



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102549148 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201080042333. 0

代理人 顾晋伟 田旻

(22) 申请日 2010. 09. 21

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/244, 786 2009. 09. 22 US

C12N 7/02 (2006. 01)

A61K 39/12 (2006. 01)

A61K 39/145 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 22

A61P 31/16 (2006. 01)

A61P 37/04 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CA2010/001488 2010. 09. 21

C12N 7/00 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

W02011/035422 EN 2011. 03. 31

(71) 申请人 麦迪卡格公司

地址 加拿大魁北克

(72) 发明人 路易斯 - 菲利普 · 韦齐纳

马农 · 科图雷 达尼 · 帕克特

米凯莱 · 达吉斯

马克 - 安德烈 · 德奥斯特

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

权利要求书 2 页 说明书 31 页

序列表 9 页 附图 10 页

(54) 发明名称

制备植物来源的 VLP 的方法

(57) 摘要

提供了制备植物来源之病毒样颗粒 (virus like particle, VLP) 的方法。该方法可包括获取包含定位于质外体 (apoplast) 之 VLP 的植物或植物物质, 从所述植物或植物物质产生原生质体 (protoplast)/ 原生质球 (spheroplast) 级分和质外体级分, 以及回收质外体级分。质外体级分包含植物来源的 VLP。或者, 可以通过用细胞壁降解酶组合物消化植物物质来产生消化级分, 从而从包含植物来源之 VLP 的植物或植物物质获得 VLP。过滤消化级分以产生过滤级分, 从过滤级分中回收植物来源的 VLP。

1. 制备植物来源的 VLP 的方法,其包括:
 - a. 获取包含定位于质外体的 VLP 的植物或植物物质,
 - b. 产生原生质体 / 原生质球级分和质外体级分 ;和,
 - c. 回收所述质外体级分,所述质外体级分包含所述植物来源的 VLP。
2. 权利要求 1 的方法,其中在所述产生步骤 (步骤 b) 中,通过用细胞壁降解酶组合物处理所述植物或植物物质来产生所述质外体级分和原生质体级分。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述细胞壁降解酶组合物包含一种或多种于一种果胶酶、一种或多种于一种纤维素酶,或者一种或多种于一种果胶酶和一种或多种于一种纤维素酶。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述细胞壁降解酶组合物不包含脂肪酶、蛋白酶或果胶酶中的一种或更多种。
5. 权利要求 1 的方法,其中在所述获取步骤 (步骤 a) 中,用编码选自以下组的蛋白质的核酸序列转化所述植物 :病毒包膜蛋白、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白和病毒外壳蛋白,以及收集所述植物或植物物质。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述核酸以瞬时方式引入所述植物中。
7. 权利要求 5 的方法,其中所述核酸稳定整合进所述植物的基因组。
8. 权利要求 1 的方法,其中在所述获取步骤 (步骤 a) 中,培养所述植物并收集所述植物或植物物质。
9. 权利要求 5 的方法,其中所述核酸编码流感血凝素。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述植物来源的 VLP 不包含神经氨酸酶或 M 蛋白。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述植物物质选自叶和培养的植物细胞的组。
12. 权利要求 1 的方法,其还包括步骤 d) 从所述质外体级分中纯化所述植物来源的 VLP。
13. 权利要求 12 的方法,其中所述纯化步骤包括利用深层过滤来过滤所述质外体级分以产生澄清的提取物,然后用阳离子交换树脂来层析所述澄清的提取物。
14. 制备包含植物来源之脂质包膜的植物来源 VLP 的方法,其包括:
 - a. 获取包含定位于质外体的 VLP 的植物或植物物质,
 - b. 用酶组合物处理所述植物或植物物质,以产生原生质体 / 原生质球级分和一种或多种于一种包含所述 VLP 的质外体蛋白复合物 ;以及
 - c. 将所述一种或多种于一种质外体蛋白复合物与所述原生质体级分分离。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述酶组合物包含一种或多种于一种果胶酶、一种或多种于一种纤维素酶,或者一种或多种于一种果胶酶和一种或多种于一种纤维素酶。
16. 权利要求 14 的方法,其中所述酶组合物不包含脂肪酶、蛋白酶或果胶酶中的一种或更多种。
17. 权利要求 14 的方法,其还包括步骤 d) 从所述质外体级分中纯化所述植物来源的 VLP。
18. 权利要求 17 的方法,其中所述纯化步骤包括利用深层过滤来过滤所述质外体级分以产生澄清的提取物,然后用阳离子交换树脂来层析所述澄清的提取物。
19. 权利要求 14 的方法,其中在所述获取步骤 (步骤 a) 中,用编码选自以下组的蛋白质的核酸序列转化所述植物 :病毒包膜蛋白、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白和病毒外壳蛋

白,以及收集所述植物或植物物质。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述核酸以瞬时方式引入所述植物中。

21. 权利要求 19 的方法,其中所述核酸稳定整合进所述植物的基因组。

22. 权利要求 14 的方法,其中在所述获取步骤(步骤 a)中,培养所述植物并收集所述植物或植物物质。

23. 权利要求 19 的方法,其中所述 VLP 包含流感血凝素。

24. 权利要求 14 的方法,其中所述植物物质选自叶和培养的植物细胞的组。

25. 权利要求 14 的方法,其中所述 VLP 不包含神经氨酸酶或 M 蛋白。

26. 制备植物来源的 VLP 的方法,其包括:

a. 获取包含植物来源的 VLP 的植物或植物物质;

b. 用细胞壁降解酶组合物消化所述植物物质以产生消化级分;

c. 过滤所述消化级分以产生过滤级分,从所述过滤级分中回收所述植物来源的 VLP。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述细胞壁降解酶组合物包含一种或多种果胶酶、一种或多种纤维素酶,或者一种或多种果胶酶和一种或多种纤维素酶。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述细胞壁降解酶组合物包含一种或多种果胶酶、一种或多种纤维素酶,或者一种或多种果胶酶和一种或多种纤维素酶。

29. 权利要求 27 的方法,其中在所述获取步骤(步骤 a)中,用编码选自以下组的蛋白质的核酸序列转化所述植物:病毒包膜蛋白、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白和病毒外壳蛋白,以及收集所述植物或植物物质。

30. 权利要求 29 的方法,其中所述核酸以瞬时方式引入所述植物中。

31. 权利要求 29 的方法,其中所述核酸稳定整合进所述植物的基因组。

32. 权利要求 29 的方法,其中所述植物来源的 VLP 包含流感血凝素。

33. 权利要求 27 的方法,其中所述植物物质选自叶和培养的植物细胞的组。

34. 权利要求 26 的方法,其还包括步骤 d) 将所述过滤级分中的 VLP 与细胞碎片和不溶物质分离开。

35. 权利要求 34 的方法,其中所述分离步骤通过离心进行。

36. 权利要求 34 的方法,其中所述分离步骤通过深层过滤进行。

37. 权利要求 27 的方法,其还包括步骤 d) 从所述过滤级分中纯化所述植物来源的 VLP。

38. 权利要求 34 的方法,其中所述纯化步骤包括深层过滤所述过滤级分以产生澄清的提取物,然后用阳离子交换树脂来层析所述澄清的提取物。

制备植物来源的 VLP 的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及制备植物来源的病毒样颗粒 (virus like particle, VLP) 的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 目前宿主细胞 (如大肠杆菌、昆虫细胞培养物和哺乳动物细胞培养物) 中的重组表达策略在培养基中以非常高的水平表达和分泌蛋白质。使用这些系统获得了高水平表达、正确蛋白质折叠和蛋白质翻译后修饰。此外, 由于可以容易地将细胞内蛋白质与其他组分 (DNA、囊泡、膜、色素等) 分离, 所表达蛋白质的纯化得以简化。对于植物或酵母表达系统, 细胞壁阻止表达的蛋白质分泌到培养基中。

[0004] 对抗病毒感染的一种主要方法是通过免疫接种。应对流行爆发或满足季节性需求 (例如, 每年秋季发生的“流感季”或最近全球爆发的“猪流感”) 的疫苗生产需要在获知后短时间内生产足量的疫苗。在面对全球流感大流行时, 目前全球的流感疫苗产量可能不足。此外, 主导 (dominant) 流感毒株每年变化, 因此在一年中的低需求时间中储备是不实际的。经济、大规模地生产有效的流感疫苗有显著价值。

[0005] 病毒样颗粒 (VLP) 可用于制备流感疫苗。超结构 (suprastructure) (如 VLP) 模拟病毒衣壳结构, 但缺少基因组, 从而不能复制或提供再次感染。VLP 刺激强免疫应答, 为分离 (可溶) 的重组抗原提供了替代方法。VLP 在特定病毒蛋白表达后进行组装并具有类似于其同类病毒的外表面, 但不同于真的病毒颗粒, 遗传物质不会整合到其中。与天然病毒类似的颗粒状多价结构抗原的呈递引发具有均衡的体液和细胞成分的增强的免疫应答刺激。认为优于分离抗原产生之刺激的这种改进对于包膜病毒尤其适用, 因为包膜 VLP 以其天然膜结合状态呈递表面抗原 (Grgacic 和 Anderson, 2006 年, *Methods* 40, 60-65)。此外, 已证明与重组血凝素 (HA) (即单体 HA, 或组成花环的 HA ; 3-8 个三聚体的 HA 组装物) 相比, 拥有纳米颗粒组织结构的流感 VLP 是更佳的首选疫苗, 并且他们能激活体液和细胞免疫应答。(Bright, R. A., 等, 2007, *Vaccine* 25, 3871-3878)。

[0006] 目前市场上的绝大部分流感疫苗由从蛋中培养之病毒粒获得的病毒颗粒或病毒抗原构成。来源于蛋的疫苗的生产依赖于在具有胚胎的鸡蛋中培养活病毒。在用去污剂化学灭活和破坏纯化的病毒粒后获得裂解流感疫苗。作为大流行性疫苗产品, 重组流感抗原是病毒来源抗原的有效替代品。一旦可获得新毒株的遗传构成信息, 可以使用该信息生产重组抗原, 并且其允许快速启动生产过程。但是, 与灭活的裂解流感疫苗相比, 纯化的重组 HA 亚基表现出更低的效力, 并且需要更高的抗原含量来产生强免疫应答 (Treanor 等, 2007, *J. Am. Med. Assoc.* 297, 1577-1582)。

[0007] 已通过在培养的哺乳动物细胞中共表达全部 10 种流感病毒蛋白获得流感 VLP (Mena 等, 1996 年, *J. Virol.* 70, 5016-5024)。几种病毒蛋白对于 VLP 的生产是可缺省的, 而且在疫苗发展中已通过共表达 2 种主要抗原性包膜蛋白 (HA 和 NA) 以及 M1 或者仅共表达 HA 和 M1 生产流感 VLP (Kang 等, 2009 年, *Virus Res.* 143, 140-146)。Chen 等 (2007 年, *J. Virol.* 81, 7111-7123) 证实单独的 HA 可以驱动 VLP 形成和出芽, 在他们的系统中可以省去 M1 共表达。但是, 由于发现 HA 与产生 VLP 的哺乳动物细胞表面的唾液酸化糖蛋白结合,

所以共表达了病毒唾液酸酶以使 VLP 在出芽后从生产细胞中释放。

[0008] 期望有更简单的 VLP 生产系统(例如依赖于表达仅一种或几种病毒蛋白质而不需要表达非结构病毒蛋白的生产系统)以加快疫苗的开发。在植物系统中生产病毒抗原(包括 VLP)提供了这样的生产优势,既它们可以在温室或田间培养,不需要无菌组织培养法和处理。

[0009] PCT 公开 W0 2006/119516(Williamson 和 Rybicki)公开了在植物中表达流感病毒 A/越南/1194/2004 的全长和截短的人密码子优化 H5HA。截短的构建体缺少膜锚定结构域。通过靶向 ER 的构建体获得最高的 HA 蛋白积累。缺少膜靶向结构域的构建体没有产生可检测的 HA。没有报道 VLP 的生产情况。

[0010] 之前 W0 2009/009876 和 W0 2009/076778 的发明人已描述了包含脂质包膜的流感 HAVLP 的生产(D'Aoust 等;两者均通过引用并入本文)。对于包膜病毒,病毒保留脂质层或膜可以是有益的。不同系统的脂质构成可以有所不同(例如植物生成的包膜病毒会在包膜中包含植物脂质或植物甾醇),这可有助于增强免疫应答。

[0011] Mason 等描述了表达 HBV 表面抗原(HBsAg)的转基因烟草中包膜 VLP 的组装(1992 年,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89,11745-11749)。已证明植物生成的 HBV VLP 在肠胃外施用时在小鼠中显示出诱导强 B 和 T 细胞免疫应答(Huang 等,2005 年,Vaccine 23,1851-1858),但饲喂实验的口服免疫仅诱导了中度的免疫应答(Smith 等,2003 年,Vaccine 21,4011-4021)。Greco(2007 年,Vaccine 25,8228-8240)证明与 HBsAg 融合的人免疫缺陷病毒(HIV)表位在转基因烟草和拟南芥(Arabidopsis)中表达时累积为 VLP,产生了二价 VLP 疫苗。

[0012] 在转基因烟草和马铃薯植株中表达病毒衣壳蛋白(NVCP)导致无包膜 VLP 的组装(Mason 等,1996 年,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93,5335-5340)。已在农杆菌浸润的本塞姆氏烟草(N. benthamiana)叶中产生了 NVCP VLP(Huang 等 2009 年,Biotechnol. Bioeng. 103,706-714),并且小鼠中证实了其口服施用后的免疫原性(Santi 等,2008 年,Vaccine 26,1846-1854)。给健康成人志愿者施用含有 215-751 μ g VLP 形式的 NVCP 的 2 或 3 剂量生马铃薯在 95%的免疫志愿者中产生免疫应答(Tacket 等 2000 年,J. Infect. Dis. 182,302-305)。还由 HBV 核心抗原(HBcAg;Huang 等,2009 年,Biotechnol. Bioeng. 103,706-714)、人乳头状瘤病毒(HPV)主要衣壳蛋白 L1(Varsani 等,2003 年,Arch. Virol. 148,1771-1786)的表达获得了无包膜 VLP。

[0013] 可期望在将 VLP 用于疫苗制备之前从植物或植物物质中存在的一些或全部蛋白质、碳水化合物等中分离 VLP。PCT 公开 W0 00/09725(Turpen 等)描述了一种从植物的细胞间隙提取蛋白质的方法,包括真空和离心处理以提供包含目的蛋白质的间质液(interstitial fluid)提取物。该方法适于能在真空和离心条件下通过孔的小蛋白质(50kDa 或更小),但不适于较大超级结构蛋白(superstructure protein)或蛋白复合物如 VLP。

[0014] 1999 年 McCormick 等(Proc Natl Acad Sci USA 96:703-708)公开了使用与单链 Fv(scFv)表位融合的大米淀粉酶信号肽将表达的蛋白质靶向到细胞外部分(compartment),随后通过对叶和茎组织进行真空过滤来回收 scFv 多肽。2008 年 Moehnke 等(Biotechnol Lett 30:1259-1264)描述了使用 McCormick 的真空过滤法通过质外体提

取从烟草中获得重组植物过敏原。PCT 公开 WO 2003/025124 (Zhang 等) 公开了在植物中表达 scFv 免疫球蛋白,其通过鼠信号序列靶向质外体空间。

[0015] 考虑到 VLP 和生产它们的植物组织的复杂性,期望有这样的 VLP 制备方法,其中 VLP 基本上不含植物蛋白质或容易与其分离,但仍保留包膜病毒的结构和免疫原特性。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明涉及制备植物来源的病毒样颗粒 (VLP) 的方法。更具体地,本发明涉及制备包含流感抗原的 VLP 的方法。

[0018] 本发明的一个目的是提供制备植物来源的病毒样颗粒的改进方法。

[0019] 本发明提供了制备植物来源之 VLP 的方法 (A),包括获取定位于质外体 (apoplast) 中的包含植物来源之 VLP 的植物或植物物质;产生原生质体 (protoplast) 和质外体级分,质外体级分包含植物来源的 VLP;回收质外体级分。该方法还可包括从质外体级分纯化植物来源之 VLP 的步骤。植物来源之 VLP 可以是嵌合的植物来源 VLP。植物来源的 VLP 可选自以下组:病毒包膜蛋白 (viral envelope protein)、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白和病毒外壳蛋白 (viral coat protein)。植物来源的 VLP 可以包含流感血凝素。

[0020] 质外体和原生质体级分可以通过用酶组合物处理植物或植物物质来产生。酶组合物可以包括一种或多种果胶酶、一种或多种纤维素酶,或者一种或多种果胶酶和一种或多种纤维素酶。此外,如期望,酶组合物不包括脂肪酶或蛋白酶,或该组合物不包括添加的脂肪酶或蛋白酶。

[0021] 植物或植物物质可以通过种植、收集或者种植并收集植物来获得。植物物质可以包括一部分或整株植物、植物细胞、叶、茎、根或培养的植物细胞中的一种或多种。

[0022] 本发明提供了如上所述 (方法 A) 制备植物来源之 VLP 的方法,其中编码 VLP 的核酸以瞬时方式引入植物,所述 VLP 选自病毒包膜蛋白、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白和病毒外壳蛋白的组。或者,核酸稳定地整合进植物基因组。

[0023] 本发明提供如上所述 (方法 A) 制备植物来源的 VLP 的方法,其还包括从质外体级分纯化植物来源的 VLP 的步骤。纯化步骤可以包括通过深层过滤 (depth filtration) 来过滤所述质外体级分以产生澄清的提取物,然后用阳离子交换树脂来层析所述澄清的提取物。

[0024] 不希望被理论所约束,从质外体获取的蛋白质较为均一,因为翻译后修饰蛋白的中间形式或包含在多种细胞内部分进行之其他类型的加工的蛋白质没有被共提取。重组蛋白均一性水平更高通常使得包含该蛋白质的制剂的质量更高,并可生成具有更高的效力、更长的半衰期或更好的免疫力的有益特性的产品。例如,与含有复合糖基化的蛋白质相比,含有高度甘露糖糖基化的血液蛋白在血液循环中被更快地被清除。产生于质外体级分的糖基化蛋白表现出更复合类型的糖基化。因此,使用本文所述方法 (其涉及细胞壁消化) 制备的质外体来源蛋白表现出,例如在循环中更长的半衰期。

[0025] 本发明还提供了制备包含植物来源之脂质包膜的植物来源 VLP 的方法 (B),所述方法包括获取包含位于质外体之 VLP 的植物或植物物质;用酶组合物处理植物或植物物质以产生原生质体级分和一种或多种质外体蛋白组合物;将所述一种或多种质外体蛋白复合物与所述原生质体级分离,其中所述一种或多种质外体蛋白复合物包含 VLP。所述酶组合物可以包含一种或多种果胶酶、一种或多种纤维素酶,或者一种

或多于一种果胶酶和一种或多于一种纤维素酶。此外,如期望,酶组合物不包含脂肪酶或蛋白酶,或该组合物不包含添加的脂肪酶或蛋白酶。植物来源的 VLP 可以是嵌合的植物来源 VLP。植物来源的 VLP 可以选自病毒包膜蛋白、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白和病毒外壳蛋白的组。植物来源的 VLP 可以包含流感血凝素。

[0026] 本发明提供了如上所述(方法 B)制备植物来源之 VLP 的方法,其中编码 VLP(选自病毒包膜蛋白、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白和病毒外壳蛋白的组)的核酸以瞬时方式引入植物。或者,核酸稳定地整合进植物基因组。

[0027] 本发明提供如上所述(方法 B)的制备植物来源的 VLP 的方法,其还包括从质外体级分中纯化植物来源的 VLP 的步骤。所述纯化步骤可以包括使用深层过滤来过滤质外体级分以产生澄清的提取物,然后用阳离子交换树脂层析所述澄清的提取物。

[0028] 植物来源 VLP 可以包含一种或更多种流感 HA 多肽。流感 HA 多肽还可以是嵌合 HA 多肽。植物来源的 VLP 还可以包含凝血活性。植物或植物物质可以通过培养、收集或者培养并收集植物来获得。所述植物物质可以包括部分或全部植物或者植物细胞、叶、茎、根或培养的细胞中的一种或多于一种。

[0029] 本发明还提供了制备植物来源的 VLP 的方法(C),包括获取包含植物来源的 VLP 的植物或植物物质,用细胞壁降解酶组合物消化所述植物物质以产生消化级分,过滤所述消化级分以产生过滤级分,从所述过滤级分中回收植物来源的 VLP。

