



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101678095 B

(45) 授权公告日 2013.04.24

(21) 申请号 200780044357.8

(22) 申请日 2007.10.01

(30) 优先权数据

60/848,451 2006.09.29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.05.31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/021053 2007.10.01

(87) PCT申请的公布数据

W02008/057158 EN 2008.05.15

(73) 专利权人 赛诺菲巴斯德生物制剂公司

地址 美国麻萨诸塞州

(72) 发明人 K·凯尔宁 Y·颜 H·克利恩索斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

代理人 林毅斌 李连涛

(51) Int. Cl.

A61K 39/12(2006.01)

C12N 15/00(2006.01)

(56) 对比文件

US 5541100 A, 1996.07.30,

WO 2006078648 A2, 2006.07.27,

SHERRY B ET AL.: "USE OF MONOCLONAL

ANTIBODIES TO IDENTIFY FOUR NEUTRALIZATION

IMMUNOGENS ON A COMMON COLD PICORNAVIRUS

HUMAN RHINOVIRUS 14". 《JOURNAL OF

VIROLOGY》. 1986, 第 57 卷 (第 1 期), 246-257.

BLAAS D ET AL.: "COMPARISON OF THE THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF TWO HUMAN RHINOVIRUSES HRV2 AND HRV14". 《PROTEINS STRUCTURE FUNCTION AND GENETICS》. 1987, 第 2 卷 (第 4 期), 263-272.

LEDFOORD REBECCA M ET AL.: "VP1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: Insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds.". 《JOURNAL OF VIROLOGY》. 2004, 第 78 卷 (第 7 期), 3663-3674.

LAINE P. ET AL.: "Phylogenetic analysis of human rhinovirus capsid protein VP1 and 2A protease coding sequences confirms shared genus-like relationships with human enteroviruses". 《JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY》. 2005, 第 86 卷 697-706.

LAINE PIA ET AL.: "Alignment of capsid protein VP1 sequences of all human rhinovirus prototype strains: Conserved motifs and functional domains". 《JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY》. 2006, 第 87 卷 (第 1 期), 129-138.

审查员 周洋

权利要求书2页 说明书13页

序列表12页 附图15页

(54) 发明名称

新型鼻病毒中和免疫原 (NIMIV) 及其在疫苗中的应用

(57) 摘要

本发明涉及用于预防或治疗人类鼻病毒感染的方法和组合物。

CN 101678095 B

1. 人鼻病毒 (HRV) 的嵌合 VP1 蛋白, 所述嵌合 VP1 蛋白包含来自第一 HRV 血清型的 VP1 蛋白, 其中来自所述第一 HRV 血清型的所述 VP1 蛋白的鼻病毒中和免疫原 IV (NimIV) 肽被第二 HRV 血清型 NimIV 肽置换, 其中所述 NimIV 肽由 HRV VP1 蛋白 C 末端的 15-30、10-20、14-19、15-18 或 16-17 个氨基酸的片段组成。

2. 权利要求 1 的嵌合 VP1 蛋白, 其中所述 NimIV 肽是人鼻病毒 14 (HRV14)、HRV6 或 HRV72 的 NimIV 肽。

3. 权利要求 1 的嵌合 VP1 蛋白, 其中所述 NimIV 肽包含人鼻病毒的病毒结构蛋白 1 (VP1) 羧基末端区域的第 277-283 位氨基酸。

4. 权利要求 3 的嵌合 VP1 蛋白, 其中所述肽包含人鼻病毒的 VP1 羧基末端区域的第 275-285 位氨基酸。

5. 权利要求 1 的嵌合 VP1 蛋白, 其中所述 NimIV 肽的序列包含选自以下的序列: PVIKKR、PVIKKRK (HRV14)、PVIKKRE (HRV6 和 HRV72)、PVIKKRS (HRV92)、PVIEKRT (HRV83)、PKIIKKR (HRV86)、PVIKRRE (HRV35)、PIIAKRE (HRV79)、TIIKKRT (HRV3)、NTEPVIKKRKGDIKSY (HRV14) 和 A-X₁-X₂-I-X₃-X₄-R-X₅-B, 其中 X₁ = P 或 T; X₂ = V、K 或 I; X₃ = K、E、I 或 A; X₄ = K 或 R; X₅ = S、E、D、T、R、T 或 K; A = 0-10 个附加氨基酸; 和 B = 0-10 个附加氨基酸。

6. 编码权利要求 1-5 中任一项的嵌合 VP1 蛋白的分离的核酸分子或其互补核酸分子。

7. 包含权利要求 6 的核酸分子的载体。

8. 权利要求 7 的载体, 其中所述载体是人鼻病毒载体。

9. 权利要求 8 的载体, 其中所述人鼻病毒载体的血清型与 NimIV 肽所获自的人鼻病毒的血清型不同。

10. 权利要求 9 的载体, 其中所述 NimIV 肽或核酸分子取代了初始存在于所述载体中的 NimIV 序列而存在于所述人鼻病毒载体中。

11. 权利要求 8 的载体, 其中所述人鼻病毒载体是人鼻病毒 14 (HRV14) 载体。

12. 权利要求 7 的载体, 其中所述 NimIV 肽所获自的人鼻病毒是人鼻病毒 6 (HRV6) 或人鼻病毒 72 (HRV72)。

13. 权利要求 8 的载体, 其中所述人鼻病毒载体是人鼻病毒 14 (HRV14) 载体, 而所述 NimIV 肽所获自的人鼻病毒是人鼻病毒 6 (HRV6) 或人鼻病毒 72 (HRV72)。

14. 权利要求 7 的载体, 其中所述载体包含与权利要求 1-5 中任一项的嵌合 VP1 蛋白交联的灭活人鼻病毒。

15. 包含权利要求 1 的嵌合 VP1 蛋白或权利要求 6 的核酸分子的药物组合物。

16. 权利要求 15 的药物组合物, 其中所述嵌合 VP1 蛋白包含在载体内。

17. 权利要求 15 的药物组合物, 所述药物组合物还包括一种或多种可药用稀释剂、赋形剂、载体或佐剂。

18. 权利要求 17 的药物组合物, 其中所述佐剂选自几丁质微粒和铝化合物。

19. 权利要求 15 的药物组合物, 所述药物组合物还包含一种或多种另外的人鼻病毒中和免疫原。

20. 权利要求 1-5 中任一项的嵌合 VP1 蛋白或权利要求 6 的核酸分子在制备用于在对象中诱导针对鼻病毒免疫应答的的药物中的用途。

21. 权利要求 20 的用途,其中所述对象没有受到鼻病毒感染,但具有被鼻病毒感染的风险。

22. 权利要求 20 的用途,其中所述对象已被鼻病毒感染。

23. 由 HRV VP1 蛋白 C 末端的 15-30、10-20、14-19、15-18 或 16-17 个氨基酸的片段组成的肽。

24. 权利要求 23 的肽,其来源于 HRV6、HRV72 或 HRV14。

25. 权利要求 23-24 中任一项的肽,其中所述肽的序列包含选自以下的序列:PVIKKR、PVIKKRK (HRV14)、PVIKKRE (HRV6 和 HRV72)、PVIKKRS (HRV92)、PVIEKRT (HRV83)、PKIIKKR (HRV86)、PVIKRRE (HRV35)、PIIAKRE (HRV79)、TIIKKRT (HRV3)、NTEPVIKKRKGDIIKSY (HRV14) 和 A-X₁-X₂-I-X₃-X₄-R-X₅-B,其中 X₁ = P 或 T;X₂ = V、K 或 I;X₃ = K、E、I 或 A;X₄ = K 或 R;X₅ = S、E、D、T、R、T 或 K;A = 0-10 个附加氨基酸;和 B = 0-10 个附加氨基酸。

26. 编码权利要求 23-25 中任一项的肽的核酸分子或其互补核酸分子。

新型鼻病毒中和免疫原 (NIMIV) 及其在疫苗中的应用

发明领域

[0001] 本发明涉及预防或治疗人鼻病毒感染的方法和组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 人鼻病毒 (HRV) 是普通感冒唯一最重要的病原体 (Arruda 等, *J. Clin. Microbiol.* 35 :2864-2868 (1997) ; Couch, "Rhinoviruses." In : Fields, B. N., Knipe, D. M. (主 编), *Virology*. Raven Press, New York, 607-629 (1990) ; Turner, *Antivir. Res.* 49(1) :1-14 (2001)。导致约 1/3 普通感冒爆发的 HRV 约有 100 种血清型, 来自被 HRV 感染患者恢复期血清不完全交叉中和。尽管 HRV 引起的上呼吸道疾病通常轻微并且具有自限性, 然而工作和学习停顿所造成的社会经济影响以及不恰当使用抗生素的程度是显著的。据估计, 每年在美国上呼吸道疾病导致至少 2500 万次请假和 2300 万次缺课 (Anzueto 等, *Chest* 123(5) :1664-1672 (2003) ; Rotbart, *Antivir. Res.* 53 :83-98 (2002))。

[0004] 越来越多的证据表明 HRV 感染和更严重的医学并发症之间的联系。例如 HRV 引起的感冒是急性中耳炎和鼻窦炎重要的易感因素, 并且是引起成人和小孩哮喘恶化的主要因素。HRV 感染也与患有囊性纤维病、支气管炎和其他潜在的呼吸系统病症的个体的下呼吸道综合症相关 (Gern, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23 :S78-S86 (2004) ; Anzueto 等, *Chest* 123(5) :1664-1672 (2003) ; Gern 等, *Clin. Microbiol. Rev.* 12(1) :9-18 (1999) ; Pitkaranta 等, *J. Clin. Microbiol.* 35 :1791-1793 (1997) ; Pitkaranta 等, *Pediatrics* 102 :291-295 (1998) ; Rotbart, *Antivir. Res.* 53 :83-98 (2002))。

[0005] 迄今为止, 预防或治疗 HRV 感染引起的疾病还没有经批准的有效抗病毒疗法。因此, 存在寻找可以起以下作用药剂的显著未满足的医药需求: 预防 HRV 感染、缩短 HRV 引起的疾病的持续时间、减轻症状的严重性、减少继发细菌感染和减轻潜在疾病 (underlying disease) 的恶化、减少病毒传播。预防性 HRV 疫苗应针对多种血清型起保护作用, 以减少 HRV 感染数量并缩小其临床影响。

[0006] 制备基于对应单独结构蛋白的保守区 (McCray 等, *Nature* 329 :736-738 (1987)) 或作为生物融合体的一部分 (Brown 等, *Vaccine* 9 :595-601 (1991) ; Francis 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 :2545-2549 (1990)) 的合成多肽 HRV 疫苗的尝试仅取得有限成功, 因为所选肽免疫原性低, 这可部分通过它们较少接触病毒表面 (有限接触抗体) 或构象局限性来解释。

[0007] 本发明克服了这些限制, 并展示了诱发保护血清型交叉反应的中和抗体应答从而预防和治疗 HRV 感染的疫苗。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供分离的鼻病毒中和免疫原 IV (NimIV) 肽。这些肽可以来自鼻病毒的任何血清型, 例如人鼻病毒 (例如 HRV14)。这些肽可以包括例如人鼻病毒的病毒结构蛋白 1 (VP1) 的羧基末端区域的第 277-283 位氨基酸 (例如第 275-285 位氨基酸)。例示性的序列包括以下序列: PVIKKR (SEQ ID NO :1)、PVIKKRK (HRV14 ; SEQ ID NO :2)、PVIKKRE (HRV6 和 HRV72 ; SEQ ID NO :3)、PVIKKRS (HRV92 ; SEQ ID NO :4)、PVIEKRT (HRV83 ; SEQ ID NO :

5)、PKIIKKR(HRV86 ;SEQ ID NO :6)、PVIKRRE(HRV35 ;SEQ IDNO :7)、PIIAKRE(HRV79 ;SEQ ID NO :8)、TIIKKRT(HRV3 ;SEQ IDNO :9)、NTEPVIKKRKGDIKSY(HRV14 ;SEQ ID NO :10) 和 A-X₁-X₂-I-X₃-X₄-R-X₅-B,其中 X₁ = P 或 T ;X₂ = V、K 或 I ;X₃ = K、E、I 或 A ;X₄ = K 或 R ;X₅ = S、E、D、T、R、T 或 K ;A = 0-10 个附加氨基酸 ;和 B = 0-10 个附加氨基酸 (SEQ ID NO : 41)。

[0010] 本发明还包括分离的编码 NimIV 肽的核酸分子或其互补核酸分子 (complement)。此外,本发明包括含有本发明的肽和核酸分子的载体 (例如 HRV14 载体)。该载体可以是例如人鼻病毒载体,例如与可 NimIV 肽所获自的人鼻病毒血清型不同的人鼻病毒载体。在一个实施方案中,NimIV 肽分子或核酸分子存在于上述人鼻病毒载体,代替了最初存在于上述载体的 NimIV 序列。在另一个实施方案中,NimIV 肽所获自的人鼻病毒是人鼻病毒 6(HRV6) 或者人鼻病毒 72(HRV72)。HRV72 的 NimIV 肽可包含在例如人鼻病毒 14(HRV14) 载体中。在另一个实施方案中,NimIV 肽所获自的人鼻病毒的 VP1 蛋白或者核酸取代了载体中的 VP1 蛋白或者核酸分子。在另外的实施方案中,该载体包括与 NimIV 肽交联的灭活人鼻病毒或者与 NimIV 序列融合的乙型肝炎核心序列 (参见例如 Fiers 等, *Virus Res.* 103 :173-176, 2004 ;WO 2005/055957 ;US 2003/0138769 A1 ;US2004/0146524A1 ;US 2007/0036826 A1)。

[0011] 本发明还包括药物组合物,其包含本文描述的肽、核酸分子和载体。该药物组合物还任选包括一种或多种可药用稀释剂、赋形剂、载体和 / 或佐剂。例示性的佐剂包括几丁质微粒和铝化合物。此外,该组合物可以任选包括一种或多种附加人鼻病毒中和免疫原。

[0012] 本发明还包括在被试者中诱导鼻病毒免疫应答的方法。这些方法包括给予被试者分离的 NimIV 肽或核酸分子。在一些实施方案中,所述被试者没有受感染但存在发生鼻病毒感染风险。在其他实施方案中,被试者已经感染鼻病毒。

[0013] 定义

[0014] “给药”或“给予”是指给予哺乳动物 (例如人) 一定剂量本发明组合物的方法,所述方法是:例如鼻内给药、表面 (topical) 给药、全身给药、吸入给药、口服给药、静脉内给药、皮下给药、血管内给药、动脉内给药、瘤内给药、腹膜内给药、心室内给药、硬脑膜内 (intraepidural) 给药、鼻腔给药、直肠给药、巩膜内 (intrascleral) 给药、眼部给药、眼内给药或肌肉给药。根据不同的因素,例如药物组合物的组分、潜在和实际疾病位点 (例如待治疗的肿瘤或血管病症的位置) 和疾病的严重程度,优选的给药方法可以不同。

