

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/51

# [12] 发明专利申请公开说明书

C12N 7/01 C07K 14/02

C07K 16/08 C12Q 1/68

A61K 39/29

[21] 申请号 98814201.5

[43] 公开日 2001 年 11 月 14 日

[11] 公开号 CN 1322251A

[22] 申请日 1998.6.19 [21] 申请号 98814201.5

[86] 国际申请 PCT/SG98/00046 1998.6.19

[87] 国际公布 WO99/66048 英 1999.12.23

[85] 进入国家阶段日期 2001.2.16

[71] 申请人 新加坡共和国政府

地址 新加坡新加坡市

[72] 发明人 温崇仁 林玉娇 赵 奕 陈维宁

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

代理人 吴 奎

权利要求书 10 页 说明书 29 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 一株突变的人乙型肝炎病毒株及其应用

[57] 摘要

本发明提供一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原 - 'S' - 133 Oon 株(变蛋氨酸为苏氨酸)的乙型肝炎病毒分离株,其所组成的病毒基因组已于 1997 年 12 月 15 日在欧洲细胞培养物保藏中心保藏,登记号为 P97121501、P97121502 和 P97121503。本发明还提供编码如下一种多肽的分离核酸,其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原,所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同,其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。本发明还提供编码如下一种肽的分离核酸及其纯化的肽,其中所说的肽由含有 SEQ ID NO:1 的 527 至 595 核苷酸的核酸分子编码。本发明还提供使用所公开的分离核酸和肽的各种方法。本发明进一步提供所公开的分离核酸、多肽和肽以及抗体的各种应用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版



## 权 利 要 求 书

1. 一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原- 'S' -133 Oon 株 (变蛋氨酸为苏氨酸) 的乙型肝炎病毒分离株, 其所组成的病毒基因组已于 1997 年 12 月 15 日在欧洲细胞培养物保藏中心保藏, 登记号为 P97121501、P97121502 和 P97121503。

2. 编码如下一种多肽的分离核酸, 其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原, 所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同, 其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

3. 权利要求 2 的分离核酸, 其中所说多肽由被命名为 SEQ ID NO: 1 的核酸序列 155 至 835 位核苷酸编码。

4. 权利要求 3 的分离核酸, 在位置 551-553 含有核苷酸 "ACG"。

5. 权利要求 2 的分离核酸, 其中核酸是 DNA。

6. 权利要求 2 的分离核酸, 其中核酸是 RNA。

7. 权利要求 5 的分离核酸, 其中核酸是 cDNA。

8. 权利要求 5 的分离核酸, 其中核酸是基因组 DNA。

9. 权利要求 2 的分离核酸, 其中多肽具有与被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 174 至 400 位氨基酸残基基本上相同的氨基酸序列。

10. 编码一种肽的分离核酸, 其中所说的肽由含有 SEQ ID NO: 1 的 527 至 595 位核苷酸的核酸分子编码。

11. 编码一种肽的分离核酸, 其中所说的肽具有包含被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 298 至 320 位氨基酸残基的氨基酸序列。

12. 如下一种载体, 该载体含有编码一种多肽并与 RNA 转录启动子操纵连接的分离核酸, 其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原, 所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同, 其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

13. 含有编码一种肽的分离核酸的载体, 其中所说的肽由含有 SEQ ID NO: 1 的 527 至 595 位核苷酸的核酸分子编码。

14. 权利要求 12 或 13 的载体, 其中载体含有病毒 DNA。

15. 用于制备多肽的宿主载体系统, 该系统在一种合适的宿主中含有的

利要求 12 的载体。

16. 用于制备多肽的宿主载体系统，该系统在一种合适的宿主中含有权利要求 13 的载体。

17. 一种制备多肽的方法，该方法包括在允许多肽产生的合适条件下生成权利要求 15 的宿主载体系统，并回收这样产生的多肽。

18. 一种制备肽的方法，该方法包括在允许多肽产生的合适条件下生成权利要求 16 的宿主载体系统，并回收这样产生的多肽。

19. 一种获得纯化形式的多肽的方法，该方法包括：

- (a) 将权利要求 12 的载体导入一种合适的宿主细胞；
- (b) 培养所产生的宿主细胞，来产生该多肽；
- (c) 回收步骤 (b) 中产生的多肽；并
- (d) 纯化这样回收的多肽。

