(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-525613
(P2004-525613A)
(43)公表日　平成16年8月26日(2004.8.26)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	A	4B024
A61K 38/00	A61K 39/29		4B065
A61K 39/29	A61K 39/295		4C084
A61K 39/295	A61P 1/16		4C085
A61P 1/16	A61P 31/12		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 139 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-542994(P2002-542994)
(86)(22)出願日　平成13年9月30日(2001.9.30)
(85)翻訳文提出日　平成15年3月28日(2003.3.28)
(86)国際出願番号　PCT/CN2001/001469
(87)国際公開番号　WO2002/040681
(87)国際公開日　平成14年5月23日(2002.5.23)
(31)優先権主張番号　00 1 30634.0
(32)優先日　平成12年9月30日(2000.9.30)
(33)優先権主張国　中国(CN)

(71)出願人　502108396
ヤン　シェン　タン　イオン　シィエン　クゥオン　ス
中国　ハイナン、ハイコウ　シティ、ジンパン　インダストリィ　ゾーン、ジンニウ　ロード　６
(74)代理人　100066692
弁理士　浅村　皓
(74)代理人　100072040
弁理士　浅村　肇
(74)代理人　100088926
弁理士　長沼　暉夫
(74)代理人　100102897
弁理士　池田　幸弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｅ型肝炎ウイルスのポリペプチド断片、それを含むワクチン組成物及び診断キット、並びにその使用

(57)【要約】
本発明は、配列番号１で示す、Ｅ型肝炎ウイルスＯＲＦ－２のアミノ酸配列を含むｎ量体のポリペプチド、またはその断片に関するものであり、ｎは２～１８０の整数である。また本発明は、前記断片をインフルエンザウイルスの赤血球凝集素の保存断片と融合させたキメラポリペプチド、および前記断片とＥ型肝炎ウイルスＯＲＦ３のエピトープポリペプチドもしくはその免疫原性活性断片との共有結合、および上記のポリペプチドをコードするＤＮＡ分子を含む発現ベクター、発現ベクターを含む発現宿主に関する。また本発明は、ワクチン組成物、および上記の前記ＨＥＶポリペプチドを含むＨＥＶ感染診断用キット、ならびにＩｇＧ、ＩｇＭ、および全抗体を含む診断キット、およびＨＥＶ感染を予防、診断、および／または治療するためのその使用に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｎ重合体ポリペプチド（ｎは１～１８０の整数である）の形の、配列番号１で示す、Ｅ型肝炎ウイルスのＯＲＦ２のアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその断片であって、前記の配列番号１で示すＥ型肝炎ウイルスＯＲＦ２又はその断片のアミノ酸を含むポリペプチドが、
１）アミノ末端がアミノ酸残基１１３と４６９の間から出発し、カルボキシル末端がアミノ酸残基５９６と６６０の間で終結しているポリペプチド、
２）アミノ末端がアミノ酸残基３７０と４６９の間から出発し、カルボニル末端がアミノ酸残基６０１と６２８の間で終結しているポリペプチド、
３）アミノ末端がアミノ酸残基３９０と４５９の間から出発し、カルボキシル末端がアミノ酸残基６０１と６１０の間で終結しているポリペプチド、
４）配列番号１のアミノ酸残基４１４～６６０のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２４７、
５）配列番号１のアミノ酸残基４２９～６６０のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２３２、
６）配列番号１のアミノ酸残基４３９～６６０のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２２２、
７）配列番号１のアミノ酸残基４５９～６６０のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２０１、
８）配列番号１のアミノ酸残基３９４～６２８のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２３５Ｎ、
９）配列番号１のアミノ酸残基３９４～６１８のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２２５Ｎ、
１０）配列番号１のアミノ酸残基３９４～６０２のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２０９Ｎ、
１１）配列番号１のアミノ酸残基３９４～６０１のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２０８Ｎ、
１２）配列番号１のアミノ酸残基３９４～６０６のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチドＮＥ２Ｉ、
１３）配列番号１のアミノ酸残基３９０～６０３のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２１７Ｄ、
１４）配列番号１のアミノ酸残基３７４～６１８のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２０５、
１５）配列番号１のアミノ酸残基４１４～６０２のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド１８９、
１６）配列番号１のアミノ酸残基４１４～６０１のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド１８８、
１７）配列番号１のアミノ酸残基４５９～６２８のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び
１８）Ｎ末端にＭｅｔが付加され、Ｃ末端の３’末端上のアミノ酸残基６０３のＰｒｏにおいて、５’～３’方向にアミノ酸配列－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇが付加されてＣ末端が修飾されている、配列番号１のアミノ酸残基Ｘ～６０３のアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、
ａ）Ｘがアミノ酸残基３９４である場合の、配列番号２で示す前記ポリペプチド、すなわちＮＥ２、
ｂ）Ｘがアミノ酸残基４１４である場合の、配列番号３で示す前記ポリペプチド、すなわち１９３Ｃ、
ｃ）Ｘがアミノ酸残基４２９である場合の、配列番号４で示す前記ポリペプチド、すなわち１７８Ｃ、

ｄ）Ｘがアミノ酸残基４３９である場合の、配列番号７で示す前記ポリペプチド、すなわち１６８Ｃ、
ｅ）Ｘがアミノ酸残基４４９である場合の、配列番号８で示す前記ポリペプチド、すなわち１５８Ｃ、
ｆ）Ｘがアミノ酸残基４５９である場合の、配列番号９で示す前記ポリペプチド、すなわち１４８Ｃ、
ｇ）Ｘがアミノ酸残基４６９である場合の、配列番号１０で示す前記ポリペプチド、すなわち１３８Ｃが含まれるもの、
１９）上の１）から１８）の前述のポリペプチドのいずれか１つとの相同性が少なくとも８０％であり、抗原性や免疫原性など、生物学的特性がほぼ同一であるポリペプチドからなる群から選択されているポリペプチド。

【請求項２】
請求項１に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクター。

【請求項３】
請求項１に記載のポリペプチドを発現させることのできる、請求項２に記載の組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞。

【請求項４】
少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチドもしくはその任意の組合せ、及び場合により薬剤として許容される賦形剤及び／もしくはアジュバントを含む、哺乳動物のＥ型肝炎ウイルス感染を予防及び／又は治療するためのワクチン組成物。

【請求項５】
請求項１に記載のポリペプチド及びインフルエンザウイルス由来の赤血球凝集素抗原の保存断片を含むキメラタンパク質。

【請求項６】
請求項５に記載のキメラタンパク質、及び任意選択で薬剤として許容される賦形剤及び／もしくはアジュバントを含む、哺乳動物のＥ型肝炎ウイルス感染を予防及び／又は治療するためのワクチン組成物。

【請求項７】
哺乳動物にワクチン接種を施してＥ型肝炎ウイルス感染を予防するための、請求項１に記載のポリペプチド又は請求項５に記載のキメラタンパク質。

【請求項８】
哺乳動物にワクチン接種を施してＥ型肝炎ウイルス感染を予防するための、請求項４又は請求項６に記載のワクチン組成物の使用。

【請求項９】
哺乳動物のＥ型肝炎ウイルス感染を予防及び／又は治療する方法であって、対象に予防及び／又は治療に有効な量の請求項１に記載のポリペプチド又は請求項５に記載のキメラタンパク質を投与することを含む方法。

【請求項１０】
診断に有効な量の少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチド又はその任意の組合せを含む、生物検体のＥ型肝炎ウイルス感染を診断する診断キット。

【請求項１１】
Ｅ型肝炎ウイルスＯＲＦ３からの免疫原性エピトープを含むポリペプチド又はその免疫原性断片をさらに含み、前記のＥ型肝炎ウイルスＯＲＦ３由来の免疫原性エピトープを含む前記ポリペプチド又はその免疫原性断片が、場合により請求項１に記載の選択されたポリペプチドに共有結合している請求項１０に記載の診断キット。

【請求項１２】
少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチドを含み、所望であれば、前記ポリペプチドが適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出対象の生物検体のＩｇＧに指向性のある検出可能に標識された抗体抗ＩｇＧ、及び前記の検出可能な標識に合致する

検出剤を含み；所望であれば、適切な緩衝系をさらに含む、生物検体中のＥ型肝炎ウイルスに対する抗体ＩｇＧを判定するための請求項１０又は請求項１１に記載の診断キット。
【請求項１３】
検出対象の生物検体のＩｇＭに指向性のある捕捉抗体としての、検出可能に標識した抗体抗ＩｇＭを含み、所望であれば、前記捕捉抗体が、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出可能に標識された少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチド、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；所望であれば、適切な緩衝系をさらに含む、生物検体中のＥ型肝炎ウイルスに対する抗体ＩｇＭを判定するための請求項１０又は請求項１１に記載の診断キット。
【請求項１４】
少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチドを含み、望むなら、前記ポリペプチドが、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出可能に標識された少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチド、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；請求項１に記載のポリペプチドから選択された、支持体表面に予め塗布するための前記ポリペプチド、及び請求項１に記載のポリペプチドから選択された検出可能な標識ポリペプチドが同じポリペプチドでも異なるものでもよい、生物検体中のＥ型肝炎ウイルスに対する全抗体を判定するための請求項１０又は請求項１１に記載の診断キット。
【請求項１５】
抗原と抗体の相互作用に適する条件下、請求項１０又は請求項１１に記載の診断キットと検出対象の哺乳動物の検体とを接触させることを含む、哺乳動物のＥ型肝炎ウイルス感染を診断する方法。
【請求項１６】
生物検体中のＥ型肝炎ウイルスに対する全抗体を検出する方法であって、支持体表面上に少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチドを固定化するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体を接触させるステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；及び検出可能な標識を有するＥ型肝炎ウイルス抗原及び対応する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原／抗体複合体を検出するステップを含む方法。
【請求項１７】
生物検体においてＥ型肝炎ウイルスに対する抗体ＩｇＧを検出する方法であって、支持体表面上に少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチドを固定化するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体を接触させるステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；及びＥ型肝炎ウイルスに対する検出可能に標識した抗体抗ＩｇＧ及び対応する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原／抗体複合体を検出するステップを含む方法。
【請求項１８】
生物検体においてＥ型肝炎ウイルスに対する抗体ＩｇＭを検出する方法であって、支持体表面上に抗体抗ＩｇＭを固定化するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体を接触させるステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；及び検出可能に標識した少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチド及び対応する検出剤を使用して、支持体表面上の抗ＩｇＭ／ＩｇＭ複合体を検出するステップを含む方法。
【請求項１９】
生物検体においてＥ型肝炎ウイルスに対する抗体ＩｇＭを検出する方法であって、支持体表面上に抗体抗ＩｇＭを固定化するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体を接触させるステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；次いで抗原と抗体の相互作用に適する条件下、少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチドを接触させるステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；及び、次いで検出可能に標識した抗ＨＥＶ多クローンもしくは単クローン抗体及び対応する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原／抗体複合体を検出するステップを含む方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】

（発明の分野）
本発明は、Ｎ重合体ポリペプチド（Ｎは１～１８０の整数である）の形の、配列番号１で示す、Ｅ型肝炎ウイルスのＯＲＦ２のアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその断片；本発明のポリペプチドとインフルエンザウイルス由来赤血球凝集素抗原の保存断片とからなるキメラタンパク質；Ｅ型肝炎ウイルスＯＲＦ３由来のエピトープを含むポリペプチド又はその免疫原性断片に結合した本発明のポリペプチド；上記のポリペプチドをコードするＤＮＡ分子を含む組換え発現ベクター、及び本発明のポリペプチドを発現させることのできる、前記組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞に関する。
【０００２】
本発明はさらに、上述のポリペプチドを含む、Ｅ型肝炎ウイルスに対処するワクチン組成物、又はＥ型肝炎ウイルス用のＩｇＧ、ＩｇＭ、もしくは全抗体診断キットを含めて、上述のポリペプチドを含むＥ型肝炎ウイルス感染用診断キット、並びにＥ型肝炎ウイルス感染の予防、診断、及び／もしくは治療のための、ワクチン組成物及び診断キットの使用に関する。
【０００３】
（発明の背景）
Ｅ型肝炎ウイルス（ＨＥＶ）は、経腸的に伝染した非Ａ非Ｂ型肝炎の病原体として１９８３年に最初に確認された（Ｂａｌａｙａｎ等、１９８３年、Ｉｎｔｅｒｖｉｒｏｌｏｇｙ第２０巻：２３ページ、）。Ｅ型肝炎は、主に、アジア、アフリカ、中央アメリカの開発途上国に特有である。先進国でのＥ型肝炎の症例は、ほとんど外国からの移民又は旅行者に見られた。散発性の症例も大規模な流行も報告されている。１９５０年代から１９９０年代の期間に、飲料水の汚染のために、Ｅ型肝炎の数件の大発生が連続して起こった（Ｖｉｓｖａｎａｔｈａｎ、１９５７年、Ｉｎｄｉａｎ Ｊ．Ｍｅｄ．Ｒｅｓ．Ｓｕｐｐｌ．第４５巻：１～３０ページ；Ｗｏｎｇ等、１９８０年、Ｌａｎｃｅｔ．第２巻：８８２～８８５ページ；Ｍｙｉｎｔ等、１９８５年、Ａｍ Ｊ Ｔｒｏｐ Ｍｅｄ Ｈｙｇ．第３４：１１８３～１１８９ページ；Ｂｅｌａｂｂｅｓ等、１９８５年、Ｊ Ｍｅｄ Ｖｉｒｏｌ．第１６巻：２５７～２６３ページ；Ｈａｕ等、１９９９年、Ａｍ Ｊ Ｔｒｏｐ Ｍｅｄ Ｈｙｇ．第６０巻：２７７～２８０ページ）。大部分のＥ型肝炎感染は、自己制限的であり、慢性に発展することはほとんどないが、妊婦については予後が重く、死亡率が１７％を上回る。（Ｔｓｅｇａ等、１９９２年、Ｃｌｉｎ．Ｉｎｆｅｃ Ｄｉｓ．第１４巻：９６１～９６５ページ；Ｄｉｌａｗａｒｉ等、１９９４年、Ｉｎｄｉａｎ Ｊ Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．第１３巻：４４～４８ページ；Ｈｕｓｓａｉｎｉ等、１９９７年、Ｊ Ｖｉｒａｌ Ｈｅｐａｔ．第４巻：５１～５４ページ）。
【０００４】
１９９１年に、研究者等は、エンベロープをもたない１本鎖のプラスＲＮＡウイルスであるＨＥＶの最初の完全なゲノム配列を得た（Ｔａｍ等、１９９１年、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ第１８５巻：１２０～１３１ページ）。配列分析によって、ゲノムが７．２ｋｂであり、３つのオープンリーディングフレームを有することが示された。５’末端に位置するＯＲＦ１は、ウイルスの非構造タンパク質をコードし、３’末端に位置するＯＲＦ２は、ウイルスの主要な構造タンパク質をコードする。ＯＲＦ３ ５’末端には、ＯＲＦ１ ３’末端と重複した１ｂｐが存在する。ＯＲＦ３ ３’末端には、ＯＲＦ２末端と重複した３３９ｂｐが存在する。ＯＲＦ３が未知の機能を備えた別の構造タンパク質をコードすることが認められている（Ｔａｍ等、１９９１年、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ第１８５巻：１２０～１３１ページ；Ａｙｅ等、１９９２年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．第２０巻：３５１２ページ；Ａｙｅ等、１９９３年、Ｖｉｒｕｓ Ｇｅｎｅｓ．第７巻：９５～１０９ページ；Ｈｕａｎｇ等、１９９２年、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ第１９１巻：５５０～５５８ページ；Ｒｅｙｅｓ等、１９９３年、Ａｒｃｈ Ｖｉｒｏｌ Ｓｕｐｐｌ．第７巻：１５～２５ページ）。
【０００５】
ＨＥＶ感染の検出は、長い間、主に免疫電子顕微鏡法（ＩＥＭ）又は免疫蛍光技術に頼っ

ていたが、このような技術は非常に複雑で高価であり、多くの研究所では実施しにくいものである。ＨＥＶゲノムがクローン化され、配列決定された後、ＥＲＩＳＡ、ウェスタンブロット、ＰＣＲなどのようなより感度のよい技術が開発されて、ＨＥＶ感染の検出に使用されている。

【０００６】

血清ＨＥＶ抗体キットの開発が絶対的に必要であることは十分に認知されているが、感染したヒト又は動物が分泌するＨＥＶウイルスの濃度が非常に低いために、血清を抗原の供給源として使用することは不可能である。現在もなお、ＨＥＶ細胞培養の効率は非常に低く、これがＨＥＶを検出するために十分な抗原を利用できる可能性を制限した。したがって、ＨＥＶ抗体の検出は、依然として合成のポリペプチド又は組換え抗原に頼っている。残念なことに、多くの血清学的研究によって、合成ポリペプチド類又は異なるＨＥＶゲノム領域に由来する組換え抗原での整合性が大幅にずれていることが示された。たとえば、Ｇｏｌｄｓｍｉｔｈ等（１９９２年、Ｌａｎｃｅｔ、第３９９巻：３２８～３３１ページ）は、ＯＲＦ２　３－２（Ｍ）抗原（ａ．ａ．６１３～６６０、Ｍｅｘｉｃｏ株）を使用して、院内のＥ型肝炎ウイルス感染の症例を検出した。ＩｇＧの検出率は９１％であり、６～１２カ月後には２７～５０％に下がった。彼が３－２（Ｂ）（Ｂｕｒｍａ株由来の同じＯＲＦ２断片）を検出に使用したとき、検出率はほんの６４％であり、６～１２カ月後には陽性の結果が見られなかった。それどころか、３－２（Ｍ）は、パキスタン人の対象の回復期血清と反応しないが、３－２（Ｂ）は、４．５年後に同じ症例の血清と反応した。このようなタンパク質では、抗体が陰性に逆転する場合もあれば、依然として力価が高いままである場合もあった。大腸菌中に発現したいくつかの線状エピトープを有するモザイクタンパク質を使用した場合の結果は類似していた。良好なＨＥＶ抗体キットがないことは、ＨＥＶに感染している間の抗体の動態を深くまで研究する制約になった。一般に、ＨＥＶに感染している間、特定のＩｇＧ抗体が初期の段階で検出可能になり、２～４週間後に最高点に達し、急速に降下する。大部分は９カ月後に陰性に逆転するが、何年も後に陽性のままである患者もいる。最近では、急性相と回復期相の両方に由来する血清とも強く反応する、数種の組換え抗原がバキュロウイルス及び大腸菌中に発現されている。原則として、血清疫学調査にはこのような抗原がより適している。血清ＨＥＶ　ＩｇＧの力価が、急性段階の後急速に降下するものの、なお検出可能なレベルに保たれるからである。抗体が、疾患の流行中に感染を防御することに関係しているということは特筆に価する。

【０００７】

他の手段では、現在のところ利用できる検出法が間接的な方法だけであるために、確立されたＨＥＶ　ＩｇＭキットは、世界中で未だ開発されていない。間接的方法については、一方では検出結果が様々な要因によって影響されるので再現しにくく、他方では偽陽性の可能性が高く、陰性の値がより高く、又は感度が低いために結果の信頼性が低い。最近の報告によると、臨床サンプルを検出する際、ＩｇＭの結果が陽性であった場合、一般にＩｇＧも陽性であり、したがって、早期に診断されたその値は、限界があるものの、急性感染の診断特異性の向上において役立つといえる。

【０００８】

報告されているところでは、いくつかの合成ペプチド及び何らかの組換え抗原に対する抗体は、多くの感染対象において急速に消失するので、急性Ｅ型肝炎ウイルス感染の臨床的診断は、一般に臨床的な一致が高いＩｇＧ抗体に基づいているが、この方法の最も重大な欠陥は、過去の感染を最近の感染と区別できないことであり、これは、Ｅ型肝炎ウイルスが多く発生している区域においても、疫学的研究の際にＥ型肝炎ウイルス感染の有病率を評価する上でも、誤った診断をもたらすことになる。したがって、回復期血清に対する感度が高いことを特徴とする、信頼性があり、かつ感度のよい抗μ鎖ＩｇＭ診断キット及びＩｇＧ診断キットを開発することが早急に求められている。

【０００９】

近年では、高感度のＩｇＧ診断キットの開発に若干の進歩があった。Ｍａｓｔ等（１９９８年、Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ第２７巻：８５７～８６１ページ）は、世界中の１０種の主

要なＩｇＧ抗体ＥＩＡの包括的評価を提示している。既知の陽性血清の検出では多くのキットが実によく一致していたが、アメリカ人血液供与者の検出では、異なるキットで大きな相違があった。これは、非発生地域でのＨＥＶ有病率研究における結果の信頼性が低いことを示唆している。このようなキットの大部分の抗原は、ＨＥＶの線状エピトープを素材としていたが、２種のキットは、立体配座のエピトープを抗原として使用していた。１種目はＯＲＦ２．１（ａａ３９４～６６０）であり、他方はバキュロウイルス中で発現させたＶＬＰ（ａａ１１２～６０７）である。どちらの抗原も回復期抗体を検出できるが、これら２種の抗原の一致を比較した直接のデータは、今もまだ得られていない。これら２種の抗原が異なる抗体を識別することは可能である。さらに、ＶＬＰキットを使用して、流行のないアメリカで２０％近い有病率が報告され、これによってその特異性に疑いが生じたこともあった。しかし、ブタ、ヤギ、ウシ、ニワトリ、ラット、野生のサル、及び飼われているサルでの陽性のＨＥＶ感染の報告、並びにメリーランド州の野生ラットとルイジアナ州の野生ラットの抗体有病率が、相違する７７％と４４％であることから、動物のＨＥＶは、その病原性による臨床疾患を引き起こし得ないものの、アメリカ人集団の抗体有病率が過小評価されている可能性はある。（Ｋａｂｒａｎｅ－Ｌａｚｉｚｉ等、１９９９年、Ａｍ Ｊ Ｔｒｏｐｉｃ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ第６１巻：３３１～３３５ページ）。さらに、ＯＲＦ２．１キットは、ＣＭＶ感染及び自己免疫疾患においてより高い陽性率を検出することができる。さらに、報告されているＯＲＦ２．１ポリペプチドは、ＧＳＴとのキメラタンパク質又はポリアルギニンとのキメラタンパク質であるが、実際には偽陽性の結果をもたらすことになる。

【００１０】

ＨＥＶでは細胞培養も組織培養も成功しておらず、大量のウイルスを得るための実際的な方法が未だ得られないので、遺伝子工学を通じて、旧来の死菌ワクチン又は弱毒ワクチンからサブユニットワクチン又はＤＮＡワクチンへと転換を図ることが唯一の研究手段である。

【００１１】

ＨＥＶ ＯＲＦ２は、５１４７に位置する塩基から始まって、１９８０個のヌクレオチドを有するものであり、主要な構造タンパク質であると推定されているアミノ酸６６０個のポリペプチドをコードするものであり、ウイルスのキャプシドを構成している。ＯＲＦ２タンパク質のＮ末端には、古典的なシグナル配列の後に、正の電荷を大量に帯びた領域であり、かつウイルス構築中にゲノムＲＮＡのキャプシド形成に関与すると考えられているアルギニン高含有領域が存在する。翻訳プロセスの間、ＯＲＦ２は、シグナルペプチド認識タンパク質（ＳＲＰ）の機構によって小胞体（ＥＲ）に侵入し、さらにグリコシル化され、ＥＲ内に蓄積し、次いでおそらくは揃ってキャプシドのキャプソメアを形成する。３箇所のＮ－グリコシル化部位、Ａｓｎ－１３７、Ａｓｎ－３１０、及びＡｓｎ－５６２が、ＯＲＦ２に位置している。これらは、異なるウイルス株間でも高度に保存されており、Ａｓｎ－３１０は、主要なグリコシル化部位である。ＯＲＦ２を形質移入した哺乳動物細胞ＣＯＳ、ヒト肝細胞癌Ｈｕｈ－７、ＨｅｐＧ２は、それによって、細胞質にも膜にも見出される８８ｋＤの糖タンパク質を発現させることができる。これらのグリコシル化部位での突然変異は、ＰＯＲＦ２の細胞膜上への配置には影響を及ぼさない。しかし、シグナルペプチド配列がそこから除去された後では、細胞質中でしかＰＯＲＦ２を見出すことができない。これは、タンパク質の細胞膜上への配置にはグリコシル化でないＰＯＲＦ２の変化が必要なことを示唆している。ＨＢＶのＭＳタンパク質のように、ＰＯＲＦ２も、ゴルジ体の代わりにＥＲを介して細胞膜に直接分泌される可能性がある。形質移入した細胞の表面では、ｇｐＯＲＦ２はランダムに分布しておらず、あるゾーンに集中しているが、これはタンパク質サブユニットの合同プロセスが活性であることを示唆しており、ことによると凝集して、さらに指令された何らかの前進した形になる。ウイルスの最終的な構築／成熟には、ゲノムＲＮＡのキャプシド形成が必要であるので、ＥＲの外の細胞質又は細胞膜の壁面内でこれを起こさなければならない。膜内のｇｐＯＲＦ２の蓄積は、ウイルス構築を示唆するといえる。同時に、膜上のキャプシドタンパク質の配置は、成熟したウイ

ルスが出芽を経て細胞外へ分泌する可能性を示唆する。さらに記載すべき注目される点は、翻訳及び修飾機能を備えたｉｎ－ｖｉｔｒｏ翻訳系を使用する、ｉｎ ｖｉｔｒｏでのＰＯＲＦ２の転写及び翻訳によって、８８ｋＤのｇｐＯＲＦ２を単量体と二量体の両方の形で産生できることである。ｇｐＯＲＦ２が相同的な二量体を形成する傾向があり、前記の相同的なｇｐＯＲＦ２二量体によってキャプシドのキャプソメアが構成されることが例示されている（Ｊａｍｅｅｌ等、１９９６年、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．第７０巻：２０７～２１６ページ）。Ｌｉ等は、Ｆｒｏｓｔ Ｅｔｃｈｉｎｇ ｅｌｅｃｔｉｏｎ顕微鏡によって、バキュロウイルスによって発現した組換えＨＥＶ ＶＬＰが、直径２２～２３ｎｍの６０個のｐ５０サブユニットでできた正二重面体の対称ビリオン（Ｔ＝１）を有することを発見した。この大きさの粒子の内腔は、約１ｋｂのＲＮＡを含むことができ、ＨＥＶゲノムは、長さ７．５ｋｂであるので、自然のＨＥＶは、Ｔ≧３の結晶格子構造であると推測されるが、キャプソメアの形態上の構造は類似している。Ｔ＝３サブユニットの総数は、９０個のキャプソメアである（Ｌｉ等、１９９９年、ｖｉｒｏｌｏｇｙ第２６５巻：３５～４５ページ）。

【００１２】

上記のことによると、ＨＥＶは、エンベロープをもたないウイルスである。ウイルスのキャプシドは、ＯＲＦ２によってコードされたタンパク質でできている。このタンパク質には、主要な免疫エピトープおよび一部の中和性エピトープが組み込まれており、サブユニットワクチンを研究する際、最も好都合な断片となる。

【００１３】

米国特許第５，８８５，７６８号のＲｅｙｅｓ等の最初の報告では、４匹のカニクイザルに、ＨＥＶ Ｂｕｒｍａ株ＯＲＦ２ Ｃ末端２／３（ａａ２２５～６６０）を含む大腸菌中に発現させた組換えタンパク質ｔｒｐＥ－Ｃ２にミョウバンアジュバントを配合したものを、０、３０日で５０μｇ／１回分を投与することによって筋肉内注射した。別の２匹のサルを対照として使用し、アジュバントのみを与えた。４週間後、収集血液の抗体の増加に関する陽性の結果で、ウェスタンブロット法によって見出されたものはなかった。８０μｇのアジュバント未配合不溶性組換えタンパク質を投与することによる、そのうちの２匹のサルでの３回目の免疫化。４週間後、どちらのサルも陽性であった（ＷＢ）。次いで、６匹のサルを、各々が３匹のサルを含む第一群と第二群に分けたが、そのうちの２匹が３回又は２回の接種によって免疫化されており、１匹が対照である。第一群にはＢｕｒｍａＨＥＶを接種し、第二群にはＭｅｘｉｃｏＨＥＶを接種した。結果は、（１）免疫化した群ではＡＬＴが常に正常であったが、対照では免疫化前よりも６～１０倍高く上昇した。（２）免疫蛍光法によって肝臓生検試料で検出を行った。３回の投与で免疫化し、Ｂｕｒｍａ株を接種したものを除くすべてのサルで抗原が発見された。（３）３回の投与で免疫化し、Ｂｕｒｍａ株を接種したものを除くすべてのサルで、糞便中へのウイルスの排泄が連続的に見出された。この研究の検体は少ないが、ＯＲＦ２由来の組換えタンパク質が、ウイルス肝炎の生化学指数を出さないようにし、サルが野生のＨＥＶを接種された場合には、感染から完全に防御したことを示唆している。

【００１４】

Ｔｓａｒｅｖ等（１９９４年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．第９１巻：１０１９８～１０２０２ページ；Ｔｓａｒｅｖ等、１９９３年、Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．第１６８巻：３６９～３７８ページ；Ｔｓａｒｅｖ等、１９９７年、Ｖａｃｃｉｎｅ第１５巻：１８３４～１８３８ページ）は、昆虫（ＳＦ細胞）中のバキュロウイルスを使用して、ＨＥＶ ＯＲＦ２を発現させ、細胞溶液中に２０ｎｍ～３０ｎｍの様々な大きさのタンパク質粒子を得た。感染細胞の分裂後期には、より小さい粒子の百分率が実質的に増大する。ＷＢ法を使用して、バキュロウイルスによって発現させたＯＲＦ２を検出すると、２５ｋＤ、２９ｋＤ、３５ｋＤ、４０～４５ｋＤ、５５～７０ｋＤ、７２ｋＤに大きさの異なる多数の特定のバンドが検出された。イオン交換法及び分子スクリーニング法を使用して、ＨＥＶに特異的なタンパク質を精製した。細胞に組換えウイルスを感染させた後１日目に、７２ｋＤの全ＯＲＦ２ペプチドが最初に出現し、次いで徐々に消失した。

２日目には、６３ｋＤ及び５５ｋＤのペプチドが出現した。５３ｋＤのペプチドは、初日に大量に細胞溶液中に出現し、３日目に最高点に達した。これは、最初の７２ｋＤのタンパク質がランダムに切断されて、５５ｋＤ（細胞溶解溶液中）及び／又は５３ｋＤ（細胞溶液）のＨＥＶタンパク質となることを示唆している。これら２種のタンパク質の配列決定によって、５５ｋＤがＯＲＦ２のａａ１１２～６０７に位置することが示されたが、５３ｋＤがａａ１１２～５７８に位置し、６３ｋＤがａａ１１２～６６０に位置することも示された。ＥＬＩＳＡの結果は、５５ｋＤの活性が５３ｋＤよりも明らかに強いことを示した。昆虫内のバキュロウイルス中にａａ１１２～６６０断片が発現した場合、６３ｋＤに加え、５５ｋＤの組換えＨＥＶタンパク質も見出される。

【００１５】

細胞を感染させてから７日目にＳＦ９細胞を収集した。タンパク質を一次精製し、ミョウバンアジュバントと併せた。次いで、１回に５０μｇのタンパク質の筋肉内注射によってカニクイザルを免疫化した。４匹には１回分を与え、他の４匹には２回分を与えた（０ｄ、２８ｄ）。最終投与の後、同じＨＥＶ系統（ＳＡＲ－５５、パキスタン人患者由来）の１０００～１００００ＣＩＤ５０の投与量ですべてのサルに静脈内接種をした。１５週間以内の、肝臓生検材料、血清、及び大便を毎週収集した。１回投与のサルでのウイルス接種前の抗体の力価は、１：１００～１：１００００であったが、２回投与群では、すべて１：１００００であった（精製された５５ｋＤでコートされていた）。１回投与群では、ウイルス接種後９週間で１匹のサルが麻酔事故のために死亡した（結果では計算されている）。２回投与群では、ウイルス接種後すぐに２匹のサルが原因不明で死亡した（結果では計算せず）。免疫化後の６匹のサルに、ＡＬＴの上昇もしくは肝臓生検の病理学的変化は見受けられず、ウイルス血症もなかった。１回投与群の４匹のサルでは、３匹がウイルスを排泄したが、２回投与群の２匹のサルでは、ウイルスの排泄が見られなかった。

【００１６】

イオン交換法及び分子篩法によってバキュロウイルス系に発現させた５５ｋＤのタンパク質をさらに精製して、精製が９９％超に到達するようにした。ミョウバンアジュバントと併せた後、１回分が５０μｇ、１０μｇ、２μｇ、０．４μｇ、０μｇ（対照）のタンパク質を４匹のアカゲザルにそれぞれ注射し、０及び２８日投与した。最終投与後の４週間目に、同じウイルス（ＳＡＲ－５５）をサルに接種した。免疫化群の１６匹のサルは、すべて正常であり、２μｇ投与の１匹のサル及び０．４μｇ投与の他のサルだけに、非常に軽度の病理学的変化が現われた。免疫化されたサルは、感染したが、肝炎を予防することができた。５０μｇ投与の１匹のサル及び１０μｇ投与の他のサルを除き、免疫化したすべてのサルにウイルスの排泄、及びウイルス血症も見られた。ほとんどのサルのウイルス量が制限されたが、期間は短縮されなかった。別の４匹のサルは、２×５０μｇで免疫化し、最終投与後４週間目に１００，０００ＭＩＤ５０の他のＨＥＶを接種した。結果は同様であった。４匹のサルがすべて、ＡＬＴの上昇及び病理学的変化を示したわけではなかったが、１匹のサルだけはウイルス排泄及びウイルス血症を示さなかった。ウイルス量は、明らかに減少したが、期間は短縮されなかった。著者の意見によると、これらのサルでの全面的な防御の効果は、前回よりも悪かった。接種に使用したウイルス量が一因である可能性がある。この実験でのウイルス量は、３００，０００に達したが、前回は１０００～１００００ＭＩＤ５０であった。さらに、０．４μｇ～５０μｇ群の抗体の力価は、接種前には差を示さなかった。

【００１７】

Ｇｅｎｅｌａｂｓ ｃｏｍｐａｎｙのスタッフは、同じ昆虫内バキュロウイルスを使用してＯＲＦ２ａａ１１２～６６０を発現させ、大量の可溶性組換え６２ｋＤタンパク質を得た。精製した後、カニクイザルに免疫化を施すと、投与量１０００ＣＩＤ５０のウイルス（Ｍｅｘｉｃｏ株）接種から防御された（２０μｇで免疫化した３匹のサルは、罹患しなかった。２匹のサルではウイルスの排泄が見られず、１匹のサルでウイルス排泄量が減少した）。（Ｚｈａｎｇ等、１９９７年、Ｃｌｉｎ Ｄｉａｇｎ Ｌａｂ Ｉｍｍｕｎｏｌ．第４巻：４２３～８ページ。）

【００１８】
ＭｃＡｔｅｅ等（１９９６年、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒ．Ｐｕｒｉｆ第８巻：２６２～２７０ページ）は、組換えバキュロウイルス中に発現させたＢｕｒｍａＯＲＦ２の６２ｋＤ二量体を調製した。ＨＰＬＣ－ＭＳによって、この二量体を別々に分離して、５６．５ｋＤと５８．１ｋＤの２本のペプチドにした。ペプチド集合体のフィンガープリント解析では、この２本のペプチドのＮ末端が同じａａ１１２であり、Ｃ末端がａａ６３７及びａａ６５２で異なっていることが示された。さらに、５６．５ｋＤのタンパク質は、非常に良好な免疫原であった。
【００１９】
オーストラリアのＡｎｄｅｒｓｏｎ　ｇｒｏｕｐ（Ａｎｄｅｒｓｏｎ等、１９９９年、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ．第８１巻：１３１～１４２ページ；Ｌｉ等、１９９４年、Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏ．第３２巻：２０６０～２０６６ページ；Ｌｉ等、１９９７年、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｖｉｒｏｌ．、第５２巻：２８９～３００ページ；Ｌｉ等、２０００年、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｖｉｒｏｌ．第６０巻：３７９～３８６ページ）は、大腸菌中に発現させたＯＲＦ２のａａ３９４～６６０（ＯＲＦ２．１）を使用した。この産物は、ＧＳＴとのキメラタンパク質又はポリアルギニンタンパク質であり、高次構造の回復期エピトープを形成し得る。このエピトープは、回復期血清を非常に高率で検出できるが、断片のＮ末端側に伸長又は切断があった場合に消失する。ラットを組換えＯＲＦ２．１タンパク質で免疫化した後３０週目の血清を使用して、バキュロウイルス中に発現させたＶＬＰを被覆抗原として有する回復期の患者からの血清にブロッキングをかけた。阻止率は、８１％～８６％に達することになる。ＯＲＦ２．１タンパク質で単クローン抗体を調製すると、ＯＲＦ２．１の立体配座エピトープを識別できる２種の単クローン抗体２Ｅ２及び４Ｂ２と、識別可能な５種の単クローン抗体らしいものを得た。抗原としてＶＬＰを有する回復期血清に２Ｅ２又は４Ｂ２のどちらを使用してブロッキングをかけても、阻止率は、６０％に達し得る。これは、これら２種の単クローン抗体が、エピトープを識別でき、回復期血清中で抗体によって識別されるエピトープの主要な構成要素であることを示唆している。別のデータによって、ＯＲＩＦ２．１が、ＶＬＰにかなり類似した主要なエピトープ構造を有することが示された。このエピトープへの抗体は、ＨＥＶ感染血清中に長期間存在し得る。このエピトープは、重要な防御エピトープであるが、ＯＲＦ２．１についての動物の防御実験は、今までに報告されていない。
【００２０】
（発明の概要）
本発明の一態様では、ｎ重合体ポリペプチド（ｎは１～１８０の整数である）の形の、Ｅ型肝炎ウイルスのオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）２（配列番号１で示す）のアミノ酸配列を含むポリペプチド又はその断片であって、前記の配列番号１で示すＥ型肝炎ウイルスＯＲＦ２又はその断片のアミノ酸を含むポリペプチドが、
１）アミノ末端がアミノ酸残基１１３と４６９の間から出発し、カルボキシル末端がアミノ酸残基５９６と６６０の間で終結しているポリペプチド、
２）アミノ末端がアミノ酸残基３７０と４６９の間から出発し、カルボニル末端がアミノ酸残基６０１と６２８の間で終結しているポリペプチド、
３）アミノ末端がアミノ酸残基３９０と４５９の間から出発し、カルボキシル末端がアミノ酸残基６０１と６１０の間で終結しているポリペプチド、
４）配列番号１のアミノ酸残基４１４～６６０のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２４７、
５）配列番号１のアミノ酸残基４２９～６６０のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２３２、
６）配列番号１のアミノ酸残基４３９～６６０のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２２２、
７）配列番号１のアミノ酸残基４５９～６６０のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２０１、

８）配列番号１のアミノ酸残基３９４～６２８のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２３５Ｎ、
９）配列番号１のアミノ酸残基３９４～６１８のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２２５Ｎ、
１０）配列番号１のアミノ酸残基３９４～６０２のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２０９Ｎ、
１１）配列番号１のアミノ酸残基３９４～６０１のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２０８Ｎ、
１２）配列番号１のアミノ酸残基３９４～６０６のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチドＮＥ２Ｉ、
１３）配列番号１のアミノ酸残基３９０～６０３のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２１７Ｄ、
１４）配列番号１のアミノ酸残基３７４～６１８のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド２０５、
１５）配列番号１のアミノ酸残基４１４～６０２のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド１８９、
１６）配列番号１のアミノ酸残基４１４～６０１のアミノ酸配列を有するポリペプチド、すなわちポリペプチド１８８、
１７）配列番号１のアミノ酸残基４５９～６２８のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及び
１８）Ｎ末端にＭｅｔが付加され、Ｃ末端の３’末端上のアミノ酸残基６０３のＰｒｏにおいて、５’～３’方向にアミノ酸配列－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇが付加されてＣ末端が修飾されている、配列番号１のアミノ酸残基Ｘ～６０３のアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、
ａ）Ｘがアミノ酸残基３９４である場合の、配列番号２で示す前記ポリペプチド、すなわちＮＥ２、
ｂ）Ｘがアミノ酸残基４１４である場合の、配列番号３で示す前記ポリペプチド、すなわち１９３Ｃ、
ｃ）Ｘがアミノ酸残基４２９である場合の、配列番号４で示す前記ポリペプチド、すなわち１７８Ｃ、
ｄ）Ｘがアミノ酸残基４３９である場合の、配列番号７で示す前記ポリペプチド、すなわち１６８Ｃ、
ｅ）Ｘがアミノ酸残基４４９である場合の、配列番号８で示す前記ポリペプチド、すなわち１５８Ｃ、
ｆ）Ｘがアミノ酸残基４５９である場合の、配列番号９で示す前記ポリペプチド、すなわち１４８Ｃ、
ｇ）Ｘがアミノ酸残基４６９である場合の、配列番号１０で示す前記ポリペプチド、すなわち１３８Ｃが含まれるもの
からなる群から選択されているポリペプチドを提供する
本発明の別の態様では、上の１）から１８）で表される前述のポリペプチドのいずれか１つとの相同性が少なくとも８０％であり、抗原性や免疫原性など、生物学的特性がほぼ同一であるポリペプチドをさらに提供する。

【００２１】

別の態様では、本発明はさらに、上述の本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターも提供する。もう１つの態様では、本発明はさらに、本発明のポリペプチドを発現させることのできる、上記の組換え発現ベクターのいずれか１種で形質転換した宿主細胞も提供する。

【００２２】

本発明の別の態様では、少なくとも１種の本発明のポリペプチドもしくはその任意の組合せ、及び場合により薬剤として許容される賦形剤及び／もしくはアジュバントを含む、哺

乳動物のＥ型肝炎ウイルス感染を予防及び／又は治療するためのワクチン組成物をさらに提供する。

【００２３】

本発明の別の態様では、本発明のポリペプチド及びインフルエンザウイルス由来の赤血球凝集素抗原の保存断片を含むキメラタンパク質をさらに提供する。

【００２４】

別の態様では、本発明はさらに、哺乳動物のＥ型肝炎ウイルス感染を予防及び／又は治療するためのワクチン組成物であって、本発明のポリペプチドの１種とインフルエンザウイルス由来赤血球凝集素抗原の保存断片とからなるキメラタンパク質、並びに任意選択の薬剤として許容される賦形剤及び／又はアジュバントを含む組成物も提供する。

【００２５】

別の態様では、本発明はさらに、哺乳動物にワクチン接種を施してＥ型肝炎ウイルス感染を予防するための、上述のワクチン組成物の使用を提供する。

【００２６】

別の態様では、本発明はさらに、哺乳動物のＥ型肝炎ウイルス感染を予防及び／又は治療するための方法であって、対象に、予防及び／もしくは治療有効量の少なくとも１種の上述のポリペプチド、又は上述のポリペプチドの少なくとも１種及びインフルエンザウイルス由来赤血球凝集素抗原の保存断片からなるキメラタンパク質を投与することを含む方法も提供する。

【００２７】

別の態様では、本発明はさらに、診断に有効な量の少なくとも１種の本発明のポリペプチド又はその何らかの併用物を含む、生物検体のＥ型肝炎ウイルス感染を診断するための診断キットも提供する。

