



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110898219 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201911266801.1

(22)申请日 2019.12.11

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 朱明昭 周晓晓 王文君

(74)专利代理机构 成都七星天知识产权代理有限公司 51253

代理人 袁春晓

(51)Int.Cl.

A61K 39/29(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

A61K 39/39(2006.01)

A61K 47/64(2017.01)

A61P 31/20(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页
序列表4页 附图5页

(54)发明名称

基于铁蛋白与preS1抗原基因融合表达的疫苗

(57)摘要

本申请实施例公开了一种乙型肝炎疫苗。所述乙型肝炎疫苗包括：融合蛋白，所述融合蛋白包括乙肝病毒表面抗原肽段和铁蛋白，所述乙肝病毒表面抗原肽段和铁蛋白由连接子连接。所述连接子为柔性连接子。所述铁蛋白为细菌铁蛋白。所述乙肝病毒表面抗原肽段包括preS1肽段。

1. 一种乙型肝炎疫苗,其特征在于,包括:
融合蛋白,所述融合蛋白包括乙肝病毒表面抗原肽段和铁蛋白,所述乙肝病毒表面抗原肽段和铁蛋白由连接子连接。
2. 如权利要求1所述的乙型肝炎疫苗,其特征在于,所述连接子为柔性连接子。
3. 如权利要求1所述的乙型肝炎疫苗,其特征在于,所述铁蛋白为细菌铁蛋白。
4. 如权利要求1所述的乙型肝炎疫苗,其特征在于,所述乙肝病毒表面抗原肽段包括preS1肽段。
5. 如权利要求1所述的乙型肝炎疫苗,其特征在于,所述融合蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:3有至少99%,98%,或95%的相似性;优选的,所述融合蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO:3。
6. 如权利要求5所述的乙型肝炎疫苗,其特征在于,还包括药学上可接受的载体和/或佐剂。
7. 如权利要求6所述的乙型肝炎疫苗,其特征在于,所述佐剂为CpG寡核苷酸。
8. 如权利要求1所述的乙型肝炎疫苗,其特征在于,所述乙型肝炎疫苗引发针对乙肝病毒preS1的抗体应答。
9. 如权利要求1-8任一项所述的乙型肝炎疫苗,其特征在于,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以引发针对preS1的抗体应答;优选的,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以于14天使得应答抗体浓度超过0.4ug/ml,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以于21天使得应答抗体浓度超过10ug/ml,或者所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以于35天使得应答抗体浓度超过18ug/ml。
10. 如权利要求1-8任一项所述的乙型肝炎疫苗,其特征在于,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以引发针对preS1的抗体应答;优选的,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以在初次免疫后第14天使得应答抗体浓度达到约0.6ug/ml,第21天使得应答抗体浓度达到约12ug/ml,第35天使得应答抗体浓度达到约22ug/ml。
11. 如权利要求1-8任一项所述乙型肝炎疫苗,其特征在于,所述乙型肝炎疫苗在慢性乙型肝炎感染小鼠中可以引发针对preS1的抗体应答;优选的,所述乙型肝炎疫苗在慢性乙型肝炎感染小鼠中可以在初次免疫后第14天使得应答抗体浓度达到约2.8ug/ml,第28天使得应答抗体浓度达到约15ug/ml,第42天使得应答抗体浓度达到约38ug/ml。
12. 一种编码融合蛋白的核酸分子,其特征在于,可以编码权利要求1-10任一项中所述的融合蛋白。
13. 一种包含融合蛋白的纳米颗粒的制备方法,其特征在于,包括:在细胞或体外系统中表达权利要求12所述的核酸分子。
14. 一种药物组合物,其特征在于,包括权利要求1-11任一项所述的乙型肝炎疫苗。
15. 如权利要求14所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物用于制备预防或治疗乙型肝炎的药物。
16. 一种重组细胞,其特征在于,包含权利要求12所述的核酸分子。
17. 一种诱导产生免疫反应的方法,其特征在于,包括使用权利要求1-11任一项所述的乙型肝炎疫苗诱导人体或动物体产生免疫反应。

基于铁蛋白与preS1抗原基因融合表达的疫苗

技术领域

[0001] 本申请涉及乙肝疫苗技术领域,特别涉及铁蛋白纳米乙肝疫苗制备方法。

背景技术

[0002] 乙型肝炎是一种严重危害人类健康并广为流传的疾病,目前,普遍接种疫苗是控制乙肝的有效措施。乙肝前S1 (PreS1) 区域为乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus, HBV) 外膜蛋白的重要组成部分,在HBV感染肝细胞和机体免疫应答方面起重要作用。PreS1肽段在慢性乙肝感染的患者体内的免疫耐受程度较低,但是其免疫原性也较低,难以诱导高的抗体应答。

[0003] 目前的研究目前有报道的乙肝病毒疫苗主要包含HBsAg、preS1、preS2和HBcAg任意一种或者几种抗原肽段,再加上一些具有免疫增强作用的细胞因子等。但是对于乙肝患者的免疫耐受和激活HBV特异性细胞免疫的效果还有待提高,因此需要制备一种乙肝疫苗,能获得显著提高的免疫原性,并且能够诱导较高的免疫应答。

发明内容

[0004] 本申请实施例之一提供一种乙型肝炎疫苗。所述乙型肝炎疫苗包括:乙肝病毒表面抗原肽段和铁蛋白,所述乙肝病毒表面抗原肽段和铁蛋白由连接子连接。所述连接子为柔性连接子。所述铁蛋白为细菌铁蛋白。所述乙肝病毒表面抗原肽段包括preS1肽段。

[0005] 在一些实施例中,所述融合蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:3有至少99%,98%,或95%的相似性;优选的,所述融合蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO:3。

[0006] 在一些实施例中,所述的乙型肝炎疫苗,还包括药学上可接受的载体和/或佐剂。所述佐剂为CpG寡核苷酸。

[0007] 在一些实施例中,所述乙型肝炎疫苗引发针对乙肝病毒preS1的抗体应答。

[0008] 在一些实施例中,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以引发针对preS1的抗体应答;优选的,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以于14天使得应答抗体浓度超过0.4ug/ml,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以于21天使得应答抗体浓度超过10ug/ml,或者所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以于35天使得应答抗体浓度超过18ug/ml。

