagaccacaaaagcctaaggaagtccaacc  
[0362] accaagcaccaccaccatcaccactgataatcta  
[0363] Seq ID NO :10  
[0364] 用于 CHO 的 PreF\_V2 肽  
[0365] MELLILKTNAITAILAAVTLCFASSQNI TEEFYQSTCSAVSKGYLSALRTGWYTSVITIELSNIKENKCNGT  
[0366] DAKVKLIKQELDKYKSAVTELQLLMQSTPATNKKFLGFLLVGSAIASGIAVSKVLHLEGEVNIKISALLS  
[0367] TNKAVVSLNNGVSVLTSKVLDLKNYIDKQLLPVIVNKQSCSISNIETVIEFQQKNNRLEITREFSVNAGVTT  
[0368] PVSTYMLTNSSELLSLINDMPITNDQKMLSNVQIVRQQSYMSIIKEEVLAYVVQLPLYGVIDTPCWKLH  
[0369] TSPLCTTNTKEGSNICLTRTRDRGWYCDNAGSVSFFPLAETCKVQSNRVFCDTMNSLTLPSEVNL CNIDIFNP  
[0370] KYDCKIMTSKTDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGI IKTFSNGCDYVSNKGVDTVSVGNTLYYVNK  
[0371] QEGKSLYVKGEPI INFYDPLVFPSEFDASISQVNEKINQSLAFIRKSDEKLHNVEDKIEE ILSKIYHIENE  
[0372] IARIKKLIGEAGGKQRQNKPPNPNDFHFEVFNFPVPCSI CSNNPTCWAICKRIPNKKPGKKT TTKPTKKPT  
[0373] FKTTKDKHKPQTTPKEVPTTK  
[0374] SEQ ID NO :11  
[0375] 例示性卷曲螺旋（异亮氨酸拉链）  
[0376] EDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGEA  
[0377] SEQ ID NO :12  
[0378] PreF 抗原多核苷酸 CH02  
[0379] atggagctgcccatectgaagaccaacgccatcaccaccatectcgcgccctgacctgtgcttccgccagc  
[0380] agccagaacateacggaggagtctaccagagcacgtgcagcgcctgagcaagggtacctgagcgcgctg

[0381] cgcacgggctggtacacgagcgtgatcacgatcgagctgagcaacatcaaggagaacaagtgaacggcacg  
[0382] gacgcgaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcggtgacggagctgcagctgctg  
[0383] atgcagagcacgccggcgacgaacaacaagttcctcggcttctgctgggcgtgggcagcgcgatcgcgagc  
[0384] ggcacgcgctgagcaaggtgctgcacctggagggcgaggtgaacaagatcaagtcgcgctgctgagcacg  
[0385] aacaaggcggctgtagcctgagcaacggcgtgagcgtgctgacgagcaaggtgctcgacctgaagaactac  
[0386] atcgacaagcagctgctgccgatcgtgaacaagcagagctgcagcatcagcaacatcgagaccgtgatcgag  
[0387] ttccagcagaagaacaaccgctgctggagatcacgcgggagttctccgtgaacgcaggcgtgacgacgccc  
[0388] gtgtctacgtacatgctgacgaacagcagctgctcagcctgatcaacgacatgccgatcacgaacgaccag  
[0389] aagaagctgatgagcaacaacgtgcagatcgtgcccagcagagctacagcatcatgagcatcatcaaggag  
[0390] gaggtgctggcatacgtggtgcagctgccgctgtacggcgtcatcgacacgccctgctggaagctgcacacg  
[0391] agcccgctgtgcacgaccaacacgaaggaggcgcaacatctgcctgacgcggacggaccggggctggtac  
[0392] tgcgacaacgcgggcagcgtgagcttcttcccgctcgcggagacgtgcaaggtgcagagcaaccgctcttc  
[0393] tgcgacacgatgaacagcctgacgctgccgagcaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccgaag  
[0394] tacgactgcaagatcatgacgagcaagaccgatgtcagcagcagcgtgatcacgagcctcggcgcgatcgtg  
[0395] agctgctacggcaagacgaagtgcacggcgagcaacaagaaccgcggcatcatcaagacgttcagcaacggc  
[0396] tgcgactatgtgagcaacaagggcgtggacactgtgagcgtcggcaacacgctgtactacgtgaacaagcag  
[0397] gagggaagagcctgtacgtgaagggcgagccgatcatcaacttctacgaccgctcgtgttcccagcgcac  
[0398] gatttcgacgcgagcatcagccaagtgaacgagaagatcaaccagagcctggcgttcacccgaagagcgcac  
[0399] gagaagctgcacaacgtggaggacaagatcgaggagatcctgagcaagatctaccacatcgagaacgagatc  
[0400] gcgcgcatcaagaagctgatcggcgaggcgcacatcatcaccatcaccattga  
[0401] SEQ ID NO :13  
[0402] 具有内含子的 PreF 抗原多核苷酸  
[0403] atggagctgctgatcctgaaaaccaacgccatcaccgccatcctggccgccgtgacctgtgcttcgcctcc  
[0404] tcccagaacatcaccgaggagtctaccagtcacctgctccgccgtgccaaaggctacctgtccgccctg  
[0405] cggaccggctggtacacctccgtgatcaccatcgagctgtccaacatcaaggaaaacaagtgaacggcacc  
[0406] gacccaaggtgaagctgatcaagcaggagctggacaagtacaagagcgcgctgaccgaactccagctgctg  
[0407] atgcagtccaccctgccaccaacaacaagtttctgggcttctgctgggcgtgggctccgccatcgccctcc  
[0408] ggcacgcgctgagcaaggtacgtgtcgggacttgtgttcccccttttttaataaaaagttatatctttaat  
[0409] gttatatacatatttctgtatgtgatccatgtgcttatgactttgtttatcatgtgtttaggtgctgcacc  
[0410] tggagggcgaggtgaacaagatcaagagcgcctgctgtccaccaacaaggccgtggtgtccctgtccaacg  
[0411] gcgtgtccgtgctgacctccaaggtgctggatctgaagaactacatcgacaagcagctgctgcctatcgtga  
[0412] acaagcagtcctgctccatctccaacatcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaaccggctgctgg  
[0413] agatcaccgcgagttctccgtgaacgcggcgtgaccaccctgtgtccacctacatgctgaccaactccg  
[0414] agctgctgtccctgatcaacgacatgcctatcaccacgaccagaaaaaactgatgtccaacaacgtgcaga  
[0415] tcgtgcggcagcagtcctacagcatcatgagcatcatcaaggaagaggtgctggcctacgtggtgcagctgc  
[0416] ctctgtacggcgtgategacacccttgcgtggaagctgcacacctccccctgtgcaccaccaacaccaagg  
[0417] aggctccaacatctgctgaccggaccgaccggggctgggtactgcgacaacgcggctccgtgtccttct  
[0418] tccctctggccgagacctgcaaggtgcagtcacaaccgggtgttctgcgacacatgaactccctgaccctgc  
[0419] cttccgaggtgaacctgtgcaacatcgacatcttcaaccacaagtagcactgcaagatcatgaccagcaaga

- [0420] ccgacgtgtcctccagcgtgatcacctccctgggcgccatcgtgtcctgctacggcaagaccaagtgcaccg
- [0421] cctccaacaagaaccggggaatcatcaagaccttctccaacggctgcgactacgtgtccaataagggcgtgg
- [0422] acaccgtgtccgtgggcaacacactgtactacgtgaataagcaggaggcaagagcctgtacgtgaaggcg
- [0423] agcctatcatcaacttctacgacctctggtgttcccttccgacgagttcgacgcctccatcagccaggtga
- [0424] acgagaagatcaaccagtcctggccttcatccggaagtccgacgagaagctgcataacgtggaggacaaga
- [0425] tcgaggagatcctgtccaaaatctaccacatcgagaacgagatcgcccggatcaagaagctgatcggcgagg
- [0426] ccggaggtcaccaccaccatcaccactga
- [0427] SEQ ID NO :14
- [0428] 合成的接头序列
- [0429] GSGGSGGS
- [0430] SEQ ID NO :15
- [0431] 弗林蛋白酶切割位点
- [0432] RARR
- [0433] SEQ ID NO :16
- [0434] 弗林蛋白酶切割位点
- [0435] RKRR

[0001]