[0030] 所述酶组合物可以包含一种或多于一种果胶酶,一种或多于一种纤维素酶,或者一种或多于一种果胶酶和一种或多于一种纤维素酶。此外,如期望,酶组合物不包含脂肪酶或蛋白酶,或该组合物不包含添加的脂肪酶或蛋白酶。植物来源的 VLP 可以是嵌合的植物来源 VLP。植物来源的 VLP 可以选自病毒包膜蛋白、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白和病毒外壳蛋白的组。植物来源的 VLP 可以包含流感血凝素。

[0031] 本发明提供了如上所述(方法 C)制备植物来源之 VLP 的方法,其中编码 VLP(选自病毒包膜蛋白、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白和病毒外壳蛋白的组)的核酸以瞬时方式引入植物。或者,核酸稳定地整合进植物基因组。

[0032] 本发明提供如上所述(方法 C)的制备植物来源的 VLP 的方法,其还包括将过滤级分中的 VLP 与细胞碎片和不溶物质分离的步骤。分离步骤可以通过离心、深层过滤或者离心并深层过滤来进行以产生澄清的级分。植物来源的 VLP 可以通过层析来进一步纯化,例如,澄清的提取物可以使用阳离子交换树脂来纯化。

[0033] 植物来源 VLP 可以包括包含一种或更多种流感 HA 多肽的 VLP。流感 HA 多肽还可以是嵌合 HA 多肽。植物来源的 VLP 还可以包含凝血活性。植物或植物物质可以通过培养、收集或者培养并收集植物来获得。所述植物物质可以包括部分或全部植物或者植物细胞、叶、茎、根或培养的细胞中的一种或多于一种。

[0034] 不希望被理论所约束,包含植物来源脂质的植物制得的 VLP 可以诱导比用其他生产系统制得的 VLP 更强的免疫反应,并且这些植物制得的 VLP 诱导的该免疫反应比活或减毒全病毒疫苗所诱导的免疫反应更强。

[0035] 从宿主细胞获得的蛋白提取物成分是复杂的,并且往往包含与待分离的目的蛋白质或超结构一起的细胞外和细胞内成分。制备质外体级分随后进行分离细胞内蛋白质和成分的步骤是有利的,因为目的蛋白质或超结构可以在制造过程中被富集和提高效力。包括

更少有效步骤的更简单过程可以显著增加产量并且降低成本。还发现用细胞壁降解酶消化细胞壁的过程提高 VLP 蛋白的产量,即使在原生质体在提取过程中不保持完整的情况下也是如此。不希望被理论所约束,细胞壁消化步骤可松动细胞壁的多聚成分,并有助于使 VLP 释放而非结合在细胞壁中。该方案还可以将细胞内成分对 VLP 的污染降到最低。

[0036] 消化植物细胞壁的方法是已知的,并且消化细胞壁的酶混合物 (enzyme cocktail mixture) 可以有所不同。本发明并不受所用的细胞壁消化方法限制。

[0037] 与使用匀浆、搅拌 (blending) 或研磨来制备植物来源之 VLP 的方法相比,本文所述方法使植物来源的 VLP 提取物受到更少的破坏和污染。本文所述方法提供植物组织的质外体级分并且可以保持原生质体及其成分的完整性。本文所述方法即使在原生质体或原生质体的一部分失去其完整性而不再完整的情况下也能有效纯化 VLP。

[0038] 与涉及标准组织破碎技术 (例如,匀浆、搅拌或研磨) 的 VLP 提取方法相比,这些方法提供更高的 VLP 产量。更高的产量可以部分归因于破坏 VLP 和 / 或脂质包膜之结构完整性的剪切力的减少。从质外体级分制备 VLP 可以是有利的,因为质外体级分具有显著降低的细胞质蛋白或不含细胞质蛋白。因此,在质外体级分中将其他蛋白质和物质 (包括 HA 单体、三聚体或 HA 片段) 与 VLP 分离可以被容易地实施。但是,即使原生质体制备物或部分原生质体制备物是不完整的, VLP 的产量增加也可以通过本文所述方法来实现。

[0039] 与通过标准组织破碎技术获得的 VLP 相比,本发明的 VLP 的特征还在于显示出更高的凝血活性。这种改进的凝血活性可归因于完整 VLP 产量更高 (溶液中游离的 HA 单体或三聚体更少)、具有完整脂质包膜的完整 VLP 产量更高,或其组合。

[0040] 与用全病毒制成的疫苗相比,用 VLP 制成的疫苗的优势在于它们是无感染性的。因此,不用考虑生物防护并且这在生产中也是不需要的。植物制备的 VLP 提供的另外一个优势是允许在温室或田间培养表达系统,从而显著地更加经济并适于扩大规模。

[0041] 此外,植物不包含参与向蛋白质合成或添加唾液酸残基的酶。VLP 可以在没有神经氨酸酶 (NA) 的情况下产生,并且不需要共表达 NA 或用唾液酸酶 (神经氨酸酶) 处理生产细胞或提取以确保植物中的 VLP 生产。

[0042] 本发明的该概述并不必然描述本发明的所有特征。

[0043] 附图简述

[0044] 本发明的这些和其他特征将从以下描述中显而易见,其中参照了以下附图:

[0045] 图 1 显示了表达 H5A/ 印度尼西亚 /5/05 血凝素的基于 CPMVHT 的表达盒 (构建体 685)。

[0046] 图 2 显示了 A) 表达 H5/Indo (构建体编号 685) 的构建体的部分 (从 PacI (35S 启动子上游) 到 AscI (紧邻 NOS 终止子的下游)) 核酸序列 (SEQ ID NO. 1)。来自 A/ 印度尼西亚 /5/2005 的 H5 的编码序列以下划线表示。图 2B 显示了构建体编号 685 编码的 H5A/ 印度尼西亚 /5/05 的氨基酸序列 (SEQ ID NO. 2)。

[0047] 图 3 显示了用体积排阻层析 (SEC) 表征的包含血凝素 (HA) 的结构。离心经消化的植物提取物之后,重悬沉淀并通过 SEC 分离。图 3A 显示了每个级分的总可溶性蛋白质含量 (实心三角形;左侧 Y-轴,最大值%;用 Bradford 法测定)。还显示了所收集级分 (实心柱;右侧 Y-轴) 的凝血活性。图 3B 显示了 SEC 洗脱级分的 SDS-PAGE 分析结果。通过丙酮沉淀级分并在分析前用 1/40 体积的还原性样品上样缓冲液重悬。用 0.1% 的考马斯 R-250

溶液对凝胶染色。纯化的 VLP 用作跑胶对照。对应于 HA0 单体的带用箭头表示。MW- 分子量标准 (kDa) ;C- 纯化的 VLP (对照) ;泳道 7 至 10 和 14 至 16 对应于图 3A 所示的 SEC 分析洗脱的级分编号。

[0048] 图 4 显示了酶消化和通过 Comitrol™ 匀浆器机械匀浆所获得的蛋白谱对比。用变性样品上样缓冲液处理样品,通过洗脱级分的 SDS-PAGE 分析分离蛋白质。用 0.1% 的考马斯 R-250 溶液对凝胶染色。MW- 分子量标准 (kDa) ;泳道 1-25 μ l 酶混合物 ;泳道 2-25 μ l 植物组织酶消化物,泳道 3- 通过 Comitrol 匀浆器获得的 5 μ l 提取物。

[0049] 图 5 显示了 HA 表达盒的核酸序列 (SEQ ID NO :9),其包括苜蓿质体蓝素启动子和 5' UTR、A/ 印度尼西亚 /5/2005 (构建体号 660) 的 H5 的血凝素编码序列、苜蓿质体蓝素 3' UTR 和终止子序列。

[0050] 图 6 显示了阳离子交换树脂捕获的直接来自质外体级分的 HA-VLP 分离物的 HA-VLP。样品用非还原变性样品上样缓冲液处理,通过 SDS-PAGE 分离蛋白质。用 0.1% 考马斯 R-250 溶液对凝胶染色。泳道 1 :离心后的质外体级分 ;泳道 2-3 :连续微过滤后的质外体级分 ;泳道 4 :阳离子交换的上样物 ;泳道 5 :阳离子交换的流出级分。泳道 6 ;阳离子交换的洗脱物,浓缩 10 倍 ;泳道 7 :分子量标准 (kDa)。

[0051] 图 7 显示了 H5/Indo VLP (A)、澄清之后没有向消化缓冲液中添加 NaCl 的 H1/Ca1 VLP (B) 和进行了该添加的 H1/Ca1 VLP (C) 的纳米颗粒跟踪分析 (Nanoparticle Tracking analysis, NTA) 谱。NTA 实验是用 NanoSight LM20 (NanoSight, Amesbury, UK) 进行的。该装置配备了蓝激光 (405nm)、样品室和 Viton 氟橡胶 O 型圈。室温下记录视频并用 NTA2.0 软件分析。样品记录 60 秒。手动选择快门和增益 (gain) 以获得最优粒子分辨率。

[0052] 图 8 显示了用不同缓冲液酶消化产生的 H3/ 布里斯班 VLP 提取物的 Western 印迹结果。泳道 1) 纯重组 HA 标准 (5 μ g, Immune Technology Corp. IT-003-0042p),泳道 2-5 包含 7 μ l 如下缓冲液中进行的离心酶提取物 :泳道 2) 600mM 甘露糖醇 +125m 柠檬酸盐 +75mM NaPO₄+25mMEDTA+0.04% 亚硫酸氢盐 (pH6.2),泳道 3) 600mM 甘露糖醇 +125mM 柠檬酸盐 +75mM NaPO₄+50mM EDTA+0.04% 亚硫酸氢盐 (pH6.2),泳道 4) 200mM 甘露糖醇 +125mM 柠檬酸盐 +75mM NaPO₄+25mMEDTA+0.03% 亚硫酸氢盐 (pH6.2),泳道 5) 200mM 甘露糖醇 +125mM 柠檬酸盐 +75mM NaPO₄+50mM EDTA+0.03% 亚硫酸氢盐 (pH6.2)。箭头代表 HA0 的免疫检测信号。

[0053] 详细描述

[0054] 本发明涉及制备植物来源的病毒样颗粒 (VLP) 的方法。更具体地,本发明涉及制备包含流感血凝素 (HA) 的 VLP 的方法。

[0055] 以下描述是一个优选的实施方案。

[0056] 本发明提供了获取目的蛋白质或蛋白超结构的方法。目的蛋白质可以存在于质外体或细胞外部分 (compartment) 中 (对应于除原生质体 / 原生质球 (spheroplast) 部分之外的植物细胞部分)。该方法包括去除、消化或者消化并去除包围植物细胞的纤维素植物细胞壁。通过消化细胞壁,细胞壁的聚合成分松动,目的蛋白质或蛋白超结构可以更容易地释放。通过使用该方法,目的蛋白质或蛋白质超结构被富集,这是由于包含的主要宿主细胞蛋白和成分的原生质体 / 原生质球部分与质外体分离。如下所述,如果在过程中原生质体 / 原生质球部分失去完整性,如果原生质体 / 原生质球部分是不完整的,如果来自原生质体 /

原生质球部分的部分宿主细胞蛋白和成分存在于质外体级分中,本文提供的方法在获得目的蛋白质或蛋白超结构方面仍然有效。

[0057] 蛋白超结构的实例是由 2 个或更多个多肽构成的结构;所述多肽可以是相同或不同的;如果是不同的,它们的存在比例可以为约 1 : 1 至约 10 : 1 或更高。蛋白超结构还可以包含一种或更多种脂质、磷脂、核酸、膜等。2 个或更多个多肽可以通过共价键、二硫键、电荷相互作用、疏水吸引力、范德华力、氢键等连接。蛋白超结构的例子是病毒样颗粒 (VLP),其可以是包膜或非包膜的,例如病毒包膜蛋白、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白或病毒外壳蛋白。

[0058] 本发明还提供了制备植物来源的病毒样颗粒 (VLP) 的方法。该方法包括获取包含定位于质外体中的植物来源 VLP 的植物或植物物质;由植物物质产生原生质体 / 原生质球级分和质外体级分,质外体级分包含植物来源的 VLP,以及回收质外体级分。如期望的话,可从质外体级分中纯化植物来源的 VLP。

[0059] 本发明还提供了制备包含植物来源的脂质包膜的 VLP 的方法。该方法包括获取包含 VLP 的植物或植物物质,用酶组合物处理植物或植物物质以产生一种或多种质外体蛋白复合物和原生质体 / 原生质球级分,将一种或多种质外体蛋白复合物与原生质体级分分离。所述一种或多种质外体蛋白复合物包含含有植物来源的脂质包膜的 VLP。

[0060] 本发明还提供了制备植物来源的 VLP 的方法,其包括获取包含植物来源的 VLP 的植物或植物物质,用细胞壁降解酶组合物消化植物物质以产生消化级分,过滤消化级分以产生过滤级分,和从过滤级分回收植物来源的 VLP。在这个方法中,原生质体的完整性可以不是必需的。

[0061] 原生质体是完全或部分去除细胞壁的植物细胞。原生质球可以部分去除细胞壁。原生质体、原生质球或原生质体和原生质球 (原生质体 / 原生质球) 均如本文所述使用,并且本文使用的这些术语是可以互换的。可以通过机械方式 (例如通过匀浆、搅拌) 破碎和去除细胞壁,可全部或部分地酶消化细胞壁,或可以通过机械和酶联合的方法去除细胞壁,例如匀浆之后用酶处理以消化细胞壁。原生质体也可以从培养的植物细胞获取,例如从液体培养的植物细胞或固体培养的植物细胞。

[0062] 给出植物组织培养物、培养的植物细胞和原生质体、原生质球生产等的一般原则的标准参考文献包括:Introduction to Plant Tissue Culture, MK Razdan 著,第二版 (Science Publishers, 2003 年;通过引用并入本文),或例如参见下述 URL : molecular-plant-biotechnology.info/plant-tissue-culture/protoplast-isolation.htm。与原生质体 (或原生质球) 的生产和操作相关的方法和技术综述于,例如, Davey MR 等, 2005 (Biotechnology Advances 23 : 131-171 ;通过引用并入本文)。给出蛋白生物化学、分子生物学等的一般方法与原则的标准参考文献包括,例如 Ausubel 等, Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1998 年和 2001 年的增刊;通过引用并入本文); Sambrook 等, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, 1989 (通过引用并入本文); Kaufman 等编., Handbook Of Molecular And Cellular Methods In Biology And Medicine, CRC Press, Boca Raton, 1995 (通过引用并入本文); McPherson 编, Directed Mutagenesis : A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1991 (通过引用并入本文)。

[0063] 消化或降解细胞壁以释放原生质体或原生质球的酶是本领域技术人员已知的,可以包括纤维素酶 (EC 3.2.1.4)、果胶酶 (EC 3.2.1.15)、木聚糖酶 (EC 3.2.1.8)、几丁质酶 (EC 3.2.1.14)、半纤维素酶或其组合。合适的酶的非限制性实例包括多组分酶的混合物,其包含纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶,例如 MACEROZYME™ (约含:纤维素酶:0.1U/mg,半纤维素酶:0.25U/mg,和果胶酶:0.5U/mg)。另一些商业化酶、酶混合物的例子和供应商列于表 1(参见:Introduction to Plant Tissue Culture, MK Razdan 第二版, Science Publishers, 2003 年)。

[0064] 替代性的纤维素酶的名称和种类包括内-1,4- β -D-葡聚糖酶; β -1,4-葡聚糖酶; β -1,4-葡聚糖内切水解酶;纤维素酶 A;cellulosin AP;葡聚糖内切酶 D,碱性纤维素酶;纤维素酶 A3;纤维素糊精酶 (cellulodextrinase);9.5 纤维素酶;微晶纤维素酶;pancellase SS 和 1,4-(1,3;1,4)- β -D-葡聚糖 4-葡聚糖水解酶。替代性的果胶酶(多聚半乳糖醛酸酶)的名称和种类包括果胶去聚合酶;果胶酶;多聚半乳糖醛酸内切酶;果胶酶 (pectolase);果胶水解酶;果胶多聚半乳糖醛酸酶;多聚半乳糖醛酸内切酶;多聚- α -1,4-半乳糖醛酸聚糖水解酶;半乳糖醛酸内切酶;内-D-半乳糖醛酸酶和多聚(1,4- α -D-半乳糖醛酸)聚糖水解酶。替代性的木聚糖酶的名称和种类包括半纤维素酶,内-(1 $\rightarrow$ 4)- β -木聚糖 4-木聚糖水解酶;内-1,4-木聚糖酶;木聚糖酶; β -1,4-木聚糖酶;内-1,4-木聚糖酶;内- β -1,4-木聚糖酶;内-1,4- β -D-木聚糖酶;1,4- β -木聚糖木聚糖水解酶; β -木聚糖酶; β -1,4-木聚糖木聚糖水解酶;内-1,4- β -木聚糖酶; β -D-木聚糖酶。替代性的几丁质酶的名称和种类包括几丁质糊精酶;1,4- β -多聚-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶;多聚- β -氨基葡萄糖苷酶; β -1,4-多聚-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶;多聚[1,4-(N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶)]聚糖水解酶。

[0065] 表 1:用于原生质体分离的市售酶的非限制性实例

[0066]

酶	来源	供应商
纤维素酶		
纤维素酶ONOZUKA R-10	绿色木霉 (<i>Trichoderma viride</i>)	Kinki Yakult Mfg. Col. Ltd. 8-12, Shinglkancho Nishinomiya, Japan
纤维素酶ONOZUKA RS	绿色木霉	Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan
纤维素酶YC	绿色木霉	Seishin Pharma Co. Ltd. 9-500-1, Nagareyama Nagareyama-shi, Chiba-kan, Japan
纤维素酶CEL	绿色木霉	Cooper Biomedical Inc. Malvern, PA, USA
Cellulysin	绿色木霉	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Driselase	<i>Irpex lacteus</i>	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan
Melcelase P-1	绿色木霉	Meiji Seiki Kaisha Ltd. No.8, 2-Chome Kyobashi, Chou-Ku, Japan
Multifect CX GC	绿色木霉	Genencor
Multifect CX B	绿色木霉	Genencor
半纤维素酶		
Hellcase	罗马蜗牛 (<i>Helix pomatia</i>)	Industrie Biologique Francaise, Gennevilliers, France
半纤维素酶	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
半纤维素酶H-2125	根霉属 (<i>Rhizopus</i> sp.)	Sigma, Munchen
Rhozyme HP 150	黑曲霉	Genencor Inc., South San Francisco, CA, USA

[0067]

果胶酶		
MACERASE	少根根霉 (<i>Rhizopus arrhizus</i>)	Calbiochem, San Diego, CA, USA
MACEROZYME R-10	少根根霉	Yakult Honsha Co., Tokyo, Japan
Multifect果胶酶FE	黑曲霉	Genencor
PATE	多粘芽孢杆菌 (<i>Bacillus polymyza</i>)	Farbwerke-Hoechst AG, Frankfurt, FRG
Pectinol	曲霉属 (<i>Aspergillus</i> sp.)	Rohm and Haas Co. Independence Hall West, Philadelphia, PA 19105, USA
Pectolyase Y-23	<i>Aspergillus japonicus</i>	Seishin Pharma Co. Ltd., Japan
Zymolyase	藤黄节杆菌 (<i>Arthrobacter luteus</i>)	Sigma Chemical Co., USA

[0068] 特定的酶或酶组合以及浓度和反应条件的选择可取决于用于获取原生质体和包含 VLP 的质外体级分的植物组织的类型。使用纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶的混合物 (例如, 果胶酶 MACEROZYME™ 或 Multifect) 的浓度范围可以是 0.01% 至 2.5% (v/v), 例如 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4 或 2.5% (v/v) 或其间任意值。MACEROZYME™ 或 Multifect 可以单独使用, 与其他酶 (例如纤维素酶、果胶酶、半纤维素酶或其组合) 联合使用。使用纤维素酶的浓度范围可以是 0.1% 至 5%, 例如 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25、1.5、1.75、2.0、2.25、2.5、2.75、3.0、3.25、3.5、3.75、4.0、4.25、4.5、4.75、5.0% (w/v) 或其间任意值。

[0069] 酶溶液 (或称为细胞壁降解组合物, 消化溶液) 通常包含缓冲剂或缓冲体系、渗透剂和一种或多种盐、二价阳离子或其他添加剂。选择缓冲剂或缓冲体系将 pH 维持在适于酶活性和蛋白或 VLP 稳定性的范围内, 以在例如在约 pH5.0 至约 8.0 或其间任意值的范围内纯化。所选的 pH 可以根据待回收的 VLP 而异, 例如 pH 可以是 5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0 或其间任意 pH。缓冲剂或缓冲体系的例子包括但不限于 MES、磷酸盐、柠檬酸盐等。一种或更多种缓冲剂或缓冲体系可以与酶溶液 (消化溶液) 组合; 一种或更多种缓冲剂存在的浓度可以是 0mM 至约 200mM 或其间任意值, 例如 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180 或 190mM 或其间任意值。根据适用程度, 如期望的话可以添加渗透剂成分。选择渗透剂及其浓度以提高酶溶液的渗透强度。渗透剂的例子包括甘露糖醇、山梨醇或其他糖醇, 聚合物长度不同的聚乙二醇 (PEG) 等。渗透剂的浓度范围根据植物物种、使用的渗透剂类型和所选植物组织类型 (来源的物种或组织, 例如叶或茎) 而异——通常范围为 0M 至约 0.8M, 例如 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4、0.5、0.6、0.7 或 0.75M 或其间任意值, 例如 0、50、100、150、