[0009] 在一些实施例中,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以引发针对preS1的抗体应答;优选的,所述乙型肝炎疫苗在野生型C57BL/6小鼠中,在500pmol抗原剂量,30ugCpG佐剂剂量,皮下免疫2次,间隔2周的情况下,可以在初次免疫后第14天使得应答抗体浓度达到约0.6ug/ml,第21天使得应答抗体浓度达到约12ug/ml,第35天使得应答抗体浓度达到约22ug/ml。

[0010] 在一些实施例中,所述乙型肝炎疫苗在慢性乙型肝炎感染小鼠模型中可以引发针对preS1的抗体应答;优选的,所述乙型肝炎疫苗在AAV-HBV1.3制备的慢性感染小鼠中,在500pmol抗原剂量,30ug CpG佐剂剂量,皮下免疫3次,间隔2周的情况下,可以在初次免疫后第14天使得应答抗体浓度达到约2.8ug/ml,第28天使得应答抗体浓度达到约15ug/ml,第42

天使得应答抗体浓度达到约38ug/ml。

[0011] 本申请实施例之一提供一种编码融合蛋白的核酸分子,所述核酸分子可以编码权利要求所述的融合蛋白。

[0012] 本申请实施例之一提供包含融合蛋白的纳米颗粒的制备方法,该方法包括:在细胞或体外系统中表达所述的核酸分子。

[0013] 本申请实施例之一提供一种药物组合物,包括所述的乙型肝炎疫苗。所述药物组合物用于制备预防或治疗乙型肝炎的药物。

[0014] 本申请还提供了一种重组细胞,包含所述的核酸分子。

[0015] 本申请还提供一种诱导产生免疫反应的方法,包括使用所述的乙型肝炎疫苗诱导人体或动物体产生免疫反应。

附图说明

[0016] 本申请将以示例性实施例的方式进一步说明,这些示例性实施例将通过附图进行详细描述。这些实施例并非限制性的,在这些实施例中,相同的编号表示相同的结构,其中:

[0017] 图1是根据本申请一些实施例所示的结合后的preS1-铁蛋白经过Superose 6Increase凝胶过滤柱洗脱的纯化谱图;

[0018] 图2是根据本申请一些实施例所示的纯化后的preS1-铁蛋白的SDS-PAGE电泳结果示意图;

[0019] 图3是根据本申请一些实施例所示的preS1-铁蛋白疫苗在透射电子显微镜下拍摄结果图;

[0020] 图4是根据本申请一些实施例所示的疫苗注射与检测时间示意图;

[0021] 图5是根据本申请一些实施例所示的第14天三种疫苗引起的抗体应答水平;

[0022] 图6是根据本申请一些实施例所示的第21天三种疫苗引起的抗体应答水平;

[0023] 图7是根据本申请一些实施例所示的第35天三种疫苗引起的抗体应答水平;

[0024] 图8是根据本申请一些实施例所示的病毒感染、疫苗免疫与检测时间示意图;

[0025] 图9是根据本申请一些实施例所示的在慢性乙肝感染小鼠模型中三种疫苗引起的抗体应答水平。

具体实施方式

[0026] 为了更清楚地说明本申请实施例的技术方案,下面将对本说明书中一个或一些实施例作简单的介绍。显而易见地,下面描述的仅仅是本申请的一些示例或实施例,对于本领域的普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些实施例将本申请应用于其它类似情景。

[0027] 如本申请和权利要求书中所示,除非上下文明确提示例外情形,“一”、“一个”、“一种”和/或“该”等词并非特指单数,也可包括复数。一般说来,术语“包括”与“包含”仅提示包括已明确标识的步骤和元素,而这些步骤和元素不构成一个排它性的罗列,方法或者设备也可能包含其它的步骤或元素。

[0028] 本发明提供了基于纳米颗粒的疫苗,其是易于制造的,强力的,并且其可以引发针对乙肝病毒的抗体应答。利用本发明提供的疫苗可以应用于多种可能感染乙肝病毒的生物

体,例如,动物或人体。具体地,本发明提供了一种纳米颗粒,该纳米颗粒是由融合蛋白自组装而成。该融合蛋白包括乙肝病毒表面抗原肽段和铁蛋白(ferritin)。

[0029] 在上述实施例中,乙肝病毒表面抗原肽段是指乙型肝炎病毒(HBV)表面可以引发生物体抗体反应的全部或部分抗原肽段。例如:preS1肽段、preS2肽段、HBS肽段或HBe肽段等。在一些实施例中,所述乙肝病毒表面抗原肽段可以包括preS1肽段,具体的为ay型preS1肽段,具有与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的蛋白至少99%,98%,或95%的相似性。优选的,所述乙肝病毒表面抗原肽段为SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的preS1肽段。值得说明的是,Pres1肽段是乙肝病毒大表面抗原N端的一段序列,包括ay型和ad型,其中ay型为108个氨基酸,ad型为119个氨基酸。pres1肽段通过和肝脏细胞表面的钠离子牛磺胆酸共转运多肽(NTCP,sodium taurocholate cotransporting polypeptide)受体相互作用,介导乙肝病毒感染肝脏细胞。针对preS1的单克隆抗体,显示出具有乙肝病毒中和活性和阻断病毒感染的能力。更为突出的是,针对preS1的单克隆抗体还显示可以介导抗体依赖的细胞毒作用(ADCC,antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)和抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP,antibody dependent cell-mediated phagocytosis),提示其可以清除已被感染的肝脏细胞,发挥治疗作用。因此,诱导生物体产生有效的针对preS1抗原的抗体应答具有治疗乙型肝炎的作用。但是,游离孤立的preS1肽段的免疫原性较低,难以诱导高的抗体应答。