[0015] “人鼻病毒 (human rhinovirus)” (HRV) 是指小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 鼻病毒属 (Rhinovirus) 的任何成员。HRV 可以根据血清型进行分类,已知其存在的血清型约有 100 种。例如,HRV14、HRV6、HRV37 和 HRV92 分别是指血清型编号为 14、6、37 和 92 的人鼻病毒。

[0016] “可药用载体”是指被治疗的哺乳动物生理学上可接受、同时保留了与其一起给予的化合物预防或治疗特性的载体。一种例示性的可药用载体是生理盐水。其他生理学上可接受的载体和其制剂已为本领域技术人员所熟知,实例参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, (第 18 版), A. Gennaro 主编, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA, 通过引用结合到本文中。

[0017] “中和免疫原 (neutralizing immunogen)” (Nim) 是指在引入人体之后诱发抗 -HRV 中和抗体的人鼻病毒 (HRV) 序列。对于本文描述的重组 HRV 疫苗, NimIV 血清型置于上标

处,以明确说明 Nim 的来源(例如 NimIV^{HRV6}是指来源于 HRV6 血清型的 NimIV 序列)。

[0018] “中和免疫原 IV 肽”或“NimIV 肽”为具有鼻病毒结构蛋白 1(VP1) 羧基末端区域序列的肽(例如第 274-289 位氨基酸,使用 HRV14(NTEPVIIKKRKGDIKSY;SEQ ID NO:10)作为参考;见图 12B)。NimIV 肽可以包括下述的特定序列、附加侧翼序列、或者仅核心、保守序列。此外,该肽可不经修饰,因此与天然存在的 NimIV 序列相同,或者可包括一个或多个置换、缺失、插入或其他修饰(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个置换、缺失或插入),前提是基本维持该肽的免疫原性。此外,NimIV 肽可包含 L 型或 D 型氨基酸,或其混合物。

[0019] 可以用于本发明的 NimIV 肽序列的实例列举如下。例如,肽可以具有 5-30、8-25、10-20、14-19、15-18 或 16-17 个氨基酸的长度。该肽可包含核心 NimIV 序列,并任选在侧翼具有附加 NimIV 序列或连接序列(例如在氨基末端和 / 或羧基末端有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸)。核心 NimIV 序列的实例包括:PVIIKKR(SEQ ID NO:1)、PVIIKKRK(HRV14;SEQ ID NO:2)、PVIKKRE(HRV6 和 HRV72;SEQ ID NO:3)、PVIKKRS(HRV92;SEQ ID NO:4)、PVIEKRT(HRV83;SEQ ID NO:5)、PKIIKKR(HRV86;SEQ ID NO:6)、PVIKKRE(HRV35;SEQ ID NO:7)、PIIAKRE(HRV79;SEQ ID NO:8)、TIIKKRT(HRV3;SEQ ID NO:9)、TIVKKRT(HRV3;SEQ ID NO:11)、TAIVTRP(HRV2;SEQ ID NO:12)、VAIRPRT(HRV16;SEQ ID NO:13)、TAIVRRN(HRV1A;SEQ ID NO:14)、NTEPVIIKKRKGDIKSY(HRV 14;SEQ ID NO:10),和其他与这些序列比对的 HRV 序列(例如,参见图 11)。核心序列可定义为例如式 A-X₁-X₂-I-X₃-X₄-R-X₅-B,其中 X₁ = P 或 T;X₂ = V、K 或 I;X₃ = K、E、I 或 A;X₄ = K 或 R;X₅ = S、E、D、T、R、T 或 K;A = 0-10 个附加氨基酸;B = 0-10 个附加氨基酸(SEQ ID NO:41)。A 和 / 或 B 的序列可以为天然存在的 NimIV/VP1 序列、人工合成序列(例如连接序列)、或其混合物。

[0020] “中和免疫原 IV 核酸分子”或“NimIV 核酸分子”为本文定义的编码 NimIV 肽的核酸分子或其互补核酸分子。

[0021] 如果 NimIV 肽或核酸分子不包括与其在天然存在病毒上邻接的侧翼序列,则它是“分离的(isolated)”。此肽或核酸分子可限定为:例如 VP1 全长序列、VP1 羧基末端的一半、VP1 羧基末端的四分之一、或 VP1 的羧基末端 15-30 个氨基酸、或核酸序列的相应区域(参见例如 Laine 等, J. Gen. Virol. 87:129-138, 2006)。

[0022] 在以下情况中 NimIV 肽“基本由特定序列组成”:其只包含此序列,并在氨基和 / 或羧基端可能包含最少量侧翼序列(例如 1-10、2-9、3-8、4-7 或 5-6 个氨基酸),所述侧翼序列可为天然存在的序列、人工序列(例如连接序列)、或其组合。这样的序列可以存在于更大序列(例如异源病毒或其他载体序列)中。

[0023] 在以下情况中 NimIV 核酸分子“基本由特定序列组成”:其只包含此序列,并在 5' 和 / 或 3' 端可能包含最少量侧翼序列(例如 3-30、6-27、9-24、12-21 或 15-18 个核苷酸),所述侧翼序列可为天然存在的序列、人工序列(例如连接序列)、或其组合。这样的序列可以存在于更大序列(例如异源病毒或其他载体序列)中。

[0024] 本发明其他特征和优点将在以下发明详述、附图和权利要求中显而易见。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1 是 CR6 基因组的结构区(下图)和 HRV6(SEQ ID NO:18)与 HRV14(SEQ ID NO:10)的 NimIV 序列的氨基酸比对(上图)的图。

[0027] 图 2A 和 2B 是显示用豚鼠多克隆抗体抗 -HRV14 (图 2A) 和抗 -HRV6 (图 2B) 进行的 CR6 (NimIV 序列为 HRV6 序列的嵌合体, 其包含除 NimIV 序列以外的 HRV14 序列, ; 本文还称之为 CR6 ; 每对柱中的右柱 (绿色)) 和 HRV14 (每对柱中的左柱 (棕色)) 的蚀斑减少中和试验结果的图。20K、40K、60K、80K 对应的抗体效价分别为 2×10^4 、 4×10^4 、 6×10^4 和 8×10^4 。上面 (绿色) 和下面 (棕色) 的虚线分别表示 HRV14 和 HRV6 50% 减少的蚀斑数。

[0028] 图 3A-3D 是 HRV14 和 CR6 的三维模型。图 3A 和 3B 是基于已知晶体结构 (Che 等, J. Virol. 72 :4610-4622 (1998)) 使用嵌合体软件 (Chimera software) (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) 设计的 HRV14 病毒颗粒的 3D 模型。VP1、Vp2 和 VP2 分别用深蓝色、红紫色和灰色表示。HRV14 颗粒用空间填充模型表示, 其中 Nim 在其范德华表面 (Van-der-Vaals surface) 用颜色标明。分别用绿线、蓝线和红紫色线围起的面分别表示 NimIII、NimIV 和 NimII。图中显示 NimIV 与 NimIII 的接触通过 K287 来提供。注意到在此模型的 NimI 被用深绿色表示的 NimI- 特异性 Fab17 所覆盖。

[0029] 图 3C 和 3D 是使用 Accelrys Discovery Studio v1.5.1 (Accelrys Software, Inc.) 制作的 3D 模型。图 3C-HRV14 颗粒的 NimI、NimII、NimIII 和 NimIV 的空间填充模型。通过范德华立体表面 (Van-der-Vaals solid surface) 展示 Nim 的氨基酸残基。分别用蓝色和红色表示正电荷表面和负电荷表面。图 3D-HRV14 和 CR6 病毒的空间填充模型比较 (仅显示 NimIII 和 NimIV)。基于已知的晶体结构 (见上文) 和蛋白质序列 CR6 的信息 (见图 1) 预测了 CR6 的结构。注意 :HRV14 的 NimIV 的正电荷 K287 与 NimIII 的负电残基紧密接触, 然而在 CR6 中因为 K287T 置换这种联系被废止。

[0030] 图 4 显示 CR6 与鼠抗 -HRV37、鼠抗 -HRV92 和鼠抗 -HRV6 血清中和的结果。图 4A 是 HRV14 (SEQ ID NO :10)、HRV37 (SEQ ID NO :21)、HRV6 (SEQ ID NO :18) 和 HRV92 (SEQ ID NO :20) 的 NimIV 比对。氨基酸按照 HRV14 模板 (下面) 进行编号。相同的区域用矩形 (蓝色) 表示。图 4B 是显示用由相应纯化病毒产生的抗 -HRV37、抗 -HRV92 和抗 -HRV6 小鼠抗体进行的 HRV14 (每对柱中的左柱, 棕色) 和 CR6 (每对柱中的右柱, 绿色) 的蚀斑减少中和试验 (PRNT) 研究结果的一组图表。50% 中和效价用图中的虚线或相应图表下的图中方框内数字 (50% NUT) 表示。

[0031] 图 5 显示基于 $\text{NimIV}^{\text{HRV6}}$ 和 $\text{NimIV}^{\text{HRV14}}$ 特异性合成肽的实验数据。图 5A 是用豚鼠抗 -HRV14 (GP14) 和抗 -HRV6 (GP6) 多克隆抗体检测 KLH- 连接肽 H6 ($\text{NimIV}^{\text{HRV6}}$) 和 H14 ($\text{NimIV}^{\text{HRV14}}$) 的蛋白质印迹。图 5B 是用相同抗体检测的游离 H6 和 H14 肽的蛋白质印迹, 泳道 (1)- 蛋白质分子量标记, 泳道 (2)-H6-KLH(A) 或 H6 (B), 泳道 (3)-H14-KLH(A) 或 H14 (B)。图 5C 是显示用 GP6 和 GP14 进行 H6 和 H14 的 ELISA 分析结果的图。

[0032] 图 6 是显示用鼠抗 -HRV14-NimIV^{HRV6} 血清进行的 HRV14 和 HRV6 的蚀斑减少中和试验 (PRNT) 研究结果的图。这些数据显示 $\text{NimIV}^{\text{HRV6}}$ 在 HRV14 壳体 (capsid) 本底下的免疫优势。

[0033] 图 7 是显示 HRV14 和 CR6 的蚀斑减少中和试验 (PRNT) 研究结果的图, 该图显示了被 NimIII 单克隆抗体 (Mab5) 中和的 CR6 比 HRV14 少约十倍。

[0034] 图 8 是显示 HRV14 和 CR6 的蚀斑减少中和试验 (PRNT) 研究结果的图, 该图显示了被 NimII 单克隆抗体 (Mab16) 中和的 CR6 比 HRV14 多约五倍。

[0035] 图 9 是显示 HRV14 和 CR6 的蚀斑减少中和试验 (PRNT) 研究结果的图, 该图显示了

被 NimI 单克隆抗体 (Mab17) 中和的 CR6 比 HRV14 少约 1.5 倍。

[0036] 图 10 是显示 Nim IV 影响 NimI、NimII 和 NimIII(50%中和效价)的表。

[0037] 图 11 显示 NimIII 和 NimIV 序列 (SEQ ID NOS :10、18 和 20-37) 的比对,以及这些序列在 HRV 结构蛋白中的位置。

[0038] 图 12A 是 CR6 和 CR72 嵌合体的 VP1 序列 (SEQ ID NOS :38-40) 的比对。图 12B 是表示 HRV 基因组的简图,对 HRV6(SEQ IDNO :18)、HRV72(SEQ ID NO :32) 和 HRV14(SEQ ID NO :10) 的 NimIV 进行了比对。

[0039] 图 13 是一对显示 NimIV 赋予嵌合重组体的供体血清型中和特性图。图 13A 显示用 GP72 抗体中和 CR72(空柱)和 HRV14(黑柱)的效价。图 13B 显示用 GP6 抗体中和 CR6(空柱)和 HRV14(黑柱)的效价。注意:GP6 和 GP72 是分别针对 HRV6 和 HRV72 的豚鼠多克隆抗体 (ATCC)。

[0040] 图 14 是显示 NimIV 置换对 HRV14 主链 (backbone) 其他 Nim(针对 HRV14、CR6 和 CR72 的 NimI、II、III Mab(中和作用))影响的表格。

[0041] 图 15 是显示的抗 -CR6 和抗 -CR72 鼠抗血清针对 HRV14、HRV6、HRV72、CR6 和 CR72 的 50%中和效价的表格。

[0042] 发明详述

[0043] 总的来讲,本发明涉及人鼻病毒 (HRV) 的新型免疫原性基因座,以及其在预防和治疗 HRV 感染的疫苗中的应用。本发明基于我们对新型 HRV 中和免疫原 (Nim)NimIV 发现,其可作为疫苗使用。如下文所述,此疫苗包括几种实施方案。这些实施方案包括:展示异源 NimIV 抗原的一种或多种重组 HRV、单独的合成 NimIV 肽或在病毒、蛋白或化学连接载体中的合成 NimIV 肽、以及在生物载体中的血清型不同的 NimIV 肽的生物或化学融合物的混合物。这样的 HRV 疫苗诱发对多种 HRV 血清型产生 NimIV- 特异性免疫反应,可用于预防性和治疗性治疗 HRV 感染。NimIV 抗原、包含 NimIV 的疫苗组合物以及此组合物的使用方法在下文中进一步描述。

[0044] 中和免疫原 IV (NimIV)

[0045] 鼻病毒 (HRV) 的三种主要表面中和免疫原 (Neutralizing Immunogen) (NimI、NimII 和 NimIII) 诱发高特异性中和免疫应答。Nim 特异性抗体阻断病毒吸附于细胞受体 (ICAM-1)。本发明基于新型 Nim(NimIV) 的发现,其包括在结构蛋白 VP1 C 末端的一段约 17-25 个氨基酸序列并经过分子进化实验鉴定。我们证实了 NimIV 可在不同 HRV 血清型之间交换。例如,当供体血清型 HRV(例如 HRV6 或 HRV72) 的 NimIV 被引入另一种血清型宿主病毒(例如 HRV14) 中时,其将供体血清型的中和特征赋予得到的嵌合重组体,从而显著改变宿主病毒的中和特性。将 NimIV 掺入重组 HRV 疫苗会导致定向针对 (directed against) 多种 HRV 血清型的血清交叉反应免疫应答的产生。

[0046] 利用嵌合型 NimIV 抗体的重组 HRV 疫苗

[0047] 理想 HRV 疫苗的一个特征是保护人类免受广范围 HRV 血清型的 HRV 感染风险的能力。本发明疫苗的特征在于能够诱发针对引起人类疾病的众多 HRV 血清型(例如大部分或更理想的是所有 HRV 血清型)的保护性和治疗性免疫应答。这可以通过在疫苗中使用多种 NimIV 序列来实现,包括例如将供体血清型的 NimIV 抗原添加 (addition) 到一小群宿主血清型 HRV 中。如我们在下文所述,转移的 NimIV 抗原引起血清型特异性的强烈中和抗

