



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105307674 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201480015680. 2

C07K 14/705(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 14

(30) 优先权数据

PCT/EP2013/055409 2013. 03. 15 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2014/059802 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/141176 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 葛兰素史密斯克莱生物公司

地址 比利时里克林萨斯

(72) 发明人 S. 科洛卡 R. 科特斯 A. 福尔戈里

A. 尼科西亚

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书18页

序列表16页 附图4页

(54) 发明名称

改进的痘病毒疫苗

(57) 摘要

本申请涉及用于痘病毒载体的新施用方案，所述载体包含编码抗原性蛋白质和不变链的核酸构建体。具体地，公开了所述痘病毒载体用于引发或加强免疫应答的用途。

1. 一种用于引发或加强免疫应答的痘病毒载体,其包含核酸构建体,所述核酸构建体包含:

(i) 编码至少一种抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列,所述核酸序列可操作地连接于

(ii) 编码至少一种不变链的核酸。

2. 根据权利要求1的痘病毒载体,其中所述至少一种编码的不变链是哺乳动物起源的。

3. 根据权利要求1或2的痘病毒载体,其中所述编码的至少一种不变链的特征在于下述至少一个特征:

(i) 内源性 KEY 区缺失或被不同的序列取代;

(ii) 位置 107 和 115(人不变链)或位置 90 和 98(鼠不变链)或在另一种不变链中与其对应的位置中的甲硫氨酸被另一氨基酸取代;

(iii) 野生型人不变链序列的头 16 个氨基酸缺失;

(iv) 至少一个分选肽被添加到所述不变链的内源性分选肽,从所述不变链的内源性分选肽移除或替换所述不变链的内源性分选肽,和/或

(v) 至少一个 CLIP 区被添加到所述至少一种不变链的内源性 CLIP 区,从所述至少一种不变链的内源性 CLIP 区移除或替换所述至少一种不变链的内源性 CLIP 区。

4. 根据权利要求1至3中任一项的痘病毒载体,其中所述编码的至少一种不变链是 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的至少 40 个连续氨基酸的片段或与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 的相同片段具有至少 85% 序列同一性。

5. 根据权利要求1至4中任一项的痘病毒载体,其中所述至少一种抗原性蛋白质是病原性生物体的蛋白质、癌症特异性蛋白质、或与异常生理学应答有关的蛋白质。

6. 根据权利要求5的痘病毒载体,其中所述病原性生物体是病毒、细菌、原生生物或多细胞寄生物。

7. 根据权利要求1至6中任一项的痘病毒载体,其中所述痘病毒选自正痘病毒、副痘病毒、亚塔痘病毒(yatapox)、禽痘病毒和软疣痘病毒载体。

8. 根据权利要求7的痘病毒载体,其中所述正痘病毒载体是猴痘病毒载体、牛痘病毒载体或痘苗病毒载体,优选修饰的痘苗安卡拉(MVA)。

9. 根据权利要求1至7中任一项的痘病毒载体,其中所述引发免疫应答是同源引发-加强疫苗接种方案的一部分。

10. 根据权利要求1或2的痘病毒载体,其中所述引发免疫应答是异源引发-加强疫苗接种方案的一部分。

11. 根据权利要求1至10中任一项的痘病毒载体,其中所述痘病毒载体经由鼻内、肌内、皮下、皮内、胃内、口服和局部路径施用。

12. 一种疫苗组合,其包含:

(a) 包含核酸构建体的痘病毒载体,所述核酸构建体包含:

(i) 编码至少第一抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列,所述核酸序列可操作地连接于

(ii) 编码至少一种不变链的核酸,

和

(b) 载体,其包含编码至少第二抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列,

或

第二抗原性蛋白质或其抗原性片段,

或

病毒样颗粒,

其中所述第一抗原性蛋白质或其抗原性片段的至少一个表位与所述第二抗原性蛋白质或其片段在免疫学上相同。

13. 权利要求 12 的疫苗组合,其中所述病毒载体选自腺病毒载体、痘病毒载体、腺伴随病毒载体、慢病毒载体、alpha 病毒载体、麻疹病毒载体、沙粒病毒载体、副粘病毒(paramixovirus) 载体、杆状病毒载体、裸 DNA 和病毒样颗粒。

14. 权利要求 13 的疫苗组合,其中所述腺病毒载体是非人的大型猿衍生的腺病毒载体,优选为黑猩猩或倭黑猩猩腺病毒载体。

15. 权利要求 12 至 14 中任一项的疫苗组合,其用于引发 - 加强疫苗接种方案。

16. 权利要求 15 的疫苗组合,其中所述痘病毒载体 (a) 用于引发所述免疫应答且 (b) 的所述病毒载体或抗原性蛋白质用于加强所述免疫应答。

17. 权利要求 15 的疫苗组合,其中 (a) 的所述病毒载体或抗原性蛋白质用于引发所述免疫应答且所述痘病毒载体 (b) 用于加强所述免疫应答。

18. 权利要求 16 或 17 的疫苗组合,其中所述免疫应答经由选自下组的施用路径引发:鼻内施用、肌内施用、皮下施用、皮内施用、胃内施用、口服施用和局部施用;且所述免疫应答经由选自下组的施用路径加强:鼻内施用、肌内施用、皮下施用、皮内施用、胃内施用、口服施用和局部施用。

19. 一种用于刺激免疫应答的方法,包括对受试者施用包含权利要求 1 的痘病毒载体的组合物。

20. 权利要求 19 的方法,其还包括施用:

(i) 载体,其包含编码至少第二抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列;

(ii) 第二抗原性蛋白质或其抗原性片段;和

病毒样颗粒。

改进的痘病毒疫苗

发明领域

[0001] 本申请涉及改进的痘病毒疫苗,其包含编码抗原性蛋白质和不变链的核酸构建体,以及用于这类痘病毒载体的新施用方案。具体地,公开了所述痘病毒载体用于引发或加强免疫应答的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 感染性疾病仍然是人类的主要威胁。预防或治疗感染性疾病的一种方法是通过疫苗接种人工诱导免疫应答,所述疫苗接种是向个体施用抗原性材料使得产生针对相应抗原的适应性免疫应答。抗原性材料可以是结构完整但灭活(即,非感染性)或减毒(即,感染性降低)的病原体(例如,微生物或病毒)或者已被发现具有高免疫原性的病原体之纯化组分。诱导针对病原体的免疫应答的另一方法是提供包含一种或多种编码病原体之免疫原性蛋白质或肽的载体的表达系统。这样的载体可以是裸质粒 DNA 形式,或者通过使用病毒载体(例如基于经修饰痘苗病毒(例如,经修饰痘苗安卡拉病毒(Modified Vaccinia Ankara);MVA))或腺病毒载体)来递送免疫原性蛋白质或肽。这样的表达系统的优点是包含良好表征的对环境条件具有低敏感性的组分。

[0004] 在开发基于载体的表达系统时,一个特定目的是向患者应用这些表达系统以引发防御由各病原体引起之感染的免疫应答。但是,虽然诱导了对抗病原体的免疫原性应答,一些表达系统不能引发足够强从而完全防御由病原体所致感染的免疫应答。因此,仍然需要能够诱导针对病原体的保护性免疫应答的改进的表达系统以及引发增强的免疫应答的已知表达系统的新施用方案。

[0005] 抗原是在抗原提呈细胞表面上通过 MHC 分子提呈的肽片段。抗原可以是外来的(即病原性)、起源于或来源于生物体本身,后者称为自身或自体抗原。有两类 MHC 分子,MHC I 类(MHC-I)和 MHC II 类(MHC-II)。MHC-I 分子提呈在相应细胞内合成的肽的片段。MHC-II 分子提呈肽的片段,其通过吞噬作用被摄取,随后在核内体中消化。通常,MHC-II 分子仅由“专门”抗原提呈细胞如巨噬细胞或树突细胞表达。结合 MHC-II 分子的抗原被 T 辅助细胞识别。T 辅助细胞的 T 细胞受体对由 MHC-II 分子提呈的抗原的结合,连同由抗原提呈细胞分泌的细胞因子,诱导 TH₀表型的未成熟 T 辅助细胞成熟为各种类型的效应细胞。

[0006] MHC-II 分子是膜结合受体,其在内质网中合成并离开 MHC II 类区室中的内质网。为了阻止内源性肽(即自身抗原)结合 MHC-II 分子,新生的 MHC-II 分子与堵塞 MHC-II 分子的肽结合裂缝的另一蛋白质不变链组合。当 MHC II 类区室融合至含有吞噬并降解的蛋白质的晚期核内体时,不变链被切割以仅留下结合 MHC-II 分子的 CLIP 区。在第二步中,CLIP 被 HLA-DM 分子移除,留下可自由结合外来抗原的片段的 MHC-II 分子。一旦 MHC II 类区室与质膜融合,所述片段就提呈在抗原提呈细胞的表面上,如此将外来抗原提呈给其他细胞,主要是 T 辅助细胞。

[0007] 之前已发现(WO 2007/062656,公开为 US 2011/0293704 且通过提述并入本文以公开不变链序列)不变链与包含在用于疫苗接种的表达系统中的抗原的融合增加针对所述抗原的免疫应答,如果其与腺病毒一起施用的话。而且,在引发(prime)-加强疫苗接种

方案的背景中,所述腺病毒构建体对于引发免疫应答证明是有用的(WO 2010/057501,公开为US 2010/0278904且通过提述并入本文以公开编码不变链序列的腺病毒载体)。本发明人惊讶地发现,如果不使用腺病毒而是将痘病毒用于投递不变链抗原融合物,甚至能增强针对给定抗原的免疫应答。以此方式可以生成免疫应答。尤其令人惊讶的是,当用于引发免疫应答时,痘病毒载体也引起该效果。

[0008] 发明概述

[0009] 在第一方面,本发明涉及用于引发或加强免疫应答的包含核酸构建体的痘病毒载体,所述核酸构建体包含:

[0010] (i) 编码至少一种抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列,所述核酸序列可操作地连接于

[0011] (ii) 编码至少一种不变链的核酸。

[0012] 在另一个方面,本发明涉及包含以下的疫苗组合:

[0013] (a) 包含核酸构建体的痘病毒载体,所述核酸构建体包含:

[0014] (i) 编码至少第一抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列,所述核酸序列可操作地连接于

[0015] (ii) 编码至少一种不变链的核酸,

[0016] 和

[0017] 病毒载体,其包含编码至少第二抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列,

[0018] 或

[0019] 第二抗原性蛋白质或其抗原性片段,

[0020] 其中所述第一抗原性蛋白质或其抗原性片段的至少一个表位与所述第二抗原性蛋白质或其片段在免疫学上相同。

[0021] 在又一个方面,本发明涉及上文所述的疫苗组合,其用于引发-加强疫苗接种方案。还提供使用这类痘病毒载体和组合的方法。

[0022] 发明详述

[0023] 除非另有限定,否则本文所使用的全部技术和科学术语的含义与本领域普通技术人员通常所理解的含义相同。

[0024] 例如,本文所使用的术语如“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”,Leuenberger, H. G. W, Nagel, B. 和 Kölbl, H. 编辑(1995),Helvetica Chimica Acta, CH-4010Basel, Switzerland中所述的定义。

[0025] 在本说明书和所附权利要求书通篇中,除非上下文另有需要,否则词语“包括”及其变化形式例如“包含”和“含有”应理解为意在囊括所指出整数或步骤或者整数组或步骤组,但是不排除任何其他整数或步骤或者整数组或步骤组。

[0026] 在本说明书通篇中引用了若干文献。本文所引用的每篇文献(包括全部专利、专利申请、科学出版物、制造商的说明书、说明等),无论在上文或下文中,均通过提述完整并入本文。凭借在先发明,本文中的任何内容都不应解释为承认本发明没有资格早于这些公开内容。本文中在本发明的一个方面的背景下提供的所有定义也适用于本发明的其他方面。

[0027] 本发明根本性的问题由权利要求和以下说明书中表征的实施方案解决。

[0028] 在第一个方面,本发明涉及用于引发或加强免疫应答的包含核酸构建体的痘病毒载体,所述核酸构建体包含:

[0029] (i) 编码至少一种抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列,所述核酸序列可操作地连接于

[0030] (ii) 编码至少一种不变链的核酸。

[0031] 如本文中使用的,术语“痘病毒载体”指天然存在的痘病毒科 (poxviridae) 的成员或自其衍生的病毒载体,其能将核酸构建体引入个体的细胞中。在本发明的背景中,涵盖当由痘病毒载体引入后,由引入的核酸构建体编码的抗原和不变链在所述细胞内表达。

[0032] 痘病毒科的特征在于由双链 DNA 组成的基因组。适宜地,痘病毒载体属于脊椎动物痘病毒亚科 (subfamily chordopoxvirinae),更优选属于选自下组的所述亚科中的属:正痘病毒 (orthopox)、副痘病毒 (parapox)、亚塔痘病毒 (yatapox)、禽痘病毒 (avipox) (优选金丝雀痘 (ALVAC) 或鸟痘 (fowlpox, FPV)) 和软疣痘 (molluscipox)。甚至更优选地,痘病毒载体属于正痘病毒且选自下组:痘苗 (vaccinia) 病毒、NYVAC (源自痘苗的哥本哈根毒株)、修饰的痘苗安卡拉 (MVA)、牛痘病毒和猴痘病毒。最优选地,所述痘病毒载体是 MVA。