[0030] 在一些实施例中,所使用的载体可以为铁蛋白。在一些实施例中,铁蛋白可以包括细菌铁蛋白、植物铁蛋白、藻类铁蛋白、昆虫铁蛋白、真菌铁蛋白或哺乳动物铁蛋白等。优选的,铁蛋白可以为强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus)的铁蛋白,具有与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的蛋白至少99%,98%,或95%的相似性。优选的,所述铁蛋白具有SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0031] 将抗原与载体连接具有多种方式。在本申请的一些实施例中,通过将抗原与铁蛋白进行基因融合表达获取的载有抗原肽段的铁蛋白纳米颗粒。融合表达是将编码两个蛋白的DNA序列通过基因工程手段连接在一起,以融合的形式同时表达两个蛋白。将抗原与载体的连接方法,还可以包括利用SpyTag (ST) /SpyCatcher (SC) 连接子技术将抗原组装在铁蛋白纳米颗粒表面,该方法需要包括分别表达、纯化,共孵育,再纯化等步骤。相较于上述方法,本申请实施例采用的融合表达的方法具有以下优势:(1)操作较为简单,将抗原肽段与铁蛋白基因融合后,直接表达即可;(2)产率高,无需进行二次纯化;(3)不确定影响因素少,不会受到针对其他成分(如SpyTag/SpyCatcher)预存免疫的影响等。

[0032] 但是,利用融合表达的方式实现抗原与铁蛋白的连接具有以下难点:(1)并不是任意一种抗原肽段都可以在与铁蛋白进行基因融合后,能够有效的表达,例如将非洲猪瘟病毒的一个抗原p72与铁蛋白基因融合后并不能获得表达;(2)即使进行了有效表达,所产生的融合蛋白也不一定能够自组装形成稳定的纳米球形颗粒。(3)融合表达获得的目标抗原也不一定能够正确的折叠从而具有免疫原性,更难以确保其在融合了铁蛋白后免疫原性获得了较大的进一步的提高。例如,病毒抗原CD2V连在铁蛋白上后,免疫后诱导的抗体水平仅提高了1.21倍。因此,对于preS1抗原肽段来说,其与铁蛋白是否可以进行融合表达以及表达后的效果如何是难以通过现有知识和手段预测的。

[0033] 在本申请的一些实施例中,preS1肽段与铁蛋白进行基因融合后,可以进行有效的

表达,并且所获得的蛋白能够自组装形成稳定的纳米球形颗粒。在一些实施例中,乙肝病毒肽段与铁蛋白可直接连接,或者可通过连接子连接。在一些实施例中,连接子为柔性连接子,例如GGGGG、GGG、GGGG、GSA、GSAG、GSAGSA、GSAGSAG或类似物。

[0034] 在一些实施例中,所述的融合蛋白的氨基酸序列与SEQ ID NO:3有至少99%,98%,或95%的相似性;优选的,所述融合蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO:3。

[0035] 在一些实施例中,所获取的包含preS1肽段与铁蛋白的融合蛋白可以引起生物体产生免疫反应。具体的,preS1肽段与铁蛋白的融合蛋白其引起生物体抗体水平相较于preS1肽段提高了162倍。此外,在一些实施例中,基因融合表达方式获得的preS1-铁蛋白疫苗与SpyTag/SpyCatcher连接子技术组装获得的preS1-铁蛋白疫苗相比,在抗体应答方面具有更大的优势,获得了更高水平的抗体应答。

[0036] 在一些实施例中,疫苗中还可以包括药学上可接受的载体和/或佐剂。在一些实施例中,载体可以包括溶剂或缓冲体系、冻干保护剂或喷雾保护剂等。具体的,载体可以为磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)。佐剂可以包括中草药多糖、卡波姆、壳聚糖、免疫刺激复合物基质、左旋咪唑、葡聚糖囊素或CpG寡核苷酸、铝佐剂、单磷酰脂质A(MPLA)等。具体的,佐剂可以是CpG寡核苷酸。

[0037] 在一些实施例中,可将所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以引发针对preS1的抗体应答,优选的,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以于14天使得应答抗体浓度超过0.4ug/ml,所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以于21天使得应答抗体浓度超过10ug/ml,或者所述乙型肝炎疫苗在小鼠中可以于35天使得应答抗体浓度超过18ug/ml。具体的,野生型C57BL/6小鼠中,在500pmol抗原剂量,30ugCpG佐剂剂量,皮下免疫2次,间隔2周的情况下,可以在初次免疫后第14天使得应答抗体浓度达到约0.6ug/ml,第21天使得应答抗体浓度达到约12ug/ml,第35天使得应答抗体浓度达到约22ug/ml。

[0038] 在一些实施例中,所述乙型肝炎疫苗在慢性乙型肝炎感染小鼠模型中可以引发针对preS1的抗体应答;优选的,所述乙型肝炎疫苗在AAV-HBV1.3制备的慢性感染小鼠中,在500pmol抗原剂量,30 μ g CpG佐剂剂量,皮下免疫3次,间隔2周的情况下,可以在初次免疫后第14天使得应答抗体浓度达到约2.8ug/ml,第28天使得应答抗体浓度达到约15ug/ml,第42天使得应答抗体浓度达到约38ug/ml。

[0039] 本申请另一个方面提供了一种编码融合蛋白的核酸分子,其可以编码以上所述的融合蛋白。具体的,所述核酸分子可以包括乙肝病毒表面抗原肽段的编码核酸序列、连接子核酸序列和铁蛋白的编码核酸序列。在一些实施例中,所述的核酸分子的核酸序列与SEQ ID NO:4有至少99%,98%,或95%的相似性;优选的,所述核酸分子的核酸序列为SEQ ID NO:4。

[0040] 本申请另一个方面提供了一种包含融合蛋白的纳米颗粒的制备方法,包括在细胞或体外系统中表达所述的核酸分子。在一些实施例中,可以在细菌细胞中表达所述的核酸分子。

[0041] 本申请另一个方面提供了一种用于制备预防或治疗乙型肝炎的药物组合物,其包括所述的乙型肝炎疫苗。

[0042] 本申请另一个方面提供了一种重组细胞,其包含可以编码所述的融合蛋白的核酸分子。例如,包含可以编码所述的融合蛋白的核酸分子的BL21(DE3)pLysS E.coli感受态细

胞。

菌株

[0043] DH5 α E.coli菌株为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α ,参考文献为Sambrook,J., Fritsch,E.F.and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[0044] BL21 (DE3) pLysS *E. coli*感受态细胞菌株为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) pLysS,参考文献为Sambrook,J.,Fritsch,E.F.and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[0045] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂公司购买得到的。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