【００２８】

別の態様では、本発明はさらに、生物検体のＥ型肝炎ウイルス感染を診断するための診断キットであって、診断に有効な量の少なくとも１種の本発明のポリペプチド又はその何らかの併用物を含み、さらにＥ型肝炎ウイルスＯＲＦ３由来免疫原性エピトープを含有するポリペプチド又はその免疫原性断片も含み、前記のＥ型肝炎ウイルスＯＲＦ３由来免疫原性エピトープを含有するポリペプチド又はその免疫原性断片が、任意選択で前記ポリペプチドに共有結合しているキットも提供する。

【００２９】

別の態様では、本発明はさらに、生物検体のＥ型肝炎ウイルス感染を診断する方法であって、抗原と抗体の相互作用に適する条件下、上述の診断キットと検出対称の検体とを接触させることを含む方法も提供する。

【００３０】

別の態様では、本発明はさらに、生物検体において、Ｅ型肝炎ウイルスに対する全抗体を検出する方法、Ｅ型肝炎ウイルスに対するＩｇＧ抗体を検出する方法、及びＥ型肝炎ウイルスに対するＩｇＭ抗体を検出する方法も提供する。

【００３１】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

別段の指示がない限り、本明細書で使用する用語又は術語は、当技術分野で通常使用されているものと同じである。細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、及び免疫学的手順における通常の製造が、当技術分野で定型化した技術として実施される。本発明では、別段の指示がない限り、本明細書で使用するこれらの用語は、以下のような意味である。

【００３２】

「Ｅ型肝炎ウイルス」又は「ＨＥＶ」は、ｉ）水系感染による肝炎を引き起こし、ｉｉ）血清学的特性に関して、Ａ型肝炎ウイルス（ＨＡＶ）、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、Ｃ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、又はＤ型肝炎ウイルス（ＨＤＶ）と区別し、ｉｉｉ）ｐＴＺＫＦ１（ＥＴ１．１）に挿入された１．３３ｋｂのｃＤＮＡに相同的なゲノム領域を含むウイルス、ウイルスの型、又はウイルスのクラスを指し、前記プラスミドは、Ａｍｅｒｉ

ｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）に目録番号６７７１７で保管されている大腸菌株の中に含まれている。

【００３３】

本発明のポリペプチド

一態様では、本発明は、驚くべきことに、抗体との十分な反応性及び／又は免疫原性を有する一連のＨＥＶポリペプチド断片であり、配列番号１で示すＨＥＶ ＯＲＦ２のアミノ酸配列中に含まる断片を提供する。個々の断片の名称は、実施例６の表１に出ている。

【００３４】

本発明における、アミノ酸配列内の配置によるアミノ酸残基の番号付けは、国際純正及び応用化学連合及び国際生化学連合、Ｊｏｉｎｔ ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎ ｏｎ ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ、「アミノ酸及びペプチドの命名及び記号表示（Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ ａｎｄ ｓｙｍｂｏｌｉｓｍ ｆｏｒ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ）」、Ｐｕｒｅ Ａｐｐｌ．Ｃｈｅｍ．第５６巻、５９５～６２４ページ（１９８４年）の発番方式に従う。具体的には、配列番号１のコード出発部位Ｍｅｔを１位と示し、５’から３’の方向に大きくなる。

【００３５】

本発明の一態様では、ｎ－重合体ポリペプチド（ｎは１～１８０の整数である）の形の、配列番号１で示す、Ｅ型肝炎ウイルスＯＲＦ２のアミノ酸配列又はその断片を含むポリペプチドを提供する。ｎが２であるとき、前記ポリペプチドは二量体ポリペプチドであり、ｎが３であるとき、前記ポリペプチドは三量体ポリペプチドであり、ｎが４であるとき、前記ポリペプチドは四量体ポリペプチドであり、以下同様である。

【００３６】

本発明では、配列番号１で示すアミノ酸配列を含む前記ポリペプチド断片のアミノ末端（５’末端）は、アミノ酸残基１１３と４６９の間、好ましくはアミノ酸残基３７０と４６９の間、より好ましくはアミノ酸残基３９０と４５９の間から出発し、前記ポリペプチドのカルボキシル末端（３’末端）は、アミノ酸残基５９６と６６０の間、好ましくはアミノ酸残基６０１と６２８の間、より好ましくはアミノ酸残基６０１と６１０の間で終結する。具体的には、本発明の好ましいポリペプチドは、ポリペプチド２４７、ポリペプチド２３２、ポリペプチド２２２、ポリペプチド２０１、ポリペプチド２３５Ｎ、ポリペプチド２２５Ｎ、ポリペプチド２０９Ｎ、ポリペプチド２０８Ｎ、ポリペプチドＮＥ２Ｉ、ポリペプチド２１７Ｄ、ポリペプチド２０５、ポリペプチド１８９、ポリペプチド１８８、及び配列番号１のアミノ酸残基４５９～６２８のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【００３７】

本発明はさらに、Ｎ末端にＭｅｔが付加され、Ｃ末端の３’末端上のアミノ酸残基６０３のＰｒｏにおいて、５’～３’方向にアミノ酸配列－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇが付加されてＣ末端が修飾されている、配列番号１のアミノ酸残基Ｘ～６０３のアミノ酸配列を有するポリペプチドに関するものであり、これには、ａ）ＮＥ２、ｂ）１９３Ｃ、ｃ）１７８Ｃ、ｄ）１６８Ｃ、ｅ）１５８Ｃ、ｆ）１４８Ｃ、ｇ）１３８Ｃが含まれる。

【００３８】

別の態様では、本発明はさらに、前述のポリペプチドのいずれか１種との相同性が少なくとも８０％であり、抗原性や免疫原性など、生物学的特性がほぼ同一であるポリペプチド、すなわち、本発明のポリペプチドの派生物に関する。具体的には、このポリペプチドは、前記ポリペプチドのアミノ酸が、前記ポリペプチドのアミノ酸配列と共に、当該ポリペプチドのＮ末端及び／又はＣ末端に隣接する、自然配列でないアミノ酸を含むが、それでも抗原性や免疫原性など、生物学的特性が当該ポリペプチドとほとんど類似したままであるという条件の本発明のポリペプチド派生物であると考えられる。したがって、同じ物に相当するＤＮＡ断片を本発明の派生ＤＮＡと称する。たとえば、発現及び／又は精製の目的のために、そのＮ末端に開始アミノ酸（メチオニン）又は他のリーディングペプチド及び／もしくはシグナルペプチドを加える、あるいはそのＣ末端にいくつかのヒスチジンを

加えることによってその精製が促進される。

【００３９】

本発明はさらに、抗原性及び／もしくは免疫原性など、生物学的特性が前述のポリペプチドのいずれか１種と同一であるポリペプチド、又は前述のポリペプチドのいずれか１種との配列同一性が少なくとも８０％であるポリペプチドも考えている。用語「同一性百分率」は、最適に並べ合わせて得た２種の比較しようとする配列間で一致するヌクレオチド又はアミノ酸残基の百分率を表すものとし、この百分率は単に統計的なものであり、２配列間の相違は、ランダムに、かつその全長にわたって分布している。２種のヌクレオチド配列又はアミノ酸配列の配列比較は、その各配列を最適に並べ合わせた後にこれらの配列を比較することによって従来どおりに実施し、局所領域の配列類似性を特定及び比較するためには、区分又は「比較のウィンドウ（ｗｉｎｄｏｗ　ｏｆ　ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ）」によって前記の比較を行う。比較のための最適な配列の並べ合わせは、手作業でなく、Ｓｍｉｔｈ及びＷａｔｅｒｍａｎ（１９８１年）のＡｄ．Ａｐｐ．Ｍａｔｈ．第２巻：４８２ページの局所相同性アルゴリズム、Ｎｅｄｄｌｅｍａｎ及びＷｕｎｓｃｈ（１９７０年）のＪ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．第４８巻：４４３ページの局所相同性アルゴリズム、Ｐｅａｒｓｏｎ及びＬｉｐｍａｎ（１９８８年）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ第８５巻：２４４４ページの類似性検索法、並びにこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータプログラム（米国ウィスコンシン州マディソン５７５、Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｒｉｖｅ、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｐａｃｋａｇｅ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　ＧｒｏｕｐのＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴ　Ｐ、ＢＬＡＳＴ　Ｎ、及びＴＦＡＳＴＡ）によって生じさせる。

【００４０】

２種の核酸配列又はアミノ酸配列の同一性百分率は、最適に並べ合わせたその２種の配列を比較することによって決定するが、その２種の配列の最適な並べ合わせでも、比較対象の核酸配列又はアミノ酸配列が基準配列に対して付加又は欠失を含んでいるかもしれない。同一性百分率は、２種の配列間でヌクレオチド又はアミノ酸残基が一致する同一位置の数を決定し、これを比較する位置数で割り、得られた結果を１００倍することによって計算して、この２種の配列間の同一性百分率を得る。

【００４１】

たとえば、ウェブサイトｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｏｒｆ／ｂｌ２．ｈｔｍｌから入手できるプログラムＢＬＡＳＴ「ＢＬＡＳＴ２配列」が使用できるが、これでは、パラメータはデフォルト（特に、空のギャップペナルティーは５、伸長のギャップペナルティーは２であり、行列はプログラム「ｂｌｏｓｕｍ６２」などによって得る）であり、並べ合わせる２種の配列間の同一性百分率は、このプログラムによって直接に計算される。

【００４２】

本発明のポリペプチドの調製

本発明のポリペプチドは、化学的合成方法や組換えＤＮＡ技術など、当技術分野で知られている方法によって調製できる。好ましくは、本発明のポリペプチドの調製方法は、組換えＤＮＡを発現させることによって行うことができる。組換えタンパク質を調製する方法は、当技術分野でよく知られており、本明細書で詳細に述べる必要はないが、実施例中の方法を参照することもできる。組換えタンパク質の産生に使用できる細胞に関して言及すべきものとしては、細菌細胞（Ｐ．Ｏ．Ｏｌｉｎｓ及びＳ．Ｃ．Ｌｅｅ、１９９３年、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ第４巻：５２０～５２５ページ）、酵母細胞（Ｒ．Ｇ．ｂｕｃｋｈｏｌｚ、１９９３年、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ第４巻：５３８～５４２ページ）、動物細胞、特に哺乳動物細胞培養物（Ｃ．Ｐ．Ｅｄｗａｒｄｓ及びＡ．Ａｒｕｆｆｏ、１９９３年、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ第４巻：５５８～５６３ページ）、及び昆虫細胞がある。昆虫細胞での方法については、たとえば、バキュロウイルス（Ｖ．Ａ．Ｌｕｃｋｏｗ、１９９３年、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ第４巻：５６４～５７２ページ）を参照された

い。これに関して、本発明はさらに、上述のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターも提供する。本発明はさらに、そこに含まれるヌクレオチド配列によってコードされる前記ポリペプチドを発現させることのできる、上述の組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞も提供する。

【００４３】

本発明の一実施形態では、大腸菌を使用して、次の本発明のポリペプチド、すなわち、ポリペプチド２４７、ポリペプチド２３２、ポリペプチド２２２、ポリペプチド２０１、ポリペプチド２３５Ｎ、ポリペプチド２２５Ｎ、ポリペプチド２０９Ｎ、ポリペプチド２０８Ｎ、ポリペプチドＮＥ２Ｉ、ポリペプチド２１７Ｄ、ポリペプチド２０５、ポリペプチド１８９、ポリペプチド１８８、及びポリペプチドａ）ＮＥ２、ｂ）１９３Ｃを個々に発現させる。

【００４４】

前記ポリペプチドの単量体と二量体の比、重合体ポリペプチドの生成量、及びその個々のラジウムを測定する（詳細は実施例６を参照のこと）。結果として、発現した産物は、リフォールディングされる傾向があることが示されている。リフォールディング後に溶液中に安定な重合体が自己生成する能力によって、ＨＥＶを予防及び／又は治療するためのワクチンとして使用するのに特に適する本発明のポリペプチドができる。本発明の実施形態の１つでは、ある試験で、二量体、三量体、及び四量体を含む重合体が検出されている。現在の方法では限度があるが、推定上の三量体は、実際には二量体と四量体の適切な比の混合物でできている可能性がある。方法論が向上することによって、本発明のポリペプチドがより大きなポリペプチドを生成し得ることも想定できる。刊行された参照文献（Ｊａｍｅｅｌ等、１９９６年、Ｊ．Ｖｉｒｏｌｏｇｙ第７０巻：２０７～２１６ページ；Ｌｉ等、１９９９年、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ第２６５巻：３５～４５ページ）から推論すると、自然のＨＥＶは９０個の小粒子からなり、各小粒子がＯＲＦ２ポリペプチドの二量体である可能性が高い。したがって、本発明のポリペプチドは、最高で１８０重合体のポリペプチドである重合体、又はそれよりも長い重合体を形成し得ると予想するのが妥当であり、ウイルスの構造を知る上での進展となる。

【００４５】

本発明の別の好ましい実施形態では、封入体の形のポリペプチド２０１が大腸菌によって高い収率で発現されるが、発明者は、驚くべきことに、前記封入体がｐＨ７．４５のＰＢＳ緩衝液中で自発的に自己再生でき、これによって、塩酸グアニジンを加え、次いで多段階の透析にかけるステップを含めて、実質的に回収率を低下させる、時間がかかりかつ冗長な従来の変性／再生プロセスが回避されることを発見した。その上、大腸菌によって同時に発現される他の望ましくないタンパク質封入体は、自発的に自己再生できないので、単に遠心分離し、上清を回収することによって、本発明の問題のタンパク質が実質的に精製できる。

【００４６】

本発明のポリペプチドとインフルエンザウイルス由来赤結集凝集素抗原の保存断片からなるキメラタンパク質

本発明の別の態様では、上述のポリペプチドのいずれか１種とインフルエンザウイルス由来赤血球凝集素抗原の保存断片とからなるキメラタンパク質も提供する。赤血球凝集素抗原（以下ではＨＡと示す）は、２種のインフルエンザウイルス表面抗原の１つであり、対象血清中のインフルエンザウイルスに対する抗体を特異的に検出する際に使用される最もよく導入される抗原である。動物にＨＡをワクチン接種して産生させた抗体によって、レシート（ｒｅｃｅｉｐｔ）がインフルエンザウイルスに再感染するのを有効に予防できることは知られている。したがって、ＨＡに対する抗体が集団の大部分に与えられていると考えるのが妥当である。これまでの報告（ＭｃＥｗｅｎ　Ｊ．等、Ｖａｃｃｉｎｅ、１９９２年；第１０巻（６）：４０５～１１ページ）によると、エピトープ９１～１０８ａａは、Ａ型インフルエンザウイルスのＨ３株すべてのＨＡ遺伝子中にある保存アミノ配列である。本発明の好ましい一実施形態ではまず、遺伝子工学によって、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓ

ｅｒなど、免疫原性の高い本発明のＨＥＶ　ＯＲＦ２遺伝子のポリペプチド断片に、ＨＡ遺伝子（９１～１０８ａａ）を柔軟に連結して、原核生物発現系、特に大腸菌中でのキメラ発現を確立させる。次いで、予めインフルエンザウイルスを感染させることによって産生させたＨＡ抗体で追加免疫を行って、力価の高い防御的な抗ＨＥＶ抗体を得る。この方法では、本発明のポリペプチドのＯＲＦ２断片だけを含むワクチンに優るＨＥＶワクチンが得られる。

【００４７】

本発明での教示を考えて、当分野の技術者は、ＨＡ遺伝子中の他の保存断片から、本発明のワクチン組成物に有用なエピトープを選沢することもできる。ＨＡの特定のエピトープと本発明のポリペプチドを連結する特定の柔軟なリンカーについては、適切なペプチド断片又はその類似体からなっていてよいが、ただし、本発明のポリペプチドと選択されたＨＡ断片の連結を助長し、哺乳動物のＨＥＶ感染の予防／治療に関して本発明のポリペプチドの使用にほとんど影響を及ぼさないものとする。本発明のポリペプチドとＨＡを連結するリンカーの選択が、主として選択された本発明のポリペプチドの特性に応じて決まることは理解されるはずである。たとえば、ＨＡに連結することにした選択された本発明のポリペプチドに応じて、異なるリンカーを選択すればよい。本発明では、使用するＨＡの保存断片がアミノ酸残基９１～１０８からの断片であることが好ましい。

【００４８】

免疫原としての本発明のポリペプチドと選択したＨＡ断片を連結するリンカーは、化学合成技術など、従来の合成技術によって望ましく合成することができる。さらに、当分野の技術者には、自動ペプチド合成装置によるｔ－ＢＯＣ法など、標準の化学的方法に従ってペプチドを合成することもできる（たとえば、Ｌ．Ａ．Ｃａｒｐｉｎｏ、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．第７９巻：４４２７ページ、１９５７年を参照のこと）。しかし、ペプチドは、タンパク質を化学的に加水分解しても、他の知られている方法によっても産生できる。

【００４９】

あるいは、本発明のポリペプチドとＨＡのキメラタンパク質は、ＨＡ断片及び本発明のポリペプチドをコードする配列を含むＤＮＡ分子の核酸配列で形質転換した宿主細胞によって産生させることができ、前記ＤＮＡ分子は組換えＤＮＡ技術など、従来の遺伝子工学的方法によって宿主微生物又は宿主細胞中でクローン化することによって得られる。形質転換した細胞での組換え技術によって生成させる場合、得られる組換えキメラタンパク質は、型通りの方法によって培地もしくは宿主細胞、又はその両方から精製及び回収できる。組換え法によって産生された前記キメラタンパク質は、組換えＤＮＡ技術による組換え産生の際、得られるペプチドを細胞体又は培地からほとんど分離できる程度に単離される。さらに、得られるペプチドのためのコード配列は、合成によって、あるいは知られている方法に従ってウイルスＲＮＡを使用し、又はそのｃＤＮＡを含む入手可能なプラスミドを使用することによって調製できる。

【００５０】

この方法における使用では、上述のキメラタンパク質は、その産生を増大させ、又はその精製を促進する目的で、一般に知られている作製物向けにも他の作製物向けにも設計できる。適切な系及びベクターは知られており、公的に入手でき、又は大腸菌、バチルス、ストレプトマイセス、サッカロミケス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）、哺乳動物、酵母、昆虫細胞、及び植物細胞など、様々な微生物及び細胞中のクローン化及び発現キメラペプチドが市販されている。

【００５１】

組換え又は合成によって産生されたキメラタンパク質は、型通りの精製方法によって精製できる。当分野の技術者には、問題の用途に合致するポリペプチドの所望の純度が容易に決定できる。

【００５２】

ワクチン組成物

別の態様では、本発明はさらに、少なくとも１種の本発明のポリペプチドもしくはその何らかの併用物と、任意選択の薬剤として許容される賦形剤及び／もしくはアジュバントとを含む、哺乳動物のＥ型肝炎ウイルス感染を予防及び／又は治療するためのワクチン組成物も提供する。

【００５３】

さらに別の態様では、本発明はさらに、本発明のポリペプチド及びインフルエンザウイルスの赤血球凝集素抗原由来保存断片を含有するキメラタンパク質と、任意選択の薬剤として許容される賦形剤及び／もしくはアジュバントとを含む、哺乳動物のＥ型肝炎ウイルス感染を予防及び／又は治療するためのワクチン組成物も提供する。

【００５４】

本発明のさらに別の態様では、哺乳動物にワクチン接種を施してＥ型肝炎ウイルス感染を予防する、上記のワクチン組成物の使用も提供する。

【００５５】

本発明では、接種又は治療の対象となる哺乳動物には、それだけに限らないが、ヒト、及びヒヒ、類人猿、サルなど、他の霊長類、ウシ、ヤギ、ブタ、ウサギ、マウスなど、実用動物、並びにネコ、イヌなど、ペット類が含まれる。前記ワクチン組成物は、治療及び／又は予防に有効な量の少なくとも１種の本発明のポリペプチドを含有し、前記の有効量は、ある期間投与した後、ＨＥＶに感染した対象を有効に治療し、又は対象のＨＥＶ感染を予防するのに十分な量である。

【００５６】

本発明のワクチン組成物は、単独で使用することも、医薬用又は予防法向け処方の成分として使用することもでき、任意選択で、放出制御剤を含む、薬剤として許容される賦形剤を含有する。前記賦形剤はさらに、ＨＥＶ感染を治療及び／又は予防するための投与に適する薬剤として許容される媒介物又は希釈剤を含んでもよい。薬剤として許容される適切な媒介物とは、生物学的に不活性かつ／又は非毒性のものを指す。所望の用途に従って、当技術分野で知られている様々な媒介物が選択できる。通常、前記媒介物は、それだけに限らないが、無菌食塩水、ラクトース、スクロース、オルトリン酸カルシウム、ゼラチン、デキストリン、寒天、ミョウバン、酸化アルミニウム、水酸化アルミニウム、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、及び水からなる群から選択できる。さらに、媒介物又は希釈剤は、単独又はパラフィンとの併用で、モノステアリン酸グリセリル／ジステアリン酸グリセリルなど、放出制御性物質をさらに含んでよい。さらに、可溶性ガラスを含む従来の徐放性重合体製剤も使用できる。

【００５７】

さらにまた、所望時には、少なくとも１種の本発明のポリペプチド又はその何らかの併用物を含む本発明のワクチン組成物は、他の治療／予防薬をさらに含んでもよい。たとえば、前記組成物は、ＨＥＶ感染の治療又は予防で有用な様々な薬品の「カクテル混合物」を含んでよい。このようなカクテル混合物は、インターフェロン、ヌクレオチド類似体、及び／又はＮ－アセチル－システインなど、他の薬品をさらに含んでよい。

【００５８】

少なくとも１種の本発明のポリペプチドを含む本発明のワクチン組成物は、任意選択で、アジュバントやサイトカインなど、対象における抗体及びＴ細胞の応答をさらに誘導するのに有用な免疫系調節薬をさらに含んでもよい。前記調節薬には、従来のミョウバンを主体としたアジュバント、ムラミルジペプチド、保存剤、化学安定剤、又は他の抗原タンパク質が含まれる。一般に、安定剤、アジュバント、又は保存剤などは、所望の適用例での効果が最高の処方を最も効果的に決定する。適切な保存剤には、クロリルブチノール（ｃｈｌｏｒｙｌｂｕｔｙｎｏｌ）、ソルビン酸カリウム、ソルビン酸、二酸化硫黄、没食子酸プロピル、パラベン、グリセリン、及びフェノールが含まれる。

【００５９】

本発明のワクチン組成物を使用して哺乳動物のＨＥＶ感染を予防及び／又は治療する方法別の態様では、本発明は、対象に予防及び／又は治療に有効な量の本発明のポリペプチド

、又は少なくとも１種の本発明のポリペプチド及びインフルエンザウイルス赤血球凝集素の保存断片からなるキメラタンパク質を投与することを含む、哺乳動物のＥ型肝炎ウイルス感染を予防及び／又は治療する方法を提供する。特に、前記方法は、対象に本発明のワクチン組成物を投与するステップを含む。本発明が選択する保存断片は、９１～１０８個のアミノ酸残基からのアミノ酸断片であることが好ましい。

【００６０】

これらの組成物の適量は、所望の応答レベルに基づいて決定してよい。一般に、本発明のポリペプチドを含む組成物は、約５ｕｇと約２００ｕｇの間の粒子を含有してよい。このような組成物は、１回又は一続きの接種、たとえば、２～６カ月間隔で３回の接種として投与してよい。また適切な投与量は、単剤治療として投与する場合、患者の健康状態、体重、又は年齢、並びに免疫原成分の従来の投与量などの要因を考慮に入れて、治療を行う医師の判断によって決定してよい。患者の状態が改善し、又は所定の病原体への暴露の増加が見込まれれば、本発明のポリペプチドを含む維持量の組成物を必要に応じて投与すればよい。その後、投与量、投与頻度、又はその両方を、所望の効果が保たれるレベルに減らせばよい。その時に、治療を止めるべきである。しかし、所定の好ましくない状態が再発すれば、各個体に長期間の断続的な治療が求められることもある。

【００６１】

本発明のポリペプチドを含む組成物は、たとえば非経口投与、特に筋肉内又は皮下、並びに経口投与など、何らかの適切な経路によって投与してよい。経肺、経鼻、点耳、経肛門、経皮、点眼、静脈内、動脈内、腹腔内、経粘膜、舌下、皮下、脳内など、他の経路を使用してもよい。

【００６２】

本発明のワクチン組成物の調製をして、液状の溶液又は懸濁液としての注射用組成物又はワクチンを製剤すればよい。注射の前に液体になる溶液又は懸濁液に適する固体剤形を調製してもよい。ある実施形態では、製剤が、放出を制御し、かつ／又は送達を長引かせるために、乳化されていても、リポソーム又は可溶性ガラスに封入されていてもよい。あるいは、製剤は、エアロゾル又はスプレーの形でもよい。製剤は、経皮パッチに含まれていてもよい。活性成分は、薬剤として許容され、活性成分と適合するいくらかの医薬添加物と混合してよい。医薬添加物には、たとえば、フロイント不完全アジュバント、細菌性のリポ多糖体、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、ムラミルジペプチド、レシチン、緩衝物質、セルロースを素材とした物質、及びポリエチレングリコールが含まれる。

【００６３】

生物検体においてＨＥＶに対する抗体ＩｇＧ、ＩｇＭ、又は全抗体を検出する診断キット及び方法

本発明のポリペプチドは、生物検体においてＨＥＶに対する抗体ＩｇＧ、ＩｇＭ、又は全抗体の存在を検出するために使用でき、既存の検出キット又は検出法より感度及び特異性が高いことが特徴である。したがって、本発明は、抗体／抗原相互作用に適する条件下、検出すべき検体と検出に有効な量の本発明のポリペプチドを接触させるステップを含む、生物検体におけるＨＥＶ感染の存在を判定する方法を提供する。

【００６４】

本発明で検出対象となる生物検体を供与するものには、それだけに限らないが、ヒト、及びヒヒ、類人猿、サルなど、他の霊長類、ウシ、ヤギ、ブタ、ウサギ、マウスなど、実用動物、並びにネコ、イヌなど、ペット類が含まれる。

【００６５】

本発明の別の態様では、生物検体においてＥ型肝炎ウイルスに対する抗体ＩｇＧを判定する診断キットであって、少なくとも１種の本発明のポリペプチドを含み、望むなら、前記ポリペプチドは、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出対象の生物検体のＩｇＧに指向性のある、市販又は型通りに生成された検出可能な標識抗体抗ＩｇＧ、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；望むなら、適切な緩衝系をさらに含

むキットを提供する。

【００６６】

本発明の一実施形態では、検出対象となる前記生物検体はヒト由来であり、抗体は抗ヒトＩｇＧ抗体である。より具体的には、本発明のＩｇＧ抗体用検出キットは、ＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープを有するポリペプチド又はその免疫原性断片をさらに含み、前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片が、任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合している。

【００６７】

前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片が任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合した状態にするには、遺伝子組換え法によってキメラポリペプチドを産生させることが好ましい。化学的方法を使用して、前述のポリペプチドに前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片を共有結合させることもできる。

【００６８】

本発明の別の態様では、生物検体においてＥ型肝炎ウイルスに対する抗体ＩｇＭを判定する診断キットであって、検出対象の生物検体に由来するＩｇＭに指向性のある捕捉抗体としての、市販又は型通りに生成された検出可能な標識抗体抗ＩｇＭを含み、望むなら、前記捕捉抗体は、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出可能に標識された少なくとも１種の本発明のポリペプチド、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；望むなら、適切な緩衝系をさらに含むキットを提供する。

【００６９】

本発明の一実施形態では、検出対象となる前記生物検体はヒト由来であり、抗体は抗ヒトＩｇＭ抗体である。より具体的には、本発明のＩｇＭ抗体用診断キットは、ＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープを有するポリペプチド又はその免疫原性断片をさらに含み、前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片は、任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合している。

【００７０】

前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片が任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合した状態にするには、遺伝子組換え法によってキメラポリペプチドを産生させることが好ましい。化学的方法を使用して、前述のポリペプチドに前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片を共有結合させることもできる。

【００７１】

本発明の別の態様では、生物検体においてＥ型肝炎ウイルスに対する抗体ＩｇＭを判定する診断キットであって、検出対象の生物検体に由来するＩｇＭに指向性のある捕捉抗体としての、市販又は型通りに生成された検出可能な標識抗体抗ＩｇＭを含み、望むなら、前記捕捉抗体は、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出可能に標識された少なくとも１種の本発明のポリペプチド、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；望むなら、適切な緩衝系をさらに含むキットを提供する。

【００７２】

本発明の一実施形態では、検出対象の前記生物検体はヒト由来であり、抗体は抗ヒトＩｇＭ抗体である。より具体的には、本発明のＩｇＭ抗体用診断キットは、ＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープを有するポリペプチド又はその免疫原性断片をさらに含み、前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片は、任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合している。

【００７３】

前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片が任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合した状態にするには、遺伝子組換え法によってキメラポリペプチドを産生させることが好ましい。化学的方法を使用して、前述のポリペプチドに前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片を共有結合させることもで

きる。
【００７４】
本発明のさらにまた別の態様では、生物検体においてＥ型肝炎ウイルスに対する全抗体を判定する診断キットであって、少なくとも１種の本発明のポリペプチドを含み、望むなら、前記ポリペプチドは、適切な支持体の表面に予め塗布されており；さらに、検出可能に標識された少なくとも１種の請求項１に記載のポリペプチド、及び前記の検出可能な標識に合致する検出剤を含み；請求項１に記載のポリペプチドから選択された、支持体表面に予め塗布するための前記ポリペプチド、及び請求項１に記載のポリペプチドから選択された検出可能な標識ポリペプチドが同じポリペプチドでも異なるものでもよいキットを提供する。
【００７５】
より具体的には、本発明の全抗体用診断キットは、ＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープを有するポリペプチド又はその免疫原性断片をさらに含み、前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片は、任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合している。
【００７６】
前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片が任意選択で本発明のポリペプチドに共有結合した状態にするには、遺伝子組換え法によってキメラポリペプチドを産生させることが好ましい。化学的方法を使用して、前述のポリペプチドに前記のＨＥＶ　ＯＲＦ３内免疫原性エピトープ又はその免疫原性断片を共有結合させることもできる。
【００７７】
当技術分野では、前述の診断キットにおいて、様々な市販品を得ることも、様々な動物を利用する方法によって型通りに産生することもできる抗ヒトＩｇＧ又は抗ヒトＩｇＭを使用することが知られている。あるいは、検出対象の生物検体を供与する特定の動物に対する抗ＩｇＧ又は抗ＩｇＭを使用するが、これは、関係のある動物を利用することによって生成できる。抗体を調製する目的では、選択される動物には、それだけに限らないが、ヤギ、ヒツジ、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、ブタなどが含まれる。標識化のための前記の検出可能な標識を単独又は他の組成物もしくは化合物との併用で使用すると、検出可能なシグナルが得られて、検体中の問題の物質の存在を視覚化できる。前記の検出可能な標識は、検出の技術分野で知られており、かつ容易に入手できる材料でよく、それには、これだけに限らないが、酵素マーカー、蛍光マーカー、放射性マーカーなどが含まれる。したがって、本発明は、検出標識を特定の選択に限定するものではなく、当技術分野で知られている検出法がすべて含まれるものと考える。利便性を考えて、前記検出剤は、キットの形で提供できる。
【００７８】
前記キットは、任意選択で、本発明のポリペプチドを予め塗布したマイクロタイタープレート、適切に処方された様々な希釈剤及び／もしくは緩衝剤、標識物質、又は酵素基質、補因子、発色団など、特異的に結合した抗原／抗体複合体を検出するためのシグナルを発生する他の薬品をさらに含む。その中の他の構成要素は、当分野の技術者に容易に選択できる。
【００７９】
さらに、生物検体においてＥ型肝炎ウイルスに対する抗体ＩｇＧを検出する方法であって、支持体表面上に少なくとも１種の本発明のポリペプチドを固定化するステップ；次いで、適切な緩衝液で洗浄するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体を接触させるステップ；適切な緩衝液で再度洗浄するステップ；次いで、市販又は型通りに生成された検出可能な標識抗ＩｇＧ抗体と共に、抗原／抗体が十分に相互作用する一定の時間インキュベートするステップであって、前記抗ＩｇＧが、検出対象の生物検体を供与した動物に対するものであるステップ；並びに、その後、前記検出標識に合致する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原／抗体複合体を検出し、検体中の抗体Ｉｇ

Ｇの量を算出するステップを含む方法も提供する。
【００８０】
本発明の一実施形態では、検出対象となる前記生物検体はヒト由来であり、使用する前記抗体は抗ヒトＩｇＧである。
【００８１】
本発明の別の実施形態では、前もって決められた支持体の表面に抗原としてのポリペプチドＮＥ２Ｉを予め塗布する。本発明の別の実施形態では、特定の支持体表面を予め塗布する抗原として、ＨＥＶ　ＯＲＦ３内エピトープと結合したポリペプチド２４７を使用する。
【００８２】
本発明の別の態様では、生物検体においてＥ型肝炎ウイルスに対する抗体ＩｇＭを検出する方法であって、支持体表面上に、市販又は型通りに生成された抗体抗ＩｇＭを固定化するステップであって、前記抗ＩｇＭが、検出対象の生物検体を供与した動物に対するものであるステップ；適切に洗浄するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の検体、好ましくは血清を接触させるステップ；適切な緩衝液で再度洗浄するステップ；次いで少なくとも１種の検出可能に標識された本発明のポリペプチドと共に、抗原と抗体が相互作用するのに十分な時間インキュベートするステップ；並びに、その後、前記の検出可能な標識に合致する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原／抗体複合体を検出し、検体中の抗体ＩｇＭの量を算出するステップを含む方法を提供する。
【００８３】
本発明の一実施形態では、検出対象となる前記生物検体はヒト由来であり、使用する前記抗体は抗ヒトＩｇＭである。
【００８４】
本発明の別の実施形態では、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させたポリペプチド２２５Ｎによって、検体中の前記ＩｇＭ抗体を検出する。本発明のさらにまた別の実施形態では、ＨＥＶ　ＩＲＦ３のエピトープと結合させたポリペプチド２４７を、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させて、検体中に含まれるＩｇＭを検出する。
【００８５】
さらに、生物検体においてＥ型肝炎ウイルスに対する全抗体を検出する方法であって、支持体表面上に少なくとも１種の本発明のポリペプチドを固定化するステップ；適切な緩衝液で洗浄するステップ；抗原と抗体の相互作用に適する条件下、これに検出対象の生物検体を接触させるステップ；任意選択で、適切な緩衝液で再度洗浄するステップ；検出可能な標識された当該ポリペプチドの１つと共に、抗原と抗体が相互作用するのに十分な時間インキュベートするステップ；並びに、検出可能な標識を有するＥ型肝炎ウイルス抗原及び合致する検出剤を使用して、支持体表面上の抗原／抗体複合体を検出し、検体中の全抗体の量を算出するステップを含む方法も提供する。
【００８６】
本発明の一実施形態では、支持体表面上にＮＥ２Ｉを予め塗布し、西洋ワサビペルオキシダーゼと予め結合させたポリペプチド２２５によって、検体中の全抗体を検出する。本発明の別の実施形態では、支持体表面上に、ＨＥＶ　ＯＲＦ３からのエピトープと結合させたＮＥ２Ｉを予め塗布し、ＨＥＶ　ＯＲＦ３からのエピトープと前もって結合させてある、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させたポリペプチド２２５によって、検体中の全抗体を検出する。
【００８７】
以下の図面及び実施例の記載に関して、本発明の詳細をさらに説明するが、これは、いかようにも本発明の保護範囲を限定するものと解釈すべきでない。
【００８８】
（実施例）
別段の指示がない限り、本発明の分子生物学の実験方法およびイムノアッセイはすべて、「分子クローニング：実験室必携（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：ａ　Ｌａｂｏ

ｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）」第２版、Ｊｏｓｅｐｈ Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｄａｖｉｄ Ｗ．Ｒｕｓｓｅｌｌ著、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、および「分子生物学におけるショートプロトコル（Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）」、第３版、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．、１９９５年の基本的な記載事項に従う。制限エンドヌクレアーゼの使用は、提供者が提示するプロトコルに従う。

【００８９】

実施例１　本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の調製、およびそれを含む発現ベクターの作製

鋳型としてのＨＥＶ　ＯＲＦ２画分の調製

問題の遺伝子を調製するにあたり、中国新疆省のＨＥＶ感染患者からクローン化した、鋳型としての全長ＨＥＶ遺伝子（Ａｙｅ，Ｔ．Ｔ．、Ｕｃｈｉｄａ等、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ第２０巻（１３）３５１２ページ（１９９２年）；遺伝子銀行受入れ番号Ｄ１１０９２）、ならびに上方のプライマーとしてのＯＲＦ２　ＦＰ：５’－ａｔｇｃｇｃｃｃｔｃｇｇｃｃａ－３’および下方のプライマーとしてのＯＲＦ２　ＲＰ：５’－ａａａｔａａａｃｔａｔａａｃｔｃｃｃｇａ－３’の２種のプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応法（ＰＣＲ）を利用する。ＰＣＲ反応は、ＰＣＲサーマルサイクラー（ＢＩＯＭＥＴＲＡｔ３）において、９４℃で５分間；次いで９４℃で５０秒間、５７℃で５０秒間、および７２℃で２．５分間を２５サイクル；最後に７２℃で１０分間という条件下で実施する。本発明のポリペプチドを調製する鋳型としてのＨＥＶ　ＯＲＦ２からのＤＮＡ断片約２ｋｂが得られる。先述のＰＣＲ産物を市販のベクターｐＭＤ１８－Ｔ（ＴＡＫＡＲＡ社）にさらに連結し、次いでＯＲＦ２遺伝子が挿入された陽性クローンが識別されるようにＢａｍＨＩ／ＨｉｎｄＩＩＩで消化する。Ｍ１３（＋）／（－）をプライマーとして使用して、得られたものの配列を決定し、それによって本発明のポリペプチドを調製する鋳型として使用する２本のＨＥＶ　ＯＲＦ２ＤＮＡ断片、すなわち一方が保存配列（鋳型１、配列番号５）、他方が変異配列（鋳型２、配列番号６）を識別する。

【００９０】

配列を並べ合わせ、ＯＲＦを解析することによって、本発明のポリペプチドを調製する鋳型としてのＨＥＶ　ＯＲＦ２の変異配列（配列番号６）は、保存配列（配列番号５）に対して塩基Ａが欠落しており、これがＯＲＦ２内のアミノ酸残基６０４～６０５がＨｉｓ－Ｓｅｒ－ＶａｌからＰｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇに変異するシフト変異をもたらし、さらにこのために、この変異によって生成した終止コードタグによって前記ポリペプチドへの翻訳が停止することが判明している。

【００９１】

以下では本発明のポリペプチド２０１を使用する実施例によって、ポリペプチド２０１をコードする核酸およびそれを含む発現ベクターの調製を例示する。

【００９２】

本発明のポリペプチド２０１をコードするポリヌクレオチドおよびそれを含む発現ベクターの調製

ポリメラーゼ連鎖反応法（ＰＣＲ）において、上記で得た配列の配列番号５を鋳型として使用し、ならびにＢａｍＨＩ部位、ＮｄｅＩ部位（ＣＡＴ　ＡＴＧ）、および大腸菌系の翻訳開始コドンとしてのＡＴＧを導入した前方向プライマー２０１ＦＰ：５’－ｇｇａｔｃｃｃａｔａｔｇｇｔｔａｔｔｃａｇｇａｔｔａｔｇａｃ－３’（表１を参照のこと）と、終止コドンおよびＥｃｏＲＩ部位を導入した逆方向プライマーとしての２０１ＲＰ：５’－ｃｔｃｇａｇａａａｔａａａｃｔａｔａａｃｔｃｃｃｇａ－３’（表１を参照のこと）とを使用するものを利用して遺伝子を合成する。ＰＣＲは、サーモサイクラーにおいて、９４℃で５分間熱変性させ、次いで９４℃で５０秒間、５７℃で４０秒間、および７２℃で４０秒間のサイクルを３０回、さらに最後に７２℃で１０分間増幅させて実施する。得られた～６００ｂｐのＰＣＲ産物が本発明のポリペプチド２０１をコードするヌクレオチド配列であることを確認する。

【００９３】
本発明のポリペプチドを発現する発現ベクターｐＴＯ－Ｔ７の作製は、参照文献のＬＵＯ Ｗｅｎ－Ｘｉｎ等、Ｃｈｉｎｅｓｅ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２０００年、第１６巻：５３～５７ページにある方法に従うものである。前記方法は、前述のＰＣＲ産物を市販のｐＭＤ１８－Ｔベクター（ＴＡＫＡＲＡ社）にクローン化するステップ；ＢａｍＨＩ／ＨｉｎｄＩＩＩで消化して、ヌクレオチドによってコードされたポリペプチド２０１が挿入された陽性サブクローンを識別し、これを得るステップ；前記陽性サブクローンをＮｄｅＩおよびＥｃｏＲｌでさらに消化して、ポリペプチド２０１の遺伝子を含むヌクレオチド配列を得るステップ；次いでＮｄｅＩ／ＥｃｏＲＩで消化したｐＴＯ－Ｔ７にクローン化するステップを含む。ＮｄｅＩ／ＥｃｏＲＩで消化することによって、ポリペプチド２０１のコード化配列が組み入れられている陽性クローンｐＴＯ－Ｔ７－ＯＲＦ２－２０１を識別する。図１に、ＯＲＦ２０１ポリペプチドの発現ベクターを作製するための方策を例示する。

【００９４】
同様に、カルボキシル末端がＰｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇでない他方の本発明のポリペプチドも、配列番号６の配列を鋳型として使用し、個々の問題のポリペプチド向けに特別に設計された表中の各プライマーを使用することによって、上記の方法に従って得ることができる。

【００９５】
カルボキシル末端がＰｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇである本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド、およびそれを含む発現ベクター
カルボキシル末端がＰｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇである本発明のポリペプチドは、上述のＯＲＦ２－２０１の発現ベクターでの方法に従って得た発現ベクターで大腸菌ＥＲＲ２５６６を形質転換することによって発現される。具体的には、上述のＨＥＶ ＯＲＦ２変異配列の配列番号６を鋳型とし、本発明の個々のポリペプチド向けに特別に設計された個々の前方向／逆方向プライマー（表１を参照のこと）を使用して、ポリペプチド２０１の発現ベクターを作製するのと同様の条件下でのＰＣＲによって対応する発現ベクターを得る。この方法では、免疫原性および免疫反応性の良好な一連の本発明のポリペプチドが得られ、得られるポリペプチドは、そのＮ末端にＭｅｔが付加され、カルボキシル末端のアミノ酸６０３のＰｒｏである３’末端において、５’から３’の方向にアミノ酸配列－Ｐｒｏ－Ｐｒｏ－Ａｒｇが付加されている。

【００９６】
表１ 本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチドを調製するためのPCR増幅用鋳型および対応する前方向／逆方向プライマー