200、250、300、350、400、450、500、550、600mM 甘露糖醇或其任意值。渗透剂的浓度也可用百分比 (w/v) 表示。对于某些植物或组织类型,采用稍高渗的制剂可以是有利的,这可以促进植物细胞的质膜与细胞壁分离。在消化过程中也可以省略渗透剂。

[0070] 另一个为植物消化设置的参数是温度。如期望的话,可以在消化过程中控制温度。有用的温度范围应在 4℃ 至 40℃ 之间或其任意温度,例如约 4℃ 至约 15℃ 或其任意值,或约 4℃ 至约 22℃ 或其任意温度。根据选择的温度,可以调整其他消化实验参数以保持最佳的提取条件。

[0071] 可以添加阳离子、盐或二者以提高质膜稳定性,例如浓度为 0.5–50mM 或其任意值的二价阳离子 (如 Ca^{2+} 或 Mg^{2+}),约 0 至约 750mM 或其任意值 (例如 10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、600、700 或 750mM) 的盐 (如 CaCl_2 、 NaCl 、 CuSO_4 、 KNO_3 等)。可以添加的其他添加剂包括螯合剂 (例如但不限于,约 0 至约 200mM 或其任意值 (例如 5、10、15、20、25、50、75、100、125、150、175、200mM 或其任意值) 的 EDTA、EGTA),防止氧化的还原剂 (例如但不限于,0.005–0.4% 或其任意值 (例如 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4% 或其任意值) 的亚硫酸氢钠或抗坏血酸),特定的酶抑制剂 (参见下文) 以及 (如期望的话) 叶老化抑制剂,例如环己酰亚胺、激动素或一种或更多种聚胺。

[0072] 消化溶液还可以包含一种或更多种约 0 至约 600mM 的甘露糖醇、约 0 至约 500mM 的 NaCl 、约 0 至约 50mM 的 EDTA、约 1% 至约 2% v/v 的纤维素酶、约 0 至约 1% v/v 的果胶酶、约 0.03 至约 0.04% 的焦亚硫酸钠、约 0 至约 125mM 的柠檬酸盐或约 0 至 75mM 的 NaPO_4 。

[0073] 可以处理植物物质以提高酶或酶组合物对植物细胞壁的接近程度。例如,在用酶组合物处理之前可将叶的表皮去除或“剥离”。可以将植物物质切成小块 (手工地,或用粉碎或切削装置如 Urschel 切片机);切碎的植物物质可以在部分真空下进一步用酶组合物渗透 (Nishimura 和 Beevers 1978 年, *Plant Physiol* 62:40–43;Newell 等, 1998 年, *J. Exp. Botany* 49:817–827)。在酶组合物处理之前或过程中可以对植物组织施加机械扰动 (Giridhar 等, 1989 年, *Protoplasma* 151:151–157)。另外,可以使用培养的细胞 (无论是液体培养物还是固体培养物) 制备原生质体或原生质球。

[0074] 期望使用缺少脂肪酶或蛋白酶或者含有灭活的脂肪酶或蛋白酶的酶组合物。在一些实施方案中,酶组合物中可以包含一种或更多种蛋白酶或脂肪酶抑制剂。脂肪酶抑制剂的例子包括 RHC80267 (SigmaAldrich);蛋白酶抑制剂的例子包括 E-64、 Na_2EDTA 、胃酶抑素 (Pepstatin),抑肽酶 (aprotinin)、PMSF、Pefabloc、亮抑蛋白酶肽 (Leupeptin), bestatin 等。

[0075] 可使用混合或搅拌酶组合物中植物物质的任何适合方法。例如,植物物质可以在碟或盘上或通过旋转摇荡器轻轻地转动或摇动,在旋转或摆动的圆桶中翻滚。在将原生质体 (和 / 或原生质球) 从消化液中移出之前应小心处理,以将对它们的损伤降低到最低。应相应地选择消化容器。

[0076] 作为一个非限制性的例子,可以使用在 500mM 甘露糖醇、10m CaCl_2 和 5mM MES (pH 5.6) 中包含 1.5% 纤维素酶 (Onozuka R-10) 和 0.375% 的 MACEROZYME™ 的酶组合物来从一些烟草 (*Nicotiana*) 组织制备原生质体 (或原生质球)。如本文所述,甘露糖醇的浓度也可以为约 0 至约 500mM 或其任意值不等。本领域普通技术人员在知晓本文公开的信息

后,可以针对烟草或用于制备 VLP 的其他物种的年龄和株系决定合适的酶组合物。

[0077] 破碎细胞壁或部分消化细胞壁后,获得原生质体级分(包含原生质体和/或原生质球)和“质外体级分”。或者,可以获得“消化级分”。如下所述,对于本文所述的蛋白质高产量制备,原生质体级分的完整性可以不是必需的,因此,可使用质外体级分或消化级分提取蛋白质,例如但不限于 VLP、病毒包膜蛋白、病毒结构蛋白、病毒衣壳蛋白、病毒外壳蛋白。

[0078] “质外体级分”是指在渗透剂和/或其他可用于协助保持原生质体完整性的成分的存在下,使用细胞壁降解酶消化或部分酶消化植物物质后获得的级分。质外体级分可以包含破碎的原生质体(或原生质球)产生的一些成分。例如,质外体级分可以包含约 0 至约 50% (v/v) 或其间任意量的原生质体级分的成分,或 0、0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、或 50% (v/v) 或其间任意量的原生质体级分的成分。

[0079] “消化级分”是指使用细胞壁降解酶消化或部分酶消化植物物质后剩余的级分,但是,原生质体的完整性不是必需的,消化级分可以包含完整的、破碎的或者完整的和破碎的原生质体。用于产生消化级分的包含细胞壁降解酶的组合物可以包含渗透剂,或者渗透剂存在的量可以比用于获得原生质体的标准方法中使用的量少,或组合物中不存在渗透剂。消化级分包含质外体级分和原生质体/原生质球级分,但原生质体/原生质球级分可以是或不是完整的。消化级分包含细胞内成分和细胞外成分。如果使用渗透剂来保持原生质体/原生质球的完整性,则可发现细胞内成分为原生质体/原生质球形式。如果消化溶液中没有渗透剂,则原生质体/原生质球可能被破坏并且消化级分中细胞内和细胞外成分可能合并在一起。如本文所述,可以通过任何合适的技术从消化级分的成分中分离 VLP。不希望被理论所约束,细胞壁消化步骤可松动细胞壁的多聚成分并协助释放 VLP,使它们不会被约束在细胞壁内。该方案也可以最大限度地减少细胞内成分对 VLP 的污染。可以在酶消化之后用低速离心然后过滤、深层过滤、沉降、沉淀(例如但不限于硫酸铵沉淀)或其组合来将 VLP 与细胞碎片分离,以获得包含目的蛋白质或超结构蛋白的分离级分。

[0080] 如果采用渗透剂,则可以用任何合适的技术(例如但不限于离心、过滤、深层过滤、沉降、沉淀或其组合)将原生质体/原生质球级分或包含原生质体的级分与质外体级分分离,来获得包含 VLP 和/或包含含有 VLP 之原生质体/原生质球的分离级分。

[0081] 可以使用任何合适的技术(例如但不限于离心、过滤、深层过滤、沉降、沉淀或其组合)将原生质体(和原生质球)级分或包含原生质体的级分与质外体级分分离,以获得分离的级分。

[0082] 分离级分可以是例如上清液(如果是离心、沉降或沉淀的话)或滤液(如果是过滤的话),并且富含 VLP。分离级分可被进一步处理,以通过例如另外的离心步骤、沉淀、层析步骤(例如体积排阻、离子交换层析)、切向流过滤或其组合来分离、纯化、浓缩(或其组合)VLP。纯化的 VLP 的存在可通过例如非变性 PAGE 或 SDS-PAGE、使用合适的检测抗体的 Western 分析、毛细管电泳或本领域技术人员显而易见的其他方法证实。

[0083] 质外体是质膜外的植物细胞部分,并且包含细胞壁和植物的细胞间隙。虽然优选在消化和进一步处理过程中保持原生质体(和/或原生质球)的完整性,但对于富集 VLP 来说,保持原生质体完整不是必需的。

[0084] 在合成过程中,VLP 被排出到质膜外。VLP 的平均大小为约 20nm 至 1 μ m 或其间任意量,例如 60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、120、130、140、150、160、170、180、190

或 200nm, 或其间任意量, 例如 100nm, 并且可包含脂质膜。由于它们的大小, 一旦合成, VLP 可能被困于质膜和细胞壁之间, 可能无法使用用于获得植物蛋白质的标准机械方法进行分离或进一步纯化。为了将产量最大化, 有利的可以是细胞蛋白质对 VLP 级分的污染最小化, 保持 VLP 和 (在一些实施方案中) 结合的脂质包膜或膜的完整性, 将对原生质体 (和 / 或原生质球) 的机械损伤最小化的破坏细胞壁释放 VLP 的方法, 例如本文所述的酶法。但是, 在处理过程中保持所有的原生质体的完整性不是必需的。

[0085] 根据本发明的一些方面在植物中产生的 VLP 可以与植物来源的脂质复合。VLP 可以包含 HA0 前体形式, 或者 HA1 或 HA2 结构域通过二硫桥保持在一起的形式。植物来源的脂质可以是脂双层的形式, 并且还可以包含围绕 VLP 的包膜。植物来源的脂质可包括产生 VLP 之植物的质膜脂质成分, 包括但不限于磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、鞘糖脂、植物甾醇或其组合。植物来源的脂质可互换地称为 ‘植物脂质’。植物甾醇的例子在本领域已知, 包括例如豆甾醇、谷甾醇、24- 甲基胆固醇和胆固醇 (Mongrand 等, 2004 年, J. Biol Chem 279 :36277-86)。

[0086] 对于 VLP 的组装, 期望病毒结构蛋白 (如 HA) 正确折叠并且形成 HA 三聚体。向对象施用, 相对于施用结构蛋白质单体, VLP (尤其是包含植物来源的脂质包膜的 VLP) 可以提供更优的免疫应答。

[0087] 在一些实施方案中, 可以将多肽的表达靶向植物的任意细胞内或细胞外空间、细胞器或组织。为了将表达的多肽定位到特定位置, 编码多肽的核酸可以与编码信号肽的核酸序列相连。信号肽也可称为转运肽或信号序列。引导表达的多肽定位于质外体的信号肽或肽序列包括但不限于大米淀粉酶信号肽 (McCormick 1999 年, Proc Natl Acad Sci USA 96 :703-708)、氨基酸序列如下的蛋白二硫键异构酶信号肽 (PDI) :

[0088] MAKNVAI FGLLFSL LLLVPSQIF AEE ;SEQ ID NO. 10,

[0089] 植物发病相关蛋白 (plant pathogenesis related protein, PRP ;Szyperski 等 PNAS 95 :2262-2262) 例如烟草植物发病相关蛋白 2 (PRP)、人单克隆抗体信号肽 (SP) 或任何天然血凝素信号肽。

[0090] 在一些例子中, 例如多肽在没有信号肽或转运肽的情况下表达并分泌时, 表达的多肽可以在特定的细胞内或细胞外空间 (如质外体)、细胞器或组织中累积。

[0091] 术语 “病毒样颗粒” 或 “VLP” (virus-like particle) 是指自组装并且包含病毒表面蛋白 (例如流感 HA 蛋白或嵌合流感 HA 蛋白) 的结构。VLP 和嵌合 VLP 通常在形态和抗原性上类似于感染中产生的病毒粒, 但缺乏足以进行复制的遗传信息, 从而不具备感染性。可以在适合的宿主细胞 (包括植物宿主细胞) 中生产 VLP 和嵌合 VLP, 如期望进行进一步纯化。

[0092] 尽管本文中示例了流感 VLP 和嵌合流感 VLP, 本文所述方法可用于定位于或分泌到质外体的任何植物来源的 VLP。

[0093] “嵌合蛋白” 或 “嵌合多肽” 是指包含两种或多种来源 (例如但不限于融合为单个多肽的两种或更多种流感类型或亚型) 的氨基酸序列的蛋白或多肽。嵌合蛋白或多肽可以包含与多肽或蛋白的其余部分相同来源 (即天然) 或异源的信号肽。嵌合蛋白或嵌合多肽可作为嵌合核苷酸序列的转录本产生并保持完整, 或如果需要的话, 嵌合蛋白或嵌合多肽可以在合成后被切割。完整的嵌合蛋白或嵌合蛋白之经切割部分可以结合形成多聚体

蛋白。嵌合蛋白或嵌合多肽还可以包括含有经二硫桥连接之亚基的蛋白质或多肽（即多聚蛋白）。例如，包含两种或多于两种来源的氨基酸序列的嵌合多肽可被加工成亚基，并且所述亚基通过二硫桥相连来形成嵌合蛋白或嵌合多肽。

[0094] 多肽可以是流感血凝素（HA），并且构成多肽的两种或多于两种氨基酸序列中的每个均可获得自不同的 HA，从而产生嵌合 HA 或嵌合流感 HA。嵌合 HA 还可以包含含有异源信号肽（其在合成后被切割）的氨基酸序列（嵌合 HA 前体蛋白）。可用于本发明的 HA 蛋白的例子可参见 WO 2009/009876；WO 2009/076778；WO 2010/003225（通过引用并入本文）。编码嵌合多肽的核酸可称为“嵌合核酸”或“嵌合核苷酸序列”。由嵌合 HA 构成的病毒样颗粒可称为“嵌合 VLP”。嵌合 VLP 还在 PCT 申请号 PCT/CA2010/000983（于 2010 年 6 月 25 日提交）和美国临时申请号 61/220,161（于 2009 年 6 月 24 日提交；通过引用并入本文）中描述。VLP 可从天然或嵌合 HA 的表达获得。

[0095] 按照本发明提供方法制备的 VLP 的 HA 包括已被开发或鉴定的已知序列和变体 HA 序列。另外，如本文所述制备的 VLP 不包含神经氨酸酶（NA）或其他如 M1（M 蛋白）、M2、NS 等的成分。但是，如果期望获得包含 HA 和 NA 的 VLP，可以将 NA 和 M1 与 HA 共表达。

[0096] 通常，术语“脂质”指脂溶性（亲脂）天然分子。按照本发明的某些方面在植物中产生的嵌合 VLP 可以与植物来源的脂质复合。植物来源的脂质可以是脂双层的形式，并且还可以包含围绕 VLP 的包膜。植物来源的脂质可包括生成 VLP 的植物的质膜脂质成分，包括磷脂，三、二和单酸甘油酯以及脂溶性甾醇或包含甾醇的代谢物。例子包括磷脂酰胆碱（PC）、磷脂酰乙醇胺（PE）、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、鞘糖脂、植物甾醇或其组合。或者植物来源的脂质可称为“植物脂质”。植物甾醇的例子包括菜油甾醇、豆甾醇、麦角甾醇、菜子甾醇、 δ -7-豆甾醇、 δ -7-燕麦甾醇、daunosterol、谷甾醇、24-甲基胆固醇、胆固醇或 β -谷甾醇（Mongrand 等，2004 年，J. Biol Chem 279:36277-86）。如本领域技术人员易于理解的，细胞质膜的脂质构成可随获得细胞的细胞或有机体或物种的培养或生长条件而异。

[0097] 细胞膜通常包含脂双层以及多种功能的蛋白质。可以在脂双层中发现特定脂质的局部聚集，称为‘脂质筏’。这些脂质筏微结构域可以富含鞘脂和甾醇。不希望被理论所约束，脂质筏可以在胞吞和胞吐、病毒或其他感染物的进出、细胞间信号转导、与细胞或有机体的其他结构成分（如细胞内和细胞外基质）的相互作用中起重要作用。

[0098] 之前 WO 2009/009876；WO 2009/076778 和 WO 2010/003225（通过引用并入本文）已描述了包含脂质包膜的 VLP。对于流感病毒，本文所用术语“血凝素”或“HA”指流感病毒颗粒的结构糖蛋白。本发明的 HA 可从任何亚型获得。例如，HA 可以是亚型 H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15 或 H16，或乙型或丙型流感。本发明的重组 HA 还可以包含基于任何血凝素序列的氨基酸序列。已很好地研究了流感血凝素的结构，并证明在二级、三级和四级结构上高度保守。甚至可以在氨基酸序列改变的情况下发现这种结构保守性（参见例如，Skehel 和 Wiley，2000 年 Ann Rev Biochem 69:531-69；Vaccaro 等 2005 年；通过引用并入本文）。编码 HA 的核苷酸序列是公知的并且可获得，例如从生物防御和公众健康数据库（BioDefense and Public Health Database）（现为流感研究数据库；Squires 等，2008 年 Nucleic Acids Research 36:D497-D503）例如 URL 为：biohealthbase.org/GSearch/home.do?decorator=Influenza）或由国家生物技术信息中心维护的数据库（NCBI；例如 URL 为：ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=

nucore&cmd = search&term = influenza), 两者均通过引用并入本文。

[0099] 本发明还涉及制备、分离或者制备并分离 VLP 的方法, 所述 VLP 包括感染人或宿主动物 (例如灵长类动物、马、猪、鸟、绵羊、鸟类水禽、候鸟、鹌鹑、鸭、鹅、家禽、鸡、骆驼、犬科动物、狗、猫科动物、猫、虎、豹、麝猫、貂、石貂、雪貂、家养宠物、牲畜、小鼠、大鼠、海豹、鲸等) 的病毒的流感 VLP。一些流感病毒可以感染多于一种宿主动物。

[0100] 流感病毒血凝素可以耐受氨基酸变化。这种变化提供了不断被鉴定出的新毒株。新毒株之间感染力可不同。然而, 随后形成 VLP 的血凝素三聚体的形成被保留。本发明还包括制备任何植物来源的 VLP (无论 HA 亚型或序列或者形成 VLP 的嵌合 HA 或者物种来源为何) 的方法。

[0101] 血凝素的正确折叠对于蛋白质的稳定性、多聚体的形成、VLP 的形成和 HA 的功能 (凝血能力) 以及其他流感血凝素特性可以是重要的。蛋白质的折叠可被一个或更多个因素影响, 包括但不限于蛋白质序列, 蛋白质的相对丰度, 细胞内拥挤的程度, 可以结合折叠、部分折叠或未折叠蛋白质或与其短暂相关联的辅因子的可利用性, 一种或更多种伴侣蛋白的存在等。

[0102] 热休克蛋白 (Hsp) 或应激蛋白是伴侣蛋白的例子, 它可参与多种细胞过程, 包括蛋白质合成、细胞内转运、防止错误折叠、防止蛋白质聚集、蛋白复合物的组装和解组装、蛋白质折叠和蛋白质解聚。这种伴侣蛋白的例子包括但不限于 Hsp60、Hsp65、Hsp 70、Hsp90、Hsp100、Hsp20-30、Hsp10、Hsp100-200、Hsp100、Hsp90、Lon、TF55、FKBP、亲环素、ClpP、GrpE、泛素、钙联蛋白和蛋白质二硫键异构酶 (参见例如, Macario, A. J. L., Cold Spring Harbor Laboratory Res. 25 :59-70. 1995 年; Parsell, D. A. & Lindquist, S. Ann. Rev. Genet. 27 : 437-496 (1993); 美国专利号 5, 232, 833)。伴侣蛋白 (例如但不限于 Hsp40 和 Hsp70) 可用于保证嵌合 HA 的折叠 (PCT 申请号 PCT/CA2010/000983, 于 2010 年 6 月 25 日提交, 美国临时申请号 61/220, 161, 于 2009 年 6 月 24 日提交; WO2009/009876 和 WO 2009/076778, 以上均通过引用并入本文)。还可以使用蛋白质二硫键异构酶 (PDI; 登录号 Z11499)。

[0103] 回收后, 可通过例如但不限于电子显微镜、光散射、体积排阻层析、HPLC、Western 印迹分析或电泳来评估 VLP 的结构、大小效力或活性。用于评价 VLP 的大小、浓度、活性和构成的这些和其他评估方法是本领域公知的。