实施例1、preS1-Ferritin的构建和生产

[0046] 材料:1.菌种:DH5 α E.coli、BL21 (DE3) pLysS *E. coli*感受态细胞均购自北京全式金生物技术有限公司。2.质粒:pDEST14,。3.基因片段:Ferritin基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成,preS1基因根据GenBank参考序列KX470733.1,由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

[0047] 方法:

[0048] 1.pDEST14-preS1-Ferritin表达载体的构建。分别设计两端带酶切位点的引物,利用PCR进行扩增。preS1肽段编码序列的扩增引物的核酸序列为SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6。铁蛋白编码序列的扩增引物的核酸序列为SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8。扩增后的preS1肽段编码序列和铁蛋白编码序列与pDEST14表达质粒分别进行双酶切、琼脂糖凝胶回收,按pDEST14载体:preS1肽段编码序列:铁蛋白编码序列的摩尔比值为1:5:5的比例在T4连接酶作用下于16 $^{\circ}$ C连接过夜。将连接产物转化DH5 α E.coli感受态细胞筛选连接正确的克隆。

[0049] 2.pDEST14-preS1-Ferritin的表达

[0050] 将构建成功的pDEST14-preS1-Ferritin质粒转化到BL21 (DE3) pLysS *E. coli*感受态细胞中,42 $^{\circ}$ C热击45s,再将感受态细胞涂于带有氨苄西林 (Ampicillin) 抗性的LB固体培养平板上。长出单克隆后挑取阳性克隆于5ml LB (Amp+) 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 220rpm培养过夜,此时OD600约为2。将菌液1:50稀释到大体积LB (Amp+) 液体培养基中,相同条件继续培养1.5-2h,此时OD600约为0.6。加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为0.3mM,继续于37 $^{\circ}$ C诱导5-6h后6000rpm离心5分钟收集菌体。

[0051] 结果:经过克隆构建和筛选获得序列正确的pDEST14-preS1-Ferritin表达载体,经过试表达,筛选出最优的诱导条件和表达菌株。preS1-Ferritin的表达量约每升菌液15mg。

实施例2、pDEST14-preS1-Ferritin的纯化和表征

[0052] 1.粗纯。诱导结束的菌体用缓冲液一即20mM Tris-HCl,50mM NaCl,PH=7.5重悬,以超声仪30%的功率进行超声破碎,每超声5s即冷却5s,一共超声15min,约90个循环。12000rpm离心15min弃上清,再用缓冲液二即20mM Tris-HCl,50mM NaCl,PH=9.5重悬沉

淀。充分重悬后再次12000rpm离心15min,收集上清。用0.22 μ m滤器过滤上清除去沉淀等杂质,此时上清中大部分蛋白即为目的蛋白。

[0053] 2.凝胶过滤柱纯化。用20mM Tris-HCl、50mM NaCl,pH=9.5缓冲液平衡Superose6 Increase凝胶过滤柱,上0.5ml过0.22 μ m滤膜后的蛋白粗纯液,继续用20mM Tris-HCl、50mM NaCl,PH=9.5缓冲液平衡洗脱凝胶过滤柱,全程用0.5ml/min的流速,收集12.5ml左右的洗脱峰。蛋白的生化特征用SDS-PAGE电泳分析。

[0054] 3.透射电子显微镜观察preS1-Ferritin纳米颗粒形态。将纯化后的preS1-Ferritin滴于带有支持膜的铜网上,放置数分钟后用滤纸从铜网边缘吸去多余液体,滴上染色液染色1-2分钟,滤纸吸去染液,待干燥后即可电镜观察。

[0055] 结果:蛋白粗提液经过简单的沉淀重悬后,大部分的杂蛋白都被除去。如图1所示,经过Superose6 Increase凝胶过滤柱洗脱,preS1-Ferritin的主峰在12.5ml位置。如图2所示,SDS-PAGE电泳结果显示纯化后蛋白条带位置与预测蛋白大小基本相符(32.9kDa)。如图3所示,透射电镜结果表示纯化后preS1-Ferritin均为大小均一,结构、形态稳定的纳米颗粒结构,直径在20nm左右。

实施例3、preS1-Ferritin等疫苗引起的抗体应答检测

[0056] 材料:辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG购自中杉金桥公司。TLR9配体鼠CpG-B佐剂(ODN1826,5'-tccatgacgttcctgacgtt-3',全部核苷酸均为硫代修饰)由上海捷瑞生物工程有限公司合成。C57BL/6雌性小鼠(6-8周)购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

[0057] 方法:

[0058] 1.preS1-Ferritin等纳米疫苗免疫小鼠。将500pmol(按单体计算)的preS1-Ferritin疫苗或500pmol SC-preS1对照疫苗一或500pmol preS1-SC-ST-Ferritin对照疫苗二分别皮下免疫8周龄C57BL/6小鼠,以30 μ g(按单体计算)TLR9配体CpG为佐剂,用PBS稀释至每只小鼠100 μ l免疫体系。其中,SC-preS1对照疫苗是指包含SpyCatcher-preS1连接蛋白的疫苗;preS1-SC-ST-铁蛋白对照疫苗是指包含preS1-SpyCatcher-SpyTag-铁蛋白连接蛋白的疫苗。在初次免疫第14天后通过眼静脉取血检测抗体应答水平,同时再次给予相同剂量的免疫,然后在第21天和35天再次取血检测(图4)。

[0059] 2.ELISA检测血清中针对preS1的特异性抗体水平。包被液(PBS溶液)稀释preS1蛋白至5 μ g/ml,每孔加入50 μ l,4 $^{\circ}$ C过夜。用PBS洗板3次,加入封闭液(含5%FBS的PBS溶液),每孔280 μ l,室温放置2h以上。用含5%FBS的PBS溶液稀释血清样品(1:10,1:100,1:1000,1:10000),每孔加50 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育1.5h。用PBST洗5次,每次280 μ l。用含5%FBS的PBS溶液稀释二抗HRP标记的山羊抗鼠IgG(1:5000),每孔加50 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育1h。再次用PBST洗5次,每孔280 μ l。加底物TMB 50 μ l/孔,室温避光孵育,等待底物显色。待底物显色完全后每孔加25 μ l终止液(2N H₂SO₄)终止显色,酶标仪读板检测450nm和630nm下的光吸收值。