[0033] 对 MVA 的描述可见于 Mayr A, Stickl H, Müller HK, Danner K, Singer H. “The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defense mechanism. “Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. ”Zentralbl Bakteriell B. 1978 Dec ;167 (5-6) :375-90 和 Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V. & Stickl, H. (1975). Infection 3, 6-14。

[0034] MVA 是痘苗病毒的高度减毒株,其在鸡胚胎成纤维细胞的超过 570 次传代期间经历了多次、完全表征的缺失。这些包括宿主范围基因和编码细胞因子受体的基因。该病毒不能在人和大多数其他哺乳动物细胞中有效复制,但复制缺陷发生在病毒粒体装配的后期阶段,从而病毒和重组基因表达并未受损,使得 MVA 成为不能在哺乳动物中引起感染的一种有效的单轮表达载体。

[0035] 在一个实施方案中, MVA 源自从在 CEF 细胞上痘苗病毒的第 571 次传代获得的病毒种批次 460MG。在另一个实施方案中, MVA 源自病毒种批次 MVA476MG/14/78。在又一个实施方案中, MVA 在 1978 年 12 月 31 前衍生或产生且没有朊病毒污染。

[0036] 供本发明使用的另外的痘病毒载体具有类似于 MVA 的特性。具体地,它们是感染性的,但在人中不能复制。由于这一性状,可能有必要反式表达蛋白质以复制。典型地,那些蛋白质在病毒生产者细胞系中稳定或瞬时表达,由此允许病毒的复制。

[0037] 术语“核酸”指从核苷酸单体制得的聚合大分子。核苷酸单体由核碱基、五碳糖 (如但不限于核糖或 2'-脱氧核糖) 和 1 至 3 个磷酸根基团构成。典型地,多核苷酸经由各个核苷酸单体之间的磷酸二酯键形成。在本发明的背景中,核酸分子包括但不限于核糖核酸 (RNA) 和脱氧核糖核酸 (DNA)。而且,术语“多核苷酸”还包括 DNA 或 RNA 的人工类似物,如肽核酸 (PNA)。

[0038] 术语“核酸构建体”指编码至少一个抗原性蛋白质和至少一个不变链的核酸。适宜地,所述核酸另外包含指导由所述核酸构建体编码的多肽的转录和翻译的元件。这类元件包括启动子和增强子元件以指导无细胞或基于细胞的系统,例如基于细胞的系统中 mRNA

的转录。适宜地,这类启动子和 / 或增强子是痘病毒载体的内源启动子和 / 或增强子。如果核酸构建体以可翻译 RNA 提供,则涵盖核酸构建体包含编码至少一个免疫原性多肽的 RNA 的翻译和 / 或稳定化必需的那些原件,例如聚 A 尾部、IRES、帽结构等。

[0039] 术语“基本相似”在关于核酸序列或氨基酸序列使用时指的是对相应指定的参照核苷酸或氨基酸序列的超过 80%,超过 85%,超过 90%,超过 95%,超过 98%或超过 99% 的序列同一性程度。

[0040] 两个或更多个多肽中的残基在下述情况下被称为彼此“对应”:该残基或残基组占据多肽结构中类似的一个或多个位置。如本领域中公知的,两个或更多个多肽中类似的位置可以通过基于氨基酸序列或结构相似性将多肽序列比对来确定。这类比对工具是本领域技术人员公知的且可以是,例如,在万维网上获得的,例如 ClustalW(www.ebi.ac.uk/clustalw) 或 Align(www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html),其使用标准设置,例如对于 Align 为 EMBOS::needle,矩阵:Blosum62,缺口开放 10.0,缺口延伸 0.5。本领域技术人员理解可能有必要在任一序列中引入缺口以产生满意的比对。残基在下述情况下被称为“对应”:该残基是在最佳序列比对中比对。两个多肽之间的“最佳序列比对”定义为产生比对的相同残基的最大数目的比对。如果两个比对序列之间的序列相似性或同一性在 10、20 或 30 个氨基酸的长度内降至低于 30%,低于 20%或低于 10%,那么为了测定相似性得分,“最佳序列比对区域”终止且由此确定比较序列的长度的边界和界限。

[0041] 如上文陈述的,涵盖本发明的载体是痘病毒载体。如此,如果所述痘病毒载体不能复制,则核酸构建体包含在更大的核酸分子内,该核酸分子另外包含病毒载体复制所需的核酸序列和 / 或指导由核酸构建体编码的多肽表达的调控元件。

[0042] 在本发明的一个实施方案中,抗原性蛋白或其抗原性片段和不变链由单个开放阅读框包含,从而使得所述开放阅读框的转录和翻译产生包含抗原性蛋白或其抗原性片段和不变链的融合蛋白

[0043] 术语“开放阅读框”(ORF)指可以被翻译为氨基酸的核苷酸序列。通常而言,这样的 ORF 包含起始密码子、长度通常为 3 个核苷酸倍数的后续区,但在给定阅读框中不包含终止密码子 (TAG、TAA、TGA、UAG、UAA 或 UGA)。通常而言,ORF 天然形成或者由人工构建(即,通过基因技术手段来实现)。ORF 编码蛋白质,其中其可以被翻译得到的氨基酸形成肽连接链。

[0044] 术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用,并且指氨基酸的任何肽连接链,无论长度、共翻译或翻译后修饰如何。

[0045] 本文所使用的术语“翻译后”指在核苷酸三联体翻译为氨基酸并且与序列中前一氨基酸形成肽键之后发生的事件。这样的翻译后事件可以在完整多肽形成之后发生或者在翻译过程中对已被翻译的多肽的那些部分发生。翻译后事件通常改变或修饰所得多肽的化学特性或结构特性。翻译后事件的实例包括但不限于例如氨基酸的糖基化或磷酸化或者肽链的切割(例如通过内肽酶来实现)等事件。

[0046] 本文所使用的术语“共翻译”指在核苷酸三联体翻译为氨基酸链的过程中发生的事件。那些事件通常改变或修饰所得氨基酸链的化学特性或结构特性。共翻译事件的实例包括但不限于可彻底终止翻译过程或者中断肽键形成从而产生两种离散的翻译产物的事件。

[0047] 可以通过化学修饰进一步修饰可用于本发明的蛋白质（包括蛋白质衍生物、蛋白质变体、蛋白质片段、蛋白质区段、蛋白质表位和蛋白质域）。因此，这样的经化学修饰的多肽可以包含除见于 20 种天然存在的氨基酸的残基以外的另一些化学基团。这样的另一些化学基团的实例包括但不限于糖基化氨基酸和磷酸化氨基酸。与亲本多肽相比，多肽的化学修饰可提供有利特性，例如提高的稳定性、增加的生物半衰期或提高的水溶性中的一种或更多种。适用于本发明可用之变体的化学修饰包括但不限于：PEG 化、非糖基化亲本多肽的糖基化或者对存在于亲本多肽中的糖基化模式的修饰。适用于本发明可用之变体的这些化学修饰可共翻译地发生或在翻译后发生。

[0048] 如本申请中所指的“抗原性蛋白”是如上文定义的多肽，其含有至少一个表位。抗原性蛋白的“抗原性片段”是所述抗原性蛋白的部分序列，其包含至少一个表位。对于免疫目的，仅蛋白的那些引发免疫应答的部分是有关的。因此，核酸构建体不需要编码如其见于病原体或癌细胞中的全长抗原性蛋白。这类蛋白质的缩短的片段也是充足的，只要其氨基酸序列包含负责抗原性蛋白被免疫系统识别的一个或多个表位。

[0049] 如本发明的背景中使用的，术语“表位”（也称为“抗原决定簇”）是被免疫系统识别的多肽的部分。适宜地，该识别由抗体、B 细胞或 T 细胞对所讨论的表位的结合介导。被抗体或 B 细胞结合的表位称为“B 细胞表位”而被 T 细胞结合的表位称为“T 细胞表位”。在此背景中，术语“结合”指特异性结合，其定义为抗体或 T 细胞受体 (TCR) 和相应表位之间 $1 \times 10^5 M^{-1}$ 或更高，或 $1 \times 10^6 M^{-1}$ ， $1 \times 10^7 M^{-1}$ ， $1 \times 10^8 M^{-1}$ 或更高的结合常数。技术人员完全知晓如何测定结合常数（参见例如 Caoili, S. E. (2012) *Advances in Bioinformatics* Vol. 2012）。适宜地，抗体对表位的特异性结合由抗体的 Fab（片段、抗原结合）区介导，B 细胞的特异性结合由 B 细胞受体包含的抗体 Fab 区介导，而 T 细胞的特异性结合由 T 细胞受体的可变 (V) 区介导。T 细胞表位呈递在抗原提呈细胞的表面上，其中它们结合于主要组织相容性 (MHC) 分子。至少有 3 个不同类的 MHC 分子，分别称为 MHC I、II 和 III 类分子。经由 MHC-I 途径提呈的表位通过细胞毒性 T 淋巴细胞 (CD8⁺ 细胞) 引发应答，而经由 MHC-II 途径提呈的表位通过 T 辅助细胞 (CD4⁺ 细胞) 引发应答。通过 MHC I 类分子提呈的 T 细胞表位通常是长为 8 至 11 个氨基酸的肽，而通过 MHC II 类分子提呈的 T 细胞表位通常是长为 13 至 17 个氨基酸的肽。MHC III 类分子还提呈作为糖脂的非肽表位。因此，术语“T 细胞表位”指 8 至 11 或 13 至 17 个氨基酸长的肽，其可由 MHC I 类或 MHC II 类分子提呈。

[0050] 表位通常由分子（例如氨基酸或糖侧链）的化学活性表面成组 (grouping) 组成，并且通常具有特定三维结构特征，以及特定电荷特征。术语“表位”指构象以及非构象表位。构象表位和非构象表位的区别在于在变性溶剂存在下丧失与前者而非后者的结合。T 细胞表位是非构象性的，即它们是线性的，而 B 细胞表位可以是构象或非构象性的。线性 B 细胞表位通常长度在 5 至 20 个氨基酸之间变化。

[0051] 依照本发明的抗原性蛋白衍生自选自下组的病原体：病毒、细菌、原生生物和多细胞寄生物。在本发明的一个备选的实施方案中，抗原性蛋白是癌细胞表达的多肽或多肽片段。

[0052] 抗原性蛋白或其抗原性片段诱导 B 细胞应答或 T 细胞应答，或者 B 细胞应答和 T 细胞应答。因此，抗原性蛋白或抗原性片段包含至少一个 T 细胞表位和 / 或至少一个 B 细胞表位。

[0053] 在本发明的某些例示性实施方案中,由载体编码的抗原性蛋白源自丙肝病毒(HCV)。HCV 基因组由长为约 9.5kb 的单 RNA 链组成,其编码约 3000 个氨基酸的前体多蛋白。(Choo 等.(1989)Science 244,362-364;Choo 等.(1989)Science 244,359-362;Takamizawa 等.(1991)J.Virol.65,1105-1113)。HCV 多蛋白按以下次序含有病毒蛋白质:C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B。个别的病毒蛋白质通过 HCV 多蛋白的蛋白水解产生。宿主细胞蛋白酶释放推定的结构蛋白 C, E1, E2 和 p7,并在氨基酸 810 处创建 NS2 的 N 末端(Mizushima 等.(1994)J.Virol.65,2731-2734;Hijikata 等.(1993)P. N. A. S. USA90, 10773-10777)。

[0054] 非结构性蛋白 NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B 推定地形成病毒复制机器(machinery)并从多蛋白释放。与 NS2 和 NS3 的 N 末端联合的锌依赖性蛋白酶负责 NS2 和 NS3 之间的切割。(Grakoui 等.(1993)J.Virol.67,1385-1395,Hijikata 等.(1993)P. N. A. S. USA 90, 10773-10777)。位于 NS3 的 N 末端域内的独特的丝氨酸蛋白酶负责 NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A 和 NS5A/NS5B 接合处的蛋白水解切割。(Bartenschlager 等.(1993)J.Virol.67,3835-3844;Grakoui 等.,(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90,10583-10587,Tomei 等.(1993)Viol.67,4017-4026)。NS4A 为 NS3 活性提供辅因子。(Failla 等.(1994)J.Virol.68,3753-3760;De Francesco 等,美国专利 No. 5,739,002.)。NS5A 是赋予干扰素抗性的高度磷酸化的蛋白质。(De Francesco 等.,(2000)Semin. Liver Dis.,20(1),69-83;Pawlotsky(1999)Viral Hepat. Suppl. 1,47-48)。NS5B 提供 RNA 依赖性 RNA 聚合酶。(De Francesco 等,International Publication Number W096/37619,Behrens 等,EMBO 15,12-22,1996,Lohmann 等.,Virology 249,108-118,1998)。

[0055] 在一个非限制性的例示性实施方案中,所述抗原性蛋白是 Met-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B 多肽,其含有非活性的 NS5B RNA 依赖性 RNA 聚合酶区。例如,所述抗原性蛋白具有与 SEQ ID NO:11 所限定的序列基本相似的氨基酸序列,且具有足够的蛋白酶活性以加工自身来产生至少一个与 SEQ ID NO:11 中存在的 NS5B 区基本相似的多肽。该抗原性蛋白的序列已公布在 WO 2003/031588 中,其公开为 US 2004/0247615 且通过提述并入本文用于披露 HCV 多肽。产生的对应于 NS5B 的多肽是无酶活性的。在一个进一步的实施方案中,所述 HCV 多肽具有足够的蛋白酶活性以产生基本类似于 SEQ ID NO:11 中存在的 NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B 区的多肽。