[0104] 对于制备型体积排阻层析, 可通过本文所述方法获得包含 VLP 的制备物, 并且通过离心去除不溶性物质。用 PEG 沉淀也可以是有益的。回收的蛋白质可通过常规方法 (例如, Bradford 测定、BCA) 定量, 提取物流经体积排阻柱 (例如使用 SEPHACRYL™、SEPHADEX™ 或类似基质), 并且收集级分。可以用 Blue Dextran 2000 或合适蛋白质作为校正标准。还可以将提取物通过阳离子交换柱并且收集活性成分。层析后, 可根据期望通过蛋白质电泳、免疫印迹或两者来进一步分析级分, 以确认级分中 VLP 和蛋白质补充物的存在。

[0105] 可通过本领域公知的方法, 使用凝血测定评估包含 VLP 之级分的凝血活性。不希望被理论所约束, HA 结合不同动物来源的 RBC 的能力被 HA 对唾液酸 α 2,3 或 α 2,3 的亲合力和 RBC 表面上这些唾液酸的存在所驱动。马类和禽类的流感病毒 HA 凝集所有几种物种 (包括火鸡、鸡、鸭、豚鼠、人、绵羊、马和牛) 的红细胞; 而人 HA 结合火鸡、鸡、鸭、豚鼠、人和绵羊的红细胞 (Ito T. 等, 1997 年, Virology, 227 :493-499; Medeiros R 等, 2001 年. Virology 289 :74-85)。

[0106] 凝血抑制 (HI 或 HAI) 测定也可用于证实疫苗或疫苗组合物 (包含嵌合 HA 或可通过重组 HA 抑制红细胞 (RBC) 凝集的嵌合 VLP) 所诱导的抗体的效力。可通过微滴定 HAI (Aymard 等 1973 年) 评价血清样品的凝血抑制性抗体效价。可以使用几种物种 (例如马、火鸡、鸡等) 中任意一种的红细胞。该测定给出 VLP 表面 HA 三聚体组装的间接信息, 以确认 HA 上抗原性位点的正确呈递。

[0107] 也可使用交叉反应性 HAI 效价证明对与疫苗亚型相关的其他病毒株的免疫应答效力。例如, 用包含含有第一流感类型或亚型之 HDC 的嵌合血凝素的疫苗组合物免疫的对象的血清可用在用第二株完整病毒或病毒颗粒进行的 HAI 测试中, 并且测定 HAI 效价。

[0108] 包含 VLP 的转基因植物、植物细胞、植物物质或种子的转化和再生方法已在本领域中建立并为本领域技术人员所知。获得转化和再生植物的方法并非本发明的关键。

[0109] “转化”是指表现为基因型、表型或两者兼有的遗传信息 (核苷酸序列) 在种间的转移。遗传信息从嵌合构建体到宿主的种间转移可以是可遗传的 (即整合到宿主的基因组中), 并且认为遗传信息的转移是稳定的, 或者转移可以是瞬时的而且该遗传信息的转移是不可遗传的。

[0110] 术语“植物物质”是指来源于植物的任何材料。植物物质可以包括整个植物、组织、细胞或任何其部分。此外, 植物物质可以包括细胞内植物成分、细胞外植物成分, 植物的液体或固体提取物或其组合。另外, 植物物质可以包括来自植物的叶、茎、果实、根或其组合的植物、植物细胞、组织、液体提取物或其组合。植物物质可以包括没有经受任何处理步骤的植物或其部分。植物部分可以包括植物物质。植物或植物物质可以通过任何方法收集或获得, 例如, 可使用整个植株或者特别地移取以用于所述方法的叶或其他组织。表达和分泌 VLP 的转基因植物也可以作为本文所述方法的原料使用。

[0111] 本发明的构建体可通过 Ti 质粒、Ri 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、显微注射、电穿孔、渗入等引入植物细胞。此类技术的综述参见例如 Weissbach 和 Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academy Press, New York VIII, 421-463 页 (1988 年); Geier 和 Corey, *Plant Molecular Biology*, 第二版 (1988); Miki 和 Iyer, *Fundamentals of Gene Transfer in Plants*, Plant Metabolism, 第二版. DT. Dennis, DH Turpin, DD Lefebvre, DB Layzell 编, Addison-Wesley, Langmans Ltd. London, pp. 561-579 (1997)。其他方法包括直接 DNA 摄取、使用脂质体、电穿孔例如用原生质体、显微注射、微弹 (microprojectile) 或晶须 (whisker) 和真空渗入。参见例如, Bilang 等 (*Gene* 100 : 247-250 (1991 年)), Scheid 等 (*Mol. Gen. Genet.* 228 : 104-112, 1991 年), Guerche 等 (*Plant Science* 52 : 111-116, 1987 年), Neuhauser 等 (*Theor. Appl. Genet.* 75 : 30-36, 1987 年), Klein 等, *Nature* 327 : 70-73 (1987 年); Howell 等 (*Science* 208 : 1265, 1980 年), Horsch 等 (*Science* 227 : 1229-1231, 1985 年), DeBlock 等, *Plant Physiology* 91 : 694-701, 1989 年), *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach 和 Weissbach, eds., Academic Press Inc., 1988), *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler 和 Zielinski 编, Academic Press Inc., 1989 年), Liu 和 Lomonosoff (*J. Virol. Meth.* 105 : 343-348, 2002 年), 美国专利号 4,945,050 ; 5,036,006 ; 5,100,792 ; 6,403,865 ; 5,625,136, 均通过引用并入本文。

[0112] 可以使用瞬时表达法表达本发明的构建体 (参见 Liu 和 Lomonosoff, 2002,

Journal of Virological Methods, 105:343-348; 通过引用并入本文)。或者, 可以使用基于真空的瞬时表达方法(描述于 PCT 公开 W000/063400、W0 00/037663(通过引用并入本文))。这些方法可以包括, 例如但不限于农杆菌接种或农杆菌渗入法, 但是, 还可使用如上所述的其他瞬时方法。对于农杆菌接种或农杆菌渗入, 包含期望核酸的农杆菌(Agrobacteria)混合物进入组织(例如叶、植物的地上部分(包括茎、叶和花)、植物的其他部分(茎、根、花))或整个植株的细胞间隙。穿过表皮后, 农杆菌侵染并将 t-DNA 拷贝传递进细胞。t-DNA 被附加转录并且 mRNA 被翻译, 使得所侵染细胞产生目的蛋白质, 但 t-DNA 在细胞核内的传代是瞬时的。

[0113] 通过本发明方法制备的流感 VLP 可与现有流感疫苗联合使用, 以补充该疫苗使其更为有效或者降低所需的施用剂量。如本领域技术人员已知的, 疫苗可针对一种或多于一种的流感病毒。合适疫苗的例子包括但不限于, 从 Sanofi-Pasteur、ID Biomedical、Merial、Sinovac、Chiron、Roche、MedImmune、GlaxoSmithKline、Novartis、Sanofi-Aventis、Serono、Shire Pharmaceuticals 等购得的那些。

[0114] 如期望的话, 本发明的 VLP 可以与本领域技术人员已知的合适佐剂相混合。此外, VLP 可用于疫苗组合物中, 该组合物包含用于治疗上述目标生物的有效剂量的 VLP。另外, 根据本发明生产的 VLP 可与其他蛋白成分共表达或与其他 VLP 或流感蛋白质成分(例如神经氨酸酶(NA)、M1 和 M2)重组。它也可以与其他疫苗蛋白(例如疟疾抗原、HIV 抗原、呼吸道合胞体病毒(Rsv)抗原等)制得的 VLP 共表达或重组。

[0115] 本文所述的序列总结如下。

[0116]

SEQ ID NO:	描述	图
1	核酸序列 (构建体685)	2A
2	SEQ ID NO: 1编码的氨基酸序列	2B
3	pBinPlus.2613c: AGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAG	
4	Mut-ATG115.r: GTGCCGAAGCACGATCTGACAACGT TGAAGATCGCTCACGCAAGAAAGACAAGAGA	
5	Mut-ATG161.c: GTTGTCAGATCGTGCTTCGGCACCAGTACAA CGTTTTCTTTCACTGAAGCGA	
6	LC-C5-1.110r: TCTCCTGGAGTCACAGACAGGGTGG	
7	Apal-H5 (A-Indo).1c: TGTCGGGGCCCATGGAGAAAATAGTGC TTCTTCTTGCAAT	
8	H5 (A-Indo)-StuI.1707r: AAATAGGCCTTTAAATGCAAATTC TGCATTGTAACGA	
9	核酸序列 (构建体660)	5
10	PDI 信号肽 : MAKNVAI FGLLFSLLL VPSQIF AEE	
11	Plasto-443c	
12	supP19-plasto.r	
13	supP19-1c	

14	SupP19-SacI.r	
----	---------------	--

[0117] 本发明将在下面实施例中进一步说明。然而,应理解这些实施例仅用于说明目的,不应以任何方式用于限制本发明的范围。

[0118] 表达盒的组装

[0119] 可用于生成 VLP 的构建体描述于美国临时申请号 61/220, 161 (于 2009 年 6 月 24 日提交)、W0 2009/009876、W0 2009/076778 和 W02010/003225, 它们均通过引用并入本文。构建体还可以包括表 2 所列的那些。这些构建体的组装描述于 W0 2009/009876、W0 2009/076778、W02010/003225 和 US 61/220, 161。但还可以将包含已知 HA 的其他构建体 (包括但不限于表 2 提供的那些) 与相似或不同调控元件和启动子相组合使用来生成本文所述的 VLP。

[0120] 表 2: 可用于生成血凝素的构建体的非限制性实例。

[0121]

表达盒编号	对应的 HA	HA 简写
540	A/新喀里多尼亚/20/99 株(H1N1)的 SpPDI-H1	H1/NC
560	2X35S/CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 SpPDI-H1 A/加利福尼亚/4/2009	H1/Cal WT
580	2x35S/CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 SpPDI-H1 A/新喀里多尼亚/20/99	H1/NC
660	A/印度尼西亚/5/2005 株(H5N1)的 H5	H1/Indo
663	H5 A/印度尼西亚/5/2005	H1/Indo
685	CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 H5 A/印度尼西亚/5/2005	H1/Indo
686	CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 SpPDI-H5 A/印度尼西亚/5/2005	H1/Indo
690	H5 A/印度尼西亚/5/05 骨架中的 H1 A/布里斯班/59/07 受体结合(RB)结构域	H1/Bris
691	H5 A/印度尼西亚/5/05 骨架中的 H1 A/布里斯班/59/07 酯酶和受体结合结构域(E1-RB-E2)	H1/Bris
696	H1 A/新喀里多尼亚/20/99 骨架中的 H5 A/印度尼西亚/5/05 受体结合(RB)结构域	H1/Indo
732	CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 H1 A/布里斯班/59/2007	H1/Bris
733	CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 SpPDI-H1 A/布里斯班/59/2007	H1/Bris
734	CPMV- <i>HT</i> 表达盒中 H5 A/印度尼西亚/5/05 骨架中的 H1 A/布里斯班/59/07 受体结合(RB)结构域	H1/Bris
735	CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 H3 A/布里斯班/10/2007	H3/Bris
736	CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 SpPDI-H3 A/布里斯班/10/2007	H3/Bris
737	嵌合 SpPDI-H3 A/布里斯班/10/2007(胞外结构域) + H5 A/印度尼西亚/5/2005 (TmD + 胞尾) 在 CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的组装物	H3/Bris-H5/Indo 嵌合体
738	CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 HA B/佛罗里达/4/2006	B/Flo
739	CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 SpPDI-HA B/佛罗里达/4/2006	B/Flo
745	CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 SpPDI-HA B/佛罗里达/4/2006(细胞外结构域) + H5 A/印度尼西亚/5/2005 (TmD + 胞尾)	B/Flo
747	2X35S-CPMV- <i>HT</i> 表达盒中的 SpPDI-HA B/佛罗里达/4/2006+ H5 A/印度尼西亚/5/2005 (TmD + 胞尾)	B/Flo

[0122]

774	A/布里斯班/59/2007(H1N1)的 HA	H1/Bris
775	A/所罗门群岛 3/2006(H1N1)的 HA	H1/Solomon
776	A/布里斯班 10/2007(H3N2)的 HA	H3/Bris
777	A/威斯康星/67/2005(H3N2)的 HA	H3/Wisc
778	B/马来西亚/2506/2004 的 HA	B/Malaysia
779	B/佛罗里达/4/2006 的 HA	B/Flo
780	A/新加坡/1/57 (H2N2)的 HA	H2/Sing
781	A/安徽/1/2005(H5N1)的 HA	H5/Anhui
782	A/越南/1194/2004(H5N1)的 HA	H5/Vietnam
783	A/水鸭/香港/W312/97(H6N1)的 HA	H6/HongKong
784	A/马/布拉格/56 (H7N7)的 HA	H7/Prague
785	A/香港/1073/99(H9N2)的 HA	H9/HongKong
787	H1 A/布里斯班/59/2007	H1/Bris
790	H3 A/布里斯班/10/2007	H3/Bris
798	HA B/佛罗里达/4/2006	B/Flo

[0123] CPMV-HT 表达盒包含 35S 启动子以控制包含目的编码序列的 mRNA 的表达,该编码序列的 5' 端来自豇豆花叶病毒 (CPMV) RNA2 的核苷酸 1-512,其中在 115 和 161 位有突变的 ATG,3' 端为来自 CPMV RNA2(对应于 3' UTR)的核苷酸 3330-3481,其后为 NOS 终止子。用质粒 pBD-C5-1LC(Sainsbury 等 2008 年;Plant Biotechnology Journal 6:82-92 和 PCT 公开 W0 2007/135480) 组装基于 CPMV-HT 的血凝素表达盒。用 Darveau 等(Methods in Neuroscience 26:77-85(1995)) 提供的基于 PCR 的连接方法进行 CPMV RNA2 的 115 和 161 位 ATG 突变。用 pBD-C5-1LC 作为模板进行两个独立的 PCR。第一扩增的引物是 pBinPlus.2613c(SEQ ID NO:3) 和 Mut-ATG115.r(SEQ ID NO:4)。第二扩增的引物是 Mut-ATG161.c(SEQ ID NO:5) 和 LC-C5-1.110r(SEQ ID NO:6)。然后将两个片段混合并作为第三扩增的模板,其使用 pBinPlus.2613c(SEQ ID NO:3) 和 LC-C5-1.110r(SEQ ID NO:6) 作为引物。用 PacI 和 ApaI 消化所得片段并克隆到用同样的酶消化的 pBD-C5-1LC。生成的表达盒命名为 828。

[0124] CPMV-HT 表达盒中的 H5A/ 印度尼西亚 /5/2005(构建体号 685) 的组装

[0125] 该表达盒的组装描述于 W0 2009/009876、W0 2009/076778 和 W02010/003325,其通过引用并入本文。

[0126] 简言之,如下将来自 A/ 印度尼西亚 /5/2005 的 H5 编码序列克隆到 CPMV-HT 中:用构建体号 660(D' Aoust 等,Plant Biotechnology Journal 6:930-940(2008)) 作为模板,以 ApaI-H5(A-Indo).1c(SEQ ID NO:7) 和 H5(A-Indo)-StuI.1707r(SEQ ID NO:8) 为引物进行 PCR 扩增,以将限制性位点 ApaI(紧邻起始 ATG 的上游) 和 StuI(紧邻终止密码子的下游) 添加到血凝素编码序列。构建体 660 包括苜蓿质体蓝素启动子和 5'UTR、来自 A/ 印度尼西亚 /5/2005 的 H5 血凝素编码序列(构建体号 660)、苜蓿质体蓝素 3' UTR 和终止子序列(SEQ ID NO:9;图 5)。用 ApaI 和 StuI 限制性酶消化所得片段并克隆到预先用同样的

酶消化的构建体号 828 中。所得表达盒命名为构建体号 685(图 1、2)。

[0127] 沉默抑制子。

[0128] 转录后基因沉默 (PTGS) 可参与限制植物中转基因的表达,共表达马铃薯 Y 病毒的沉默抑制子 (HcPro) 可用于对抗转基因 mRNA 的特异性降解 (Brigneti 等,1998 年)。替代的沉默抑制子是本领域公知的,并且可如本文所述使用 (Chiba 等,2006 年,Virology 346 : 7-14 ;通过引用并入本文),它们例如但不限于 TEV-p1/HC-Pro(烟草蚀纹病毒 (Tobacco etch virus)-p1/HC-Pro)、BYV-p21、番茄丛矮病毒 (Tomato bushy stunt virus) 的 p19(TBSV p19)、番茄皱缩病毒 (Tomato crinkle virus) 的衣壳蛋白 (TCV-CP)、黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus) 的 2b ;CMV-2b)、马铃薯 X 病毒 (Potato virus X) 的 p25(PVX-p25)、马铃薯 M 病毒 (Potato virus M) 的 p11(PVM-p11)、马铃薯 S 病毒 (Potato virus S) 的 p11(PVS-p11)、蓝莓焦枯病毒 (Blueberry scorch virus) 的 p16(BScV-p16)、柑橘腐根病毒 (Citrus tristeza virus) 的 p23(CTV-p23)、葡萄卷叶相关病毒 2(Grapevine leafroll-associated virus-2) 的 p24(GLRaV-2p24)、葡萄 A 病毒 (Grapevine virus A) 的 p10(GVA-p10)、葡萄 B 病毒 (Grapevine virus B) 的 p14(GVB-p14)、独活潜伏病毒 (Heracleum latent virus) 的 p10(HLV-p10) 或大蒜普通潜伏病毒 (Garlic common latent virus) 的 p16(GCLV-p16)。因此,沉默抑制子(例如但不限于 HcPro、TEV-p1/HC-Pro、BYV-p21、TBSV p19、TCV-CP、CMV-2b、PVX-p25、PVM-p11、PVS-p11、BScV-p16、CTV-p23、GLRaV-2p24、GBV-p14、HLV-p10、GCLV-p16 或 GVA-p10) 可与编码目的蛋白质的核酸序列一起共表达以进一步确保在植物中高水平地生产蛋白质。

[0129] p19 的构建描述于 W0 2010/0003225(通过引用并入本文)。简言之,通过 Darveau 等 (Methods in Neuroscience 26 :77-85(1995)) 提供的基于 PCR 的连接法将番茄丛矮病毒 (TBSV)p19 蛋白的编码序列连到苜蓿质体蓝素表达盒。在第一轮 PCR 中,用构建体 660(描述于 W02010/0003225,通过引用并入本文)作为模板,用引物 Plasto-443c :

[0130] GTATTAGTAATTAGAATTTGGTGTC(SEQ ID NO :11)

[0131] 和 supP19-plasto. r

[0132] CCTGTATAGCTCGTTCCATTTTCTCTCAAGATG(SEQ ID NO :12)

[0133] 扩增质体蓝素启动子区段。平行地,用引物 supP19-1c

[0134] ATGGAACGAGCTATACAAGG(SEQ ID NO :13)

[0135] 和 SupP19-SacI. r

[0136] AGTCGAGCTCTTACTCGCTTTCTTTTCGAAG(SEQ ID NO :14),

[0137] 使用 Voinnet 等 (The Plant Journal 33 :949-956(2003 年)) 描述的构建体 35S : p19 作为模板扩增包含 p19 编码序列的另一片段。然后混合扩增产物并作为第二轮扩增 (组装反应) 的模板,其中使用引物 Plasto-443c 和 SupP19-SacI. r。用 BamHI (在质体蓝素启动子中) 和 SacI (p19 编码序列末端) 消化所得片段并克隆到预先用同样的限制性酶消化的构建体号 660 中,以得到构建体号 R472。通过电穿孔 (Mattanovich 等,1989) 用质粒转化根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) (AGL1 ;ATCC, Manassas, VA 20108, USA)。通过限制性图谱确认所有根癌农杆菌菌株的完整性。包含 R472 的根癌农杆菌菌株被命名为 “AGL1/R472”。

[0138] 按照 Hamilton 等 (2002) 所述制备 HcPro 构建体 (35HcPro)。测序所有克隆以确

认构建体的完整性。通过电穿孔 (Mattanovich 等, 1989) 用质粒转化根癌农杆菌 (AGL1; ATCC, Manassas, VA 20108, USA)。通过限制性图谱确认所有根癌农杆菌株的完整性。

[0139] 植物生物物质的制备, 接种, 农杆菌渗入和收集

[0140] 在填充有市售泥炭藓培养基的平地 (flat) 中从种子培育本塞姆氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 植株。以 16/8 的光周期和白天 25°C / 夜晚 20°C 的温度方案在温室中培育植株。播种后三周, 挑选出单个苗, 移植到花盆里并在相同环境条件下的温室中再培育三周。六周后, 植株的平均重量为 80g, 平均高度为 30cm。