## 序列表

<110> 魁北克益得生物医学公司 (ID Biomedical Corporation of Quebec)  
 葛兰素史密斯克莱生物公司 (GlaxoSmithKline Biologicals SA)  
 BAUDOUX, Guy J-M  
 BLAIS, Normand  
 Rheault, Patrick  
 RUELLE, Jean-Louis

<120> 重组 RSV 抗原

<130> VU62788

<150> 61/016,524  
 <151> 2007-12-24

<150> 61/056,206  
 <151> 2008-05-27

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 1697  
 <212> DNA  
 <213> 呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus)

<400> 1  
 atggagttgc taatcctcaa agcaaatgca attaccacaa tcctcactgc agtcacattt 60  
 gttttgcttc tggicaaaac atcactgaag aattttatca atcaacatgc agtgcagtag 120  
 caaaggctat cttagtgtctc tgagaactgg ttggataacc agtgttataa ctatagatta 180  
 agtaatatca aggaaaataa gtgtaatgga acagatgcta aggtaaaatt gataaacaag 240  
 aattagataa atataaaaat gctgtaacag aattgcagtt gctcatgcaa agcaccaccg 300  
 acaaaacaat cgagccagaa gagaactacc aaggtttatg aattatacac tcaaaaatgcc 360  
 aaaaaacca atgtaacatt aagcaagaaa aggaaaagaa gatttcttgg tttttgttag 420  
 gtgttggatc tgcaatgcc agtggcgttg ctgtatctaa ggctctgcac ctgaagggga 480  
 agtgaacaag atcaaaangt ctctactatc cacaaacaag gctgtagtca gttatcaaat 540  
 ggagttagtg tcctaaccag caaagtgtta gacctcaaaa actatataga aaacaattgt 600  
 tacctattgt gaacaagcaa agctgcagca tatcaaatat agcaactgta tagagttcca 660  
 acaaaaagaa aacagactac tagagattac cagggaattt agtgttaagc aggtgtaact 720  
 acacctgtaa gcacttacat gttactaat agtgaattat tgtcattatc aatgatatgc 780  
 ctataacaaa tgatcagaaa aagttaatgt ccaacaatgt tcaaatgta gacagcaag 840  
 ttactctalc atgtccataa taaaagagga agtcttagca tatgtgtaca attaccacta 900  
 tatggtgtta tagatacacc ctgttggaaa ctacacacat ccccctatgt acaaccaaca 960  
 caaaaagaag gtccaacatc tgtttaacaa gaactgacag aggtggtact gtgacaatgc 1020  
 aggatcagta tccttcttcc cacaagctga aacatgtaaa gtcaatcaaa tcgagtattt 1080  
 tgtgacacaa tgaacagttt aacattacca agtgaagtaa actctgcaat gttgacatat 1140  
 tcaaccccaa atatgattgt aaaattatga ctcaaaaac gatgtaagca gctccgittat 1200  
 cacatctcta ggagccattg tgcattgcta tggcaaaaaca aatgtacagc atccaalaaa 1260  
 aatcgtggaa tcataaagac attttetaac ggggtcgata tgtatcaaat aaaggggtgg 1320  
 acactgtgtc tgtaggtaac acattatatt atgtaaaaag caagaaggta aaagtcctta 1380  
 tgtaaaaggt gaaccaataa taaatttcta tgacccttag tattcccctc tgaatgaattt 1440  
 gatgatcaa tatctcaagt caacgagaag attaacagag cctagcattt atctgtaaat 1500  
 ccgatgaatt attacataat gtaaatgctg gtaalccacc ataaataica tgataactac 1560

[0002]

tataattata gtgattatag taatatlggt atcttaattg ctgtlggact gctctatlac 1620  
 tgtaaggcca gaagcacacc aglcacacta agaaagatca actgagtggt ataaataata 1680  
 ttgcatttag taactaa 1697

<210> 2  
 <211> 574  
 <212> PRT  
 <213> 呼吸道合胞病毒

<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

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 Ala 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

[0003]

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

&lt;210&gt; 3

[0004]

<211> 897  
 <212> DNA  
 <213> 呼吸道合胞病毒

<400> 3  
 atgtcctcaaaa acaaggacca acgcaccgct aagacactag aaaagacctg ggacactctc 60  
 aatcatttat taticatata atcgggctta tataagttaa atcttaaatc tatagcacia 120  
 atcacattat ccattctggc aalgataatc tcaacttcac ttataattac agccatcata 180  
 ttcatagcct cggcaaacca caaagtcaca ctaacaacig caatcataca agatgcaaca 240  
 agccagaatc agaacacaac cccaacatac ctcaclcagg atcctcagct tggaatcagc 300  
 ttctccaatc tglctgaaat tacatcacia accaccacca tactagcttc aacaacacca 360  
 ggagtcgaat caaacctgca acccacaaca gtcaagacla aaaacacaac aacaacccaa 420  
 acacaaccca gcaagcccac taaaaaaca cgcctaaaaca aaccacaaa caaacccaat 480  
 aatgatttct acttcgaagt gttlaacttt giaccctgca gcatatgcag caacaatcca 540  
 acctgctggg ctactctgca aagaatacca aacaaaaaac caggaaagaa aaccaccacc 600  
 aagcctacia aaaaaccaac cticaagaca accaaaaaag atctcaaac tcaaacact 660  
 aaacaaaagg aaglaccac caccaagccc acagaagagc caaccatcaa caccacaaa 720  
 acaaacatca caactacact gctaccaac aacaccacag gaaatccaaa actcacaagt 780  
 caaatggaaa ccttccactc aacctctctc gaaggcaatc taagcccttc tcaagtctcc 840  
 acaacatccg agcaccatc acaacctca tctccacca acacaacacg ccagtag 897

<210> 4  
 <211> 298  
 <212> PRT  
 <213> 呼吸道合胞病毒

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Thr Thr Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn

[0005]

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 Phe	
	195	200	205
Lys Thr Thr Lys Lys Asp Leu Lys	Pro Gln Thr Thr Lys	Pro Lys Glu	
	210	215	220
Val Pro Thr Thr Lys	Pro Thr Glu Glu Pro Thr	Ile Asn Thr Thr Lys	
	225	230	235
Thr Asn Ile Thr Thr Thr	Leu Leu Thr Asn Asn Thr Thr	Gly Asn Pro	
	245	250	255
Lys Leu Thr Ser Gln Met Glu Thr	Phe His Ser Thr Ser	Ser Glu Gly	
	260	265	270
Asn Leu Ser Pro Ser Gln Val	Ser Thr Thr Ser Glu	His Pro Ser Gln	
	275	280	285
Pro Ser Ser Pro Pro Asn Thr	Thr Arg Gln		
	290	295	

<210> 5  
 <211> 1566  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重组 PreF 多核苷酸

<400> 5	
aagccttgcca ccatggagct gctgacctg aaaaccaacg ccatcaccgc catcctggcc	60
gcegtgacce tgtgcttcgc ctctcccg aacatcaccg aggagttcta ccagtccacc	120
tgtccgcggc tglccaaggc ctaccgtcc gccctgcgga cggctggta cacctccgtg	180
atcaccatcg agctgtccaa calcaaggaa aacaagtga acggcaccga cgccaaggtg	240
aagctgatca agcaggagct ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgctg	300
atgcagtgcca cccctgccac caacaacaag ttcttgggct tcttctggg cgtgggctcc	360
gccatcgccct ccggcatcgc cgtgagcaag gtgctgcacc tggagggcga ggtgaacaag	420
atcaagagcg ccctgctgct caccaacaag gccgtgggtg ccctglccaa cggcgtgctc	480
gtgctgacct ccaaggtgct ggatctgaag aactacatcg acaagcagct gctgcctatc	540
gtgaacaang agtctctgct catctccaac atcgagaccg tgatcgagtt ccagcagaag	600
aacaaccggc tgcctggagat caccgcgag ttctccgtga acgccggcgt gaccaccctt	660
gtgtccacct acatgctgac caactccgag ctgctglccc tgatcaacga catgcctatc	720
accaacgacc agaaaaaact gatgtccaac aacgtgcaga tcgtgcggca gcagtcctac	780
agcatcatga gcatcatcaa ggaagagggt ctggcctacg tgggtcagct gcctctgtac	840
ggcgtgatcg acaccccttg ctggaagctg cacacctccc cctgtgcac caccaacacc	900
aaggagggtc ccaacatctg cctgaccggg accgaccggg gctggctactg cgacaacgcc	960