ポリペプチド	HEV ORF2 位置	鋳型番号	前方向プライマー(FP)および逆方向プライマー(RP)
NE2	394-603ppr*	2	HEFP:5’-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3’ HERP:5’-ctcgagaaataaactataactcccga-3’
217C	390-603ppr	2	217FP:5’-ggatcccatatgtcggctggtggccag-3’ HERP:5’-ctcgagaaataaactataactcccga-3’
193C	414-603ppr	2	E220F:5’-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3’ HERP:5’-ctcgagaaataaactataactcccga-3’
178C	429-603ppr	2	E235F:5’-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3’ HERP:5’-ctcgagaaataaactataactcccga-3’
168C	439-603ppr	2	E46F:5’-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3’ HERP:5’-ctcgagaaataaactataactcccga-3’
158C	449-603ppr	2	E56F:5’-ggatcccatatgcaggaccgaccgac-3’ HERP:5’-ctcgagaaataaactataactcccga-3’

148C	459-603ppr	2	E66F:5'-ggatcccatatgtcgcgccctttt-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
138C	469-603ppr	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgctttggctttctc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
NE2D	394-603	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E2RD:5'-gaattcttagggggctaaaacagc-3'
217D	390-603	2	217FP:5'- ggatcccatatgtcggctggtggccag -3' E2RD:5'-gaattcttagggggctaaaacagc-3'
193D	414-603	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E2RD:5'-gaattcttagggggctaaaacagc-3'
178D	429-603	2	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' E2RD:5'-gaattcttagggggctaaaacagc-3'
NE2I	394-606	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatgggggggctaaaacag-3'
217I	390-606	2	217FP:5'- ggatcccatatgtcggctggtggccag -3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatgggggggctaaaacag-3'
193I	414-606	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatgggggggctaaaacag-3'
178I	429-606	2	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatgggggggctaaaacag-3'
266N	394-660	1	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
235N	394-628	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 235NR:5'- gaattcttacgggcagaagtcatcg -3'
225N	394-618	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 225RP:5'-gaattcttaggcagggtagtccatgg-3'
209N	394-602	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'
208N	394-601	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 208RP:5'-gaattcttataaaacagcaaccgc-3'
207N	394-600	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 207RP:5'-gaattcttaaacagcaaccgcg-3'
203N	394-596	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E203R:5'-gaattcttaggaaatagagacgggac-3'
193N	394-586	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E220R:5'-ctcgagttaagtggtgtaagtggaaatag-3'
176N	394-569	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E237R:5'-ctcgagttacagttggtcactagcagt-3'
280	380-660	1	227FP:5'-ggatcccatatgctaggcggtctaccca-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'

270	390-660	1	217FP:5'- ggatcccatatgtcggctggtggccag -3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
260	400-660	1	207FP:5'-ggatcccatatgcccgtcgtctcagc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
247	414-660	1	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
232	429-660	1	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
222	439-660	1	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
205	414-618	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' 225RP:5'- gaattcttaggcagggtagtccatgg -3'
201	459-660	1	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
191	469-660	1	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgctttggctttctc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
189	414-602	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'
188	414-601	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' 208RP:5'-gaattcttataaaacagcaaccgc-3'
183	414-596	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E203R:5'-gaattcttaggaaatagagacgggac-3'
173	414-586	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E220R:5'-ctcgagttaagtggtgtaagtggaaatag-3'
170	459-628	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 235NR:5'-gaattcttacgggcagaagtcatcg-3'
C160	469-628	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgctttggctttctc-3' 235NR:5'- gaattcttacgggcagaagtcatcg -3'
N160	459-618	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 225RP:5'- gaattcttaggcagggtagtccatgg -3'
150	469-618	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgctttggctttctc-3' 225RP:5'- gaattcttaggcagggtagtccatgg -3'
144	459-602	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'
142	459-600	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 207RP:5'-gaattcttaaacagcaaccgcg-3'
134	469-602	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgctttggctttctc-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'

*: pprは、C末端上の603位のアミノ酸Proである3'末端において、5'から3'の方向にアミノ酸配列-Pro-Pro-Argが付加されているポリペプチドを表す。

【００９７】

実施例２　ポリペプチド２０１の発現

形質転換用の（塩化カルシウム法で発生させた）大腸菌ＥＲＲ２５６６コンピテント細胞４０ｕＬにプラスミドｐＴＯ－Ｔ７－ＯＲＦ２－２０１（０．１５ｍｇ／ｍＬ）１ｕＬを加えた。次いで、混合物をカナマイシンＬＢプレートにスクロールし、個々のクローンが得られるまでプレートを３７℃で１０～１２時間インキュベートした。個々のクローンを選び取り、さらに管中ＬＢ培地４ｍＬに接種し、培養物のＯＤ$_{550nm}$値が約１．５に

なるまで、３７℃で１０時間、２２０ｒｐｍで振とうした。次いで、１ｍＬの培地を後の使用に備えて４℃で保管し、残りの３ｍｌの培地（最終濃度は０．３ｍＭ）に０．５ＭのＩＰＴＧ２ｕＬを加えた。ＩＰＴＧ含有培地を２２０ｒｐｍで振とうしながら３７℃で４時間インキュベートを続けて、問題のポリペプチドの発現を誘導した。誘導を行った培地１．５ｍＬを３０秒間１２０００ｇでの遠心分離にかけた。沈殿した細胞を１００ｕＬのタンパク質添加液（５０ｍＭのトリスＣｌｐＨ６．８、１００ｍＭのＤＴＴ、２％のＳＤＳ、０．１％のブロモフェノールブルー、１０％のグリセロール）に再懸濁させ、さらに１０分間煮沸し、次いで１０分間１２０００ｇでの遠心分離にかけた。１０ｕｌの上清を１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにかけて、ポリペプチド２０１の発現を解析した。高い収率で発現したクローンをさらなる発酵に使用した。

【００９８】

ＬＢ培地５００ｍＬを含む１Ｌ容エルレンマイヤーフラスコにシーク培地２００ｕＬを加えた。培養物のOD_{550nm}値が２．０に達するまで、１９０ｒｐｍで振とうしながら３７℃で約１１時間インキュベートした後、０．５ＭのＩＰＴＧ３００ｕＬを加えて、最終含有量を０．３ｍＭとした。前述の条件下、この混合物をさらに４時間インキュベートした。誘導を行った１．５ｍＬの培養物を３０秒間１２０００ｇでの遠心分離にかけた。細胞を１００ｕＬのタンパク質添加液に再懸濁させ、１０分間煮沸し、次いで１０分間１２０００ｇでの遠心分離にかけた。１０ｕｌの上清を１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにかけて、ポリペプチド２０１の発現を解析した。ＵＶＩゲル画像処理器（Ｕ－ＶＩｔｅｃｈ、ＤＢＴ－０８モデル）によって示された（クーマシーブリリアントブルーＲ２５０で染色を行う）ＳＤＳ－ＰＡＧＥでの解析結果は、ポリペプチド２０１の発現が、発現した総細胞タンパク質の約３５％であることを示した。

【００９９】

実施例３　大腸菌中に発現させたポリペプチド２０１封入体の精製

実施例２で得た組換えポリペプチド２０１を含有する大腸菌の培地を１５分間４０００ｒｐｍでの遠心分離にかけ、培養物の沈殿各５００ｍＬを１５ｍＬの溶解緩衝液（dH_2O中５０ｍＭのトリスＣｌ、１０ｍＭのＥＤＴＡ、および３００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．２）に再懸濁させた。超音波処理器において細胞を超音波処理した（Ｕｉｌｂｒａ－ＣｅｌｌＶＣＸ５００、ＳＯＮＩＣＳ　＆　ＭＡＴＥＲＩＡＬＳ　ｃｏｍｐａｎｙ、パワー７０％、４０秒間オン、６０秒間オフ、合計２０分間の超音波処理）。超音波処理した混合物を４℃で１０分間１２０００ｒｐｍでの遠心分離にかけ、ペレットを２％のトリトンＸ１００を含む緩衝液Ｉ溶液（２００ｍＭのトリスＣｌ、ｐＨ８．５；５ｍＭのＥＤＴＡ；１００ｍＭのＮａＣｌ）に再懸濁させ、最終体積は、元の溶解液と同じである。混合物を３７℃で３０分間、２００ｒｐｍで振とうし、次いで４℃で１０分間１００００ｒｐｍでの遠心分離にかけた。ペレットを等しい体積の緩衝液Ｉに再懸濁させ、混合物を超音波処理した（４０秒間オン、６０秒間オフ、パワー７０％、合計で３分間の超音波処理）。その後、混合物を４℃で１０分間遠心分離した（１００００ｒｐｍ）。ペレットを２％のトリトンＸ１００を含む緩衝液Ｉに再懸濁させて、最終体積を前と同じにした。混合物を３７℃で３０分間振とう（２００ｒｐｍ）した後、４℃で１０分間遠心分離した（１０００ｒｐｍ）。ペレットを３７℃で３０分間振とう（２００ｒｐｍ）して、等しい体積の緩衝液Ｉに再懸濁させた。次いで、混合物を４℃で１０分間、１００００ｒｐｍで遠心分離した。ペレットを２Ｍの尿素を含む緩衝液Ｉに再懸濁させて、最終体積を元の混合物と同じにした。３７℃で３０分間、２００ｒｐｍで振とうした後、混合物を４℃で１０分間、１００００ｒｐｍで遠心分離した。この上清に２０１－２Ｍと印をつけた。ペレットは、４Ｍの尿素を含む緩衝液Ｉに再懸濁させて、最終体積を前と同じにした。３７℃で１時間振とう（２００ｒｐｍ）した後、混合物を一晩４℃で保管し、次いでこれを４℃で１０分間、１２０００ｒｐｍで遠心分離した。この上清に２０１－４Ｍと印をつけた。上記の試料の純度はすべて、１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって解析した。図３に結果を示す。

【０１００】

実施例４　組換えポリペプチド２０１の再生

実施例３に従って調製した試料２０１－４Ｍ１００ｍｌを２袋の透析バッグ（３６ＤＭ、保持ＭＷ：８０００～１００００、米国Ｕｎｉｔｅｄ　Ｃａｒｂｏｎ　Ｃｏｍｐｏｕｎｄ）に装入し、１×ＰＢＳ（Na_2HPO_4．１２H_2O　７３．３４４ｇ、KH_2PO_4　４ｇ、ＮａＣｌ　１６３、６３２ｇ、ＫＣｌ　４．０２４ｇを含有する２０×ＰＢＳ（１Ｌ）、ｐＨ７．４５）９００ｍｌを含む１Ｌ容ビーカー中で攪拌しながら、２５℃で終夜（１０時間）透析を行うと、透析バッグ中に白色の沈殿が認められた。透析液を補給し、透析を続け、次いで透析液を３時間毎に４回補給した。原則として、透析が済んだときの試料中の尿素含有量は、４×１０－６Ｍである。透析した試料を２５℃で１０分間、１２０００ｒｐｍで遠心分離し、上清を０．２２μｍの濾過膜で濾過してさらに精製し；４Ｍの尿素／緩衝液Ｉに懸濁させたペレットを新しい透析で使用して、その間に沈殿を出現させることもできるが、得られるタンパク質試料の濃度が最初に得たものより低くなる。

【０１０１】

実施例５　ゲル濾過ＨＰＬＣによる組換えポリペプチド２０１の精製

実施例４の方法に従って調製した再生２０１の試料を以下のようなＨＰＬＣ、すなわち、

機器：Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｇｏｌｄ　Ｎｏｕｖｅａｕ　１２５ＮＭＰ／１６６ＮＭＰ　ＨＰＬＣ、

カラム：ＴＳＫ　ＧＥＬ　ＳＷ３０００　２１．５ｍｍ×６０ｃｍ、

溶離：１×ＰＢＳ　ｐＨ７．４５、

流速：４ｍｌ／分、

検出：２８０ｎｍのＵＶ、

試料：４ＭのＮＥ２（８ｍｇ／ｍｌ）２ｍｌ、

収集：ウィンドウ式自動頂角収集（ａｕｔｏｍａｔｉｃ　ａｐｅｘ　ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｗｉｎｄｏｗ　ｍｏｄｅ）、

収集時間：１チューブ／２０秒、

収集遅延：６秒によって精製した。

【０１０２】

クロマトグラムの結果は、分子の濾過が非常に有効であることを示したが、頂角の成分は、単量体および二量体、ならびにこれらの間に均等に分布するタンパク質を含んでいる。試料タンパク質を沸騰湯中で１０分間処理した後、最高で９５％を越える目的のタンパク質ピークの単量体純度について１２％アクリルアミドのＳＤＳ－ＰＡＧＥによって解析した。それによって、ＯＲＦ２－２０１単量体が、自己凝集に加えて他の小さいタンパク質とも凝集し、クロマトグラムの際に一緒に溶離した多量体の間で相互作用が生じることも示されている。

【０１０３】

実施例６　本発明の組換えポリペプチド産物の特徴づけ

実施例１～５の方法に従って、本発明の組換えポリペプチドを作製し、発現させた。さらに、各々の組換えペプチドを洗浄し、実施例３～４の方法に従って透析にかけた。表２に、各組換えペプチドのＥ型肝炎ウイルスにおける対応するアミノ酸配置、発現された組換え産物の再生特性、ＳＤＳ－ＰＡＧＥでの単量体および二量体の比率、ならびに多量体の生成を示す。

【０１０４】

表2 各組換えペプチドのE型肝炎ウイルスにおける対応するアミノ酸配置、発現された組換え産物の再生特性、SDS－PAGEでの単量体および二重体の比率、ならびに多量体の生成

ポリペプチド名	配列番号	単量体百分率	二重体百分率	多量体化	透析による再生
NE2	配列番号 2	10%	90%	有	有
193C	配列番号 3	5%	95%	有	有
178C	配列番号 4	100%	0%	無	有
168C	配列番号 7	100%	0%	無	有
158C	配列番号 8	60%	40%	無	有
148C	配列番号 9	100%	0%	無	有
138C	配列番号 10	100%	0%	無	有
NE2I	配列番号 1 aa394~aa606 配列番号 1	5%	95%	無	有
217I	aa390~aa606 配列番号 1	85%	15%	無	有
193I	aa414~aa606 配列番号 1	100%	0%	無	有
178I	aa429~aa606 配列番号 1	60%	40%	無	有
NE2D	aa394~aa603 配列番号 1	80%	20%	無	有
217D	aa390~aa603 配列番号 1	20%	80%	無	有
193D	aa414~aa603 配列番号 1	100%	0%	無	有
178D	aa429~aa603 配列番号 1	100%	0%	無	有
235N	aa394~aa628	10%	90%	無	有
225N	配列番号 1 aa394~aa618 配列番号 1	4%	96%	無	有
209N	aa394~aa602 配列番号 1	25%	75%	無	有
208N	aa394~aa601 配列番号 1	100%	0%	無	有
207N	aa394~aa600 配列番号 1	100%	0%	無	無

203N	aa394~aa596 配列番号1	100%	0%	無	無
193N	aa394~aa586 配列番号1	100%	0%	無	無
176N	aa394~aa569 配列番号1	100%	0%	無	無
247	aa414~aa660 配列番号1	10%	90%	無	有
232	aa429~aa660 配列番号1	10%	90%	無	有
222	aa439~aa660 配列番号1	10%	90%	無	有
205	aa374~aa618 配列番号1	10%	90%	無	有
201	aa459~aa660 配列番号1	1%	99%	無	有
189	aa414~aa602 配列番号1	2%	98%	無	有
188	aa414~aa601 配列番号1	4%	94%	無	有
183	aa414~aa596 配列番号1	100%	0%	無	無
173	aa414~aa586	100%	0%	無	無

【０１０５】
表２で示したとおり、ＨＥＶ　ＯＲＦ２の配列番号１のアミノ酸配列に含まれる本発明のポリペプチドは、そのカルボキシル末端が配列番号１のａａ６０１（Ｌｅｕ）とａａ６６０の間に位置する場合、よく再生する能力を有し、これによって自然のＨＥＶタンパク質に近い次元構造を示すようになる。具体的には、ペプチド２４７、２３２、２２２、２０１、２３５Ｎ、２２５Ｎ、２０９Ｎ、ＮＥ２Ｉ、２１７Ｄ、２０５、１８９、１８８、ＮＥ２（配列番号２）、および１９３Ｃ（配列番号３）は、単量体分子量および２倍の単量体分子量に相当する位置に発現バンドを有するが、二量体の量が明らかに単量体を上回っていることが判明した。ＮＥ２および１９３Ｃが、より大きい分子量の位置にはっきりとしたバンドを有することが判明し、前記ペプチドが自発的に多量体化することを示唆した。

【０１０６】
表２の再生可能な組換えペプチド１９３Ｃ、２０１、２０８Ｎ、２０９Ｎ、ＮＥ２、２２２、２２５Ｎ、２３２、および２４７をゲル濾過ＨＰＬＣによってさらに精製し、それぞれを１０分間２００００ｇで遠心分離し、０．１μｍのAl_2O_3濾過膜で濾過した後、動的光散乱計（ＤＹＮＡＰＲ０９９－Ｄ－５０動的光散乱計、ＰＲＯＴＥＩＮ　ＳＯＬＵＴＩＯＮＳ製）によってこれらのペプチドの動的半径を測定し、表３ではその構築状態を推測してある。得られた各々の組換えペプチドの分子半径は、その単量体の予想半径よりも明らかに大きい。推定上の分子量に従うと、このようなペプチドの形状が、溶液中に少なくとも二量体を形成し、その大部分が高次の多量体を形成すると結論付けることができるが、これはＳＤＳ－ＰＡＧＥでの挙動と同調している。実際、上記の方法で調製した本発明のポリペプチドは、最高で１８０個以上の単量体の多量体を形成し得る。さらに、発明のポリペプチドが予想外の特性、すなわち大腸菌系によって発現された上記の前記組換えペプチドが、変性剤を含まないＰＢＳ溶液中で自発的に多量体化するので、そのワクチンとしての免疫原性を増強するのに有利であることも実証された。

【０１０７】

表3 本発明の再生可能な組換えペプチドの凝集状態の動的光散乱計による検出

ポリペプチド	理論上の単量体分子量 (KD)	測定半径（nm）	推定上の分子量 (KD)	推定上の凝集状態
193C	21.2	3.44	47	二量体 (21.2 ×2 = 42.4)
201	22.1	3.08	62.7	三量体 (22.1 ×3 = 66.3)
208N	22.9	3.57	66.1	三量体 (22.9 ×3 = 68.7)
209N	23	4.10	91.	四量体 (23 ×4=92)
NE2	24.4	4.04	90	四量体 (24.4 ×4=97.6)
222	24.4	3.72	73	三量体（24.4 ×3=73.2）
225N	24.8	3.91	82	三量体 (74.4) 四量体 (99.2) 共存
232	25.5	3.97	85	三量体 (25.5 ×3=76.5)
247	27.2	4.28	101	二量体 (27.2 ×4=108.8)
266N	29.3	4.41	108	四量体 (29.3 ×4=117.2)

【０１０８】

実施例７　ポリペプチドの物理化学的特性

封入体からの再生

実施例１～３で記載したとおりに調製した組換えポリペプチドの封入体を４Ｍの尿素で変性させ、次いで実施例４で記載したとおりに、１００を超える量のＰＢＳでの透析にかけた。透析したものを１０分間１２，０００ｒｐｍで遠心分離した。上清は、若干またはすべての組換えポリペプチドを含んでおり、それによって前記組換えポリペプチドに再生能力があることを実証する。

【０１０９】

組換えペプチドの重合

従来のＳＤＳ－ＰＡＧＥを利用する上清の解析において、それぞれ単量体、二量体、および多量体に対応するバンドを識別した。従来のウェスタンブロット法によって前記バンドの特異性をさらに確かめ、それによって組換えポリペプチド２０１が再生後に重合体を形成することを実証した（図４を参照のこと）。

【０１１０】

光走査法によるポリペプチド２０１の分子サイズの決定

実施例６に従って、ポリペプチド２０１をＨＰＬＣによって精製した後、１０分間２０，０００ｒｐｍで遠心分離し、次いで０．１ｕｍのアルミナ製ミリポア膜で濾過した。濾液を動的光走査計（ＤＹＮＡ－ＰＯＲ９９－Ｄ－５０、米国ＰＲＯＴＥＩＮ　ＳＯＬＵＴＩＯＮ　Ｃｏｍ．Ｌｔｄ．）による８２４．０ｎｍでの測定にかけた。算出には制御アルゴリズムを使用し、数多くの標準試料によってその実用性を確かめた。分子の半径は、％ピーク強度に対応する動的半径から算出した。溶媒は、試料緩衝液ＰＢＳとした。図５に示す測定結果は、変性剤を含まない溶液中のポリペプチド２０１の平均半径が３．０８ｎｍであったことを示唆し、（三量体に相当する）ＭＷ６２．７ＫＤが算出された。本発明の技術者には、前記の本発明のポリペプチドが実際に１８０個以上の単量体の重合体を形成したことが知られている。

【０１１１】

実施例８　マウス抗ＮＥ２単クローン抗体の調製

ハイブリドーマ細胞系の確立

第一次の免疫化では、各々のＢａｌｂ／Ｃ雌性マウス（生後６～８週間）に５ｕｇの組換え抗原ＮＥ２で乳化したフロイント不完全アジュバント（総体積５０ｕＬ）で免疫化を施した。１５日後、マウスにフロイント不完全アジュバント中に乳化された同じ量のＮＥ２を筋肉内投与して２回目の免疫化を施した。３０日後、アジュバントなしの抗原５ｕｇを（尾の静脈を通して）静脈内投与してマウスに追加免疫を施した。追加免疫の後７２～９６時間でマウスを屠殺した。次いで血液を採取し、脾臓を切除して、（ＲＰＭＩ１６４０培地に懸濁させて）脾細胞懸濁液を調製した。脾細胞を細胞計数器でカウントした。次いで、６：１の比で脾細胞をＳＰ２／０マウス黒色腫細胞と混合し、遠心分離した。細胞をＰＥＧ（ＰＥＧ１５００）で融合し、次いで等しい量の支持細胞と混合し、９６穴プレート（２００ｕＬ／ウェル）に移した。５％のCO_2雰囲気において、９６穴プレートを恒温器（ＥＳＰＥＣ　ＢＮＡ－３１）において３７℃でインキュベートした。３日後、培地の半分を新鮮なＨＴ培地（ＲＰＭＩ１６４０培地（ＧＩＢＣＯ　Ｉｎｔ．）を加えて１００ｍＬとし、約４５～５０℃で溶解させ、濾過して滅菌した１．３６１ｍｇのヒポキサンチンおよび０．３８８ｍｇのチミジン）に入れ替えた。７日後、９６穴プレートにＮＥ２を塗布し、以下に述べるようにハイブリドーマ細胞培養物についてのＥＬＩＳＡアッセイを実施した。ＥＬＩＳＡアッセイで陽性であった細胞を限界希釈法によってクローン化した。

【０１１２】

ＥＬＩＳＡアッセイ

実施例５で述べたＨＰＬＣによって１００ｕＬのＮＥ２を３７℃で精製し、次いで０．０５モル／ＬのＣＢ（ｄｄH_2Oを加えて１Ｌとした２０．０２ｇのNa_2CO_3および２．５２ｇの$NaHCO_3$、ｐＨ９．５）に溶解させて、最終濃度を０．３ｕｇ／ｍＬとした。９６穴ポリビニルマイクロタイタープレートを、３７℃で２時間、次いで４℃で一晩かけて、得られた溶液で処理した。マイクロタイタープレートをＰＢＳＴ（ｄｄH_2Oを加えて１Ｌとした８．０ｇのＮａＣｌ、０．２ｇのKH_2PO_4、２．９ｇの$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$、０．２ｇのＫＣｌ、および０．５ｍＬのＴｗｅｅｎ－２０、ｐＨ７．４）で洗浄して、吸収されていない抗原を除去した。次いで、ウェル毎に２００ｕＬのブロッキング用緩衝液（１×ＰＢＳ中２％のグルチン、０．２％のカゼイン、および２％のスクロース）を加え、２時間インキュベートした。次いで溶液を流し、ウェルを乾燥させ、真空中に４℃で保管した。

【０１１３】

アッセイのために、１００ｕＬの細胞培養物を各ウェルに加え、各プレートに１陽性対照（１：１００に希釈した多クローン性抗ＮＥ２血清１００ｕＬを加えたもの）および１陰性対照（ＨＴ培地１００ｕＬを加えたもの）を設けた。３７℃で３０分間インキュベートした後、プレートをＰＢＳＴで５回洗浄し、次いで乾燥させた。ＨＲＰ－ＧＡＭ　Ｉｇ（ＤＡＫＯ社）を加え、３７℃でさらに３０分間インキュベートした。プレートを再度ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ－２０で５回洗浄し、乾燥させた。プレートに５０ｕＬの基質溶液Ａ（ｄｄH_2Oを加えて７００ｍＬとした１３．４２ｇの$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$、４．２ｇのクエン酸H_2O、および０．３ｇのH_2O_2）および５０ｕＬの基質溶液Ｂ（ｄｄH_2Oを加えて７００ｍＬとした０．２ｇのＴＭＤおよび２０ｍＬのジメチルホルムアミド）を加え、３７℃で１０分間インキュベートした。５０ｕＬの停止溶液を使用して、反応を停止した。各ウェルのOD_{450}値をＥＬＩＳＡリーダーで読み取った。一般に、OD_{450}値が陰性対象より少なくとも２０倍高いと、陽性であるとみなすことができる。

【０１１４】

腹水の調製および単クローン抗体の精製

生後１０週間のＢａｌｂ／Ｃマウス各々に０．５ｍＬのフロイント不完全アジュバントを腹腔内接種した。２～７日後、ハイブリドーマ細胞を収集し、遠心分離した。次いで上清を捨て、細胞群に血清を含まない培地を加えて、最終濃度を2×10^5～2×10^6細胞／ｍＬとした。得られた細胞懸濁液０．５ｍＬを使用して、各マウスに接種した。マウスの腹部が膨張してから７～１０日目に腹水を採取し、次いで１５分間３，０００ｒｐｍで

遠心分離した。管中間部の透明の液体をピペットで取り出し、０．４５ｕｍのミリポア膜で濾過して滅菌した。濾液を－２０℃で保管した。

【０１１５】

処理した腹水を等しい体積のＰＢＳ（通常の食塩水を加えて１００ｍＬとした０．２モル／ＬのNa_2HPO_4 ８１ｍＬおよび０．２モル／ＬのNaH_2PO_4 １９ｍＬ）で希釈した。次いで５０％飽和になるまで、穏やかに攪拌しながら（$NH_4)_2SO_4$を滴下し、終夜４℃に保った。溶液を４℃で１５分間遠心分離（１２，０００ｒｐｍ）し、上清を捨てた。ペレットを（２の量の腹水を使用した）ＰＢＳに溶解させた。３３％飽和になるまで、得られた溶液に攪拌しながら再度（$NH_4)_2SO_4$を滴下し、終夜４℃に保った。溶液を４℃で１５分間遠心分離（１２，０００ｒｐｍ）し、上清を捨てた。ペレットを（２の量の腹水を使用した）ＰＢＳに溶解させた。５０％飽和になるまで、穏やかに攪拌しながら（$NH_4)_2SO_4$を滴下し、終夜４℃に保った。溶液を４℃で１５分間遠心分離（１２，０００ｒｐｍ）し、上清を捨てた。次いでペレットを透析バッグ中の適量のＰＢＳに溶解させ、５０～１００の量の、１２０ミリモル／ＬのトリスＨＣｌ緩衝液（２０ミリモル／ＬのＮａＣｌ含有、ｐＨ７．８）において４℃で約１２時間攪拌しながら透析した。緩衝液は3回より頻繁に入れ替えた。透析したものを－２０℃で保管した。

【０１１６】

上記で述べた方法に従い、本発明のポリペプチドＮＥ２でＢａｌｂ／Ｃマウスに免疫化を施すことによって単クローン抗体を調製し、８種の抗ＮＥ２単クローン抗体（１Ｆ６、２Ｃ９、３Ｆ５、８Ｃ１１、８Ｈ３、１３Ｄ８、１５Ｂ２、および１６Ｄ７）が識別された。前記８種の抗体をエッペンドルフ管にそれぞれ塗布し、捕捉ＲＴ－ＰＣＲ（実施例９を参照のこと）によって、前記抗体が自然のＨＥＶを結合する能力を試験した。その結果、８Ｃ１１、８Ｈ３、および１３Ｄ８が、顕著なＨＥＶ結合活性を示し、その認識部位がウイルス外皮表面上の自然のエピトープであることを示唆した。前記の３種の抗体を実施例１０で使用した。

【０１１７】

実施例９　抗体捕捉ＲＴ－ＰＣＲによるｍＡｂのＨＥＶ結合能試験

１．５ｍＬ容エッペンドルフ管に３０分間紫外線を照射し、次いでＣＢ（ｄｄH_2Oを加えて１Ｌとした２０．０２ｇのNa_2CO_3および２．５２ｇの$NaHCO_3$、ｐＨ９．５）中に１：１０００で希釈したｍＡｂ５００ｕＬを加えた。３７℃で終夜インキュベートした後、緩衝液を流し、１．５ｍＬのブロッキング用緩衝液（２％アルブミン添加１×ＰＢＳ、ｐＨ７．４）を加えて、３７℃で２時間ブロッキングした。次いでブロッキング用緩衝液を流し、滅菌した通常食塩水中１０％のＨＥＶ陽性排泄物５００ｕＬを加えた。３７℃で２時間反応させた後、エッペンドルフ管をＰＥＳＴで６回洗浄し、次いで各エッペンドルフ管に２５０ｕＬのｄｄH_2Oを加えた。次いで実施例１４に従ってＲＴ－ＰＣＲアッセイを実施した。その結果、８Ｃ１１、８Ｈ３、および１３Ｄ８の単クローン抗体はＨＥＶを結合できたが、１Ｆ６、２Ｃ９、３Ｆ５、１５Ｂ２、および１６Ｄ７はＨＥＶを結合できなかった。

【０１１８】

実施例１０　本発明のポリペプチドと、陽性アカゲザル由来血清、ヒト由来血清、およびマウス由来単クローン抗体とのＥＬＩＳＡ、ならびに本発明のポリペプチドとマウス由来単クローン抗体のドットブロット

組換えポリペプチドと、陽性アカゲザル由来血清、ヒト由来血清、およびマウス由来単クローン抗体とのＥＬＩＳＡ

実施例１～６で述べた方法に従って、表２で示した本発明のポリペプチドを作製し、精製した。得られた濃度１ｍｇ／ｍｌの精製組換えタンパク質の試料をＰＢＳ緩衝液（２０Ｍｍ、ｐＨ７．４）で１：５００に希釈し、９６穴マイクロタイタープレートに１００μｌ／ウェルを塗布し、次の条件下、すなわち３７℃で２時間インキュベートし、次いで４℃で終夜約１２時間インキュベートする条件下に置いた。自動洗浄器（ＴＥＣＡＮ、Ｍ１２／４Ｒ　Ｃｏｌｕｍｂｕｓ　ｐｌｕｓ）においてＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ２０洗浄溶液（非イ

オン性H_2Oを加えて最終濃度１Ｌとしてある８．０ｇのＮａＣｌ、０．２ｇのKH_2PO_4、２．９ｇの$Na_2HPO_4・12H_2O$、０．２ｇのＫＣｌ、および０．５ｍｌのＴｗｅｅｎ２０、ｐＨ７．４）で洗浄し、乾燥させた後、ブロッキング用緩衝液（ＰＢＳ中２％のグルチン、０．２％のカゼイン、および２％のスクロース）を２００μｌ／ウェル加え、３７℃で３０分間インキュベートした。次いで適宜希釈した抗血清または単クローン抗体を３７℃で３０分間かけて加えた。自動洗浄器において２０秒間隔で５回、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ２０洗浄溶液で洗浄し、乾燥させた後、適宜希釈したＨＲＰ標識二次抗体（ヤギ抗ヒト、マウスＩｇＧ抗体）を３７℃で３０分間かけて加えた。自動洗浄器において２０秒間隔で５回、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎ２０洗浄溶液で洗浄し、乾燥させた後、色素産生性薬品ＡおよびＢ（Ａ：非イオン水で体積を７００ｍｌに調整してある１３．４２ｇの$Na_2HPO_4・12H_2O$、４．２ｇのクエン酸・H_2O、および０．３ｇのH_2O_2；Ｂ：非イオン水で体積を７００ｍｌに調整してある０．２ｇのＴＭＢ、２０ｍｌのジメチルホルムアミド）をそれぞれ１滴加えて、３７℃で１０分間かけて発色させた。停止溶液（２ＭのH_2SO_4）を１滴加えた。マイクロプレートリーダー（ＴＥＣＡＮ、Ｓｕｎｒｉｓｅ　Ｒｅｍｏｔｅ／Ｔｏｕｃｈ　Ｓｃｒｅｅｎ）で（６２０ｎｍの波長を基準として）OD_{450nm}を測定した。陰性対象の３回の平均値を陽性閾値と定めてあり、結果のＯＤ値が閾値より高い場合が陽性である。

【０１１９】

本発明のポリペプチドと様々なマウス由来単クローン抗体のドットブロット

実施例１～５の方法に従って得、ＨＰＬＣゲル濾過によって精製した、表２に載せたポリペプチド各１０μｌ（１ｍｇ／ｍｌ）を、ニトロセルロース膜にそれぞれをゆっくりとスポットし、風乾した。５％の脱脂乳によって室温で１．５時間ブロッキングした後、実施例８で述べたように得た様々なマウス由来単クローン抗体（５％の脱脂乳で１：１００に希釈した、単クローン性Ｂリンパ球によって分泌された細胞上清）を加えて、室温で１時間反応させた。次いで、ＴＮＴ（１０ｍＭのトリスＣｌ、ｐＨ８．０、１５０ＭｍのＮａＣｌ、０．０５％のＴｗｅｅｎ２０）を使用して膜を５分間隔で３回洗浄した。ＨＲＰ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ（ＪＩＮＧＭＥＩ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ社製、５％の脱脂乳で１：１０００に希釈したもの）を加え、室温で１時間反応させた。５分間隔で３回、ＴＮＴで洗浄した後、ＮＢＴ／ＢＣＩＰ（$C_{40}H_{30}N_{10}O_6Cl_2$／$C_8H_6BrClNO_4P$．$C_7H_9N$）を加えて発色させた。ドットをゲル画像処理システムでスキャンし、黒色度の値に転用し、＋＋＋＋、＋＋＋、＋＋、＋、＋－の５陽性段階および－の陰性段階に分類した。古典的なウェスタンブロットに比べ、この方法は、ＳＤＳでの変性にかけないために変性剤の存在なしで、免疫反応性をより如実に反映できる。

【０１２０】

表4 マウス由来単クローン抗体、回復相のHEV患者由来血清、および急性相のHEV感染アカゲザル由来血清に対する本発明のポリペプチドの反応性

ポリペプチド	ELISA					ドットブロット		
	サル血清	ヒト血清	8C11	8H3	13D8	8C11	8H3	13D8
NE2	++	++	+++	++	+++	++++	++	+++
193C	++	++	+++	+	++	++	++	++
178C	+	++	+++	+-	+++	++	++	++
168C	-	+-	++	-	+++	+/-	+/-	+/-
158C	+-	+	+	-	+++	+	+/-	+/-
148C	+	++	-	-	-	+/-	+/-	+/-
138C	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-
NE2I	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+++
217I	+	+	++	-	++	+	+	+
193I	++	++	++	-	++	+++	++	+++
178I	+++	++	++	-	++	++	++	++
NE2D	++	++	++	-	++	+	+	+
217D	++	++	++	-	++	+	+	+
193D	++	++	++	-	++	+	+	+
178D	++	++	+++	-	+++	+	+	+
235N	++	+-	+++	+-	+++	+++	+	+++
225N	+++	+++	+++	+-	+++	++++	+	+++
209N	++	++	+++	+	+++	++++	+	+++
208N	+	+++	+++	-	+++	++	+	++
207N	-	-	-	-	-	++	+	+
203N	-	-	-	-	-	++	+	+
193N	-	-	-	-	-	++	+	+
176N	-	+	-	-	-	+	+/-	+
247			+++	+	+++	++++	+++	++++
232			+++	+	+++	++++	++++	++++

222			+++	+-	+++	++++	++	++++
205	++	+	+++	-	+++	+++	++	++
201			+++	+	++	++++	++	++++
189	-	+-	+++	-	+++	++	++	++
188	-	+-	++	-	+++	++	++	++
183	-	+	+-	-	+-	++	++	++
173	-	-	-	-	-	++	+	++
170			+++	-	+++	++++	+++	++++
C160			-	-	-	-	-	-
N160			++	-	++	++	-	++
150			-	-	-	-	-	-
144			++	-	++	++	-	++
142			-	-	-	-	-	-
134			-	-	-	-	-	-

【０１２１】
結果
表４に載せた精製組換えポリペプチドをそれぞれ、マイクロタイタープレートに塗布し、実施例８で述べた３種のマウス由来単クローン抗体８Ｃ１１、８Ｈ３、１３Ｄ８、回復相のＨＥＶ患者の血清、および急性相のＨＥＶ感染アカゲザル由来血清に対するその反応性をＥＬＩＳＡによって調べ、使用した３種の単クローン抗体に対するその反応性をドットブロットアッセイによって調べた。その結果は、ポリペプチドＮＥ２、１９３Ｃ、１７８Ｃ、ＮＥ２Ｉ、２３５Ｎ、２２５Ｎ、２０９Ｎ、２４７、２３２、２２２、および２０１が各々の血清／単クローン抗体に対してより反応性であることを示した。これは、これらのポリペプチドが自然のＨＥＶエピトープをより多く有しており、ＨＥＶの診断キットおよび／またはワクチンに使用できることを示唆している。
【０１２２】
ポリペプチド１３８Ｃ、Ｃ１６０、１５０、１４２、および１３４は、様々な抗体に対する反応性が弱かった。これによって、主要な自然のエピトープＯＲＦ２の形成には、少なくともａａ４６９～ａａ６００の断片が関与することが示された。
【０１２３】
ポリペプチド１７０、Ｃ１６０、Ｎ１６０、１５０、１４４、１４２、および１３４の配列は、ＯＲＦ２のａａ４５９～ａａ６２８、ａａ４６９～ａａ６２８、ａａ４５９～ａａ６１８、ａａ４６９～ａａ６ｌ８、ａａ４５９～ａａ６０２、ａａ４５９～ａａ６００の配列がそれぞれ開始アミノ酸（Ｍｅｔ）に結合したものである。
【０１２４】
実施例１１　本発明のポリペプチドとマウス由来単クローン抗体のウェスタンブロット
実施例１～５で述べたようにして得た本発明のポリペプチド２０８Ｎ、２０９Ｎ、および２２５Ｎと、実施例８で得たマウス由来単クローン抗体１Ｆ６、２Ｃ９、３Ｆ５のウェスタンブロットを実施した。前記ポリペプチドをＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分離し、次いで従来の方法に従ってニトロセルロース膜に移し、５％の脱脂乳を加えて１．５時間ブロッキングし、様々なマウス由来単クローン抗体（５％の脱脂乳で１：１００に希釈した、単クローン性Ｂリンパ球によって分泌された細胞上清）を加えて、室温で１時間反応させ、５分間隔で３回洗浄した後、（５％の脱脂乳で１：１０００に希釈した）ＨＲＰ標識抗マウスＩｇＧを室温で１時間かけて加え、５分間隔で３回、ＴＮＴで洗浄し、ＮＢＴ／ＢＣＩＰを加えて発色させた。図６にウェスタンブロットの結果を示す。その結果は、特にレーン８の、クーマシーブリリアントブルーＲ２５０での染色では観察できない重合体バン

ドが、ウェスタンブロットアッセイの酵素に関連した増幅効果によって観察できることを示している。さらに、本発明の組換えポリペプチド２０８Ｎが１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ中には重合体にならないこと、ならびに２０９Ｎおよび２２５Ｎに対する単クローン抗体１Ｆ６の活性が、単クローン抗体２Ｃ９および３Ｆ５より強いことも確かである。

【０１２５】

実施例１２　ポリペプチド２０１を含むワクチンの調製およびそれによるマウスの免疫化アッセイ

フロイントアジュバントと併せたポリペプチド２０１含有ワクチンの調製

上述のようにして得、ＨＰＬＣによって精製した本発明のポリペプチド２０１（純度＞９５％およびタンパク質濃度１．０２ｍｇ／ｍｌ）をＰＢＳで希釈し、等価な体積の（ＢＣＧを含有する）フロイント完全アジュバントを加えて、ポリペプチド２０１が所望の最終濃度に達するようにした（たとえば、各マウスを１００μｌ、５μｇで免疫化することが望まれれば、ポリペプチド２０１の濃度を０．０５ｍｇ／ｍｌに調製することになる）。この溶液を混合し、３０分間動かさずにした後分離する液体相が現われなくなるまで３０分間かけて乳化した。

【０１２６】

フロイントアジュバントをワクチンアジュバントとして使用して、０、７、２８日の免疫化スケジュールに従い、４グループの各々のマウス（各群に３匹のＫｕｎｍｉｎｇ白色マウス）に１００μｌ中０．５、１、２、５μｇ／マウスを筋肉内注射した。図７に結果を示す。その結果は、２μｇを超える用量のフロイントアジュバントを加えて調製したＯＲＦ２－２０１ワクチンが非常に強い免疫原性を有しており、免疫化後２週間目に抗原が産生され始め、４週間目には力価が最高に達したことを示唆した。免疫学についての一般の書籍および文献によると、３０～７０μｇ／マウスの用量のタンパク質抗原で免疫化したマウスにおいてのみ力価のより高い抗体が産生できると考えられている。したがって、この結果は、このワクチン、すなわちフロイントアジュバントと併せた本発明のポリペプチド２０１が、入手可能なワクチンに比べて著しく高い免疫原性効果を有することを示している。

【０１２７】

アルミニウムアジュバントと併せたポリペプチド２０１含有ワクチンの調製

Ｌａｎｚｈｏｕ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｃｈｉｎａからの所望の量の原物アルミニウムアジュバント（Ａｌ３＋１３．６８％、Ｎａ＋３．３６％、ｐＨ５．５５）を沈殿が生じるまで１ＮのＮａＯＨで調整した。完全に混合した後、１×ＰＢＳを加えて体積を２倍にした。次いで、１分間１０，０００で遠心分離し、上清を捨てた。沈殿を１×ＰＢＳで再懸濁させて、再度体積を２倍にし、１分間１０，０００で遠心分離し、上清を捨てた。ｐＨが７～７．４に達するまで、このプロセスを数回繰り返した。最後に、沈殿を等しい体積の１×ＰＢＳで再懸濁させ、溶液を滅菌し、４℃で保管し、９倍の保存溶液として使用した。

【０１２８】

同様に、上述のようにして得、ＨＰＬＣによって精製したポリペプチド２０１（純度＞９５％およびタンパク質濃度１．０２ｍｇ／ｍｌ）をＰＢＳで希釈し、１／９の量のアルミニウムアジュバントを加えて、ポリペプチド２０１が所望の最終濃度に到達するようにし、４℃で終夜混合した。免疫化用量は、１００μｌ／マウスである。アルミニウムアジュバントをワクチンアジュバントとして使用して、０、７、２８日の免疫化スケジュールに従い、各群の３匹のＢａｌ　ｂ／ｃマウス各々に２、５、１０μｇ／マウスを筋肉内注射した。図９に結果を示す。その結果は、５、１０μｇ／マウスの用量の免疫原生効果がより高いことを示唆したが、これは、粒子抗原であり、単量体抗原より免疫原性が高いと考えられている最近の入手可能なＨＢＶ表面抗原ワクチンに匹敵する。したがって、この結果は、本発明の重合体がワクチンに有用であることを示している。