20. 一种获得纯化形式的肽的方法，该方法包括：

- (a) 将权利要求 13 的载体导入一种合适的宿主细胞；
- (b) 培养所产生的宿主细胞，来产生该多肽；
- (c) 回收步骤 (b) 中产生的多肽；并
- (d) 纯化这样回收的多肽。

21. 一种纯化的多肽，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

22. 用权利要求 19 的方法获得的一种纯化的多肽。

23. 一种纯化的肽，其中该肽具有包含被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 298 至 320 位氨基酸残基的氨基酸序列。

24. 用权利要求 20 的方法获得的一种纯化的肽。

25. 一种至少为 15 个核苷酸的寡核苷酸，它能特异性地与一种核酸分子内的独特核苷酸序列杂交，其中所说核酸分子编码一种多肽，该多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸；并且该寡核苷酸不能与编码野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的核酸分子内的任何核苷酸序列杂交。

26. 权利要求 25 的寡核苷酸，它包含 SEQ ID NO: 1 的 527 至 595 位核苷酸。

27. 获得针对一种多肽的抗体的方法，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，并且这种抗体不能针对野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原，该方法包括：

- (a) 获取纯化形式的多肽；
- (b) 免疫一种能够产生针对纯化多肽的抗体的生物；
- (c) 收集所产生的抗体；
- (d) 在能够形成一种复合物的条件下将产生的抗体与纯化多肽结合；
- (e) 确定能够与纯化多肽形成一种复合物的所产生抗体，从而获得针对该多肽的抗体。

28. 权利要求 27 的方法，其中多肽由被命名为 SEQ ID NO: 1 的核酸序列的 155 至 835 位核苷酸编码。

29. 权利要求 27 的方法，其中多肽具有与被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 174 至 400 位氨基酸残基基本上相同的氨基酸序列。

30. 权利要求 27 的方法，其中生物包括兔或小鼠。

31. 获得针对一种肽的抗体的方法，其中所说的肽具有包含被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 298 至 320 位氨基酸残基的氨基酸序列，该方法包括：

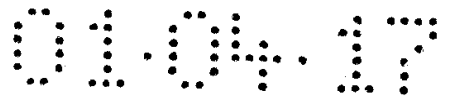
- (a) 获取纯化形式的肽；
- (b) 免疫一种能够产生针对纯化肽的抗体的生物；
- (c) 收集所产生的抗体；
- (d) 在能够形成一种复合物的条件下将产生的抗体与纯化肽结合；并
- (e) 确定能够与纯化肽形成一种复合物的抗体，从而获得针对该肽的抗体。

32. 权利要求 31 的方法，其中生物包括兔或小鼠。

33. 权利要求 27 或 31 中获得的抗体。

34. 权利要求 33 的抗体的单克隆抗体。

35. 能够检测一种多肽的抗体，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变



的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，并且这种抗体不能检测野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原。

36. 能够检测一种肽的抗体，其中所说的肽具有包含被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 298 至 320 位氨基酸残基的氨基酸序列。

37. 编码一种多肽的核酸的应用，其中多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，用来检测被试者是否被一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原- 'S' -133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株感染，其中这种检测包括：

(a) 从被试者中获得一种合适的核酸样品；并

(b) 测定步骤 (a) 的核酸样品是否为或来自编码一种多肽的核酸，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

38. 权利要求 37 的应用，其中步骤 (a) 的核酸样品包含对应于编码一种多肽的 DNA 的转录物的 mRNA，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，其中步骤 (b) 的测定包括：

(i) 在允许 mRNA 与寡核苷酸结合的条件下将 mRNA 与权利要求 25 的寡核苷酸接触，以形成一种复合物；

(ii) 分离这样形成的复合物；并

(iii) 鉴定分离复合物中的 mRNA，从而测定 mRNA 是否为或来自编码该多肽的核酸。

39. 权利要求 37 的应用，其中步骤 (a) 的核酸样品包含对应于编码一种多肽的 DNA 的转录物的 mRNA，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸

而不是蛋氨酸，其中步骤（b）的测定包括：

（i）在合适条件下翻译 mRNA，以获得氨基酸序列；并

（ii）将步骤（i）的氨基酸序列与权利要求 9 的分离核酸编码的氨基酸序列进行比较，从而测定核酸样品是否为或来自一种编码该多肽的核酸。

40. 权利要求 37 的应用，其中步骤（b）的测定包括：

（i）扩增存在于步骤（a）的样品中的核酸；并

（ii）在所产生的扩增核酸中检测多肽的存在。

41. 能够识别一种多肽的抗体的应用，所说多肽是一种乙型肝炎病毒株的突变主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，用来测定被试者是否被一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 On 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株感染，其中这种测定包括：