[0006]



```

ggctccgtgt ccttcttccc tctggccgag acctgcaagg tgcagtccaa cggggtgttc 1020
tgcgacacca tgaactccct gaccctgcct tccgaggatga acctgtgcaa catcgacatc 1080
ttcaacccca agtacgactg caagatcatg accagcaaga cgcacgtgtc ctccagcgtg 1140
atcacctccc tgggcgccat cgtgtcctgc tacggcaaga ccaagtgcac cgcctccaac 1200
aagaaccggg gaatcatcaa gaccttctcc aacggctgcg actacgtgtc caataagggc 1260
gtggacaccc tgtccgtggg caacacactg tactacgtga ataagcagga gggcaagagc 1320
ctgtacgtga agggcgagcc talcatcaac ttctacgacc ctctgggtgt cccttccgac 1380
gagttcgacg cctccatcag ccaggatganc gagaagatca accagtcctt ggccttcac 1440
cggaaagtcg acgagaagct gcataacgtg gaggacaaga tgcaggagat cctgtccaaa 1500
atctaccaca tcgagaacga gatcgcccgg atcaagaagc tgatcggcga ggctgataa 1560
tctaga 1566

```

<210> 6  
 <211> 514  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 重组 PreF 抗原

<400> 6

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

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser 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 Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
 85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Phe Leu Gly Phe Leu Leu  
 100 105 110

Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val Leu  
 115 120 125

His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr  
 130 135 140

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

Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile  
 165 170 175

Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu  
 180 185 190

[0007]

Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser  
 195 200 205

Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn  
 210 215 220

Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln  
 225 230 235 240

Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr  
 245 250 255

Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln  
 260 265 270

Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr  
 275 280 285

Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu  
 290 295 300

Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser  
 305 310 315 320

Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe  
 325 330 335

Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys  
 340 345 350

Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser  
 355 360 365

Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val  
 370 375 380

Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly  
 385 390 395 400

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

Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln  
 420 425 430

Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr  
 435 440 445

Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln  
 450 455 460

Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp  
 465 470 475 480

Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys  
 485 490 495

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly  
 500 505 510

[0008]

Glu Ala

<210> 7  
 <211> 1855  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 嵌合的 PreF-G 抗原多核苷酸序列

<400> 7  
 aagcttgcca ccattggagct gctgalecte aagaccaacg ccataccgc cactctggcc 60  
 gccgtgacce tglgtctcgc ctccctccag aacatcaccg aagagttcta ccagtcacc 120  
 tgcctccgctg tgtccaaggc ctacctgtcc gccctgcgga cggcttgta caccctcgtg 180  
 atcaccatcg agctgtccaa catcaaagaa aacaagtgca acggcaccga cgccaagtc 240  
 aagctgatca agcaggaact ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctcgtg 300  
 atgcagtcca cccctgccc caacaacaag aagttctcgg gcttctcgtg gggcglggc 360  
 tccgccatcg ctccggcat cggcgtgagc aaggctcctg acctggaggc cgagggtgac 420  
 aagatcaaga gcgcccctgct gtccaccaac aaggccgtgg tctccctgic caacggcgtg 480  
 tccgtgctga ctccaaggt gctggatctg aagaactaca tcgacaagca gctgctgcct 540  
 atcgtgaaca agcagtcctg ctccatctcc aacatcgaga ccgltatcga gttccagcag 600  
 aagaacaacc ggcctcctga gatcaccgcg gacttctcgg tgaacccggc cgtgaccacc 660  
 cctgtgtcca cctacatgct gacaaactcc gagctcctct cctgatcaa cgacatgctt 720  
 atcaccaacg accaaaaaaa gctgatgtcc aacaacgtgc agatcgtgcg gcagcagtc 780  
 tacagcatca tgagcatcat caaggaaaga gtcctggcct acgtcgtgca gctgcctcig 840  
 tacggcgtga tcgacacccc ttgctggaag ctgcacacct cccccctgig caccaccaac 900  
 accaaagagg gctccaacat ctgcctgacc cggaccgacc ggggcttgla ctgcgacaac 960  
 gccggctcgg tgcctctctt cctctcggcc gagaccgtca aggtgcagtc caaccgggtg 1020  
 tctcggaca ccattgaactc ctgaccctg ccttcgagg tgaacctgig caacatcgac 1080  
 atcttcaacc ccaagtagca ctgcaagate atgaccagca agaccgacgt gtcctccagc 1140  
 gtgatcactt ccttgggcgc catcgtgtcc tgcctacgca agaccaagtg caccgcctcc 1200  
 aacaagaacc ggggaatcat caagacctc tccaacggct gcgactacgt gtccaataag 1260  
 ggcctggaca ccgtgtccgt gggcaacaca ctgtactacg tgaataagca ggaaggcaag 1320  
 agcctglacg tgaaggcgga gcctatcctc aacttctacg accctcigtg gttcccttcc 1380  
 gacgagttcg acgcttccat cagccaggtc aacgagaaga tcaaccagtc cctggccttc 1440  
 atccggaagt ccgacgagaa gctgcataac gtggaggaca agatcgaaga gatcctgtcc 1500  
 aaaaatcacc aacatcgaaa cgagatcgcc cggatcaaga agctgatcgg cgaggctggc 1560  
 ggcctcggcg gcagcggcgg ctccaagcag cggcagaaca agcctcctaa caagcccaac 1620  
 aacgacttcc acttcgaggt gttaacttc gtcctctgct ccatctgctc caacaacct 1680  
 acctgtcggc ccatctgcaa gagaatcccc aacaagaagc ctggcaagaa aaccaccacc 1740  
 aagcctacca agaagcctac ctccaagacc accaagaagg accacaagcc tcagaccaca 1800  
 aagcctaagg aagtccaac caccaagcac caccaccatc accactgata atcta 1855

<210> 8  
 <211> 605  
 <212> PRT

[0009]

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合的 PreF-G 多肽

<400> 8

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

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser 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 Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Lys Phe Leu Gly Phe Leu  
100 105 110

Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val  
115 120 125

Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser  
130 135 140

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

Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro  
165 170 175

Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile  
180 185 190

Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe  
195 200 205

Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr  
210 215 220

Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp  
225 230 235 240

Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser  
245 250 255

Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val  
260 265 270

Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His  
275 280 285

Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys

[0010]

290 295 300

Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val  
305 310 315 320

Ser Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val  
325 330 335

Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu  
340 345 350

Cys Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr  
355 360 365

Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile  
370 375 380

Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg  
385 390 395 400

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

Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys  
420 425 430

Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe  
435 440 445

Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser  
450 455 460

Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser  
465 470 475 480

Asp Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser  
485 490 495

Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile  
500 505 510

Gly Glu Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Lys Gln Arg Gln  
515 520 525

Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe  
530 535 540

Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala  
545 550 555 560

Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr  
565 570 575

Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys  
580 585 590

Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys Glu Val Pro Thr Thr Lys  
595 600 605

<210> 9

[0011]