【０１２９】

アジュバントなしのポリペプチド２０１の免疫アッセイ

上述のようにして得たポリペプチド２０１を４Ｍの尿素に溶かし、上清をＰＢＳ（ｐＨ７．４５）での透析にかけて再生させ、純度を約９５％とした。フロイントアジュバントをワクチンアジュバントとして使用して、０、７、２８日の免疫化スケジュールに従い、各群の３匹のＫｕｎｍｉｎｇ白色マウス各々に５、２５、５０μｇ／マウス（対照群には５μｇ／マウス）を筋肉内注射した。図８に結果を示す。その結果は、アジュバントなしのＯＲＦ２－２０１ワクチンで免疫化したマウスにおいて抗体が顕著に産生されたことを示し、その使用した投与量は、フロイントアジュバントを加えてある従来の抗原の投与量と同等であった。本発明の重合体ポリペプチドの免疫原性が従来の抗原よりも高いことをさらに示している。

【０１３０】

上記の結果から、フロイントアジュバントまたはアルミニウムアジュバントの配合にかかわらず、組換えポリペプチド２０１とＮＥ２（５μｇ／マウス）の両方で免疫化した場合も、Ｂａｌｂ／ｃマウスによる特定の抗体の産生が誘発できると結論付けられる。フロイントアジュバントを配合した他の再生可能なポリペプチドも、マウスによる特定の抗体の産生を誘発し得る。したがって、本発明のポリペプチドは、ワクチンとしての使用に好適な特性を有する。

【０１３１】

実施例１３　本発明の組換えポリペプチドを含むワクチンによるアカゲザルの免疫化

ＡＬＴが正常であり、ＨＥＶ陰性のアカゲザル６匹を選択し、２つの群に分け、一方の群をＨＦ１、ＨＦ２、およびＨＦ３と称し、他方の群をＨＦ４、ＨＦ５、およびＨＦ６と称した。実施例１～５および１２で記載したとおりに調製した、投与量２０μｇのアルミニウムアジュバント含有ポリペプチドＮＥ２Ｉワクチンおよびポリペプチド２０１ワクチンを三角筋内注射することによって、対象アカゲザルの２つの群にそれぞれワクチン接種を施した。このワクチン接種をそれぞれ０、１０、および３０日目に行った。最後のワクチン接種から３週間目に、この動物からの抗ＮＥ２ＩｇＧ抗体の力価を間接ＥＬＩＳＡによって試験すると、結果は次のとおり、すなわちＨＦ１（１：１６０００）、ＨＦ２（１：４０００）、ＨＦ３（１：８０００）、ＨＦ４（１：２０００）、ＨＦ５（１：３０００）、およびＨＦ６（１：５０００）であった。

【０１３２】

ポリペプチドＮＥ２Ｉおよび２０１によって例示された上記の結果は、本発明の組換えポリペプチドが、米国特許第５８８５７６８号で免疫原として使用されたＨＥＶ　ＯＲＦ２ポリペプチドｔｒｐＥ－Ｃ２（配列番号１のアミノ酸２２５～６６０）よりも高い免疫原性を有することを示唆している。Ｒｅｙｅｓ等の米国特許第５８８５７６８号では、大腸菌から発現させたＨＥＶ　ＯＲＦ２ポリペプチドｔｒｐＥ－Ｃ２と改良アルミニウムアジュバントの併用物５０ｕｇをそれぞれ０および３０日目に静脈内注射することによって、４匹のカニクイザルにワクチン接種を施している。アジュバントのみを注射した２匹のカニクイザルが対照として使用されている。２回目のワクチン接種後４週間目には、ワクチン接種したサルの群においてＨＥＶに対する抗体が検出されなかった。ワクチン接種したサルの２匹を選択して、５８日目に不溶性のアジュバントを含まないｔｒｐＥ－Ｃ２ポリペプチド８０ｕｇによる３回目のワクチン接種を施したが、抗ＨＥＶ抗体が検出されたのは４週間後までだけであった。

【０１３３】

実施例１４　本発明の組換えポリペプチドを含むワクチンで免疫化したアカゲザルへのＨＥＶ接種

Ｅ型肝炎ウイルス（ＨＥＶ）の調製および定量化

中国新疆省出身のＨＥＶ患者からの糞便を無菌生理食塩水中１０％懸濁液に調製した。この懸濁液を４℃で２０分間、１２０００ｇで遠心分離し、上清を０．２μｍの無菌フィルター（ＮＡＬＧＥＮＥ（登録商標）カタログ番号１９０－２５２０）での濾過によって滅菌した。ＰＣＲでの検出が可能な量のＨＥＶを感染投与量として使用した。

【０１３４】

糞便由来ＨＥＶ　ＲＮＡの抽出、逆転写、およびＰＣＲ：その操作指示に従ってＴｒｉｚｏｌ試薬（ＧＩＢＣＯＬ）を使用し、１０％の糞便懸濁液からＨＥＶ　ＲＮＡを抽出し、さらにＡＭＶ逆転写酵素を使用して、２０μｌの反応体積で、４２℃で４０分間、特定のプライマーＡ３（４５６６～４５８６、５’－ｇｇｃｔｃａｃｃｇｇａｇｔｇｔｔｔｃｔｔｃ－３’）をＲＴプライマーとして用いる、それの逆転写を行った。次いで、２ｕｌのＲＴ産物を鋳型として使用し、Ａ３プライマーおよびプライマーＡ５（４３４１～４３６２、５’－ｃｔｔｔｇａｔｇａｃａｃｃｇｔｃｔｔｃｔｃｇ－３’）を使用して、次の反応条件下、すなわち９４℃で５分間の予備変性；９４℃で４０秒間の変性および６８℃で４０秒間の伸長を３５サイクル；７５℃で５分間の伸長によって、１回目のＲＴ－ＰＣＲを実施して、最終体積を２０ｕｌにした。１回目の反応産物２ｕｌを鋳型として使用し、プライマーＢ５（４３７２～７３９２、５’－ｇｃｃｇｃａｇｃａａａｇｇｃａｔｃｃａｔｇ－３’）およびＢ３（４５５４～４５７５、５’－ｇｔｇｔｔｔｃｔｔｃｃａａａａｃｃｃｔｃｇｃ－３’）を使用して、次の反応条件下、すなわち９４℃で５分間の予備変性；９４℃で４０秒間の変性、５６℃で４０秒間のアニーリング、および７２℃で１分２０秒間の伸長を３５サイクル；７５℃で５分間の伸長によって、２回目のＰＣＲを実施して、最終体積を２０ｕｌとした。

【０１３５】

この実験で扱うアカゲザルのグループ分け：免疫化群１は、それぞれ実施例２のＨＦ１、ＨＦ２、およびＨＦ３の動物に対応するアカゲザルＶ１０、Ｖ１１、およびＶ１２を含み；免疫化群２は、それぞれ実施例２のＨＦ４、ＨＦ５、およびＨＦ６に対応するアカゲザルＶ１３、Ｖ１４、およびＶ１５を含み；対照群は、Ｖ１６、Ｖ１７、およびＶ１８と称した３匹の非免疫化アカゲザルを含む。

【０１３６】

ＨＥＶ接種

ＰＣＲで検出できる量のＨＥＶを１感染投与量として用いた。実施例１３で記載した、本発明の組換えポリペプチドを含むワクチンをアカゲザルＨＦ１～６に最後に接種してから３週間目に、１，０００感染投与量のＨＥＶを上記のサルに接種した。ＨＥＶ接種後、どのサルのＡＬＴも上昇しなかった。４週間目にＶ１６およびＶ１７の動物で抗ＮＥ２Ｉ－ＩｇＧが検出され、５週間目にＶ１８の動物で抗ＮＥ２－ＩｇＧが検出された。Ｖ１０～１５の動物では１～３７日目までＨＥＶ排泄物が検出されず；Ｖ１６の動物では５日目にＨＥＶの排泄が始まり３０日目に終わり；Ｖ１７およびＶ１８の動物ではこれも５日目にＨＥＶの排泄が始まったが、３７日目になっても止まらなかった。これらの結果は、ワクチンとしての本発明のポリペプチドが米国特許第５８８５７６８号のＨＥＶ　ＯＲＦ２のポリペプチドｔｒｐＥ－Ｃ２よりも高い免疫原性を有し、強い防御をもたらすことを示唆している。

【０１３７】

これらの結果から、少ない投与量の本発明のワクチンを使用してサルにワクチン接種を施した場合、ワクチン接種を受けたサルは、ＨＥＶに応答して優れた抗体を産生できるので、ＨＥＶを接種後、異常なＡＬＴおよび糞便中のウイルス排泄が認められなかったことがわかる。したがって、ＨＥＶ　ＯＲＦ２からのポリペプチドｔｒｐＥ－Ｃ２を使用して調製したワクチン（米国特許第５８８５７６８号）およびＴｓａｒｅｖ等が調製したポリペプチドを含むワクチンについての報告されているワクチン接種結果に比べて、より優れた免疫防御がもたらされた。さらに、Ｔｓａｒｅｖ　ａｎｄ　Ｇｅｎｅｌａｂｓ　ｃｏ．が利用したバキュロウイルス発現系は、人体に有害である可能性があるので、この系によって発現された組換えタンパク質が、ヒトに使用する市販薬または市販ワクチンとして認可されたことはこれまで報告されていない。対照的に、本発明による大腸菌発現系によって発現されたいくつかの組換えタンパク質は、ヒトに使用するｉｎ　ｖｉｖｏ市販薬として認可されており、安全性がより確かである。

【０１３８】

実施例１５　ＨＥＶ　ＯＲＦ３内エピトープに結合させた本発明のポリペプチド２４７を

含むキメラポリペプチドの調製
その５’末端に制限エンドヌクレアーゼ部位ＢａｍＨＩおよびＮｄｅＩを導入する前方向プライマーの３７２ＦＰ（５’－ｇｇａｔｃｃｃａｔａｔｇａａｔａａｃａｔｇｔｃｔｔｔｇｃｔ－３’）と、その５’末端に制限エンドヌクレアーゼ部位ＢａｍＨＩを導入する逆方向プライマーの３７２ＢＲＰ（５’－ｇｇａｔｃｃｔｃｇｇｃｇｃｇｇｃｃ－３’）を使用して、次の反応条件下、すなわち９４℃で５分間；９４℃で５０秒間、５６℃で５０秒間、および７２℃で３０秒間を３０サイクル；および７０℃で１０分間の反応条件下において、中国新疆省のＨＥＶ患者から単離したＥ型肝炎ウイルス（ＨＥＶ）の全長ゲノム（Ａｙｅ，Ｔ．Ｔ．、Ｕｃｈｉｄａ等のＮｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ第２０巻（１３）３５１２ページ（１９９２年）；遺伝子銀行受入れ番号ＧＩ２２１７０１）を鋳型とするＰＣＲ反応を行った。ＨＥＶ ＯＲＦ３内エピトープをコードする、大きさ約３７０ｂｐの特定のＤＮＡ断片を得た。上記の得られたＰＣＲ産物を市販のｐＭＤ１８－Ｔプラスミド（ＴＡＫＡＲＡ社）に連結した。ＢａｍＨＩでの消化によって、ＨＥＶ ＯＲＦ３内のエピトープ遺伝子が挿入された陽性サブクローンを識別した。ＤＮＡの配列決定によって、クローン中に変異がないことが示され、それによって配列番号１１で示す、ＨＥＶ ＯＲＦ３内エピトープ遺伝子のアミノ酸配列が得られた。

【０１３９】
ＢａｍＨＩでの消化によってＨＥＶ－ＯＲＦ３の遺伝子断片を得、ＢａｍＨＩで消化した（実施例１に記載の方法に従って調製した）ｐＴＯ－Ｔ７－ＯＲＦ２－２４７発現プラスミドベクターに連結した。ＢａｍＨＩで消化して、ＨＥＶ ＯＲＦ３の遺伝子断片が挿入された陽性発現クローンｐＴＯ－Ｔ７－ＯＲＦ３－２４７を識別した。このクローンを大腸菌ＥＲＲ２５６６株に形質転換し、これをＯＲＦ３－２４７キメラポリペプチドの発現に使用した。

【０１４０】
実施例１６ ＮＥ２Ｄをインフルエンザ由来赤血球凝集素抗原に結合させたキメラポリペプチドの調製
対のプライマーＨＡＦＰ／Ｅ２ＲＤを使用する、実施例１で調製したＨＥＶ－ＯＲＦ２変異配列（配列番号６）を鋳型とするＰＣＲで増幅することによって、キメラペプチドのヌクレオチド配列を得た。ＰＣＲ反応は、９４℃で５分間の予備加熱；９４℃で５０秒間の変性、５６℃で５０秒間のアニーリング、７２℃で７０秒間の伸長を３０サイクル；および最後に７２℃で１０分間の伸長という条件下で実施する。得られたＰＣＲ産物は、インフルエンザウイルス由来ＨＡおよび本発明のポリペプチドＮＥ２Ｄを含むキメラポリペプチドをコードする、約８００ｂｐのＤＮＡ断片である。前方向プライマーＨＡＦＰは、ＢａｍＨＩおよびＮｄｅＩ制限部位を含む。逆方向プライマーＥ２ＲＤは、ＥｃｏＲＩ制限部位および翻訳終止コドンＴＡＡを含む。ＮｄｅＩに対する配列はＣＡＴ ＡＴＧであり、ＡＴＧは翻訳開始コドンである。さらに、２種のペプチドＨＡおよびＮＥ２Ｄの立体配座を厳密に維持するために、ＨＡペプチドとＮＥ２Ｄペプチドの間にそれぞれ、ＣＡＧ ＣＴＧ ＴＴＣによってコードされる柔軟なリンカーＧｌｙ－Ｇｌｙ－を導入した。したがって、キメラポリペプチドＨＡ－ＮＥ２Ｄは、ＨＥＶワクチンに適切に使用できる。一対のプライマーの配列は、以下のとおりである。

```
HAFP:5'-AGA TCT CAT ATG TCT AAA
          BglII  NdeI 91 Ser Lys
GCT TTC TCT AAC TGC TAC CCT TAC
Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr
GAC GTT CCG GAC TAC GCT TCT
Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser
TTA     GGT GGA TCC
Leu108 Gly Gly Ser
CAG CTG TTC TAC TCT CGT CC-3'
E2RD:5'-gaattcttaggggggctaaaacagc-3'
```

【０１４１】
得られたキメラポリペプチドをコードする核酸構築物を含む発現ベクターの調製
前述のＰＣＲ産物を市販のプラスミドｐＭＤ１８－Ｔ（ＴＡＫＡＲＡ社）中にクローン化した。次いで、ＢａｍＨＩ／ＥｃｏＲＩでの消化によってｐＭＤ１８－Ｔ－ＨＡ－ＯＲＦ２－ＮＥ２Ｄプラスミドから問題の配列を得、ＢａｍＨＩ／ＥｃｏＲＩでの消化および連結によって発現ベクターに組み込んだ。ｐＴＯ－Ｔ７－ＨＡ－ＯＲＦ２－ＮＥ２Ｄ発現プラスミドで形質転換した大腸菌ＥＲＲ２５６６宿主細胞から、ＨＡ－ＯＲＦ２－ＮＥ２Ｄキメラペプチドを単離した。このアミノ酸配列を配列番号１２と称した。
【０１４２】
実施例１７　本発明のポリペプチドＮＥ２Ｉを主体とした間接Ｅｌｉｓａキットよる生物検体中の対ＨＥＶＩｇＧの検出
ＨＥＶに対するＩｇＧを本発明のポリペプチドＮＥ２Ｉで検出するキットは、組換えポリペプチドＮＥ２Ｉを塗布し、ブロッキング用緩衝液（２０ｍＭかつｐＨ７．２のＰＢ、０．５％のカゼイン、２％のゼラチン）でブロッキングしたマイクロタイタープレート；検体希釈剤（２０ｍＭかつｐＨ７．２のＰＢ、１％のカゼイン）；作用コンジュゲート（酵素希釈剤（２０ｍＭかつｐＨ７．２のＰＢ、０．５％のカゼイン、１０％のＮＢＳ）で希釈したＨＲＰで標識したヤギ抗ヒトＩｇＧ（ＤＡＫＯ））；２０×ＰＢＳＴ、色素原Ａ、色素原Ｂ、および停止溶液（Ｂｅｉｊｉｎｇ　ｗａｎｔａｉ）など、生物活性のない材料を含む。
【０１４３】
ＮＥ２Ｉに基く抗ＨＥＶ　ＩｇＧキットで一連のサル血清を検出し、Ｂｅｉｊｉｎｇ　ｗａｎｔａｉおよびＳｉｎｇａｐｏｒｅ　Ｇｅｎｅｌａｂｓから得た２種の市販抗ＨＥＶ　ＩｇＧキットと比較した。これらのサル血清は、静脈内接種後０～１８週（ｗ）までに得た、ＨＥＶに自然感染したサルを模倣したサルＮｏ１、Ｎｏ２、Ｎｏ３、およびＮｏ１３の血清であった。
【０１４４】
操作手順は以下のとおり、すなわち、各マイクロタイターに検体溶媒１００ｕｌを加え；マイクロタイターに検体１０ｕｌを加え；マイクロプレートのすべての側面を穏やかに叩くことによって十分に混合し；３７℃で３０分間インキュベートし；マイクロプレートを１回、ＰＢＳＴで５回洗浄し；マイクロプレートを逆さにし、吸収性の紙にしっかりと軽く叩くことによってブロットドライし；すべてのウェルに作用コンジュゲート１００ｕｌを加え、マイクロプレートを３７℃で３０分間インキュベートし；マイクロプレートを再度５回洗浄してブロットドライし；色素原Ａ５０ｕｌおよび色素原Ｂ５０ｕｌを加えて、穏やかに叩いて十分に混合し；暗所においてそのマイクロプレートを３７℃で１０分間インキュベートし；各ウェルに停止溶液５０ｕｌを加え、プレートを軽く叩くことによって穏やかに混合し；各ウェルの４５０ｎｍ／６２０ｎｍの吸光度を測定するものである。２種の市販の抗ＨＥＶ　ＩｇＧキットでも、各々のアッセイ手順に従って厳密なアッセイを行った。
【０１４５】
結果は以下のとおり、すなわち、ＮＥ２Ｉを主体としたキットは、７～１４日目までにＷａｎｔａｉおよびＳｉｎｇａｐｏｒｅ　Ｇｅｎｅｌａｂｓからの２種の市販のキットよりも早く抗体陽転を検出し；抗ＮＥ２Ｉ－ＩｇＧの持続時間は、Ｇｅｎｅｌａｂｓの抗ＨＥＶ－ＩｇＧおよびＷａｎｔａｉの抗ＨＥＶ－ＩｇＧより長く；抗ＮＥ２Ｉ－ＩｇＧの検出率は、２種の市販の抗ＨＥＶ－ＩｇＧキットより高かった（図１０を参照のこと。表５に未処理データを示す）。無作為の３４件の健常者血清を検出した場合、抗ＮＥ２Ｉ－ＩｇＧおよびＧｅｎｅｌａｂｓ抗ＨＥＶ－ＩｇＧの陽性率は、それぞれ３５％および１１％であり、後者は、完全に前者に含まれていた。肝炎患者の２６３件の臨床血清では、抗ＮＥ２Ｉ－ＩｇＧおよびＷａｎｔａｉ抗ＨＥＶ－ＩｇＧの陽性率は、それぞれ２７．２％および１０．６％であった。非Ａ、非Ｂ、非Ｃ型肝炎患者の９１件の血清では、抗ＮＥ２Ｉ－ＩｇＧおよびＧｅｎｅｌａｂｓ抗ＨＥＶ－ＩｇＧの陽性率は、それぞれ６９．２％および

２４．２％であった。一言で言えば、本発明のＮＥ２Ｉを素材とした抗ＨＥＶ－ＩｇＧは、市販の抗ＨＥＶ－ＩｇＧキットよりも感度がよい。

【０１４６】

表5　本発明の抗HEVIgG抗体検出キット(NF2I－IgG)および2種の市販検出キット(Genelabs、WANTAI)によるHEV感染サルの血清の検出感度の比較

血清番号1	0w	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	9w	10w	11w	12w	13w	14w	15w	16w	17w	18w
Genelabs																			
抗 HEV-IgG	0.01	0.01	0.01	0.01	0.21	2.61	3	3	3	2.61	1.78	1.36	0.92	0.92	0.92	0.96	0.72		
WANTAI 抗 HEV-IgG	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	1.82	2.45	2.48	2.42	1.7	1.37	0.54	0.36	0.25	0.18	0.1	0.05	0.05	0.03
本発明のNE2I-IgG	0.01	0.02	0.01	1.87	2.56	2.5	2.52	2.49	2.72	2.52	2.52	2.47	2.53	2.58	2.64	2.65	2.40	2.36	2.35

血清番号2	0w	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	9w	10w	11w	12w	13w	14w	15w	16w	17w	18w
Genelabs																			
抗 HEV-IgG	0.05	0.07	0.05	0.04	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
WANTAI 抗 HEV-IgG	0.02	0.02	0.02	0.02	2.05	2.58	2.42	2.46	2.65	2.5	2.33	2.23	2.3	2.21	2.2	2.26	2.26	2.38	2.46
本発明のNE2I-IgG	0.06	0.06	0.06	0.77	2.26	2.36	2.5	2.56	2.62	2.65	2.49	2.47	2.4	2.54	2.51	2.38	2.29	2.34	2.33

血清番号3	0w	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	9w	10w	11w	12w	13w	14w	15w	16w	17w	18w
Genelabs																			
抗 HEV-IgG	0.05	0.02	0.02	0.02	0.78	3	3	2.91	2.83	2.77	2.22	1.95	1.79	1.54	1.42	1.42	1.38		
WANTAI 抗 HEV-IgG	0	0	0	0.02	0.02	1.87	1.62	1.67	1.82	1.48	1.05	0.67	0.75	0.76	0.58	0.38	0.46	0.34	0.23
本発明のNE2I-IgG	0.01	0.05	0.04	0.83	2.2	2.63	2.59	2.62	2.75	3	2.7	2.6	2.55	2.6	2.54	2.51	2.51	2.36	2.51

血清番号13	0w	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	9w	10w	11w	12w	13w	14w	15w	16w	17w	18w
Genelabs																			
抗 HEV-IgG	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.15	0.1	0.08	0.06	0.06	0.07	0.08	0.07	0.1	0.15	0.07	0.04	0.02
WANTAI 抗 HEV-IgG	0.02	0	0.01	0.01	0.01	0	0.01	0.02	0.04	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02		
本発明のNE2I-IgG	0.1	0.11	0.09	0.09	2.3	2.45	2.51	2.5	2.34	2.21	2.13	2.14	2.05	2.01	1.82	1.87	1.79	1.7	1.6

【０１４７】

実施例１８　本発明の組換えタンパク質をＨＲＰで標識する方法

超純粋（ＵＰＷ）にそれぞれ１ｍｇのＨＲＰ（ＢｉｏｚｙｍｅＲ／Ｚ＞３）およびＮａＩＯ４を溶解させ；攪拌しながらＮａＩＯ４溶液を滴下し；この混合溶液を室温で３０分間暗所に静置し；混合しながら１％のエチレングリコール溶液１００ｕｌを段階的に加え；それを４℃で３０分間暗所に静置する。組換えタンパク質を３時間炭酸緩衝液（１０ｍＭ、ｐＨ９．６）での透析にかけ；適度に透析した組換えタンパク質を酸素添加したＨＲＰに加え、炭酸緩衝液（１０ｍＭ、ｐＨ９．５）中、穏やかに攪拌しながら室温（または４℃）で６時間透析し；上述の混合物に新しく調製した０．１ＭのＮａＢＨ４溶液２０ｕｌを加え；暗所に４℃で２時間静置し、３０分間ずつ１回穏やかにボルテックス（ｖｏｒｔｅｘ）し；これをＰＢＳ（１０ｍＭ、ｐＨ７．２）中、４℃で終夜透析にかける。

【０１４８】

実施例１９　生物検体においてＨＥＶに対する抗体ＩｇＭを検出する診断キット、および生物検体においてＨＥＶに対する抗体ＩｇＭを検出する捕捉アッセイ

実施例１８で記載した方法に従って、ポリペプチド２２５ＮをＨＲＰで標識した。

【０１４９】

ＨＲＰで標識した本発明のポリペプチドＮＥ２Ｉを含有する、ＨＥＶに対する抗体ＩｇＭを検出する診断キットは、マウス抗ヒトＩｇＭμ鎖多クローン抗体（デンマークＤａｋｏ社）を予め塗布し、ブロッキング用緩衝液でブロッキングしたマイクロタイターストリップ；検体希釈剤（２０ｍＭ、ｐＨ７．２のＰＢ、１％のカゼイン）；作用コンジュゲート（酵素希釈剤（２０ｍＭ、ｐＨ７．２のＰＢ、０．５％のカゼイン、１０％のＮＢＳ）で適切に希釈したＨＲＰ標識ポリペプチド２２５Ｎ）；２０×ＰＢＳＴ、色素原薬品Ａ、色素原薬品Ｂ、および停止溶液（ＷＡＮＴＡＩ社、Ｂｅｉｊｉｎｇ）など、生物活性のない材料を含む。

【０１５０】

この診断キットを使用する捕捉アッセイを以下のようにして、すなわち、マウス抗ヒトＩｇＭμ鎖多クローン抗体を予め塗布した各ウェルに希釈緩衝液１００ｕｌを加え；希釈緩衝液に検出対象の検体１ｕｌを加え；穏やかに叩くことによって十分に混合し；３７℃で３０分間インキュベートし；ＰＢＳＴで５回洗浄し；マイクロプレートを逆さにし、ティッシュペーパー上にしっかりと軽く叩くことによってブロットドライし；各ウェルに作用コンジュゲート（適切に希釈したＨＲＰ標識ポリペプチド２２５Ｎ）１００ｕｌを加え、マイクロプレートを３７℃で３０分間インキュベートし；再度５回洗浄し、ブロットドライし；次いで色素原Ａ５０ｕｌおよび色素原Ｂ５０ｕｌを加え、穏やかに叩くことによって十分に混合し；暗所において３７℃で１０分間インキュベートし；各ウェルに停止溶液５０ｕｌを加え、プレートを穏やかに叩くことによって混合し；各ウェルの吸光度をＯＤ４５０ｎｍ／６２０ｎｍで測定することによって実施する。

【０１５１】

本発明に従って調製した抗ＨＥＶ－ＩｇＭ診断キットを使用して、前述の捕捉アッセイによって、肝炎患者の２６３件の臨床血清を検出にかけると、陽性率は１１％であり；また前記捕捉アッセイによって非Ａ、非Ｂ、非Ｃ型肝炎患者の９１件の血清を検出にかけると、陽性率は４８．４％であった。一方、Ｇｅｎｅｌａｂｓの抗ＨＥＶ－ＩｇＧ診断キットによって検出したこの９１件の血清検体の陽性率は、２４．２％に過ぎなかった。上記の結果が示すように、捕捉アッセイを利用して本発明の抗ＨＥＶ－ＩｇＭ診断キットによって検出された陽性検体は、臨床的な診断とよく一致している。さらに、Ｇｅｎｅｌａｂｓ抗ＨＥＶ－ＩｇＧキットによって検出された陽性検体の大部分も、この捕捉アッセイにおいて陽性である。すなわち、本発明の抗ＨＥＶ－ＩｇＭキット、ならびに前記捕捉アッセイは、臨床上のＨＥＶ診断において現存する市販のキットよりも感度および特異性が高い。

【０１５２】

実施例２０　生物検定においてＨＥＶに対する全抗体を検出する診断キット、および生物検体においてＨＥＶに対する全抗体を検出する方法

実施例１８で記載した方法に従って、ポリペプチド２２５Ｎを西洋ワサビペルオキシダー

ゼ（ＨＲＰ）で標識した。

【０１５３】

本発明のポリペプチドＮＥ２Ｉおよび２２５Ｎを含有する、ＨＥＶに対する全抗体を検出するキットは、組換えポリペプチドＮＥ２Ｉを予め塗布し、ブロッキング用緩衝液（２０ｍＭかつｐＨ７．２のＰＢ、０．５％のカゼイン、２％のゼラチン）でブロッキングしたマイクロタイターストリップ；作用コンジュゲート（酵素希釈剤（２０ｍＭかつｐＨ７．２のＰＢ、０．５％のカゼイン、１０％のＮＢＳ）で希釈したＨＲＰで標識したポリペプチド２２５Ｎ）；２０×ＰＢＳＴ、色素原薬品Ａ、色素原薬品Ｂ、および停止溶液（北京ＷＡＮＴＡＩ社）など、生物活性のない材料を含む。

【０１５４】

当該キットの検出プロトコルは、以下のとおり、すなわち、予めポリペプチドＮＥ２Ｉを塗布した前記ストリップのマイクロタイターに血清５０ｕｌおよび適切に希釈した組換えポリペプチド２２５ＮをＨＲＰで標識したもの５０ｕｌを加え；マイクロプレートのすべての側面を穏やかに叩いて混合し；３７℃で６０分間インキュベートし；マイクロプレートをＰＢＳＴで５回洗浄し；マイクロプレート逆さにすることによってブロットドライし；色素原Ａ５０ｕｌおよび色素原Ｂ５０ｕｌを加え；次いでマイクロプレートを３７℃で１５分間インキュベートし；最後に各ウェルに停止溶液５０ｕｌを加え、プレートを穏やかに叩いて混合し；各ウェルの$OD_{450nm/620nm}$の吸光度を測定するものである。

【０１５５】

得られた検出結果は、次のとおり、すなわち、本発明のポリペプチドＮＥ２Ｉおよび２２５Ｎを主体とするサンドウィッチ式全抗ＨＥＶ抗体キットでの検出では、肝炎患者からの２６３件の臨床血清が陽性率５２％で検出されたが、ＷＡＮＴＡＩ抗ＨＥＶ－ＩｇＧキットでの検出では、１０．６％しか判定されなかった。さらに、同じサンドウィッチ式キットを使用して、非Ａ、非Ｂ、非Ｃ型肝炎患者の９１件の血清を検出すると、陽性率は５４．９％であった。しかし、この９１件の血清において、Ｇｅｎｅｌａｂｓ抗ＨＥＶ－ＩｇＧによって検出された陽性率は、２４．２％に過ぎなかった。上記のデータが示すように、臨床的な診断において、当該診断キットでの検出は、現存する市販のキットに優っている。

【図面の簡単な説明】

【図１】

ポリペプチド２０１を発現するプラスミドｐＴＯ－Ｔ７－ＯＲＦ２－２０１の作製を示す略図である。

【図２】

発現ベクターｐＴＯ－Ｔ７－ＯＲＦ２－２０１で形質転換した誘導大腸菌の培養物可溶化液（培地を遠心分離にかけるステップ、沈殿した細胞を収集するステップ、次いでペレットを０．１％のＳＤＳを含む供給液で再懸濁させるステップ、これを沸騰湯中で１０分間さらに処理するステップ、次いで１０分間１２，０００ｒｐｍで遠心分離するステップ、上清を取り出して測定するステップを経た）に関して、１２％ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）（クーマシーブリリアントブルーＲ２５０で染色）によって分析した結果を示す図である。レーン１および２は、それぞれ２種の異なる細菌培養物可溶化液を含む。Ｕｖｉゲル画像処理システム（ＵＶＩｔｅｃ，ｌｔｄ．、型式ＤＢＴ－０８）によって解析すると、発現された産物は総タンパク質のほぼ３５％までになる。

【図３】

４回分のポリペプチド２０１からの精製ポリペプチド２０１の封入体の２Ｍおよび４Ｍ尿素溶液に関する、クーマシーブルーＲ２５０で染色を行った１２％ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）の解析結果を示す図であり、前記試料は、発現ベクターｐＴＯ－Ｔ７－ＯＲＦ２－２０１が組み入れられている組換え大腸菌から得る。この結果は、二量体ポリペプチドの割合が１０％～６０％に変動しており、再生を

経て二量体ポリペプチドを形成したポリペプチド２０１が若干あることを示している。再生割合は、１×ＰＢＳ（２０×ＰＢＳ（１Ｌ）：Na_2HPO_4－１２H_2O、７３．３４４ｇ；KH_2PO_4、４ｇ；ＮａＣｌ、１６３．６３２ｇ；ＫＣｌ、４．０２４ｇ、ｐＨ７．４５）中で再生した試料よりも低い。図４で示すように、二量体の百分率は９９％である。

【図４】

ポリペプチド２０１とＨＥＶ感染患者からの血清のウェスタンブロット分析結果を示す図である。レーン１～３は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ対照であり、レーン１はタンパク質分子量マーカーであり、レーン２は、１×ＰＢＳ中の再生ポリペプチド２０１試料であり、レーン３は、沸騰湯浴中で１０分間処理した再生ポリペプチド２０１であり、レーン４および５は、それぞれレーン２および３の試料に対応するウェスタンブロット結果である。

【図５】

前述のポリペプチド２０１の、動的光散乱計による水和状態の動的半径から得た結果を示す図であり、ポリペプチド２０１は、ゲル濾過ＨＰＬＣによって予め精製し、１０分間２００００ｇで遠心分離し、０．１ｕｍの濾過膜で濾過してある。

【図６】

ポリペプチド２０８Ｎ、２０９Ｎ、および２２５Ｎと、マウスのＭａｂ１Ｆ６、２Ｃ９、および３Ｆ５との反応のウェスタンブロット結果を示す図である。レーン１、２、３はそれぞれ、ポリペプチド２０８Ｎの、沸騰湯浴中で１０分間処理した再生試料、再生試料、および沈殿させた再生試料に対応し、レーン４、５、６はそれぞれ、ポリペプチド２０９Ｎの、沸騰湯浴中で１０分間処理した再生試料、再生試料、および沈殿させた再生試料に対応し、レーン７、８、９はそれぞれ、ポリペプチド２２５Ｎの、沸騰湯浴中で１０分間処理した再生試料、再生試料、および沈殿させた再生試料に対応し、レーン１０は、対照としての単量体ポリペプチド２０１である。

【図７】

様々な投与量の（フロイントアジュバントを含有する）ポリペプチド２０１ワクチンで免疫化した後のマウスの血清中に産生されたＨＥＶ抗体のプロフィールを示すグラフである。水平座標は、最初の免疫化からの日数である。垂直座標は、ＥＬＩＳＡによって測定した$OD_{450nm/620nm}$である。

【図８】

様々な投与量の（アジュバントを含まない）ポリペプチド２０１ワクチンで免疫化した後のマウスの血清中に産生されたＨＥＶ抗体のプロフィールを示すグラフである。水平座標は、最初の免疫化からの日数である。垂直座標は、ＥＬＩＳＡによって測定した$OD_{450nm/620nm}$である。

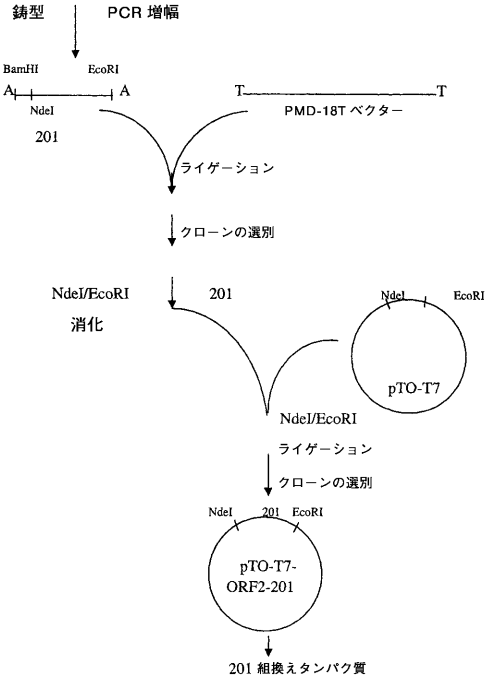
【図９】

様々な投与量の（アジュバントとして水酸化アルミニウムを含有する）ポリペプチド２０１ワクチンで免疫化した後のマウスの血清中に産生されたＨＥＶ抗体のプロフィールを示すグラフである。水平座標は、最初の免疫化からの日数である。垂直座標は、ＥＬＩＳＡによって測定した$OD_{450nm/620nm}$である。

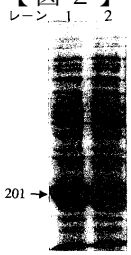
【図１０】

図１０Ａ、１０Ｂ、１０Ｃ、および１０Ｄは、それぞれＮｏ．１、Ｎｏ．２、Ｎｏ．３、およびＮｏ．１３にグループ分けしたアカゲザルの血清中に産生されたＨＥＶ抗体のプロフィールを示すグラフである。これらの対象動物にはすべて、静脈内注射によってＨＥＶを接種している。水平座標は、最初の免疫化からの日数である。垂直座標は、ＥＬＩＳＡによって測定した$OD_{450nm/620nm}$である。この結果は、Ｎｏ．１、Ｎｏ．２、およびＮｏ．３の群のサル血清中に、抗ＮＥ２Ｉ－ＩｇＧがＧＥＮＥＬＡＢＳ－ＩｇＧおよびＷＡＮＴＡＩ抗ＨＥＶ－ＩｇＧより５～１０日早く存在していること、ならびにＮｏ．１３のサルの血清において抗ＮＥ２Ｉ－ＩｇＧは検出可能であるが、Ｇｅｎｅｌａｂｓ抗ＨＥＶ－ＩｇＧおよびＷＡＮＴＡＩ抗ＨＥＶ－ＩｇＧは、ＮＯ．１３のサル血清中に検出されないことを例示している。

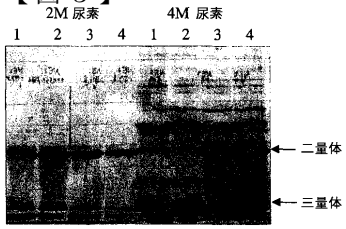
【図１】



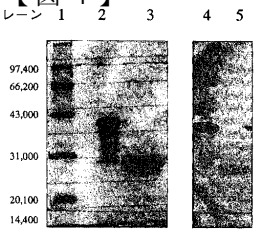
【図２】



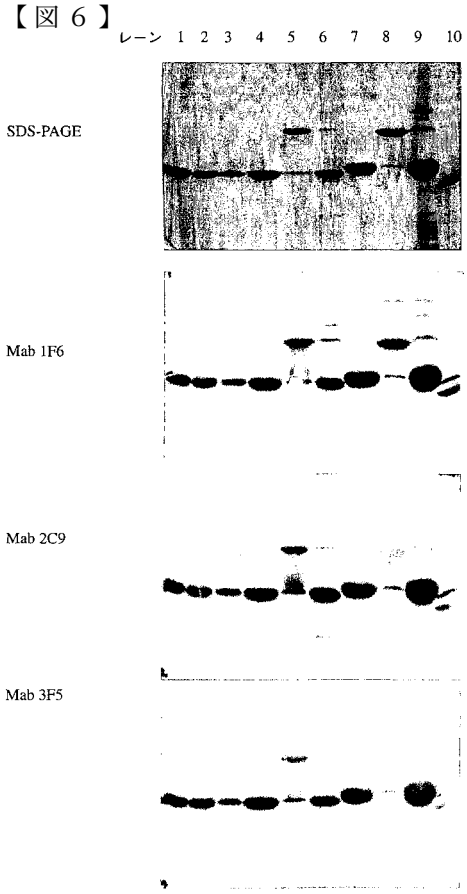
【図３】



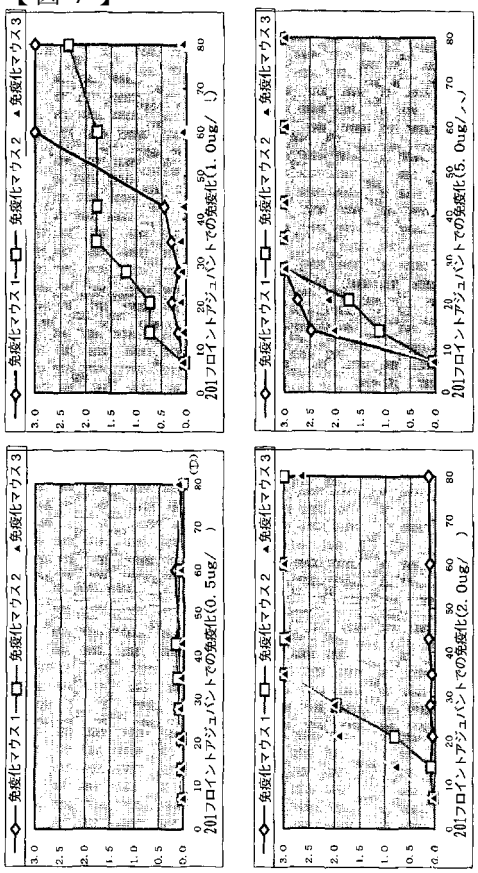
【図４】



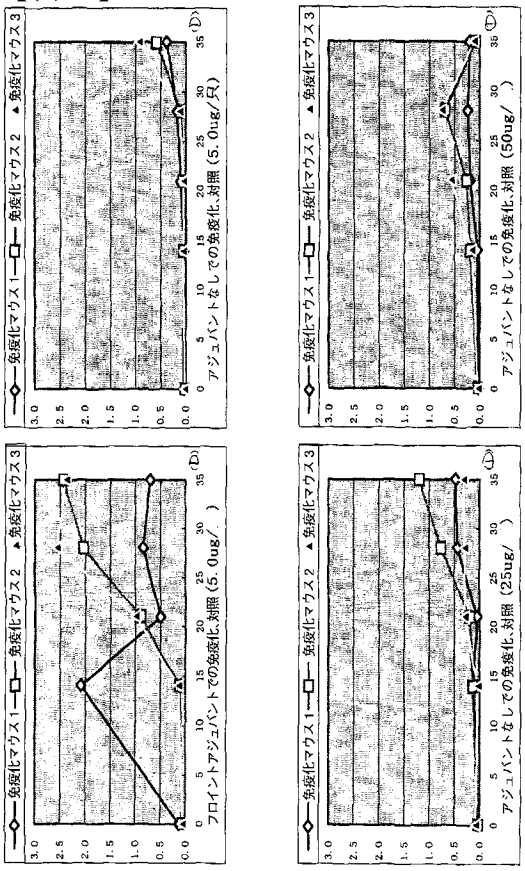
【図６】



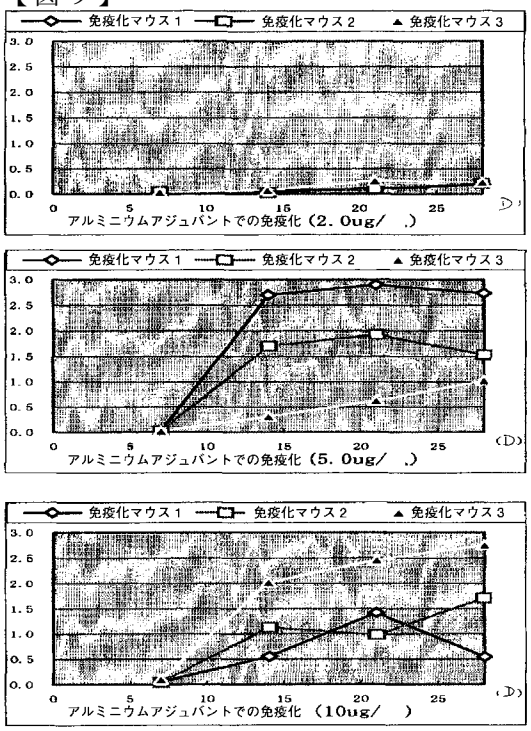
【図７】



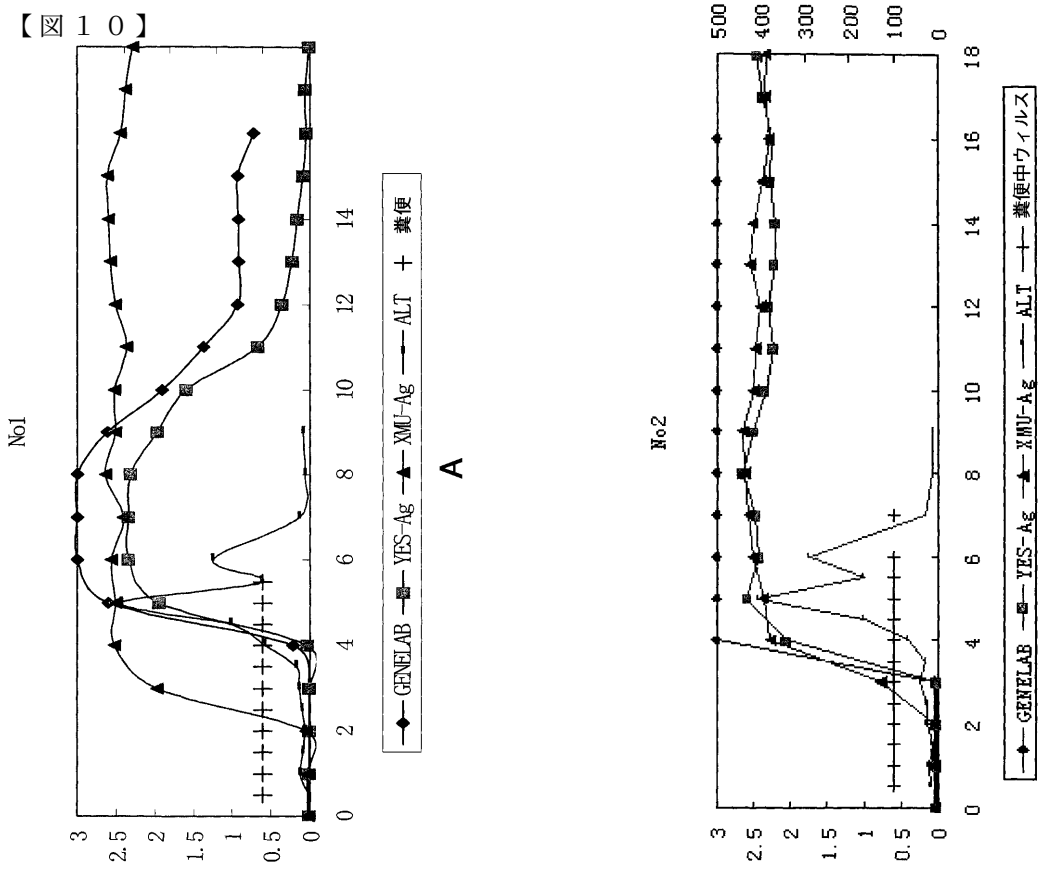
【図８】

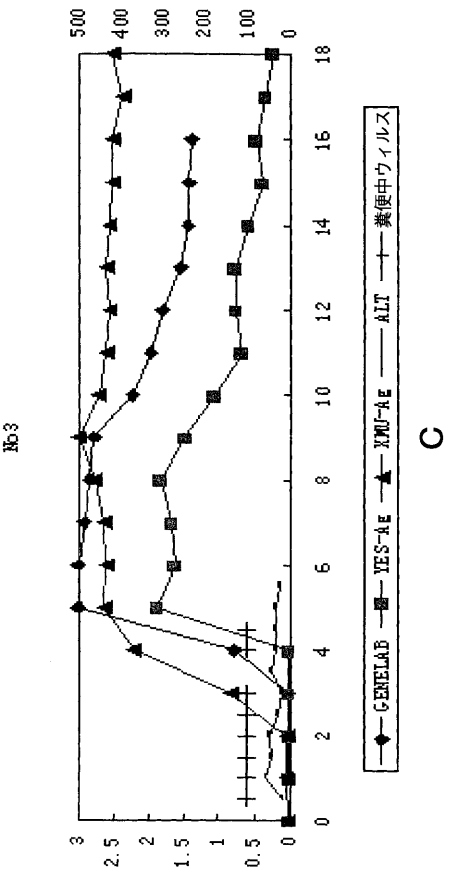

免疫化マウス1
免疫化マウス2
免疫化マウス3
アジュバントなしでの免疫化、対照（5.0ug/只）
フロイントアジュバントでの免疫化、対照（5.0ug/ ）
アジュバントなしでの免疫化、対照（50ug/ ）
アジュバントなしでの免疫化、対照（25ug/ ）