[0060] 结果:SC-preS1抗原免疫原性较弱,即使联合CpG佐剂也基本不能引起抗体应答。如图5所示,相较于SC-preS1疫苗,preS1-SC-ST-Ferritin疫苗和preS1-Ferritin疫苗均能引起更强的抗体应答。其中,preS1-Ferritin疫苗在初次免疫的第14天的抗体应答便强于SC-preS1疫苗或preS1-SC-ST-Ferritin疫苗引起的抗体应答,且均存在显著性差异。在第21天和35天(两次免疫后),preS1-Ferritin疫苗引起的抗体应答也是最强的。

[0061] 实施例4、preS1-Ferritin等疫苗在HBV耐受小鼠模型中引起的抗体应答检测

[0062] 材料:C57BL/6雄性小鼠(3-4周)购于北京维通利华实验动物技术有限公司。AAV-HBV1.3购自北京五加和分子医学研究所有限公司。其他实验材料同实施案例3。

[0063] 方法:

[0064] 1.HBV耐受小鼠模型的构建。购买3-4周龄的雄性C57BL/6小鼠,尾静脉注射 1×10^{10} vg AAV-HBV1.3病毒,感染后每周采血检测血清中preS1、HBsAg、HBeAg的含量,连续检测5周,选取能够持续检测到抗原的稳定感染的小鼠。

[0065] 2.preS1-Ferritin等纳米疫苗免疫小鼠及preS1的特异性抗体水平检测。AAV-HBV1.3病毒感染第35天,选取稳定感染的小鼠进行分组。尾基部皮下免疫500pmol preS1-Ferritin疫苗或等摩尔量的对照疫苗或PBS,疫苗免疫时联合使用30 μ g CpG佐剂。每两周免疫一次,连续免疫三次(图8)。每两周采集小鼠的血清,ELISA检测血清中anti-preS1抗体水平。

[0066] 结果:在HBV耐受的小鼠模型中,preS1-Ferritin疫苗在免疫两次后即可引起相较于SC-preS1疫苗或preS1-SC-ST-Ferritin疫苗显著增强的抗体应答,preS1-SC-ST-Ferritin疫苗需免疫三次后才可产生相当水平的抗体应答,而SC-preS1疫苗引起的anti-preS1抗体水平始终较低(图9)。

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 基于铁蛋白与 preS1 抗原基因融合表达的疫苗

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus)

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 174

<212> PRT

<213> 强烈炽热球菌(Pyrococcus furiosus)

<400> 2

```

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

```

Glu Leu Tyr Ser Ala Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Ala Ala Tyr Phe Glu
 20 25 30
 Asp Leu Gly Leu Glu Gly Phe Ala Asn Trp Met Lys Ala Gln Ala Glu
 35 40 45
 Glu Glu Ile Gly His Ala Leu Arg Phe Tyr Asn Tyr Ile Tyr Asp Arg
 50 55 60
 Asn Gly Arg Val Glu Leu Asp Glu Ile Pro Lys Pro Pro Lys Glu Trp
 65 70 75 80
 Glu Ser Pro Leu Lys Ala Phe Glu Ala Ala Tyr Glu His Glu Lys Phe
 85 90 95
 Ile Ser Lys Ser Ile Tyr Glu Leu Ala Ala Leu Ala Glu Glu Glu Lys
 100 105 110
 Asp Tyr Ser Thr Arg Ala Phe Leu Glu Trp Phe Ile Asn Glu Gln Val
 115 120 125
 Glu Glu Glu Ala Ser Val Lys Lys Ile Leu Asp Lys Leu Lys Phe Ala
 130 135 140
 Lys Asp Ser Pro Gln Ile Leu Phe Met Leu Asp Lys Glu Leu Ser Ala
 145 150 155 160
 Arg Ala Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Met Gln Gly Gly Glu
 165 170

<210> 3

<211> 298

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

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

Arg Met Leu Lys Ala Leu Asn Asp Gln Leu Asn Arg Glu Leu Tyr Ser
 130 135 140
 Ala Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Ala Ala Tyr Phe Glu Asp Leu Gly Leu
 145 150 155 160
 Glu Gly Phe Ala Asn Trp Met Lys Ala Gln Ala Glu Glu Glu Ile Gly
 165 170 175
 His Ala Leu Arg Phe Tyr Asn Tyr Ile Tyr Asp Arg Asn Gly Arg Val
 180 185 190
 Glu Leu Asp Glu Ile Pro Lys Pro Pro Lys Glu Trp Glu Ser Pro Leu
 195 200 205
 Lys Ala Phe Glu Ala Ala Tyr Glu His Glu Lys Phe Ile Ser Lys Ser
 210 215 220
 Ile Tyr Glu Leu Ala Ala Leu Ala Glu Glu Glu Lys Asp Tyr Ser Thr
 225 230 235 240
 Arg Ala Phe Leu Glu Trp Phe Ile Asn Glu Gln Val Glu Glu Glu Ala
 245 250 255
 Ser Val Lys Lys Ile Leu Asp Lys Leu Lys Phe Ala Lys Asp Ser Pro
 260 265 270
 Gln Ile Leu Phe Met Leu Asp Lys Glu Leu Ser Ala Arg Ala Pro Lys
 275 280 285
 Leu Pro Gly Leu Leu Met Gln Gly Gly Glu
 290 295

- <210> 4
- <211> 897
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4
 atggggcaga atctttccac cagcaatcct ctgggattct tccccacca ccagttggat 60
 ccagccttca gagcaaacac agcaaatcca gattgggact tcaatcccaa caaggacacc 120
 tggccagacg ccaacaaggt aggagctgga gcattcgggc tgggtttcac cccaccgcac 180
 ggaggccttt tgggggtggag ccctcaggct cagggcatac taaaaacttt gccagcaaat 240
 cgcctcctg cctccaccaa tcgccagaca ggaaggcagc ctaccccgt gtctccacct 300
 ttgagaaaca ctcatectca ggccgaattc ggcggtggtg gcagcggcgg tgggtggcagc 360
 ggcggtggtg gcagcctgag cgagcgtatg ctgaaagccc tgaatgacca gctgaaccgc 420
 gaactgtata gcgcctacct gtacttcgcc atggcagcct atttcgagga tctgggcctg 480
 gaaggctttg ccaattggat gaaagcccaa gccgaagaag aaattggcca cgcctgcmc 540
 tttfacaact acatctatga tcgcaatggc cgcgtggaac tggacgaaat cccgaaaccg 600
 ccgaaagaat gggaaagccc gctgaaagcc ttcgaggccc cctatgaaca tgaaaaattt 660
 attagcaaaa gcatttatga actggccgcc ctggccgagg aagaaaagga ctatagcacc 720
 cgccgattcc tggagtgggt catcaatgag caggtggaag aagaagctag cgtgaaaaag 780
 atctctggaca aactgaaatt cgccaaggac agccccgaga tctgttcat gctggataag 840