[0056] 在一个实施方案中,与依照 SEQ ID NO:11 的序列的序列同一性程度为与 SEQ ID NO:11 所限定的序列的超过 80%,超过 85%,超过 90%,超过 95%或超过 98%。然而,在一些实施方案中,所述抗原性蛋白的序列与 SEQ ID NO:11 限定的序列具有超过 99%的序列同一性或与其相同。

[0057] 术语“不变链”,也称为“li”或“CD74”,指非多态的 II 型整合膜蛋白。该蛋白在淋巴细胞成熟和适应性免疫反应中具有多种功能;具体地,li 确保新合成的 MCH II 靶向于内吞作用途径,其中该复合物能遇到抗原性肽。(Pieters J.(1997)Curr. Opin. Immunol.,9:8996)。另外,已显示 li 充当 MHC I 类分子伴侣(Morris 等.(2004)Immunol. Res.,30:171-179)且通过其核内体靶向性序列,促进对针对共价连接的抗原的 CD4⁺而非 CD8⁺T 细胞的刺激(Diebold 等.(2001)Gene Ther. 8:487-493)。

[0058] 对于人不不变链,已知 4 种不同的同等型(isoform),通常称为 p33, p35, p41 和

p43(Strubin 等., 1986, EMBO Journal, 5:3483 - 3488)。SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 对应于人不变链 p35 同等型的氨基酸序列和核酸序列。相对于人 p33 和 p41, 人 p35 和 p43 同等型由于翻译的备选启动在 N 末端含有额外的 16 个残基。相比于人 p33 和 p35, 人 p41 和 p43 同等型包含符合阅读框地插入不变链的 C 末端中的额外的域 (外显子 6b 的可变剪接)。SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 对应于人不变链 p43 同等型的氨基酸序列和核酸序列。相对于人 p33 和 p35 缺少两个外显子的另外的人同等型 c 的序列可在 Genbank (登录号 BC024272) 获得。SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 对应于人不变链 c 同等型的氨基酸序列和核酸序列。

[0059]

表1: 人不变链变体的概述

[0060]

同等型	N末端处的16 AA	额外的域	SEQ ID NO: (肽、核酸)
P33	-	-	-
P35	+	-	1, 2
P41	-	+	-
P43	+	+	5, 6
c	+	-	9,10

[0061] 对于鼠不变链, 仅已知对应于人不变链同等型 p33 和 p41 的两个同等型 (p31 和 p41)。SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 对应于鼠不变链 p31 同等型的氨基酸序列和核酸序列。SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8 对应于鼠不变链 p41 同等型的氨基酸序列和核酸序列。对不同同等型的示意性概述显示于图 4。

[0062] 在一个实施方案中, 用于本发明的不变链与依照 SEQ ID NO:1 或 3 的不变链基本相似。

[0063] 所述不变链包含几个域: 人不变链 p35 和 p43 变体中前有 ER 保留信号 (人不变链 SEQ ID NO:1 中的位置 1 至 16) 的包含分选 (靶向性) 肽 (也称为溶酶体靶向性序列) 的胞质 (cytosolic) 域 (人不变链 SEQ ID NO:1 中的位置 17 至 46, 鼠不变链 SEQ ID NO:3 中的位置 1 至 29)、跨膜域 (信号锚, 人不变链 SEQ ID NO:1 中的位置 47 至 72, 鼠不变链 SEQ ID NO:3 中的位置 30 至 55)、和自身包含 KEY 区的腔 (luminal) 域 (人不变链 SEQ ID NO:1 中的位置 93 至 96, 鼠不变链 SEQ ID NO:3 中的位置 76 至 79)、临近的 CLIP 区 (人不变链 SEQ ID NO:1 中的位置 97 至 120, 鼠不变链 SEQ ID NO:3 中的位置 80 至 103)。CLIP 区包含核心 CLIP 肽 (人不变链 SEQ ID NO:1 中的位置 103 至 117, 鼠不变链 SEQ ID NO:3 中的位置 86 至 100) 和三聚化域 (人不变链 SEQ ID NO:1 中的位置 134 至 208, 鼠不变链 SEQ ID NO:3 中的位置 117 至 191; Mittendorf 等., (2009) Expert Opin. Biol. Ther., 9:71-78; Strumptner-Cuvelette 和 Benaroch, 2002, Biochem. Biophys. Acta, 1542:1-13)。腔域的剩余部分包含位于跨膜和 KEY 区之间 (人不变链 SEQ ID NO:1 中的位置 73 至 92, 鼠不变链 SEQ ID NO:3 中的位置 56 至 75) 或三聚化域下游 (人不变链 SEQ ID NO:1 中的位置 209 至

232, 鼠不变链 SEQ ID NO:3 中的位置 192 至 215) 的两个高度柔性的区域。已在几种生物体如鸡、牛 (cow)、犬、小鼠、大鼠和人中表征了不变链。

[0064] 在一个实施方案中, 不变链具有脊椎动物起源、禽类或哺乳动物起源, 或者进一步地, 其选自下组: 源自鸡、牛、犬、小鼠、大鼠、非人灵长类和人的不变链。在一个进一步的实施方案中, 其具有人或鼠起源, 例如该人不变链具有由 SEQ ID NO:1 限定的氨基酸序列。所述多肽在一个实施方案中由如 SEQ ID NO:2 中给出的核酸序列编码。在另一个实施方案中, 鼠不变链具有如 SEQ ID NO:3 限定的氨基酸序列。所述多肽在一个实施方案中由如 SEQ ID NO:4 中给出的核酸序列编码。

[0065] 术语“不变链”还包括上述多肽的变体, 其特征在于是天然存在的不变链或基本类似于天然存在的不变链的不变链的部分氨基酸序列的缺失或其被其他序列取代。例示性的变体在下文给出。

[0066] 在不变链的一个具体的变体中, 由 LRMK 氨基酸残基组成的内源性 KEY 区缺失或被不同的氨基酸序列取代。例如, LRMK 氨基酸残基或对应残基缺失。LRMK 氨基酸残基的缺失可以是完全的 (涉及所有 LRMK 氨基酸残基) 或部分的 (涉及至少一个 LRMK 氨基酸残基)。涵盖所有 LRMK 氨基酸残基的完全缺失。另外, 至少一个或所有的 LRMK 氨基酸残基被不同的氨基酸残基取代。

[0067] 在又一个例示性变体中, 依照 SEQ ID NO:1 的人不变链的位置 107 和 115 中的甲硫氨酸或依照 SEQ ID NO:3 的鼠不变链的位置 90 和 98 中的甲硫氨酸或其他不变链中对应于这些位置中的甲硫氨酸被其他氨基酸取代。适宜地, 甲硫氨酸被取代。

[0068] 在再一个例示性变体中, 所述不变链是 N 末端截短的, 例如达到使得从直到跨膜区为止的 N 端被除去的程度。因此, 在一个进一步的实施方案中, 依照 Seq ID NO:1 的不变链的 N 末端的 46 个氨基酸或更少被截短, 41 个氨基酸或更少被截短或 36 个氨基酸或更少被截短。因此, 还涵盖对于依照 Seq ID NO:3 的不变链, N 末端的 30 个氨基酸或更少被截短, 25 个氨基酸或更少被截短, 或 20 个氨基酸或更少被截短。对于依照 SEQ ID NO:1 的不变链的一个实施方案, 人不变链的头 16 个氨基酸残基缺失。还可以头 16 氨基酸残基中至少一个而并非所有缺失。此外, 可以是人不变链 (SEQ ID NO:1) 的头 16 个氨基酸残基中至少一个或所有被其他氨基酸残基取代。

[0069] 在再一个变体中, 将用于在内质网的腔中表达的至少一个信号肽添加至不变链的 N 末端, 例如添加至由于 N 末端截短而缺少跨膜区的不变链的 N 末端截短型。

[0070] 在不变链的又一个变体中, 将至少一个 CLIP 区添加至或替换相应不变链的内源性 CLIP 区。在依照 SEQ ID NO:1 的人不变链中, CLIP 区跨越位置 97 至 120, 而在依照 SEQ ID NO 3 的鼠不变链中, 其跨越位置 80 至 103。如此, 技术人员能容易地确定对应于依照 SEQ ID NO:1 和 3 的不变链中 CLIP 区的氨基酸残基。在又一个实施方案中, 完整的内源性 CLIP 区缺失或被替换。然而, 还涵盖属于内源性 CLIP 区的至少一个氨基酸残基的缺失或替换。

[0071] 术语“不变链”还指上文描述的不变链及其变体的片段, 例如具有依照 SEQ ID NO:1 或 3 的氨基酸序列或由依照 SEQ ID NO:2 或 4 的核酸序列编码的不变链。应理解由于遗传密码的简并性质, 一种氨基酸可由超过一种密码子编码。例如, 氨基酸异亮氨酸可由密码子 AUU, AUC 或 AUA 编码。因此, 本发明还涵盖编码由 SEQ ID NO:1 或 3 限定的氨基酸序列的前述核酸序列的所有变体, 不管具体的核酸序列如何。由于不同的生物体以不同效率利

用不同密码子,使核苷酸序列中的密码子选择适应于意图的宿主生物体可能是有利的。在一个实施方案中,片段是如上文限定的野生型不变链或其变体的至少 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 或 210 个氨基酸残基的片段。

[0072] 而且,术语“不变链”指与上文描述的野生型不变链、其变体或片段中的任一种具有至少 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8% 或 99.9% 序列同一性的多肽。用于测定两个不同多肽之间的序列同一性的方法是本领域公知的。可以通过序列比对来确定核苷酸和氨基酸序列的相似度(即,序列同一性百分比)。可以使用本领域已知的若干算法来进行这样的比对,例如使用 Karlin 和 Altschul 的数学算法(Karlin&Altschul(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877)、使用 hmalign(HMMER 程序包,<http://hmmer.wustl.edu/>) 或者使用 CLUSTAL 算法(Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4673-80), 其可在例如 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/> 或 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> 或 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html 得到。优选使用的参数是默认参数,与它们设置在 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/> 或 <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> 上一样。可以使用例如 BLAST、BLAT 或 BlastZ(或 BlastX) 来计算序列同一性(序列匹配)的级别。类似的算法被并入 Altschul 等(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 的 BLASTN 和 BLASTP 程序中。

[0073] 为了得到缺口比对(gapped alignment)以用于比较目的,如 Altschul 等(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 中所述使用缺口 BLAST。当使用 BLAST 和缺口 BLAST 程序时,使用各程序的默认参数。可以用已建立的同源性作图技术例如 Shuffle-LAGAN(Brudno M., Bioinformatics 2003b, 19 Suppl 1: I54-I62) 或马尔科夫随机场(Markov random field)来补充序列匹配分析。在本申请中提及序列同一性百分比时,如果未特别另外指明,则相对于较长序列的全长来计算这些百分比。

[0074] 术语“引发免疫应答”指免疫系统第一次与至少一种抗原性蛋白或其抗原性片段相遇和随后在限定的时间段内诱导抗原特异性的免疫应答。所述时间段为引发前例如,至少 1 年、至少 2 年、至少 3 年、至少 5 年或至少 10 年。在一个实施方案中,个体或受试者的免疫系统与抗原性蛋白或其抗原性片段的不诱导抗原特异性免疫应答的相遇不视为“引发免疫应答”。例如,个体的免疫系统与抗原性蛋白或其抗原性片段的不诱导持久免疫的相遇依照本发明不视为“引发免疫应答”。在又一个实施方案中,持久免疫的诱导由记忆 B 细胞和/或记忆 T 细胞的生成介导。在癌症的情况中,例如,特定的抗原可由癌细胞表达而不引发免疫应答。仅存在该抗原不是本申请所理解的针对所述抗原“引发免疫应答”。在一个实施方案中,个体或受试者尚未有意用抗原性蛋白或其抗原性片段或包含编码这类蛋白质或片段的核酸的载体进行免疫以在前文给定的时间段内治疗或预防疾病。

[0075] 然而,术语“引发免疫应答”指个体与天然包含所述抗原性蛋白或其抗原性片段的病原体的任何在前的接触,只要所述接触不是人为诱导用于医学目的的。具体地,本申请涵盖所述个体可能已经感染有前述病原体,只要所述感染不是人为诱导用于医学目的的。当发生引发免疫应答时,个体的感染可能仍存在或其已被消除。类似地,在癌症的情况中,涵盖要用本发明的痘病毒载体免疫的个体或受试者已患有表达由本发明的核酸构建体包含

的抗原性蛋白或其抗原性片段的癌症。

[0076] 要用依照本发明的痘病毒载体免疫的患者或受试者是,例如哺乳动物或鸟类,更具体地是灵长类、小鼠、大鼠、绵羊、山羊、牛、猪、马、鹅、鸡、鸭或火鸡,且最特定地,是人。