<211>	1834	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	嵌合的 PreF-G 多核苷酸	
<400>	9	
aagcttgcca	ccatggagct gctgatcctc aagaccaacg ccatcaccgc catcctggcc	60
gccgtgacc	tgtgtcttgc ctctccag aacatcaccg aagagttcta ccagtcacc	120
tgtccgccg	tgtccaaggg ctacctgtcc gccctgcgga cggcttgta cacctccgtg	180
atcaccatcg	agctgtccaa catcaaagaa aacaagtga cggcaccga cgccaaggtc	240
aagctgatca	agcaggaact ggacaagtac aagagcgccg tgaccgaact ccagctgtg	300
atgcagtcca	cccctgccac caacaacaag aagtttctgg gcttctgtct gggcgtgggc	360
tccgccatcg	cctccggcat cgccgtgagc aagggtgtgc acctggaggg cgaggtaac	420
aagatcaaga	gogccctgct gtccaccaac aaggccgtgg tgtccctgtc caacggcgtg	480
tccgtgctga	cctccaaggt gctggatctg aagaactaca tcgacaagca gctgtgctt	540
atcgtgaaca	agcagtcctg ctccatctcc aacatcgaga ccgtgatcga gttccagcag	600
aagaacaacc	ggctgtcggg gatcaccgcg gaggttctcc tgaacgccgg cgtgaccacc	660
cctgtgtcca	cctacatgct gacaaactcc gagctgtctt cctgatcaa cgacatgctt	720
atcaccaacg	accaaaaaaaa gctgatgtcc aacaacgtgc agatcgtgcg gcagcagtc	780
tacagcatca	tgagcatcat caaggaagaa gtcctggcct acgtcgtgca gctgcctctg	840
tacggcglga	tcgacacccc ttgttggag ctgcacacct cccccctgtg caccaccaac	900
accnaagagg	gctccaacat ctgctgacc cggaccgacc ggggcttgta ctgcgacaac	960
gccggctccg	tgtccttctt cctctggcc gagacctgca aggtgcagtc caaccgggtg	1020
ttctgcgaca	ccatgaacte ctgaccctg ccttcgagg tgaacctgtg caacatcgac	1080
atcttcaacc	ccaagtacga ctgcaagatc atgaccagca agaccgacgt gtcctccagc	1140
gtgatcacct	ccctgggcgc catcgtgtcc tgctacggca agaccaagtg caccgcctcc	1200
aacaagaacc	ggggaatcat caagacctc tccaacggct gcgactacgt gtccaataag	1260
ggcgttgaca	ccgtgtccgt gggcaacaca ctgtactacg tgaataagca ggaaggcaag	1320
agcctgtacg	tgaaggcgga gcctatcacc aacttctacg accctctggt gttcccttcc	1380
gacgagttcg	acgcctccat cagccaggtc aacgagaaga tcaaccagtc cctggccttc	1440
atccggaagt	ccgacgagaa gctgcataac gggaggaca agatcgaaga gatcctgtcc	1500
aaaaatctacc	acatcgagaa cgagatcgcc cggatcaaga agctgatcgg cgaggctggc	1560
ggcaagcagc	ggcagaacaa gcctcctaac aagcccaaca acgacttcca cttcgaggtg	1620
ttcaacttcc	tgccttcttc catctgtctc aacaacccta cctgctgggc catctgcaag	1680
agaatccccca	acaagaagcc tggcaagaaa accaccacca agcctaccaa gaagcctacc	1740
ttcaagacca	ccaagaagga ccacaagcct cagaccacaa agcctaagga agtgccaacc	1800
accaagcacc	accaccatca ccaactgataa tcta	1834
<210>	10	
<211>	598	
<212>	PRT	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	嵌合的 PreF-G 多肽	
<400>	10	

[0012]

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

Ala Val Thr Leu Cys Phe Ala Ser Ser 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 Ser Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu  
85 90 95

Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr Asn Asn Lys Lys Phe Leu Gly Phe Leu  
100 105 110

Leu Gly Val Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Ile Ala Val Ser Lys Val  
115 120 125

Leu His Leu Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser  
130 135 140

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

Ser Lys Val Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro  
165 170 175

Ile Val Asn Lys Gln Ser Cys Ser Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile  
180 185 190

Glu Phe Gln Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe  
195 200 205

Ser Val Asn Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr  
210 215 220

Asn Ser Glu Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp  
225 230 235 240

Gln Lys Lys Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser  
245 250 255

Tyr Ser Ile Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val  
260 265 270

Gln Leu Pro Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His  
275 280 285

Thr Ser Pro Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys  
290 295 300

Leu Thr Arg Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val  
305 310 315 320

[0013]

Ser Phe Phe Pro Leu Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val  
 325 330 335  
 Phe Cys Asp Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu  
 340 345 350  
 Cys Asn Ile Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr  
 355 360 365  
 Ser Lys Thr Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile  
 370 375 380  
 Val Ser Cys Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg  
 385 390 395 400  
 Gly Ile Ile Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Val Ser Asn Lys  
 405 410 415  
 Gly Val Asp Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys  
 420 425 430  
 Gln Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe  
 435 440 445  
 Tyr Asp Pro Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser  
 450 455 460  
 Gln Val Asn Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser  
 465 470 475 480  
 Asp Glu Lys Leu His Asn Val Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser  
 485 490 495  
 Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile  
 500 505 510  
 Gly Glu Ala Gly Gly Lys Gln Arg Gln Asn Lys Pro Pro Asn Lys Pro  
 515 520 525  
 Asn Asn Asp Phe His Phe Glu Val Phe Asn Phe Val Pro Cys Ser Ile  
 530 535 540  
 Cys Ser Asn Asn Pro Thr Cys Trp Ala Ile Cys Lys Arg Ile Pro Asn  
 545 550 555 560  
 Lys Lys Pro Gly Lys Lys Thr Thr Thr Lys Pro Thr Lys Lys Pro Thr  
 565 570 575  
 Phe Lys Thr Thr Lys Lys Asp His Lys Pro Gln Thr Thr Lys Pro Lys  
 580 585 590  
 Glu Val Pro Thr Thr Lys  
 595

<210> 11  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 异亮氨酸取代的 GCN4 亮氨酸拉链

[0014]



<400> 11

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

Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Ala  
20 25

<210> 12

<211> 1563

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 密码子优化的 PreF 核苷酸序列

<400> 12

```

atggagctgc ccattcctgaa gaccaacgcc atcaccacca tctctgccgc cgtgaccctg      60
tgcttcgcca gcagccagaa catcacggag gagttctacc agagcacgtg cagcgccgtg      120
agcaagggct acctgagcgc gctgcgcacg ggctgggtaca cgagcgtgat cacgatcgag      180
ctgagcaaca tcaaggagaa caagtgcaac ggcacggacg cgaagggtgaa gctgatcaag      240
caggagctgg acaagtacaa gagcgcgggtg acggagctgc agctgctgat gcagagcacg      300
ccggcgacga acaacaagtt cctcggcttc ctgctggggcg tgggcagcgc gatcgcgagc      360
ggcatcgccc tgagcaaggt gctgcacctg gagggcggagg tgaacaagat caagtccgcg      420
ctgctgagca cgaacaaggc ggtcgtgagc ctgagcaacg gcgtgagcgt gctgacgagc      480
aagggtgctcg acctgaagaa ctacatcgac aagcagctgc tgccgatcgt gaacaagcag      540
agctgcagca tcagcaacat cgagaccgtg atcgagttcc agcagaagaa caaccgacct      600
ctggagatca cgcgggagtt ctccgtgaac gcaggcgtga cgacgcccgt gtctacgtac      660
atgctgacga acagcgagct gctcagccctg atcaacgaca tgccgateac gaacgaccag      720
aagaagctga tgagcaacaa cgtgcagatc gtgcgccagc agagctacag catcatgagc      780
atcatcaagg aggagggtgcl ggcatacgtg gtgcagctgc cgtgttacgg cgtcatcgac      840
acgccccgtc tgaagctgca cagcagcccc ctgtgcacga ccaacacgaa ggagggcagc      900
aacatctgcc tgacgaggac ggaccggggc tggtagctgc acaacgcggg cagcgtgagc      960
ttcttcccgc tcgaggagac gtgcaagggtg cagagcaacc gcgtcttctg cgacacgatg      1020
aacagccctg cgtcggcagc cgagggtgac ctgtgcaaca tcgacatctt caaccogaag      1080
tacgacigca agatcatgac gagcaagacc gatgtcagca gcagcgtgat cacgagcctc      1140
ggcgcgatcg tgagctgcta cggcaagacg aagtgacagg cgagcaacaa gaaccgcggc      1200
atcatcaaga cgllcagcaa cggctgcgac tatgtgagca acaaggcgct ggacactgtg      1260
agcgtcggca acacgctgta ctacgtgaac aagcaggagg gcaagagcct gtacgtgaa      1320
ggcagagcca tcatcaactt ctacgacccg ctctgtgtcc cgagcgacga gttcgacgcg      1380
agcatcagcc aagtgaacga gaagatcaac cagagcctgg cgttcatccg caagagcgac      1440
gagaagctgc acaacgtgga ggacaagatc gaggagatcc tgagcaagat ctaccacatc      1500
gagaacgaga tcgctgcgat caagaagctg atcggcgagg cgcatcatca ccatcaccat      1560
tga                                                                                   1563

```

<210> 13

<211> 1685

<212> DNA

<213> 人工序列

[0015]