【図９】

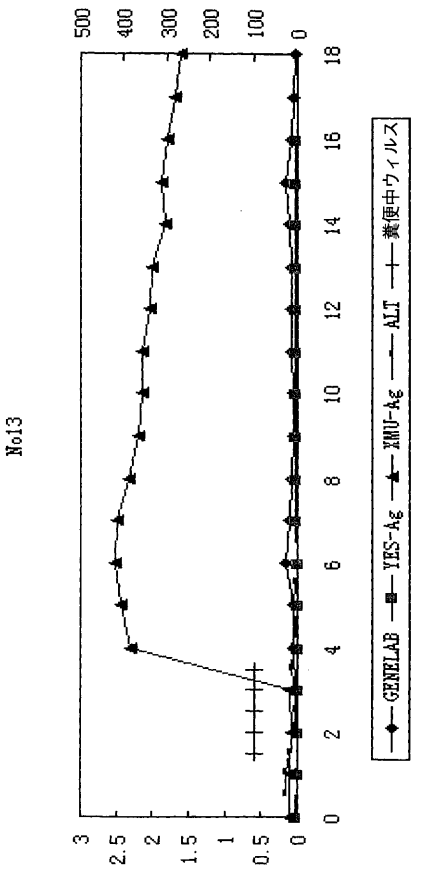

免疫化マウス1
免疫化マウス2
免疫化マウス3
アルミニウムアジュバントでの免疫化（2.0ug/ ）
アルミニウムアジュバントでの免疫化（5.0ug/ ）
アルミニウムアジュバントでの免疫化（10ug/ ）

【図１０】


No1
GENELAB
YES-Ag
XMU-Ag
ALT
糞便
A
No2
GENELAB
YES-Ag
XMU-Ag
ALT
糞便中ウィルス
B


No3
500
400
300
200
100
0
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
GENELAB
YES-Ag
XMU-Ag
ALT
糞便中ウィルス

C


No13
500
400
300
200
100
0
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
GENELAB
YES-Ag
XMU-Ag
ALT
糞便中ウィルス

D

【国際公開パンフレット】

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日:
2002年5月23日(23.05.02)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 02/40681 A1

(51) 国际分类号[7]: C12N 15/51

(21) 国际申请号: PCT/CN01/01469

(22) 国际申请日: 2001年9月30日(30.09.01)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
00130634.0 2000年9月30日(30.09.00) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 养生堂有限公司(YANG SHENG TANG COMPANY, LTD.) [CN/CN]; 中国海南省海口市金盘工业区金牛路6号, Hainan 570216 (CN)。

(72) 发明人;及
(75) 发明人/申请人(仅对美国): 夏宁邵(XIA, Ningshao) [CN/CN]; 张军(ZHANG, Jun) [CN/CN]; 李少伟(LI, Shaowei) [CN/CN]; 葛胜祥(GE, Shengxiang) [CN/CN]; 顾颖(GU, Ying) [CN/CN]; 何志强(HE, Zhiqiang) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市曙光路29号养生堂有限公司, Zhejiang 310007 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市复兴门内大街158号远洋大厦10层, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则4.17的声明:
- 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号，请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的"代码及缩写符号简要说明"。

(54) Title: THE POLYPEPTIDE FRAGMENTS OF HEPATITIS E VIRUS, THE VACCINE COMPOSITION COMPRISING SAID FRAGMENTS AND THE DIAGNOSTIC KITS

(54) 发明名称: 戊型肝炎病毒之多肽片段以及包含所述片段的疫苗组合物和诊断试剂盒及其用途

(57) Abstract: The invention relates to n-met of polypeptide comprising the amino acids of ORF-2 of the hepatitis E virus shown by the sequences of SEQ ID NO:1 or fragments thereof, wherein n is integer of 2-180. The invention also relates to the chimeric polypeptide of said fragments fused to conservative fragment of influenza virus hemagglutinin, and to covalent binding of said fragments with epitope polypeptide of ORF3 of hepatitis E virus or its fragments of immungenic activity, and to an expression vector comprising DNA molecules coding for above polypeptide, an expression host comprising expression vector. The invention also relates to vaccine composition and a kit of comprising above said polypeptide of HEV for diagnosing infection of HEV, and to diagnostic kits comprising IgG, IgM and total antibody, and its uses for preventing, diagnosing and/or treating infection of HEV.

(57) 摘要

本发明涉及包含戊型肝炎病毒 ORF2 之 SEQ ID NO: 1 中所示氨基酸序列或其片段的多肽的 n 聚体，其中 n 为 2－180 的整数，还涉及所述多肽片段与流感病毒血凝素中的保守片段构成的嵌合多肽，涉及所述多肽片段与戊型肝炎病毒 ORF3 中的表位的多肽或其有免疫原活性的片段共价结合，涉及包含编码上述多肽的 DNA 分子之表达载体，含有该表达载体的能够表达所述多肽的表达宿主，本发明还涉及含有上述多肽的戊型肝炎病毒疫苗组合物及戊型肝炎病毒感染的诊断试剂盒，包括戊型肝炎病毒 IgG、IgM 以及总抗体的诊断试剂盒，以及所述疫苗组合物和诊断试剂盒在预防、诊断和/或治疗戊型肝炎病毒感染中的用途。

WO 02/40681 A1

戊型肝炎病毒之多肽片段以及包含所述片段的疫苗组合物和诊断试剂盒及其用途

发明领域

本发明涉及包含戊型肝炎病毒开放阅读框（ORF）2之（如 SEQ ID NO: 1 中所示）氨基酸序列或其片段的多肽的 n 聚体，其中 n 为 1-180 的整数，还涉及本发明所述多肽片段与流感病毒血凝素中的保守片段构成的嵌合多肽，涉及与戊型肝炎病毒 ORF3 中的表位的多肽或其有免疫原活性的片段相结合的本发明所述多肽片段，涉及包含编码上述多肽的 DNA 分子之表达载体，含有该表达载体的能够表达所述多肽的表达宿主，本发明还涉及含有上述多肽的戊型肝炎病毒疫苗组合物及戊型肝炎病毒感染的诊断试剂盒，包括戊型肝炎病毒 IgG、IgM 以及总抗体的诊断试剂盒，以及所述疫苗组合物和诊断试剂盒在预防、诊断和/或治疗戊型肝炎病毒感染中的用途。

背景技术

戊型肝炎病毒（以下简称为 HEV）作为一种肠道传染性非甲非乙型肝炎的致病因子在 1983 年首先被发现的（Balayan 等人，1983. Intervirology 20:23）。戊型肝炎主要流行于亚洲、非洲、中美洲的发展中国家，发达国家中的病例主要见于外来移民或出国旅行者中，可以以散发形式存在，也可出现大流行。从五十年代到九十年代间，先后有数次由于饮水污染导致的戊型肝炎暴发流行（Visvanathan, 1957，印度医学研究杂志（Indian J. Med. Res.）(Suppl.). 45:1-30; Wong 等人，1980，柳叶刀（Lancet.），2:882-885; Myint 等人，1985，美国热带医疗卫生杂志（Am J Trop Med Hyg.），34:1183-1189; Belabbes 等人，1985 医学病毒学杂志（J Med Virol.），16:257-263;

Hau 等人，1999，美国热带医疗卫生杂志，60:277-280）。HEV 感染多为自限性过程，少有慢性化，但当孕妇感染戊型肝炎时后果较为严重，病死率可高达 17％以上（Tsega 等人，1992，临床感染性疾病（Clin. Infec Dis.），14:961-965; Dilawari 等人，1994，印度胃肠疾病杂志（ Indian J Gastroenterol.），13:44-48; Hussaini 等人，1997，病毒性肝炎杂志（J Viral Hepat.），4:51-54）。

1991 年，研究者首次获得了 HEV 的全长基因组序列，发现其为单股正链无包膜 RNA 病毒（Tam 等人，1991，病毒学（Virology）185:120-131）。对 HEV 基因组的序列分析表明，约 7.2kb 的病毒基因组含有三个开放读码框架。位于 5'末端的 ORF1 编码病毒非结构蛋白，位于 3'末端的 ORF2 编码病毒主要结构蛋白。ORF3 的 5'端与 ORF1 的 3'端有 1 个碱基的重叠，3'端与 ORF2 有 339 个碱基的重叠。ORF3 被认为编码另一个功能尚不明确的结构蛋白。（Tam 等人， 1991，病毒学，185:120-131; Aye 等人，1992，核酸研究（Nucleic Acids Res.），20:3512; Aye 等人，1993，病毒遗传学（Virus Genes.），7:95-109; Huang 等人，1992，病毒学，191:550-558; Reyes 等人，1993，病毒学学报增刊（Arch Virol Suppl.）7:15-25）。

长期以来，HEV 感染的检测主要依赖于免疫电镜技术（IEM）或免疫荧光技术，然而，这些检测技术十分繁杂，价格昂贵，而且在多数实验室难以完成。在 HEV 基因组克隆和测序完成之后，发展出了更灵敏的检测技术如酶联免疫吸附试验（ELISA）、蛋白印迹试验（Western blot）和聚合酶链反应（PCR）等，用于 HEV 感染相关标志物的检测。

发展血清 HEV 抗体检测试剂的必要性早已被广大研究人员所认识，但由于感染者或感染动物的 HEV 病毒分泌浓度极低，因而几乎不可能作为血清检测试剂的抗原来源，而迄今 HEV 的细胞培养的效

率仍极低，同样也无法得到足够量的抗原用于检测试剂。因此目前HEV 的抗体检测一直依赖于合成肽抗原和重组抗原。遗憾的是，利用不同区域的合成肽或重组抗原进行的众多血清学研究结果间存在着相当大的不一致性。例如，Goldsmith 等人，（1992，柳叶刀，399:328-331）用 ORF2 3-2（M）抗原（墨西哥株 ORF2 的氨基酸 613-660 片段）对入院戊肝病人进行检测，其 IgG 检出率为 91%，但 6～12 个月后仅剩 27～50%，而用 3-2(M)的同源片段 3-2(B)（缅甸株 ORF2 的相同片段）进行检测，入院病人的检出率仅为 64%，6～12 月后无一检出；相反地，3-2(M)对一例巴基斯坦患者恢复期血清无反应，而 3-2(B)对该病人 4.5 年后的血清仍可检出。对这些蛋白，当一些病人抗体已经阴转时，另一些病人仍可有很高的抗体存在。用大肠杆菌表达的多线性表位嵌合蛋白抗原的结果也类似。因此一直无法对 HEV 感染的抗体动态进行较深入的描述。大体而言，在疾病早期即可检出特异性 IgG 抗体，发病后 2～4 周达峰值，随后较快下降，在发病后 9 个月即有较多阴转，也有一些患者在发病后多年仍可呈阳性。最近，利用杆状病毒表达系统和大肠杆菌表达系统分别表达出了几种重组抗原，其与急性期和恢复期血清均有良好反应。这些抗原在逻辑上更适合于血清流行病学调查：虽然在急性期后血清抗 HEV-IgG 滴度迅速下降，但在多年后仍可维持在可检出的水平上。值得注意的是，这种抗体与疾病流行时对感染的保护是相关的。

另一方面，国际上一直未能研制成功成熟的 HEV-IgM 抗体检测试剂，这与目前采用的检测方法均使用间接法有关。间接法检测 IgM 抗体的技术中，一方面影响检测结果的因素众多，重复性较差，另一方面，检测结果可靠性不好，容易出现假阳性，同时阴性值偏高，灵敏度也较差。从目前的各种报道看来，在检测临床标本时，通常 IgM 检测呈阳性时 IgG 抗体也已可同时检出，因此对于早期诊

断价值不大，但对于提高急性感染诊断的特异性有帮助。

由于已报道的几种合成肽抗原和一些重组抗原的抗体在多数感染者中具有迅速消失的急性抗体表现，因此目前临床上通常以 IgG 抗体检测试剂进行急性戊肝的诊断，与临床的符合率也较高，但该方法的最大缺陷还是无法区分患者为既往感染或近期感染，特别在戊肝高流行区容易造成误诊，而用于流行病学调查时则会低估戊肝的流行率。因此，目前对可靠灵敏的μ链捕获法 IgM 检测试剂和对恢复期血清仍敏感的高灵敏度 IgG 检测试剂的需求都十分迫切。

近几年来，在研制高灵敏度 IgG 试剂方面取得了一定进展。Mast 等人（1998，肝脏病学（Hepatology）27: 857-861）对国际上 10 种主要的 IgG 抗体 EIA 试剂进行了综合评价，结果在检出已知阳性血清方面有不少检测试剂的结果吻合得很好，但在对美国献血员的检测中各试剂的结果间有较大的差距，提示在非流行地区 HEV 感染率的调查结果的可靠性较差。这些试剂中的大多数采用戊型肝炎病毒的线性表位作为抗原，但有两种试剂采用了构象型表位，一种是 ORF2.1（aa394~660），另一种是杆状病毒表达的 VLP（aa112~607）。这两种抗原都可以检出恢复期抗体，但迄今仍无直接数据对两者间的符合情况进行比较，也有可能两者识别的是不同的抗体。另外，VLP 试剂在美国这一非流行区域有接近 20％的检出率，使人们不免对其特异性产生了怀疑，但随着猪、羊、牛、鸡、鼠、野猴和圈养猴在内的动物体内陆续检出 HEV，而在美国马里兰州、路易斯安娜州野鼠的抗体检出率分别高达 77%和 44%，也有可能美国人群的抗体流行率就是比预计的高出许多，但由于动物 HEV 的毒力问题而极少引起临床疾病(Kabrane-Lazizi 等人，1999 美国热带医疗卫生杂志，61:331-335)。而 ORF2.1 试剂在巨细胞病毒（CMV）感染者、自身免疫病患者中的检出率也有所偏高。另外，报道的 ORF2.1 多肽为

GST 融合蛋白或多聚组氨酸融合蛋白，在实际应用中易出现假阳性结果。

由于 HEV 的细胞培养和组织培养均未成功，目前还没有找到实用的获得大量病毒的手段，因此传统的灭活疫苗和减毒活疫苗的研制工作均难以开展，而只有通过基因工程手段进行亚单位疫苗或 DNA 疫苗的研制。

戊型肝炎病毒的 ORF2 开始于 5147 位碱基，含 1980 个核苷酸，编码 660 个氨基酸的多肽，推测为病毒主要结构蛋白，组成病毒衣壳。ORF2 蛋白在 N 端有一个典型的信号肽序列，其后是一个富含精氨酸的结构域，这一强正电区域被认为与病毒组装过程中的基因组 RNA 衣壳化（encapisidation）有关。ORF2 在翻译过程中通过信号肽识别蛋白（SRP）机制进入内质网（ER），并在 ER 中糖基化和累积，并很可能在此形成衣壳的子粒（capsomer）。ORF2 上有三个 N-糖基化位点，Asn-137、Asn-310 和 Asn-562，在各毒株间高度保守，其中 Asn-310 为主要糖基化位点。以 ORF2 转染哺乳动物细胞 COS、人肝癌细胞 Huh-7、HepG2，表达出 88kD 糖蛋白，在胞浆和胞膜上均可见到。对这些糖基化位点进行突变，并不影响 PORF2 定位于细胞膜，而去除信号肽序列后则 PORF2 仅见于胞浆，提示 PORF2 的移位而非糖基化为蛋白细胞表面定位所必需。PORF2 可能与 HBV 的 MS 蛋白一样直接由内质网（ER）分泌至细胞表面，而无需经 Golgi 体。在转染细胞表面，gpORF2 并非散在分布，而是集中于某些区域，提示一个蛋白亚单位的主动结合过程，也许在此汇集成某种更有序的高级形式。病毒体最后的组装/成熟因需要基因组 RNA 的衣壳化，因此必然发生在 ER 外的胞浆中或胞膜内壁，gpORF2 在细胞膜上的聚集可能意味着病毒体的装配。同时，衣壳蛋白在细胞膜上的定位也提示成熟病毒通过芽生方式分泌至细胞外

的可能性。另一个值得注意的是，用具备翻译修饰功能的体外转录翻译体系进行 PORF2 的体外翻译，翻译出的 88kD 的 gpORF2 除单体外，还可见明显的二聚体形式，说明 gpORF2 有自发形成同源二聚体的倾向，病毒衣壳的子粒很可能即是由 gpORF2 的同源二聚体组成(Jameel 等人，1996. 病毒学杂志(J. Virol.)，70:207-216.)。Li 等通过冰冻蚀刻电镜技术显示出杆状病毒表达的重组 HEV 类病毒颗粒为 T=1 的二十面体对称结构，由 60 个 P50 亚单位拷贝组成，其直径约 22~23nm。由于这一大小的颗粒内部空间对 RNA 的容纳能力在 1kb 左右，而 HEV 的基因组为 7.5kb 长，因此推测天然 HEV 病毒应为 T≥3 的晶格结构，但子粒的拓扑结构相似。T = 3 的亚单位总数为 90 个子粒（Li 等人，1999. 病毒学，265:35-45.）。

由上述可知，HEV 是一种无包膜病毒，病毒衣壳则由 ORF2 编码蛋白组成，该蛋白具有主要的优势免疫表位，并已发现了一些中和表位，因此成为亚单位基因工程疫苗的首选区段。

在美国专利 5885768 号中，Reyes 等首先报道了利用含有缅甸株 ORF2 C 端 2/3（aa225~660）的大肠杆菌重组蛋白 trpE-C2，采用铝盐佐剂，50μg/针于 0 天、30 天静脉免疫 4 只食蟹猴，2 只为空白佐剂对照。在 4 周后采血蛋白质印迹（WB）检测，结果均未测出抗体；此时对其中 2 只猴以无佐剂不溶性重组蛋白 80μg/只第三次免疫，4 周后抗体阳转（WB）。将 6 只实验猴分为两组，每组含 3 针免疫、2 针免疫和对照各 1 只，第一组以缅甸毒株攻击，第二组以墨西哥毒株攻击。结果：(1)免疫组 ALT 一直维持正常水平，对照组 ALT 则较攻毒前呈 6~10 倍升高；（2）应用免疫荧光法检测肝活检标本，攻击缅甸毒株的 3 针免疫猴未见 HEV 抗原存在，其余均见肝细胞内 HEV 抗原存在；（3）攻击缅甸毒株的 3 针免疫猴未见粪便排毒，其余均陆续见粪便排毒。尽管该研究规模很小，但提示 ORF2

来源的重组蛋白在野毒株攻击时能阻止病毒性肝炎生化指标的出现，对一些实验猴可提供完全保护。

Tsarev 等人（1994，美国国家科学院院报（Proc Nat Acad Sci USA.），91:10198-10202；Tsarev 等人，1993，感染性疾病杂志（J. Infect. Dis.），168:369-378；Tsarev 等人，1997，疫苗（Vaccine）15:1834-1838）应用昆虫杆状病毒表达系统（SF9 细胞）表达 HEV ORF2 基因，在细胞上清中获得 20nm~30nm 蛋白颗粒，大小多样，在重组病毒感染细胞后期小颗粒明显增多；WB 检测杆状病毒表达的 ORF2，可见到 25kD，29kD，35kD，40~45kD，55~70kD，72kD 等多条特异带；利用离子交换、分子筛法纯化 HEV 特异性蛋白，在重组病毒感染细胞后第 1 天首先出现 72kD 的全长 ORF2 肽，随后逐渐消失，第 2 天出现 63kD 和 55kD 肽；1 天时即有 53kD 肽出现于细胞上清中，且量大，在 3 天时丰度最高，提示初始 72kD 蛋白随机剪切出 55kD（在细胞裂解液中）和/或 53kD（细胞上清）HEV 蛋白产物；对 55kD 蛋白和 53kD 蛋白进行两端测序，结果表明 55kD 蛋白位于 ORF2 的 aa112~607，而 53kD 蛋白位于 aa112~578，而 63kD 蛋白对应于 aa112~660；ELISA 结果显示，55kD 蛋白的活性明显强于 53kD 蛋白。只以 aa112~660 片段在昆虫杆状病毒系统中表达，同样可见 63kD 和 55kD HEV 重组蛋白。

收获感染 7 天的 SF9 细胞，初步纯化后以铝佐剂吸附，50μg/针肌肉注射免疫食蟹猴，4 只接种 1 针，4 只接种 2 针（0d，28d），最后 1 针后 4 周以同一 HEV 病毒株（SAR-55 株，来源于巴基斯坦病人）1000~10000CID_{50} 剂量静脉攻击，15 周内每周 1 次肝活检及收集血清、粪便。结果在攻毒前 1 针组抗体滴度在 1:100~1:10000 之间，而 2 针组滴度均达 1:10000（纯化 55kD 蛋白包被）；1 针组 1 只实验猴在攻毒后 9 周因 1 次麻醉意外死亡（仍统计在结果中），2 针组 2

只在攻毒后即死亡（未进行统计），原因不明；6 只免疫组中，无一有 ALT 升高或肝活检病理改变，均未检出病毒血症，但 1 针组 4 只中有 3 只有粪便排毒，而 2 针组 2 只均未见排毒。

通过离子交换、分子筛等进一步纯化杆状病毒系统表达的 55kD 蛋白，使其纯度达到 99% 以上，铝佐剂吸附后，按每剂量 50μg、10μg、2μg、0.4μg、0μg（对照）五组 0d、28d 两针免疫恒河猴，每组 4 只，最后一针后 4 周以 30 万 MID_{50} 同型病毒（SAR-55 株）攻击，结果免疫组 16 只猴均不发病，肝活检仅 1 只 2μg 组和 1 只 0.4μg 组出现轻微病理改变；虽然免疫组避免了肝炎，但均无法避免感染，在所有 16 只免疫猴中均出现了粪便排毒，除 1 只 50μg 组和 1 只 10μg 组外均出现了病毒血症，而且在大多数猴中虽然排毒量有所下降，但排毒时间并无明显缩短。另以 2×50μg 免疫 4 只恒河猴，最后一针后 4 周以 10 万 MID_{50} 异型病毒（墨西哥株 Mex-14）攻击，结果与同型毒株攻击结果类似，4 只免疫猴均未见 ALT 升高及肝病理改变，但仅 1 只未查见粪便排毒和病毒血症，其余 3 只均有粪便排毒和病毒血症，虽然排毒量有明显下降，但排毒时间并无明显缩短。据作者分析，这批实验猴子完全保护效果较前次为差，可能与所用病毒量有较大关系，本次实验用的同型病毒量达 30 万 MID_{50}，而前次实验仅用了 1000－10000MID_{50} 的病毒量。另一值得注意的是，在攻毒前，从 0.4μg 到 50μg 组的血清抗体滴度并无明显差别。

Genelabs 公司研究人员同样利用昆虫杆状病毒表达系统表达 ORF2 的 aa112~660 片段，获得大量可溶性的重组 62kD 蛋白，纯化后免疫食蟹猴，同样可对 1000CID_{50} 剂量的异源病毒（墨西哥株）攻击产生良好保护（20μg 免疫 3 只，均不发病，其中 2 只不排毒，1 只排毒减少）(Zhang 等人，1997，临床诊断与实验室免疫（Clin

Diagn Lab Immunol.）;4:423-8.)

McAtee 等人，（1996 蛋白质表达纯化（Protein Expr. Purif.）8:262-270）用重组杆状病毒制备的缅甸株 ORF2 62kD 蛋白（aa112~660）为双联体，用方向高效液相层析偶联电喷射质谱技术（LC-MS）将双联体解离，得到相对分子质量分别为 56.5kD 和 58.1kD 的多肽，经蛋白质肽谱分析，该两个多肽的 N 端同为 aa112，C 端分别为 aa637 和 aa652，其中 56.5kD 蛋白具有很好的免疫反应性。

澳大利亚 Anderson 小组(Anderson 等人，1999. 病毒学方法杂志（J. Virol. Methods.）81:131-142; Li 等人，1994，临床微生物杂志（J Clin Microbio.）32:2060-2066; Li 等人，1997 医学病毒学杂志（J. Med. Virol.） 52:289-300; Li 等人，2000，医学病毒学杂志，60:379-386)用大肠杆菌表达 ORF2 的 aa394~660（ORF2.1），其表达为带有 GST 或多聚组氨酸（His）的融合蛋白，可以形成一种高度构象依赖的恢复期表位，对恢复期血清有很高的检出率，但是当该片段的 N 端再延伸一些或缩短一些时都会使恢复期表位丧失。以 ORF2.1 重组蛋白免疫小鼠，取 30w 血清对恢复期病人血清进行阻断实验，以杆状病毒表达的 VLP 为包被抗原，其阻断率可达 81%~86%。以 ORF2.1 蛋白制备单克隆抗体，获得两个识别 ORF2.1 构象型表位的单抗 2E2 和 4B2，以及另外 5 个可能识别线性表位的单抗，其中 2E2 或 4B2 对恢复期病人血清与 VLPs 抗原反应的阻断率可达 60%，提示这两个单抗识别的表位占恢复期病人血清抗体识别表位中的主要部分。这种种迹象提示 ORF2.1 可能具备了与 VLP 十分相似的主要表位结构，这一表位抗体在感染者血清中可持续较长时间存在，很可能是一个重要的保护性表位，但迄今仍未见 ORF2.1 蛋白对动物的保护实验结果报道。

发明概述

本发明的一个方面，提供了一种包含戊型肝炎病毒 ORF2（如 SEQ ID NO: 1 中所示）的氨基酸序列或其片段的多肽的 n 聚体，其中 n 为 1-180 的整数，包含的所述 SEQ ID NO: 1 的氨基酸片段的多肽选自:

（1）氨基端位于 113 位至 469 位氨基酸之间，羧基端位于 596 位氨基酸至 660 位氨基酸之间的多肽，

（2）氨基端位于 370 位至 469 位氨基酸之间，羧基端位于 601 位氨基酸至 628 位氨基酸之间的多肽，

（3）氨基端位于 390 位至 459 位氨基酸之间，羧基端位于 601 位氨基酸至 610 位氨基酸之间的多肽，

（4）具有 SEQ ID NO: 1 的 414 位至 660 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 247，

（5）具有 SEQ ID NO: 1 的 429 位至 660 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 232，

（6）具有 SEQ ID NO: 1 的 439 位至 660 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 222，

（7）具有 SEQ ID NO: 1 的 459 位至 660 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 201，

（8）具有 SEQ ID NO: 1 的 394 位至 628 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 235N，

（9）具有 SEQ ID NO: 1 的 394 位至 618 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 225N，

（10）具有 SEQ ID NO: 1 的 394 位至 602 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 209N，

（11）具有 SEQ ID NO: 1 的 394 位至 601 位氨基酸序列的多

肽，以后称为多肽 208N,

（12）具有 SEQ ID NO: 1 的 394 位至 606 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 NE2I,

（13）具有 SEQ ID NO: 1 的 390 位至 603 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 217D,

（14）具有 SEQ ID NO: 1 的 374 位至 618 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 205,

（15）具有 SEQ ID NO: 1 的 414 位至 602 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 189,

（16）具有 SEQ ID NO: 1 的 414 位至 601 位氨基酸序列的多肽，以后称为多肽 188,

（17）具有 SEQ ID NO: 1 的 459 位至 628 位氨基酸序列的多肽，以及

（18）氨基端添加 Met，羧基端被修饰的 SEQ ID NO: 1 的 X 位至 603 位氨基酸序列的多肽，其中所述羧基端修饰是 603 位氨基酸 Pro 的 3'端以 5'－3'方向添加氨基酸序列-Pro-Pro-Arg，包括:

a) X=394 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 2 所示的多肽，以后称为 NE2;

b) X=414 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 3 所示的多肽，以后称为 193C;

c) X=429 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 4 所示的多肽，以后称为 178C;

d) X=439 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 7 所示的多肽，以后称为 168C;

e) X=449 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 8 所示的多肽，以后称为 158C;

f) X=459 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 9 所示的多肽，以后称为 148C;

g) X=469 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 10 所示的多肽，以后称为 138C.

本发明另一方面，提供了与上述任一多肽具有至少 80% 同一性，且具有相同的抗原性、免疫原性等生物学性质的多肽。

本发明又一方面，提供了重组表达载体，其包含编码上述多肽的核苷酸序列。本发明还提供数种经上述重组表达载体转化的宿主细胞，其能够表达包含的核苷酸序列所编码的上述多肽。

本发明的再一方面，提供了一种用于预防和/或治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，其含有至少一种上述多肽或其任意组合，以及任选地药学可接受的载体和/或佐剂。

本发明的再一方面，提供了由上述多肽之一与流感病毒血凝素的保守片段构成的嵌合蛋白。

本发明的再一方面，提供了一种用于预防和/或治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，其含有由上述多肽之一与流感病毒血凝素的保守片段构成的嵌合蛋白，以及任选地药学可接受的载体和/或佐剂。

本发明的再一方面，提供了上述疫苗组合物用于免疫哺乳动物使其免受戊型肝炎病毒感染的用途。

本发明的再一方面，提供了一种用于预防和/或治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染的方法，其包括向受试者施用预防和/或治疗有效量的至少一种上述多肽或者由上述多肽之一与流感病毒血凝素的保守片段构成的嵌合蛋白。

本发明的再一方面，提供了一种用于诊断生物学样品中戊型肝炎病毒感染的诊断试剂盒，其中包括诊断有效量的至少一种上述多

肽或其任意组合。

本发明的再一方面，提供了一种用于诊断生物学样品中戊型肝炎病毒感染的诊断试剂盒，其包括诊断有效量的至少一种上述多肽或其任意组合，其中还包括戊型肝炎 ORF3 中的抗原性表位的多肽，或其有抗原活性的片段，其中 ORF3 的抗原性表位多肽或其具有抗原活性的片段任选地与所用的上述多肽共价结合。

本发明的再一方面，提供了一种用于诊断生物学样品中戊型肝炎病毒感染的方法，其包括用上述诊断试剂盒在适于发生抗原抗体反应的条件下与待测样品相接触。

本发明的再一方面，提供了一种用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgG 抗体的方法；一种用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgM 抗体的方法，以及检测生物学样品中戊型肝炎病毒总抗体的方法。

发明详述

除非另外定义，这里所用的所有技术和科学名词都表达的是在本发明涉及领域里的熟练技术人员所理解的通常含义。这里所用的命名和在细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。在本发明中，除另外指出，以下名词的含义应为：

“戊型肝炎病毒”，或“HEV”，是指一种病毒、病毒类型或病毒类别，具体地，（I）它引起来源于水的传染性肝炎；（II）它在血清学特性上不同于甲型肝炎病毒（HAV）、乙型肝炎病毒（HBV）、丙型肝炎病毒（HCV）、和丁型肝炎病毒（HDV）；（III）该病毒含有一个同源于插入 pTZKF1(ET1.1)中之 1.33kb cDNA 的基因组区域，所述质粒由美国典型培养物保藏中心（ATCC）保藏号 67717

的大肠杆菌菌株 BB4 携带。

本发明的多肽

本发明一方面提供了一系列具有出人意料的良好抗体反应性和/或免疫原性的戊型肝炎病毒的多肽片段，所述片段包含于戊型肝炎病毒 ORF2 中 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列中。所述各个片段的名称详见实施例 6 中的表 1。

在本发明中，所用的氨基酸序列的位置编号与国际纯化学和应用化学协会所用的编码方式相同（International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry. Joint Commission on Biochemical Nomenclature, "Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides", *Pure Appl. Chem*, 56, 595-624 (1984).）。具体说来，以 SEQ ID NO: 1 中起始信号 Met 为位置 1，自 5' 向 3' 递增。

本发明的一个方面，提供了包含戊型肝炎病毒 ORF2（如 SEQ ID NO: 1 中所示）的氨基酸序列或其片段的多肽的 n 聚体，其中 n 为 1-180 的整数。当 n=2 时，所述多肽为二聚体；当 n=3 时，所述多肽为三聚体；当 n=4 时，所述多肽为四聚体，其余类推。

本发明中，包含所述 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列之片段的多肽的氨基端（5' 端）位于 113 位至 469 位氨基酸之间，优选地位于 370 位至 469 位氨基酸之间，更优选地，位于 390 位至 459 位氨基酸之间，所述多肽的羧基端位于 596 位氨基酸至 660 位氨基酸之间，优选地，位于 601 位氨基酸至 628 位氨基酸之间，更优选地，位于 601 位氨基酸至 610 位氨基酸之间的多肽。具体地，本发明所述的多肽尤其是多肽 247，多肽 232，多肽 222，多肽 201，多肽 235N，

多肽 225N，多肽 209N，多肽 208N，多肽 NE2I，多肽 217D，多肽 205，多肽 189，多肽 188，和具有 SEQ ID NO: 1 的 459 位至 628 位氨基酸序列的多肽。

本发明中，包含所述 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列之片段的多肽进一步包括氨基端添加 Met，羧基端被修饰的 SEQ ID NO: 1 的 X 位至 603 位氨基酸序列的多肽，其中 X 位分别为第 394、414、429、439、449、459 和 469 位，所述羧基端修饰是 603 位氨基酸 Pro 的 3'端以 5'－3'方向添加氨基酸序列-Pro-Pro-Arg，包括 a) NE2; b) 193C; c) 178C; d) 168C; e) 158C; f) 148C; g) 138C.