gagctgagcg cacgtgcccc gaaactgccg ggtctgctga tgcagggtgg tgaataa	925
<210> 5	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 5	
ggaattccat atggggcaga atctttccac cagc	34
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 6	
ccggaattcg gcctgaggat gagtgtttct	30
<210> 7	
<211> 74	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 7	
ccggaattcg gcggtggtgg cagcggcggg ggtggcagcg ggggtggtggc agcctgagcg agcgtatgct gaaa	60 76
<210> 8	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<400> 8	
cgagctctta ttaccaccc tgcacag	28

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 基于铁蛋白与preS1抗原基因融合表达的疫苗

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus)

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 174

<212> PRT

<213> 强烈炽热球菌 (Pyrococcus furiosus)

<400> 2

```

Met Leu Ser Glu Arg Met Leu Lys Ala Leu Asn Asp Gln Leu Asn Arg
1           5           10           15
Glu Leu Tyr Ser Ala Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Ala Ala Tyr Phe Glu
           20           25           30
Asp Leu Gly Leu Glu Gly Phe Ala Asn Trp Met Lys Ala Gln Ala Glu
           35           40           45
Glu Glu Ile Gly His Ala Leu Arg Phe Tyr Asn Tyr Ile Tyr Asp Arg
           50           55           60
Asn Gly Arg Val Glu Leu Asp Glu Ile Pro Lys Pro Pro Lys Glu Trp

```

65	70	75	80
Glu Ser Pro Leu Lys Ala Phe Glu Ala Ala Tyr Glu His Glu Lys Phe			
	85	90	95
Ile Ser Lys Ser Ile Tyr Glu Leu Ala Ala Leu Ala Glu Glu Glu Lys			
	100	105	110
Asp Tyr Ser Thr Arg Ala Phe Leu Glu Trp Phe Ile Asn Glu Gln Val			
	115	120	125
Glu Glu Glu Ala Ser Val Lys Lys Ile Leu Asp Lys Leu Lys Phe Ala			
	130	135	140
Lys Asp Ser Pro Gln Ile Leu Phe Met Leu Asp Lys Glu Leu Ser Ala			
145	150	155	160
Arg Ala Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Met Gln Gly Gly Glu			
	165	170	
<210> 3			
<211> 298			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<400> 3			
Met Gly Gln Asn Leu Ser Thr Ser Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp			
1	5	10	15
His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Arg Ala Asn Thr Ala Asn Pro Asp Trp			
	20	25	30
Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Thr Trp Pro Asp Ala Asn Lys Val Gly			
	35	40	45
Ala Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu			
	50	55	60
Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Gln Thr Leu Pro Ala Asn			
65	70	75	80
Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Thr Gly Arg Gln Pro Thr Pro			
	85	90	95
Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asn Thr His Pro Gln Ala Glu Phe Gly Gly			
	100	105	110
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Ser Glu			
	115	120	125
Arg Met Leu Lys Ala Leu Asn Asp Gln Leu Asn Arg Glu Leu Tyr Ser			
	130	135	140
Ala Tyr Leu Tyr Phe Ala Met Ala Ala Tyr Phe Glu Asp Leu Gly Leu			
145	150	155	160
Glu Gly Phe Ala Asn Trp Met Lys Ala Gln Ala Glu Glu Glu Ile Gly			

	165		170		175										
His	Ala	Leu	Arg	Phe	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Arg	Asn	Gly	Arg	Val
	180		185		190										
Glu	Leu	Asp	Glu	Ile	Pro	Lys	Pro	Pro	Lys	Glu	Trp	Glu	Ser	Pro	Leu
	195		200		205										
Lys	Ala	Phe	Glu	Ala	Ala	Tyr	Glu	His	Glu	Lys	Phe	Ile	Ser	Lys	Ser
	210		215		220										
Ile	Tyr	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Asp	Tyr	Ser	Thr
225			230		235										
Arg	Ala	Phe	Leu	Glu	Trp	Phe	Ile	Asn	Glu	Gln	Val	Glu	Glu	Glu	Ala
	245		250		255										
Ser	Val	Lys	Lys	Ile	Leu	Asp	Lys	Leu	Lys	Phe	Ala	Lys	Asp	Ser	Pro
	260		265		270										
Gln	Ile	Leu	Phe	Met	Leu	Asp	Lys	Glu	Leu	Ser	Ala	Arg	Ala	Pro	Lys
	275		280		285										
Leu	Pro	Gly	Leu	Leu	Met	Gln	Gly	Gly	Glu						
	290		295												

<210> 4

<211> 897

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

```

atggggcaga atctttccac cagcaatcct ctgggattct ttcccgacca ccagttggat 60
ccagccttca gagcaaacac agcaaatcca gattgggact tcaatcccaa caaggacacc 120
tggccagacg ccaacaaggt aggagctgga gcattcgggc tgggtttcac cccaccgcac 180
ggaggccttt tggggtggag ccctcaggct cagggcatac taaaacttt gccagcaaat 240
ccgcctcctg cctccaccaa tcgccagaca ggaaggcagc ctaccccgct gtctccacct 300
ttgagaaaca ctcatcctca ggccgaattc ggcggtggtg gcagcggcgg tgggtggcagc 360
ggcgggtggtg gcagcctgag cgagcgtatg ctgaaagccc tgaatgacca gctgaaccgc 420
gaactgtata ggcctacct gtacttcgcc atggcagcct atttcgagga tctgggcctg 480
gaaggctttg ccaattggat gaaagcccaa gccgaagaag aaattggcca cgccctgcgc 540
ttttacaact acatctatga tcgcaatggc cgcgtggaac tggacgaaat cccgaaaccg 600
ccgaaagaat gggaaagccc gctgaaagcc ttcgaggccg cctatgaaca tgaaaaattt 660
attagcaaaa gcatttatga actggccgcc ctggccgagg aagaaaagga ctatagcacc 720
cgcgcattcc tggagtgggt catcaatgag caggtggaag aagaagctag cgtgaaaaag 780
atcctggaca aactgaaatt cgccaaggac agcccgcaga tctgttcat gctggataag 840
gagctgagcg cacgtgcccc gaaactgccg ggtctgctga tgcagggtgg tgaataa 925