<220>  
 <223> 具有内含子的 PreF 多核苷酸序列

<400> 13  
 atggagctgc lgalcctgaa aaccaacgcc atcaccgcca tcctggccgc cgtgacctg 60  
 tgccttgcct cctcccagaa catcaccgag gaggttctacc agtccacctg ctccgcccgtg 120  
 tccaagggct acctgtccgc cctgcccacc ggctgggtaca cctccgtgat caccatcgag 180  
 ctgtccaaca tcaaggaaaa caagtgaac ggcaccgacg ccaagggtgaa gctgatcaag 240  
 caggagctgg acaagtacaa gagcgcctgt accgaactcc agctgctgat gcagtccacc 300  
 cctgccacca acaacaagtt tctgggcttc ctgctggggcg tgggctccgc catcgccctc 360  
 ggcatcgccg tgagcaaggt acgtgctggg acttgggttc cctttttttt aataaaaagt 420  
 tataatcitta atgttatata cataattcct giatgtgac catgtgctta tgactttgtt 480  
 talcatgtgt ttaggtgctg cacctggagg gcgagggtgaa caagatcaag agcgccttgc 540  
 tgtccacca caaggccgtg gtgcccctgt ccaacggcgt gtccgtgctg accccaagg 600  
 tgcctgact gaagaactac atcgacaagc agctgctgcc tategtgac aagcagctct 660  
 gctccatctc caacatcgag acctgatcg agttccagca gaagaacaac cggctgctgg 720  
 agatcaccgg cgagttctcc gtgaacccg gcgtgaccac cccctgtgtcc acctacatgc 780  
 tgaccaactc cgagctgctg tccctgata acgacatgcc tateccaac gaccagaaaa 840  
 aactgatgic caacaacgtg cagatcgtgc ggcagcagtc ctacagcctc atgagcatca 900  
 tcaaggaaga ggtgctggcc taccgtggtc agctgcctct gtaccggcgtg atcgacaccc 960  
 ctgtctgaaa gctgcacacc tccccctgt gcaccaccaa caccaaggag ggtccaaca 1020  
 tctgctgac ccggaccgac cggggctggg actgagcaaa cgccggctcc gtgtccttct 1080  
 tccccctggc cgagacctgc aagggtcagt ccaaccgggt gttctgcgac accatgaact 1140  
 ccttgacctt gccttccgag gtgaacctgt gcaacatcga catcttcaac cccaagtacg 1200  
 actgcaagat catgaccage aagaccgacg tgtcccacag cgtgatcacc tcccggggcg 1260  
 ccatcgtgic ctgctacggc aagaccaagt gcaccgctc caacaagaac cgggggatca 1320  
 tcaagacctt ctcaacggc tgcgactacg tctccaataa gggcgtggac accgltgccc 1380  
 tgggcaacac actgtactac gtgaataagc aggagggcaa gagcctgtac gtgaaggcgg 1440  
 agcctatcat caactctac gacctctgg tttcccttc cgacgagttc gacgcctcca 1500  
 tcagccaggt gaacgagaag atcaaccagt ccttggcctt catccggaag tccgacgaga 1560  
 agctgataa cgtggaggac aagatcgagg agatcctgic caaaatctac cacatcgaga 1620  
 acgagatcgc ccggatcaag aagctgatcg gcgaggccgg aggtcaccac caccatcacc 1680  
 actga 1685

<210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成的接头肽

<400> 14  
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 15  
 <211> 4  
 <212> PRT

[0016]

<213> 人工序列

<220>

<223> 弗林蛋白酶切割共有基序

<400> 15

Arg Ala Arg Arg  
1

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

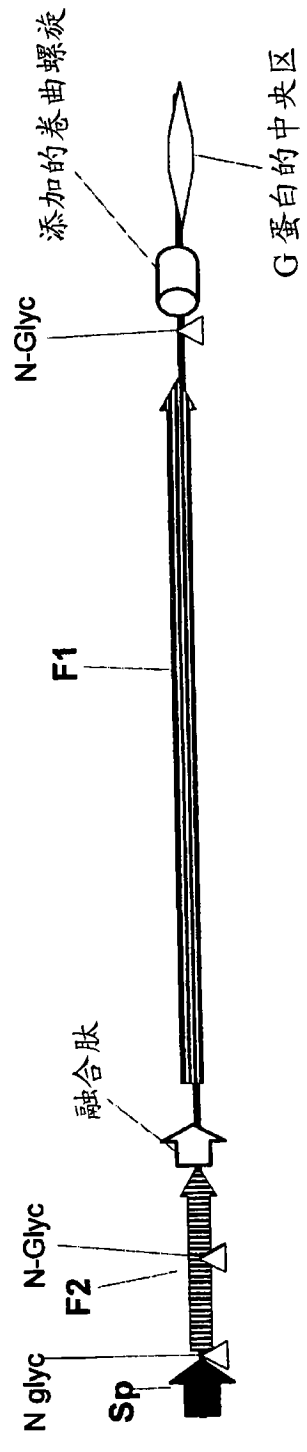
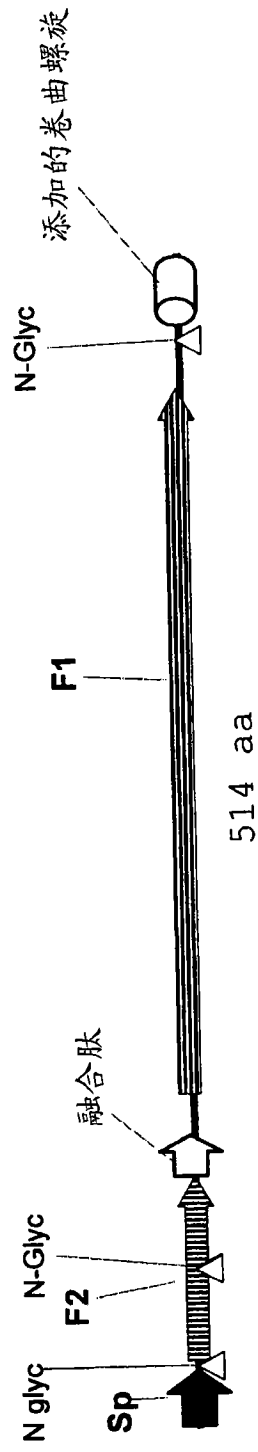
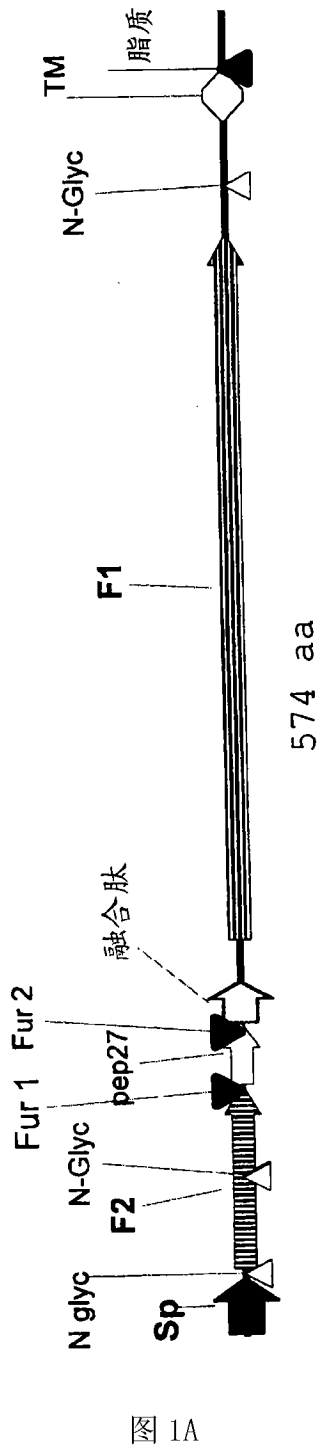
<213> 人工序列