本发明另一方面，提供了与上述任一多肽具有相同的抗原性和/或免疫原性等生物学性质，且具有至少 80％同一性的多肽，即本发明所述多肽的衍生物。具体的，如果一个多肽之氨基酸序列包含有上述多肽的氨基酸序列，但其 N 端和/或 C 端带有其他非本发明所述多肽本身的相邻序列的其他氨基酸，然而，所得多肽具有与本发明所述多肽相似的抗原性和/或免疫原性等生物学性质仍然类似，则称该多肽为本发明所述多肽的衍生物，其相应的 DNA 分子称为衍生 DNA。例如，为利于目标多肽的表达和/或纯化，而在上述多肽序列的 N 端添加起始氨基酸（甲硫氨酸）或其他引导肽和/或信号肽，或在 C 端添加数个组氨酸以利于纯化等。

本发明进一步地涵盖了与上述任一多肽具有相同的抗原性和/或免疫原性等生物学性质的多肽；或者与上述任一多肽具有至少 80％同一性的多肽。此处所述的“同一性百分比”旨在表示经序列优化比对后获得的所比较的两种序列之间相同核苷酸或氨基酸残基的同一性百分比，该百分比完全是统计学的，两种序列之间的差异随机分布且包含于其全长。两种核酸或氨基酸序列之间的序列比较通常通过将这些序列优化比对后比较来进行，所述比较通过片段或通过

“比较窗”来进行，从而鉴定并比较局部区域的序列相似性。除了手工操作，用于比较的序列优化比对可以通过 Smith 和 Waterman（1981，应用数学进展（Ad. App. Math.）2: 482）的局部同一性算法、Neddleman 和 Wunsch（1970，分子生物学杂志（J. Mol. Biol.）48: 443）的局部同一性算法、Pearson 和 Lipman（1988，美国国家科学院进展（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）85: 2444）的相似性搜索方法、使用这些算法的计算机软件（威斯康星遗传学软件包（Genetics Computer Group，575 Science Dr.，Madison，WI）中的 GAP、BESTFIT、FASTA、和 TFASTA，或者 BLAST N 或 BLAST P 比较软件）产生。

两种核酸或氨基酸序列之间的百分比同一性通过比较经比较窗优化比对的这两种序列来测定，待比较的核酸或氨基酸序列在比较窗中的区域相对于用于这两种序列间优化比对的参考序列可能包含添加或删除。百分比同一性的计算方法是，测定两种序列之间核苷酸或氨基酸残基相同的同一位置的数目，将此同一位置数目除以比较窗中的总位置数目，并将得数乘以 100，从而获得这两种序列之间的百分比同一性。

例如，可以利用 BLAST 程序“BLAST 2 sequences”，可以由站点http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/b12.html获得，所用参数为缺省值（特别是“开放缺口罚”参数：5 和“延伸缺口罚”参数：2；所选矩阵是例如由程序提供的“BLOSUM 62”矩阵），待比较的两种序列之间的同一性百分比由程序直接计算。

本发明所述多肽的制备

本发明所述的多肽可通过化学合成、遗传重组的方法制备。优选地，本发明所述多肽可通过重组途径表达。用于制备重组蛋白的

方法在当今对于本领域技术人员是众所周知的，因而在此描述中将不再详述；然而，可以参照实施例中描述的方法。在可能用于产生这些重组蛋白的细胞中，当然应当提及细菌细胞（P. O. Olins 和 S. C. Lee，1993，大肠杆菌中异源基因表达的最新进展，生物技术当代观点（Curr. Op. Biotechnology）4：520－525）、酵母细胞（R. G. Buckholz，1993，用于表达异源基因产物的酵母系统，生物技术当代观点 4：538－542）、动物细胞特别是哺乳动物细胞培养物（C. P. Edwards 和 A. Aruffo，1993，基于 COS 细胞的瞬时表达系统的现行应用，生物技术当代观点 4：558－563）、和昆虫细胞，用于昆虫细胞的方法可能采用例如杆状病毒（V. A. Luckow，1993，用于表达人类基因产物的杆状病毒系统，生物技术当代观点 4：564－572）。因此，本发明又一方面，提供了重组表达载体，其包含编码上述多肽的核苷酸序列。本发明还提供了一种经上述重组表达载体转化的宿主细胞，其能够表达包含的核苷酸序列所编码的上述多肽。

在本发明的一个实施方案中，分别利用大肠杆菌表达本发明所述的如下多肽：多肽 247，多肽 232，多肽 222，多肽 201，多肽 235N，多肽 225N，多肽 209N，多肽 208N，多肽 NE2I，多肽 217D，多肽 205，多肽 189，多肽 188，以及多肽 a) NE2；b) 193C。测定了所述多肽的单双体比例，多聚体形成情况以及相应的半径（具体结果见实施例 6）。结果表明，上述表达产物易于复性，复性后在溶液中可自发形成较稳定的多聚体的特点，这一特点使本发明多肽尤其适于作为疫苗，用于戊型肝炎病毒感染的预防或治疗。在本发明所举的实施方案中，用一种方法测得了从 2 到 4 的多聚体。由于方法学的限制，不能排除其中推测的三聚体实际上是由适当比例的二聚体和四聚体混合物组成，同样也不排除由于方法的改进，实际上本发明所述多肽能够形成更大的聚合体。从已公开的文献中（(Jameel 等人，

1996. 病毒学杂志, 70:207-216; Li 等人, 1999. 病毒学, 265:35-45.)。可以发现, 天然 HEV 病毒有较大的可能是由 90 个子粒组成, 而每个子粒为 ORF2 多肽的二聚体, 因此可以合理地认为, 本发明所述多肽实际上最大可形成 180 聚体, 或由于对病毒结构认识的深入, 实际上可形成大于 180 聚体的多聚体。

在本发明的又一优选的实施方案中, 经大肠杆菌 ERR2566 表达的多肽 201, 虽然以高表达量的包涵体形式表达, 但是, 本发明人出人意料的发现, 所述包涵体在条件为 pH7.45 的 PBS 缓冲液中可以自发发生蛋白质复性, 无需加入盐酸胍和多步透析等费时费力且大大降低回收率的传统变性/复性过程, 同时, 由于其它同时由大肠杆菌表达的非目标蛋白包涵体在上述条件下不能自发复性, 故只须简单的离心、收集上清液, 即可基本上纯化本发明目标蛋白。

本发明多肽与流感病毒血液凝集素保守片段构成的嵌合蛋白

本发明的再一方面, 提供了由上述多肽之任一项与流感病毒血凝素的保守片段构成的嵌合蛋白。血细胞凝集素(以下简称为 HA)是流感病毒的两种表面抗原之一, 是特异性检测受试者血清中流感病毒抗体的最重要的抗原。已知用所述 HA 免疫动物产生的抗体可有效防止流感病毒再次感染受试者。因此, 有理由认为大多数人群体内具有 HA 的抗体。根据(McEwen J 等人, 疫苗(Vaccine) 1992;10(6):405-11)文献报道, 91-108aa 表位是所有流感病毒 A 型 H3 株系的 HA 基因中的保守氨基酸序列。在本发明的一个优选实施方案中, 利用基因工程的手段首先将 HA 基因(91-108aa)和有较强免疫原性的本发明 HEV ORF2 基因之多肽片段通过柔性连接, 例如(Gly-Gly-Ser), 在原核生物表达系统中尤其是大肠杆菌中实现嵌合表达。利用已有流感病毒感染产生 HA 抗体的再次免疫加强作用,

产生高滴度的保护性抗 HEV 抗体，从而，成为比单独含有 ORF2 片段之本发明多肽的疫苗更优的 HEV 疫苗。

根据本发明的教导，本领域普通技术人员还可从 HA 基因的其它保守片段中选择适用于本发明所述的疫苗组合物的表位。至于连接 HA 的特定表位与本发明多肽的特定柔性连接，可以由适当的肽片段或类似物组成，只要其可有利于本发明的多肽与 HA 中的所选片段相结合，并基本不影响本发明的多肽用于预防/治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染。应当理解，用于连接本发明的多肽与 HA 的接头的选择主要取决于构成所选择的本发明多肽的性质。例如，不同的本发明的多肽可能需要不同接头与 HA 连接。优选的，本发明所用的 HA 保守片段为 91－108 位氨基酸的片段。

用于使作为免疫原的本发明的多肽与 HA 特定片段连接的配体，优选地用常规合成技术如化学合成技术合成。此外，技术人员利用标准化学方法如 t-BOC 化学法使用自动肽合成仪可合成任何肽。参见，例如，L.A. Carpino，美国化学协会杂志（J. Am. Chem. Soc.）79，4427（1957）。肽也可通过蛋白质的化学切割或其他方法制备。分离这些肽，使得当化学合成时其基本上不含化学前体或其他化学试剂，或通过蛋白质的化学切割获得。

此外，可通过常规遗传工程技术如重组 DNA 技术，通过在宿主微生物或细胞中克隆表达一种带有 HA 片段以及选自本发明的多肽的编码序列的 DNA 片段，在编码该肽的核酸序列所转化的宿主细胞中制备与 HA 融合的本发明的多肽之嵌合蛋白。当通过重组技术产生时，在适当转化的细胞中，可用常规方法从细胞培养基、宿主细胞或两者中纯化所得嵌合蛋白。分离重组产生的嵌合蛋白，使在通过重组 DNA 技术生产时，这些肽基本上不含细胞物质或培养基。这些肽的编码序列可以合成制备，或通过已知技术由病毒 RNA 产

生，或从可获得的含 cDNA 质粒中产生。

为在本发明的方法中使用，可将上述嵌合蛋白设计为通常已知的或另外的构建体，以提高其表达产量或有利于其纯化。在不同微生物和细胞包括如大肠杆菌、芽孢杆菌、链霉菌（Streptomyces）、酵母属（Saccharomyces）、哺乳动物、酵母、昆虫细胞和植物细胞中克隆表达 HBV 衣壳嵌合肽的系统及其合适的载体已知，并可从未公开及公开的实验室和保藏所获得，及从供应商处获得。

无论是重组产生还是合成产生，如上述产生的嵌合蛋白可用常规纯化方法纯化。本领域技术人员能容易地确定为了希望的用途使用肽所需的适当纯度水平。

疫苗组合物

本发明的再一方面，提供了一种用于预防和/或治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，其含有至少一种本发明所述的多肽或其任意组合，以及任选地药学可接受的载体和/或佐剂。

本发明的再一方面，提供了一种预防和/或治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，其含有由上述本发明多肽之一与流感病毒血凝素保守片段构成的嵌合蛋白，以及任选地药学可接受的载体和/或佐剂。

本发明的再一方面，提供了上述本发明的疫苗组合物用于免疫哺乳动物使其免受戊型肝炎病毒感染的用途。

本发明中，用于预防和/或治疗所述的哺乳动物包括但不限于人和其它灵长类动物，如狒狒、猿、猴等；经济类家畜，如牛、羊、猪、兔、鼠以及家养宠物如猫、狗、等。疫苗组合物包含治疗和/或预防有效量的至少一种本发明的多肽，即经施用一定时间治疗和/或预防受试者免受戊型肝炎病毒感染有效的量。

本发明所述的疫苗组合物可单独施用，或作为药用或预防制剂的部分，其中任选地含有药学可接受的载体，包括控制释放的制剂。所述载体还可包括适于为治疗和/或预防戊型肝炎病毒感染而施用的药学可接受的载体或稀释剂。合适的药学可接受的载体是生理学惰性和/或无毒性的。本领域已知多种载体，可根据希望的用途选用。典型的载体包括但不限于：无菌盐水、乳糖、蔗糖、磷酸钙、明胶、糊精、琼脂、明矾、氧化铝、氢氧化铝、花生油、橄榄油、芝麻油和水。另外，载体或稀释剂可包括缓释物质，如单独的或与石蜡一起的单硬脂酸甘油或二硬脂酸甘油。另外，也可使用常规缓释聚合物制剂，包括如可溶性玻璃。

此外，含有本发明至少一种多肽或其任意组合的本发明的疫苗组合物如需要可含有其他治疗或预防剂。例如，这些组合物可含有在所述戊型肝炎病毒感染的治疗或预防中有用的多种试剂的“鸡尾酒混合物”。一种这样的鸡尾酒混合物可含有其他试剂如干扰素、核苷类似物和/或 N-乙酰-半胱氨酸。

任选地，含有至少一种本发明所述多肽的疫苗组合物可进一步含有免疫系统调节剂，如在进一步诱导患者的抗体和 T 细胞应答中有用的佐剂或细胞因子。这些调节剂包括常规的基于明矾的佐剂，或胞壁酰二肽、防腐剂、化学稳定剂或其他抗原性蛋白质。一般而言，稳定剂、佐剂和防腐剂等是合适的。合适的防腐剂可包括氯氧基丁炔醇（**chloryl butynol**）、山梨酸钾、山梨酸、二氧化硫、没食子酸丙酯（**propyl gallade**）、对羟基苯甲酸脂、甘油和苯酚。

利用疫苗组合物预防和/或治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染的方法

本发明的再一方面，提供了一种用于预防和/或治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染的方法，其包括向受试者施用预防和/或治疗有效量

的至少一种 本发明所述多肽，或者施用预防和/或治疗有效量的由本发明所述多肽之一与流感病毒血凝素的保守片段构成的嵌合蛋白。尤其是，包括向受试者施用本发明的疫苗组合物。优选的，本发明所选 HA 保守片段为 91－108 位氨基酸序列片段。

可根据希望的免疫反应水平确定这些疫苗组合物中本发明多肽的适当含量。通常，含有本发明所述多肽的疫苗组合物可含有约 5μg~200μg 颗粒。这些疫苗组合物可以以单次或一系列接种施用，例如，以 2~6 个月的间隔接种 3 次。也可由经治医生判断确定合适的剂量，当作为单一治疗施用时，应考虑如患者健康状态、体重或年龄，以及成分免疫原的常规剂量等因素。待患者病症改善或接触特定病原体的可能性增加后，如必要时可施用维持剂量的含有本发明所述多肽的组合物。随后，施用的剂量或频率或此两者可减为能保持希望的作用的水平。此时，应停止治疗。但是，个体在不希望复发时可能需要长期的断续治疗。

含有至少一种本发明的多肽的疫苗组合物可通过任何合适的途径施用，例如，肠胃外施用，特别是肌内或皮下，以及口服。也可利用其他途径，如肺、鼻、耳、肛门、皮肤、眼、静脉内、动脉内、腹膜内、粘膜、舌下、皮下和颅内。

可制备含有至少一种本发明的多肽作为活性成分的疫苗组合物，其方便地为可配制为液体溶液或悬液形式的可注射的组合物。也可制备成在注射前适于以液体溶解或悬浮的固体形式。在某些实施方案中，制剂也可以是乳化的或在脂质体中封装的，或为可溶性玻璃，以便逐渐释放和/或延时释放。此外，制剂也可以是气雾剂或喷雾形式。它们也可以包含于透皮贴剂中。活性成分可以与任意量的药学可接受的并与活性成分相容的赋形剂混合。这些赋形剂包括，例如，弗氏不完全佐剂、细菌脂多糖、离子交换剂、氧化铝、硬脂

酸铝、胞壁酰二肽、卵磷脂、缓冲物、基于纤维素的物质和聚乙二醇。

检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgG 抗体、IgM 抗体或总抗体诊断试剂盒和方法

本发明所述多肽可用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgG 抗体、IgM 抗体和/或总抗体的存在，相比于现有的检测试剂盒及检测方法而言，具有灵敏度高、特异性好的特点。因此，本发明提供了用于检测生物学样品中是否存在戊型肝炎病毒感染的方法，其包括用检测有效量本发明的多肽在适于发生抗原抗体反应的条件下与待测样品相接触。

本发明所述的待检测生物学样品来源于但不限于人，以及其它灵长类动物，如狒狒、猿、猴等；经济类家畜，如牛、羊、猪、兔、鼠以及家养宠物如猫、狗等。

本发明的又一方面，提供了一种用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgG 抗体的诊断试剂盒，其中包括至少一种选自本发明的所述多肽 ，如需要，所述多肽可预包被合适的支持物表面；还包括带有可检测标记的市售或使用常规方法制备的抗待检生物样品来源的 IgG 抗体和与可检测标记相应的检测剂，如需要还应包括适当的缓冲体系。在本发明的一个实施方案中，所述待检测生物样品来源为人，所用抗体为抗人 IgG 抗体。进一步地，本发明的 IgG 抗体诊断试剂盒中还包括戊型肝炎病毒 ORF3 中的免疫原性表位的多肽，或其有免疫原活性的片段，其中 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段任选地与所用的本发明的多肽共价结合。对于 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段任选地与所用的上述多肽共价结合的情况，优选地利用遗传重组方法制备嵌合多肽。也

可以利用化学法将 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段与所用的上述多肽共价结合。

本发明的又一方面，提供了一种用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgM 抗体的诊断试剂盒，其中包括使用由常规方法制备的或市售的抗待检生物样品来源的 IgM 抗体作为捕捉抗体，如需要，所述捕捉抗体可预包被合适的支持物表面，还包括带有可检测标记的至少一种选自本发明的多肽和与可检测标记相应的检测剂，如需要还应包括适当的缓冲体系。在本发明的一个实施方案中，所述待检测生物样品来源为人，所用抗体为抗人 IgM 抗体。进一步地，本发明的 IgM 抗体诊断试剂盒中还包括戊型肝炎病毒 ORF3 中的免疫原性表位的多肽，或其有免疫原活性的片段，其中 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段任选地与所用的本发明的多肽共价结合。对于 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段任选地与所用的上述多肽共价结合的情况，优选地利用遗传重组方法制备嵌合多肽。也可以利用化学法将 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段与所用的上述多肽共价结合。

本发明的又一方面，提供了一种用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgM 抗体的诊断试剂盒，其中包括使用由常规方法制备的或市售的抗待检生物样品来源的 IgM 抗体作为捕捉抗体，如需要，所述捕捉抗体可预包被合适的支持物表面，还包括至少一种本发明所述多肽，以及带有可检测标记的抗戊型肝炎病毒多克隆抗体或单克隆抗体和与可检测标记相应的检测剂，如需要还应包括适当的缓冲体系。在本发明的一个实施方案中，所述待检测生物样品来源为人，所用抗体为抗人 IgM 抗体。进一步地，本发明的 IgM 抗体诊断试剂盒中还包括戊型肝炎病毒 ORF3 中的免疫原性表位的多肽，或其有免疫原活性的片段，其中 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫

活性的片段任选地与所用的本发明的多肽共价结合。对于 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段任选地与所用的上述多肽共价结合的情况，优选地利用遗传重组方法制备嵌合多肽。也可以利用化学法将 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段与所用的上述多肽共价结合。

本发明还提供了一种用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒总抗体的诊断试剂盒，其中包括至少一种本发明的多肽，如需要所述多肽可预包被于合适的支持物表面；还包括带有可检测标记的本发明所述多肽，以及与所选可检测标记相应的检测剂。在本发明的诊断试剂盒中，用于预包被支持物表面所用的本发明所述多肽可以与同样选自本发明所述多肽中的带有可检测标记的多肽为同一多肽，或不同的多肽。

进一步地，本发明的总抗体诊断试剂盒中还包括戊型肝炎病毒 ORF3 中的免疫原性表位的多肽，或其有免疫原活性的片段，其中 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段任选地与所用的本发明的多肽共价结合。对于 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段任选地与所用的上述多肽共价结合的情况，优选地利用遗传重组方法制备嵌合多肽。也可以利用化学法将 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫活性的片段与所用的上述多肽共价结合。

本领域技术人员知晓，本发明的上述诊断试剂盒中，可使用多种市售的或使用常规方法利用多种动物制备抗人 IgG 抗体和抗人 IgM 抗体，以及利用多种动物制备待检测的生物样品来源动物之抗 IgG 抗体和抗 IgM 抗体，用于制备抗体的所述动物包括但不限于山羊、绵羊、大鼠、小鼠、兔、豚鼠、猪等。用于标记的可检测标记能单独或与其他组合物或化合物一起提供可检测信号，从而表明样

品中目标分析物的存在。这些可检测标记可选自诊断测定领域技术人员周知的且易于获得的物质，包括但不限于酶标记、荧光标记、放射性标记等。因此本发明不被特定检测标记的选择所限制，并且认为其包括本领域技术人员周知的测定形式。为方便起见，可以以试剂盒的形式提供检测试剂。这些试剂盒任选地包括预吸附有本发明的多肽的微量滴定板，多种适当配制的稀释液和缓冲液，用于检测特异结合的抗原抗体复合物的标记偶联物及其他信号产生试剂，如酶底物、辅因子和生色团。其他成分可由本领域技术人员轻易确定。

此外，本发明提供了一种用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgG 抗体的方法，其包含如下步骤：将一种选自本发明所述的多肽预包被支持物表面；适当洗涤；与待测的生物学样品，优选的血清，在适于发生抗原抗体反应的条件下相接触；再次用适当缓冲液洗涤；然后用带有可检测标记的市售或使用常规方法制备的抗待检测生物样品来源的动物之 IgG 抗体温育足以使抗原抗体发生反应的一段时间，然后使用与可检测标记相应的检测剂检测支持物表面的抗原抗体复合物，得出样品中所含 IgG 抗体的量。在本发明的一个实施方案中，所述待检测生物样品来源为人，所用抗体为抗人 IgG 抗体。在发明的一个实施方案中，用多肽 NE2I 作为抗原与特定支持物表面预包被。在本发明的一个实施方案中，用与戊型肝炎病毒 ORF3 中的表位偶联的多肽 247 作为抗原与特定支持物表面预包被。

另一方面，本发明提供了一种检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgM 抗体的方法，其包含如下步骤：将市售或使用常规方法制备的抗待检测生物样品来源的动物之 IgM 抗体预包被支持物表面；适当洗涤；与待测的生物学样品，优选地血清在适于发生抗原抗体反应的条件下相接触；再次用适当缓冲液洗涤；然后与带有可检测标记

的至少一种选自本发明的多肽温育足以使抗原抗体发生反应的一段时间，使用与可检测标记相应的检测剂检测支持物表面形成的抗原抗体复合物，得到样品中所含的 IgM 抗体的量。在本发明的一个实施方案中，所述待检测生物样品来源为人，所用抗体为抗人 IgM 抗体。

在本发明的一个实施方案中，用与辣根过氧化物酶结合的多肽 225N 检测样品中所含的 IgM 抗体。在本发明的一个实施方案中，用与戊型肝炎病毒 ORF3 中的表位偶联的多肽 247 与辣根过氧化物酶偶联以检测样品中所含 IgM 抗体。

另外，本发明还提供了一种检测生物学样品中戊型肝炎病毒总抗体的方法，其包含如下步骤：将至少一种选自本发明的多肽预包被于支持物表面；适当洗涤；与待测的生物学样品，在适于发生抗原抗体反应的条件下相接触；再次用或不用适当缓冲液洗涤；然后与带有可检测标记的一种选自 本发明的多肽温育足以使抗原抗体发生反应的一段时间，使用与可检测标记相应的检测剂检测支持物表面形成的抗原抗体复合物，得到样品中所含总抗体的量。

在本发明的一个实施方案中，用 NE2I 预包被支持物表面，用与辣根过氧化物酶结合的多肽 225 检测样品中所含的总抗体。在本发明的一个实施方案中，用与戊型肝炎病毒 ORF3 中的表位偶联的多肽 NE2I 预包被支持物表面，用辣根过氧化物酶结合的与戊型肝炎病毒 ORF3 中的表位偶联的多肽 225 检测样品中所含的总抗体。

以下参照附图及实施例更详细地说明本发明。

附图说明：

图 1 显示多肽 201 表达载体 pTO-T7-ORF2-201 的构建过程。

图 2 显示诱导后的含有 pTO-T7-ORF2-201 表达载体之重组大肠杆菌培养物裂解液（制备方法：离心培养液，收集菌体，用含 0.1

% SDS 的样品缓冲液重悬，沸水浴处理 10 分钟，12,000 转/分离心 10 分钟，吸取上清液用于测定）进行 12%丙烯酰胺 SDS-PAGE 分析。考马斯亮蓝染色。泳道 1、2 为两批细菌培养物裂解液的分析结果，经 UVi 凝胶成像仪（UVItec 公司生产 DBT-08 型）分析，表达量均为占总蛋白量的约 35%。

图 3 显示 4 批由含有 pTO-T7-ORF2-201 表达载体之重组大肠杆菌获得的多肽 201 包涵体洗涤纯化样品之 2M 和 4M 尿素变性液的 12% 丙烯酰胺 SDS-PAGE 分析结果。考马斯亮蓝染色。结果表明，SDS-PAGE 分析过程中，有部分的多肽 201 复性成双体（双体比例从 10－60% 不等），但复性比率低于在 1× PBS 中（20× PBS(1L): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 73.344g， KH_2PO_4 4g，NaCl 163.632g，KCl 4.024g，pH7.45）复性的样品（如图 4 显示，双体比例为 99% ）。

图 4 显示如上所得多肽 201 与确证为 HEV 阳性的人血清的 Western 印迹分析结果。泳道 1-3 为 SDS-PAGE 对照，其中泳道 1 为蛋白分子量标记，泳道 2 为 多肽 201 经 1× PBS 中的复性样品、泳道 3 为经沸水浴 10 分钟处理后的 多肽 201PBS 复性样品；泳道 4 和 5 分别为与泳道 2、3 上样样品相对应的 Western 印迹结果。

图 5 显示如上所述的多肽 201 经 HPLC 凝胶过滤进一步纯化后，20,000g 离心 10 分钟，再用 0.1μm 的氧化铝微孔滤膜过滤，于动态光散射仪（PROTEIN SOLUTIONS 生产的 DYNAPRO99-D-50 动态光散射仪）上测量，图中纵坐标表示光遇到分子发生散射的百分比强度，横坐标 Rh 表示水化动力学半径，单位为 nm，峰尖对应的 Rh 为通过 Regulation 算法计算得到的最优水化动力学半径分布，即为测得分子半径，而质量百分比 Mass% 表示对发生光散射的质量贡献程度，如图，第 1 个峰质量贡献为 100%，第 2 个峰质量贡献为 0%，说明第 2 个峰的是由于收到偶然的环境变化如尘埃、气泡等的

瞬间干扰造成的，因为所得的结果采样达到 30 次之多，再进行平均权衡计算，偶然的干扰的质量贡献接近于 0，因此第 1 个峰为溶液中分子的动力学半径。

图 6 显示多肽 208N、209N 和 225N 与鼠源单克隆抗体 1F6、2C9、3F5 的 Western 印迹结果。泳道 1、2、3 分别为多肽 208N 沸水浴 10 分钟处理复性样品、复性样品和复性沉淀样品；泳道 4、5、6 分别为多肽 209N 沸水浴 10 分钟处理复性样品、复性样品和复性沉淀样品；泳道 7、8、9 分别为多肽 225N 沸水浴 10 分钟处理复性样品、复性样品和复性沉淀样品；泳道 10 为多肽 201 单体对照。

图 7 显示用不同剂量之包含弗氏佐剂的多肽 201 的疫苗免疫小鼠的抗体产生动态图，其中横坐标为攻击的天数，纵坐标血清抗体检测的 $OD_{450nm/620nm}$。

图 8 显示用不同剂量之包含无佐剂的多肽 201 的疫苗免疫小鼠的抗体产生动态图，其中横坐标为攻击的天数，纵坐标为血清抗体检测的 $OD_{450nm/620nm}$。

图 9 显示用不同剂量之包含铝佐剂的多肽 201 的疫苗免疫小鼠的抗体产生动态图，其中横坐标为攻击的天数，纵坐标为血清抗体检测的 $OD_{450nm/620nm}$。

图 10 A、图 10B、图 10C 和图 10D 分别为静脉攻击 HEV 病毒以模拟天然感染的恒河猴 No.1、2、3 和 13 的结果。其中横坐标为攻击的天数，纵坐标为血清抗体检测的 $OD_{450/620nm}$ 读值。从图中可看出 No.1、2、3 恒河猴的抗 NE2I-IgG 出现比 Genelabs-IgG 及万泰 Anti-HEV-IgG 早 5 到 10 天；No.13 Anti-NE2I-IgG 可检出，而 Genelabs-IgG 及万泰 Anti-HEV-IgG 则漏检。

实施例

除非特别指明，本发明中所使用的分子生物学实验方法和免疫

检测的进行，基本上参照 J. Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册，第 2 版，冷泉港实验室出版社，1989，以及 F. M. Ausubel 等人，精编分子生物学实验指南，第 3 版，John Wiley & Sons, Inc.，1995 中所述的方法进行，限制性内切酶的使用依照产品制造商推荐的条件。本领域技术人员知晓，实施例中以举例方式描述的本发明不旨在限制本发明所要求保护的范围。

实施例 1：编码本发明所述多肽的多核苷酸的获得及包含其的表达载体的构建

用做模板之 HEV ORF2 片段的制备

以从新疆维吾尔自治区的戊肝病人中克隆得到的 HEV 全基因（Aye,T.T., Uchida 等，核酸研究， 20 (13), 3512 (1992)；GenBank 序号：D11092）为模板，ORF2FP:5'-atgcgcc ctcggcca-3'为正向引物，ORF2RP:5'- aaataaactataactcccga -3'为反向引物，在 PCR 热循环仪（Biometra T3）按照如下条件进行 PCR 反应：94℃ 5 分钟；随后是 94℃ 50 秒，57℃ 50 秒，72℃ 2 分 30 秒的 25 个循环，最后为 72℃ 延伸 10 分钟。得到特异的 2kb 左右大小的用做制备本发明多肽之模板的 HEV ORF2 的 DNA 片段。将上述获得的 PCR 产物与商售的 pMD 18-T 载体（TAKARA 公司生产）连接，经 BamHI/HindIII 酶切鉴定，得到插入 ORF2 基因的阳性克隆。在上海博亚生物工程公司，利用 M13(+)/(-)引物，测得经过上述方法制备的用做制备本发明多肽的模板之两种 HEV ORF2 的 DNA 片段，其中一个为保守序列（模板 1，SEQ ID NO: 5）；另一个为突变序列（模板 2，SEQ ID NO: 6）。

经过比对和开放读码框（ORF）分析，上述用于制备本发明多肽的 HEV ORF2 模板中的突变序列（SEQ ID NO: 6）与保守序列

（SEQ ID NO: 5）相比，缺失一个碱基 A（序列中标以大写 A 处），导致移码突变，使 ORF2 基因的第 604-605 位氨基酸由原来的 His-Ser-Val 突变成 Pro-Pro-Arg，随后由突变成的终止密码子 tag 终止了多肽的继续翻译。

下面以本发明多肽 201 为例具体说明编码本发明多肽 201 的多核苷酸以及包含其的表达载体的制备。

编码本发明多肽 201 的多核苷酸以及包含其的表达载体的制备

以如上获得的 SEQ ID NO: 5 为模板，利用正向引物 201FP 5'-ggatcccatatggttat tcaggattatgac-3'（见表 1），其 5'端引入限制性内切酶 BamHI 和 NdeI 位点，NdeI 位点序列为 CAT ATG，ATG 为大肠杆菌系统中的起始密码子；和反向引物 201RP 5'-ctcgagaaataaactataa ctcccga-3'（见表 1），其 5'端引入终止密码子和限制型内切酶 EcoRI 位点。在 PCR 热循环仪（Biometra T3）按照如下条件进行 PCR 反应：94℃ 5 分钟；随后是 94℃ 50 秒，57℃ 40 秒，72℃ 40 秒的 30 个循环，最后为 72℃ 延伸 10 分钟。得到特异的 600bp 左右大小的 DNA 片段，经鉴别为编码本发明所述多肽 201 的多核苷酸序列。

用于表达本发明所述多肽的表达载体 pTO-T7 的构建依照文献进行（罗文新等，生物工程学报，2000，16:53-57）。具体步骤包括：将如上述获得的 PCR 产物与商售的 pMD 18-T 载体（TAKARA 公司生产）连接，经 BamHI/EcoRI 酶切鉴定，得到插入 201 基因的阳性亚克隆；NdeI/EcoRI 酶切获得 201 基因片段，再与经 NdeI/EcoRI 酶切的 pTO-T7 表达载体相连接，NdeI/EcoRI 酶切鉴定得到插入 201 基因的阳性表达克隆 pTO-T7-ORF2-201，含有多肽 201 编码序列的 201 多肽重组表达载体 pTO-T7-ORF2-201。图 1 表示上述多肽

ORF2-201 表达载体的构建过程示意图。

类似地，以上述方法利用模板 SEQ ID NO: 6，分别利用表 1 中所示针对各个多肽设计的引物制备本发明所述的羧基端不是 Pro-Pro-Arg 的其它多肽。

编码羧基端是 Pro-Pro-Arg 的本发明所述多肽的多核苷酸以及包含其的表达载体的制备

以如上获得的 HEV ORF2 突变序列 SEQ ID NO: 6 为模板，分别利用根据本发明所述多肽设计的不同正向引物和反向引物（具体见表 1）参照制备多肽 201 表达载体的条件进行 PCR 反应，依与上述 ORF2-201 表达载体的构建过程的相同方法进行克隆构建，转化大肠杆菌 ERR2566，用于表达其羧基端是 Pro-Pro-Arg 的本发明所述的多肽。由此，得到氨基端添加 Met，羧基端修饰是 603 位氨基酸 Pro 的 3'端以 5'－3'方向添加氨基酸序列-Pro-Pro-Arg 的一系列具有良好免疫原性和免疫反应性的本发明的多肽（具体见表 1）。

表 1 用于制备编码本发明所述多肽的多核苷酸的 PCR 扩增模板以及相应的正向/反向引物

多肽名称	HEV ORF2 中的位置	所用模板编号	正向引物（FP）和反向引物（RP）
NE2	394-603ppr*	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
217C	390-603ppr	2	217FP:5'-ggatcccatatgtcggctggtggccag-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
193C	414-603ppr	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
178C	429-603ppr	2	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
168C	439-603ppr	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
158C	449-603ppr	2	E56F:5'-ggatcccatatgcaggaccgaccgac-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
148C	459-603ppr	2	E66F:5'-ggatcccatatgtcgcgccctttt-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
138C	469-603ppr	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgctttggcttttctc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'

NE2D	394-603	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E2RD:5'-gaattcttaggggctaaaacagc-3'
217D	390-603	2	217FP:5'- ggatcccatatgtcggctggtggccag -3' E2RD:5'-gaattcttaggggctaaaacagc-3'
193D	414-603	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E2RD:5'-gaattcttaggggctaaaacagc-3'
178D	429-603	2	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' E2RD:5'-gaattcttaggggctaaaacagc-3'
NE2I	394-606	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatgggggctaaaacag-3'
217I	390-606	2	217FP:5'- ggatcccatatgtcggctggtggccag -3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatgggggctaaaacag-3'
193I	414-606	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatgggggctaaaacag-3'
178I	429-606	2	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' E2RI:5'-gaattcttatgcggaatgggggctaaaacag-3'
266N	394-660	1	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
235N	394-628	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 235NR:5'- gaattcttacgggcagaagtcatcg -3'
225N	394-618	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 225RP:5'-gaattcttaggcagggtagtccatgg-3'
209N	394-602	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'
208N	394-601	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 208RP:5'-gaattcttataaaacagcaaccgc-3'
207N	394-600	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' 207RP:5'-gaattcttaaacagcaaccgcg-3'
203N	394-596	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E203R:5'-gaattcttaggaaatagagacgggac-3'
193N	394-586	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E220R:5'-ctcgagttaagtggtgtaagtggaaatag-3'
176N	394-569	2	HEFP:5'-ggatccatatgcagctgttctactctcgtc-3' E237R:5'-ctcgagttacagttggtcactagcagt-3'
280	380-660	1	227FP:5'-ggatcccatatgctaggcggtctaccca-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
270	390-660	1	217FP:5'- ggatcccatatgtcggctggtggccag -3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
260	400-660	1	207FP:5'-ggatcccatatgcccgtcgtctcagc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
247	414-660	1	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
232	429-660	1	E235F:5'-ggatcccatatgcatgacatcgacctcg-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
222	439-660	1	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
205	414-618	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' 225RP:5'- gaattcttaggcagggtagtccatgg -3'
201	459-660	1	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
191	469-660	1	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgctttggcttttctc-3' HERP:5'-ctcgagaaataaactataactcccga-3'
189	414-602	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'
188	414-601	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' 208RP:5'-gaattcttataaaacagcaaccgc-3'

183	414-596	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E203R:5'-gaattcttaggaaatagagacgggac-3'
173	414-586	2	E220F:5'-ggatcccatatgacatctgtagagaatgctca-3' E220R:5'-ctcgagttaagtggtgtaagtggaaatag-3'
170	459-628	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 235NR:5'-gaattcttacgggcagaagtcatcg-3'
C160	469-628	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgctttggctttctc-3' 235NR:5'- gaattcttacgggcagaagtcatcg -3'
N160	459-618	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 225RP:5'- gaattcttaggcagggtagtccatgg -3'
150	469-618	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgctttggctttctc-3' 225RP:5'- gaattcttaggcagggtagtccatgg -3'
144	459-602	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'
142	459-600	2	E46F:5'-ggatcccatatggttattcaggattatgac-3' 207RP:5'-gaattcttaaacagcaaccgcg-3'
134	469-602	2	138CF:5'-ggatcccatatggacgtgctttggctttctc-3' 209RP:5'-gaattcttaggctaaaacagcaacc-3'

*: ppr 示羧基端 603 位氨基酸 Pro 的 3'端以 5'～3'方向添加氨基酸序列-Pro-Pro-Arg 的多肽。

实施例 2: 多肽 201 的表达

1μL 的 pTO-T7-ORF2-201 质粒（0.15mg/ml）转化 40μL 的氯化钙法制备的感受态大肠杆菌 ERR2566，涂布于卡那霉素（终浓度 25μg/mL，下同）抗性的固体 LB 培养基，37℃静置培养 10-12 小时至单菌落清晰可辨。挑取单菌落至含 4mL 卡那霉素抗性的液体 LB 培养基之试管，37℃ 220 转/分振荡培养 10 小时，至菌体浓度为 OD550≈1.5，从中取 1mL 保存于 4℃，剩余的 3mL 加入 2μL 0.5M IPTG（终浓度为 0.3mM），37℃ 220 转/分振荡进一步诱导培养转化的表达菌株 4 小时。取 1.5mL 经诱导培养的表达菌株培养液，12,000 转/分离心 30 秒，弃去上清，扣干，用 100μL 1×凝胶加样缓冲液（50mM Tris · Cl(pH6.8),100mM 二硫苏糖醇(DTT),2%SDS,0.1% 溴酚蓝,10%甘油）重悬；沸水浴处理 10 分钟；12,000 转/分，离心 10 分钟；取出 10μL 进行 12%丙烯酰胺 SDS-PAGE 分析。挑选表达量较高的转化菌株进行大量表达并长期保种。

每个 1L 的三角培养瓶装 500mL 新鲜 LB 液体培养基，分别转接 200μL 的保存菌液，37℃，190 转/分振荡培养 11 小时，至菌体

浓度 OD550≈2.0。然后向每培养瓶加入 300μL 0.5M IPTG 使终浓度为 0.3mM，37℃，190 转/分进一步振荡诱导培养 4 小时。离心所得的培养液，收集菌体，用含 0.1％SDS 的样品缓冲液重悬，沸水浴处理 10 分钟，12,000 转/分离心 10 分钟，吸取上清液用于进行 12%丙烯酰胺 SDS-PAGE 分析。考马斯亮蓝染色。经 UVI 凝胶成像仪（UVItec 公司生产 DBT-08 型）分析，表达量约为占总蛋白量 35％。参见图 2。

实施例 3: 多肽 201 在大肠杆菌中重组表达的包涵体的洗涤纯化

如上述实施例 2 中制备的高表达多肽 201 重组菌株经诱导表达所得培养液 4000 转/分离心 15 分钟后，弃上清；沉淀后的菌体以每 500mL 培养基加 15mL 裂解液（50mM Tris · Cl，10mM EDTA，300mM NaCl pH7.2）计算，重新悬浮于裂解液中。用超声波破碎仪（SONICS&MATERIALS 生产 Uilbra-Cell VCX500 型）破碎细胞，对于 200mL 培养液所得菌体悬浮液，破碎条件为：设置 70%功率，安装大型的超声探头，将悬浮液装于 250mL 的烧杯中，并置于冰浴盒中，调整位置和高度，以使超声探头位于液体中央。每次脉冲破碎时间为 40 秒，间隔 1 分钟，共破碎 20 分钟，直至无明显的粘稠物，且细胞破碎液离心后，沉淀中有少量黑色被碳化的物质为原则；随后 12,000 转/分 4℃下离心 10 分钟，弃上清；沉淀用 1/2 菌体悬浮液体积的缓冲液 I溶液（200mM Tris•Cl，pH8.5，5mM EDTA，100mM NaCl）重悬，加入等体积含 4%Triton-X100 的缓冲液 I，其中 Triton-x100 的终浓度为 2%。37℃下 200 转/分，振荡 30 分钟；10,000 转/分，4℃离心 10 分钟，弃上清；沉淀用与菌体悬浮液等体积的缓冲液 I 重悬；条件同上，超声破碎，每次脉冲破碎时间为 40 秒，间隔 1 分钟，共破碎 3 分钟；10,000 转/分，4℃，离心 10 分钟，

弃上清；沉淀用 1/2 菌体悬浮液体积的缓冲液 I 重悬，再加入等体积含 4%Triton-X100 的缓冲液 I；37℃，200 转/分，振荡 30 分钟；10,000 转/分，4℃，离心 10 分钟，弃上清；沉淀用与菌体悬浮液等体积的缓冲液 I 重悬；37℃，200 转/分，振荡 30 分钟；10,000 转/分，4℃，离心 10 分钟，弃上清；沉淀用与菌体悬浮液等体积的 2M 尿素/缓冲液 I 重悬；37℃，200 转/分，振荡 30 分钟；10,000 转/分，4℃，离心 10 分钟，留上清，样品编号为 201 2M；沉淀用等体积的 4M 尿素/缓冲液 I 重悬；37℃，200 转/分，振荡 1 小时，4℃放置过夜（10 小时）；4℃，12,000 转/分，离心 10 分钟，留上清，样品编号为 201 4M，弃沉淀；利用 12% SDS-PAGE 分析所得样品 201 2M 和 201 4M 的纯度，结果见图 3。

实施例 4：201 重组多肽的复性

100mL 经实施例 3 制备的 201 4M 样品分装到两个透析袋（美国联合碳化公司生产，36DM，截留分子量 8,000-10,000），放入 1L 容量的烧杯，加入 900mL 的 1 × PBS（20 × PBS(1L) 中含有 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 73.344g，KH_2PO_4 4g，NaCl 163.632g，KCl 4.024g，pH7.45），在 25℃下，搅拌透析过夜（10 小时），透析袋里将出现白色不溶物；更换透析液继续透析，以后每隔 3 小时更换一次透析液，重复 4 次。理论上，透析结束时，样品的尿素含量为 4×10^{-6}M；透析样品经 12,000 转/分，25℃离心 10 分钟；上清液通过 0.22μm 的微孔滤膜过滤，可用于进一步纯化；离心沉淀用 4M 尿素/缓冲液 I 重悬，可重新用于透析，但所得的样品蛋白浓度小于第一次获得的样品，且透析过程仍将有沉淀出现。

实施例 5：201 重组多肽的 HPLC 凝胶过滤色谱纯化

对利用如实施例 4 的方法制备的复性样品 201 采用如下 HPLC 系统和方法进一步纯化。

仪器系统：Beckman System Gold Nouveau 125NMP/166NMP HPLC，层析柱：TSK GEL SW3000 21.5mm × 60cm，洗脱液：1 × PBS pH7.45，流速：4ml/min，检测器波长：280nm，样品量：2ml 样品 NE2 4M (8mg/ml)，收集模式：窗口式自动峰收集，收集时间：1 管/20 秒，收集延迟：6 秒。

结果表明：色谱过程的分子筛效应是十分有效的，然而，峰组分同时含有单体和二聚体以及介于其间均匀分布的蛋白，样品经沸水浴 10 分钟处理后，12%丙烯酰胺 SDS-PAGE 分析目的蛋白峰的单体纯度，纯度可达 95%以上。说明在色谱分离过程中，ORF2-201 单体除了与自身聚合，还与其它小蛋白聚合，而且聚合体之间还发生相互作用，在色谱过程中一起被洗脱。

实施例 6 本发明的重组多肽表达产物的表征

利用如上实施例 1-5 所述的方法，分别构建并表达本发明的重组多肽 (具体多肽见表 2)。进一步的，按照实施例 3-4 的方法对各个重组多肽进行洗涤和透析。表 2 中表明了本发明的各个重组多肽所对应的戊型肝炎病毒 ORF2 中的氨基酸位置，重组表达产物的复性性质及在其 SDS-PAGE 中单体与双体的构成比，以及多聚体的形成情况。

表 2 各个本发明所述多肽所对应的氨基酸序列，表达产物的复性性质，在 SDS-PAGE 中单体与双体的构成比，以及多聚体的形成情况

多肽名称	序列	单体比例	双体比例	是否形成多聚体	是否透析复性
NE2	SEQ ID NO: 2	10%	90%	是	是

193C	SEQ ID NO: 3	5%	95%	是	是
178C	SEQ ID NO: 4	100%	0%	否	是
168C	SEQ ID NO: 7	100%	0%	否	是
158C	SEQ ID NO: 8	60%	40%	否	是
148C	SEQ ID NO: 9	100%	0%	否	是
138C	SEQ ID NO: 10	100%	0%	否	是
NE2I	SEQ ID NO: 1 aa394~aa606	5%	95%	否	是
217I	SEQ ID NO: 1 aa390~aa606	85%	15%	否	是
193I	SEQ ID NO: 1 aa414~aa606	100%	0%	否	是
178I	SEQ ID NO: 1 aa429~aa606	60%	40%	否	是
NE2D	SEQ ID NO: 1 aa394~aa603	80%	20%	否	是
217D	SEQ ID NO: 1 aa390~aa603	20%	80%	否	是
193D	SEQ ID NO: 1 aa414~aa603	100%	0%	否	是
178D	SEQ ID NO: 1 aa429~aa603	100%	0%	否	是
235N	SEQ ID NO: 1 aa394~aa628	10%	90%	否	是
225N	SEQ ID NO: 1 aa394~aa618	4%	96%	否	是
209N	SEQ ID NO: 1 aa394~aa602	25%	75%	否	是
208N	SEQ ID NO: 1 aa394~aa601	100%	0%	否	是
207N	SEQ ID NO: 1 aa394~aa600	100%	0%	否	No
203N	SEQ ID NO: 1 aa394~aa596	100%	0%	否	No
193N	SEQ ID NO: 1 aa394~aa586	100%	0%	否	否
176N	SEQ ID NO: 1 aa394~aa569	100%	0%	否	否
247	SEQ ID NO: 1 aa414~aa660	10%	90%	否	是
232	SEQ ID NO: 1 aa429~aa660	10%	90%	否	是
222	SEQ ID NO: 1	10%	90%	否	是

	aa439~aa660				
	SEQ ID NO: 1				
205	aa374~aa618	10%	90%	否	是
	SEQ ID NO: 1				
201	aa459~aa660	1%	99%	否	是
	SEQ ID NO: 1				
189	aa414~aa602	2%	98%	否	是
	SEQ ID NO: 1				
188	aa414~aa601	4%	94%	否	是
	SEQ ID NO: 1				
183	aa414~aa596	100%	0%	否	否
	SEQ ID NO: 1				
173	aa414~aa586	100%	0%	否	否

如表 2 所示，当包含于戊型肝炎病毒基因 ORF2 中如 SEQ ID NO: 1 中所示氨基酸序列中的本发明多肽其羧基末端位于第一个序列第 601 位氨基酸（Leu）至第 660 位氨基酸之间时，所获得的重组多肽均复性良好，使其易于表现出接近于天然 HEV 蛋白的空间结构。具体地，其中多肽 247、232、222、201、235N、225N、209N、NE2I、217D、205、189、188、NE2（SEQ ID NO: 2）和 193C（SEQ ID NO: 3）在相应单体分子量位置及约为单体分子量 2 倍的位置均有表达带，而且双体带的量明显高于单体带，其中 NE2 和 193C 在更大的位置（推测为多聚体）亦有明显带，提示上述多肽具有自发形成多聚体的趋势。