体反应。在嵌合型疫苗或重组疫苗中,第一血清型 NimIV 抗原与第二血清型宿主 HRV 结合 (combination) 会诱发定向针对这两种 HRV 血清型的中和抗体,因而与不是在 NimIV 基因座嵌入的疫苗相比,得到更广泛的保护性或治疗性益处。例如,用 NimIV^{HRV6} 置换 HRV14 的 NimIV^{HRV14} (即在 HRV 血清型 14 中的 NimIV 抗原) 得到 HRV 疫苗 CR6 (下文进一步讨论)。此疫苗诱导产生同时定向针对 HRV14 和 HRV6 血清型的中和抗体。在另一个实施方案中,用 NimIV^{HRV72} 置换 HRV14 的 NimIV^{HRV14} 得到 HRV 疫苗 CR72 (下文进一步讨论)。此疫苗产生同时定向针对 HRV14 和 HRV72 血清型的中和抗体。由此构建的重组 HRV 混合物 (其包含众多供体血清型 NimIV 抗原和有限宿主血清型 HRV 组合) 代表用于预防或治疗 HRV 感染的理想疫苗。

[0048] NimIV 肽

[0049] 本发明第二个实施方案是人工合成或天然来源的 NimIV 肽的应用,此 NimIV 肽与 NimIV 基因座的氨基酸序列相对应。本文其他地方提供了此肽的实例 (见例如发明概述和实验性实施例)。给予由许多 HRV 血清型合并的肽混合物,诱发对预防或治疗 HRV 感染的广泛保护性中和抗体应答。NimIV 肽混合物可以单独给药或与可药用佐药或免疫系统刺激剂联合给药 (见下文)。

[0050] NimIV 融合分子

[0051] 本发明另一方面是 NimIV 抗原与生物载体的化学或生物融合用作 HRV 疫苗。在上下文中,来源于一种或多种血清型的 NimIV 肽与合适的生物载体 (例如乙型肝炎核心抗原) 结合 (bond),以延长 NimIV 肽降解半衰期,提高其组织渗透率 (penetrance) 和特异性、可探测性或免疫原性。此 NimIV 融合分子的混合物 (取自 (drawn from) 许多 HRV 血清型) 可用于接种人以预防或治疗 HRV 感染。在其他实施方案中, NimIV 肽 (其可来源于许多不同血清型) 与 HRV 载体交联。

[0052] 给药和剂量

[0053] 本发明还提供组合物,该组合物包含本文描述的预防上或治疗上有效量的一种或多种人鼻病毒疫苗。HRV 疫苗的混合物可在相同的药物组合物 (单一剂型) 或分开的药物组合物 (分开剂型) 中存在,其可伴随 (concomitantly) 给药或分不同次数给药。该组合物可经配制用于多种递药系统。组合物还可以包含一种或多种生理上可接受的赋形剂或载体用作合适的制剂。病毒可以冻干形式或溶解在生理上可容的溶液或缓冲液 (例如盐水或水) 中。制备和配制的标准方法可以应用在例如 Remington's Pharmaceutical Sciences (第 18 版), A. Gennaro (主编), 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA 中所描述的方法。

[0054] 该组合物预期用于鼻内给药、胃肠外给药、表面 (topical) 给药、口服给药或局部给药用以预防性和 / 或治疗性治疗。一般而言,该组合物是鼻内给药 (例如通过喷雾法或滴鼻剂)、胃肠外给药 (例如通过肌肉、皮下或静脉注射)、或口服法、或通过表面施用或关节内注射。另外的给药途径包括血管内给药、动脉内给药、瘤内给药、腹腔内给药、心室内给药、硬脑膜内给药,以及眼部给药、巩膜内给药、眼眶内给药、直肠给药或表面给药。本发明还特别地包括缓释给药,通过如长效注射 (depot injection) 或可蚀性植入物 (erodible implant) 或可蚀性成分的方法。因此,本发明提供用于粘膜给药或胃肠外给药的组合物,其包含溶解或悬浮在可接受载体、优选含水的载体 (例如水、缓冲水、盐水、PBS 等等) 中的上述作用剂。该组合物可含有根据接近生理条件所需的可药用辅助物质,如 pH 调

剂剂和缓冲剂、张度调节剂、湿润剂和去污剂等等。本发明还提供用于经口递送的组合物，其可含有惰性成分，例如用于配制片剂和胶囊等等的粘合剂或充填剂。另外，本发明提供局部给药的组合物，其可含有惰性成分，例如用于配制霜剂和软膏剂等等的溶剂或乳化剂。

[0055] 这些组合物可通过常规灭菌技术灭菌或过滤除菌。所得到的水溶液可包装待使用或进行冻干，冻干制剂与无菌水载体结合后再给药。制剂的 pH 通常在 3-11 之间，例如 5-9、6-8 或 7-8，如 7-7.5。得到的固体组合物以多个单剂量单元包装，每单元含有固定量的上述药剂 (agent 或 agents)，例如以密封包装的片剂或胶囊的形式。该组合物还可以包括冻干形式的有效成分，其在给药时重新溶解 (reconstitute)。

[0056] 包含有效量疫苗的该组合物可经给药用以预防性和 / 或治疗性治疗。在预防性应用中，组合物可以以对 HRV 感染敏感性增加的量给予对象 (例如人类对象)。本发明的组合物以足够量给予对象 (例如人) 以延缓、减少或防止临床或亚临床疾病的发病。在治疗性应用中，组合物以足够量给予受 HRV 感染的患者 (例如人)，以治愈或至少部分阻止此病症的症状及其并发症。足以达到此目的的量被定义为“治疗有效量”。适宜的剂量和服法可容易由本领域技术人员确定。此应用的有效量可取决于疾病的严重性或患者的病况、体重和一般状况，而通常每名患者每剂量在约 0.5mg- 约 3000mg 药剂的范围。疫苗只能一次性给药或按初次 / 加强服法给药。用于初次给药和加强给药的适宜服法是指在初次给药后，随后以一个或多个小时、一天或多天、一周或多周或者一个或多个月的间隔给予重复剂量。存在于本发明组合物中的有效总量的药剂可以作为单剂量给予哺乳动物 (以弹丸注射 (bolus) 或在相对短的时间内注入)，或者可以使用分段治疗 (fractionated treatment) 方案给药，即在更长时期内分多剂给药 (例如每 4-6、8-12、14-16 或 18-24 小时一剂，或每 2-4 天、1-2 周、每月一剂)。

[0057] 存在于本发明组合物中并在应用于哺乳动物 (例如人) 的本发明方法中使用的治疗有效量的一种或多种药剂，可以通过本领域技术人员考虑了哺乳动物的年龄、体重、免疫系统完整性和病况的个体差异后确定。本发明的药剂以有效量给予对象 (例如哺乳动物，如人类、小鼠、家畜 (例如牛、羊或猪)、家庭宠物 (例如猫或狗)，此有效量为在治疗患者时达到所期望的结果的量 (例如预防易感个体的 HRV 感染或减轻感染个体的症状)。此治疗有效量可以由本领域技术人员通过经验来确定。

[0058] 本发明疫苗可以与其他接种方法和其他治疗方法 (例如基于小分子的方法) 联用。例如，病毒可以联合包括相同或不同抗原的其他重组疫苗给药。本发明的联合方法包括本发明疫苗与其他抗原形式共给药。或者，本发明的疫苗可与其他方法 (如亚单位法 或 HBc 法 (HBc-M2e ;Fiers 等, Virus Res. 103 :173-176, 2004 ;WO 2005/055957 ;US 2003/0138769A1 ;US 2004/0146524A1 ;US 2007/0036826A1)) 以初次 - 加强策略联用，本发明的疫苗或另一种方法用作初次，然后另一种方法用作加强，或相反。另外，本发明包括将本发明疫苗同时用作初次剂和加强剂的初次 - 加强策略。

[0059] 本发明的疫苗可以使用标准方法给予对象，例如哺乳动物 (例如人类对象)。对于鼻内给药，载体可以以滴鼻剂形式给药或通过吸入雾化或喷雾制剂给药。

[0060] 本发明的载体可以作为活疫苗或灭活疫苗给予对象 (例如人类)。活疫苗可以使用本领域技术人员所熟悉的方法鼻内给药 (见例如 Grünberg 等, Am. J. Respir. Crit. Car. Med. 156 :609-616, 1997)。适宜的剂量和服法可容易通过本领域技术人员确定。作为实例，

剂量范围可以为每剂 10^3 - 10^8 pfu。该疫苗以单剂量给药会有利,然而如果本领域技术人员认为有需要,还可给予加强剂量。至于灭活疫苗,可以用例如福尔马林或 UV 处理杀死病毒,以每剂约 10^8 pfu 任选与合适佐剂(例如几丁质或突变 LT,见上文)进行鼻内给药。在此方法中,不止一剂(例如 2-3 剂)给药会是有利的。

[0061] 包含在本发明疫苗的肽或蛋白质的大小可以在例如 3-3000 个氨基酸(例如 5-500、10-100、20-55、25-45 或 35-40 个氨基酸)的长度范围内,其可以由本领域技术人员适当地确定。因此,本发明可以应用长度在 7-25、12-22 和 15-20 个氨基酸范围内的肽。另外,本文所述的肽可以包括附加序列或可以减少长度,还可以由本领域技术人员适当地确定。本文列出的肽可以在本文所示的本发明的载体中存在,或可以通过例如置换或缺失一个或多个氨基酸(例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个氨基酸)来进行修饰。另外,该肽可以位于较大的肽内而存在于疫苗中。任选地,诸如上文和本文其他地方描述的肽在氨基端和 / 或羧基端包括附加序列,而不管这些序列与肽序列天然连接(例如,在流感病毒基因组中该序列与所述肽邻接)或否(例如合成连接序列)。因此,所述肽可以包括例如在一端或两端的 1-25、2-20、3-15、4-10 或 4-8 个氨基酸序列。作为具体实例,所述肽可在氨基端和 / 或羧基端包括 1-3 个连接序列。

[0062] 佐剂

[0063] 在疫苗应用中,可以任选使用本领域技术人员所熟知的佐剂。佐剂是根据给药途径来选择的。对于鼻内给药,可以使用几丁质微粒(CMP)(Asahi-Ozaki 等, *Microbes and Infection* 8:2706-2714, 2006; Ozdemir 等, *Clinical and Experimental Allergy* 36:960-968, 2006; Strong 等, *Clinical and Experimental Allergy* 32:1794-1800, 2002)。适用于粘膜途径给药(例如鼻内或口服途径)的其他佐剂包括大肠杆菌(*E. coli*)的不耐热毒素(LT)或其突变衍生物。对于灭活病毒,可以使用胃肠外佐剂,包括例如铝化合物(例如氢氧化铝、磷酸铝或羟基磷酸铝化合物)、脂质体制剂、合成佐剂例如(如 QS21)、胞壁酰二肽、单磷酸脂质 A 或聚磷嗪(polyphosphazine)。另外,可以将编码具有佐剂活性的细胞因子的基因插入载体。因此,可以将编码细胞因子例如 GM-CSF、IL-2、IL-12、IL-13 或 IL-5 的基因与外源性抗原基因共同插入,以产生起以下作用的疫苗:增强免疫应答,或调整对细胞、体液或粘膜应答特异性更强的免疫性。或者,可以通过熟悉的方法(例如直接接种、裸 DNA、在病毒的载体中等等)使细胞因子与重组疫苗病毒同时、序贯、分开递送。

[0064] 实验性实施例

[0065] NimIV 的鉴定

[0066] 我们发现了中和免疫原 NimIV,其包含长度为 17-25 个氨基酸的非保守病毒结构蛋白 1(VP1)C 末端序列。此表位可以在 HRV 血清型之间交换。如果 NimIV 被置换,它会将其中和特性赋予异源 HRV。研究表明,NimIV 的相应合成肽在 ELISA 和蛋白质印迹实验中能被病毒特异性抗体识别。

[0067] 在下述进行的分子进化实验(VP1 基因改组(gene shuffling))中,分离得到两个活性嵌合体 HRV14-NimIV^{HRV6}(CR6)和 HRV14-NimIV^{HRV72}(CR72)。如图 12A 给出的比对所示,CR6 和 CR72 的 VP1 序列包含几个个别的氨基酸取代,并且在 CR6 和 CR72 中 NimIV^{HRV6} 和 NimIV^{HRV72} 分别置换了 NimIV^{HRV14}。NimIV 的比对(图 12B)显示:所有 NimIV 病毒都含有保守中心域(PVIKKRK/E;SEQ IDNOS:2 和 3),而侧翼区是变化的。有趣的是,在所有 HRV 血

清型 (RM2506) 中,第 279-282 位的氨基酸都显示出十分保守或相似。CR6 和 CR72 的嵌合体显示出与多克隆豚鼠抗体 GP6 和 GP72(ATCC) 的强中和性,而这些抗体不中和主链病毒 (backbone virus) (HRV14;图 13)。结果显示,与 GP6 或 GP72 相比针对 HRV6 和 HRV72 得到的小鼠多克隆抗体中和 CR6 和 CR72 的效价低 10 倍,其证实 CR6 和 CR72 的 NimIV 决定子是表面外露的,并以有利的构象用以与中和抗体结合。嵌合体中这些表位的构象很可能与野生型病毒的一致。

[0068] 作为分离 NimIV 置换方法的 DNA 改组

[0069] 在产生 HRV 嵌合体 CR6 之后发现 NimIV 是可能的,该嵌合体具有 (carry) 以下置换:VP1C 末端部分的 18 个氨基酸被 HRV6 相应的 17 个氨基酸区域置换 (见图 1)。此序列通过 DNA 改组,随后将此片段重新克隆到 HRV14 感染性克隆中来得到 (DNA 改组方法综述参见 Patten 等人, DNA 改组在药物和疫苗中的应用 (“Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines”), *Curr Opin Biotechnol* 8:724-733(1997); 使用的实例包括:Zhang 等,由 DNA 改组和通过噬菌体展示文库得到的病肝病毒高变区 1 的广泛交叉反应模拟位 (“Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display library”), *J Med Virol* 71:511-517(2003); Castle 等,草甘膦耐受基因的发现及定向进化 (“Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene”), *Science* 304:1151-1154(2004); Pekrun 等,通过 DNA 改组在猪尾恒河猴细胞中复制增强的 1 型人免疫缺陷病毒的进化 (“Evolution of a human immunodeficiency virus type 1 variant with enhanced replication in pig-tailed macaque cells by DNA shuffling”), *J Virol* 76:2924-2935(2002); Toth 等,通过 DNA 改组提高植物病毒载体移动及宿主范围得特性 (“Improvement of the movement and host range properties of a plant virus vector through DNA shuffling”), *Plant J* 30:593-600(2002); Kaper 等,超热稳定的 β 糖苷酶的 DNA 家族改组 (“DNA family shuffling of hyperthermostable beta-glycosidases”), *Biochem J* 368:461-470(2002).; Wang 等,底物最佳化 GroEL/S 陪伴蛋白的定向进化 (“Directed evolution of substrate-optimized GroEL/S chaperonins”), *Cell* 111:1027-1039(2002); 和 Hurt 等,通过定向结构域改组和基于细胞选择获得的高特异性锌指蛋白 (“Highly specific zinc finger proteins obtained by directed domain shuffling and cell-based selection”), *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 100:12271-12276(2003)。DNA 改组实验包含了约 100 个 VP1 序列 (Ledford 等,所有人鼻病毒血清型的 VP1 测序:了解种系发育和对抗病毒壳体结合化合物的敏感性 (“VP1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds”), *J Virol* 78:3663-3674(2004))。