[0141] 通过 D'Aoust 等 2008 (Plant Biotechnology Journal 6 :930-940) 描述的方法, 用如下所述的构建体转染 (电穿孔) 农杆菌菌株 AGL1。在补充有 10mM 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES)、20 μ M 乙酰丁香酮、50 μ g/ml 卡那霉素和 25 μ g/ml 羧苄青霉素的 YEB 培养基 (pH5.6) 中培养转染的农杆菌, 至 OD₆₀₀ 为 0.6 至 1.6。在使用前离心农杆菌悬液并用渗入介质 (10mM MgCl₂ 和 10mM MES pH 5.6) 重悬。

[0142] 通过 D'Aoust 等 (同上) 描述的农杆菌渗入法处理植株。简言之, 对于真空渗入, 离心根癌农杆菌悬液, 在渗入介质中重悬, 在 4°C 储存过夜。在渗入当天, 用 2.5 倍培养体积稀释培养批次并在使用前温热。将整个本塞姆氏烟草植株倒置在 20-40 托真空下的气密不锈钢罐的细菌悬液中 2 分钟。除另外指出, 所有的渗入均为与 R472 转化细菌 (AGL1/R472 株) 以 1 : 1 的比例共同渗入。真空渗入后, 将植株被送回温室孵育 4-6 天直到收集。

[0143] 叶的取样和总蛋白质提取 (机械匀浆)

[0144] 孵育 4、5、6、7 和 8 天后, 收集植株的地上部分并立即使用。在 3 倍体积的含有 1% Triton X-100 和 0.004% 焦亚硫酸钠的冷 50mM Tris pH8.0, 0.15M NaCl 中通过匀浆植物组织提取总可溶性蛋白。用 POLYTRON™ 通过杵臼研磨, 或在 1 体积冷 50mM Tris pH8.0, 0.15M NaCl 中用 COMITROL™ 对植物组织进行机械匀浆。COMITROL™ 使用的缓冲液也包含 0.04% 焦亚硫酸钠。匀浆后, 在 4°C 下以 5,000g 离心地上植物材料的浆液 5 分钟, 保留粗提物 (上清液) 进行分析。用牛血清白蛋白作为参照标准, 通过 Bradford 测定 (Bio-Rad, Hercules, CA) 检测澄清粗提物的总蛋白质含量。

[0145] 通过细胞壁消化提取 VLP

[0146] 从本塞姆氏烟草植株收集叶组织并切成 ~1cm² 的片。在室温 (RT) 下将叶片浸没于 500mM 甘露糖醇中 30 分钟。然后去除甘露糖醇溶液并换成酶混合物 (原生质体化溶液 (500mM 甘露糖醇, 10mM CaCl₂ 和 5mM MES/KOH (pH 5.6) 中的来自绿色木霉的纤维素酶混合物 (Onozuka R-10 ; 3% v/v) 和来自根霉属的果胶酶混合物 (MACEROZYME™ ; 0.75% v/v ; 均购自 Yakult Pharmaceuticals))。使用的比例为每 100mL 溶液 20g 叶片。将该制备物均匀分散到浅容器 (~11×18cm) 中并用旋转摇床以 40rpm 和 26°C 孵育 16 小时。

[0147] 或者, VLP 提取可按如下方法进行 : 用 AGL1/#685 按照实施例 1 所述对植株进行农杆菌渗入。在渗入后第 6 天从本塞姆氏烟草植株收集叶并切成 ~1cm² 的片。以 1 : 2.5 (w/v) 的新鲜生物物质 : 消化缓冲液的比例, 将 Multifect 果胶酶 FE、Multifect CX C G 和 Multifect CX B (Genencor) (每个 1.0% (v/v)) 添加到 600mM 甘露糖醇, 75mM 柠檬酸盐, 0.04% 亚硫酸氢钠缓冲液 (pH 6.0) 中。在室温下用轨道摇床消化生物物质 15 小时。

[0148] 孵育后, 通过过滤 (250 或 400 μ m 目的尼龙滤器) 去除叶碎片。如下收集悬液中的原生质体 : 以 200×g (15 分钟) 离心, 然后以 5000×g (15 分钟) 离心上清液以进一步澄

清上清液。或者,可进行 $5000 \times g$ 、15 分钟的单个离心步骤。然后以 $70,000 \times g$ 离心 70mL 上清液 30 分钟。所得沉淀用 1.7mL PBS 重悬并立即分析或冻存。

[0149] 蛋白质分析

[0150] H5 的凝血测定基于 Nayak 和 Reichl (2004) 描述的方法。简言之,在含有 $100 \mu\text{L}$ PBS 的 V 形底 96 孔微滴定板中对测试样品 ($100 \mu\text{L}$) 进行系列两倍稀释,每孔留下 $100 \mu\text{L}$ 稀释的样品。向每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 0.25% 火鸡红细胞悬液 (Bio Link Inc., Syracuse, NY), 在室温孵育板 2 小时。将显示完全凝血的最高稀释度的倒数记录为凝血活性。平行地,用 PBS 稀释重组 HA5 标准 (A/ 越南 /1203/2004H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT), 并在每个板中作为对照。

[0151] ELISA

[0152] 用破碎 (用 1% Triton X-100 处理,随后在 Tissue Lyser™ (Qiagen) 机械搅拌 1 分钟) 的纯化病毒样颗粒制备 HA5 标准。在 4°C 用 50mM 碳酸盐 - 碳酸氢盐包被缓冲液 (pH 9.6) 中的 $10 \mu\text{g/mL}$ 捕获抗体 (Immune Technology Corporation, #IT-003-005I) 包被 U 形底 96 孔微滴定板 16-18 小时。用含有 0.1% Tween-20 的 0.01M PBS (磷酸盐缓冲盐水) (pH 7.4) 进行所有洗涤。孵育后,洗涤微滴定板三次并在 37°C 下用 PBS 中的 1% 酪蛋白封闭 1 小时。封闭步骤后,洗涤板三次。用模拟提取物 (制备自用单独的 AGL1/R472 渗入的叶组织) 稀释 HA5 标准以获得 500 至 50ng/mL 的标准曲线。在加入微孔板之前用 1% Triton X-100 处理待定量的样品。在 37°C 下再孵育板 1 小时。洗涤后,加入 1 : 1000 稀释的针对 HA5 (CBER/FDA) 的绵羊多克隆抗体,在 37°C 下孵育板 1 小时。洗涤后,加入 1 : 1000 稀释的辣根过氧化物酶缀合的兔抗绵羊抗体,在 37°C 下孵育板 1 小时。最后一次洗涤后,在室温下用 SureBlue TMB 过氧化物酶底物 (KPL) 孵育板 20 分钟。加入 1N HCl 终止反应,用 Multiskan Ascent 读板器 (Thermo Scientific) 测量 A_{450} 值。

[0153] 实施例 1 :酶法提取植物组织释放相对活性提高的高产量 HA。

[0154] 将用本发明酶提取法获得之 HA 的量和相对活性与普通机械提取法获得之 HA 的数量和相对活性进行比较。用 AGL1/685 渗入本塞姆氏烟草植株,5-6 天的孵育期后收集叶。如下制备叶匀浆 :用 Polytron 匀浆器将 2g 叶匀浆 ;用杵臼研磨 4g 叶 ;以及用 COMITROL™ 处理机 (Urschel Laboratories) 在提取缓冲液 (50mM Tris, 150mM NaCl pH 8.0, 比例 1 : 1w/v) 中对 25kg 叶进行匀浆。酶提取如下进行 :用上述 Macerozyme 果胶酶和 Onozuka R-10 纤维素酶消化 20g 收集的叶。消化后,通过过滤 (250 μm 目的尼龙滤器) 去除叶碎片。通过以下去除悬液中的原生质体 : $200 \times g$ (15 分钟) 离心,然后通过 $5000 \times g$ (15 分钟) 离心进一步澄清上清液。

[0155] 每个这些植物提取物中的 HA 的量和相对活性见表 3。与用机械方法相比,酶提取法获得的 HA 的量显著较多。

[0156] 表 3 :机械和酶提取植物叶获得的 HA 的相比的量和相对活性。所有的数据均被调整以计入每个提取方法添加的液体体积差异。为了本发明的比较性分析,选择 Comitrol™ 提取法作为标准值。

[0157]

提取方法	相对活性	量*
------	------	----

Comitrol™ 提取物	100%	100%
Polytron 提取物	50%	150%
白提取物	100%	220%
消化提取物	440%	570%

[0158] *通过 ELISA 分析对量进行评测

[0159] 实施例 2 :用酶消化植物组织所释放的 HA 组成 VLP

[0160] 用差速离心和体积排阻层析 (SEC) 的组合证实通过本文所述的酶提取法获得的 HA 组成 VLP。如实施例 1 中所述用 AGL1/685 对本塞姆氏烟草植株进行农杆菌渗入。如实施例 1 中所述渗入 6 天后从植株收集叶并切成 $\sim 1\text{cm}^2$ 的片,然后消化、粗滤并离心。

[0161] 然后以 $70,000 \times g$ 离心澄清样品以分离 VLP。在上样到 SEC 柱之前,将包含 VLP 的离心沉淀小心重悬于 1/50 体积的磷酸盐缓冲盐水 (PBS ;0.1M 磷酸钠,0.15M NaCl pH 7.2) 中。

[0162] 用平衡 / 洗脱缓冲液 (50mM Tris,150mM NaCl,pH8) 准备 32ml SEPHACRYL™ S-500 高分辨率珠 (S-500HR ;GE Healthcare, Uppsala, Sweden, Cat.No. 17-0613-10) 的 SEC 柱。将 1.5mL VLP 样品上样到平衡好的柱并用 45mL 平衡 / 洗脱缓冲液洗脱来进行 SEC 层析。洗脱液收集于 1.7mL 的级分中,通过将 $10\mu\text{L}$ 洗脱级分与 $200\mu\text{L}$ 稀释的 Bio-Rad 蛋白染色剂 (Bio-Rad, Hercules, CA) 混合来评估每个级分的蛋白含量。每次分离之前均用 Blue Dextran 2000 (GE Healthcare Bio-Science Corp., Piscataway, NJ, USA) 进行校准。对于每次分离都比较 Blue Dextran 2000 和宿主蛋白质两者的洗脱谱,以确保分离的一致性。

[0163] SEC 洗脱级分的蛋白质分析

[0164] 以牛血清白蛋白作为参照标准,用 Bradford 测定 (Bio-Rad, Hercules, CA) 检测澄清粗提物的总蛋白含量。用丙酮沉淀存在于 SEC 洗脱级分中的蛋白质 (Bollag 等,1996),用 0.25 体积或 0.05 体积的变性上样缓冲液 (0.1M Tris pH 6.8,0.05% 溴酚蓝,12.5% 甘油,4% SDS 和 5% β -巯基乙醇) 重悬以分别进行 SDS-PAGE 分析或免疫印迹分析。在还原条件下通过 SDS-PAGE 进行分离,用考马斯亮蓝 R-250 对蛋白染色。

[0165] H5 的凝血测定基于 Nayak 和 Reichl (2004) 描述的方法。简言之,在含有 $100\mu\text{L}$ PBS 的 V 形底 96 孔微滴定板中对测试样品 ($100\mu\text{L}$) 进行系列双倍稀释,每孔留下 $100\mu\text{L}$ 稀释的样品。向每孔加入 $100\mu\text{L}$ 0.25% 火鸡红细胞悬液 (Bio Link Inc., Syracuse, NY), 在室温孵育板 2 小时。将显示完全凝血的最高稀释度的倒数记录为凝血活性。平行地,用 PBS 稀释重组 H5 标准 (A/越南/1203/2004H5N1) (Protein Science Corporation, Meriden, CT),并在每个板中作为对照。

[0166] 图 3A 显示凝血活性集中在对应于柱空隙体积的级分,证明凝血活性来源于高分子量结构组织。SDS-PAGE 分析 (图 3B) 表明那些相同的空隙体积级分 (级分 7-10) 也存在最高的 HA 含量,其中对应于 HA0 单体的条带在约 75kDa 处可检测到。

[0167] 实施例 3 :植物组织的酶消化释放具有更少污染物的 HA-VLP

[0168] 如实施例 1 中所述以 AGL1/685 对本塞姆氏烟草植株进行农杆菌渗入。如实施例

1 中所述在渗入后第 6 天收集叶并切成 $\sim 1\text{cm}^2$ 的片,然后消化、粗滤并离心。

[0169] 叶的受控酶消化去除(至少部分地)细胞壁,从而允许存在于细胞壁和质膜间的间隙中的蛋白质和成分释放入提取基质。由于大多数细胞内蛋白质和成分仍未被破坏并包含在几乎完整的原生质体中,初始的离心步骤可以去除它们,从而提供包含细胞壁降解酶以及细胞外植物蛋白质和成分(质外体级分)的图 4 所示的所得溶液。

[0170] 图 4 显示了上述的叶组织受控酶消化后所获得的溶液的 SDS-PAGE 分析,其中泳道 1 显示所用的酶混合物,泳道 2 显示酶消化后所得的溶液。泳道 3 提供从 Comitrol™ 得到的粗提物的蛋白质含量以供比较。生物物质:缓冲液的比例对于泳道 2 的提取物是 1 : 5(w/v),对于泳道 3 是 1 : 1(w/v)。因此泳道 2 和 3 各自包含源自等量起始原料的蛋白。对于大约相同的缓冲液:植物比例,机械植物提取物包含浓度约 3.5-4mg/ml 的蛋白质,而根据本发明方法获得的酶植物提取物的蛋白质浓度约为 1mg/ml。

[0171] 发现泳道 3 中存在的主要污染物是 RubisCo(核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶加氧酶),它由两种蛋白亚基形成:大链(L,约 55kDa)和小链(S,约 13kDa)。通常总共八条大链二聚体和八条小链彼此之间组装成较大复合物 RubisCo 540kDa。尽管在源自机械提取法的植物提取物中发现大量的该植物蛋白污染物(如图 4 箭头所示),它几乎在本文所述酶消化法所获得的植物提取物中不存在。因此,本方法允许在处理的早期去除该主要的植物蛋白污染物以及其他污染物。

[0172] 实施例 4:植物组织的酶消化在可以直接用阳离子交换树脂捕获 HA-VLP 的条件下释放 HA-VLP。

[0173] 按照实施例 1 中所述用 AGL1/685 对本塞姆氏烟草植株进行农杆菌渗入。在渗入后第 6 天收集叶,切成 $\sim 1\text{cm}^2$ 的片,用轨道摇床室温消化 15 小时。消化缓冲液包含 1.0% (v/v)Multifect 果胶酶 FE,1.0% (v/v)Multifect CX CG 或和 1.0% (v/v)Multifect CX B(均购自 Genencor),每个均在 600mM 甘露糖醇,75mM 柠檬酸盐,0.04%亚硫酸氢钠缓冲液(pH 6.0)中,使用 1 : 2.5(w/v)的生物物质:消化缓冲液比例。

[0174] 消化后,将质外体级分用 400 μm 尼龙滤器过滤,以去除粗的未消化的植物组织(< 5%的起始生物物质)。然后在室温下以 5000 $\times g$ 离心经过滤提取物 15 分钟,以去除原生质体和细胞内污染物(蛋白质、DNA、膜、囊泡、色素等)。然后在进行层析之前,用 0.65 μm 玻璃纤维滤器(Sartopore2/Sartorius Stedim)和 0.45/0.2 μm 滤器深层过滤上清液(以澄清)。

[0175] 将澄清的质外体级分上样到用平衡/洗脱缓冲液(50mM NaPO_4 ,100mM NaCl,0.005% Tween 80pH 6.0)平衡好的阳离子交换柱(Poros HS Applied Biosystems)。UV 回归到 0 后,用包含升高浓度的 NaCl(500mM)的平衡/洗脱缓冲液分步洗脱提取物。必要时,使用装配有 10kDa MWC0 的 Amicon™ 装置将层析级分浓缩 10 倍。蛋白分析按照之前实施例所述进行。

[0176] 在上述条件下,大多数酶和植物蛋白质不与阳离子交换树脂结合而 HA-VLP 结合,从而在洗脱级分中提供 HA-VLP 的可观富集(图 6)。此外,如图 6 所示,在 pH 在 7 以下时泳道 4 和 5 的纤维素酶和果胶酶不与阳离子交换柱结合。因此,根据 HA 凝血活性,HA-VLP 的回收在上样至阳离子交换柱前为 92%,在洗脱级分中为 66%。在阳离子交换树脂的洗脱级分中检测到纯化因子为 194。

[0177] 实施例 5 :向消化缓冲液中添加 NaCl

[0178] 按照实施例 1 所述用携带表达目的血凝素的构建体 (H1/Ca1 WT, B/Flo, H5/Indo 或 H1/Ca1 X179A) 的农杆菌株 AGL1 对本塞姆氏烟草植株进行农杆菌渗入。在渗入后第 6 天收集叶,切成 $\sim 1\text{cm}^2$ 的片并按照实施例 4 所述消化(除非以下特别注明)。按照实施例 4 所述进行过滤、离心和澄清。

[0179] 向消化缓冲液中添加 NaCl 以评估其对 HA-VLP 回收率的潜在作用。所猜测的优点是可能能够阻止 HA 非特异性地与澄清过程中去除的植物细胞或悬液颗粒相关联,以及可对获得和 / 或维持和 / 或提高 HA-VLP 的胶体稳定性有潜在作用。

[0180] 向消化缓冲液中加入 500mM NaCl 使得在通过离心去除原生质体和细胞碎片之后,每克生物质的 HA-VLP 回收得率提高。但是,该提高只见于 H1/Ca1 WT 和 B/Flo 株,而通过这种方法 H5 的回收得率并没有显著提高(表 4)。

[0181] 表 4 :在消化步骤中添加 NaCl 对 HA-VLP 回收得率的作用(通过凝血活性单位测量, dil :稀释度的倒数)

HA 株	消化条件	HA 中的 浓度 (dil /ml)	得率 (dil/g)	得率增加 (X 倍) ¹
H5 Indo/05 (#972)	Ø NaCl	4608	12,430	1.2
	500 mM NaCl	4608	14,921	
H1 CA/07 WT (#604)	Ø NaCl	384	1,206	2.1
	500 mM NaCl	768	2,481	
H1 CA/07 X-179A (#605)	Ø NaCl	96	299	8.1
	500 mM NaCl	768	2,419	
B Flo/4 (475)	Ø NaCl	16	52	7.5
	500 mM NaCl	128	392	

[0183] ¹ 有 NaCl 时的得率 (dil/g) 除以无 NaCl 时的得率 (dil/g)

[0184] 对 H1/Ca1 WT 和 H1/Ca1 X-179A 两毒株,在消化过程中添加 500mMNaCl 进一步使消化过程中 HA-VLP 释放增加,这继而导致澄清后的回收得率提高(表 5),但对 H5/Indo 株不是如此。

[0185] 表 5 :在澄清步骤之后向消化步骤添加 NaCl 对 HA-VLP 回收得率的作用(通过凝血活性单位测量)

[0186]

HA 株	消化条件	深层过滤后 的回收率 ¹	回收率 增加 (X倍)
H5/Indo (#972)	Ø NaCl	100%	1.0
	500 mM NaCl	100%	
H1/Cal WT (#604)	Ø NaCl	25%	3.0
	500 mM NaCl	75%	
H1/Cal X- 179A (#605)	Ø NaCl	50%	2.0
	500 mM NaCl	100%	

[0187] ¹ 回收率表示为深层过滤后获得的凝血活性占离心消化提取物的活性的百分比。

[0188] 在酶消化过程中添加和不添加 NaCl 时,用纳米颗粒追踪分析法 (NTA) 对 H5/Indo 和 H1/Cal WT 的 HA-VLP 的结合状态进行了分析 (分别见图 7A 和 7B)。在无 NaCl 时进行消化对于 H5 观察到颗粒的单分散制备物,而 H1/Cal 制备物显示颗粒类型更大的阵列。如图 7C 中良好的单分散颗粒分布所示,向消化缓冲液中添加 NaCl 降低 H1/Cal HA-VLP 的自结合。通过向消化缓冲液中添加 500mM NaCl,150nm 的 H1/CalWT-VLP 颗粒数增加 (约 5 倍)。

[0189] 实施例 6 :色素的控制释放

[0190] 按照实施例 1 所述用携带表达目的血凝素的构建体 (H5/Indo) 的农杆菌株 AGL1 对本塞姆氏烟草植株进行农杆菌渗入。在渗入后第 6 天收集叶,切成 ~1cm² 的片,并按照实施例 4 所述进行消化,其中向消化缓冲液中添加 500mM NaCl 或 500mM NaCl 和 25mM EDTA。按照实施例 4 所述进行过滤、离心和澄清。