[0077] 包含如上文限定的核酸构建体的痘病毒载体例如用于引发-加强疫苗接种方案中。

[0078] 在许多情况中,疫苗的单次施用不足以生成在未来感染所讨论的病原体的情况中有效保护所需的持久作用的免疫细胞数,针对包括肿瘤疾病在内的疾病提供保护或治疗性处理某疾病,如肿瘤疾病。因此,需要用特异于特定病原体或疾病的生物制剂进行重复激发(challenge)以建立针对所述病原体或疾病的持久和保护性免疫或治愈给定疾病。包含针对同一病原体或疾病的疫苗的重复施用的施用方案在本申请中称为“引发-加强疫苗接种方案”。在一个实施方案中,引发-加强疫苗接种方案涉及针对特定病原体、病原体组或疾病组的疫苗或疫苗组合物的至少两次施用。疫苗的第一次施用称为“引发”,而同一疫苗或与第一种疫苗一样针对相同的病原体的疫苗的任何后续施用称为“加强”。如此,在本发明的一个进一步的实施方案中,引发-加强疫苗接种方案涉及疫苗的一次施用以用于引发免疫应答和至少一次后续施用以用于加强该免疫应答。应理解本发明还涵盖用于加强免疫应答的2,3,4或甚至5次施用。

[0079] 引发和加强之间的时间段为任选地1周、2周、4周、6周或8周。更具体地,其为4周或8周。如果实施超过一次加强,则在在前加强后1周、2周、4周、6周或8周施用后续加强。例如,任意两次加强之间的时间间隔为4周或8周。

[0080] 引发-加强疫苗接种方案可以是同质或异质的。在同质引发-加强方案中,引发和至少一次加强这两者使用抗原性蛋白或其抗原性片段的相同施用手段进行,即引发和加强使用多肽进行或引发和加强使用由相同载体包含的核酸构建体进行。在本发明的背景中,同质引发-加强疫苗接种方案将包含将本发明的痘病毒载体用于引发以及用于加强免疫应答两者。异质引发-加强方案涉及将不同手段用于引发和加强免疫应答。在本发明的背景中,异质引发-加强方案将包含将如上文描述的痘病毒载体用于引发免疫应答,而将不同的载体或肽疫苗用于加强免疫应答。

[0081] 或者,异质引发-加强方案将包含将不同的载体或肽疫苗用于引发免疫应答,而将如上文描述的痘病毒载体用于加强免疫应答。

[0082] 在本发明的一个实施方案中,所述引发-加强疫苗接种方案是同质的。

[0083] 在本发明的另一个实施方案中,所述引发-加强疫苗接种方案是异质的。

[0084] 在一个异质引发-加强方案中,将如上文描述的痘病毒载体用于加强免疫应答,而将不同的载体或肽疫苗用于引发免疫应答。在另一个异质引发-加强方案的实施方案中,将如上文描述的痘病毒载体用于引发免疫应答,而将不同的载体或肽疫苗用于加强免疫应答。

[0085] 在另一个实施方案中,异质引发-加强方案将包含将腺病毒载体用于引发免疫应答,而将如上文描述的痘病毒载体用于加强免疫应答。

[0086] 在又一个实施方案中,异质引发-加强方案将包含将如上文描述的痘病毒载体用于引发免疫应答,而将腺病毒载体用于加强免疫应答。

[0087] 对于所有引发-加强疫苗接种方案,涵盖用于加强免疫应答的抗原性蛋白或抗原

性肽与用于引发免疫应答的抗原性蛋白或其抗原性片段是免疫学相同的。应理解抗原性蛋白或其抗原性片段可作为多肽（“肽疫苗”）施用或者其可以由施用给所论述个体的核酸分子编码。在后一情况中，引发期望的免疫应答的抗原性蛋白或抗原性多肽在经免疫个体的细胞中表达。

[0088] 如果两种或更多种抗原性蛋白或其抗原性片段被相同的抗体、T 细胞或 B 细胞识别，则它们是“免疫学相同的”。两种或更多种免疫原性多肽被相同的抗体、T 细胞或 B 细胞识别也称为所述抗体、T 细胞或 B 细胞的“交叉反应性”。在一个实施方案中，两种或更多种免疫学相同的多肽被相同的抗体、T 细胞或 B 细胞识别的原因是相同或相似的表位在所有多肽中的存在。相似的表位共享足够的结构和 / 或电荷特征以被相同抗体的 Fab 区或 B 细胞受体或被相同 T 细胞受体的 V 区结合。抗体、T 细胞受体或 B 细胞受体的结合特征例如是由受体对所论述表位的结合亲和力限定的。如通过本申请理解，两种免疫原性多肽在下述情况下是“免疫学相同的”：具有较低亲和常数的多肽的亲和常数是具有较高亲和常数的多肽的亲和力的至少 30%，至少 40%，至少 50%，至少 60%，至少 70%，至少 80%，至少 90%，至少 95% 或至少 98%。用于测定多肽对受体的结合亲和力的方法如平衡透析或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 是本领域中公知的。

[0089] 在一个实施方案中，两种或更多种“免疫学相同的”多肽包含至少一个相同的表位。如果免疫原性多肽包含相同的表位或者如果它们具有相同的氨基酸序列，则通常可以获得最强的疫苗接种效果。

[0090] 在一个实施方案中，将如上文描述的痘病毒载体用于引发免疫应答将建立针对病原体或疾病的保护性免疫或将导致疾病的根治。

[0091] 在一个实施方案中，所述痘病毒载体经由鼻内、肌内、皮下、皮内、胃内、口服和局部 (topical) 路径施用。

[0092] “鼻内施用”是将本发明的载体施用至包括肺在内的全部呼吸道的粘膜。更具体地，将组合物施用至鼻粘膜。在一个实施方案中，鼻内施用通过滴注 (instillation)、喷雾或气溶胶实现。在另一个实施方案中，所述施用不涉及通过机械手段（如针）对粘膜穿孔。

[0093] 术语“肌内施用”指将载体注射到个体的任意肌肉中。例示性的肌内注射是施用到三角肌、股外肌、腹臀肌 (ventrogluteal) 和背臀肌 (dorsogluteal) 区域中。

[0094] 术语“皮下施用”指将载体注射到皮下中。

[0095] 术语“皮内施用”指将载体注射到皮肤层间的真皮中。

[0096] 术语“口服施用”指经由口将载体施用至胃系统。

[0097] “局部施用”是将载体施用至皮肤的任意部分而不用针或相当的装置穿透皮肤。载体还可以局部施用至口、鼻、生殖区和直肠的粘膜。

[0098] 在另一个方面，本发明涉及包含以下的疫苗组合：

[0099] (a) 包含核酸构建体的痘病毒载体，所述核酸构建体包含：

[0100] (i) 编码至少第一抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列，所述核酸序列可操作地连接于

[0101] (ii) 编码至少一种不变链的核酸

[0102] 和

[0103] (b) 载体，其包含编码至少第二抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列

[0104] 或

[0105] 第二抗原性蛋白质或其抗原性片段

[0106] 或

[0107] 病毒样颗粒,

[0108] 其中所述第一抗原性蛋白质或其抗原性片段的至少一个表位与所述第二抗原性蛋白质或其片段在免疫学上相同。

[0109] 术语“疫苗”指诱导或改进对特定疾病的免疫的生物制剂。所述制剂可以包含杀死的或减毒的活病原体。它还可以包含适用于引发免疫应答的源自病原体的一种或多种化合物。在一个实施方案中,所述化合物是与所述病原体的多肽基本相同或免疫学相同的多肽。在另一个实施方案中,疫苗包含编码与所述病原体的多肽基本相同或免疫学相同的免疫原性多肽的核酸构建体。在后一情况中,还涵盖所述多肽在用疫苗治疗的个体中表达。疫苗接种根本性的原理是生成免疫“记忆”。用疫苗激发个体的免疫系统诱导免疫细胞的形成和/或增殖,该免疫细胞特异性识别由疫苗包含的化合物。所述免疫细胞的至少一部分保持存活一段时间,其可以延长至疫苗接种后 10, 20 或 30 年。如果个体的免疫系统在所述时间段内遇到衍生能引发免疫应答的化合物的病原体,那么通过疫苗接种生成的免疫细胞被再活化,且相比于尚未用疫苗激发和首次遇到病原体的免疫原性化合物的个体的免疫应答,增强针对该病原体的免疫应答。

[0110] 如本文中使用的,术语“载体”指能够将包含于其中的多核苷酸引入细胞的至少一种多核苷酸或至少一种多核苷酸和至少一种蛋白质的混合物。而且,术语“载体”还可以指与脂质体或脂质纳米颗粒的制备物一起配制的至少一种多核苷酸,所述制备物能与至少一种多核苷酸一起转染细胞,如例如由 Geall 等, 2012, PNAS, 109:14604-14609 描述的。

[0111] 由载体包含的至少一种多核苷酸组成为 (consist of) 或包含编码至少一种免疫原性蛋白质的至少一种核酸构建体。除了组成为或包含本发明的核酸构建体的多核苷酸以外,可将另外的多核苷酸和/或多肽引入细胞。如果需要另外的多核苷酸和/或多肽来将本发明的核酸构建体引入细胞或如果另外的多核苷酸和/或多肽的引入提高由本发明的核酸构建体编码的免疫原性多肽的表达,则还涵盖添加所述另外的多核苷酸和/或多肽。

[0112] 在本发明的背景中,涵盖由引入的核酸构建体编码的抗原性蛋白或其抗原性片段在引入一种或多种载体时在细胞中表达。适宜的载体的例子包括但不限于质粒、粘粒、噬菌体、病毒载体、脂质纳米颗粒或人工染色体。

[0113] 在本发明的一个实施方案中,病毒载体选自下组:腺病毒载体、腺伴随病毒 (AAV) 载体 (例如,5 型 AAV 和 2 型 AAV)、alpha 病毒载体 (例如,委内瑞拉马脑炎病毒 (VEE)、辛德毕斯 (sindbis) 病毒 (SIN)、森林脑炎病毒 (semliki forest virus, SFV) 和 VEE-SIN 嵌合体)、疱疹病毒载体 (例如,源自巨细胞病毒例如恒河猴巨细胞病毒 (RhCMV) 的载体)、沙粒病毒 (arena virus) 载体 (例如,淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 载体)、麻疹病毒载体、痘病毒载体、副粘病毒 (paramixovirus, paramyxovirus) 载体、杆状病毒载体、水泡性口炎 (vesicular stomatitis) 病毒载体、逆转录病毒、慢病毒、病毒样颗粒和细菌孢子 (bacterial spores)。

[0114] 在一个进一步的实施方案中,载体是腺病毒载体,特别是源自人或非人大型猿 (great ape) 的腺病毒载体。衍生腺病毒的例示性大型猿是黑猩猩 (Chimpanzee) (Pan)、

大猩猩 (Gorilla) 和 orangutans (Pongo), 例如倭黑猩猩 (Bonobo) (Pan paniscus) 和普通 (common) 黑猩猩 (Pan troglodytes)。典型地, 天然存在的非人类大型猿腺病毒分离自相应的大型猿的粪样品。具体地, 载体是基于 hAd5, hAd11, hAd26, hAd35, hAd49, ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd55, ChAd63, ChAd73, ChAd82, ChAd83, ChAd146, ChAd147, PanAd1, PanAd2 和 PanAd3 载体的非复制性腺病毒载体或能复制的 Ad4 和 Ad7 载体。人腺病毒 hAd4, hAd5, hAd7, hAd11, hAd26, hAd35 和 hAd49 是本领域中公知的。基于天然存在的 ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd63 和 ChAd82 的载体在 WO 2005/071093 中详细描述, 其公开为 US 20110217332 且通过提述将其中描述的腺病毒载体并入本文。基于天然存在的 PanAd1, PanAd2, PanAd3, ChAd55, ChAd73, ChAd83, ChAd146 和 ChAd147 的载体在 WO 2010/086189 中更详细描述, 其公开为 US20120027788 且通过提述将其中描述的腺病毒载体并入本文。

[0115] 在另一个实施方案中, 所述第二抗原性蛋白或其抗原性片段与痘病毒载体所包含的核酸构建体编码的抗原性蛋白或其抗原性片段在免疫学上相同。

[0116] 在本发明的另一个实施方案中, 载体以裸 DNA 存在。术语“裸 DNA”指任何核酸分子、DNA 或 RNA, 其不编码病毒载体的蛋白质但编码至少一种抗原性蛋白或其片段。涵盖裸 DNA 不与任何多肽, 特别是不与具有病毒起源的多肽联合。例如, 裸 DNA 以质粒、粘粒或人工染色体存在。在另一个实施方案中, 裸 DNA 编码与痘病毒载体所包含的核酸构建体编码的抗原性蛋白或其抗原性片段在免疫学上相同的多肽。

[0117] 术语“病毒样颗粒”(VLP) 指包含病毒蛋白但不包含核酸的装配物。VLP 可通过在适宜的生产者细胞系中表达病毒表面蛋白产生。缺少核酸和由此的遗传信息使得 VLP 是非感染性的, 由此创建了安全的疫苗。例如, VLP 包含与痘病毒载体所包含的核酸构建体编码的抗原性蛋白或其抗原性片段在免疫学上相同的多肽。

[0118] 在本发明的某个实施方案中, 上文描述的疫苗组合用于引发 - 加强疫苗接种方案。在该引发 - 加强疫苗接种方案的第一实施方案中, 痘病毒载体用于引发免疫应答, 而病毒载体或抗原性蛋白或其抗原性片段用于加强该免疫应答。在引发 - 加强疫苗接种方案的另一个实施方案中, 病毒载体或抗原性蛋白或其抗原性片段用于引发免疫应答, 而痘病毒载体用于加强该免疫应答。