<220>

<223> 弗林蛋白酶切割共有基序

<400> 16

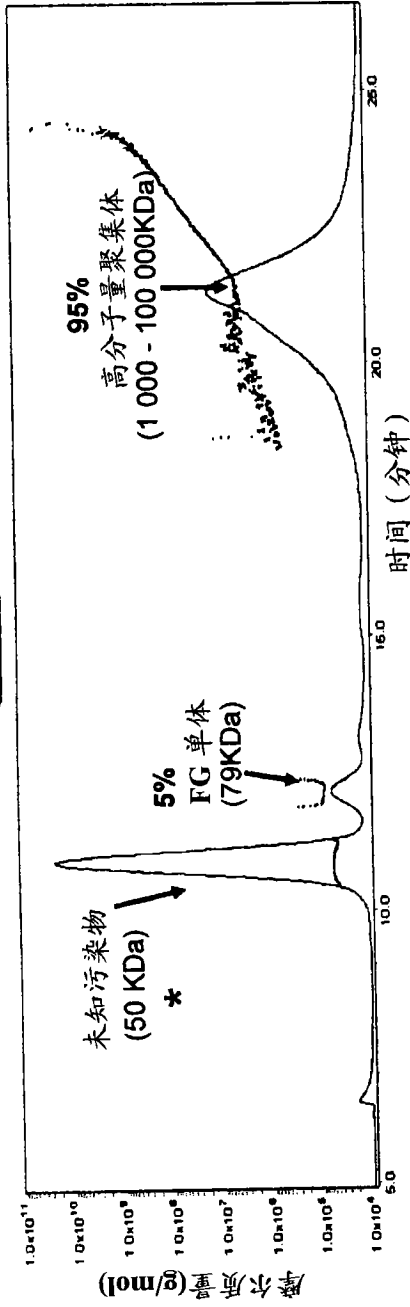
Arg Lys Arg Arg  
1



### PreF 和 FG 的流体力学表征

通过 FFF-MALLS 分析 FG Rix 洗脱  
注射 100 mcl 缓冲液: 1 X PBS, pH7.4

EF - F0.Rix

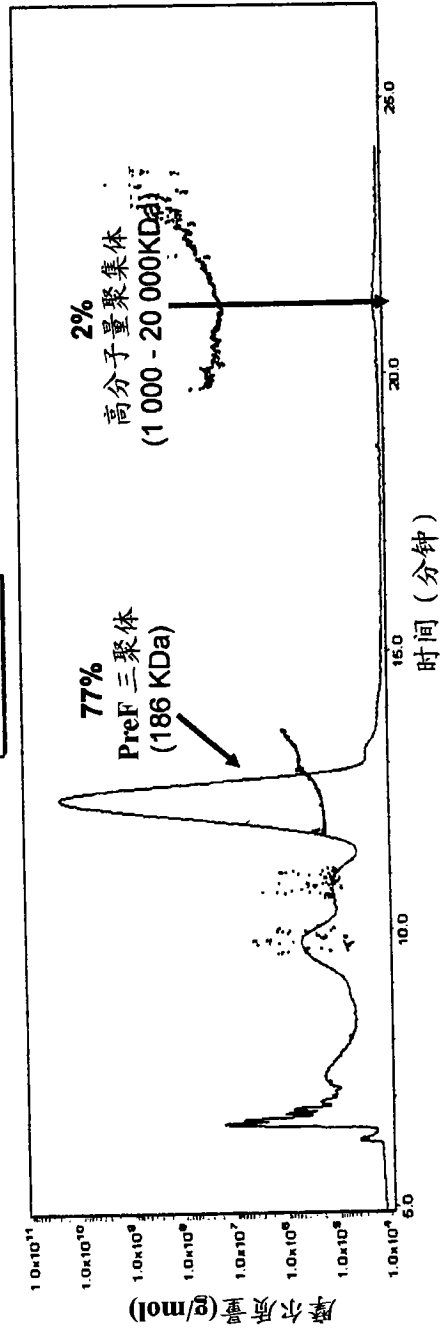


## FG

\* 未知的摩尔消光系数，  
因此未知的比例

通过 FFF-MALLS 分析 PreF ABio 洗脱  