[0070] CR6 同时被 GP6 和 GP14 中和

[0071] CR6 嵌合体的中和特异性显示出与亲代 (parental)HRV14 载体 (pWR3.26 感染性克隆) 不同。除了检测到 CR6 与 HRV14- 特异性多克隆豚鼠抗体的中和作用之外 (GP14;图 2A),我们还发现其与豚鼠 HRV6- 特异性抗体的中和作用 (GP6;图 2B),然而亲代 HRV14 不被 GP6 中和 (图 2)。这表明 HRV6 的 C 末端结构域具有免疫原性和中和性。

[0072] CR6 被 NimI 和 NimII 特异性单克隆抗体强烈中和,但不能被 NimIII 特异性单克隆抗体强烈中和

[0073] 在 HRV14 本底中存在的 NimIV^{HRV6} (CR6) 改变了其他 Nim(HRV14) 的中和作用 (NA)。用 Nim^{HRV14} 特异性单克隆抗体 (mAb) 进行的 PRNT 显示:CR6NimIII 特异性中和作用降低(约 10 倍;图 7),而 NimII 特异性 NA 提高(5 倍;图 8);NimI 特异性中和作用仅受轻微影响(1.5 倍;图 9 和 16)。图 10 概述了这些发现。

[0074] NimIV^{HRV6} 和 NimIV^{HRV72} 对主链 Nim 的中和效能的影响

[0075] 为了研究 NimIV 置换对主链 Nim 中和特性的影响,针对 CR6 和 CR72 使用一组 HRV14 Nim 特异性小鼠单克隆抗体(图 14)。两种嵌合体的 NimI 中和能力受轻微影响,但 CR6 对 NimII 和 NimIII 分别表现出中和率(neutralization rate)提高 5 倍和降低 10 倍。相反,CR72 的 NimIII 依赖性中和作用则不受影响。遗憾的是,因为受到抗体供应的限制,没有研究 NimII-特异性抗体对 CR72 的中和作用。这些数据证明了 NimIV 和 NimIII 结构域间存在强相互作用,这与结晶学和以往得到的诱变数据一致。

[0076] CR6 和 HRV14 中 NimIV 与其他 Nim 相互作用的建模

[0077] 这些结果显示 NimIV^{HRV6} 对于 CR6 构象完整性的重要性。3D 建模是在已知晶体结构的基础上完成的,所述晶体结构显示在 HRV14 中(但在 CR6 颗粒中)NimIII 与 NimIV 紧密接触(图 3B、D)(Che 等,通过病毒-Fab 复合体的冷冻电子显微镜术和 X 衍射晶体学研究人鼻病毒 14 的抗体介导中和作用(“Antibody-mediated neutralization of human rhinovirus 14 explored by means of cryoelectron microscopy and X-ray crystallography of virus-Fab complexes”),J Virol 72:4610-4622(1998))。在 HRV14 中,这种接触与 VP1 的正电荷 K287 有关,通过 K287 NimIV 与 NimIII 的负电荷残基相互作用(图 3B、D)。在 CR6 中,T287 突变废止了这种联系(图 3D)。有趣的是,K287 突变对 NimIII 特异性中和作用的负面作用先前已有文献记载(Sherry 等,利用单克隆抗体鉴定普通感冒小 RNA 病毒:人鼻病毒的四中中和免疫原(“Use of monoclonal antibodies to identify four neutralization immunogens on a common cold picornavirus, human rhinovirus”),J Virol 57:246-257(1986)),但作者认为 VP1 的 C 末端区域不是中和免疫原(Nim),因为没有逃逸突变体与对此区域特异的单克隆抗体起中和作用。CR6 的 NimIV^{HRV6} 仅轻微影响 NimI 特异性中和作用,这可以部分通过此表位与 NimIV 的距离较远来解释(图 3C)。

[0078] CR6 的唯一特征是其对 NimII 特异性中和作用的敏感性提高 5 倍(图 14)。这种提高不能通过 NimIV^{HRV6} 与 NimII^{HRV14} 的直接物理接触解释。3D 建模显示在病毒颗粒中这两个 Nim 的位置相距较远(图 3A-C)。此现象最可能通过 VP2 构象变化来解释,VP2 构象的变化可能更利于单克隆抗体结合接触病毒颗粒表面的 NimII。

[0079] CR6 的交互中和作用概况

[0080] NimIV^{HRV6} 与所有 100 种血清型的 NimIV 的比对确定出其两种最接近的匹配:HRV37 与 HRV92 的 C 末端(见图 4A)。分析显示 NimIV 存在三个区域:由 6 个氨基酸(AA)(P-V-I-K-K-R;SEQ IDNO:1)组成的保守(核心)区,以及核心区上游和下游的两个区。7 种紧密相关的病毒(HRV14、HRV72、HRV83、HRV86、HRV35、HRV79 和 HRV3;见图 11)的 NimIV 中也检测到核心。这里值得关注的是,在所有 100 种 HRV 血清型中,发现 R282 是保守的。如图 4A 所示,NimIV^{HRV6} 和 NimIV^{HRV37} 的 6 个 AA 下游区域几乎相同(D/E-N-I-T-T-Y;SEQ ID

NO :42), 而 HRV92 的对应序列 (S-L-I-T-N-Y ;SEQ ID NO :43) 与它们差异较大。NimIV^{HRV6} 与 NimIV^{HRV92} 的上游域具有两个相同的氨基酸, 而 NimIV^{HRV37} 的相应区域与 NimIV^{HRV6} 则没有明显的相似性。NimIV 之间的这种差异提供了机会评估表位的哪些部分对 CR6 病毒中和作用具有重要性。为了研究这一方面, 我们制备了针对这三种血清型的鼠恢复期血清, 并测试它们对 CR6 病毒的中和作用 (图 4B)。虽然 NimIV^{HRV6} 和 NimIV^{HRV37} 抗 HRV37 的下游区具有广泛同源性, 但血清不显示中和作用, 证明下游区对于中和作用无重要性。相反, 与抗 -HRV 6 相比抗 -HRV92 血清的 NA 仅稍微降低。这三个血清样品都不能中和 HRV14。这些结果表明了 NimIV 的功能性分析, 并提供证据证明了上游区的交叉中和活性比核心区和下游区高。为了回答这些病毒被小鼠抗体识别的差异性是否反映了它们与 NimIV 特异性序列的实际相互作用的问题, 我们合成了 NimIV^{HRV14} 和 NimIV^{HRV6}- 特异性肽, 并用同一套抗体进行了蛋白质印迹和 ELISA 实验。

[0081] NimIV 特异性肽与 GP14 和 GP6 的免疫反应性在血清型特异性肽之间的差异

[0082] 在蛋白质印迹 (图 5A-B) 和 ELISA (图 5C) 实验中, GP6 和 GP14 特异性识别同源性 NimIV 特异性肽。图 5A 和 5B 分别表示用 KLH- 连接材料和游离肽得到的蛋白质印迹结果。因为 KLH 的分子量很大 (约 3×10^5 kDa), 所以图 5A 的蛋白质条带呈成片条带。给定肽的免疫反应性特异性很高, 因用肽 / 抗体异源组合 (GP6/NimIV^{HRV14} 或 GP14/NimIV^{HRV6}) 没有检测到任何信号。KLH- 连接材料中的异源组合有微弱信号归因于 KLH 特征。这些结果是 HRV6 和 HRV14 表面的 NimIV 表位为线性和具有高特异性的证据, HRV6 和 HRV14 的纯化样品分别用于生产 GP6 和 GP14。这些肽之间没有显著交叉反应性, 证明了这些 Nim 的核心部分免疫原性低。若此表述不正确, 则在本实验中应该观察到高交叉免疫反应性。

[0083] 这些肽与 GP6 和 GP14 的高识别特异性还通过 ELISA 得以证实 (图 5C)。H14 与 GP14 的反应性比 H6 与 GP6 的反应性低表明病毒颗粒表面的 NimIV 表位呈递差异。这些结果与图 2 所描述的 PRNT 数据相反。这两个实验中均无鉴定到 HRV14 和 HRV6 之间或它们的 NimIV 特异性肽之间有显著交叉反应性。

[0084] 体内试验 : 抗 -CR6 血清中和 HRV6

[0085] 用 $100 \mu\text{l}$ 与佐剂 (氢氧化铝) 混合的病毒悬浮液 (10^5 pfu/ml) 或模拟品 (稀释剂) 腹膜内免疫接种 11-12 周龄雌性 B1b/c 小鼠 3 次 (在第 1、14 和 28 天)。最后小鼠在第 49 天采血。为了测试血清抗体水平, 在接种之前 (基线), 以及在异氟醚吸入麻醉下经眼后途经或不经麻醉经下颌骨途经免疫接种后第 30-40 天对小鼠采血 (体积不超过 $7.7 \mu\text{l/g}$ 体重)。PPNT 实验证实了 HRV6 与 2 只小鼠的血清库的特异性中和作用 (图 6)。这也显示了 HRV14 病毒中和作用降低, 这提供了证据表明 NimIV^{HRV6} 在 CR6 中是优势免疫表位。

[0086] 方法

[0087] 肽和缀合物

[0088] 通过 Biosynthesis, Inc (Lewisville, TX) 用标准固相合成法制备寡肽 NimIV^{HRV6}、NimIV^{HRV72} 和 NimIV^{HRV14}, 这些寡肽分别与 HRV6 (CKNIVPVIKKRENTITY ;SEQ ID NO :15)、HRV14 (CNTEPVIKKRKGDIKSY ;SEQ ID NO :16) 和 HRV72 (CNPKPVIKKREGDIKTY ;SEQ ID NO :17) 结构区的 C- 末端对应。通过使用交联剂 4-(对马来酰亚胺基苯基)-丁酸琥珀酰亚胺酯 (sMBS) 和还原剂 TCEP · HCl 盐酸三 (2-羧基乙基) 膦 (TCEP HCL), 使肽材料的部分与 *Concholepas concholepas* 的血蓝蛋白 (KLH) 缀合。

[0089] 细胞培养、病毒繁殖和试剂

[0090] 通过连续感染靶 H1 海拉细胞 (HeLa cell), 将 HRV 血清型 6、14、35、37、72、83、86、92 原种 (ATCC) 扩增至高滴度。将海拉细胞 (ATCC) 维持在含有 5% 胎牛血清 (JRH Biosciences, KS) 的最低基础培养基 (Minimum Essential Medium) (Invitrogen) 中以进行常规繁殖。在传代过程中, 使细胞维持在分会合生长状态。于 34°C 下 48 小时后, 经过 3 次在 -80 和 37°C 下的冻融循环, 使病毒从细胞中释放。弃去细胞碎片, 同时将含有扩增病毒的上清液分成等份并在 -80°C 冷冻。从 ATCC 获得用于 HRV 血清型 6、14、72、92 和 37 的豚鼠抗血清。

[0091] VP1 基因改组病毒文库

[0092] 通过 RT-PCR 从 HRV 血清型 6、14、35、37、72、79、83、86 和 92 的 RNA 扩增 VP1 的 DNA 片段。为了作进一步克隆, 通过重组 PCR 去除 HRV 血清型 83、86、92 的 VP1 基因中存在的固有 AvrII 位点。将所有 PCR 片段合并在一起并进行改组, 随后克隆到改良的 HRV14 cDNA 载体 pWR3.26 (ATCC)。简而言之, 用 DNase I (Amersham Pharmacia Biotech, Inc) 处理 2 微克合并的 PCR 片段, 胶纯化出 50-100bp DNA 片段部分, 然后不需引物进行 15-25 个循环的 PCR (94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 1min), 接着用克隆引物进行 25 个循环的 PCR (94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 1min)。将扩增改组 VP1 序列文库克隆到改良的 pWR3.26 质粒的 XhoI 和 AvrII 位点。为此目的, 通过插入在 VP1 序列 5' 位的 XhoI 位点来改良 HRV14 cDNA 克隆 pWR3.26 (图 12)。将 XhoI 和 AvrII 位点分别掺入到 VP1 正向和反向克隆引物。

[0093] VP1 改组质粒 DNA 文库通过 MluI 消化进行线性化和并通过 T7 转录试剂盒 (Epicentre, Inc) 进行体外转录。RNA 用 lipofectine (Invitrogen, Inc) 转染到 H1-海拉细胞 (ATCC) 中。于 34°C 培养 2-4 天后收集细胞。细胞样品经过三个冻融循环, 上清液用于感染单层 H1-海拉细胞。病毒文库保藏在 -80°C。

[0094] HRV14-NimIV 重组病毒的分离

[0095] 从上述病毒文库蚀斑纯化 HRV14-NimIV^{HRV6} (CR6) 嵌合体。为了分离其他 HRV14-NimIV^{HRVX} 重组体, 用病毒文库的总 RNA 作模板, 通过 8 条退火至 VP1 基因 3'-末端的血清型-特异性反向引物进行 8 个不同的 RT-PCR 反应。所有这些反应都使用相同的正向引物, 该引物与 VP1 基因的上游保守区互补。将得到的 PCR 片段重新克隆到上述用于 VP1 改组体 (shuffliant) 的 pWR3.26 质粒中。转录并转染到 H1-海拉细胞后, 将各别的病毒进行蚀斑纯化并测序。

[0096] 动物实验方案

[0097] 取 8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠 (10 只/组), 通过腹膜内给予 500 μ L 与 100 μ g 佐剂 (氢氧化铝) 混合的过滤细胞培养基, 在第 0 天对小鼠进行初次接种, 然后在第 14 和 28 天进行加强接种, 该细胞培养基每剂含有约 1.0×10^6 pfu 的 (1)HRV14-NimIV^{HRV6}、(2)HRV14-NimIV^{HRV72}、(3) 亲本 HRV14 或模拟物 (培养上清液) 作为阴性对照。

[0098] 使用与 (或不与) KLH 肽偶联的 NimIV^{HRV6} 和 NimIV^{HRV6} 免疫接种 8 周龄雌性 Balb/c 小鼠。小鼠在第 0 天用 100 μ l 含 15 μ g KLH-连接肽的 Titermax Gold (1:1 乳化剂) 经皮下途径进行初次接种, (在第 36 天和第 49 天) 通过腹膜内给予 15 μ g 溶解在 100 μ l PBS 的“游离”肽来进行两次加强接种。

[0099] 通过在包被了相应合成 NimIV 肽的微量滴定板中进行的确立 ELISA, 测定血清中

NimIV 特异性抗体效价。

[0100] 蚀斑减少中和试验 (PRNT)

[0101] 将约 50pfu 研究的 HRV (在完全 MEM+5% FBS 培养基中) 与样品血清的各级稀释液混合, 总体积为 300 μ L, 于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。在 12 孔组织培养板中, 用 100 微升每种混合物感染 1 孔 H1-海拉细胞 (每孔接种 6×10^5 H1-海拉细胞, 于 37 $^{\circ}$ C 下培养箱中孵育过夜)。于 34 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时后, 用 1mL MEM 中的 0.4% 琼脂糖和含有青霉素 / 链霉素的 10% FBS 覆盖细胞, 并于 34 $^{\circ}$ C 下孵育约 3 天。然后用甲醛 (终浓度为 3.7%) 固定单细胞层, 并用含 1% 结晶紫的 70% 甲醇染色。