[0191] 酶消化步骤中释放的绿色成分使纯化的 VLP 制备物呈浅绿色。因此研究并调整细胞壁消化溶液的成分以获得绿色减少的 VLP 纯化制备物,从而获得增加的纯度。不希望被理论所约束,由于 Ca²⁺ 在将细胞壁的中间片层成分保持在一起中起关键作用,并且考虑到植物细胞壁通常具有高浓度的 Ca²⁺ 这一事实,添加 Ca²⁺ 螯合剂 EDTA 可促进细胞壁的酶促解聚,从而保留完整的细胞内细胞器 (例如叶绿体),并防止绿色成分的释放。

[0192] 见表 6,如通过测量制备物吸光度 (OD_{672nm}-OD_{650nm}) 差异所评估的,向消化缓冲液中添加 25mM EDTA 使纯化的 H5-VLP 制备物的绿色减少。当绿色成分大量释放或未被适当去除时,VLP 制备物表现出的 ΔOD > 0.040。

[0193] 表 6 :添加 25mM EDTA 至消化缓冲液对 H5-VLP 产物中的绿色的影响。

[0194]

	OD _{672nm} - OD _{650nm}
0 mM NaCl, 0 mM EDTA	0.071 ± 0.061
500 mM NaCl	0.087 ± 0.060
500 mM NaCl + 25 mM EDTA	0.010 ± 0.002

[0195] 实施例 7 :替代性的消化缓冲液成分

[0196] 按照实施例 1 所述用携带表达目的血凝素的构建体 (H5/Indo) 的农杆菌株 AGL1 对本塞姆氏烟草植株进行农杆菌渗入。在渗入后第 6 天收集叶,切成 $\sim 1\text{cm}^2$ 的片并按照实施例 4 所述进行消化,其中将消化缓冲液改变为包含 0%、0.25%、0.5%、0.75%或 1% v/v Multifect 果胶酶 FE、Multifect CX-CG 纤维素酶和 Multifect CX B 纤维素酶 (如表 7-9 所示)。按照实施例 4 所述进行过滤、离心和澄清。

[0197] 如下表 7 和 8 所示,证实果胶酶在消化缓冲液中不是必需的。在存在或不存在果胶酶的情况下,可以提取到相似水平的 H5/Indo 或 H1/Ca1 WTVLP。此外,发现与之前实施例相比,降低纤维素酶浓度与对提取质量没有显著的影响 (表 9)。

[0198] 表 7:消化本塞姆氏烟草叶后 H5/Indo VLP 的释放。所有的条件均重复测试。(HA-VLP 浓度通过凝血活性测量, dil :稀释度的倒数)

[0199]	果胶酶 (% v/v)	纤维素酶 * (% v/v)	H5 VLP 浓度 (dil/ml)
	1	1	1152
	0.5	1	6144
	0	1	768
	0	2	1536

[0200] * Multifect CX GC

[0201] 表 8:消化本塞姆氏烟草叶后 H1/Ca1 WT VLP 的释放。所有的条件均重复测试。(HA-VLP 浓度通过凝血活性测量, dil :稀释度的倒数)

[0202]	果胶酶 (% v/v)	纤维素酶 * (% v/v)	H1 VLP 浓度 (dil/ml)
	1	2	2304
	0	2	3840

[0203] * Multifect CX GC 和 Multifect CX B 每个 1%

[0204] 表 9:消化本塞姆氏烟草叶后 H1/Ca1 WT VLP 的释放。所有的条件均进行重复测试。(HA-VLP 浓度通过凝血活性检测, dil :稀释度的倒数)

[0205]

果胶酶 (% v/v)	纤维素酶 * (% v/v)	H1 VLP 浓度 (dil/ml)
1.0	1	384
0.75	1	480
0.50	1	480
0.25	1	480

[0206] * Multifect CX GC

[0207] 实施例 8:接近中性 pH 条件下的酶消化

[0208] 控制消化过程中的 pH 对于某些 VLP 的提取可以是关键的。考虑到消化步骤中发生的细胞壁的解聚可以释放酸性糖,这在适当缓冲液溶液的存在下会使溶液酸化 (即 pH 6 至 5),并且已证实某些 VLP (如包含 H3/Bris 和 B/Flo HA 的那些) 对轻度酸性环境有很高的敏感性,所以研究了这种可能的酸化对 VLP 产率的影响。

[0209] 按照实施例 1 所述用携带表达目的血凝素的构建体 (B/Flo、H5/Indo、H3/Bris) 的农杆菌株 AGL1 对本塞姆氏烟草植株进行农杆菌渗入。在渗入后第 6 天收集叶, 切成 $\sim 1\text{cm}^2$ 的片并按照实施例 4 所述进行消化, 其中将消化条件改变为包含 500mM NaCl; 25 或 50mM EDTA; 0.03 或 0.04% 硫酸氢钠; 0、100、200 或 600mM 甘露糖醇, 75、125 或 150mM 柠檬酸盐; 和 / 或 75mM NaPO_4 ; 消化缓冲液 pH 的调整如表 10-14 所示。按照实施例 4 所述进行过滤、离心和澄清。

[0210] 测试不同的消化缓冲液成分是否在酶消化结束时达到约 5.5 的 pH, 包括增加的柠檬酸盐浓度 (缓冲能力在 pH 3.0 至 5.4 之间) 和添加磷酸钠 (缓冲能力在 pH 6.0 以上)。表 10 显示在消化后 pH 接近 pH 6.0 时, 来自 B 株的 VLP 能够被更有效地提取。

[0211] 表 10: 消化缓冲液成分对 B/Flo VLP 提取率的影响。

[0212]

缓冲液成分 ¹	B/Flo VLP 浓度 (dil/ml)	蛋白质浓度 (mg/ml)	消化后 pH
75 mM 柠檬酸盐 + 500mM NaCl + 25 mM EDTA pH 6.0	1	0.92	5.0
75 mM 柠檬酸盐 pH 6.0	0	1.43	5.6
125 mM 柠檬酸盐 + 500mM NaCl + 25 mM EDTA pH 6.0	1.5	1.07	5.4
150 mM 柠檬酸盐 + 500mM NaCl + 25 mM EDTA pH 6.0	1.5	1.07	5.4
125 mM 柠檬酸盐 + 75mM NaPO_4 + 500mM NaCl + 25 mM EDTA pH 6.5	4	2.19	5.9

[0213] ¹ 所有缓冲液包含 600mM 甘露糖醇, 焦亚硫酸钠 0.04%

[0214] 然后, 检测了为使最终 pH 值接近 pH 6.0 而在更高 pH 起始消化的影响。如表 11 所示, 在这种近中性条件下消化植物细胞壁是可以的, 并未减少 H5/Indo VLP 的提取率。

[0215] 表 11: 消化缓冲液起始 pH 对 H5/Indo VLP 提取率的影响。

[0216]

消化溶液的起始 pH ¹	H5/Indo VLP 浓度 (dil/ml)	蛋白质浓度 (mg/ml)	消化后 pH
6.5	2304	2.79	6.08
6.4	1536	2.31	5.93
6.3	2304	2.40	5.81
6.2	2304	2.09	5.73
6.1	2304	1.72	5.61

[0217] ¹ 所有消化缓冲液包含 600mM 甘露糖醇, 焦亚硫酸钠 0.04%, 125mM 柠檬酸盐 + 75mM NaPO_4 + 500mM NaCl + 25mM EDTA

[0218] 还表明调整消化溶液的其他成分对 VLP 的提取率没有不利影响。表 12 显示了可以对消化溶液进行调整以提高 B/Flo VLP 的提取率同时获得 5.4-5.7 的消化后 pH。这种调

整包括提高柠檬酸盐的浓度和添加 PO_4 缓冲液。发现提高 EDTA 浓度通常导致更加酸化的提取物和更低的 VLP 提取率。

[0219] 表 12 :不同消化缓冲液成分对 B/F1o VLP 提取率的影响。

[0220]

缓冲液成分 ¹							
甘露糖醇 (mM)	柠檬 酸盐 (mM)	PO_4 (mM)	EDTA (mM)	pH	B VLP 浓度 (dil/ml)	蛋白质浓度 (mg/ml)	消化后 pH
600	75	0	25	6.1	2	1.07	5.0
600	125	0	25	6.1	192	0.83	5.7
600	125	75	25	6.2	192	1.81	5.5
600	125	75	50	6.2	96	1.26	5.4
200	125	75	25	6.2	384	1.05	5.7
200	125	75	50	6.2	96	1.04	5.4
200	125	75	75	6.2	96	1.55	5.4

[0221] ¹ 所有缓冲液包含 500mM NaCl, 焦亚硫酸钠 0.04%。

[0222] 进一步调整缓冲液成分以提高 H3/ 布里斯班 VLP 的提取率 (表 13)

[0223] 表 13 :消化溶液中甘露糖醇和亚硫酸钠浓度对 H3/Bris VLP 提取率的影响。

[0224]

缓冲液成分					
甘露糖醇 (mM)	亚硫酸钠 (%)	EDTA (mM)	pH	蛋白质浓度 (mg/ml)	消化后 pH
600	0.04	25	6.2	1.87	5.7
600	0.04	50	6.2	1.62	5.6
200	0.03	25	6.2	1.89	5.7
200	0.03	50	6.2	1.24	5.6

[0225] ¹ 所有缓冲液包含 125mM 柠檬酸盐, 75mM NaPO_4 , 500mM NaCl,

[0226] 如表 12 和 13 所示, 甘露糖醇浓度可降至 200mM 而不显著影响 VLP 提取率。进一步降低甘露糖醇浓度到 100mM 甚至完全不将甘露糖醇添加至消化溶液不会显著影响获得的 HA-VLP 水平 (表 14)。

[0227] 表 14 :甘露糖醇浓度不同的缓冲液消化生物质所释放的 H5/Indo VLP

[0228]

消化溶液中甘露糖醇浓度 ¹	H5/Indo VLP 浓度 (dil/ml)	蛋白浓度 (mg/ml)
² 实验 1: 不含甘露糖醇	2304	1.62
² 实验 1: 600 mM 甘露糖醇	3072	1.73
² 实验 2: 100 mM 甘露糖醇	4608	1.77
² 实验 2: 600 mM 甘露糖醇	4608	2.0

[0229] ¹ 所有缓冲液包含 75mM 柠檬酸盐 pH 6.0+ 焦亚硫酸钠 0.04%。

[0230] ² 在不含甘露糖醇（实验 1）和含 100mM 甘露糖醇（实验 2）的情况下进行 2 个相比于 600mM 甘露糖醇的实验以比较 VLP 的提取率。

[0231] 实施例 9 :酶消化对多种 HA-VLP 的适用性

[0232] 本文所述的植物生物质酶消化法有可能被应用到多种 HA-VLP 的提取中。除了提取之前实施例所示的包含 H5/Indo、H1/Cal WT VLP、H3/Bris 和 B/Flo 的 HA-VLP 之外,本文所述方法还适用于季节性的 H1/Bris 和 H1/NC 的 HA-VLP 的提取,如表 15 所示。

[0233] 表 15 :消化农杆菌渗入的本塞姆氏烟草叶所释放的季节性 H1/Bris 和 H1/NC VLP。(HA 浓度通过凝血活性测量, dil :稀释度的倒数)

	HA 株	HA 浓度 (dil /ml)
[0234]	H1/Bri	1536
	H1/NC	384

[0235] 所有引用文献通过引用并入本文,就像指名每个独立出版物专门并单独地通过引用并入本文并在本文中给出全文那样。本文引用的参考文献不应理解为或视为承认这些参考文献是本发明的现有技术。

[0236] 已通过示例方式描述了一个或多个目前优选的本发明实施方案。本发明包括基本如上所述并且参照实施例和附图的所有实施方案、改变和变化。对本领域技术人员来说显而易见的是,大量的变化和改变可在不偏离本发明权利要求所限定范围的情况下获得。这些修改的例子包括用已知的等同方案替换本发明的任何方面以实质相同的方式获得同样的结果。

[0001]

序 列 表

<110> Medicago Inc.
 VEZINA, Louis-Philippe
 DARGIS, Michele
 COUTURE, Manon
 PAQUET, Dany
 D'AOUST, Marc-Andre

<120> 制备植物来源的VLP的方法

<130> V82324WO

<150> 61/244,786

<151> 2009-09-22

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3067

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体685

<400> 1

```

ttaattaaga attogagctc caccgcggaa aacctctcgg attccattgc ccagctatct      60
gtcactttat tgagaagata gtggaaaagg aagggtggctc ctacaaatgc catcattgcg      120
ataaaggaaa ggccatcggt gaagatgcct ctgccgacag tggccccaaa gatggacccc      180
caccacagag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cagctcttca aagcaagtg      240
attgatgtga tatctccact gacgtaaggg atgaagcaca atcccactat ccttcgcaag      300
aoccttctct tatataagga agttcatttc atttggagag gtattaaaat cttaataggt      360
tttgataaaa gcgaacgtgg ggaaccocga accaaacctt cttctaaact ctctctcatc      420
tctcttaaaag caaacctctc tcttctcttt cttgcgtgag cgatcttcaa cgttgtcaga      480
tctgtctctg gcaccagtac aacgttttct ttcactgaag cgaaatcaaa gatctctttg      540
tggacacgta gtgcggcgcc attaaataac gtgtacttgt cctattcttg tgggtgtggt      600
cttgggaaaa gaaagcttgc tggaggctgc tgttcagccc catacattac ttgttacgat      660
tctgctgact ttgcggcggg gcaatatctc tacttctgct tgacgaggta ttgttgccgt      720
tacttctttc ttcttcttct tgctgattgg ttctataaga aatctagtat tttctttgaa      780
acagagtttt cccgtgggtt tcgaacttgg agaaagattg ttaagcttct gtatattctg      840
cccaaatttg tcgggccccat ggagaaaata gtgcttcttc ttgcaatagt cagtcttggt      900
aaaagtgatc agatttgcat tggttaccat gcaacaatt caacagagca ggttgacaca      960

```

[0002]

atcatggaaa agaacgttac tggtacacat gcccaagaca tactggaaaa gacacacaac	1020
gggaagctct gcgatctaga tggagtgaag cctctaattt taagagattg tagtgtagct	1080
ggatggctcc tcgggaaccc aatgtgtgac gaattcatca atgtaccgga atggtcttac	1140
atagtggaga aggccaatcc aaccaatgac ctctgttacc cagggagttt caacgactat	1200
gaagaactga aacacctatt gagcagaata aaccattttg agaaaattca aatcatcccc	1260
aaaagtctct ggtccgatca tgaagcctca tcaggagtta gctcagcatg tccatacctg	1320
ggaagtccct ccttttttag aaatgtggta tggcttatca aaaagaacag tacataccca	1380
acaataaaga aaagctacaa taataccaac caagaggatc ttttgggtact gtggggaatt	1440
caccatccta atgatgoggc agagcagaca aggctatatc aaaacccaac cacctatatt	1500
tccattggga catcaacact aaaccagaga ttggtaccaa aatagctac tagatccaaa	1560
gtaaacgggc aaagtggaag gatggagttc ttctggacaa ttttaaaacc taatgatgca	1620
atcaacttgc agagtaatgg aaatttcatt gctccagaat atgcatacaa aattgtcaag	1680
aaaggggact cagcaattat gaaaagtga ttggaatatg gtaactgcaa caccaagtgt	1740
caaactccaa tggggggcat aaactctagt atgocattcc acaacataca cctctcacc	1800
atcggggaat gcccacaata tgtgaaatca aacagattag tccttgcaac agggctcaga	1860
aatagccctc aaagagagag cagaagaaaa aagagaggac tatttggagc tatagcaggt	1920
tttatagagg gaggatggca gggaatggta gatggttggt atgggtacca ccatagcaat	1980
gagcagggga gtgggtacgc tgcagacaaa gaatccactc aaaaggcaat agatggagtc	2040
accaataagg tcaactcaat cattgacaaa atgaacactc agtttgaggc cgttggaagg	2100
gaatttaata acttagaaag gagaatagag aatttaaaaca agaagatgga agacgggttt	2160
ctagatgtct ggacttataa tgcogaactt ctggtttctca tggaaaatga gagaactcta	2220
gactttcatg actcaaatgt taagaacctc tacgacaagg tccgactaca gcttagggat	2280
aatgcaaagg agctgggtaa cggttgtttc gagttctatc acaaatgtga taatgaatgt	2340
atggaaagta taagaaacgg aacgtacaac tatccgcagt attcagaaga agcaagatta	2400
aaaagagagg aaataagtgg ggtaaaattg gaatcaatag gaacttacca aatactgtca	2460
atttattcaa cagtggcgag ttccctagca ctggcaatca tgatggctgg tctatcttta	2520
tggatgtgct ccaatggatc gttacaatgc agaatttgca tttasaggcc tattttcttt	2580
agtttgaatt tactgttatt cgggtgtgcat ttctatgttt ggtgagcggg tttctgtgct	2640
cagagtgtgt ttattttatg taatttaatt tctttgtgag ctctgtttta gcaggctgtc	2700
ccttcagcaa ggcacacaaa agattttaat ttatttaaaa aaaaaaaaaa aaaagaccgg	2760
gaattcgata tcaagcttat cgacctgcag atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct	2820

[0003]

```

taagattgaa tctgttgcc ggtcttgcca tgattatcat ataatttctg ttgaattacg      2880
ttaagcatgt aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga      2940
ttagagtccc gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact      3000
aggataaatt atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga ttctagagtc tcaagcttcg      3060
gcgcgcc                                           3067

```

<210> 2
 <211> 568
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 由Seq Id No:1编码的合成的氨基酸

<400> 2

```

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1              5              10              15

```

```

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
              20              25              30

```

```

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
              35              40              45

```

```

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50              55              60

```

```

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65              70              75              80

```

```

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
              85              90              95

```

```

Glu Lys Ala Asn Pro Thr Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Ser Phe Asn
              100              105              110

```

```

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
              115              120              125

```

```

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
              130              135              140

```

```

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Leu Gly Ser Pro Ser Phe Phe
145              150              155              160

```

[0004]

Arg	Asn	Val	Val	Trp	Leu	Ile	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Tyr	Pro	Thr	Ile	165	170	175	
Lys	Lys	Ser	Tyr	Asn	Asn	Thr	Asn	Gln	Glu	Asp	Leu	Leu	Val	Leu	Trp	180	185	190	
Gly	Ile	His	His	Pro	Asn	Asp	Ala	Ala	Glu	Gln	Thr	Arg	Leu	Tyr	Gln	195	200	205	
Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ser	Ile	Gly	Thr	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Arg	210	215	220	
Leu	Val	Pro	Lys	Ile	Ala	Thr	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Gly	Gln	Ser	Gly	225	230	235	240
Arg	Met	Glu	Phe	Phe	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Pro	Asn	Asp	Ala	Ile	Asn	245	250	255	
Phe	Glu	Ser	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Ala	Pro	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Ile	260	265	270	
Val	Lys	Lys	Gly	Asp	Ser	Ala	Ile	Met	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Tyr	Gly	275	280	285	
Asn	Cys	Asn	Thr	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Met	Gly	Ala	Ile	Asn	Ser	Ser	290	295	300	
Met	Pro	Phe	His	Asn	Ile	His	Pro	Leu	Thr	Ile	Gly	Glu	Cys	Pro	Lys	305	310	315	320
Tyr	Val	Lys	Ser	Asn	Arg	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Leu	Arg	Asn	Ser	325	330	335	
Pro	Gln	Arg	Glu	Ser	Arg	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	340	345	350	
Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Trp	Gln	Gly	Met	Val	Asp	Gly	Trp	Tyr	355	360	365	
Gly	Tyr	His	His	Ser	Asn	Glu	Gln	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asp	Lys	370	375	380	
Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Asn	Lys	Val	Asn	Ser	385	390	395	400

[0005]

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
485 490 495

Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

Thr Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
530 535 540

Leu Ala Ile Met Met Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡核苷酸

pBinPlus.2613c

<400> 3

aggaaggga gaaagcgaaa ggag

24

<210> 4

<211> 56

<212> DNA

<213> 人工序列

[0006]

<220>			
<223>	合成的寡核苷酸	Mut-ATG115.r	
<400>	4		
gtgccgaagc acgatctgac aacgttgaag atcgctcacg caagaaagac aagaga			56
<210>	5		
<211>	52		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的寡核苷酸	Mut-ATG161.c	
<400>	5		
gttgtcagat cgtgcttogg caccagtaca acgttttctt tcaactgaagc ga			52
<210>	6		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的寡核苷酸	LC-C5-1.110r	
<400>	6		
tctcctggag tcacagacag ggtgg			25
<210>	7		
<211>	39		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的寡核苷酸	ApaI-H5 (A-Indo).1c	
<400>	7		
tgtcgggccc atggagaaaa tagtgcttct tcttgcaat			39
<210>	8		
<211>	37		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的寡核苷酸	H5 (A-Indo)-StuI.1707r	
<400>	8		
aaataggcct ttaaattgcaa attctgcatt gtaacga			37
<210>	9		
<211>	3111		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			