[0119] 在本发明的一个实施方案中,

[0120] 免疫应答通过鼻内施用引发且该免疫应答通过至少一次肌内施用加强;

[0121] 免疫应答通过鼻内施用引发且该免疫应答通过至少一次皮下施用加强;

[0122] 免疫应答通过鼻内施用引发且该免疫应答通过至少一次皮内施用加强;

[0123] 免疫应答通过鼻内施用引发且该免疫应答通过至少一次胃内施用加强;

[0124] 免疫应答通过鼻内施用引发且该免疫应答通过至少一次口服施用加强;

[0125] 免疫应答通过鼻内施用引发且该免疫应答通过至少一次局部施用加强;

[0126] 免疫应答通过鼻内施用引发且该免疫应答通过至少一次鼻内施用加强;

[0127] 免疫应答通过肌内施用引发且该免疫应答通过至少一次肌内施用加强;

[0128] 免疫应答通过肌内施用引发且该免疫应答通过至少一次皮下施用加强;

- [illegible]

[0168] 免疫应答通过局部施用引发且该免疫应答通过至少一次鼻内施用加强。

[0169] 在一个实施方案中,免疫应答通过鼻内施用引发且该免疫应答通过至少一次肌肉施用加强。

[0170] 在再一个实施方案中,免疫应答通过鼻内施用引发且该免疫应答通过至少一次鼻内施用加强。

[0171] 在又一个实施方案中,免疫应答通过肌肉施用引发且该免疫应答通过至少一次肌肉施用加强。

[0172] 在另一个方面,本发明涉及包含如上文描述的用于引发免疫应答的痘病毒载体的疫苗组合物或包含痘病毒载体和选自下组的药剂的疫苗组合:(i) 包含编码至少第二抗原性蛋白质或其抗原性片段的核酸序列的载体;(ii) 第二抗原性蛋白或其抗原性片段,和(iii) 病毒样颗粒。

[0173] 术语“组合物”指一种组合,其包含抗原性蛋白或其片段或包含核酸构建体的病毒样颗粒或载体,以及至少一种选自下组的另外的化合物:药学可接受的载体、药学赋形剂和佐剂。

[0174] “药学可接受的”意指经联邦政府或州政府的管控机构批准或者列于美国药典或其它一般认可的用于动物、更特别地用于人的药典中。

[0175] 本文所使用的术语“载体”指在药理上无活性的物质,例如但不限于与治疗活性成分一起施用的稀释剂、赋形剂或媒介物。这样的药物载体可以是液体或固体。液体载体包括但不限于无菌液体,例如盐水溶液和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。还可以将盐水溶液和水性右旋糖以及甘油溶液用作液体载体,特别是用于注射用溶液。当静脉内或利用雾化器鼻内施用药物组合物时,优选的载体是盐水溶液。

[0176] 合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米(rice)、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、干脱脂乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。

[0177] 合适的药物载体的实例描述于 E. W. Martin 的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中。

[0178] 术语“佐剂”指在细胞水平或体液水平增加、刺激、活化、加强或调节针对组合物之活性成分的免疫应答的试剂,例如,免疫佐剂刺激免疫系统针对实际抗原的应答但其本身没有免疫效应。这样的佐剂的实例包括但不限于无机佐剂(例如,无机金属盐例如磷酸铝或氢氧化铝)、有机佐剂(例如,皂角苷或鲨烯)、油基佐剂(如弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂)、细胞因子(如 IL-1 β 、IL-2、IL-7、IL-12、IL-18、GM-CSF 和 INF- γ)、颗粒状佐剂(例如,免疫刺激性复合物(ISCMS)、脂质体或可生物降解的微球)、病毒颗粒、细菌佐剂(例如单磷酸脂质 A 或胞壁肽)、合成佐剂(例如,非离子型嵌段共聚物、胞壁肽类似物或合成脂质 A)或合成多核苷酸佐剂(例如,多聚精氨酸或多聚赖氨酸)。

[0179] 附图简述

[0180] 图 1: 编码不变链(1i)-NS 抗原的 MVA 在小鼠中诱导更强的 T 细胞应答。将两组小鼠用 2×10^5 噬斑形成单位(pfu)的包含 NS 抗原的 MVA 免疫(左图)和用包含连接不变链的 NS 的 MVA 免疫(右图)。通过 IFN γ ELISpot 测量对 NS 抗原的总 T 细胞应答且 y 轴上

的数目代表点形成细胞 (SFC) / 百万脾细胞。

[0181] 图 2: 编码不变链 (Ii)-NS 抗原的 MVA 比相应腺病毒在小鼠中诱导更强的 T 细胞应答。将两组小鼠用编码 NS (MVA wt) 或连接于人不变链的 NS (MVA Ii) 的 MVA 免疫。将两个另外的小鼠组用可比剂量的编码 NS (ChAd3wt) 或连接于人不变链的 NS (ChAd3 Ii) 的 ChAd3 免疫。通过 IFN γ ELISpot 测量对 NS 抗原的总 T 细胞应答且 y 轴上的数目代表点形成细胞 (SFC) / 百万脾细胞。

[0182] 图 3: 用包含连接于不变链的 NS 的 MVA 加强增加猕猴 (macaque) 中 HCV-NS 特异性 T 细胞的生成。

[0183] 将 4 只猕猴的两组用 ChAd3 Ii NS 引发, 且在 50 周后用 MVA-NS (灰色条) 或用 MVA-Ii NS (黑色条) 加强。图 A 显示加强后 1 周 (峰加强) 或 3 个月 (记忆) 的通过 IFN γ ELISpot 测得的应答。y 轴上的数目代表点形成细胞 (SFC) / 百万 PBMC。B 图显示使用 MVA Ii NS (黑色条) 加强后 1 周的通过 IFN γ ICS 测得的更高的 CD8 频率。Y 轴上的数目代表产生 IFN γ 的抗原特异性 CD8T 细胞的 %。

[0184] 图 4: 显示人不变链的 4 种同等型 (p33、p35、p41、p43、同等型 c) 和鼠不变链的 2 种同等型 (p31、p41) 的示意图。在人 p35 和 p43 中由于备选的翻译启动, N 末端存在额外的 16 个残基。在人 p41 和 p43 同等型和鼠 p41 同等型中, 由于可变剪接存在额外的域。人 c 同等型相对于人 p33 和 p35 缺少两个外显子 (相对于人 p41 和 p43 为 3 个外显子), 导致移码。

实施例

[0185] 实施例 1: 用包含连接于不变链的 NS 的 MVA (MVA-h Ii NS) 引发增加了小鼠中 HCV-NS 特异性 T 细胞的生成。

[0186] 将两组 Balb/c 小鼠用 2×10^5 pfu (噬斑形成单位) 的编码 NS 的 MVA 或相同剂量的包含连接于人不变链的 NS 的 MVA 肌肉免疫。NS 区涵盖 HCV 基因组的约 2/3 且编码 5 种不同的蛋白质 (NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B), 所述蛋白质来源于通过编码的 NS3 蛋白酶对 HCV 多蛋白的蛋白水解性切割。在免疫后 10 天, 收集脾细胞, 并通过 IFN γ ELISpot 使用跨越 NS 的肽的合并物 (pool) 评估 HCV-NS 特异性 T 细胞应答。通过对针对 6 种个别的肽合并物的反应性求和并减去背景 (在无肽的对照孔中计数的点) 来评估应答。靶向 NS 的特异性 T 细胞的水平在用基于 Ii 的 MVA 疫苗引发的小鼠中更高 (图 1)。

[0187] 实施例 2: 用包含连接于不变链的 NS 的 MVA (MVA-h Ii NS) 引发比相应的腺病毒载体在小鼠中诱导更强的 T 细胞应答。

[0188] 将两组 Balb/c 小鼠用 2×10^5 pfu 的编码 NS 的 MVA 或相同剂量的包含连接于人不变链的 NS 的 MVA 肌肉免疫。将两个另外的小鼠组用 2×10^5 iu (感染单位) 的编码 NS 的 ChAd3 或相同剂量的包含连接于人不变链的 NS 的 ChAd3 免疫。在以 MVA 和 ChAd3 为载体的疫苗免疫后分别为 10 天和 21 天时收集的脾细胞上评估峰免疫应答。通过 IFN γ ELISpot 使用跨越 NS 的肽合并物评估 T 细胞应答。结果 (图 2) 显示基于 Ii 的 MVA 疫苗比相应的基于 Ii 的 ChAd3 疫苗诱导更高的应答。

[0189] 实施例 3: 用包含连接于不变链的 NS 的 MVA (MVA-h Ii NS) 加强增加了猕猴中 HCV-NS 特异性 T 细胞的生成。

[0190] 将 4 只猕猴的两组用 ChAd3IiNS 引发,且在 50 周后用 MVA-NS(灰色条)或用 MVA-IiNS(黑色条)加强。注射的剂量对于腺病毒载体为 1×10^{10} vp,而对于 MVA 载体为 2×10^8 pfu。在引发后 1 周(峰应答)和 3 个月(记忆应答)时收集的 PBMC 上通过 IFN γ ELISpot 和 IFN γ 胞内染色(ICS)使用跨越 NS 的肽合并物评估免疫应答。如图 3 中显示的,在两个时间点都接受 MVAIiNS(黑色条)的组中诱导更高的 ELISpot 应答。图 A 显示加强后 1 周或 3 个月时的通过 IFN γ ELISpot 测得的应答。B 图显示使用 MVAIiNS(黑色条)加强后 1 周时通过 ICS 测得的更高的产生 IFN γ 的 CD8T 细胞频率。

[0191] 材料和方法

[0192] 腺病毒和 MVA 载体

[0193] 先前已描述了来自株 bk 基因型 1b 的表达完整 HCV NS3-5B(NS) 区的 ChAd3 载体(Colloca 等. Sci Transl Med 4(115), 115ra112, 2012)。如先前描述的,衍生和制备表达相同盒的 MVA 载体(Cottingham, M. G. 等 PLoS ONE 3, e1638, 2008 ;Di Lullo, G. 等. Virol. Methods 156, 37 - 43, 2009)。人 Ii(p35, NCBI Reference Sequence:NM_004355)插入物由 GeneArt(Life Technologies, Paisley, UK)合成,然后克隆到在 HCMV 和 BGHpA 控制下的 NS 转基因的 N 末端。

[0194] 动物和疫苗接种

[0195] 所有实验规程均依照国家和国际法和政策(EEC 理事会法令 86/609 ;意大利立法法令 116/92)实施。意大利卫生部的伦理委员会批准了本研究。动物操作规程在麻醉条件下实施且进行了所有的努力来使伤害最小化和减少动物数目。雌性 6 周龄 Balb/c 或 C57Bl/6 小鼠购自 Charles River(Como, Italy),并设置为各 5 只小鼠的实验组。通过投递 $50 \mu\text{l}$ 体积每部位($100 \mu\text{l}$ 终体积)在四头肌中肌肉内施用 ChAd3 和 MVA 载体。

[0196] 将未经免疫(Naïve)的雌性 11 至 19 岁龄(重量范围 3.2 至 6.5Kg)猕猴(Cynomolgus macaque)(macaca fascicularis)分配到各 4 只动物的实验组,该猕猴来自细胞生物学和神经生物学研究院(意大利国家研究委员会(National Research Council of Italy),罗马)收容的目的育种集群(purpose bred colony)。所有免疫通过肌肉内路径在三角肌中投递,其注射在稳定化缓冲液中稀释的 0.5ml 病毒。注射的剂量对于腺病毒载体为 1×10^{10} vp,而对于 MVA 载体为 2×10^8 pfu。在操作期间,通过 i. m. 注射 10mg/kg 盐酸氯胺酮(ketamine hydrochloride)来麻醉动物。

[0197] 肽

[0198] HCV 基因型 1b 株 BK 的一组长度为 15 个氨基酸的 494 个肽获自 BEI Resources(Manassas, VA),所述肽有 11 个氨基酸的重叠且跨越来自 NS3-NS5B(1985a. a.) 的开放阅读框。

[0199] 使用小鼠和猕猴样品的离体 IFN γ ELISpot

[0200] 将 MSIP S4510 板(Millipore)用 $10 \mu\text{g/ml}$ 的抗小鼠或抗猴 IFN γ 抗体(两者均来自 U-CyTech Utrecht, The Netherlands)在 4°C 过夜包被。在清洗和封闭后,将小鼠脾细胞或猕猴外周血单核细胞(PBMC)以两种不同密度(2×10^5 和 4×10^5 细胞/孔)一式两份地铺板并用每种单肽的终浓度 $4 \mu\text{g/ml}$ 的重叠性 15mer 肽合并物过夜刺激。分别使用肽稀释剂 DMSO(Sigma-Aldrich, Milan, Italy)和 ConA(Sigma-Aldrich, Milan, Italy)作为阴性和阳性对照。通过随后与生物素化的抗小鼠或抗猴 IFN γ 抗体(两者均来自 U-CyTech

Utrecht, The Netherlands)、缀合的链霉亲合素 - 碱性磷酸酶 (BD Biosciences, NJ), 最后与 BCIP/NBT1-Step 溶液 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) 温育来使板显色。采集板并通过 A. EL. VIS 自动化板读数器分析。当所有以下条件都满足时, ELISpot 应答被视为阳性的: IFN γ 生产存在于用 Con-A 刺激的孔中; 针对至少一种肽合并物的至少 50 个特异性点 / 百万个脾细胞或 PBMC; 阳性孔中看到的点数是在假对照孔 (DMSO) 中检测到的数目的三倍; 和应答随细胞稀释而降低。ELISpot 数据表示为 IFN γ 点形成细胞 (SFC) 每百万个脾细胞或 PBMC。