[0102] ELISA

[0103] 用 5 μ g/ml NimIV 特异性肽或纯化的 HRV14 病毒包被 96 孔板, 于 4 $^{\circ}$ C 下过夜。于 37 $^{\circ}$ C 下用不同稀释度的抗血清孵育微孔板 1 小时, 然后用 1 : 1000 羊抗鼠 IgG-AP (Southern Biotech, Inc) 于 37 $^{\circ}$ C 下缀合 1 小时。如厂家 (Sigma, Inc) 所述, 微孔板在碱性磷酸酶底物中显影。

[0104] 蛋白质印迹

[0105] 将 20 μ g 肽在 10% tris-甘氨酸 SDS 胶 (Novex, Invitrogen, Inc) 上点样, 电泳运行一小段时间后, 将肽转移到硝基纤维素膜 (Bio-Rad, Inc) 上。在室温下用封闭液 (含 5% 脱脂乳的 PBS/0.05% 吐温) 将膜浸泡 1 小时, 实现膜的非特异性结合。将膜用含豚鼠抗 -HRV6 或抗 -HRV14 多克隆抗体 (ATCC) (1 : 1000) 的封闭液于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。将膜用 PBS/0.05% 吐温洗涤 3 次, 每次 15 分钟, 然后用含羊抗鼠 IgG-AP 缀合抗体 (Southern Biotech) 的封闭液在室温下孵育 1 小时。膜在 AP 底物 (Sigma SIGMA FASTTM BCIP/NBT) 中显影 10 分钟。

[0106] 其他实施方案

[0107] 所有出版物、专利申请和本说明书提及的专利通过引用结合于本文中。

[0108] 在不背离本发明的范围和精神下, 本发明描述的方法和系统的多种修改和变更对本领域技术人员都是显而易见的。虽然已结合具体所需的实施方案描述了本发明, 但应该理解的是, 所要求保护的本发明不应过分限于这些具体实施方案。用于实施本发明所描述的各种修改, 无疑对医学、药物学或相关领域的技术人员是显而易见的, 并意欲落入本发明的范围内。本文使用的单数形式, 例如“一个 (种)”和“所述”, 不排除相应的复数形式, 除非上下文表明具有相反意思。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 赛诺菲巴斯德生物制剂公司
- [0003] <120> 新型鼻病毒中和免疫原 (NIMIV) 及其在疫苗中的应用
- [0004] <130>06132/113W02
- [0005] <140>PCT/US07/21053
- [0006] <141>2007-10-01
- [0007] <150>US 60/848, 451
- [0008] <151>2006-09-29
- [0009] <160>43
- [0010] <170>PatentIn version 3.3
- [0011] <210>1
- [0012] <211>6
- [0013] <212>PRT
- [0014] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
- [0015] <400>1
- [0016] Pro Val Ile Lys Lys Arg
- [0017] 1 5
- [0018] <210>2
- [0019] <211>7
- [0020] <212>PRT
- [0021] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
- [0022] <400>2
- [0023] Pro Val Ile Lys Lys Arg Lys
- [0024] 1 5
- [0025] <210>3
- [0026] <211>7
- [0027] <212>PRT
- [0028] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
- [0029] <400>3
- [0030] Pro Val Ile Lys Lys Arg Glu
- [0031] 1 5
- [0032] <210>4
- [0033] <211>7
- [0034] <212>PRT
- [0035] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
- [0036] <400>4
- [0037] Pro Val Ile Lys Lys Arg Ser
- [0038] 1 5

[0039] <210>5
[0040] <211>7
[0041] <212>PRT
[0042] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）
[0043] <400>5
[0044] Pro Val Ile Glu Lys Arg Thr
[0045] 1 5
[0046] <210>6
[0047] <211>7
[0048] <212>PRT
[0049] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）
[0050] <400>6
[0051] Pro Lys Ile Ile Lys Lys Arg
[0052] 1 5
[0053] <210>7
[0054] <211>7
[0055] <212>PRT
[0056] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）
[0057] <400>7
[0058] Pro Val Ile Lys Arg Arg Glu
[0059] 1 5
[0060] <210>8
[0061] <211>7
[0062] <212>PRT
[0063] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）
[0064] <400>8
[0065] Pro Ile Ile Ala Lys Arg Glu
[0066] 1 5
[0067] <210>9
[0068] <211>7
[0069] <212>PRT
[0070] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）
[0071] <400>9
[0072] Thr Ile Ile Lys Lys Arg Thr
[0073] 1 5
[0074] <210>10
[0075] <211>16
[0076] <212>PRT
[0077] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）

[0078] <400>10
 [0079] Asn Thr Glu Pro Val Ile Lys Lys Arg Lys Gly Asp Ile Lys Ser Tyr
 [0080] 1 5 10 15
 [0081] <210>11
 [0082] <211>7
 [0083] <212>PRT
 [0084] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
 [0085] <400>11
 [0086] Thr Ile Val Lys Lys Arg Thr
 [0087] 1 5
 [0088] <210>12
 [0089] <211>7
 [0090] <212>PRT
 [0091] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
 [0092] <400>12
 [0093] Thr Ala Ile Val Thr Arg Pro
 [0094] 1 5
 [0095] <210>13
 [0096] <211>7
 [0097] <212>PRT
 [0098] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
 [0099] <400>13
 [0100] Val Ala Ile Arg Pro Arg Thr
 [0101] 1 5
 [0102] <210>14
 [0103] <211>7
 [0104] <212>PRT
 [0105] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
 [0106] <400>14
 [0107] Thr Ala Ile Val Arg Arg Asn
 [0108] 1 5
 [0109] <210>15
 [0110] <211>17
 [0111] <212>PRT
 [0112] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
 [0113] <400>15
 [0114] Cys Lys Asn Ile Val Pro Val Ile Lys Lys Arg Glu Asn Ile Thr Thr
 [0115] 1 5 10 15
 [0116] Tyr

[0117] <210>16
 [0118] <211>17
 [0119] <212>PRT
 [0120] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
 [0121] <400>16
 [0122] Cys Asn Thr Glu Pro Val Ile Lys Lys Arg Lys Gly Asp Ile Lys Ser
 [0123] 1 5 10 15
 [0124] Tyr
 [0125] <210>17
 [0126] <211>17
 [0127] <212>PRT
 [0128] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
 [0129] <400>17
 [0130] Cys Asn Pro Lys Pro Val Ile Lys Lys Arg Glu Gly Asp Ile Lys Thr
 [0131] 1 5 10 15
 [0132] Tyr
 [0133] <210>18
 [0134] <211>17
 [0135] <212>PRT
 [0136] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
 [0137] <400>18
 [0138] Lys Asn Lys Ile Val Pro Val Ile Lys Lys Arg Glu Asn Ile Thr Thr
 [0139] 1 5 10 15
 [0140] Tyr
 [0141] <210>19
 [0142] <400>19
 [0143] 000
 [0144] <210>20
 [0145] <211>16
 [0146] <212>PRT
 [0147] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
 [0148] <400>20
 [0149] Gln Ala Ile Val Pro Val Ile Lys Lys Arg Ser Leu Ile Thr Asn Tyr
 [0150] 1 5 10 15
 [0151] <210>21
 [0152] <211>15
 [0153] <212>PRT
 [0154] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
 [0155] <400>21

[0156] Met Ile Thr Pro Val Ile Lys Lys Arg Asp Asn Ile Thr Thr Tyr
[0157] 1 5 10 15
[0158] <210>22
[0159] <211>7
[0160] <212>PRT
[0161] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）
[0162] <400>22
[0163] Thr Gln Gly Leu Lys Asn Ala
[0164] 1 5
[0165] <210>23
[0166] <211>7
[0167] <212>PRT
[0168] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）
[0169] <400>23
[0170] Thr Ala Asn Arg Gln Asn Asp
[0171] 1 5
[0172] <210>24
[0173] <211>7
[0174] <212>PRT
[0175] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）
[0176] <400>24
[0177] Thr Ala Asn Lys Gln Asn Gly
[0178] 1 5
[0179] <210>25
[0180] <211>7
[0181] <212>PRT
[0182] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）
[0183] <400>25
[0184] Gln Pro Asn Arg Gln Gly Glu
[0185] 1 5
[0186] <210>26
[0187] <211>7
[0188] <212>PRT
[0189] <213> 鼻病毒（人鼻病毒）
[0190] <400>26
[0191] Ile Gln Gly Gln Lys Asn Glu
[0192] 1 5
[0193] <210>27
[0194] <211>7

- [0195] <212>PRT
[0196] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
[0197] <400>27
[0198] Asn Val Asn Lys Gln Asn Glu
[0199] 1 5
[0200] <210>28
[0201] <211>7
[0202] <212>PRT
[0203] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
[0204] <400>28
[0205] Val Ala Asn Gln Gln Asn Glu
[0206] 1 5
[0207] <210>29
[0208] <211>7
[0209] <212>PRT
[0210] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
[0211] <400>29
[0212] Thr Ala Asn Gln Gln Asn Thr
[0213] 1 5
[0214] <210>30
[0215] <211>7
[0216] <212>PRT
[0217] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
[0218] <400>30
[0219] His Ala Asp Arg Gln Asn Glu
[0220] 1 5
[0221] <210>31
[0222] <211>7
[0223] <212>PRT
[0224] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
[0225] <400>31
[0226] Asn Ala Asn Arg Gln Asn Glu
[0227] 1 5
[0228] <210>32
[0229] <211>16
[0230] <212>PRT
[0231] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
[0232] <400>32
[0233] Asn Pro Lys Pro Val Ile Lys Lys Arg Glu Gly Asp Ile Lys Thr Tyr

[0234]	1	5	10	15
[0235]	<210>33			
[0236]	<211>16			
[0237]	<212>PRT			
[0238]	<213> 鼻病毒 (人鼻病毒)			
[0239]	<400>33			
[0240]	Gln Asn Ile Lys Pro Val Ile Glu Lys Arg Thr Ser Ile Lys Gln Tyr			
[0241]	1	5	10	15
[0242]	<210>34			
[0243]	<211>15			
[0244]	<212>PRT			
[0245]	<213> 鼻病毒 (人鼻病毒)			
[0246]	<400>34			
[0247]	Asn Pro Pro Lys Ile Ile Lys Lys Arg Asp Thr Ile Asn Thr Tyr			
[0248]	1	5	10	15
[0249]	<210>35			
[0250]	<211>15			
[0251]	<212>PRT			
[0252]	<213> 鼻病毒 (人鼻病毒)			
[0253]	<400>35			
[0254]	Ser Ala Lys Pro Val Ile Lys Arg Arg Glu Gln Ile Thr Lys Tyr			
[0255]	1	5	10	15
[0256]	<210>36			
[0257]	<211>15			
[0258]	<212>PRT			
[0259]	<213> 鼻病毒 (人鼻病毒)			
[0260]	<400>36			
[0261]	Asp Ala Lys Pro Ile Ile Ala Lys Arg Glu Asn Ile Met Lys Tyr			
[0262]	1	5	10	15
[0263]	<210>37			
[0264]	<211>15			
[0265]	<212>PRT			
[0266]	<213> 鼻病毒 (人鼻病毒)			
[0267]	<400>37			
[0268]	Asp Ser Lys Thr Ile Ile Lys Lys Arg Thr Asn Ile Lys Thr Tyr			
[0269]	1	5	10	15
[0270]	<210>38			
[0271]	<211>289			
[0272]	<212>PRT			

[0273]	<213> 鼻病毒 (人鼻病毒)															
[0274]	<400>38															
[0275]	Gly	Leu	Gly	Asp	Glu	Leu	Glu	Glu	Val	Ile	Val	Glu	Lys	Thr	Lys	Gln
[0276]	1				5					10					15	
[0277]	Thr	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Pro	Lys	His	Thr	Gln	Lys	Val	Pro
[0278]					20				25					30		
[0279]	Ile	Leu	Thr	Ala	Asn	Glu	Thr	Gly	Ala	Thr	Met	Pro	Val	Leu	Pro	Ser
[0280]					35				40					45		
[0281]	Asp	Ser	Ile	Glu	Thr	Arg	Thr	Thr	Tyr	Met	His	Phe	Asn	Gly	Ser	Glu
[0282]					50				55				60			
[0283]	Thr	Asp	Val	Glu	Cys	Phe	Leu	Gly	Arg	Ala	Ala	Cys	Val	His	Val	Thr
[0284]	65					70					75				80	
[0285]	Glu	Ile	Gln	Asn	Lys	Asp	Ala	Thr	Gly	Ile	Asp	Asn	His	Arg	Glu	Ala
[0286]					85					90					95	
[0287]	Lys	Leu	Phe	Asn	Asp	Trp	Lys	Ile	Asn	Leu	Ser	Ser	Leu	Val	Gln	Leu
[0288]					100					105					110	
[0289]	Arg	Lys	Lys	Leu	Glu	Leu	Phe	Thr	Tyr	Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Glu	Tyr
[0290]					115					120					125	
[0291]	Thr	Ile	Leu	Ala	Thr	Ala	Ser	Gln	Pro	Asp	Ser	Ala	Asn	Tyr	Ser	Ser
[0292]					130					135					140	
[0293]	Asn	Leu	Val	Val	Gln	Ala	Met	Tyr	Val	Pro	Pro	Gly	Ala	Pro	Asn	Pro
[0294]	145					150						155			160	
[0295]	Lys	Glu	Trp	Asp	Asp	Tyr	Thr	Trp	Gln	Ser	Ala	Ser	Asn	Pro	Ser	Val
[0296]					165						170				175	
[0297]	Phe	Phe	Lys	Val	Gly	Asp	Thr	Ser	Arg	Phe	Ser	Val	Pro	Tyr	Val	Gly
[0298]					180					185					190	
[0299]	Leu	Ala	Ser	Ala	Tyr	Asn	Cys	Phe	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Ser	His	Asp	Asp
[0300]					195					200					205	
[0301]	Ala	Glu	Thr	Gln	Tyr	Gly	Ile	Thr	Val	Leu	Asn	His	Met	Gly	Ser	Met
[0302]					210					215					220	
[0303]	Ala	Phe	Arg	Ile	Val	Asn	Glu	His	Asp	Glu	His	Lys	Thr	Leu	Val	Lys
[0304]	225					230						235			240	
[0305]	Ile	Arg	Val	Tyr	His	Arg	Ala	Lys	His	Val	Glu	Ala	Trp	Ile	Pro	Arg
[0306]					245						250				255	
[0307]	Ala	Pro	Arg	Ala	Leu	Pro	Tyr	Thr	Ser	Ile	Gly	Arg	Thr	Asn	Tyr	Pro
[0308]					260						265				270	
[0309]	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Ile	Lys	Lys	Arg	Lys	Gly	Asp	Ile	Lys	Ser
[0310]					275					280					285	
[0311]	Tyr															