由表 2，本发明将可复性的重组多肽 193C、201、208N、209N、NE2、222、225N、232 和 247 经 HPLC 凝胶过滤进一步纯化后，分别 20,000g 离心 10 分钟，再用 0.1μm 的氧化铝微孔滤膜过滤，在动态光散射仪（PROTEIN SOLUTIONS 生产的 DYNAPRO99-D-50 动态光散射仪）上测量的动力学半径，进而推测其聚集状态，结果见表 3。表 3 中记录了利用动态光散射仪检测表 2 中所述可复性重组多肽的聚集状态。由所测得的分子半径表明，各个重组多肽均明显

高于单体的预测半径，根据推算的分子量可以判断出这些多肽在溶液中均至少形成二聚体，多数形成更大的聚体，与这些多肽在 SDS-PAGE 电泳中的表现相符。实际上，由上述方法制备的本发明的多肽最多可形成高达 180 或更多的多聚体。进一步证实了本发明的重组多肽具有出人意料的性质，即经大肠杆菌体系重组表达的上述多肽在无变性剂的 PBS 溶液中有自发形成多聚体的倾向，这有利于增强其作为疫苗的免疫原性。

表 3 利用动态光散射仪检测本发明的可复性重组多肽的聚集状态

多肽	单体理论分子量(KD)	实测半径（nm）	推算分子量(KD)	推测聚集状态
193C	21.2	3.44	47	二聚体 (21.2 × 2 = 42.4)
201	22.1	3.08	62.7	三聚体 (22.1 × 3 = 66.3)
208N	22.9	3.57	66.1	三聚体 (22.9 × 3 = 68.7)
209N	23	4.10	91.	四聚体 (23 × 4=92)
NE2	24.4	4.04	90	四聚体 (24.4 × 4=97.6)
222	24.4	3.72	73	三聚体（24.4 × 3=73.2）
225N	24.8	3.91	82	三聚体(74.4)四聚体(99.2)并存
232	25.5	3.97	85	三聚体(25.5 × 3=76.5)
247	27.2	4.28	101	四聚体(27.2 × 4=108.8)
266N	29.3	4.41	108	四聚体(29.3 × 4=117.2)

实施例 7: 多肽 201 理化性质的研究

包涵体的复性：如上述实施例 1-3 所述制备的重组表达多肽 201 的包涵体，按照实施例 4 中的方法经过 4M 尿素变性处理，变性液对 100 倍以上体积的 PBS 透析，12,000rpm 离心 10 分钟，有部分或全部重组蛋白出现在上清液，判断该重组蛋白可复性。

重组蛋白的聚集性：复性上清液进行常规的 SDS-PAGE 分析，出现单体、双体和多聚体带；再用常规的 Western 印迹进一步验证这些条带的特异性，从而证实重组多肽 201 复性后形成多聚体。结果见图 4。

光散射技术测定多肽 201 的分子大小：按照实施例 6 中所述的方法，将经 HPLC 纯化后的多肽 201，20,000g 离心 10 分钟，再用 0.1μm 的氧化铝微孔滤膜过滤，于动态光散射仪（PROTEIN SOLUTIONS 生产 DYNAPRO99-D-50 动态光散射仪）上测量，入射激光波长为 824.0nm，使用 Regulation 算法计算，该算法为多种标准样品所验证，以 % Intensity 峰对应的动力学半径算得分子半径，并将测定溶剂设为样品缓冲液 PBS。图 5 为多肽 201 的测量结果。实验结果表明，可复性的多肽 201 在无变性剂的溶液中平均半径为 3.08nm，推测分子量为 62.7KD，约相当于三聚体形式。本领域技术人员知晓，由于检测方法所限，本发明中所述多肽实际上可形成 180 或更高的多聚体。

实施例 8：NE2 多肽鼠源单克隆抗体的制备

杂交瘤细胞系的产生

取 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠，初次免疫每只小鼠肌肉注射用福氏完全佐剂乳化的 5μg NE2 重组抗原（总体积 50μl）。15 天后进行二次基础免疫，方法为取相同量的抗原用福氏不完全佐剂乳化，肌肉注射。30 天后，尾静脉加强注射 5μg 不加佐剂的抗原，并于加强免疫后 72~96 小时，杀死小鼠，收集血液，取脾制备脾细胞悬液（悬于 RPMI 1640 培养基中），细胞计数板细胞计数。按 1/6 于脾细胞的数量取培养的 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞，混合后离心，利用聚乙二醇（PEG 1500）使脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合。将细胞悬液与等体积的饲养细胞混合后，分置于 96 孔细胞培养板中（200μl/孔）于 5% 二氧化碳培养箱（ESPEC BNA-311）37℃培养。3 天

后，用 HT 培养基（黄嘌呤(hypoxanthn，H)1.361mg + 胸腺嘧啶核苷（thymidine，T）0.388mg，加 RPMI1640（GIBCO 公司）培养基至 100mL。45～50℃条件下溶解后，过滤除菌。）半保留换液。7 天后，用 NE2 重组抗原包被板，利用如下述酶联免疫吸附法（ELISA）检测 96 孔细胞培养板中所得杂交瘤细胞上清培养液。对于 ELISA 检测为阳性的细胞克隆，利用有限稀释法进行克隆化。

ELISA 检测法

于 37℃下使 100μl NE2 重组抗原经如实施例 5 中所述的 HPLC 纯化，溶解于 0.05mol/L 碳酸包被缓冲液（20.02g Na2CO3，2.52g NaHCO3 加去离子水至 1 升，pH 为 9.5）中，浓度约为 0.3μg/ml，在 96 孔聚乙烯微量滴定板的各孔表面上吸附 2 小时（37℃），再置于 4℃过夜。用 PBS-吐温洗涤液（8.0g NaCl、0.2g KH_2PO_4、2.9g $Na_2HPO_4 \bullet 12H_2O$、0.2g KCl 和 0.5ml 吐温 20，加去离子水至 1 升，pH 为 7.4）洗涤滴定板以除去未结合的抗原蛋白。然后用 200μl/孔的封闭液（1× PBS 溶液，组成同前）中加入 2%明胶、0.2%酪蛋白和 2%蔗糖）37℃封闭 2 小时。甩净、拍干后真空封闭，4℃保存。

检测时，于每孔中加入 100μl 细胞培养液上清；每块 96 孔微量滴定板设一阳性对照，加入 100μl 小鼠多抗血清（1:100 稀释使用）；另设一阴性对照，加入 100μl HT 细胞培养液。37℃温浴 30 分钟，用 PBS-吐温洗涤液洗 5 遍，拍干后加入过氧化物酶结合的羊抗鼠免疫球蛋白（HRP-GAM Ig，DAKO 公司），37℃温浴 30 分钟，取出后用 PBS-吐温洗涤液洗 5 遍，拍干后先后加入底物液 A、B 各 50μl（底物液 A 成分为：显色液 A 成分为：13.42g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$、4.2g 柠檬酸 $\cdot H_2O$ 和 0.3g 过氧化氢，用去离子水中调节体积为 700ml；显色液 B 成分为：0.2g 四甲基联苯胺、20ml 二甲基甲酰胺用去离子

水中调节体积为 700ml），37℃显色 10 分钟，加入 50μl 终止液（2M H2SO4）终止反应，并于酶标仪上检测各孔的 OD450 值，通常以 OD450 值高于阴性对照 2 倍以上者视为阳性。

单克隆抗体腹水的获得及纯化

取 10 周龄的健康 Balb/c 小鼠，腹腔注射福氏不完全佐剂，每只 0.5ml。2~7 天后，收集克隆化的杂交瘤细胞，离心去上清，加入不含血清的培养基，调节细胞密度至 $2\times10^5\sim2\times10^6$ 个/ml，每只小鼠注射 0.5ml。7~10 天后小鼠腹部增大，开始收集腹水。3000rpm 离心 15 分钟，吸取中间澄清部分的液体，0.45μm 的微孔滤膜过滤除菌，分装后-20℃保存。

将处理好的腹水用 0.02mol/L、pH 7.4 的 PBS（81ml 0.2mol/L Na_2HPO_4，19ml 0.2mol/L NaH_2PO_4，加生理盐水至 100ml）对倍稀释，搅拌下逐滴缓慢加入硫酸铵（浓度达到 50%饱和度），4℃过夜。4℃，12000rpm 离心 15 分钟，弃上清，将沉淀溶于原腹水体积 2 倍的 PBS 中。搅拌下逐滴缓慢加入硫酸铵，使硫酸铵浓度达到 33%饱和度，4℃静置过夜。4℃，12000rpm 离心 15 分钟，弃上清，将沉淀溶于原腹水体积 2 倍的 PBS 中。搅拌下逐滴缓慢加入硫酸铵，（浓度达到 50%饱和度），4℃过夜。4℃，12000rpm 离心 15 分钟，弃上清。将沉淀溶于适量的 PBS 中，装入透析带中，放入 50~100 倍含 20mmol/L NaCl，pH 7.8 的 120mmol/L Tris-HCl 缓冲液中 4℃搅拌下脱盐 12 小时左右，期间更换 3 次以上透析液。取出后分装-20℃保存。

以上述方法将本发明的多肽 NE2 免疫 Balb/c 小鼠，制备单克隆抗体，筛选出了 8 株抗 NE2 单克隆抗体（1F6、2C9、3F5、8C11、8H3、13D8、15B2 和 16D7）。将这 8 株单抗分别包被 eppendorf 管，

以捕获 RT-PCR 方法检测这些单抗结合天然戊型肝炎病毒的能力(参见实施例 9)，结果单抗 8C11、8H3 和 13D8 表现出明显的病毒结合活性，表明其识别表位为病毒外壳上的天然表位，用于下面实施例 10 中所述的实验。

实施例 9: 抗体捕获 RT-PCR 检测单克隆抗体与 HEV 病毒颗粒的结合

将普通 1.5ml Eppendorf 管紫外照射 30 分钟，然后加入 500μl 以碳酸包被缓冲液（20.02g Na2CO3，2.52g NaHCO3 加去离子水至 1 升，pH 为 9.5）1: 1000 稀释的不同单克隆抗体，37℃孵育包被过夜；移去包被液，加入 1.5ml 封闭液（含 2％的白蛋白的 1× PBS 缓冲液，pH7.4），37℃封闭 2 小时；移去封闭液，加入 500μl 以无菌生理盐水稀释的的 HEV 病毒阳性粪便 10％悬液，37℃反应 2 小时后，用 PBST 洗涤 6 遍；最后在洗涤好的 Eppendorf 管加入 250μl 蒸馏水，参照实施例 14 进行 RT-PCR 检测。结果发现，实施例 8 中所得 1F6、2C9、3F5、15B2、16D7 这 5 个单抗不能结合病毒，而 8C11、8H3、13D8 这 3 个单抗能结合病毒。

实施例 10: 本发明的多肽对阳性猴和人血清以及鼠源单克隆抗体的酶联免疫吸附测定（ELISA）和对鼠源单克隆抗体的点杂交

重组多肽对阳性猴和人血清以及鼠源单克隆抗体的（ELISA）

分别将表 2 中所示的本发明的多肽按照实施例 1-6 所述的方法制备并纯化，得到浓度为 1mg/ml 的纯化重组蛋白样品，用 20mM

pH7.4 的 PBS 缓冲液，1:500 稀释，按 100μl/孔包被在 96 孔酶标板上，包被条件是：于 37℃ 温育 2 小时，4℃ 过夜温育约 12 小时；在 TECAN 全自动洗板机（M12/4R Columbus plus 型）上用 PBS-吐温洗涤液（8.0g NaCl、0.2g KH_2PO4、2.9g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$、0.2g KCl 和 0.5ml 吐温 20，加去离子水至 1 升，pH 为 7.4）洗涤 1 次，扣干，加入 200ul/孔的封闭液（组成：2%明胶、0.2%酪蛋白和 2%蔗糖的 PBS 溶液），于 37℃温育 2 小时；加入经适当稀释的抗血清或单克隆抗体（100μl/孔），于 37℃温育 30 分钟；在 TECAN 全自动洗板机上用 PBS-吐温洗涤液洗涤 5 次，每次间隔 20 秒，扣干，加入合适稀释度的 HRP 酶标二抗（羊抗人、鼠 IgG 抗体），于 37℃温育 30 分钟；在 TECAN 全自动洗板机上用 PBS-吐温洗涤液洗涤 5 次，每次间隔 20 秒，扣干，加入显色液 A 和 B（显色液 A 成分为：13.42g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$、4.2g 柠檬酸 $\cdot H_2O$ 和 0.3g 过氧化氢，用去离子水中调节体积为 700ml；显色液 B 成分为：0.2g 四甲基联苯胺、20ml 二甲基甲酰胺用去离子水中调节体积为 700ml）各 1 滴，于 37℃显色 10 分钟，加入 1 滴终止液（2M H_2SO_4）；在 TECAN 酶标仪（Sunrise Remote/ Touch Screen）上测量 OD_{450nm}（参比波长为 620nm）值，阳性阈值为 3 倍的阴性均值，OD 值大于阈值的结果为阳性结果，OD 值小于阈值的结果为阴性。结果见表 4。

高纯度的本发明的多肽对数种鼠源单克隆抗体的点杂交

分别取 10μl 1mg/ml 的依实施例 1－5 的方法制备并经 HPLC 凝胶过滤纯化的表 2 中所示多肽，缓慢反复点在硝酸纤维素膜上，自然风干；加入 5%的脱脂牛奶于室温封闭 1.5 小时；加入如实施例 8 中所述制备的各种鼠源单克隆抗体（以 5%脱脂奶 1:100 稀释由单克隆 B 淋巴细胞分泌的细胞上清液），室温反应 1 小时；TNT（10mM

Tris · Cl(pH8.0), 150mM NaCl, 0.05% 吐温 20）洗涤三次，每次间隔 5 分钟；加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG（晶美生物公司生产，以 5% 脱脂奶 1:1000 稀释使用），室温反应 1 小时；TNT 洗涤三次，每次间隔 5 分钟；NBT/BCIP（$C_{40}H_{30}N_{10}O_6Cl_2/C_8H_6BrClNO_4P \cdot C_7H_9N$）显色。杂交点经 UVI 凝胶成像仪扫描转换成灰度值而分成五种阳性等级++++、+++、++、+、 +-和阴性-。该方法与经典的 Western 印迹法相比，蛋白质没经过 SDS 的变性作用，更为真实地反映在无变性剂条件下的免疫反应性。

表 4 本发明的多肽对鼠源单克隆抗体、戊肝患者恢复期血清、戊肝病毒感染恒河猴急性期血清的反应性

多肽	ELISA					点印迹		
	猴血清	人血清	8C11	8H3	13D8	8C11	8H3	13D8
NE2	++	++	+++	++	+++	++++	++	+++
193C	++	++	+++	+	++	++	++	++
178C	+	++	+++	+-	+++	++	++	++
168C	-	+-	++	-	+++	+/-	+/-	+/-
158C	+-	+	+	-	+++	+	+/-	+/-
148C	+	++	-	-	-	+/-	+/-	+/-
138C	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-
NE2I	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+++
217I	+	+	++	-	++	+	+	+
193I	++	++	++	-	++	+++	++	+++
178I	+++	++	++	-	++	++	++	++
NE2D	++	++	++	-	++	+	+	+
217D	++	++	++	-	++	+	+	+

193D	++	++	++	-	++	+	+	+
178D	++	++	+++	-	+++	+	+	+
235N	++	+-	+++	+-	+++	+++	+	+++
225N	+++	+++	+++	+-	+++	++++	+	+++
209N	++	++	+++	+	+++	++++	+	+++
208N	+	+++	+++	-	+++	++	+	++
207N	-	-	-	-	-	++	+	+
203N	-	-	-	-	-	++	+	+
193N	-	-	-	-	-	++	+	+
176N	-	+	-	-	-	+	+/-	+
247			+++	+	+++	++++	+++	++++
232			+++	+	+++	++++	++++	++++
222			+++	+-	+++	++++	++	++++
205	++	+	+++	-	+++	+++	++	++
201			+++	+	++	++++	++	++++
189	-	+-	+++	-	+++	++	++	++
188	-	+-	++	-	+++	++	++	++
183	-	+	+-	-	+-	++	++	++
173	-	-	-	-	-	++	+	++
170			+++	-	+++	++++	+++	++++
C160			-	-	-	-	-	-
N160			++	-	++	++	-	++
150			-	-	-	-	-	-
144			++	-	++	++	-	++
142			-	-	-	-	-	-
134			-	-	-	-	-	-

实验结果

分别以如表四所列纯化的重组多肽包被微孔板，以 ELISA 方法检测其与实施例 8 中所述三株鼠源单抗 8C11、8H3 和 13D8、戊肝患者恢复期血清以及戊肝病毒感染恒河猴急性期血清的反应，并以斑点杂交方法检测纯化的重组多肽与所用三株单抗的反应，结果其中的多肽 NE2、193C、178C、NE2I、235N、225N、209N、247、232、222 及 201 对各血清/单抗均反应良好，说明这些多肽呈现出较好的天然 HEV 表位，可用于戊肝诊断试剂盒和/或疫苗。

多肽 138C、C160、150、142 和 134 的对各抗体的反应均差，说明 ORF2 主要天然表位的形成至少要包含 469 位氨基酸至 600 位氨基酸的片段。

多肽 170、C160、N160、150、144、142 和 134 的序列分别为起始氨基酸（Met）之后分别接上 ORF2 的 aa459~aa628、aa469~aa628、aa459~aa618 、 aa469~aa618 、 aa459~aa602 、 aa459~aa600 和 aa469~aa602。

实施例 11: 本发明的多肽与鼠源单克隆抗体的 Western 印迹

如实施例 1－5 中所述制备的本发明多肽 208N、209N 和 225N 分别与实施例 8 中制备鼠源单克隆抗体 1F6、2C9、3F5 进行 Western 印迹实验。所述多肽先经 SDS-PAGE 分离，再按常规方法转移到硝酸纤维素膜上，加入 5% 的脱脂奶于室温封闭 1.5 小时；加入各种鼠源单克隆抗体（以 5% 脱脂奶 1:100 稀释由单克隆 B 淋巴细胞分泌的细胞上清液），室温反应 1 小时；TNT 洗涤三次，每次间隔 5 分钟；加入 HRP 标记的抗鼠 IgG（以 5% 脱脂奶 1:1000 稀释），室温反应 1 小时；TNT 洗涤三次，每次间隔 5 分钟；NBT/BCIP 显色。Western

印迹结果参见图 6。结果表明，Western 印迹实验反应具有酶联放大效应，可观察到考马斯亮兰 R250 染色显示不出的多聚体带，泳道 8 最为明显。进一步证实本发明的重组多肽 208N 经 12％丙烯酰胺 SDS-PAGE 过程，没有多聚体形式的存在；单克隆抗体 1F6 对 209N 和 225N 多聚体的反应性比单克隆抗体 2C9、3F5 强。

实施例 12：包含多肽 201 的疫苗的制备以及利用其免疫小鼠的实验

包含多肽 201 的含有弗氏佐剂疫苗的配制

如上述制备本发明的多肽 201 样品，经 HPLC 纯化，纯度大于 95％，蛋白浓度为 1.02mg/ml，用 PBS 稀释，再加入等体积的弗氏完全佐剂（含卡介苗），使多肽 201 终浓度到一定的量（如，设计每只小鼠免疫剂量为 5μg，免疫体积为 100μl，则配置的多肽 201 终浓度为 0.05mg/ml）。混合乳化 30 分钟，直至静置 30 分钟仍没有出现油脂分层为止。

以弗氏佐剂为疫苗佐剂，免疫剂量梯度为每只注射 0.5、1、2、5μg 量，每组平行免疫 3 只昆明白小鼠。注射体积为 100μl/只鼠，注射方式为肌肉注射，免疫程序为 0、7、28 天。结果参见图 7。结果表明，弗氏佐剂配制的 ORF2-201 疫苗，剂量在 2μg/只以上有很强的免疫原性，免疫第二周即开始产生抗体，第四周达到最高滴度，据常规相关免疫学书籍和文献一般认为，通常蛋白抗原免疫小鼠剂量应在 30-70μg/只才能产生高滴度的抗体。由此表明，本发明多肽 201 与弗氏佐剂相结合的疫苗佐剂比现有疫苗有显著高的免疫效果。

多肽 201 质铝佐剂疫苗的配制

原始铝佐剂来自兰州生物制品研究所（Al3+ 13.68%，Na+ 3.36%，pH5.55），使用时，取所需量，用 1N 的 NaOH 调整酸度至

刚好出现沉淀，混匀，加入 1× PBS 至 2 倍体积，10000rpm，离心 1 分钟，弃上清；沉淀再加 1× PBS 至 2 倍体积重悬，10000rpm，离心 1 分钟，弃上清；重复平衡多次，直到上清 pH 为 7-7.4 为止，最后加 1× PBS 至等体积重悬，灭菌后存放于 4℃，以 1/9 体积使用。

类似地，将如上所述制备的多肽 201 样品经 HPLC 纯化，纯度大于 95%，蛋白浓度为 1.02mg/ml，用 PBS 稀释，再加入 1/9 体积的铝佐剂，使多肽 201 的终浓度到一定的量，4℃，混合过夜。使用剂量为 100μl/只鼠。以铝佐剂为免疫佐剂，剂量梯度为 2、5、10μg/只，每组平行免疫 3 只 Bal b/c 小鼠。注射方式为肌肉注射，免疫程序为 0、7、28 天。结果参见图 9 。结果表明，5μg，10μg/只的剂量有良好的免疫效果，这与市售的乙肝表面抗原疫苗效果相当，而乙肝表面抗原疫苗为颗粒性抗原，公认比一般的单体抗原免疫原性更好，从而说明本发明的多聚体多肽适用作为疫苗。

无佐剂多肽 201 疫苗的免疫实验

将如上获得的本发明多肽 201 经为 4M 尿素溶解离心上清，经 PBS pH7.45 透析复性的离心上清，纯度为 95% 左右。以弗氏佐剂为对照，剂量梯度为 5、25、50ug/只，对照组为 5ug/只，每组平行免疫 3 只昆明小白鼠。注射方式为肌肉注射，免疫程序为 0、7、28 天。结果参见图 8。结果表明，无佐剂 ORF2-201 疫苗免疫小鼠，有明显的抗体产生，与常规抗原的弗氏佐剂吸附样品的使用剂量相当，进一步说明本发明的多聚体多肽比有常规单体抗原更好的免疫原性。

上述结果表明，本发明中，将重组多肽 201、NE2 分别免疫 Bal b/c 小鼠，以 5ug/只的剂量，弗氏佐剂和铝佐剂配方，都能诱发鼠体产生特异性的抗体，其余的可复性多肽以弗氏佐剂配方也都能使鼠体

产生良好特异性抗体，说明本发明的多肽具有用作疫苗的良好特性。

实施例 13: 利用包含本发明的重组多肽的疫苗免疫恒河猴

选取 HEV 各个指标均阴性并 ALT 正常的恒河猴六只，分成两组，一组编号为 HF1、HF2、HF3，一组为 HF4、HF5、HF6，分别以如实施例 1－5 和实施例 12 制备的含有铝佐剂的多肽 NE2I 疫苗与多肽 201 疫苗免疫受试恒河猴。免疫剂量都为 20 μg，三角肌注射，免疫方案为 0、10、30 天。在最后一次加强后第 3 周，利用间接 ELISA 测定各猴抗 NE2I-IgG 抗体的滴度分别为 HF1(1:16000)、HF2(1:4000)、HF3(1:8000)、HF4(1:2000)、HF5(1:3000)、HF6(1:5000)。

以多肽 NE2I 和多肽 201 为例的上述结果表明，本发明的重组多肽与 5885768 号美国专利中用做免疫原的戊型肝炎 ORF2 多肽 trpE-C2（SEQ ID NO: 1 的 225－660 位）相比，均具有良好的免疫原性。在 5885768 号美国专利中，Reyes 等用大肠杆菌表达的戊型肝炎 ORF2 多肽 trpE-C2 用改良铝佐剂每针 50μg 静脉注射，以 0 天、30 天方案免疫 4 只食蟹猴，同时以 2 只食蟹猴仅注射佐剂作为对照，结果在 4 周后免疫组均未检测到抗体产生。取其中 2 只在第 58 天时以 80μg 无佐剂的不溶性 trpE-C2 多肽进行第三次免疫，在 4 周后方可检出抗体。

实施例 14: HEV 病毒对利用包含本发明的重组多肽疫苗免疫恒河猴猴的攻击实验

HEV 病毒的制备与定量

取一份来自新疆的 HEV 病人的粪便，用无菌生理盐水配成 10％的悬液，12000g 4℃离心 20 分钟，上清用 0.2μm 的除菌滤器

（NALGENE® Cat.No.190-2520）除菌。以 PCR 可见的 HEV 病毒量为一个感染剂量。

粪便 HEV RNA 的提取、反转录及 PCR：10%的粪便悬液用 GIBCOL 公司的 Trizol 试剂按其操作说明提取，20μl 体积反转录，反转录引物为特异性引物 A3（4566-4586，5′-ggctcaccggagtgtttcttc-3′），AMV 反转录酶 42℃反转录 40 分钟。nt-PCR 第一轮引物为 A5（4341-4362，5′-ctttgatgacaccgtcttctcg-3′）、A3，反转录模板加 2μl，总体积为 20μl，条件为：94℃预变性 5 分钟；94℃ 变性 40 秒，68℃ 复性延伸 40 秒，35 个循环；72℃延伸 5 分钟。第二轮引物为 B5（4372-4392，5′-gccgcagcaaaggcatccatg-3′）、B3（4554-4575，5′-gtgtttcttccaaaaccctcgc-3′），第一轮模板加 1μl，总体积为 20μl，条件为：94℃预变性 5 分钟；94℃ 变性 40 秒，56℃ 复性 40 秒，72℃延伸 1 分 20 秒，35 个循环；72℃延伸 5 分钟。

实验猴分组：免疫组 1 中所用猴编号为为 V10、V11、V12（分别对应于实施例 2 中猴子 HF1、HF2、HF3）；免疫组 2 为 V13、V14、V15（分别对应于实施例 2 中的猴子编号 HF4、HF5、HF6）；空白组为 V16、V17、V18。

病毒攻击

以 PCR 可见的 HEV 病毒量为一个感染剂量。在利用如实施例 13 所述包含本发明重组多肽的疫苗对实验猴 HF1-6 最后一次加强免疫后，第 3 周对上述各猴以 1000 个感染剂量攻击。攻毒后各猴 ALT 均未见升高。实验猴 V16、V17 于第 4 周可检测到 Anti-NE2I-IgG，V18 于第 5 周可检测到 Anti-NE2-IgG。从第 1 到 37 天，V10-15 均未检测到排毒；V16 排毒从第 5 天开始到第 30 天结束；V17、V18 也从第 5 天开始，到第 37 天仍未结束。这些结果表明了本发明涉及

的这些多肽作为疫苗与5885768号美国专利中的戊型肝炎病毒ORF2多肽trpE-C2相比，具有良好免疫原性和保护性。

由这些结果可见，本发明涉及的疫苗以较小的剂量免疫恒河猴后，免疫组能产生很好的抗体反应，在病毒攻击后既没有转氨酶的升高，又检测不到粪便排毒，具有比采用HEV ORF2之trpE-C2为疫苗（美国专利 5885768）和 Tsarev 等人制备的多肽制成的疫苗。已报道结果更好的保护性。另外，由于 Tsarev 和 Genelabs 公司均采用对人体有潜在安全问题的杆状病毒表达系统由于其潜在的安全性问题，迄今仍未见有利用该系统表达的重组蛋白正式被批准用于商业化人体体内药物或疫苗的报告，而本发明利用大肠杆菌表达系统表达的重组多肽已有多种用作于商业化人体体内药物，具有更为可靠的安全性。

实施例 15: 与本发明多肽 247 嵌合的 HEV ORF3 中的表位之嵌合多肽的制备

以从新疆维吾尔自治区的戊肝病人中克隆得到的 HEV 全基因（Aye,T.T., Uchida 等，核酸研究，20 (13), 3512 (1992); GenBank 序号： GI221701 ）为模板，利用正向引物 372FP（ 5'-ggatcccatatgaataacatgtcttttgct-3'），其 5'端引入限制性内切酶 BamHII 和 NdeI 位点；以及反向引物 372BRP（ 5'-ggatcctcggcgcggcc-3'），其 5'端引入 BamHI 位点，以如下条件进行 PCR 反应：94℃ 5 分钟，30×(94℃ 50 秒，56℃ 50 秒，72℃ 30 秒)，72℃ 10 分钟，得到特异的 370bp 左右大小编码 HEV ORF3 中表位的 DNA 片段。上述获得的 PCR 产物与商售的 pMD 18-T 载体（TAKARA 公司生产）连接，BamHI 酶切鉴定得到插入 HEV-ORF3 中的表位基因的阳性亚克隆。核苷酸测序表明其未发生变异，由此得到 ORF 3

中表位的氨基酸序列，见 SEQ ID NO: 11。

BamHI 酶切获得 HEV-ORF3 基因片段，再与经 BamHI 酶切的按照实施例 1 所述方法制备的 pTO-T7-ORF2-247 表达质粒载体相连接，BamHI 酶切鉴定得到插入 HEV-ORF3 基因的阳性表达克隆 pTO-T7- ORF3-247，该克隆转化大肠杆菌 ERR2566 菌株，用于表达 ORF3-247 嵌合多肽。

实施例 16: 流感病毒血液凝集素（HA）与本发明的多肽 NE2D 之嵌合多肽的制备

以如实施例 1 中制备的 HEV-ORF2 突变序列（SEQ ID NO: 6）为模板，以如下所示设计的正向/反向引物 HAFP/E2RD，94℃ 5 分钟，30×(94℃ 50 秒，56℃ 50 秒，72℃ 70 秒)，72℃ 10 分钟，进行 PCR 扩增，得到特异的 800bp 左右大小的包含编码流感病毒血凝素 HA 与本发明的多肽 NE2D 之嵌合多肽的 DNA 片段。其中 HAFP 为正向引物，其 5'端引入限制性内切酶 BamHI 和 NdeI 位点，NdeI 位点序列为 CAT ATG，ATG 为大肠杆菌的起始密码子，并在 HA 与本发明多肽 NE2D 之间引入柔性连接 Gly-Gly-Ser，使两者的活性都能得以表现，以达到利用 HA 增强本发明多肽 NE2D 免疫原性的目的；E2RD 为反向引物，其 5'端引入终止密码子和限制型内切酶 EcoRI 位点。设计目的是在表达载体中翻译没有融合蛋白的 ORF2-NE2D 蛋白质，适用作为疫苗。

HAFP: 5'- AGA TCT CAT ATG TCT AAA GCT TTC TCT AAC TGC TAC CCT

BglII NdeI 91 Ser Lys Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro

TAC GAC GTT CCG GAC TAC GCT TCT TTA GGT GGA TCC

Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu108 Gly Gly Ser

CAG CTG TTC TAC TCT CGT CC-3'

E2RD:5'-gaattcttaggggctaaaacagc-3'

包含编码所得嵌合多肽的核酸构建体之表达载体的制备

将上述获得的 PCR 产物与商售的 pMD 18-T 载体（TAKARA 公司生产）连接，BamHI/EcoRI 酶切鉴定得到插入本发明 ORF2－NE2D 基因的阳性亚克隆；NdeI/EcoRI 酶切获得 HA-ORF2-NE2D 基因片段，再与经 NdeI/EcoRI 酶切的 pTO-T7 表达质粒载体相连接，NdeI/EcoRI 酶切鉴定，得到插入编码本发明 ORF2-NE2D 基因的、包含编码所得嵌合多肽的核酸构建体之阳性表达载体 pTO-T7- HA-ORF2-NE2D，该克隆转化大肠杆菌 ERR2566 菌株，用于表达 HA-ORF2-NE2D 嵌合多肽。得到的 HA-ORF2-NE2D 嵌合多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

实施例 17：利用包含本发明的多肽 NE2I 的 IgG 抗体诊断试剂盒诊断生物学样品中戊型肝炎病毒感染

包含本发明的重组多肽 NE2I 的 IgG 抗体诊断试剂盒组成如下：包含预包被好重组多肽 NE2I 并用封闭液（20mM pH7.2 PB，5‰酪蛋白，2％深水鱼皮明胶）封闭好的微孔条；样品稀释液（20mM pH7.2 PB，1％酪蛋白）；以及用酶稀释液（20mM pH7.2 PB，5‰酪蛋白，10％新生牛血清）适当稀释的 HRP 标记的抗人 IgG 抗体（DAKO 公司）；非生物活性材料如 20×PBST、显色剂 A、显色剂 B、终止液等购自北京万泰公司。

以 NE2I 组装抗 HEV-IgG 抗体诊断试剂盒，对 HEV 感染的猴子的系列血进行检测，以两种商业试剂（北京万泰公司和新加坡 Genelabs 公司）为对照。系列血选模拟天然 HEV 感染的猴子 No1、2、3、13 在静脉攻毒后 0 到 18 周的血清。

此试剂盒检测生物学样品中抗 HEV-IgG 抗体步骤如下：在已预包被多肽 NE2I 的微孔条中加入 100μl 样品稀释液；在样品稀释液中加入 10μl 待测血清，轻拍混匀后于 37℃温育 30 分钟；然后用 PBST 洗涤 5 次，在吸水纸上扣干后每孔加入 100μl 已稀释好的标记 HRP 的抗人 IgG 抗体，轻拍混匀后再次于 37℃温育 30 分钟；再次用 PBST 洗涤 5 次并扣干后，加入显色剂 A、B 各 50μl，37℃温育 10 分钟后，加终止液 50μl 终止，于酶标仪上读取 $OD_{450/620nm}$ 的读值。北京万泰公司和新加坡 Genelabs 公司检测抗 HEV-IgG 抗体的诊断试剂盒严格按其各自的操作说明书操作。

结果采用本发明 NE2I 的试剂检出生物学样品中 IgG 抗体时间比 Genelabs 公司及万泰公司试剂平均早 7～14 天；Anti-NE2I-IgG 持续时间比 Genelabs Anti-HEV-IgG 及万泰 Anti-HEV-IgG 长；Anti-NE2-IgG 检出率比 Genelabs Anti-HEV-IgG 及万泰 Anti-HEV-IgG 高（参见图 10，具体数据见表 5）。对 34 份随意人血清进行检测，本发明的 NE2I 试剂及 Genelabs 试剂阳性率分别为 35％与 11％，后者阳性者前者都能检出。对 263 份临床肝炎标本进行 NE2I-IgG 试剂、万泰 Anti-HEV-IgG 试剂检测，阳性率分别为 27.7％、10.6％。对 91 份非甲、乙、丙肝炎病人血清进行 NE2I-IgG 试剂、Genelabs 试剂检测，阳性率分别为 69.2％、24.2％。由此可看出本发明的 NE2I 试剂较现有商业试剂的更高的灵敏度。

表 5 本发明提供的抗戊型肝炎 IgG 抗体检测试剂盒（NE2I-IgG）与两种商业试剂对系列 HEV 感染猴血清的检出情况比较

No.1 血清	0w	1w	2w	3w	4w	5	6w	7w	8	9w	10	11w	12w	13w	14w	15w	16w	17w	18w
Genelabs Anti-HEV-IgG	0.01	0.01	0.01	0.01	0.21	2.6	3	3		2.61	1.7	1.36	0.92	0.92	0.92	0.96	0.72		
万泰 Anti-HEV-IgG	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	1.8	2.45	2.48	2.4	1.7	1.3	0.54	0.36	0.25	0.18	0.1	0.05	0.05	0.03
本发明 NE2I-IgG	0.01	0.02	0.01	1.87	2.56	2.	2.52	2.49	2.7	2.52	2.5	2.47	2.53	2.58	2.64	2.65	2.40	2.36	2.35

No.2 血清	0w	1w	2w	3w	4w	5	6w	7w	8	9w	10	11w	12w	13w	14w	15w	16w	17w	18w
Genelabs Anti-HEV-IgG	0.05	0.07	0.05	0.04	3		3	3		3		3	3	3	3	3	3		
万泰 Anti-HEV-IgG	0.02	0.02	0.02	0.02	2.05	2.5	2.42	2.46	2.6	2.5	2.3	2.23	2.3	2.21	2.2	2.26	2.26	2.38	2.46
本发明 NE2I-IgG	0.06	0.06	0.06	0.77	2.26	2.3	2.5	2.56	2.6	2.65	2.4	2.47	2.4	2.54	2.51	2.38	2.29	2.34	2.33

No.3 血清	0w	1w	2w	3w	4w	5	6w	7w	8	9w	10	11w	12w	13w	14w	15w	16w	17w	18w
Genelabs Anti-HEV-IgG	0.05	0.02	0.02	0.02	0.78		3	2.91	2.8	2.77	2.2	1.95	1.79	1.54	1.42	1.42	1.38		
万泰 Anti-HEV-IgG	0	0	0	0.02	0.02	1.8	1.62	1.67	1.8	1.48	1.0	0.67	0.75	0.76	0.58	0.38	0.46	0.34	0.23
本发明 NE2I-IgG	0.01	0.05	0.04	0.83	2.2	2.6	2.59	2.62	2.7	3	2.	2.6	2.55	2.6	2.54	2.51	2.51	2.36	2.51

No.13 血清	0w	1w	2w	3w	4w	5	6w	7w	8	9w	10	11w	12w	13w	14w	15w	16w	17w	18w
Genelabs Anti-HEV-IgG	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.0	0.15	0.1	0.0	0.06	0.0	0.07	0.08	0.07	0.1	0.15	0.07	0.04	0.02
万泰 Anti-HEV-IgG	0.02	0	0.01	0.01	0.01		0.01	0.02	0.0	0.03	0.0	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02		
本发明 NE2I-IgG	0.1	0.11	0.09	0.09	2.3	2.4	2.51	2.5	2.3	2.21	2.1	2.14	2.05	2.01	1.82	1.87	1.79	1.7	1.6

实施例 18: 对本发明的重组蛋白进行酶标的方法

各取 HRP、NaIO4 1 mg，加超纯水溶解；然后在 HRP 溶液中逐滴加入 NaIO4 溶液，边加边搅拌，并将混合好的溶液置于 4℃，暗置 30 分钟；取 1μl 乙二醇溶于超纯水中，边加边搅拌的逐滴加入上述混合溶液中，室温暗置 30 分钟，至此酶氧化过程完成。在氧化 HRP 的过程中，用 pH9.6 左右的 50mM CB 透析重组蛋白。HRP 氧化完后，将透析好的重组蛋白与 HRP 按所需比例混合，于 50mM pH9.5 CB 中透析 6 小时以上；然后用新鲜配置的 NaBH4 溶液终止，NaBH4 量为 0.2 mg；摇匀，4℃静置 2 小时。然后用 pH7.2 的 10 mM PBS 透析过夜。

实施例 19 检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgM 抗体的诊断试剂盒和检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgM 抗体的捕获法

利用实施例 18 所述的方法，对本发明的多肽 225N 进行辣根过氧化物酶（HRP）标记。

辣根过氧化物酶标记的包含本发明的重组多肽 225N 的捕获法检测 IgM 抗体的诊断试剂盒组成如下：包含预包被好抗人 IgMμ链多克隆抗体（丹麦 DAKO 公司）并封闭好的微孔条；样品稀释液（20mM pH7.2 PB，1%酪蛋白）；以及用酶稀释液（20mM pH7.2 PB，5‰酪蛋白，10％新生牛血清）适当稀释的 HRP 标记的重组多肽 225N；非生物活性材料如 20×PBST、显色剂 A、显色剂 B、终止液等购自北京万泰公司。

用此试剂盒检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgM 抗体的捕获法包含如下步骤：在已预包被抗μ链多抗的微孔条中加入 100μl 样品稀释液；在样品稀释液加入 1μl 待测血清，轻拍混匀后于 37℃温育

30 分钟；然后用 PBST 洗涤 5 次，在吸水纸上扣干后每孔加入 100 μl 已稀释好的标记 HRP 的重组多肽 225N，轻拍混匀后再次于 37℃温育 30 分钟；再次用 PBST 洗涤 5 次并扣干后，加入显色剂 A、B 各 50μl，37℃温育 10 分钟后，加终止液 50μl 终止，于酶标仪上读取 $OD_{450/620nm}$ 的读值。

利用如上述制备的本发明试剂盒用捕获法，对 263 份临床肝炎标本进行 Anti-HEV-IgM 检测，阳性率为 11%。对 91 份临床非甲、乙、丙肝炎病人血清进行 Anti-HEV-IgM 捕获法检测，同时利用 Genelabs 生产的 Anti-HEV-IgG 检测试剂盒进行检测，阳性率分别为 48.4%、24.2%。上述结果表明，采用本发明制备的诊断试剂盒以及捕获法检测 IgM 抗体，检测结果为阳性者与临床诊断结果吻合好，而且大多数 Genelabs 试剂阳性者捕获法 IgM 亦阳性，表明该捕获法 IgM 试剂用于临床戊肝诊断较现有商业试剂更为灵敏与特异。

实施例 20 检测生物学样品中戊型肝炎病毒总抗体的诊断试剂盒和检测生物学样品中戊型肝炎病毒总抗体的方法

利用实施例 18 所述的方法，对本发明的多肽 225N 进行辣根过氧化物酶标记。

包含本发明的重组多肽 NE2I、225N 的总抗体诊断试剂盒组成如下：包含预包被好重组多肽 NE2I 并封闭好的微孔条；以及用酶稀释液（20mM pH7.2 PB，5‰酪蛋白，10%新生牛血清）适当稀释的 HRP 标记的重组多肽 225N；非生物活性材料如 20×PBST、显色剂 A、显色剂 B、终止液等购自北京万泰公司。

用如上述制备的本发明试剂盒检测生物学样品中抗戊型肝炎病毒总抗体的夹心法包含如下步骤：在已预包被重组多肽 NE2I 的微孔条中加入血清 50μl 并加入 50μl 已稀释好的标记 HRP 的重组多肽

225N，轻拍混匀后于37℃温育60分钟；用PBST洗涤5次并扣干后，加入显色剂A、B各50μl，37℃温育15分钟后，加终止液50μl终止，于酶标仪上读取$OD_{450/620nm}$的读值。

对部分血清的检测结果如下：用本发明所述诊断试剂盒对263份临床肝炎标本进行Anti-HEV总抗体夹心法检测，同时用万泰Anti-HEV-IgG试剂检测，阳性率分别为52％、10.6％。用本发明所述诊断试剂盒对91份非甲、乙、丙肝炎病人血清进行Anti-HEV总抗体夹心法检测，同时用Genelabs Anti-HEV-IgG检测，阳性率分别为54.9％、24.2％。结果表明，采用本发明制备的诊断试剂盒的检测结果优于现有临床用诊断试剂。

权 利 要 求

1. 一种包含戊型肝炎病毒 ORF2 之 SEQ ID NO: 1 中所示氨基酸序列或其片段的多肽的 n 聚体，其中 n 为 1-180 的整数，包含的所述 SEQ ID NO: 1 的氨基酸片段的多肽选自：