[0201] 用猕猴样品的胞内细胞因子染色 (ICS) 和 FACS 分析

[0202] 简言之, 将 2×10^6 个猴 PBMC 在 37 °C 在 5 % CO₂ 中使用每种肽终浓度为 2 μ g/ml 的肽合并物作为抗原在存在抗人 CD28/CD49d 共刺激抗体 (BD Biosciences, NJ) 和 Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) 的情况下刺激 15-20 小时。将 DMSO (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) 用作阴性对照, 而将葡萄球菌肠毒素 B (SEB, Sigma-Aldrich, Milan, Italy) 用作阳性对照。在过夜刺激后, 将 PBMC 用以下表面抗体染色: APC 抗猴 CD3, 克隆 SP34-2; PerCp-Cy5.5 抗猴 CD4, 克隆 L200; PE 抗人 CD8, 克隆 RPA-T8 (所有来自 BD Biosciences, NJ)。胞内染色在用 Cytofix/Cytoperm 处理后和存在 PermWash (BD Biosciences, NJ) 的情况下使用 FITC 抗人 IFN γ 克隆 MD-1 (U-CyTech Utrecht, The Netherlands) 实施。经染色的细胞在 FACS Canto 流式细胞器上采集, 并使用 DIVA 软件 (BD Biosciences, NJ) 分析。对于每种样品获得至少 30,000 个 CD8⁺, CD3⁺ 设门事件。

[0001]

序列表

<110> Okairos AG

<120> 改进的痘病毒疫苗

<150> PCT/EP2013/055409

<151> 15-Mar-2013

<160> 11

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 232

<212> PRT

<213> 人类

<220>

<221> 来源

<222> 1..232

<223> /分子_类型="蛋白"
/生物="人类"

<400> 1

Met	His	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Ser	Cys	Arg	Glu	Asp	Gln	Lys	Pro	Val
1				5					10					15	
Met	Asp	Asp	Gln	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Asn	Glu	Gln	Leu	Pro	Met
			20					25					30		
Leu	Gly	Arg	Arg	Pro	Gly	Ala	Pro	Glu	Ser	Lys	Cys	Ser	Arg	Gly	Ala
		35				40					45				
Leu	Tyr	Thr	Gly	Phe	Ser	Ile	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Ala	Gly	Gln	
	50				55				60						
Ala	Thr	Thr	Ala	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gln	Gln	Gly	Arg	Leu	Asp	Lys
65				70					75				80		
Leu	Thr	Val	Thr	Ser	Gln	Asn	Leu	Gln	Leu	Glu	Asn	Leu	Arg	Met	Lys
			85					90				95			
Leu	Pro	Lys	Pro	Pro	Lys	Pro	Val	Ser	Lys	Met	Arg	Met	Ala	Thr	Pro
			100					105				110			
Leu	Leu	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Met	Gly	Ala	Leu	Pro	Gln	Gly	Pro	Met
		115						120				125			
Gln	Asn	Ala	Thr	Lys	Tyr	Gly	Asn	Met	Thr	Glu	Asp	His	Val	Met	His
	130						135					140			
Leu	Leu	Gln	Asn	Ala	Asp	Pro	Leu	Lys	Val	Tyr	Pro	Pro	Leu	Lys	Gly

[0002]

145	150	155	160
Ser Phe Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile			
	165	170	175
Asp Trp Lys Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu			
	180	185	190
Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys			
	195	200	205
Glu Ser Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys			
	210	215	220
Gln Asp Leu Gly Pro Val Pro Met			
225	230		

<210> 2

<211> 699

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> 来源

<222> 1..699

<223> /分子_类型="DNA"
/生物="人类"

<400> 2

atgcacagga ggagaagcag gagctgtcgg gaagatcaga agccagtcac gcatgaccag	60
cgcgacctta tctccaacaa tgagcaactg cccatgctgg gccggcgccc tggggccccg	120
gagagcaagt gcagccgggg agccctgtac acaggttttt ccatcttgtt gactctgtct	180
ctcgtctggc agggcaccac cgcctacttc ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa	240
ctgacagtca cctcccagaa cctgcagctg gagaacctgc gcatgaagct tcccaagcct	300
cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc acccgcctgc tgatgcaggc gctgccccatg	360
ggagccctgc ccagggggc catgcagaat gccaccaagt atggcaacat gacagaggac	420
catgtgatgc acctgctcca gaatgctgac cccctgaagg tgtaccggcc actgaagggg	480
agcttcccgg agaacctgag acaccttaag aacaccatgg agaccataga ctggaaggte	540
tttgagagct gcatgcacca ttggctcctg ttgaaatga gcaggcactc ctggagacaa	600

[0003]

aagcccaactg acgctccacc gaaagagtca ctggaactgg aggaccgcgc ttctgggctg 660

ggtgtgacca agcaggatct gggcccagtc cccatgtga 699

<210> 3

<211> 215

<212> PRT

<213> Mus <小鼠, 属>

<220>

<221> 来源

<222> 1..215

<223> /分子_类型="蛋白"

/生物="Mus <小鼠, 属>"

<400> 3

Met	Asp	Asp	Gln	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	His	Glu	Gln	Leu	Pro	Ile
1			5					10					15		
Leu	Gly	Asn	Arg	Pro	Arg	Glu	Pro	Glu	Arg	Cys	Ser	Arg	Gly	Ala	Leu
		20					25						30		
Tyr	Thr	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Gly	Gln	Ala
	35						40						45		
Thr	Thr	Ala	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gln	Gln	Gly	Arg	Leu	Asp	Lys	Leu
	50					55						60			
Thr	Ile	Thr	Ser	Gln	Asn	Leu	Gln	Leu	Glu	Ser	Leu	Arg	Met	Lys	Leu
65				70					75					80	
Pro	Lys	Ser	Ala	Lys	Pro	Val	Ser	Gln	Met	Arg	Met	Ala	Thr	Pro	Leu
			85						90					95	
Leu	Met	Arg	Pro	Met	Ser	Met	Asp	Asn	Met	Leu	Leu	Gly	Pro	Val	Lys
		100							105				110		
Asn	Val	Thr	Lys	Tyr	Gly	Asn	Met	Thr	Gln	Asp	His	Val	Met	His	Leu
		115							120				125		
Leu	Thr	Arg	Ser	Gly	Pro	Leu	Glu	Tyr	Pro	Gln	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe
	130						135						140		
Pro	Glu	Asn	Leu	Lys	His	Leu	Lys	Asn	Ser	Met	Asp	Gly	Val	Asn	Trp
145				150					155					160	
Lys	Ile	Phe	Glu	Ser	Trp	Met	Lys	Gln	Trp	Leu	Leu	Phe	Glu	Met	Ser
			165						170					175	
Lys	Asn	Ser	Leu	Glu	Glu	Lys	Lys	Pro	Thr	Glu	Ala	Pro	Pro	Lys	Glu
		180							185					190	
Pro	Leu	Asp	Met	Glu	Asp	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Val	Thr	Arg	Gln
		195						200						205	
Glu	Leu	Gly	Gln	Val	Thr	Leu									

[0004]

210

215

<210> 4

<211> 648

<212> DNA

<213> Mus <小鼠, 属>

<220>

<221> 来源

<222> 1..648

<223> /分子_类型="DNA"

/生物="Mus <小鼠, 属>"

<400> 4

atggatgacc aacgcgacct catctetaac catgaacagt tgcacatact gggcaaccgc 60

cctagagage cagaaagggtg cagccgtgga gctctgtaca ccggtgtctc tgccttggtg 120

gctctgtctc tggctgggca ggccaccact gcttacttcc tgtaccagca acagggcgcg 180

ctagacaage tgaccatcac ctcccagaac ctgcaactgg agagccttcg catgaagctt 240

ccgaaatctg ccaaacctgt gageccagatg cggatggcta ctcccttgct gatgcgtcca 300

atgtccatgg ataacatgct ccttgggcct gtgaagaacg ttaccaagta cggcaacatg 360

accagagacc atgtgatgca tctgctcagc aggtctggac ccctggagta cccgcagctg 420

aaggggacct tcccagagaa tctgaagcat cttaagaact ccatggatgg cgtgaactgg 480

aagatcttcg agagctggat gaagcagtgg ctcttggttg agatgagcaa gaactccctg 540

gaggagaaga agcccaccga ggtccacct aaagagccac tggacatgga agacctatct 600

tctggcctgg gagtgaccag gcaggaactg ggcaagtca ccctgtga 648

<210> 5

<211> 296

<212> PRT

<213> 人类

<220>

<221> 来源

[0005]

<222> 1..296

<223> /分子_类型="蛋白"

/生物="人类"

<400> 5

```

Met His Arg Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg Glu Asp Gln Lys Pro Val
1           5           10           15
Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met
20           25           30
Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala
35           40           45
Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln
50           55           60
Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
65           70           75           80
Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys
85           90           95
Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro
100          105          110
Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met
115          120          125
Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His
130          135          140
Leu Leu Gln Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly
145          150          155          160
Ser Phe Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile
165          170          175
Asp Trp Lys Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu
180          185          190
Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys
195          200          205
Val Leu Thr Lys Cys Gln Glu Glu Val Ser His Ile Pro Ala Val His
210          215          220
Pro Gly Ser Phe Arg Pro Lys Cys Asp Glu Asn Gly Asn Tyr Leu Pro
225          230          235          240
Leu Gln Cys Tyr Gly Ser Ile Gly Tyr Cys Trp Cys Val Phe Pro Asn
245          250          255
Gly Thr Glu Val Pro Asn Thr Arg Ser Arg Gly His His Asn Cys Ser
260          265          270
Glu Ser Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys
275          280          285
Gln Asp Leu Gly Pro Val Pro Met
290          295

```

[0006]

<210> 6

<211> 891

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> 来源

<222> 1.. 891

<223> /分子_类型="DNA"

/生物="人类"

<400> 6

atgcacagga ggagaagcag gagctgtcgg gaagatcaga agccagtcac ggatgaccag 60

cgcgacctta tctccaacaa tgagcaactg cccatgtctg gccggcgcgc tggggccccg 120

gagagcaagt gcagccgcgg agccctgtac acaggtcttt ccatcctggt gactctgtc 180

ctcgtctggc aggccaccac cgcctacttc ctgtaccagc agcagggcgc gctggacaaa 240

ctgacagtca cctcccagaa cctgcagctg gagaacctgc gcatgaagct tcccagcct 300

cccagcctg tgagcaagat gcgcattggc acccgcctgc tgatgcagcc gctgccccatg 360

ggagccctgc cccaggggccc catgcagaat gccaccaagt atggcaacat gacagaggac 420

catgtgatgc acctgtccca gaatgtctac cccctgaagg tgtaccgcgc actgaagggg 480

agcttcccgc agaacctgag acaccttaag aacaccatgg agaccataga ctggaaggtc 540

tttgagagct ggatgcacca ttggctcctg ttigaaatga gcaggcactc cttggagcaa 600

aagcccactg acgtccacc gaaagtactg accaagtgcc aggaagaggt cagccacatc 660

cctgtctgcc acccgggttc attcaggccc aagtgcgacg agaacggcaa ctatctgcca 720

ctccagtgtc atgggagcat cggctactgc tgggtgtgtc tcccacacgg caccgaggtc 780

cccacaccca gaagccgcgg gcaccataac tgcagtgagt cactggaact ggaggaccgc 840

tcttctgggc tgggtgtgac caagcaggat ctgggcccag tcccattgtg a 891

<210> 7

[0007]

<211> 279

<212> PRT

<213> Mus <小鼠, 属>

<220>

<221> SOURCE

<222> 1..279

<223> /分子_类型="蛋白"

/生物="Mus <小鼠, 属>"

<400> 7

```

Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn His Glu Gln Leu Pro Ile
1           5           10           15
Leu Gly Asn Arg Pro Arg Glu Pro Glu Arg Cys Ser Arg Gly Ala Leu
           20           25           30
Tyr Thr Gly Val Ser Val Leu Val Ala Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala
           35           40           45
Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu
           50           55           60
Thr Ile Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Ser Leu Arg Met Lys Leu
65           70           75           80
Pro Lys Ser Ala Lys Pro Val Ser Gln Met Arg Met Ala Thr Pro Leu
           85           90           95
Leu Met Arg Pro Met Ser Met Asp Asn Met Leu Leu Gly Pro Val Lys
           100          105          110
Asn Val Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Gln Asp His Val Met His Leu
           115          120          125
Leu Thr Arg Ser Gly Pro Leu Glu Tyr Pro Gln Leu Lys Gly Thr Phe
           130          135          140
Pro Glu Asn Leu Lys His Leu Lys Asn Ser Met Asp Gly Val Asn Trp
145          150          155          160
Lys Ile Phe Glu Ser Trp Met Lys Gln Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser
           165          170          175
Lys Asn Ser Leu Glu Glu Lys Lys Pro Thr Glu Ala Pro Pro Lys Val
           180          185          190
Leu Thr Lys Cys Gln Glu Glu Val Ser His Ile Pro Ala Val Tyr Pro
           195          200          205
Gly Ala Phe Arg Pro Lys Cys Asp Glu Asn Gly Asn Tyr Leu Pro Leu
           210          215          220
Gln Cys His Gly Ser Thr Gly Tyr Cys Trp Cys Val Phe Pro Asn Gly
225          230          235          240
Thr Glu Val Pro His Thr Lys Ser Arg Gly Arg His Asn Cys Ser Glu
           245          250          255
Pro Leu Asp Met Glu Asp Leu Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Arg Gln