[0312]	<210>39
[0313]	<211>289
[0314]	<212>PRT
[0315]	<213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
[0316]	<400>39
[0317]	Gly Leu Gly Asp Glu Leu Glu Glu Val Ile Val Glu Lys Thr Lys Gln
[0318]	1 5 10 15
[0319]	Thr Val Ala Ser Ile Ser Ser Gly Pro Lys His Thr Gln Lys Val Pro
[0320]	20 25 30
[0321]	Ile Leu Thr Ala Asn Glu Thr Gly Ala Thr Met Pro Val Leu Pro Ser
[0322]	35 40 45
[0323]	Asp Ser Ile Glu Thr Arg Thr Thr Tyr Met His Phe Asn Gly Ser Glu
[0324]	50 55 60
[0325]	Thr Asp Val Glu Cys Phe Leu Gly Arg Ala Ala Cys Val His Val Thr
[0326]	65 70 75 80
[0327]	Glu Ile Gln Asn Lys Asp Ala Thr Gly Ile Asp Asn His Arg Glu Ala
[0328]	85 90 95
[0329]	Lys Leu Phe Asn Asp Trp Lys Ile Asn Leu Ser Ser Leu Val Gln Leu
[0330]	100 105 110
[0331]	Arg Lys Lys Leu Glu Leu Phe Thr Tyr Val Arg Phe Asp Ser Glu Tyr
[0332]	115 120 125
[0333]	Thr Ile Leu Ala Thr Ala Ser Gln Pro Asp Ser Ala Asn Tyr Ser Ser
[0334]	130 135 140
[0335]	Asn Leu Val Val Gln Ala Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Asn Pro
[0336]	145 150 155 160
[0337]	Val Glu Trp Asp Asp Tyr Thr Trp Gln Ser Ala Ser Asn Pro Ser Val
[0338]	165 170 175
[0339]	Phe Phe Lys Val Gly Asp Thr Ser Arg Phe Ser Val Pro Tyr Val Gly
[0340]	180 185 190
[0341]	Leu Ala Ser Ala Tyr Asn Cys Phe Tyr Asp Gly Tyr Ser His Asp Asp
[0342]	195 200 205
[0343]	Glu Asp Thr Pro Tyr Gly Ile Thr Val Leu Asn His Met Gly Ser Met
[0344]	210 215 220
[0345]	Ala Phe Arg Ile Val Asn Asp His Asp Ala His Arg Thr Leu Val Lys
[0346]	225 230 235 240
[0347]	Ile Arg Val Tyr His Arg Ala Lys His Ile Glu Ala Trp Val Pro Arg
[0348]	245 250 255
[0349]	Ala Pro Arg Ala Leu Pro Tyr Thr Ser Ile Gly Arg Thr Asn Tyr Pro
[0350]	260 265 270

[0351]	Lys Asn Pro Lys Pro Val Ile Lys Lys Arg Glu Gly Asp Ile Lys Thr
[0352]	275 280 285
[0353]	Tyr
[0354]	<210>40
[0355]	<211>290
[0356]	<212>PRT
[0357]	<213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
[0358]	<400>40
[0359]	Gly Leu Gly Asp Glu Leu Glu Glu Val Ile Val Glu Lys Thr Lys Gln
[0360]	1 5 10 15
[0361]	Thr Val Ala Ser Ile Ser Ser Gly Pro Lys His Thr Gln Lys Val Pro
[0362]	20 25 30
[0363]	Ile Leu Thr Ala Asn Glu Thr Gly Ala Thr Met Pro Val Leu Pro Ser
[0364]	35 40 45
[0365]	Asp Ser Ile Glu Thr Arg Thr Thr Tyr Met His Phe Asn Gly Ser Glu
[0366]	50 55 60
[0367]	Thr Asp Val Glu Cys Phe Leu Gly Arg Ala Ala Cys Val His Val Thr
[0368]	65 70 75 80
[0369]	Glu Ile Gln Asn Lys Asp Ala Thr Gly Ile Asp Asn His Arg Glu Ala
[0370]	85 90 95
[0371]	Lys Leu Phe Asn Asp Trp Lys Ile Asn Leu Ser Ser Leu Val Gln Leu
[0372]	100 105 110
[0373]	Arg Lys Lys Leu Glu Leu Phe Thr Tyr Val Arg Phe Asp Ser Glu Tyr
[0374]	115 120 125
[0375]	Thr Ile Leu Ala Thr Ala Ser Gln Pro Asp Ser Ala Asn Tyr Ser Ser
[0376]	130 135 140
[0377]	Asn Leu Val Val Gln Ala Met Tyr Val Pro Pro Gly Ala Pro Asn Pro
[0378]	145 150 155 160
[0379]	Val Glu Trp Asn Asp Tyr Thr Trp Gln Ser Ala Ser Asn Pro Ser Val
[0380]	165 170 175
[0381]	Phe Phe Lys Val Gly Asp Thr Ala Arg Phe Ser Val Pro Phe Val Gly
[0382]	180 185 190
[0383]	Leu Ala Ser Ala Tyr Asn Cys Phe Tyr Asp Gly Tyr Ser His Asp Asp
[0384]	195 200 205
[0385]	Ala Glu Thr Gln Tyr Gly Ile Thr Val Leu Asn His Met Gly Ser Met
[0386]	210 215 220
[0387]	Ala Phe Arg Ile Val Asn Glu His Asp Glu His Lys Thr Leu Val Lys
[0388]	225 230 235 240
[0389]	Ile Arg Val Tyr His Arg Ala Lys His Val Glu Ala Trp Ile Pro Arg

[0390]	245	250	255
[0391]	Ala Pro Arg Ala Leu Pro Tyr Thr Ser Ile Gly Arg Thr Asn Tyr Pro		
[0392]	260	265	270
[0393]	Lys Lys Asn Lys Ile Val Pro Val Ile Lys Lys Arg Glu Asn Ile Thr		
[0394]	275	280	285
[0395]	Thr Tyr		
[0396]	290		
[0397]	<210>41		
[0398]	<211>27		
[0399]	<212>PRT		
[0400]	<213> 鼻病毒 (人鼻病毒)		
[0401]	<220>		
[0402]	<221>MISC_FEATURE		
[0403]	<222>(1)..(10)		
[0404]	<223>Xaa = 任何氨基酸或不存在		
[0405]	<220>		
[0406]	<221>MISC_FEATURE		
[0407]	<222>(11)..(11)		
[0408]	<223>Xaa = Pro 或 Thr		
[0409]	<220>		
[0410]	<221>MISC_FEATURE		
[0411]	<222>(12)..(12)		
[0412]	<223>Xaa = Val、Lys 或 Ile		
[0413]	<220>		
[0414]	<221>MISC_FEATURE		
[0415]	<222>(14)..(14)		
[0416]	<223>Xaa = Lys、Glu、Ile 或 Ala		
[0417]	<220>		
[0418]	<221>MISC_FEATURE		
[0419]	<222>(15)..(15)		
[0420]	<223>Xaa = Lys 或 Arg		
[0421]	<220>		
[0422]	<221>MISC_FEATURE		
[0423]	<222>(17)..(17)		
[0424]	<223>Xaa = Ser、Glu、Asp、Thr、Arg 或 Lys		
[0425]	<220>		
[0426]	<221>MISC_FEATURE		
[0427]	<222>(18)..(27)		
[0428]	<223>Xaa = 任何氨基酸或不存在		

- [0429] <400>41
- [0430] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Arg
- [0431] 1 5 10 15
- [0432] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
- [0433] 20 25
- [0434] <210>42
- [0435] <211>6
- [0436] <212>PRT
- [0437] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
- [0438] <220>
- [0439] <221>MISC_FEATURE
- [0440] <222>(1)..(1)
- [0441] <223>Xaa = Asp 或 Glu
- [0442] <400>42
- [0443] Xaa Asn Ile Thr Thr Tyr
- [0444] 1 5
- [0445] <210>43
- [0446] <211>6
- [0447] <212>PRT
- [0448] <213> 鼻病毒 (人鼻病毒)
- [0449] <400>43
- [0450] Ser Leu Ile Thr Asn Tyr
- [0451] 1 5