```

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

ggaattccat atggggcaga atctttccac cagc 34

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

ccggaattcg gcctgaggat gagtgtttct 30

<210> 7

<211> 74

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

ccggaattcg gcggtggtgg cagcggcggg ggtggcagcg ggggtggtggc agcctgagcg 60

agcgtatgct gaaa 76

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 8

cgagctctta ttcaccaccc tgcatcag 28

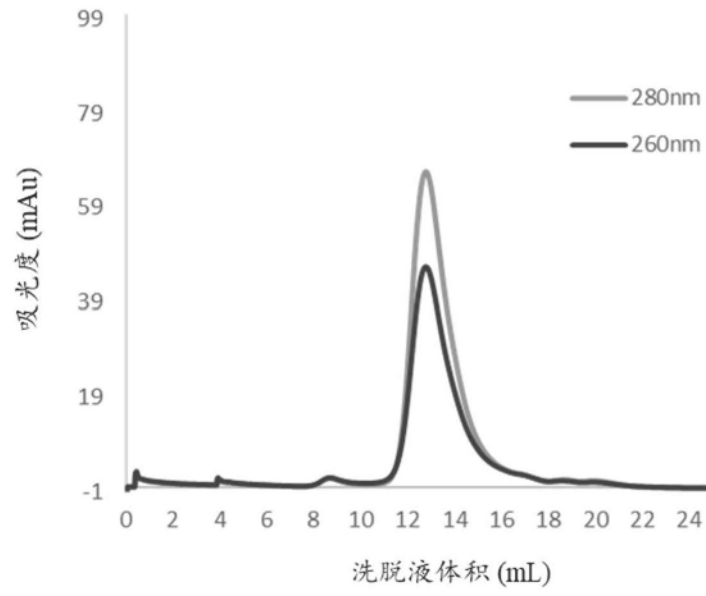


图1

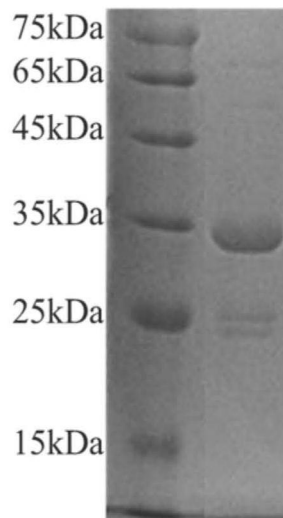


图2

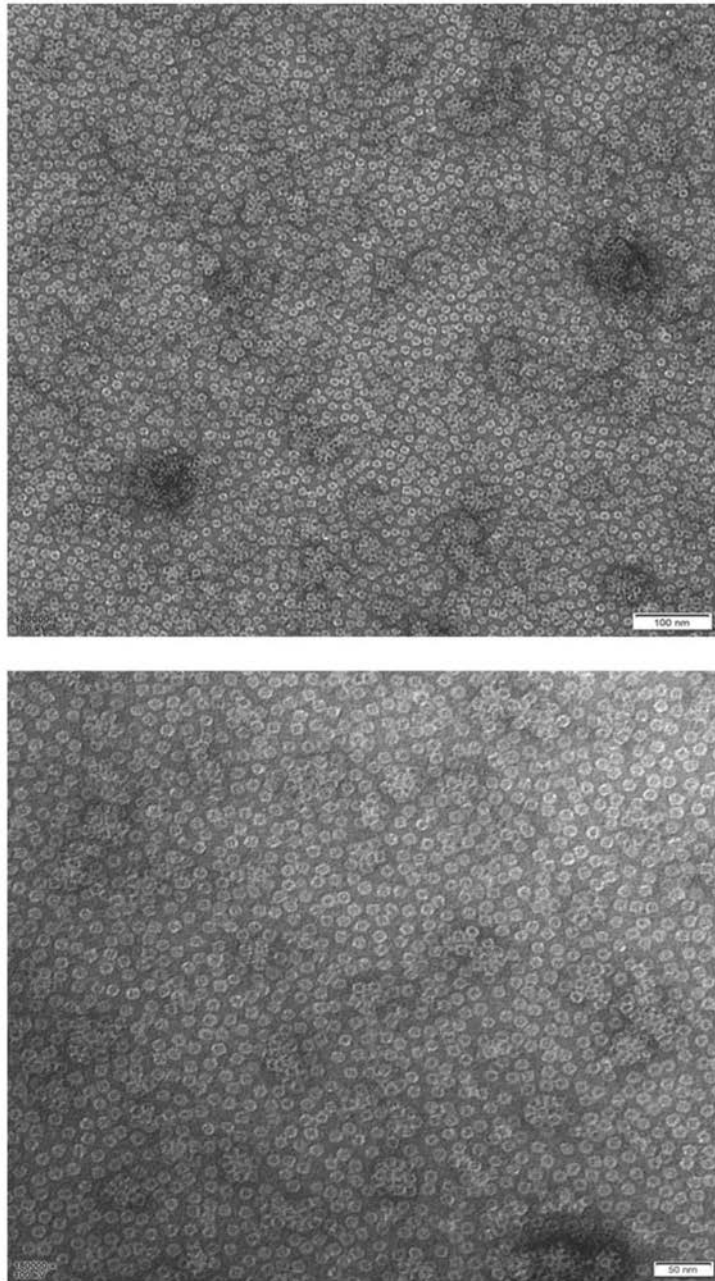


图3

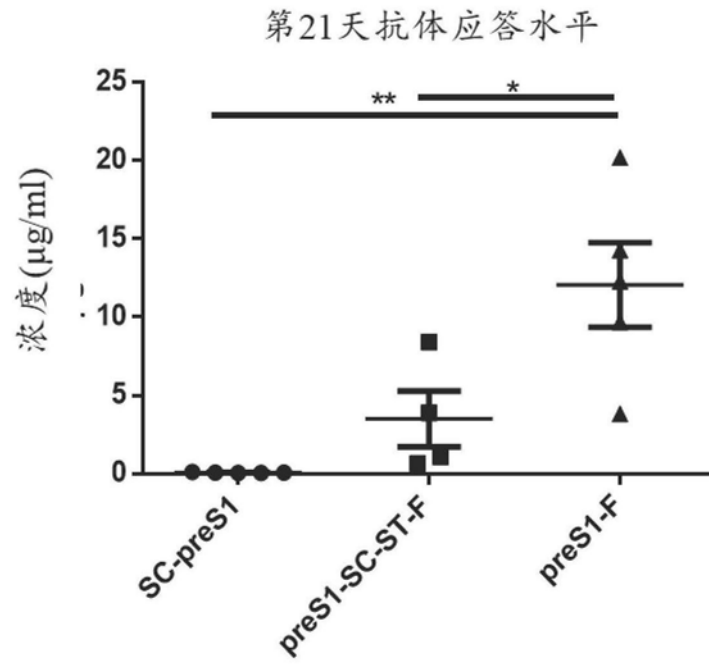


图6

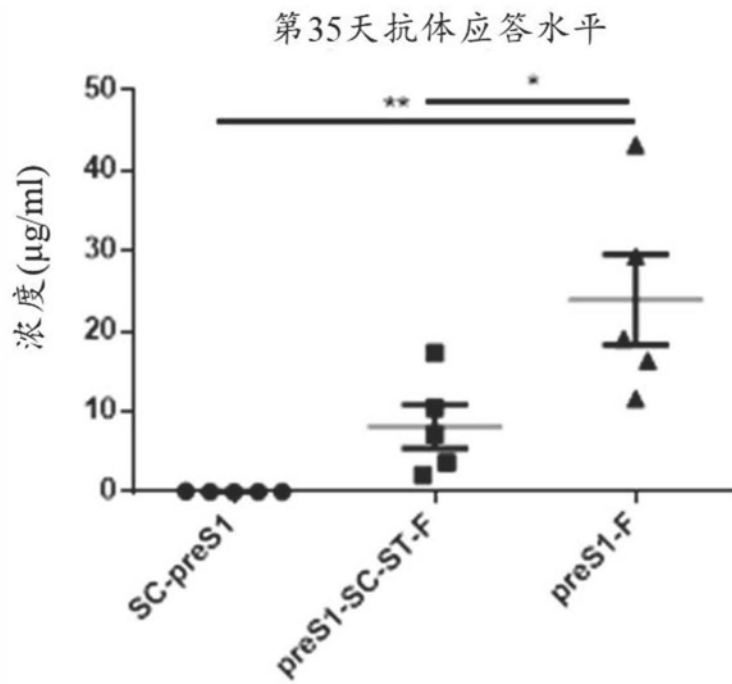


图7

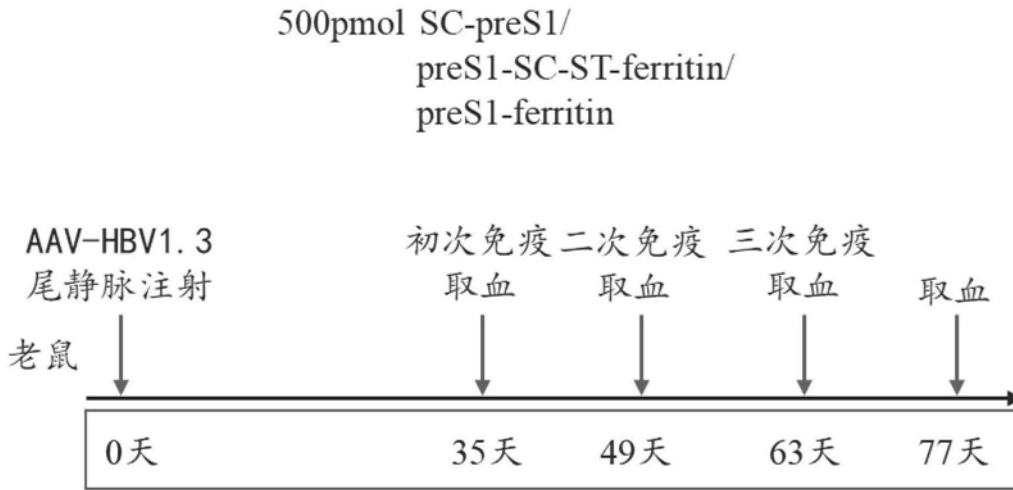


图8

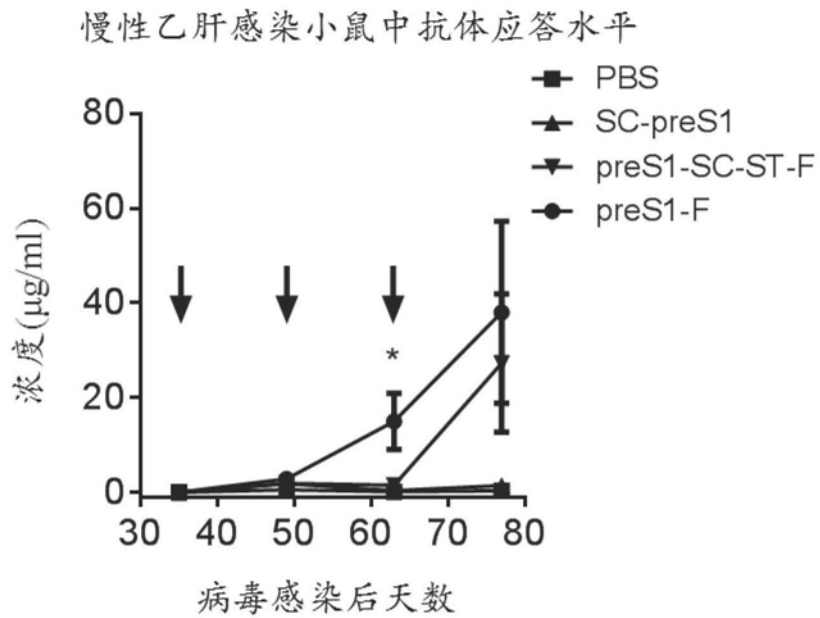


图9