```

[0008]

	260	265	270
	Glu Leu Gly Gln Val Thr Leu		
	275		
<210>	8		
<211>	840		
<212>	DNA		
<213>	Mus <小鼠, 属>		
<220>			
<221>	来源		
<222>	1..840		
<223>	/分子_类型="DNA"		
	/生物="Mus <小鼠, 属>"		
<400>	8		
	atggatgacc aacgcgacct catctetaac catgaacagt tgeccatact gggeaacccgc	60	
	cctagagagc cagaaagggtg cagccgtgga gctctgtaca ccggtgtctc tgtcctgggtg	120	
	gctctgctct tggtctggga ggccaccact gcttacttcc tgtaccagca acagggccgc	180	
	ctagacaagc tgaccatcac ctcccagaac ctgcaactgg agagccttcg catgaagctt	240	
	ccgaaatctg ccaaacctgt gagccagatg cggatggcta ctcccttgcg gatgcgtcca	300	
	atgtccatgg ataacatgct ccttgggcct gtgaagaacg ttaccaagta cggcaacatg	360	
	accaggacc atgtgatgca tctgctcagc aggtctggac ccttggagta cccgcagctg	420	
	aaggggacct tcccagagaa tctgaagcat cttagaact ccatggatgg cgtgaactgg	480	
	aagatcttcg agagctggat gaagcagtgg ctcttgtttg agatgagcaa gaactccctg	540	
	gaggagaaga agcccaccga ggctccacct aaagtactga ccaagtgccg ggaagaagtc	600	
	agccacatcc ctgcctcta cccgggtgcg ttccgtccca agtgcgacga gaacggtaac	660	
	tatttgccac tccagtgccg cgggagcact ggctactgct ggtgtgtgtt ccccaacggc	720	
	actgagggtc ctacaccaa gagccgcggg cgcataact gcagtgagcc actggacatg	780	
	gaagacctat ctcttggcct gggagtgaac aggcaggaac tgggtcaagt caccctgtga	840	

[0009]

<210> 9
<211> 160
<212> PRT
<213> 人类

<220>
<221> 来源
<222> 1..160
<223> /分子_类型="蛋白"
/生物="人类"

<400> 9
Met His Arg Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg Glu Asp Gln Lys Pro Val
1 5 10 15
Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met
20 25 30
Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala
35 40 45
Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Ala Gly Gln
50 55 60
Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
65 70 75 80
Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys
85 90 95
Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro
100 105 110
Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met
115 120 125
Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His
130 135 140
Leu Leu Gln Ser His Trp Asn Trp Arg Thr Arg Leu Leu Gly Trp Val
145 150 155 160

<210> 10
<211> 483
<212> DNA
<213> 人类

<220>
<221> 来源
<222> 1..483
<223> /分子_类型="DNA"
/生物="人类"

[0010]

<400> 10
 atgcacagga ggagaagcag gagctgtcgg gaagatcaga agccagtcac ggaigaccag 60
 cgcgacctta tctccaacaa tgagcaactg cccatgctgg gccggcgccc tggggccccc 120
 gagagcaagt gcagcccgcg agccctgtac acaggtcttt ccatcctggt gactctgctc 180
 ctgcttgccc aggccaccac cgcctacttc ctgtaccagc agcagggccg gctggacaaa 240
 ctgacagtea cctcccagaa cctgcagctg gagaacctgc gcatgaagct tcccaagcct 300
 cccaagcctg tgagcaagat gcgcatggcc accccgctgc tgatgcagge gctgcccatg 360
 ggagccctgc cccaggggccc catgcagaat gccaccaagt atggcaacat gacagaggac 420
 catgtgatgc acctgctcca gagtcactgg aactggagga cccgtcttct gggtctgggtg 480
 tga 483

<210> 11
 <211> 1985
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <222> 1..1985
 <223> /分子_类型="protein"
 /注释="Met-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B 多肽"
 /生物="人工序列"

<400> 11
 Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ser Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly
 20 25 30
 Glu Val Gln Val Val Ser Thr Ala Thr Gln Ser Phe Leu Ala Thr Cys
 35 40 45
 Val Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Ser Lys Thr
 50 55 60
 Leu Ala Gly Pro Lys Gly Pro Ile Thr Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
 65 70 75 80

[0011]

```

Gln Asp Leu Val Gly Trp Gln Ala Pro Pro Gly Ala Arg Ser Leu Thr
      85                      90                      95
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
      100                    105                    110
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
      115                    120                    125
Ser Pro Arg Pro Val Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
      130                    135                    140
Leu Cys Pro Ser Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
      145                    150                    155                    160
Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Val Pro Val Glu Ser Met
      165                    170                    175
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro
      180                    185                    190
Ala Val Pro Gln Ser Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
      195                    200                    205
Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
      210                    215                    220
Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly
      225                    230                    235                    240
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
      245                    250                    255
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ala Pro Val Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
      260                    265                    270
Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
      275                    280                    285
Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ser Thr Thr Ile Leu Gly Ile
      290                    295                    300
Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Val Val
      305                    310                    315                    320
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
      325                    330                    335
Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Asn Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
      340                    345                    350
Lys Ala Ile Pro Ile Glu Ala Ile Arg Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
      355                    360                    365
Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Ser Gly
      370                    375                    380
Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
      385                    390                    395                    400
Ile Pro Thr Ile Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
      405                    410                    415
Thr Gly Tyr Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys
      420                    425                    430

```

[0012]

Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu			
435	440	445	
Thr Thr Thr Val Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Ser Gln Arg Arg Gly			
450	455	460	
Arg Thr Gly Arg Gly Arg Arg Gly Ile Tyr Arg Phe Val Thr Pro Gly			
465	470	475	480
Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr			
485	490	495	
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Ser Val			
500	505	510	
Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp			
515	520	525	
His Leu Glu Phe Trp Glu Ser Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp			
530	535	540	
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ala Gly Asp Asn Phe Pro Tyr			
545	550	555	560
Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro			
565	570	575	
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr			
580	585	590	
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn			
595	600	605	
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Ala Cys Met			
610	615	620	
Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly			
625	630	635	640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Thr Thr Gly Ser Val Val			
645	650	655	
Ile Val Gly Arg Ile Ile Leu Ser Gly Arg Pro Ala Ile Val Pro Asp			
660	665	670	
Arg Glu Phe Leu Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ala Ser			
675	680	685	
His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Gln Leu Ala Glu Gln Phe Lys			
690	695	700	
Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Thr Lys Gln Ala Glu Ala			
705	710	715	720
Ala Ala Pro Val Val Glu Ser Lys Trp Arg Ala Leu Glu Thr Phe Trp			
725	730	735	
Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala Gly			
740	745	750	
Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala Phe			
755	760	765	
Thr Ala Ser Ile Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gln Ser Thr Leu Leu Phe			
770	775	780	

[0013]

```

Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Pro Pro Ser Ala
785              790              795              800
Ala Ser Ala Phe Val Gly Ala Gly Ile Ala Gly Ala Ala Val Gly Ser
              805              810              815
Ile Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala
              820              825              830
Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Val Met Ser Gly Glu Met
              835              840              845
Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser Pro
              850              855              860
Gly Ala Leu Val Val Gly Val Val Cys Ala Ala Ile Leu Arg Arg His
865              870              875              880
Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile Ala
              885              890              895
Phe Ala Ser Arg Gly Asn His Val Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu
              900              905              910
Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile Leu Ser Ser Leu Thr Ile
              915              920              925
Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp Cys Ser
              930              935              940
Thr Pro Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys
945              950              955              960
Thr Val Leu Thr Asp Phe Lys Thr Trp Leu Gln Ser Lys Leu Leu Pro
              965              970              975
Gln Leu Pro Gly Val Pro Phe Phe Ser Cys Gln Arg Gly Tyr Lys Gly
              980              985              990
Val Trp Arg Gly Asp Gly Ile Met Gln Thr Thr Cys Pro Cys Gly Ala
              995              1000              1005
Gln Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val Gly Pro
              1010              1015              1020
Lys Thr Cys Ser Asn Thr Trp His Gly Thr Phe Pro Ile Asn Ala Tyr
1025              1030              1035              1040
Thr Thr Gly Pro Cys Thr Pro Ser Pro Ala Pro Asn Tyr Ser Arg Ala
              1045              1050              1055
Leu Trp Arg Val Ala Ala Glu Glu Tyr Val Glu Val Thr Arg Val Gly
              1060              1065              1070
Asp Phe His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr Asp Asn Val Lys Cys Pro
              1075              1080              1085
Cys Gln Val Pro Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly Val Arg
              1090              1095              1100
Leu His Arg Tyr Ala Pro Ala Cys Arg Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val
1105              1110              1115              1120
Thr Phe Gln Val Gly Leu Asn Gln Tyr Leu Val Gly Ser Gln Leu Pro
              1125              1130              1135

```

[0014]

Cys Glu Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp		
1140	1145	1150
Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys Arg Arg Leu Ala Arg Gly		
1155	1160	1165
Ser Pro Pro Ser Leu Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro		
1170	1175	1180
Ser Leu Lys Ala Thr Cys Thr Thr His His Val Ser Pro Asp Ala Asp		
1185	1190	1195
Leu Ile Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn Ile		
1205	1210	1215
Thr Arg Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Val Leu Asp Ser Phe Asp		
1220	1225	1230
Pro Leu Arg Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Pro Ala Glu		
1235	1240	1245
Ile Leu Arg Lys Ser Lys Lys Phe Pro Ala Ala Met Pro Ile Trp Ala		
1250	1255	1260
Arg Pro Asp Tyr Asn Pro Pro Leu Leu Glu Ser Trp Lys Asp Pro Asp		
1265	1270	1275
Tyr Val Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Ile Lys Ala		
1285	1290	1295
Pro Pro Ile Pro Pro Pro Arg Arg Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu		
1300	1305	1310
Ser Ser Val Ser Ser Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Thr Phe Gly		
1315	1320	1325
Ser Ser Glu Ser Ser Ala Val Asp Ser Gly Thr Ala Thr Ala Leu Pro		
1330	1335	1340
Asp Gln Ala Ser Asp Asp Gly Asp Lys Gly Ser Asp Val Glu Ser Tyr		
1345	1350	1355
Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser		
1365	1370	1375
Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Glu Glu Ala Ser Glu Asp Val Val		
1380	1385	1390
Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile Thr Pro Cys		
1395	1400	1405
Ala Ala Glu Glu Ser Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu		
1410	1415	1420
Leu Arg His His Asn Met Val Tyr Ala Thr Thr Ser Arg Ser Ala Gly		
1425	1430	1435
Leu Arg Gln Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu Asp Asp		
1445	1450	1455
His Tyr Arg Asp Val Leu Lys Glu Met Lys Ala Lys Ala Ser Thr Val		
1460	1465	1470
Lys Ala Lys Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Lys Leu Thr Pro Pro		
1475	1480	1485

[0015]

His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val Arg Asn			
1490	1495	1500	
Leu Ser Ser Lys Ala Val Asn His Ile His Ser Val Trp Lys Asp Leu			
1505	1510	1515	1520
Leu Glu Asp Thr Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala Lys Asn			
1525	1530	1535	
Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro Ala Arg			
1540	1545	1550	
Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys Met Ala			
1555	1560	1565	
Leu Tyr Asp Val Val Ser Thr Leu Pro Gln Val Val Met Gly Ser Ser			
1570	1575	1580	
Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu Val Asn			
1585	1590	1595	1600
Thr Trp Lys Ser Lys Lys Asn Pro Met Gly Phe Ser Tyr Asp Thr Arg			
1605	1610	1615	
Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Asn Asp Ile Arg Val Glu Glu Ser			
1620	1625	1630	
Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Arg Gln Ala Ile Lys			
1635	1640	1645	
Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Thr Asn Ser Lys			
1650	1655	1660	
Gly Gln Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Gly Val Leu Thr			
1665	1670	1675	1680
Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Cys Tyr Leu Lys Ala Ser Ala Ala			
1685	1690	1695	
Cys Arg Ala Ala Lys Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Asn Ala Ala			
1700	1705	1710	
Gly Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Thr Gln Glu Asp Ala Ala			
1715	1720	1725	
Ser Leu Arg Val Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala Pro Pro			
1730	1735	1740	
Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr Ser Cys			
1745	1750	1755	1760
Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Ala Ser Gly Lys Arg Val Tyr			
1765	1770	1775	
Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala Trp Glu			
1780	1785	1790	
Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile Ile Met			
1795	1800	1805	
Tyr Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His Phe Phe			
1810	1815	1820	
Ser Ile Leu Leu Ala Gln Glu Gln Leu Glu Lys Ala Leu Asp Cys Gln			
1825	1830	1835	1840

[0016]

Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro Gln Ile			
1845	1850	1855	
Ile Glu Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser Tyr Ser			
1860	1865	1870	
Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ser Cys Leu Arg Lys Leu Gly Val			
1875	1880	1885	
Pro Pro Leu Arg Val Trp Arg His Arg Ala Arg Ser Val Arg Ala Arg			
1890	1895	1900	
Leu Leu Ser Gln Gly Gly Arg Ala Ala Thr Cys Gly Lys Tyr Leu Phe			
1905	1910	1915	1920
Asn Trp Ala Val Lys Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Pro Ala Ala			
1925	1930	1935	
Ser Gln Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Val Ala Gly Tyr Ser Gly Gly			
1940	1945	1950	
Asp Ile Tyr His Ser Leu Ser Arg Ala Arg Pro Arg Trp Phe Met Leu			
1955	1960	1965	
Cys Leu Leu Leu Leu Ser Val Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn			
1970	1975	1980	
Arg			
1985			

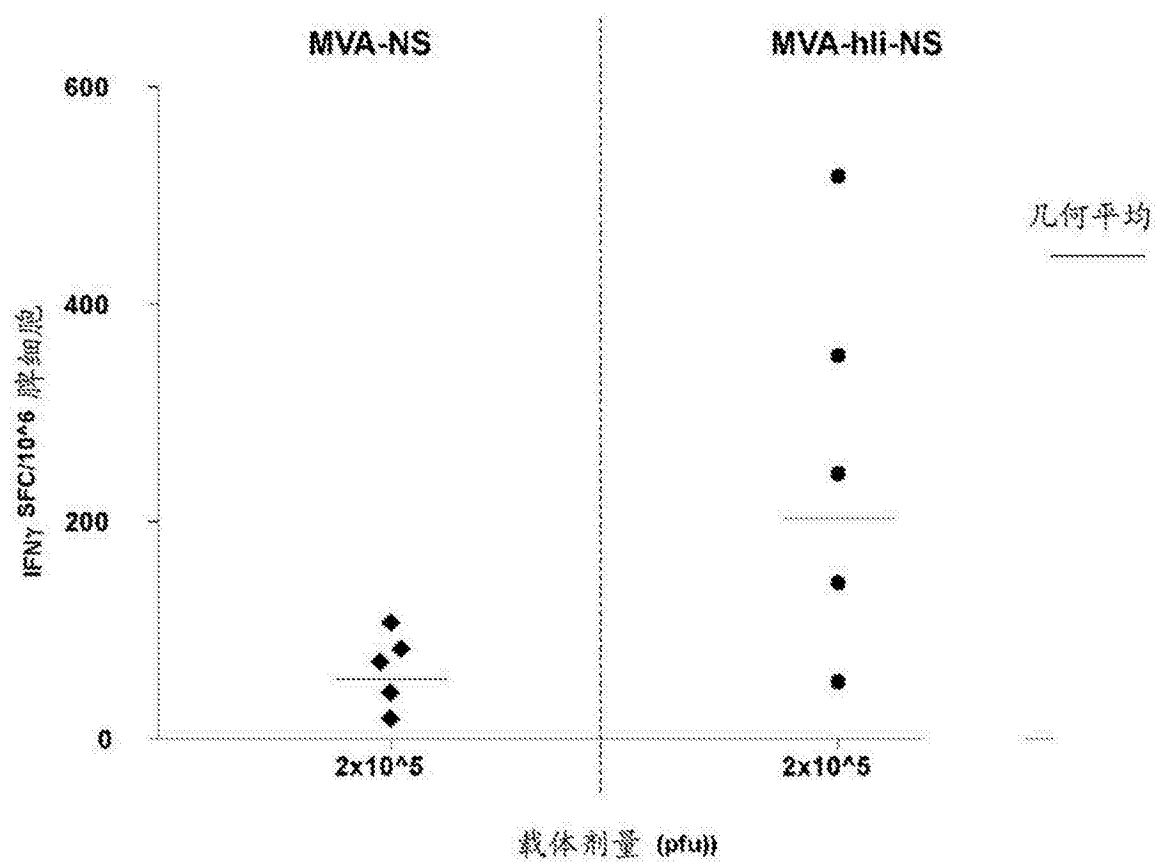


图 1

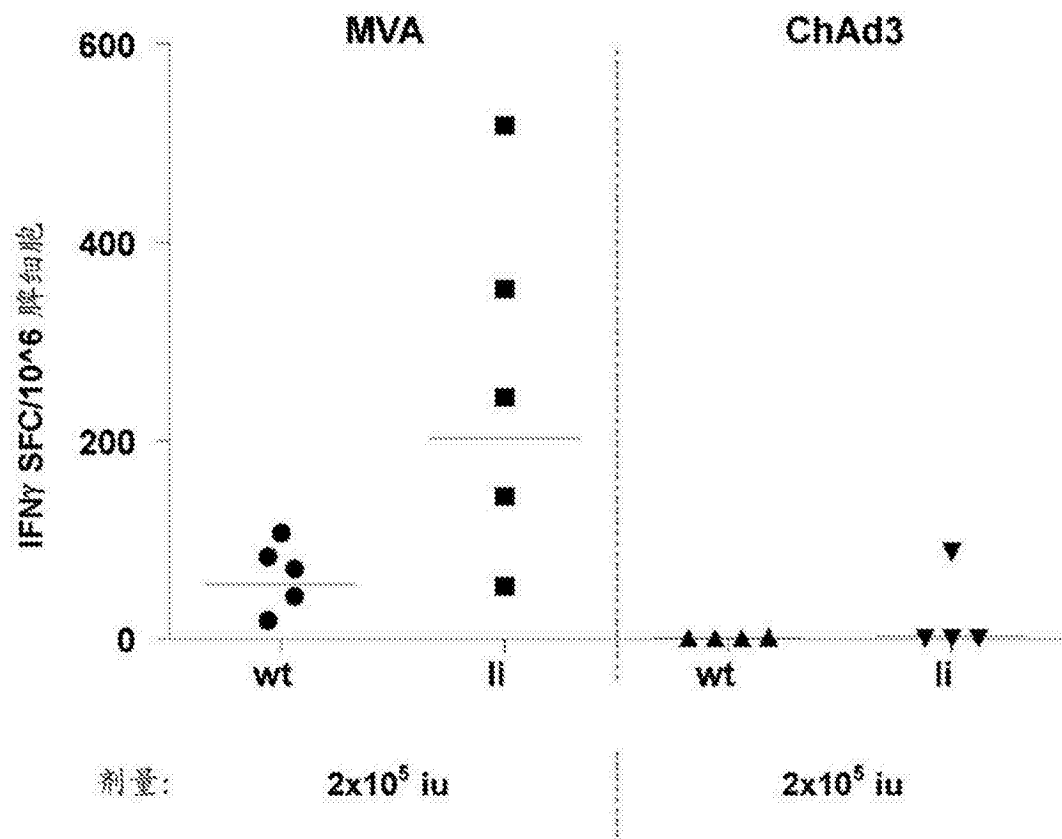


图 2

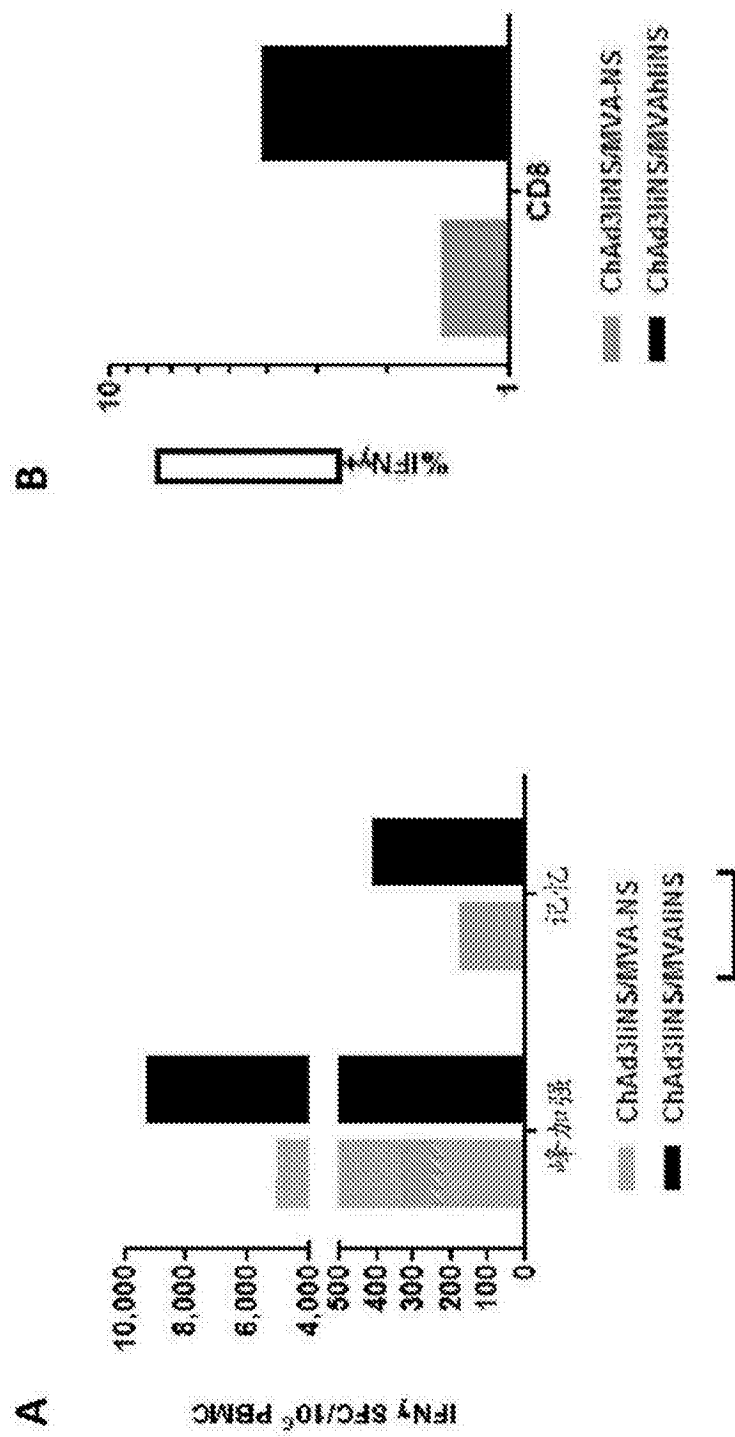


图 3

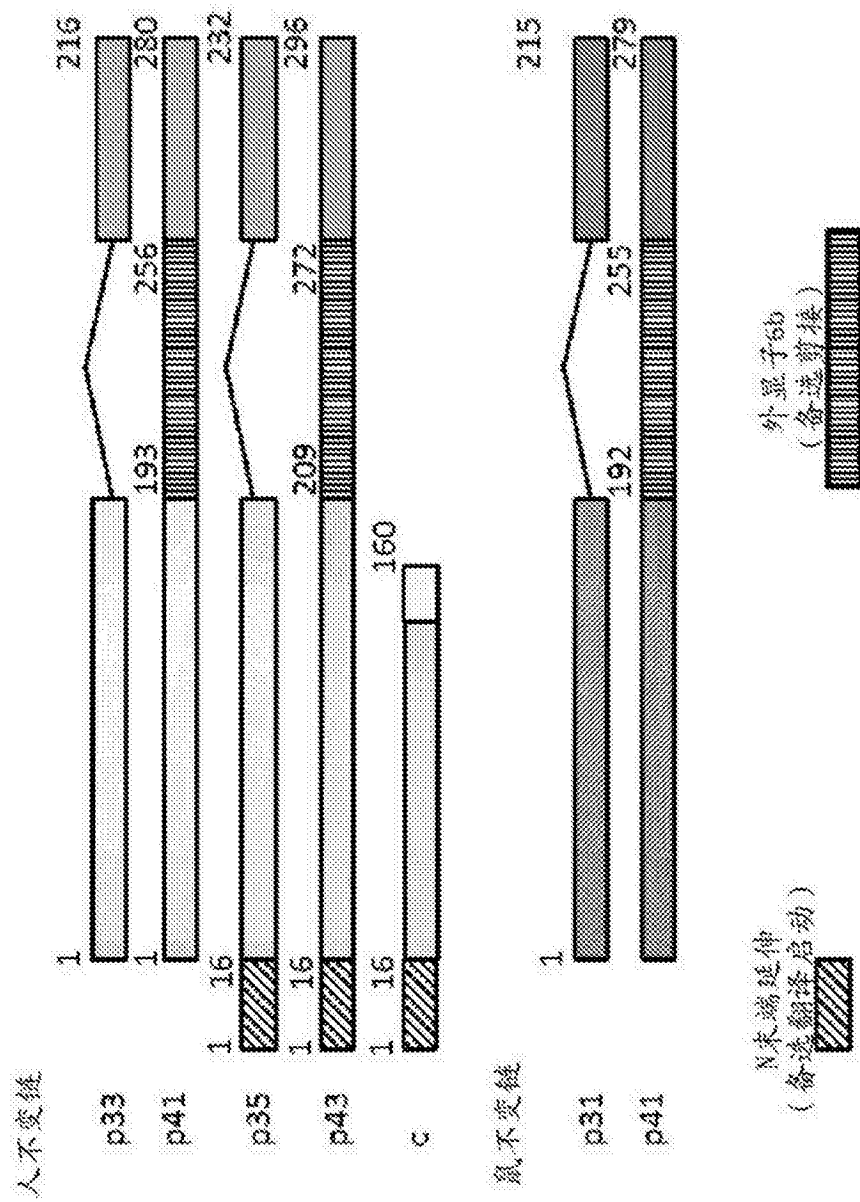


图 4