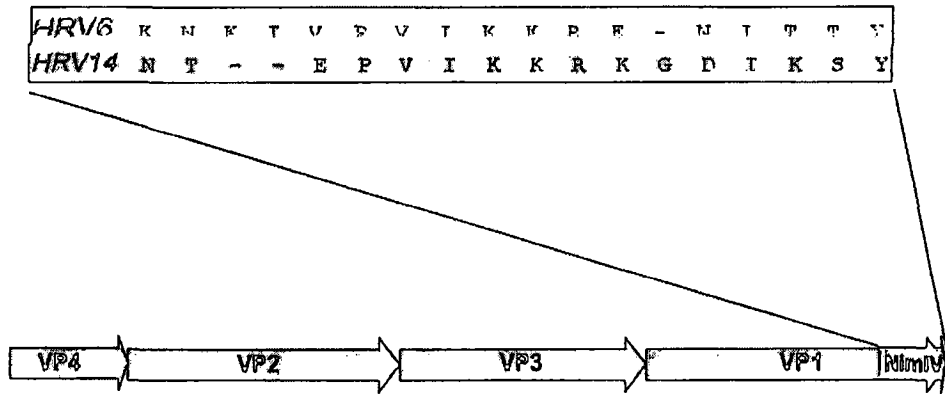


图 1

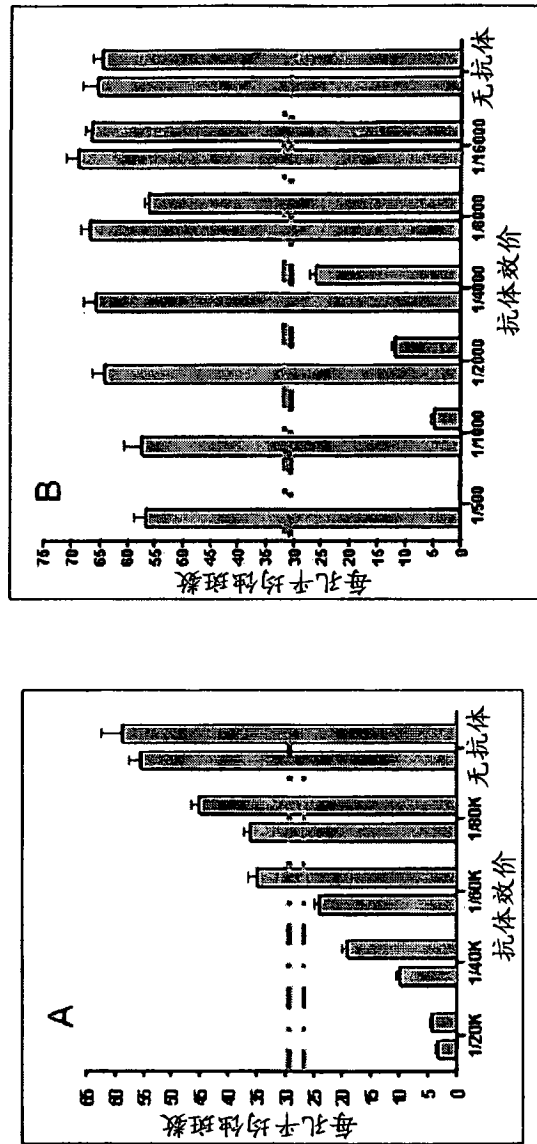


图 2

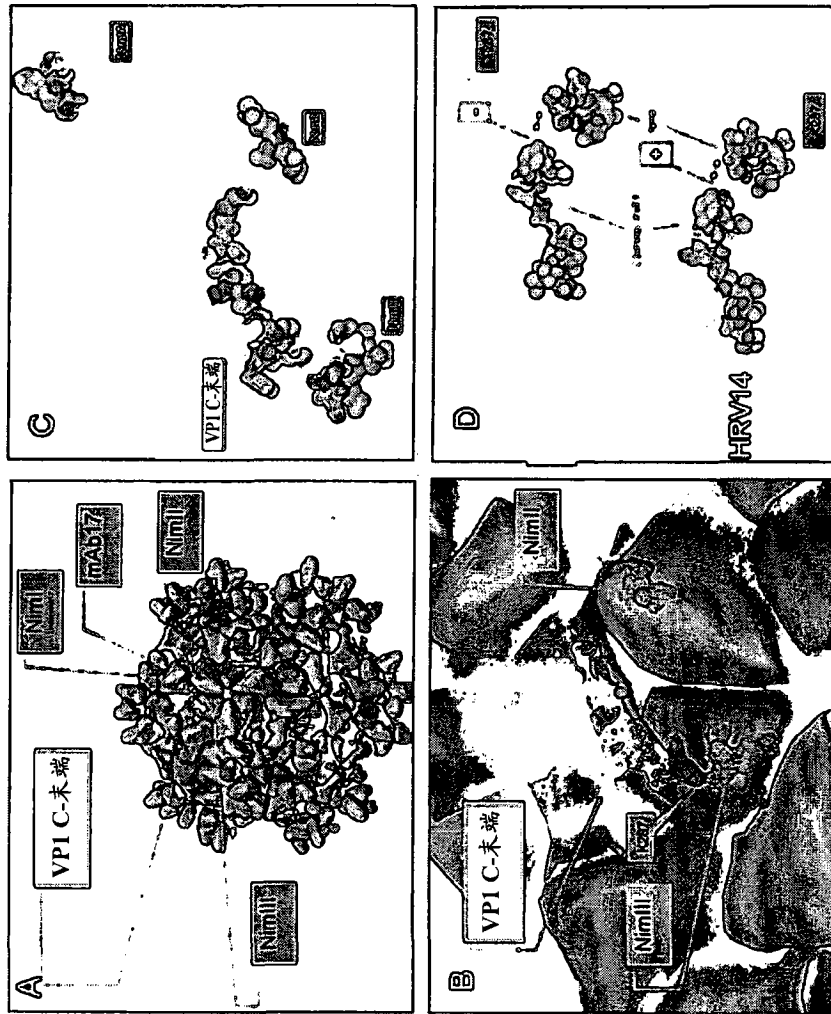


图 3

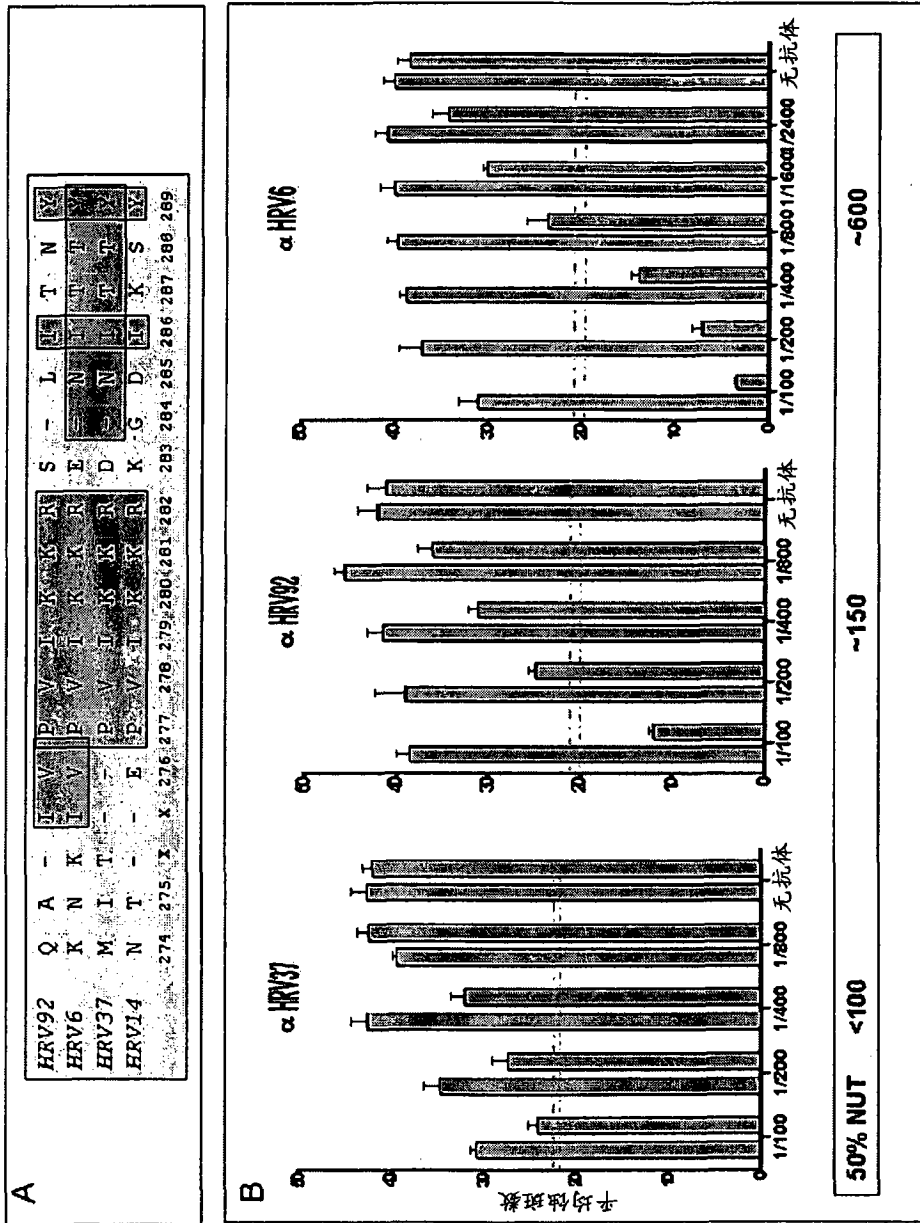


图 4

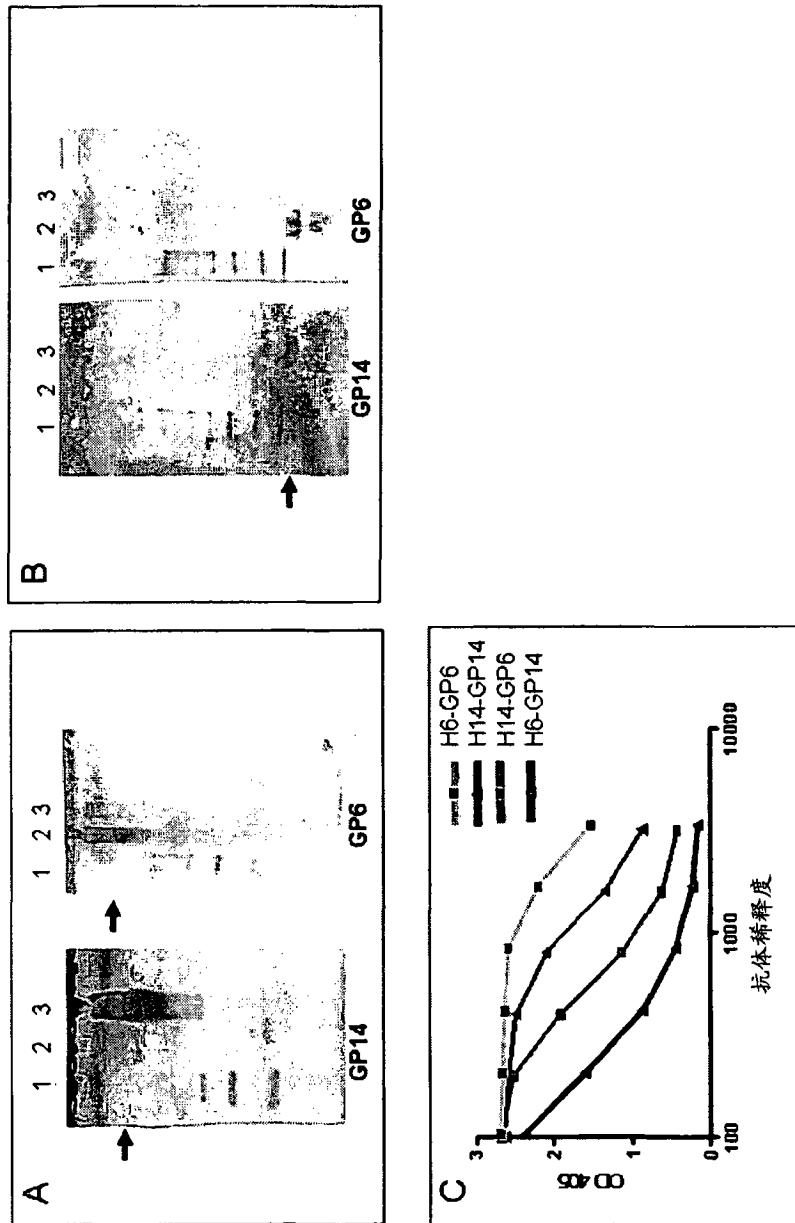


图 5

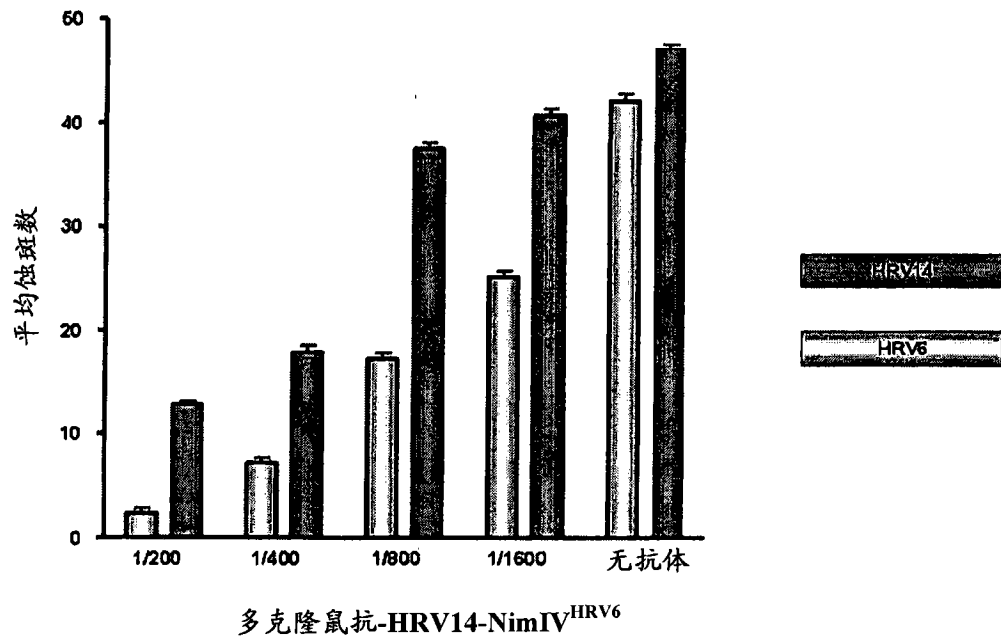


图 6

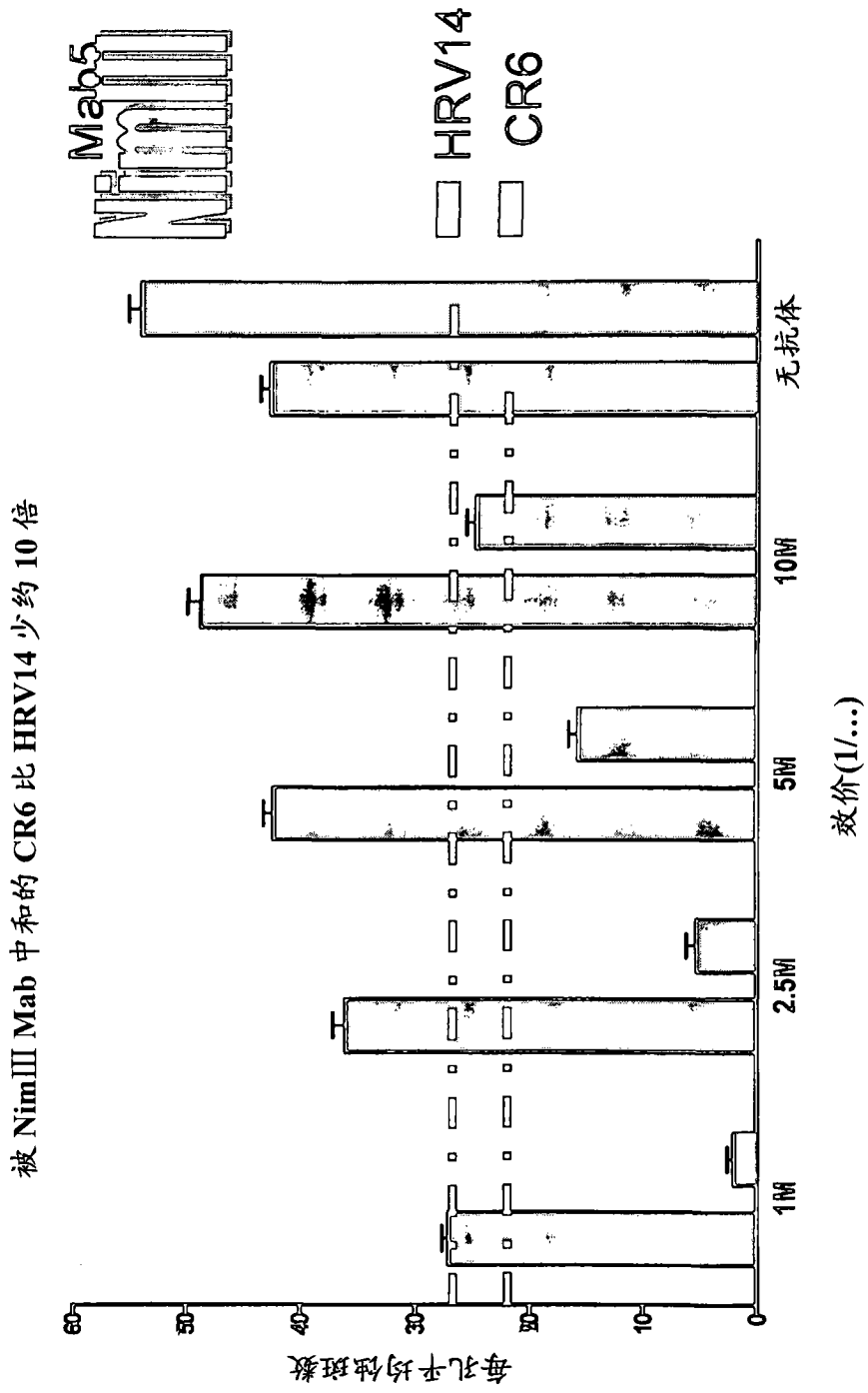


图 7

被 Nim II Mab 中和的 CR6 比 HRV14 多约 5 倍

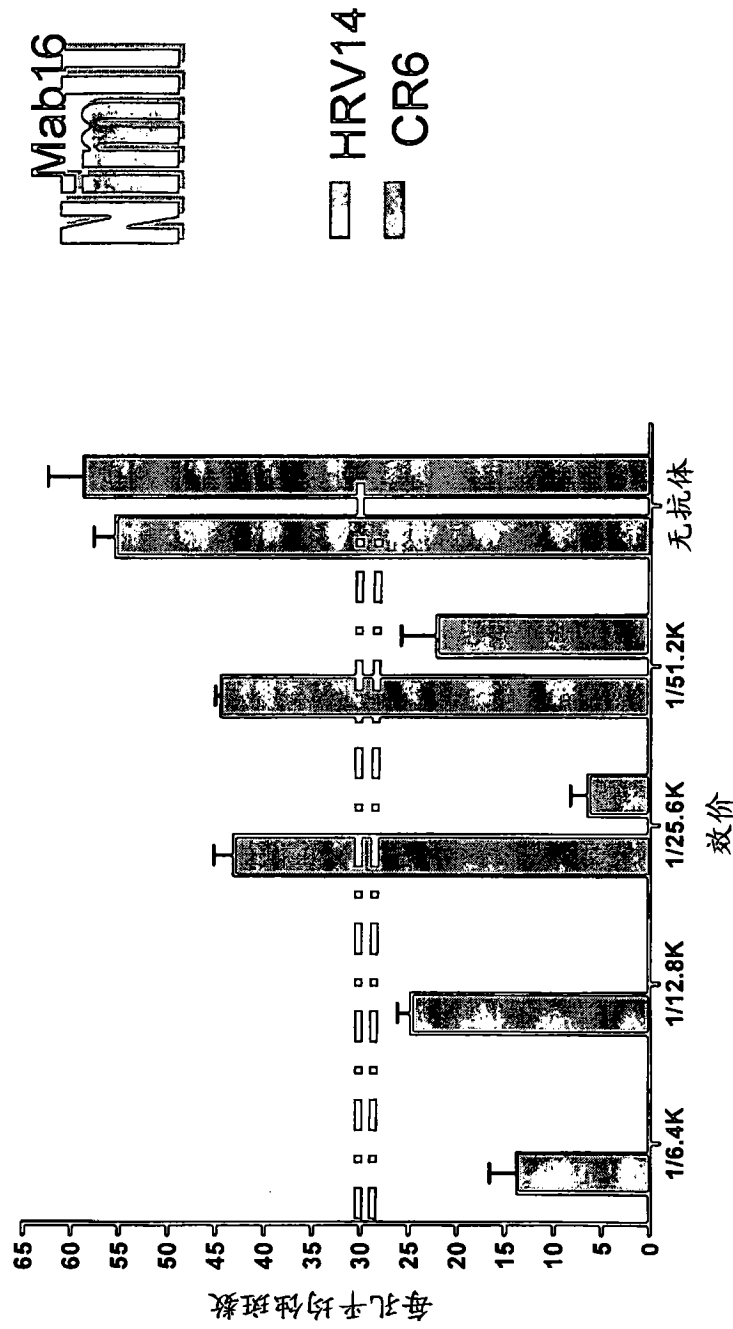


图 8

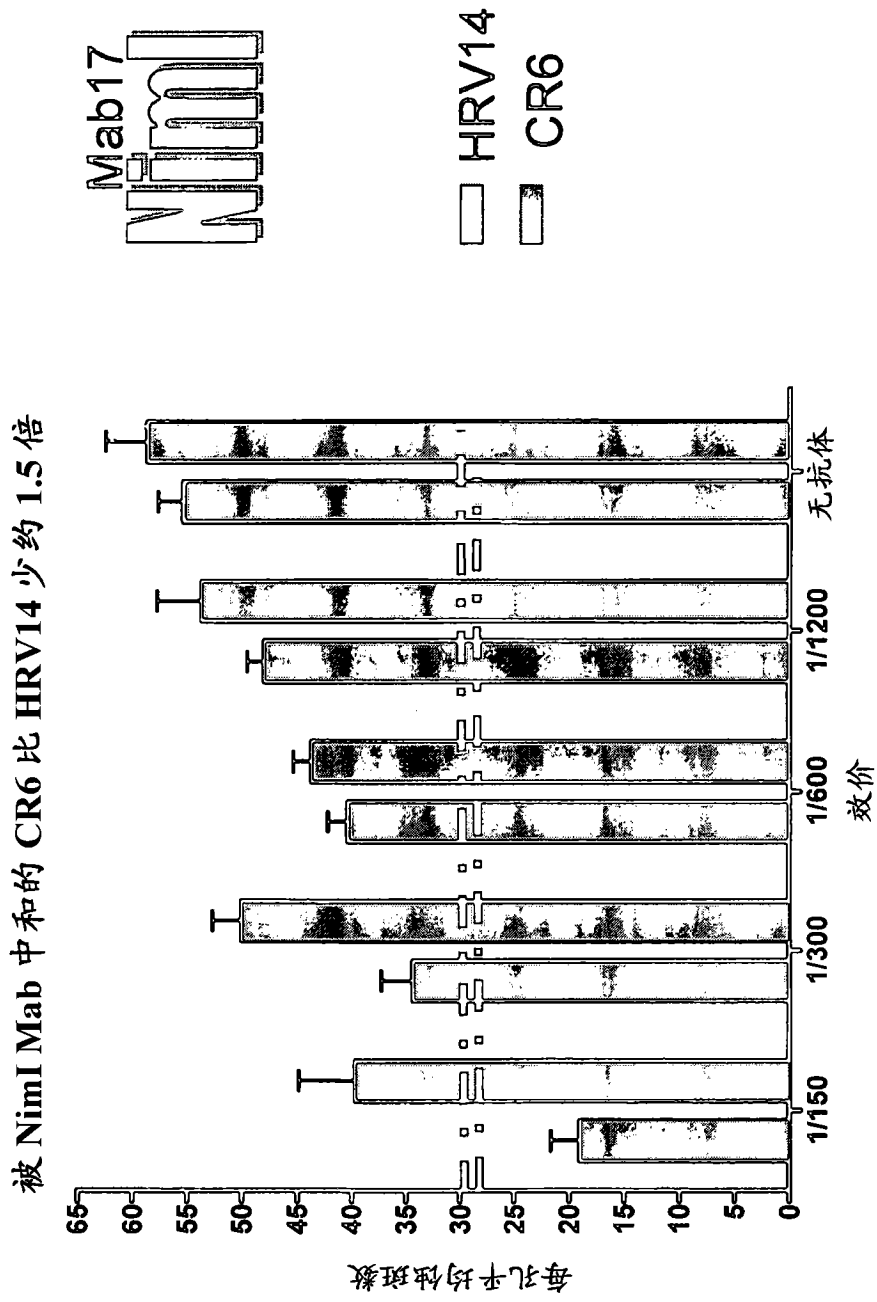


图 9

NimIV 影响 Nim I, Nim II, NimIII
50%中和效价





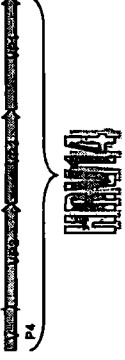
<p>单克隆抗体</p>	 <p>Mab17</p>	 <p>Mab16</p>	 <p>Mab5</p>
<p>病毒</p>	 <p>P4</p>	<p>200</p>	<p>~1x10⁶</p>
<p>病毒</p>	 <p>P4</p>	<p>300</p>	<p>~13x10³</p>
<p>1.5X</p>		<p>5X</p>	<p>10X</p>

图 10

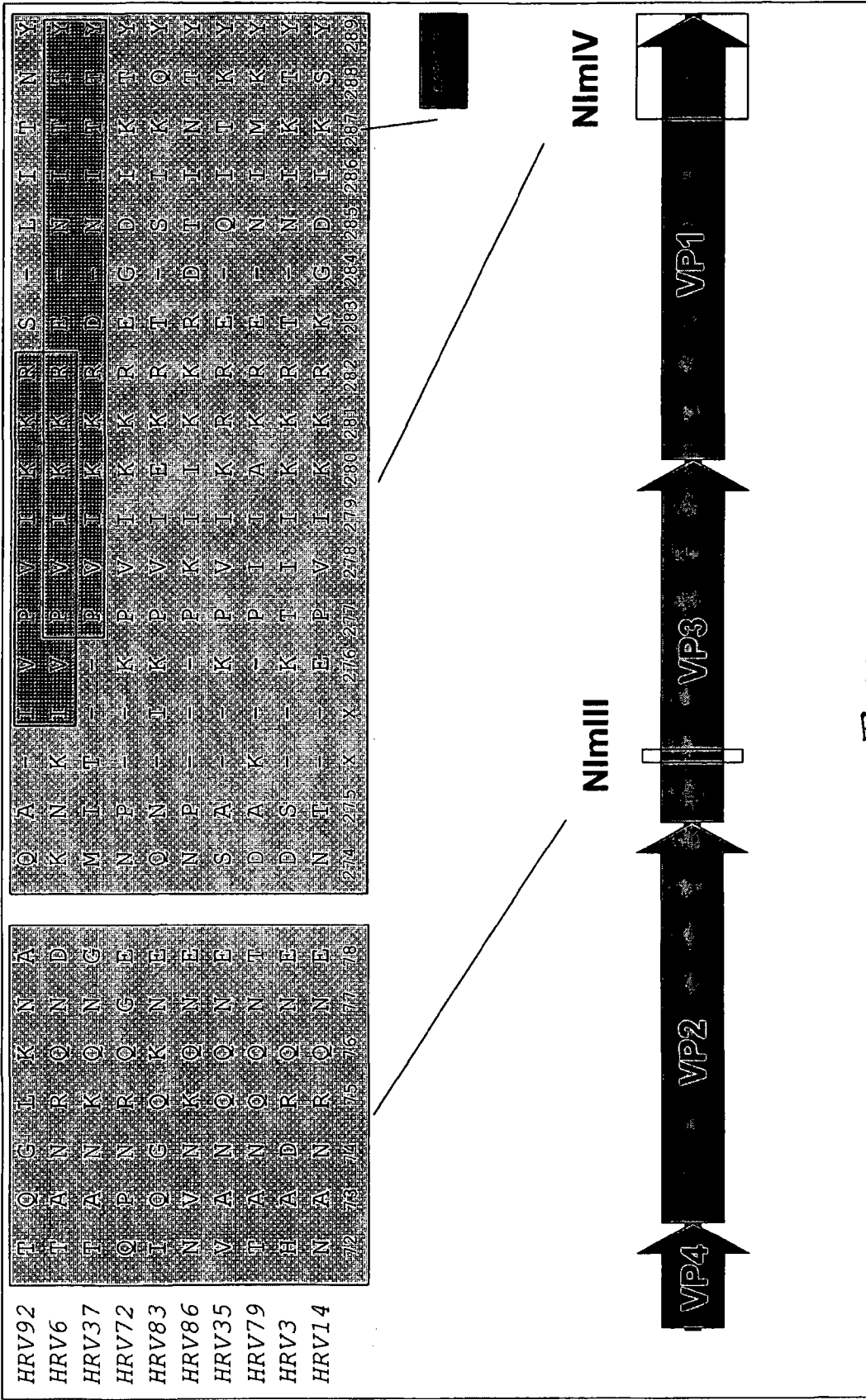


图 11

A

HRV14	1	10	20	30	40	50	60	70	83
CR72	GLGDELEEVIV	VEIKIKQIVASIS	SGPKHIQKVP	PILLTANEIG	AMPVLP	SDSII	RIIYMH	FNGSID	VZICLGRAACVHV
CR6	GLGDELEEVIV	VEIKIKQIVASIS	SGPKHIQKVP	PILLTANEIG	AMPVLP	SDSII	RIIYMH	FNGSID	VZICLGRAACVHV
HRV14	84	90	100	110	120	130	140	150	166
CR72	NKDAIGIDN	HREAKLFNDW	KINLSLVQ	LKLELFTY	VRDSEY	YIILAI	ASQ	DSANYS	SNLVQAMYP