（1）氨基端位于 113 位至 469 位氨基酸之间，羧基端位于 596 位氨基酸至 660 位氨基酸之间的多肽，

（2）氨基端位于 370 位至 469 位氨基酸之间，羧基端位于 601 位氨基酸至 628 位氨基酸之间的多肽，

（3）氨基端位于 390 位至 459 位氨基酸之间，羧基端位于 601 位氨基酸至 610 位氨基酸之间的多肽，

（4）具有 SEQ ID NO: 1 的 414 位至 660 位氨基酸序列的多肽，即多肽 247，

（5）具有 SEQ ID NO: 1 的 429 位至 660 位氨基酸序列的多肽，即多肽 232，

（6）具有 SEQ ID NO: 1 的 439 位至 660 位氨基酸序列的多肽，即多肽 222，

（7）具有 SEQ ID NO: 1 的 459 位至 660 位氨基酸序列的多肽，即多肽 201，

（8）具有 SEQ ID NO: 1 的 394 位至 628 位氨基酸序列的多肽，即多肽 235N，

（9）具有 SEQ ID NO: 1 的 394 位至 618 位氨基酸序列的多肽，即多肽 225N，

（10）具有 SEQ ID NO: 1 的 394 位至 602 位氨基酸序列的多肽，即多肽 209N，

（11）具有 SEQ ID NO: 1 的 394 位至 601 位氨基酸序列的多

肽，即多肽 208N,

（12）具有 SEQ ID NO: 1 的 394 位至 606 位氨基酸序列的多肽，即多肽 NE2I,

（13）具有 SEQ ID NO: 1 的 390 位至 603 位氨基酸序列的多肽，即多肽 217D,

（14）具有 SEQ ID NO: 1 的 374 位至 618 位氨基酸序列的多肽，即多肽 205,

（15）具有 SEQ ID NO: 1 的 414 位至 602 位氨基酸序列的多肽，即多肽 189,

（16）具有 SEQ ID NO: 1 的 414 位至 601 位氨基酸序列的多肽，即多肽 188,

（17）具有 SEQ ID NO: 1 的 459 位至 628 位氨基酸序列的多肽，以及

（18）氨基端添加 Met，羧基端被修饰的 SEQ ID NO: 1 的 X 位至 603 位氨基酸序列的多肽，其中所述羧基端修饰是 603 位氨基酸 Pro 的 3'端以 5'－3'方向添加氨基酸序列-Pro-Pro-Arg，包括：

a) X=394 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 2 所示的多肽，即 NE2;

b) X=414 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 3 所示的多肽，即 193C;

c) X=429 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 4 所示的多肽，即 178C;

d) X=439 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 7 所示的多肽，即 168C;

e) X=449 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 8 所示的多肽，即 158C;

f) X=459 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 9 所示的多肽，即 148C;

g) X=469 时，所述多肽为 SEQ ID NO: 10 所示的多肽，即 138C。

（19）与上述（1）－（18）中的任一多肽具有至少 80％同一性，且具有相同的抗原性、免疫原性等生物学性质的多肽。

2. 一种重组表达载体，其包含编码权利要求 1 所述多肽的核苷

酸序列。

3. 一种经权利要求 2 的重组表达载体转化的宿主细胞，其能够表达权利要求 1 的多肽。

4. 一种用于预防和/或治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，其至少含有权利要求 1 的多肽之一或其任意组合，以及任选地药学可接受的载体和/或佐剂。

5. 一种包含权利要求 1 的多肽与流感病毒血凝素的保守片段的嵌合蛋白。

6. 一种用于预防和/或治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染的疫苗组合物，其含有权利要求 5 的嵌合蛋白，以及任选地药学可接受的载体和/或佐剂。

7. 一种用于免疫哺乳动物使其免受戊型肝炎病毒感染的权利要求 1 多肽或权利要求 5 的嵌合蛋白。

8. 权利要求 4 或 6 的疫苗组合物用于免疫哺乳动物使其免受戊型肝炎病毒感染的用途。

9. 一种用于预防和/或治疗哺乳动物戊型肝炎病毒感染的方法，其包括向受试者施用预防和/或治疗有效量的权利要求 1 的多肽或权利要求 5 的嵌合蛋白。

10. 一种用于诊断生物学样品中戊型肝炎病毒感染的诊断试剂盒，其中包括诊断有效量的至少一种权利要求 1 的多肽或其任意组合。

11. 权利要求 10 的诊断试剂盒，其还包括戊型肝炎 ORF3 中的免疫原性表位的多肽或其有免疫原活性的片段，其中 ORF3 的免疫原性表位多肽或其具有免疫原活性的片段任选地与所用的权利要求 1 的多肽共价结合。

12. 权利要求 10 或 11 的诊断试剂盒，其用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgG 抗体，其中包含至少一种选自权利要求 1 中的多肽，

如需要，所述多肽可预包被合适的支持物表面；还包括带有可检测标记的抗待检生物样品来源的 IgG 抗体和与可检测标记相应的检测剂，如需要还应包括适当的缓冲体系。

13. 权利要求 10 或 11 的诊断试剂盒，其用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgM 抗体，其中包括使用抗待检生物样品来源的 IgM 抗体作为捕捉抗体，如需要，所述捕捉抗体可预包被合适的支持物表面，还包括带有可检测标记的至少一种选自权利要求 1 中的多肽和与可检测标记相应的检测剂，如需要还应包括适当的缓冲体系。

14. 权利要求 10 或 11 的诊断试剂盒，其用于检测生物学样品中戊型肝炎病毒总抗体，其中包括至少一种选自权利要求 1 中的多肽，如需要所述多肽可预包被于合适的支持物表面；还包括带有可检测标记的选自权利要求 1 中的多肽，以及与所选可检测标记相应的检测剂，其中用于预包被支持物表面所用的选自权利要求 1 中的多肽之多肽可以与同样选自权利要求 1 中的多肽之带有可检测标记的多肽为同一多肽，或不同的多肽。

15. 一种诊断哺乳动物戊型肝炎病毒感染的方法，其包括用权利要求 10 或 11 的诊断试剂盒在适于发生抗原抗体反应的条件下与待测哺乳动物样品相接触。

16. 一种检测生物学样品中戊型肝炎病毒总抗体的方法，其包含如下步骤：将至少一种权利要求 1 的多肽固定于支持物表面；与待测样品在适于发生抗原抗体反应的条件下相接触；用适当缓冲液洗涤；然后用带有可检测标记的戊型肝炎病毒抗原及相应的检测剂检测支持物表面的抗原抗体复合物。

17. 一种检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgG 抗体的方法，其包含如下步骤：将至少一种权利要求 1 的多肽固定于支持物表面；与待测样品在适于发生抗原抗体反应的条件下相接触；用适当缓冲液

洗涤；然后用带有可检测标记的戊型肝炎病毒抗 IgG 抗体及相应的检测剂检测支持物表面的抗原抗体复合物。

18. 一种检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgM 抗体的方法，其包含如下步骤：将抗 IgM 抗体固定于支持物表面；与待测样品在适于发生抗原抗体反应的条件下相接触；用适当缓冲液洗涤；然后用带有可检测标记的至少一种权利要求 1 的多肽及相应的检测剂检测支持物表面的抗 IgM 抗体与 IgM 抗体复合物。

19. 一种检测生物学样品中戊型肝炎病毒 IgM 抗体的方法，其包含如下步骤：将抗 IgM 抗体固定于支持物表面；与待测样品在适于发生抗原抗体反应的条件下相接触；用适当缓冲液洗涤；然后用至少一种权利要求 1 的多肽在适于发生抗原抗体反应的条件下相接触；用适当缓冲液洗涤；然后用带有可检测标记的抗戊型肝炎病毒多克隆抗体或单克隆抗体及相应的检测剂检测支持物表面的抗原抗体复合物。

Fig. 1

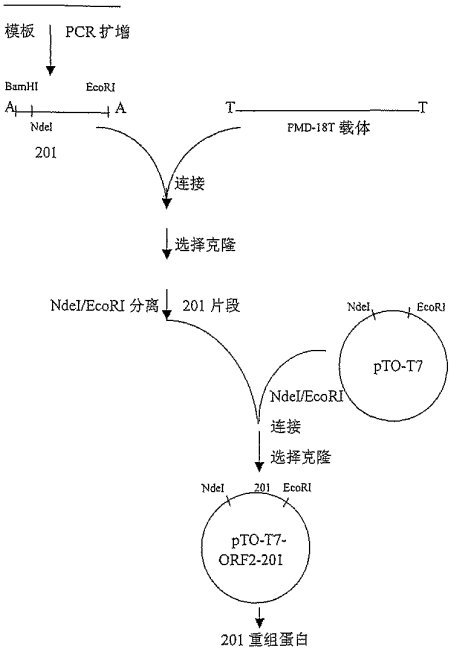

模板
PCR 扩增
BamHI
EcoRI
A
A
NdeI
201
T
T
FMD-18T 载体
连接
选择克隆
NdeI/EcoRI 分离
201 片段
NdeI
EcoRI
pTO-T7
NdeI/EcoRI
连接
选择克隆
NdeI
201
EcoRI
pTO-T7-
ORF2-201
201 重组蛋白

Fig. 2

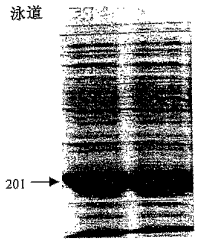


Fig. 3

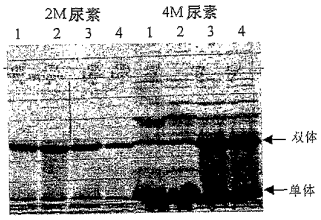


Fig. 4

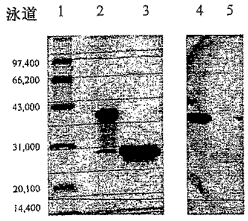


Fig. 5

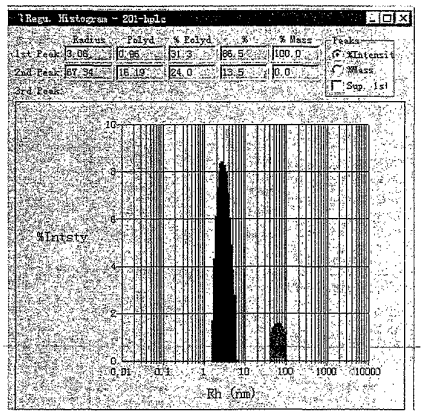

Regn. Histogram - 201-hplc
Radius
Polyd
% Polyd
% Mass
Peaks
1st Peak
2nd Peak
3rd Peak
Intensity
Mass
Sup. 1st
%Intsty
Rh (nm)

Fig. 6

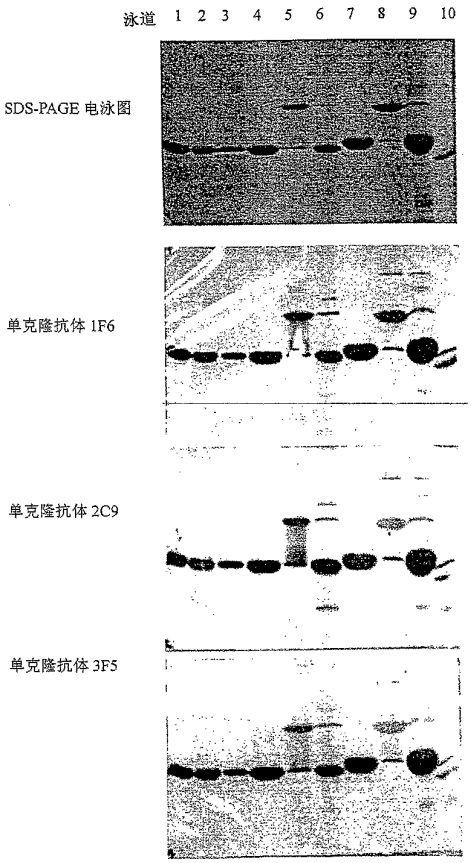


Fig. 7

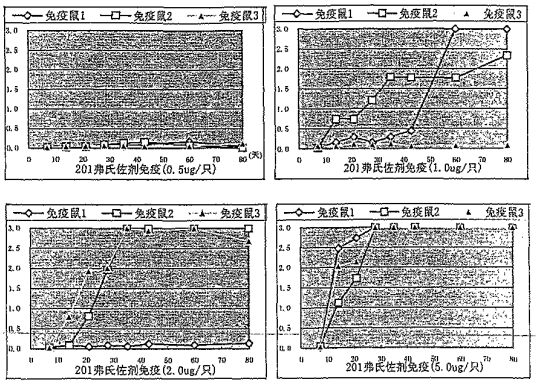

免疫鼠1
免疫鼠2
免疫鼠3
201弗氏佐剂免疫(0.5ug/只)
201弗氏佐剂免疫(1.0ug/只)
201弗氏佐剂免疫(2.0ug/只)
201弗氏佐剂免疫(5.0ug/只)

Fig. 8

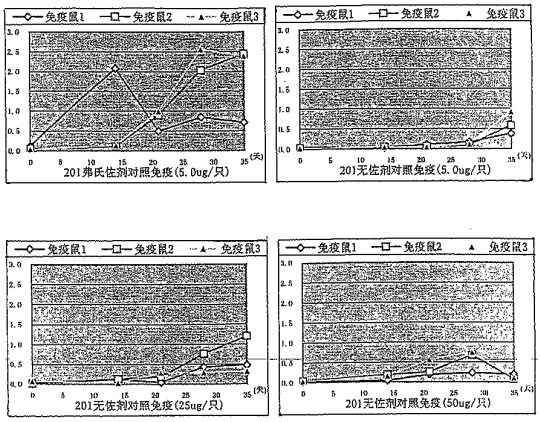
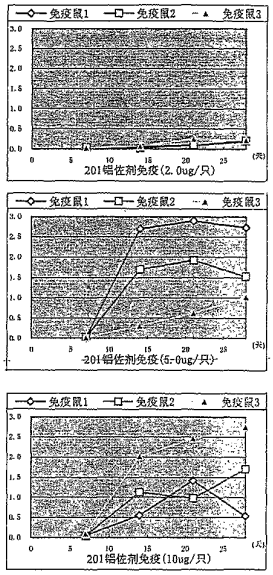

免疫鼠1
免疫鼠2
免疫鼠3
201弗氏佐剂对照免疫(5.0ug/只)
201无佐剂对照免疫(5.0ug/只)
201无佐剂对照免疫(25ug/只)
201无佐剂对照免疫(50ug/只)

Fig. 9


免疫鼠1
免疫鼠2
免疫鼠3
201铝佐剂免疫(2.0ug/只)
201铝佐剂免疫(5.0ug/只)
201铝佐剂免疫(10ug/只)

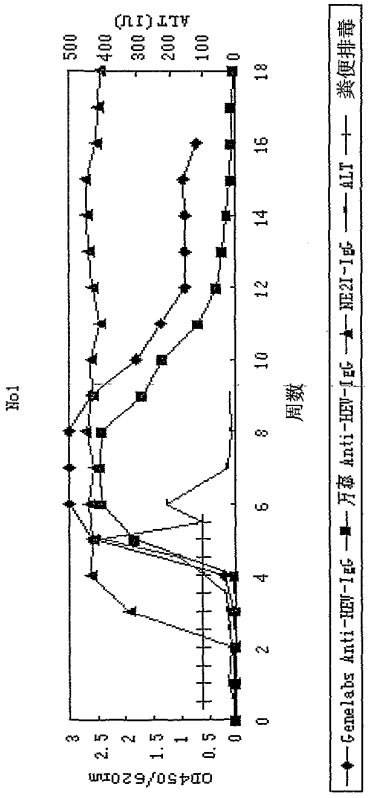

No1
OD450/620nm
ALT(IU)
周数
Genelabs Anti-HEV-IgG
万泰 Anti-HEV-IgG
NE2I-IgG
ALT
粪便排毒

Fig. 10A

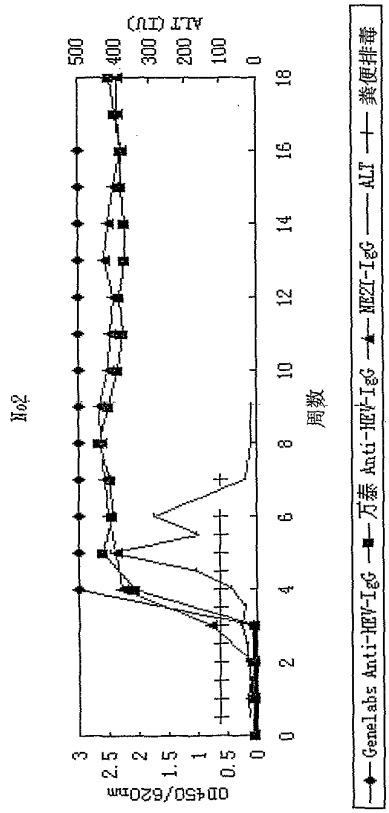

No2
OD450/620nm
ALT (IU)
周数
Genelabs Anti-HEV-IgG
万泰 Anti-HEV-IgG
NEZU-IgG
ALT
粪便排毒

Fig. 10B

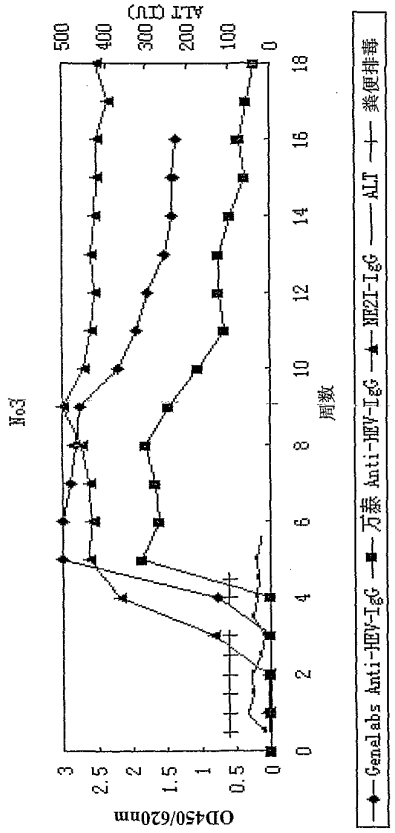

No3
OD450/620nm
ALT (IU)
周数
Genelabs Anti-HEV-IgG
万泰 Anti-HEV-IgG
WEZT-IgG
ALT
粪便排毒

Fig. 10C

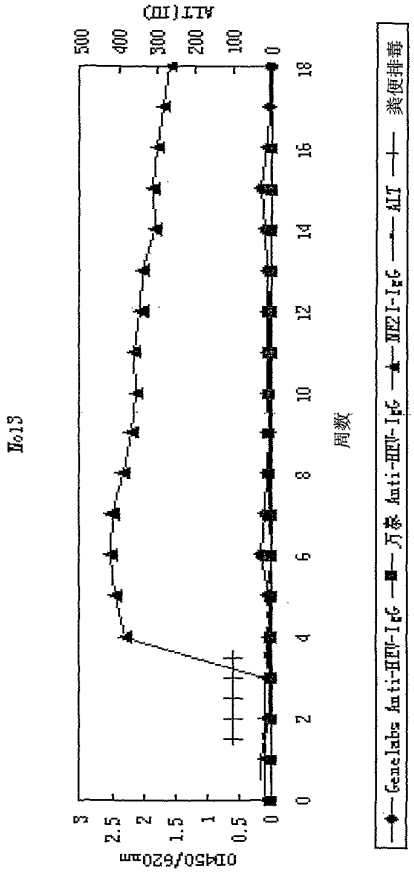

ALT(IU)
500
400
300
200
100
0
OD450/620nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
周数
Genelabs Anti-HEV-IgG
万泰 Anti-HEV-IgG
WPZ1-IgG
ALT
粪便排毒

Fig. 10D

序列表

申请人：养生堂有限公司

发明名称：戊型肝炎病毒之多肽片段以及包含所述片段的疫苗组合物和诊断试剂盒及其用途

SEQ ID NO: 1

1	Met Arg Pro Arg Pro Ile Leu Leu Leu Leu Leu Met Phe Leu Pro Met	16
17	Leu Pro Ala Pro Pro Pro Gly Gln Pro Ser Gly Arg Arg Arg Gly Arg	32
33	Arg Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Phe Trp Gly Asp Arg Val Asp Ser	48
49	Gln Pro Phe Ala Ile Pro Tyr Ile His Pro Thr Asn Pro Phe Ala Pro	64
65	Asp Val Thr Ala Ala Ala Gly Ala Gly Pro Arg Val Arg Gln Pro Ala	80
81	Arg Pro Leu Gly Ser Ala Trp Arg Asp Gln Ala Gln Arg Pro Ala Ala	96
97	Ala Ser Arg Arg Arg Pro Thr Thr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Thr Ala	112
113	Val Ala Pro Ala His Asp Thr Pro Pro Val Pro Asp Val Asp Ser Arg	128
129	Gly Ala Ile Leu Arg Arg Gln Tyr Asn Leu Ser Thr Ser Pro Leu Thr	144
145	Ser Ser Val Ala Thr Gly Thr Asn Leu Val Leu Tyr Ala Ala Pro Leu	160
161	Ser Pro Leu Leu Pro Leu Gln Asp Gly Thr Asn Thr His Ile Met Ala	176
177	Thr Glu Ala Ser Asn Tyr Ala Gln Tyr Arg Val Ala Arg Ala Thr Ile	192
193	Arg Tyr Arg Pro Leu Val Pro Asn Ala Val Gly Gly Tyr Ala Ile Ser	208
209	Ile Ser Phe Trp Pro Gln Thr Thr Thr Thr Pro Thr Ser Val Asp Met	224
225	Asn Ser Ile Thr Ser Thr Asp Val Arg Ile Leu Val Gln Pro Gly Ile	240
241	Ala Ser Glu Leu Val Ile Pro Ser Glu Arg Leu His Tyr Arg Asn Gln	256
257	Gly Trp Arg Ser Val Glu Thr Ser Gly Val Ala Glu Glu Glu Ala Thr	272
273	Ser Gly Leu Val Met Leu Cys Ile His Gly Ser Pro Val Asn Ser Tyr	288
289	Thr Asn Thr Pro Tyr Thr Gly Ala Leu Gly Leu Leu Asp Phe Ala Leu	304
305	Glu Leu Glu Phe Arg Asn Leu Thr Pro Gly Asn Thr Asn Thr Arg Val	320

321	Ser Arg Tyr Ser Ser Thr Ala Arg His Arg Leu Arg Arg Gly Ala Asp	336
337	Gly Thr Ala Glu Leu Thr Thr Thr Ala Ala Thr Arg Phe Met Lys Asp	352
353	Leu Tyr Phe Thr Ser Thr Asn Gly Val Gly Glu Ile Gly Arg Gly Ile	368
369	Ala Leu Thr Leu Phe Asn Leu Ala Asp Thr Leu Leu Gly Gly Leu Pro	384
385	Thr Glu Leu Ile Ser Ser Ala Gly Gly Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro	400
401	Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser Val	416
417	Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile Asp	432
433	Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu	448
449	Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val	464
465	Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr	480
481	Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp	496
497	Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg	512
513	Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr	528
529	Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys	544
545	Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn	560
561	Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly	576
577	His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro	592
593	Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Val Leu Ala	608
609	Leu Leu Glu Asp Thr Met Asp Tyr Pro Ala Arg Ala His Thr Phe Asp	624
625	Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg Pro Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala Phe	640
641	Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg Leu Lys Met Lys Val Gly Lys	656
657	Thr Arg Glu Leu ***	661

SEQ ID NO: 2

Met Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro

Val Val Ser Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser Val

Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile Asp
Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu
Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val
Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr
Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp
Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg
Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr
Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys
Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn
Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly
His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro
Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro Pro Pro Arg

SEQ ID NO: 3

Met Thr Ser Val
Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile Asp
Leu Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu
Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val
Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr
Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp
Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg
Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr
Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys
Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn
Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly
His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro Pro Pro Arg

SEQ ID NO: 4

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Gly Ser His Met Asn Asn
Met Ser Phe Ala Ala Pro Met Gly Ser Gln Pro Cys Ala Leu Gly Leu Phe Cys
Cys Cys Ser Ser Cys Phe Cys Leu Cys Cys Pro Arg His Arg Pro Val Ser Arg
Leu Ala Ala Val Val Gly Gly Ala Ala Ala Val Pro Ala Val Val Ser Gly Val
Thr Gly Leu Ile Pro Ser Pro Ser Gln Ser Pro Ile Phe Ile Gln Pro Thr Pro
Ser Pro Pro Met Ser Pro Leu Arg Pro Gly Leu Asp Leu Val Phe Ala Asn Pro
Pro Asp His Ser Ala Pro Leu Gly Val Thr Arg Pro Ser Ala Pro Pro Leu Pro
His Val Val Asp Leu Pro Gln Leu Gly Pro Arg Arg Gly Ser His Met Thr Ser
Val Glu Asn Ala Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile Asp Leu
Gly Glu Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu Gln Asp Arg
Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val Leu Arg Ala Asn Asp
Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser
Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr
Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly
Arg Pro Leu Ser Thr Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu
Arg Gly Lys Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr
Asn Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly His
Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro Val Ser Ile
Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro His Ser Ala Leu Ala Leu Leu Glu Asp Thr
Met Asp Tyr Pro Ala Arg Ala His Thr Phe Asp Asp Phe Cys Pro Glu Cys Arg
Pro Leu Gly Leu Gln Gly Cys Ala Phe Gln Ser Thr Val Ala Glu Leu Gln Arg
Leu Lys Met Lys Val Gly Lys Thr Arg Glu Leu

SEQ ID NO: 5:

atgcgccctcggcctattttgctgttgctcctcatgtttctgcctatgctgcccgcgccaccgcccgg
tcagccgtctggccgccgtcgtgggcggcgcagcggcggttccggcggtggtttctggggtgaccggg
ttgattctcagcccttcgcaatcccctatattcatccaaccaaccccttcgcccccgatgtcaccgct
gcggccggggctggacctcgtgttcgccaacccgcccgaccactcggctccgcttggcgtgaccaggc
ccagcgccccgccgttgcctcacgtcgtagacctaccacagctggggccgcgccgctaaccgcggtcg
ctccggcccatgacaccccgccagtgcctgatgttgactcccgcggcgccatcctgcgccggcagtat
aacctatcaacatctcccccttacttcttccgtggccaccggtacaaacttggttctatacgccgctcc
tcttagcccacttctacccctccaggacggcaccaatacicatataatggccacagaagcttctaatt
atgcccagtaccgggttgctcgtgccacaattcgctaccgcccgctggtccccaacgctgttggtggc
tacgccatctccatctcgttctggccacagaccaccaccaccccgacgtccgttgacatgaattcaat
aacctcgacggatgttcgtatttagtccagcccggcatagcctccgagcttgttatcccaagtgagc
gcctacactaccgtaaccaaggttggcgctctgttgagacctccggggtggcggaggaggaggccacc
tctggtcttgttatgctctgcatacatggctcacctgtaaattcttatactaatacaccttataccgg
tgccctcgggctgttggactttgccctcgaacttgagttccgcaacctcacccccggtaataccaaca
cgcgggtctcccgttactccagcactgcccgtcaccgccttcgtcgcggtgcagatgggactgccgag
cttaccaccacggctgctacccgcttcatgaaggacctctattttactagtactaatggtgtcggtga
gatcggccgtgggatagcgcttaccctgtttaaccttgctgacaccctgcttggcggtctaccgacag
aattgatttcgtcggctggtggccagctgttctactctcgtcccgtcgtctcagccaatggcgagccg
actgttaagctttatacatctgtagagaatgctcagcaggataagggtattgcaatcccgcatgacat
cgacctcggggagtctcgtgtagttattcaggattatgacaaccaacatgagcaggaccgaccgacac
cttccccagccccatcgcgccctttttctgtcctccgagctaatgatgtgctttggctttctctcacc
gctgccgagtatgaccagtccacttacggctcttcgaccggcccagtctatgtctctgactctgtgac
cttggttaatgttgcgaccggcgcgcaggccgttgcccggtcactcgactggaccaaggtcacacttg
atggtcgccccctttccaccatccagcagtattcaaagaccttctttgtcctgccgctccgcggtaag
ctctccttttgggaggcaggtactactaaagccgggtacccttataattataacaccactgctagtga

ccaactgctcgttgagaatgccgctgggcatcgggttgctatttccacttacaccactagcctgggtg
ctggtcccgtctctatttccgcggttgctgttttagccccccactccgcgctagcattgcttgaggat
accatggactaccctgcccgcgcccatactttcgatgacttctgcccggagtgccgcccccttggcct
ccagggctgtgcttttcagtctactgtcgctgagcttcagcgccttaagatgaaggtgggtaaaactc
gggagttatagtttattt-3'

SEQ ID NO: 6:

atgcgccctcggcctattttgctgttgctcctcatgtttctgcctatgctgcccgcgccaccgcccgg
tcagccgtctggccgccgtcgtgggcggcgcagcggcggttccggcggtggtttctggggtgaccggg
ttgattctcagcccttcgcaatcccctatattcatccaaccaaccccttcgcccccgatgtcaccgct
gcggccggggctggacctcgtgttcgccaacccgcccgaccactcggctccgcttggcgtgaccaggc
ccagcgccccgccgttgcctcacgtcgtagacctaccacagctggggccgcgccgctaaccgcggtcg
ctccggcccatgacaccccgccagtgcctgatgttgactcccgcggcgccatcctgcgccggcagtat
aacctatcaacatctcccctacttcttccgtggccaccggtacaaacttggttctatacgccgctcc
tcttagcccacttctacccctccaggacggcaccaatactcatataatggccacagaagcttctaatt
atgcccagtaccgggttgctcgtgccacaattcgctaccgcccgctggtccccaacgctgttggtggc
tacgccatctccatctcgttctggccacagaccaccaccaccccgacgtccgttgacatgaattcaat
aacctcgacggatgttcgtatttagtccagcccggcatagcctccgagcttgttatcccaagtgagc
gcctacactaccgtaaccaaggttggcgctctgttgagacctccggggtggcggaggaggaggccacc
tctggtcttgttatgctctgcatacatggctcacctgtaaattcttatactaatacaccttataccgg
tgccctcgggctgttggactttgccctcgaacttgagttccgcaacctcacccccggtaataccaaca
cgcgggtctcccgttactccagcactgcccgtcaccgccttcgtcgcggtgcagatgggactgccgag
cttaccaccacggctgctacccgcttcatgaaggacctctattttactagtactaatggtgtcggtga
gatcggccgtgggatagcgcttaccctgtttaaccttgctgacaccctgcttggcggtctaccgacag
aattgatttcgtcggctggtggccagctgttctactctcgtcccgtcgtctcagccaatggcgagccg
actgttaagctttatacatctgtagagaatgctcagcaggataagggtattgcaatcccgcatgacat

cgacctcggggagtctcgtgtagttattcaggattatgacaaccaacatgagcaggaccgaccgacac

cttccccagccccatcgcgccctttttctgtcctccgagctaatgatgtgctttggctttctctcacc

gctgccgagtatgaccagtccacttacggctcttcgaccggcccagtctatgtctctgactctgtgac

cttggttaatgttgcgaccggcgcgcaggccgttgcccggtcactcgactggaccaaggtcacacttg

atggtcgccccctttccaccatccagcagtattcaaagaccttctttgtcctgccgctccgcggtaag

ctctccttttgggaggcaggtactactaaagccgggtacccttataattataacaccactgctagtga

ccaactgctcgttgagaatgccgctgggcatcgggttgctatttccacttacaccactagcctgggtg

ctggtcccgtctctatttccgcggttgctgttttagccccc cct ccg cgc tag cattgcttga

ggataccatggactaccctgcccgcgcccatactttcgatgacttctgcccggagtgccgccccttg

gcctccagggctgtgcttttcagtctactgtcgctgagcttcagcgccttaagatgaaggtgggtaaa

actcgggagttatagtttattt-3'

SEQ IN NO:7

Met Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu

Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val

Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp

Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg

Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr

Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys

Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn

Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly

His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro

Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro Pro Pro Arg

SEQ *ID* NO:8

Met
Gln Asp Arg Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val
Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr
Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp
Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg
Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr
Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys
Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn
Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly
His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro
Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro Pro Pro Arg

SEQ ID NO:9
Met Ser Arg Pro Phe Ser Val
Leu Arg Ala Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr
Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp
Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg
Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr
Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys
Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn
Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly
His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro
Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro Pro Pro Arg

SEQ ID NO:10
Met Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr

Asp Gln Ser Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp
Ser Val Thr Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg
Ser Leu Asp Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr
Ile Gln Gln Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys
Leu Ser Phe Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn
Tyr Asn Thr Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly
His Arg Val Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro
Val Ser Ile Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro Pro Pro Arg

SEQ ID NO: 11

Met Asn Asn Met Ser Phe Ala Ala Pro Met Gly Ser Arg Pro Cys Ala Leu Gly
Leu Phe Cys Cys Cys Ser Ser Cys Phe Cys Leu Cys Cys Pro Arg His Arg Pro
Val Ser Arg Leu Ala Ala Val Val Gly Gly Ala Ala Ala Val Pro Ala Val Val
Ser Gly Val Thr Gly Leu Ile Leu Ser Pro Ser Gln Ser Pro Ile Phe Ile Gln
Pro Thr Pro Ser Pro Pro Met Ser Pro Leu Arg Pro Gly Leu Asp Leu Val Phe
Ala Asn Pro Pro Asp His Ser Ala Pro Leu Gly Val Thr Arg Pro Ser Ala Pro
Pro Leu Pro His Val Val Asp Leu Pro Gln Leu Gly Pro Arg Arg

SEQ ID NO: 12

1 Met Ser Lys Ala Phe Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr 16
17 Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gln Leu Phe Tyr Ser Arg Pro Val Val Ser 32
33 Ala Asn Gly Glu Pro Thr Val Lys Leu Tyr Thr Ser Val Glu Asn Ala 48
49 Gln Gln Asp Lys Gly Ile Ala Ile Pro His Asp Ile Asp Leu Gly Glu 64
65 Ser Arg Val Val Ile Gln Asp Tyr Asp Asn Gln His Glu Gln Asp Arg 80
81 Pro Thr Pro Ser Pro Ala Pro Ser Arg Pro Phe Ser Val Leu Arg Ala 96
97 Asn Asp Val Leu Trp Leu Ser Leu Thr Ala Ala Glu Tyr Asp Gln Ser 112

113	Thr Tyr Gly Ser Ser Thr Gly Pro Val Tyr Val Ser Asp Ser Val Thr	128
129	Leu Val Asn Val Ala Thr Gly Ala Gln Ala Val Ala Arg Ser Leu Asp	144
145	Trp Thr Lys Val Thr Leu Asp Gly Arg Pro Leu Ser Thr Ile Gln Gln	160
161	Tyr Ser Lys Thr Phe Phe Val Leu Pro Leu Arg Gly Lys Leu Ser Phe	176
177	Trp Glu Ala Gly Thr Thr Lys Ala Gly Tyr Pro Tyr Asn Tyr Asn Thr	192
193	Thr Ala Ser Asp Gln Leu Leu Val Glu Asn Ala Ala Gly His Arg Val	208
209	Ala Ile Ser Thr Tyr Thr Thr Ser Leu Gly Ala Gly Pro Val Ser Ile	224
225	Ser Ala Val Ala Val Leu Ala Pro	232

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/CN01/01469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC[7] C12N15/51

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols)

IPC[7] C12N15/51

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched

Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, EPOQUE(WPI), NCBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
X	US, A, 6054567 (US DEPT OF HEALTH) 25. April 2000, See the whole document	1—19
X	WO, A2, 9612807 (GENELABS TECHNOLOGIES INC) 02. May1996, See the whole document	1—19
X	WO, A1, 9517501 (ABBOTT LAB) 29. June1995, See the whole document	1—19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 March 2002(15.03.02)	28 MAR 2002 (28.03.02)
Name and mailing address of the ISA/ The Chinese Patent Office 6, Xitucheng Road, Haidian District, Beijing, 100088, China Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer PAN, aiqun Telephone No. 86-10-62093906

Form PCT/ISA/210(second sheet)(July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/CN01/01469

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
US-A-6054567	25-04-00	CN-A-1260000	12-07-00
WO-A2-9612807	02-05-96	WO-A3-9612807	30-05-96
WO-A1-9517501	29-06-95	AU-A-1437695	10-07-95

Form PCT/ISA/210(patent family annex)(July 1992)

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN01/01469

A. 主题的分类

IPC[7] C12N15/51

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC[7] C12N15/51

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和，如果实际可行的，使用的检索词)

EPOQUE(WPI)，CNPAT,NCBI

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	US，A，6054567（美国卫生健康部） 25.4 月 2000，参见全文	1－19
X	WO,A2,9612807（基因实验室技术公司） 02.5 月 1996，参见全文	1－19
X	WO,A1,9517501（ABBOTT 实验室） 29.6 月 1995，参见全文	1－19

☐ 某会文件在 C 栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型：

"A" 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件

"E" 在先文件，但是在国际申请日的同一日或之后公布的

"L" 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件

"P" 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件

"T" 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件，它与申请不相抵触，但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

"X" 特别相关的文件；当该文件被单独使用时，要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性

"Y" 特别相关的文件；当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起，这种结合对本领域技术人员是显而易见的，要求保护的发明不能认为具有创造性

"&" 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
15.3 月 2002(15.03.02)	28 3月 2002 (28.03.02)

国际检索单位名称和邮寄地址	受权官员
中国专利局 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号：86-10-62019451	潘爱群 电话号码：86－10－62093906

PCT/ISA/210 表(第 2 页)(1992 年 7 月)

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN01/01469

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
US-A-6054567	25-04-00	CN-A-1260000	12-07-00
WO-A2-9612807	02-05-96	WO-A3-9612807	30-05-96
WO-A1-9517501	29-06-95	AU-A-1437695	10-07-95

PCT/ISA/210 表(同族专利附件)(1992 年 7 月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 31/12	Ｃ０７Ｋ 14/08	ＺＮＡ	
Ｃ０７Ｋ 14/08	Ｃ０７Ｋ 14/705		
Ｃ０７Ｋ 14/705	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｎ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/543	５０１Ａ	
Ｇ０１Ｎ 33/543	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/576	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/576	Ｇ０１Ｎ 33/577	Ｂ	
Ｇ０１Ｎ 33/577	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
	Ａ６１Ｋ 37/02		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 シア、ニンシャオ
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード ２９、 ヤン シェン タン カンパニー リミテッド内
(72)発明者 ザン、ジュン
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード ２９、 ヤン シェン タン カンパニー リミテッド内
(72)発明者 リ、シャオウェイ
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード ２９、 ヤン シェン タン カンパニー リミテッド内
(72)発明者 ゲ、シェンシャン
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード ２９、 ヤン シェン タン カンパニー リミテッド内
(72)発明者 グ、イン
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード ２９、 ヤン シェン タン カンパニー リミテッド内
(72)発明者 ヘ、ジキアン
中国 ゼジャン、ハングゾウ シティー、シュガング ロード ２９、 ヤン シェン タン カンパニー リミテッド内

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA31 BA32 CA04 DA01 DA02 DA06 DA11 EA04
GA01 GA11 GA18 HA08
4B065 AA26X AA57X AA87X AA96X AA96Y AB01 AB02 BA02 BA08 BA25
BD17 CA24 CA25 CA45 CA46
4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA22 BA23 CA01 NA14 ZA751
4C085 AA03 BA55 BA92 CC03 CC04 CC05 EE01 EE03 EE05 EE06
4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA41 CA02 CA40 DA86 EA31 EA53
FA74 GA10 GA22 GA32

专利名称(译)	戊型肝炎病毒的多肽片段，含有其的疫苗组合物和诊断试剂盒，及其用途		
公开(公告)号	JP2004525613A	公开(公告)日	2004-08-26
申请号	JP2002542994	申请日	2001-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	ヤンシェンタンイオンシィエンクゥオンス		
申请(专利权)人(译)	杨慎谭离子Shiien Kuuon扫描		
[标]发明人	シアニンシャオ ザンジュン リシャオウェイ ゲシェンシャン グイン ヘジキアン		
发明人	シア、ニンシャオ ザン、ジュン リ、シャオウェイ ゲ、シェンシャン グ、イン ヘ、ジキアン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/29 A61K39/295 A61P1/16 A61P31/12 C07K14/08 C07K14/705 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/51 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/576 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/12 A61K39/29 A61K2039/55505 A61K2039/55566 A61K2039/57 A61K2039/6075 A61P1/16 C07K14/005 C07K16/10 C07K2319/00 C12N2760/16022 C12N2770/28122 C12N2770/28134 C12N2770/28171 G01N33/576		
FI分类号	C12N15/00.A A61K39/29 A61K39/295 A61P1/16 A61P31/12 C07K14/08.ZNA C07K14/705 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/543.501.A G01N33/566 G01N33/576.Z G01N33/577.B C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA31 4B024/BA32 4B024/CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA08 4B065/AA26X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA96X 4B065/AA96Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BA25 4B065/BD17 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA01 4C084/NA14 4C084/ZA751 4C085/AA03 4C085/BA55 4C085/BA92 4C085/CC03 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE05 4C085/EE06 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA02 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA53 4H045/FA74 4H045/GA10 4H045/GA22 4H045/GA32		
代理人(译)	池田幸		
优先权	00130634.0 2000-09-30 CN		
其他公开文献	JP5681337B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及包含SEQ ID NO：1所示的戊型肝炎病毒ORF-2的氨基酸序列或其片段的n聚体多肽，其中n是2至180的整数。 本发明还提供了一种嵌合多肽，其中该片段与流感病毒血凝素的保守片段融合，并且该片段与戊型肝炎病毒ORF3的表位多肽或其免疫原

性活性片段融合， 含有编码上述多肽的DNA分子的表达载体和含有该表达载体的表达宿主。 本发明还提供疫苗组合物，包含上述HEV多肽的HEV感染诊断试剂盒，以及包含IgG，IgM和完整抗体并预防，诊断和/或治疗HEV感染的诊断试剂盒。 供其使用。

(P2004-
(43) 公表日 平成16年8月26日 (20

(51) Int.Cl.[7]	F I		テーマコード (参
C12N 15/09	C12N 15/00	A	4B024
A61K 38/00	A61K 39/29		4B065
A61K 39/29	A61K 39/295		4C084
A61K 39/295	A61P 1/16		4C085
A61P 1/16	A61P 31/12		4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 有 （全 139 頁） 最終

(21) 出願番号 特願2002-542994 (P2002-542994)
(86) (22) 出願日 平成13年9月30日 (2001.9.30)
(85) 翻訳文提出日 平成15年3月28日 (2003.3.28)
(86) 国際出願番号 PCT/CN2001/001469
(87) 国際公開番号 WO2002/040681
(87) 国際公開日 平成14年5月23日 (2002.5.23)
(31) 優先権主張番号 00 1 30634.0
(32) 優先日 平成12年9月30日 (2000.9.30)
(33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 502108396
ヤン シェン タン イオン シクゥオン ス
中国 ハイナン、ハイコウ シテ パン インダストリィ ゾーン、ロード 6
(74) 代理人 100066692
弁理士 浅村 皓
(74) 代理人 100072040
弁理士 浅村 肇
(74) 代理人 100088926
弁理士 長沼 暹夫
(74) 代理人 100102897
弁理士 池田 幸弘

最終頁