注射 100 mcl 缓冲液: 1 X PBS, pH7.4

EF - PreF ABio.R2



## PreF

图 2

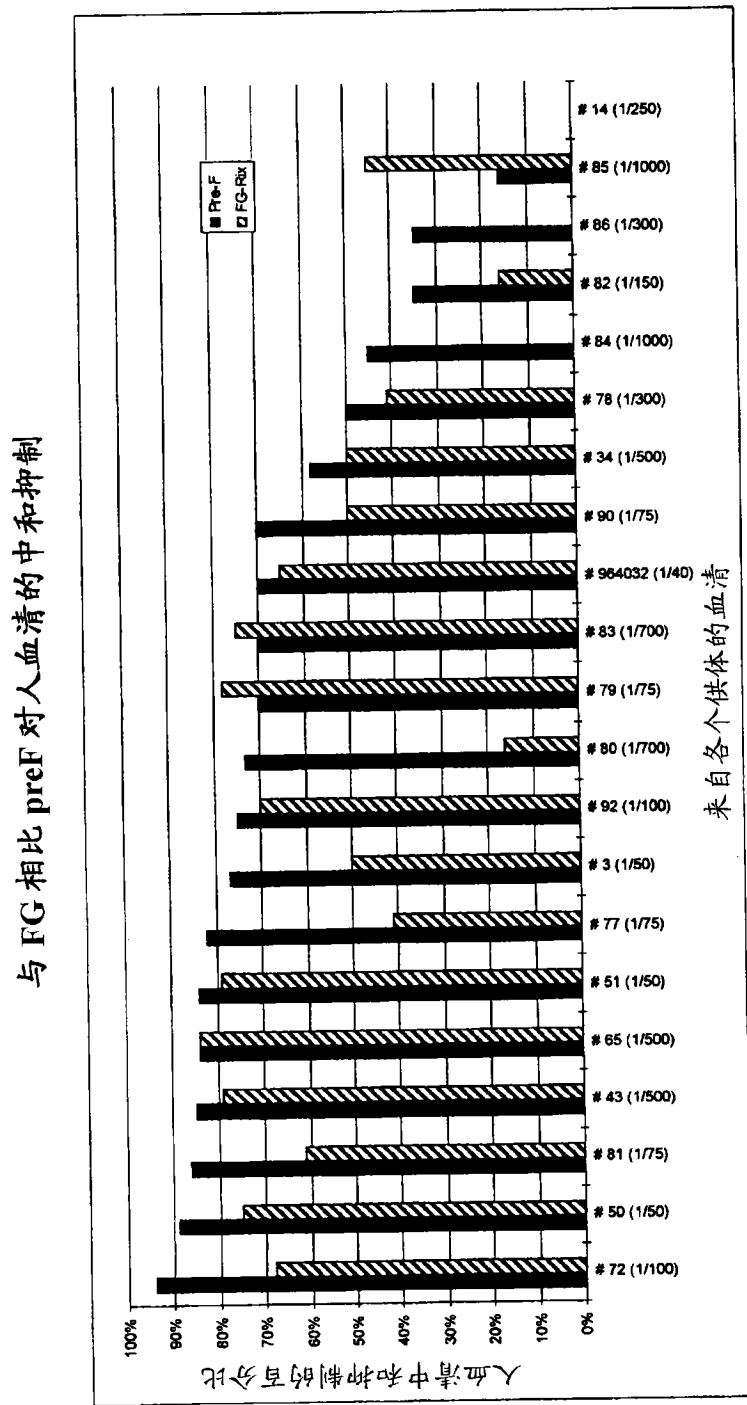


图 3

经免疫的小鼠中的血清学, CHO-pref

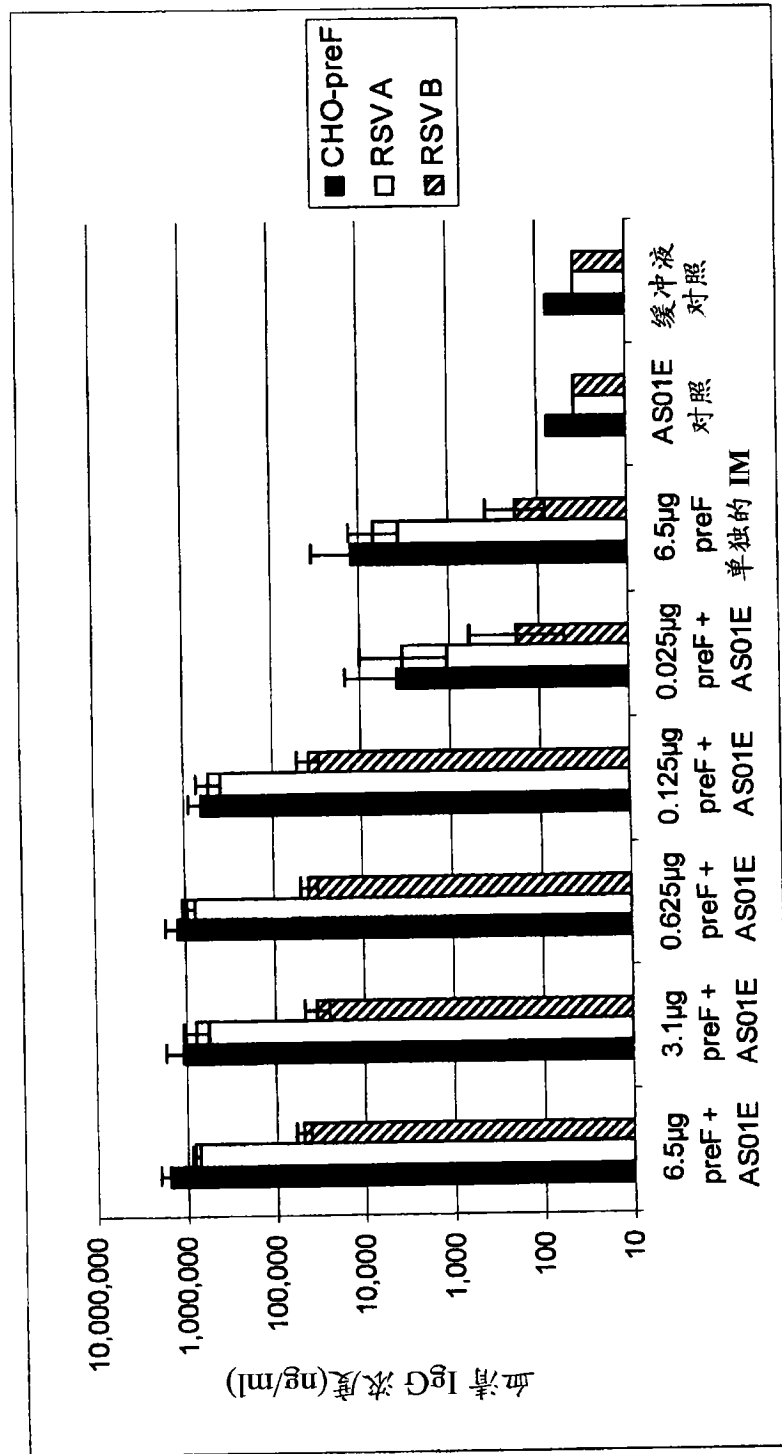


图 4A

经免疫的小鼠中的血清学，CHO-preF

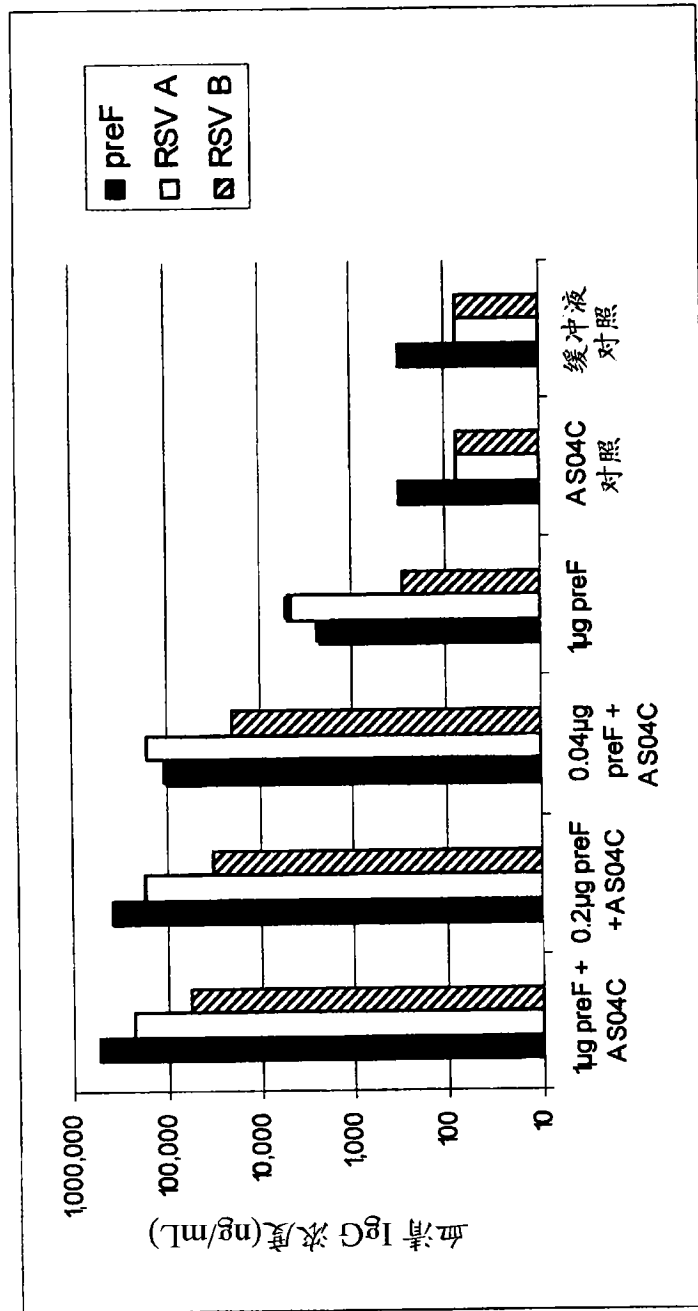
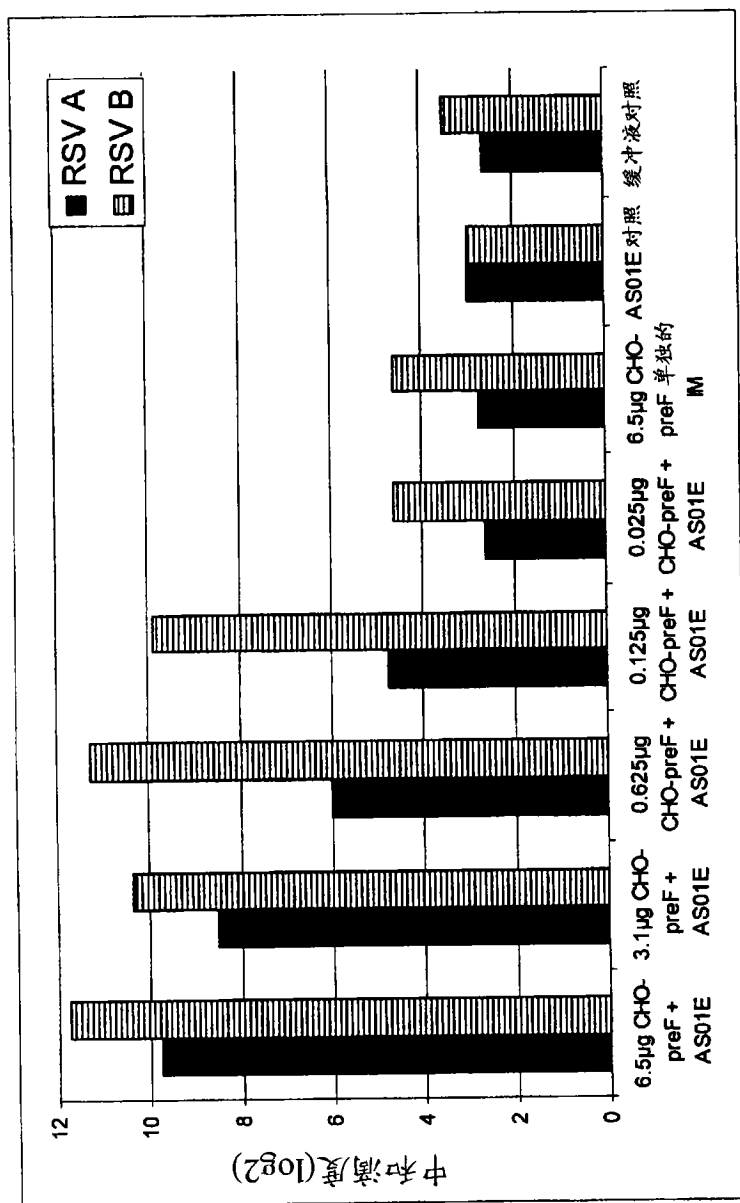