CR6	NKDAIGIDN	HREAKLFNDW	KINLSLVQ	LKLELFTY	VRDSEY	YIILAI	ASQ	DSANYS	SNLVQAMYP
HRV14	167	180	190	200	210	220	230	249	
CR72	IWQASNP	SVFEK	VDISRF	SVFYV	GLASAY	NCFYD	GYSH	DDAEIO	YGITV
CR6	IWQASNP	SVFEK	VDISRF	SVFYV	GLASAY	NCFYD	GYSH	DDAEIO	YGITV
HRV14	250	260	270						
CR72	VEAWIP	RA	PRAL	PIYSIG	RINYP	KNT			
CR6	VEAWIP	RA	PRAL	PIYSIG	RINYP	KNT			

B

	274	275	-	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289
HRV14	N	T	-	E	P	V	I	K	K	R	K	G	D	I	K	S	Y
HRV72	N	P	-	K	P	V	I	K	K	R	R	E	G	D	I	K	Y
HRV6	K	N	K	I	V	P	V	I	K	K	R	E	-	N	I	T	Y

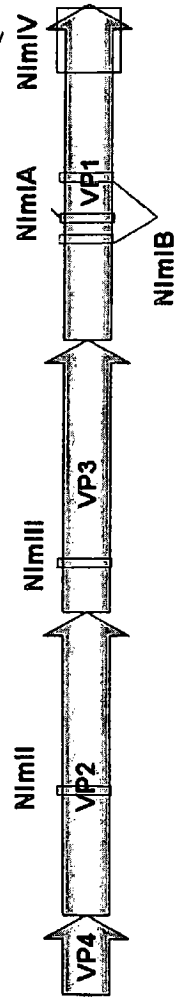


图 12

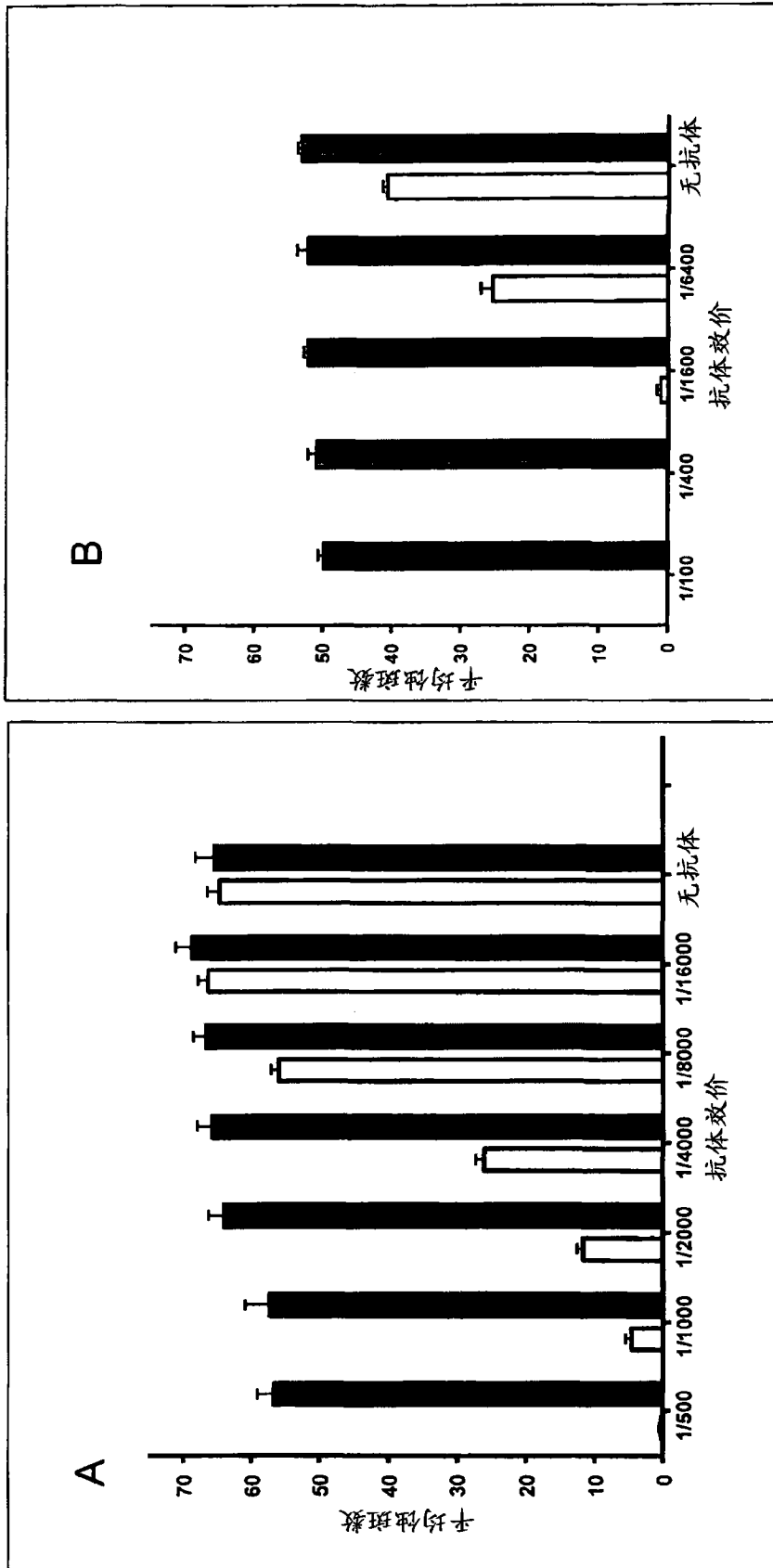


图 13

Nim 特异性抗体针对 CR6、CR72 和 HRV14 的 50% 中和效价

	Mab4 (α -NimI)	Mab17 (α -NimI)	Mab16 (α -NimII)	Mab5 (α -NimIII)
CR72	$>1.0 \times 10^7$	~ 200	ND	$>1.0 \times 10^7$
CR6	$>1.0 \times 10^7$	~ 200	$\sim 60 \times 10^3$	$\sim 1 \times 10^6$
HRV14	$>1.0 \times 10^7$	~ 300	$\sim 13 \times 10^3$	$\sim 1.1 \times 10^7$

图 14

抗 CR6 和抗 CR72 针对 HRV14、HRV6、
HRV72、CR6 和 CR72 的 50%中和效价

病毒	血清	
	抗 CR6	抗 CR72
HRV14	6×10^2	2×10^3
HRV6	6×10^3	未能检测出(ND)
HRV72	未能检测出(ND)	5×10^2
CR6	6×10^3	未能检测出(ND)
CR72	未能检测出(ND)	2×10^3

图 15