[0007]

<223> 合成的寡核苷酸构建体660

<400> 9

```

agaggtaccc cgggctggta tttttatatg ttgtcaaata actcaaaaac cataaaagtt      60
taagttagca agtgtgtaca tttttacttg aacaaaaata ttcacctact actgtttataa      120
atcattatta aacattagag taaagaaata tggatgataa gaacaagagt agtgatatatt      180
tgacaacaat tttgttgcaa catttgagaa aattttgttg ttctctcttt tcattgggtca      240
aaaacaatag agagagaaaa aggaagaggg agaataaaaa cataatgtga gtatgagaga      300
gaaagttgta caaaagttgt accaaaatag ttgtacaaat atcattgagg aatttgacaa      360
aagctacaca aataagggtt aattgctgta aataaataag gatgacgcac tagagagatg      420
taccattaga gaatttttgg caagtcatta aaaagaaaaga ataaattatt tttaaaatta      480
aaagttgagt catttgatta aacatgtgat tatttaatga attgatgaaa gagttggatt      540
aaagttgtat tagtaattag aatttggtgt caaatttaat ttgacatttg atcttttctt      600
atatattgcc ccatagagtc agttaactca tttttatatt tcatagatca aataagagaa      660
ataacggtat attaatccct ccaaaaaaaaa aaaacggtat atttactaaa aaatctaagc      720
cacgtaggag gataacagga tccccgtagg aggataacat ccaatccaac caatcacaac      780
aatcctgatg agataaccca ctttaagccc acgcacatctt ggcacatcta cattatctaa      840
atcacacatt ctccacaca tctgagccac acaaaaacca atccacatct ttatcaccca      900
ttctataaaa aatcacactt tgtgagtcta cactttgatt cccttcaaac acatacaaaag      960
agaagagact aattaattaa ttaatcatct tgagagaaaa tggagaaaat agtgctttct      1020
cttgcaatag tcagtcttgt taaaagtgat cagatttgca ttggttacca tgcaaacaaat      1080
tcaacagagc aggttgacac aatcatggaa aagaacgtta ctgttacaca tgcccaagac      1140
atactggaaa agacacacaa cggaagctc tgcgatctag atggagtga ggcctctaatt      1200
ttaagagatt gtagtgtagc tggatggtc ctcgggaacc caatgtgtga cgaattcatt      1260
aatgtaccgg aatggtctta catagtggag aaggccaatc caaccaatga cctctgttac      1320
ccagggagtt tcaacgacta tgaagaactg aaacacotat tgagcagaat aaaccatttt      1380
gagaaaatte aaatcatccc caaaagttct tggtcgcatc atgaagctc atcaggagtt      1440
agctcagcat gtccatacct gggaagtccc tcctttttta gaaatgtggt atggcttatt      1500
aaaaagaaca gtacataccc aacaataaag aaaagctaca ataataccaa ccaagaggat      1560
cttttggtac tgtggggaat tcaccatcct aatgatgcgg cagagcagac aaggctatat      1620
caaaacccaa ccacctatat ttccattggg acatcaaac taaaccagag attggtacca      1680
aaaatagcta ctagatccaa agtaaagggg caaagtggaa ggatggagtt cttctggaca      1740

```

[0008]

```

attttaaaac ctaatgatgc aatcaacttc gagagtaatg gaaatttcat tgctccagaa      1800
tatgcataca aaattgtcaa gaaaggggac tcagcaatta tgaaaagtga attggaatat      1860
ggtaactgca acaccaagtg tcaaactcca atggggggcga taaactctag tatgccattc      1920
cacaacatac accctctcac catcggggaa tgccccaat atgtgaaatc aaacagatta      1980
gtccttgcaa cagggctcag aaatagccct caaagagaga gcagaagaaa aaagagagga      2040
ctatttggag ctatagcagg ttttatagag ggaggatggc agggaatggg agatggttgg      2100
tatgggtacc accatagcaa tgagcagggg agtgggtacg ctgcagacaa agaatccact      2160
caaaaggcaa tagatggagt caccaataag gtcaactcaa tcattgacaa aatgaacact      2220
cagtttgagg ccgttggaag ggaatttaac aacttagaaa ggagaataga gaatttaaac      2280
aagaagatgg aagacgggtt tctagatgtc tggacttata atgccgaact tctggttctc      2340
atggaaaatg agagaactct agactttcat gactcaaatg ttaagaacct ctacgacaag      2400
gtccgactac agcttaggga taatgcaaag gagctgggta acggttggtt cgagttctat      2460
cacaatgtg ataatgaatg tatggaaagt ataagaaacg gaacgtacaa ctatccgcag      2520
tattcagaag aagcaagatt aaaaagagag gaaataagtg gggtaaaatt ggaatcaata      2580
ggaacttacc aaatactgtc aatttattca acagtggcga gttccctagc actggcaatc      2640
atgatggctg gtctatcttt atggatgtgc tccaatggat cgttacaatg cagaatttgc      2700
atttaagagc tctaagttaa aatgottctt cgtctcctat ttataatatg gtttgttatt      2760
gttaattttg ttcttgtaga agagcttaat taatcgttgt tgttatgaaa tactatttgt      2820
atgagatgaa ctggtgtaat gtaattcatt tacataagtg gagtcagaat cagaatgttt      2880
cctccataac taactagaca tgaagacctg ccgcgtacaa ttgtcttata tttgaacaac      2940
taaaattgaa catcttttgc cacaacttta taagtgggta atatagctca aatatatggt      3000
caagttcaat agattaataa tggaaatatc agttatcgaa attcattaac aatcaactta      3060
acgttattaa ctactaattt tatatcatcc cctttgataa atgatatgac a              3111

```

<210> 10

<211> 26

<212> PRT

<213> 紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)

<400> 10

```

Met Ala Lys Asn Val Ala Ile Phe Gly Leu Leu Phe Ser Leu Leu Leu
1              5              10              15

```

```

Leu Val Pro Ser Gln Ile Phe Ala Glu Glu
                20              25

```

[0009]

<210>	11		
<211>	25		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的寡核苷酸	Plasto-443c	
<400>	11		25
	gtattagtaa ttagaatttg gtgtc		
<210>	12		
<211>	34		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的寡核苷酸	supP19-plasto.r	
<400>	12		34
	ccttgtag ctcgttccat tttctctcaa gatg		
<210>	13		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的寡核苷酸	supP19-1c	
<400>	13		20
	atggaacgag ctatacaagg		
<210>	14		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成的寡核苷酸	SupP19-SacI.r	
<400>	14		32
	agtcgagctc ttactcgctt tctttttcga ag		

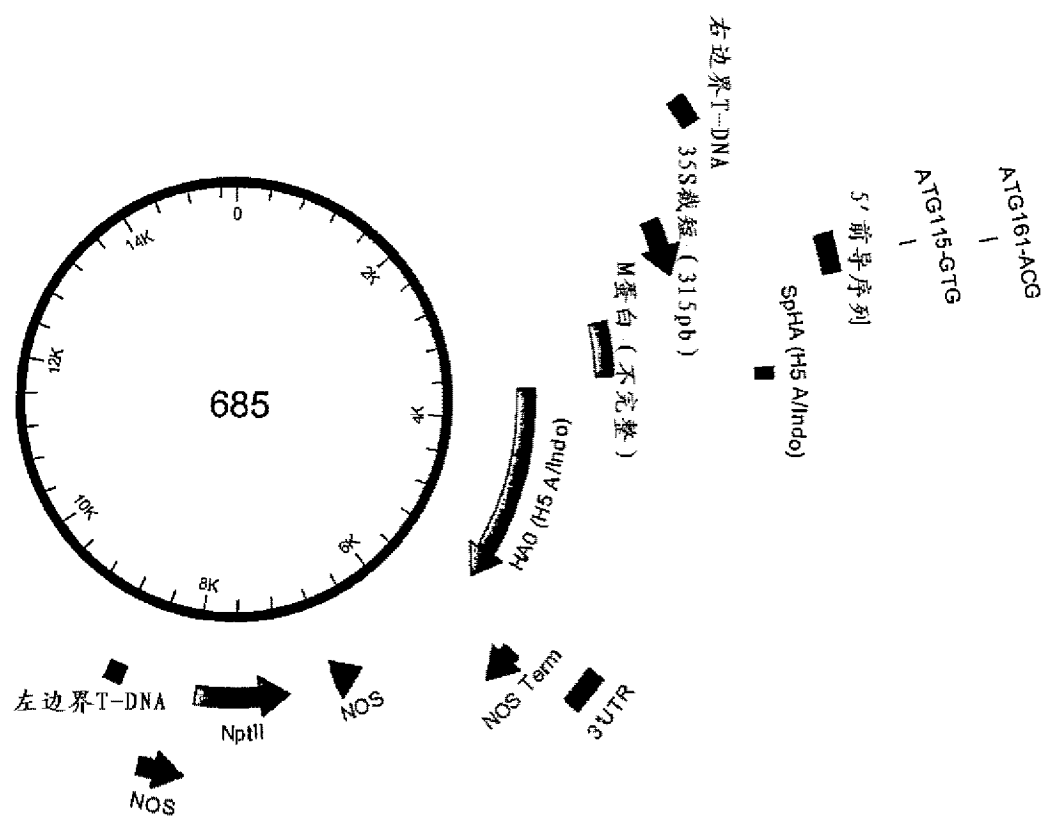


图 1

TTAATTAAGAATTTCGAGCTCCACCGCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTA
TTGAGAAGATAGTGGAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCAITGCGATAAAGGAAAGGCCATC
GTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCACCCACGAGGAGCATCGTGGA
AGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATG
ACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGT
ATTAATACTTAATAGGTTTGTATAAAGCGAACGTGGGGAAACCCGAACCAACCTTCTTCTAAACTC
TCTCTCATCTCTTTAAAGCAAACCTTCTCTCTTGTCTTCTTGTGCGTGAGCGATCTTCAACGTTGTCAGAT
CGTGCTTCGGCACCAGTACAACGTTTCTTTCACTGAAGCGAAATCAAAGATCTCTTTGTGGACACGTA
GTGCGGCGCCATTAAATAACGTGTACTTGTCTATTCTTGTGCGGTGTGGTCTTGGGAAAAGAAAGCTTG
CTGGAGGCTGCTGTTAGCCCCATACATTACTTGTACGATTCTGCTGACTTTCGGCGGGTGCAATATC
TCTACTTCTGCTTGACGAGGTATTGTTGCCTGTACTTCTTCTTCTTCTTCTTGTGATTGGTTCTATAA
GAAATCTAGTATTTTCTTTGAAACAGAGTTTTCCCGTGGTITTCGAACTTGGAGAAAGATTGTTAAGCT
TCTGTATATTCTGCCCCAAATTTGTGCGGCCCCATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGAATAGTCAGTCT
TGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATTGCAAACTCAACAGAGCAGGTTGACACAATCA
TGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATACTGGAAGACACACAACGGGAAGCTCTGC
GATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGGAACCC
AATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAACCAATG
ACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCAT
TTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTTAGCTCA
GCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACA
TACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGGAATTCA
CCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAAACCCAACCACTATATTTCCATTGGGA
CATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGA
AGGATGGAGTCTTCTGGACAATTTTAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAATTTCT
ATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGAATTGGA
ATATGGTAACTGCAACACCAAGTGCAAACTCCAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCATTCCACA
ACATACACCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCCTTGCAACA
GGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAGAAAAAAGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAG
GTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAG
GGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCA
ACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAATAACTTAGAAAGG
AGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCCGAAC
TCTGGTTCATGGAATAAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTAAAGAACTCTACGACAA
GGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCACAAT
GTGATAATGAATGTATGGAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGCAGTATTCAGAAGAAGCA
AGATTAAGAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAATACTGTCAAT
TTATTCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTC
CAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAAGGCCTATTTCTTTAGTTTGAATTTACTGTTATTC
GGTGTGCATTTCTATGTTTGGTGAGCGGTTTTCTGTGCTCAGAGTGTGTTATTTTATGTAATTTAATTT
CTTTGTGAGCTCCTGTTTAGCAGGTCGTCCCTCAGCAAGGACACAAAAAGATTTTAATTTTATTAATAA
AAAAAAAAAAAAAGACCGGAATTCGATATCAAGCTTATCGACCTGCAGATCGTTCAAACATTTGGC
AATAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGTCTTGCATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATT
ACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTATGATTAGAG
TCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGAACTAGGATAAATTATCG
CGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATTCTAGAGTCTCAAGCTTCGGCGCGCC

图 2A

MEKIVLLLAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTTHAQDILEKTHNGKLCDLGDGVKPLILRDCS
 VAGWLLGNPMCDDEFINPEWSYIVEKANPTNDLCYPGFSFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSDHEASS
 GVSSACPYLGSPSFERNVWVLIKKNSTYPTIKKSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTRLYQNPTTYISIG
 TSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDAINFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGN
 CNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NRLVLATGLRNSPQRESRRKKRGLFGAIAFGIEGGWQ
 GMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVTKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKKM
 EDGFLDVWYTNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRLQLRDNAKELGNGCFEFYHKCDNECMESIR
 NGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMMAGLSLWMCSNGSLQCRICI

图 2B

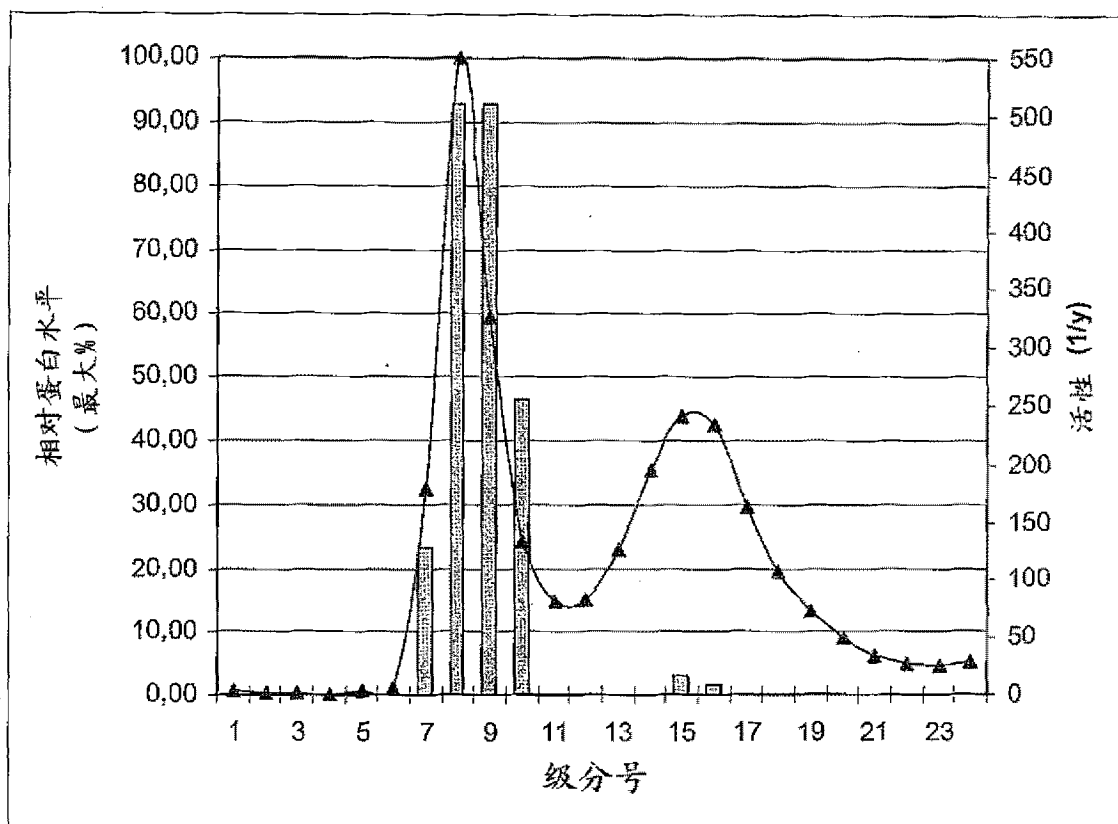


图 3A

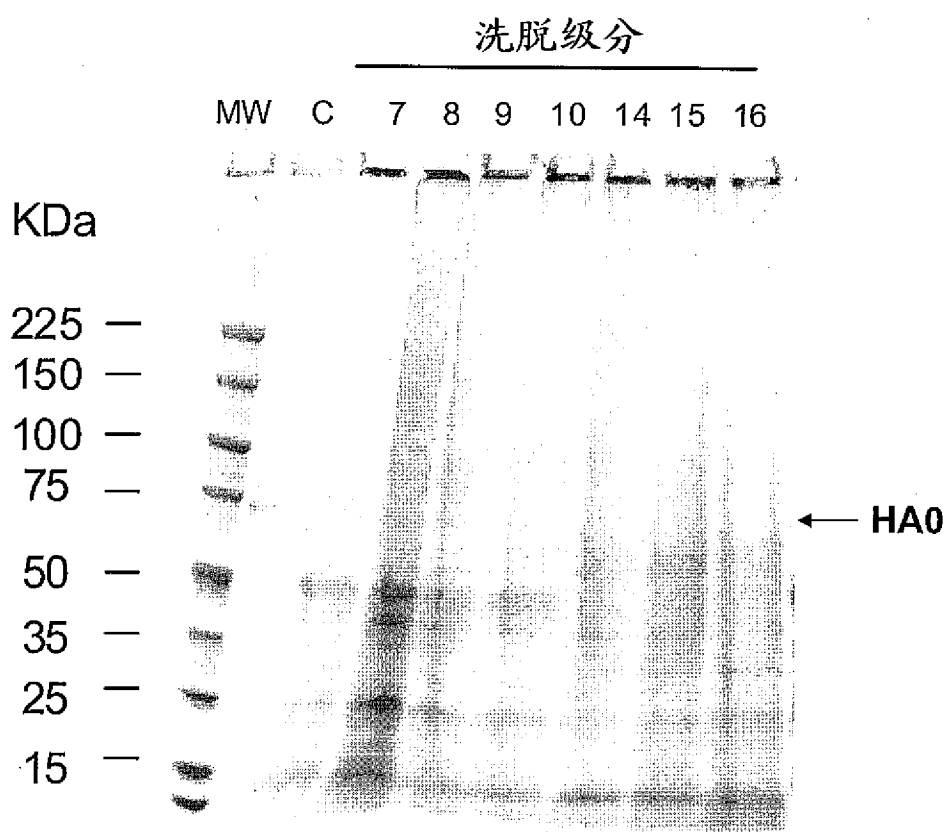


图 3B

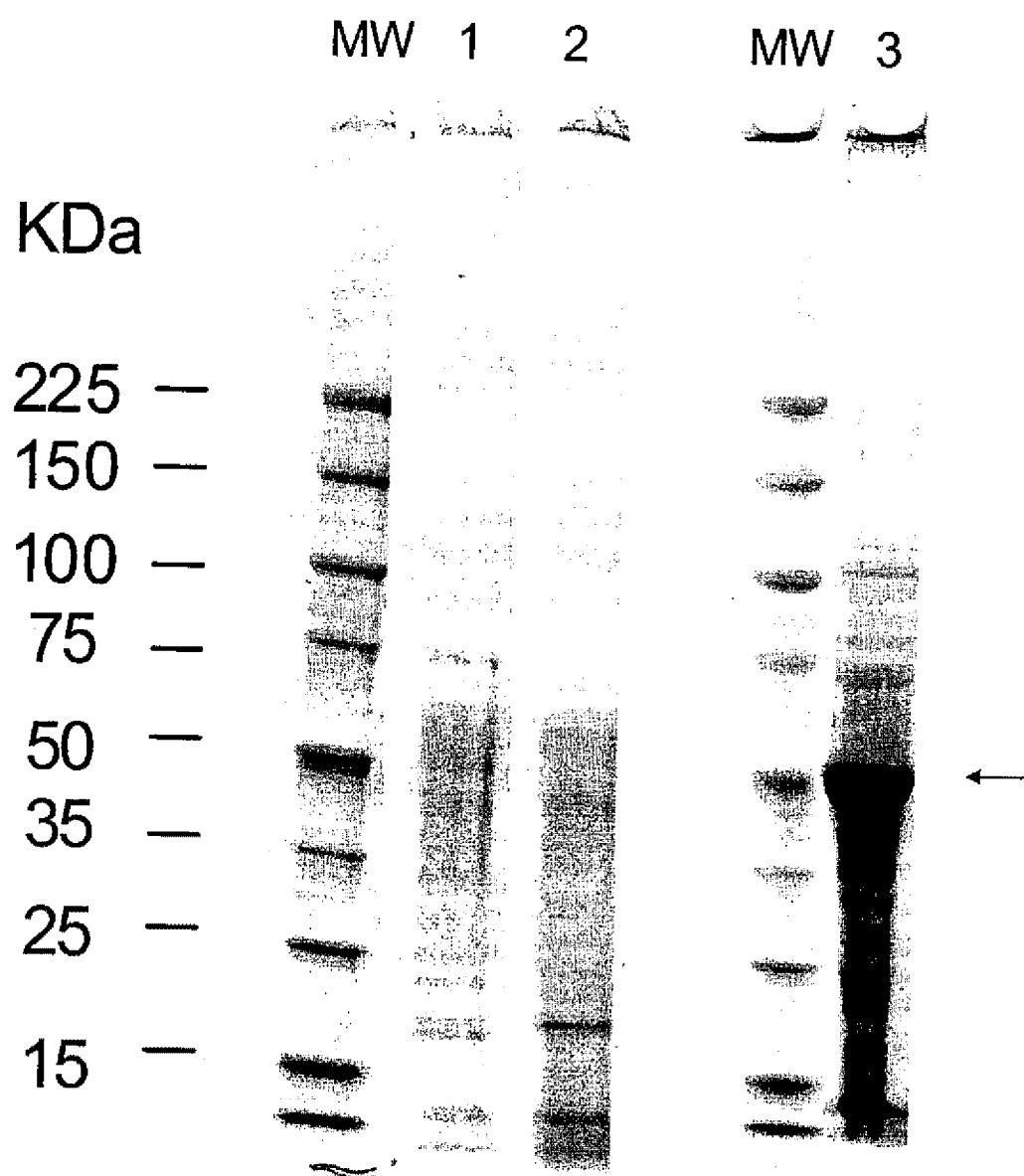


图 4

AGAGGTACCCCGGGCTGGTATATTTATATGTTGTCAAATAACTCAAAAACCATAAAAAGTTTAAGTTAGC
AAGTGTGTACATTTTTACTTGAACAAAAATATTCACCTACTACTGTTATAAATCATTATTAAACATTAG
AGTAAAGAAATATGGATGATAAGAACAAGAGTAGTGATATTTTGACAACAATTTTGTGCAACATTTG
AGAAAATTTTGTGTTCTCTCTTTTCATTGGTCAAAAACAATAGAGAGAGAAAAAGGAAGAGGGAGAA
TAAAAACATAATGTGAGTATGAGAGAGAAAGTTGTACAAAAGTTGTACCAAAATAGTTGTACAAATAT
CATTGAGGAATTTGACAAAAGCTACACAAATAAGGGTTAATTGCTGTAAATAAATAAGGATGACGCAT
TAGAGAGATGTACCATTAGAGAATTTTGGCAAGTCATTAAGAAAGAAAGAAATAAATTTATTTTAAAAAT
TAAAAGTTGAGTCATTTGATTAAACATGTGATTATTTAATGAATTGATGAAAGAGTTGGATTAAAGTTG
TATTAGTAATTAGAATTTGGTGTCAAATTTAATTTGACATTTGATCTTTTCTATATATTGCCCATAGA
GTCAGTTAACTCATTTTTATATTTTCATAGATCAAATAAGAGAAATAACGGTATATTAATCCCTCCAAAA
AAAAAAAACGGTATATTTTACTAAAAAATCTAAGCCACGTAGGAGGATAACAGGATCCCCGTAGGAGGA
TAACATCCAATCCAACCAATCACACAATCCTGATGAGATAACCCACTTTAAGCCACGCATCTGTGGC
ACATCTACATTATCTAAATCACACATTCCTCCACACATCTGAGCCACACAAAAACCAATCCACATCTTT
ATCACCATTCTATAAAAAATCACACTTTGTGAGTCTACACTTTGATTCCCTTCAAACACATACAAAGA
GAAGAGACTAATTAATTAATTAATCATCTTGAGAGAAAATGGAGAAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAATA
GTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAATTCAACAGAGCAGGTTGAC
ACAATCATGGAAGAAGAACGTTACTGTTACACATGCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAA
GCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTAAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGG
GAACCCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTACCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAA
CCAATGACCTCTGTTACCCAGGGAGTTTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTATTGAGCAGAATA
AACCATTTTGAGAAAATTCAAATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCGATCATGAAGCCTCATCAGGAGTT
AGCTCAGCATGTCCATACCTGGGAAGTCCCTCCTTTTTTAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAC
AGTACATACCCAACAATAAAGAAAAGCTACAATAATACCAACCAAGAGGATCTTTTGGTACTGTGGGG
AATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAGGCTATATCAAACCCAACCACCTATATTTCCAT
TGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAA
GTGGAAGGATGGAGTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCTAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGA
AATTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAATTATGAAAAGTGA
ATTGGAATATGGTAAGTCAACACCAAGTGTCAAACCTCAAATGGGGGCGATAAACTCTAGTATGCCAT
TCCACAACATACACCTCTCACCATCGGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTTG
CAACAGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGCAGAAAGAAAAAAGAGAGGACTAATTTGGAGCTAT
AGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATG
AGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAAGAAATCCACTCAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAA
GGTCAACTCAATCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAAITTAATAACTTAG
AAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCC
GAACTTCTGGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACTCTAGACTTTCATGACTCAAATGTAAAGAACCCTAC
GACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCA
CAAATGTGATAATGAATGTATGGAAAAGTATAAGAAACGGAACGTACAACCTATCCGCAGTATTCAGAAG
AAGCAAGATTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGGGTAAAATTGGAATCAATAGGAACCTACCAATACT
GTCAATTTATTCACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATGATGGCTGGTCTATCTTTATGGAT
GTGCTCCAATGGATCGTTACAATGCAGAATTTGCATTTAAGAGCTCTAAGTTAAATGCTTCTTCGTCT
CCTATTTATAATATGGTTTGTATTGTTAATTTTGTCTTGTAGAAGAGCTTAATTAATCGTTGTTGTTA
TGAAATACTATTTGTATGAGATGAACTGGTGTAAATGTAATTCATTTACATAAGTGGAGTCAGAATCAG
AATGTTTCCTCCATAACTAAGTACATGAAGACCTGCCGCTACAATTGCTTATATTTGAACAACCTA
AAATTGAACATCTTTTGGCACAACCTTTATAAGTGGTTAATATAGCTCAAATATATGGTCAAGTTCAATA
GATTAATAATGGAAATATCAGTTATCGAAATTCATTAACAATCAACTTAACGTTATTAAGTACTAATTT
TATATCATCCCTTTGATAAATGATAGTACA

图 5

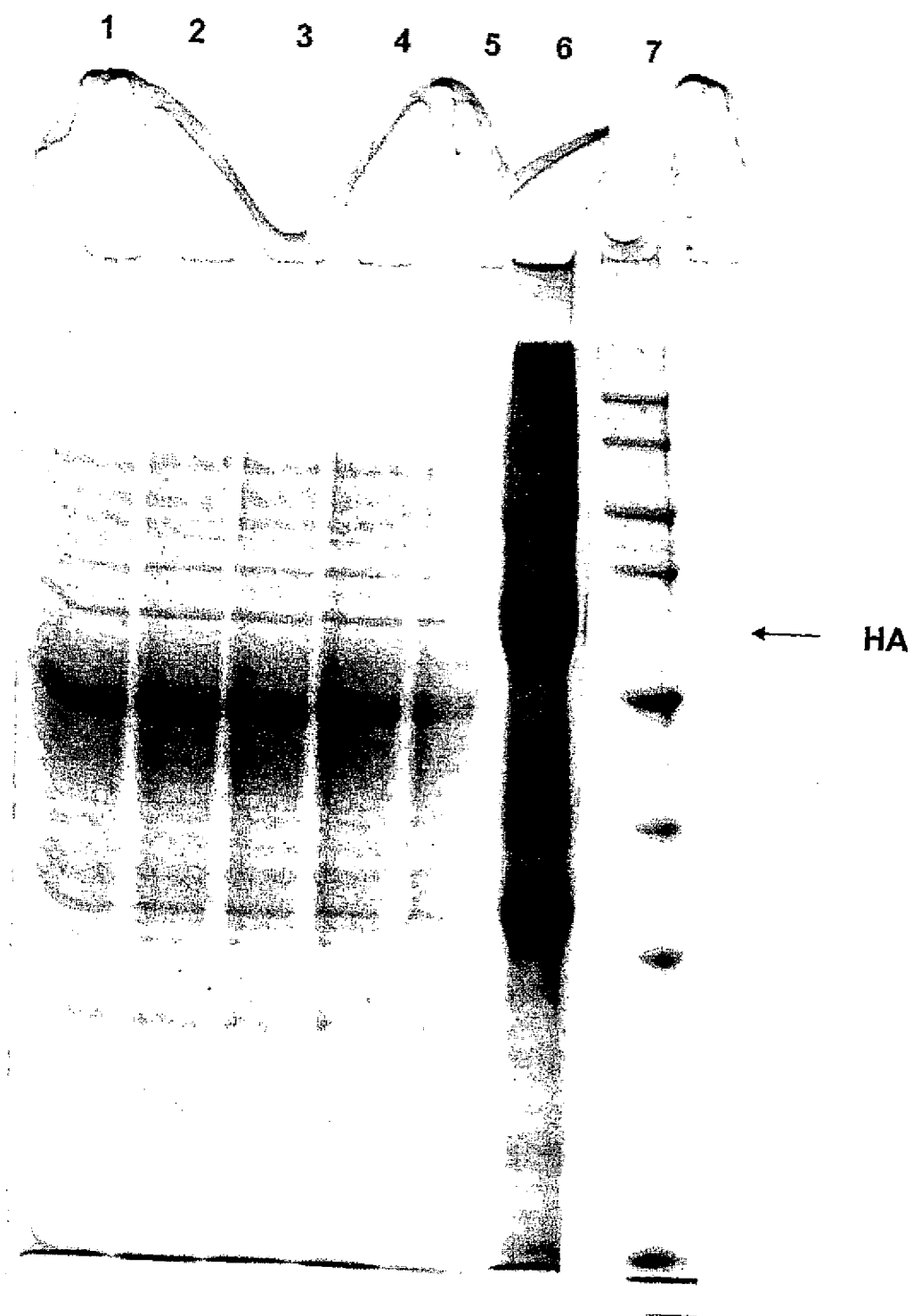


图 6

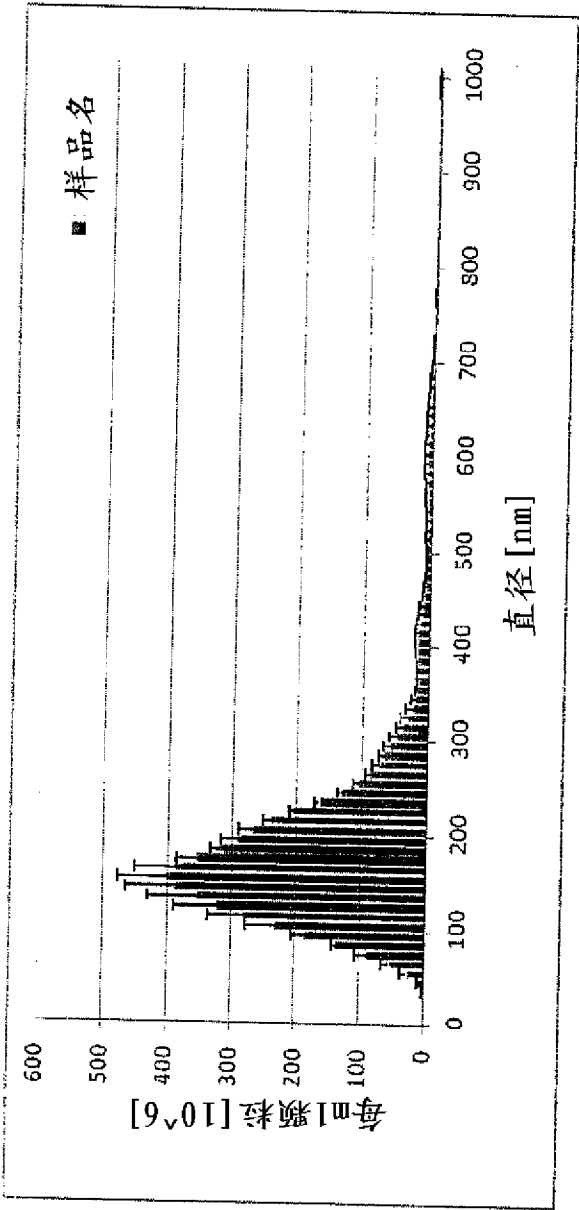


图 7A

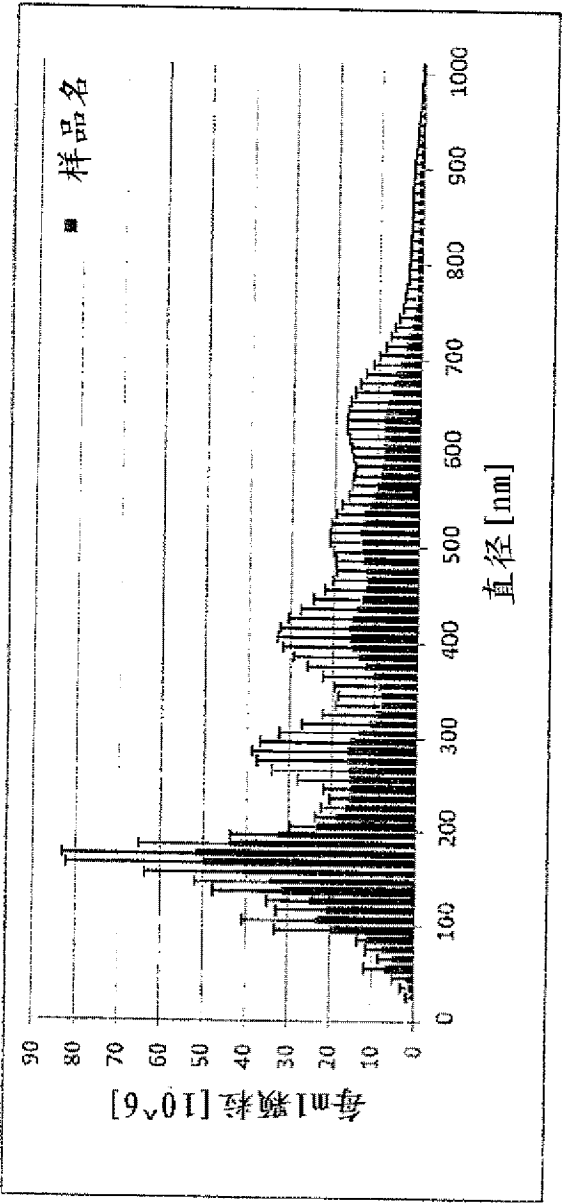


图 7B

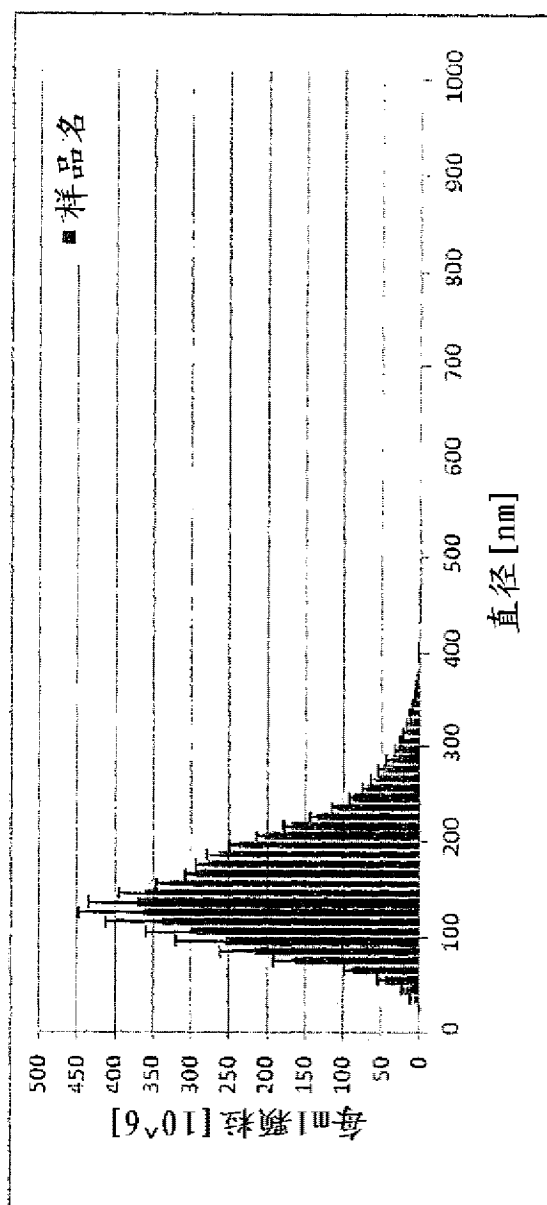


图 7C

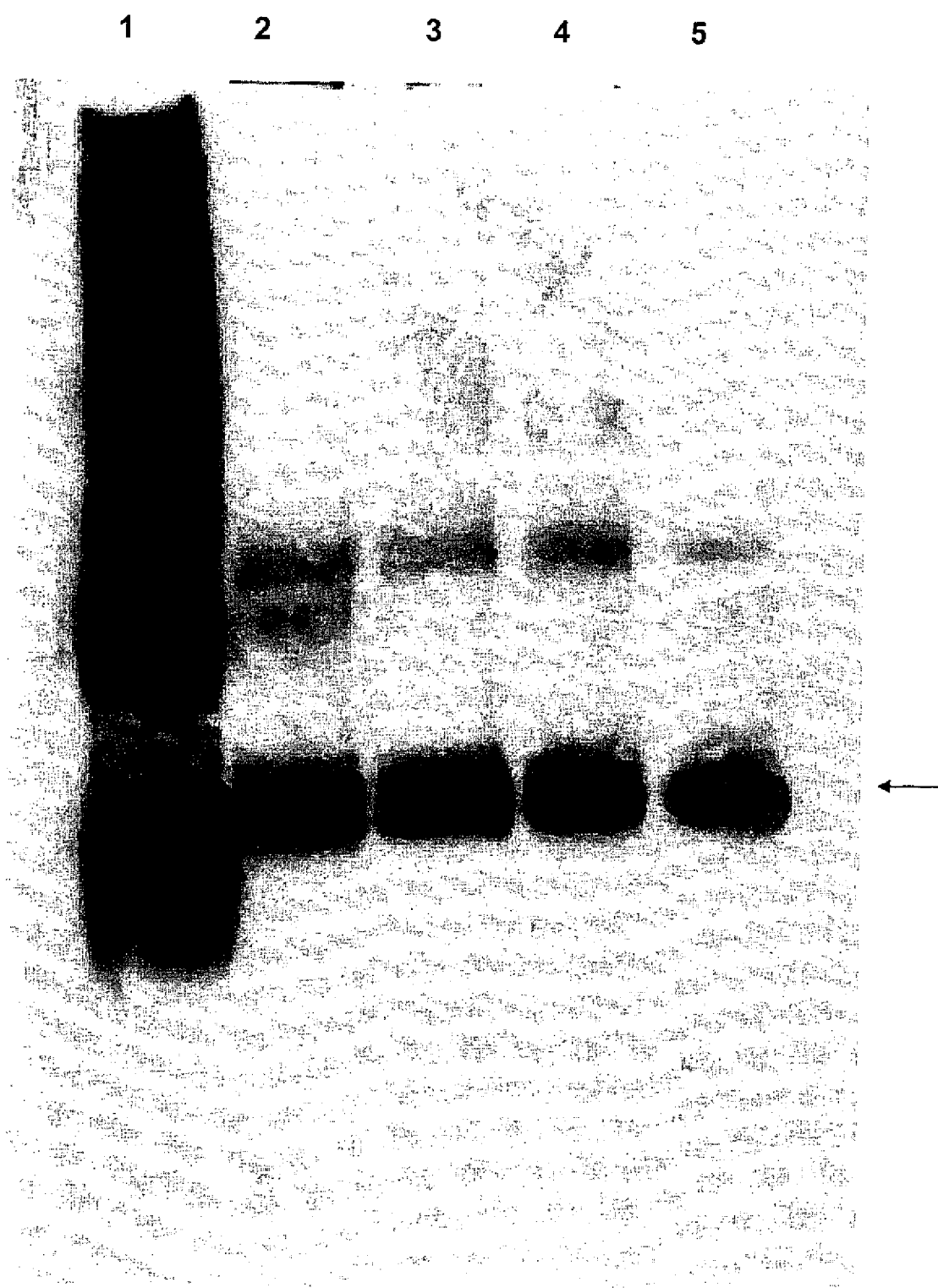


图 8