图 4B



对 CHO-preF 体内中和滴度的评估



\*相同的测定法，自不同动物研究采集的血清

图 5A

对 CHO-preF 体内中和滴度的评估

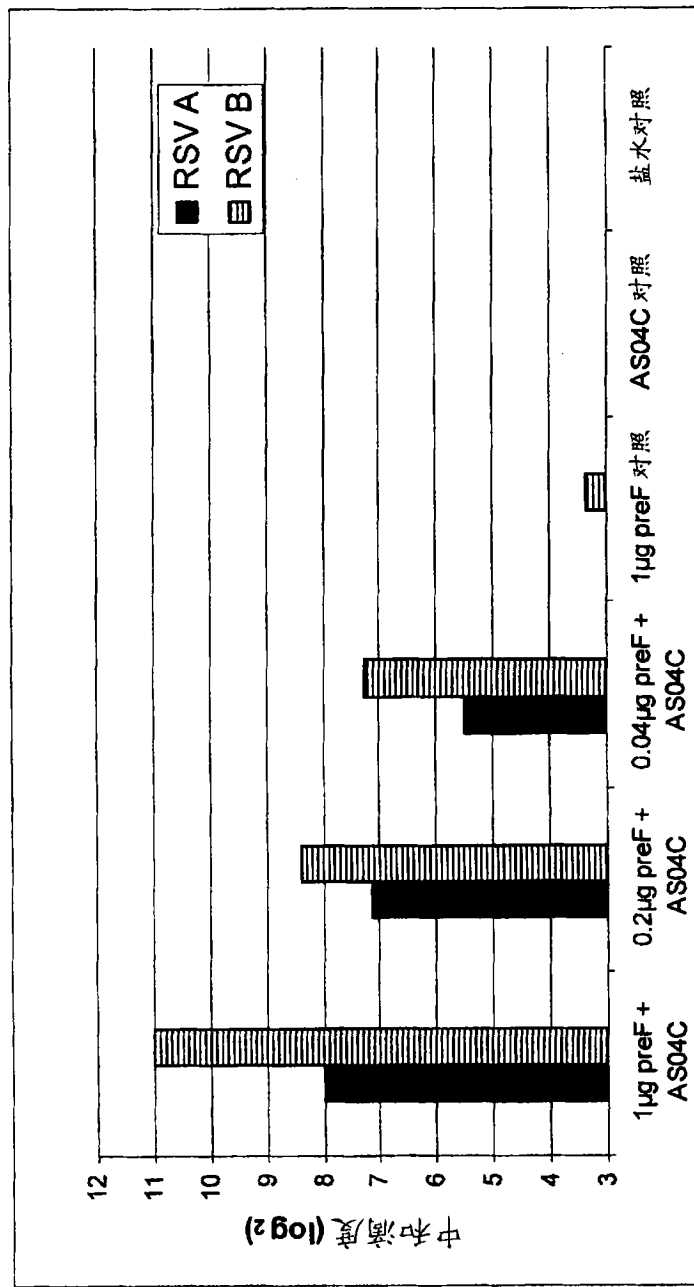


图 5B

### CHO-preF 针对攻击的保护

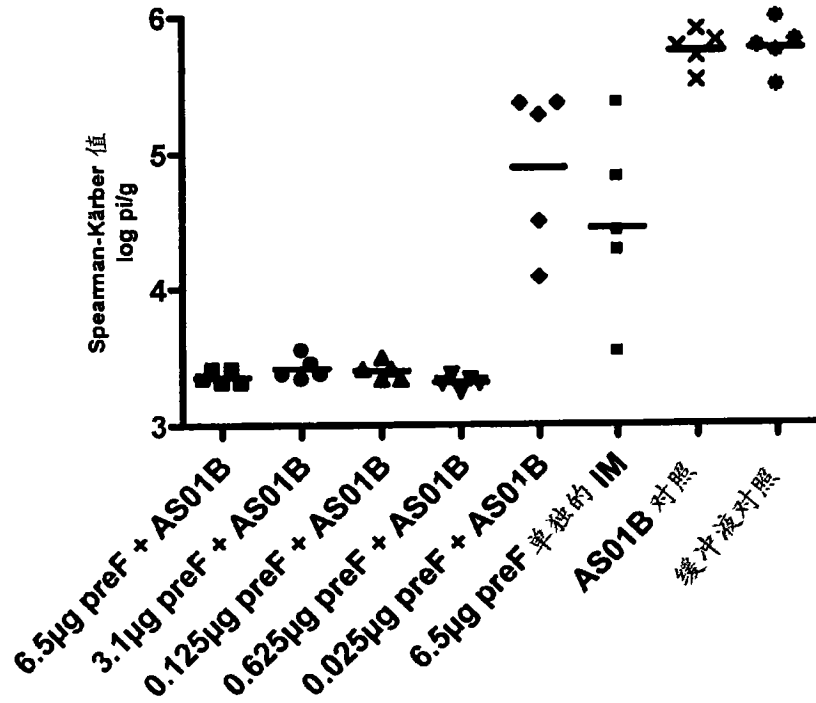


图 6A

### CHO-preF 针对攻击的保护

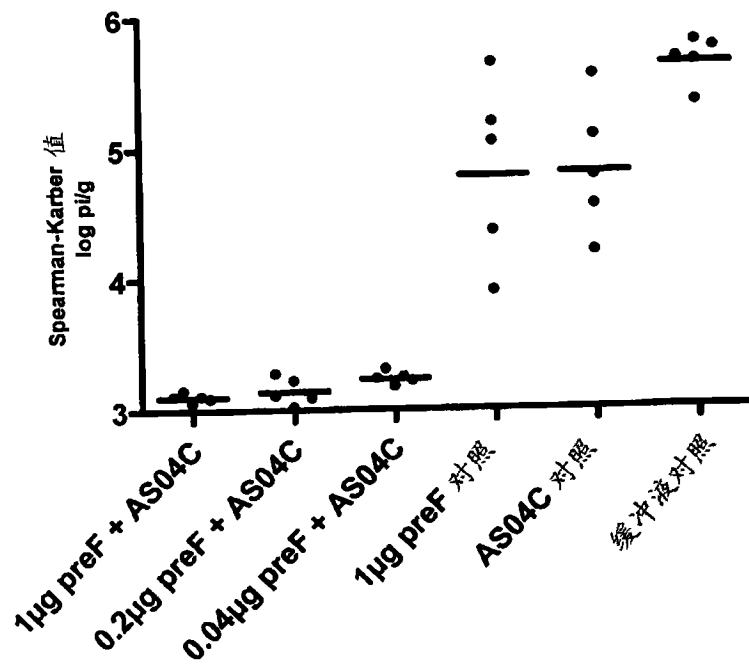


图 6B

### 小鼠中攻击后的肺嗜曙红细胞募集

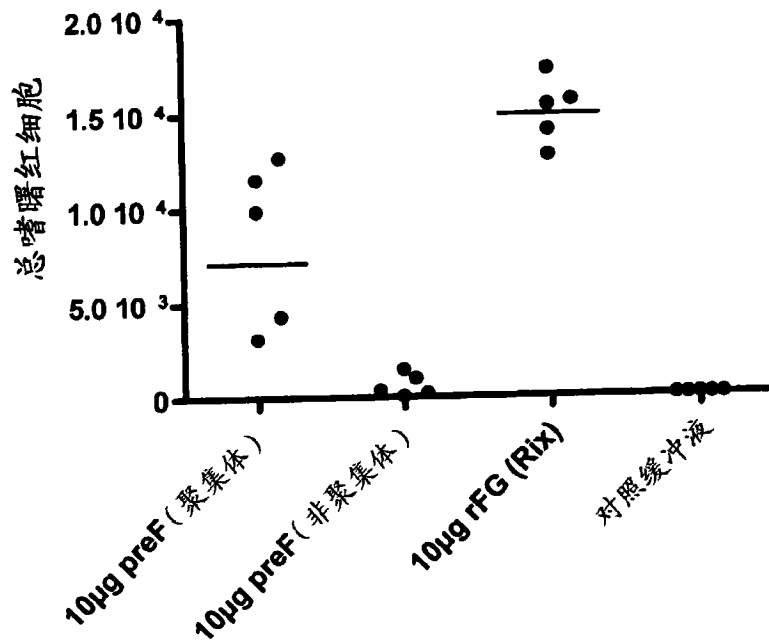


图 7