（a）从被试者中获得一种合适的样品；并

（b）测定步骤（a）的样品是否为或来自编码一种多肽的核酸，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，这通过下述方法完成，在合适条件下将样品与权利要求 35 或 36 的抗体结合，以便确定被试者是否被感染。

42. 权利要求 37、38 或 41 的应用，其中分离核酸、寡核苷酸或抗体用一种可检测的标记物标记。

43. 权利要求 42 的应用，其中可检测标记物是放射性同位素、荧光素或酶。

44. 权利要求 37 的应用，其中样品包括血液、组织或血清。

45. 编码一种多肽的核酸的应用，其中多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，用来检测被试者是否具有肝细胞癌的易感体质，其中这种检测包括：

（a）从被试者中获得一种合适的核酸样品；并

(b) 测定步骤 (a) 的核酸样品是否为或来自编码一种多肽的核酸，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

46. 权利要求 45 的应用，其中步骤 (a) 的核酸样品包含对应于编码一种多肽的 DNA 的转录物的 mRNA，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，其中步骤 (b) 的测定包括：

(i) 在允许 mRNA 与寡核苷酸结合的条件下将 mRNA 与权利要求 25 的寡核苷酸接触，以形成一种复合物；

(ii) 分离这样形成的复合物；并

(iii) 鉴定分离复合物中的 mRNA，从而测定 mRNA 是否为或来自编码该多肽的核酸。

47. 权利要求 45 的应用，其中步骤 (a) 的核酸样品包含对应于编码一种多肽的 DNA 的转录物的 mRNA，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，其中步骤 (b) 的测定包括：

(i) 在合适条件下翻译 mRNA，以获得氨基酸序列；

(ii) 将步骤 (i) 的氨基酸序列与权利要求 9 的分离核酸的氨基酸序列进行比较，从而测定核酸样品是否为或来自一种编码该多肽的核酸。

48. 权利要求 45 的应用，其中步骤 (b) 的测定包括：

(i) 扩增步骤 (a) 的样品中存在的核酸；并

(ii) 在所产生的扩增核酸中检测多肽的存在。

49. 能识别一种多肽的抗体的应用，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，用来测定被试者是否具有肝细胞癌的易感体质，其中这种测定包括：

(a) 从被试者中获得一种合适的核酸样品；并



(b) 测定步骤 (a) 的核酸样品是否为或来自编码一种多肽的核酸分子，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，这通过下述方法完成，在合适条件下将样品与权利要求 35 或 36 的抗体结合，以便确定被试者是否具有肝细胞癌的易感体质。

50. 权利要求 46、47 或 49 的应用，其中分离核酸、寡核苷酸或抗体用一种可检测的标记物标记。

51. 权利要求 50 的应用，其中可检测标记物是放射性同位素、荧光素或酶。

52. 权利要求 45 的应用，其中样品包括血液、组织或血清。

53. 为药物生产而鉴定化合物的方法，所说的药物能够治疗一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原- 'S' -133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的感染，该方法包括：

(a) 在允许多肽与化合物结合的条件下将多肽与化合物接触，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸；

(b) 检测化合物与该多肽的特异性结合；并

(c) 测定该化合物是否能抑制该多肽，以便鉴定一种能够治疗该病毒株感染的化合物。

54. 为药物生产而鉴定化合物的方法，所说的药物能够预防一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原- 'S' -133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的感染，该方法包括：

(a) 在允许多肽与化合物结合的条件下将多肽与化合物接触，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸；

(b) 检测化合物与该多肽的特异性结合；并

(c) 测定该化合物是否能抑制该多肽，以便鉴定一种能够预防该病毒株感染的化合物。

55. 为药物生产而鉴定化合物的方法，所说的药物能够治疗肝细胞癌，该方法包括：

(a) 在允许多肽与化合物结合的条件下将多肽与化合物接触，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸；

(b) 检测化合物与该多肽的特异性结合；并

(c) 测定该化合物是否能抑制该多肽，以便鉴定一种能够治疗肝细胞癌的化合物。

56. 为药物生产而鉴定化合物的方法，所说的药物能够预防肝细胞癌，该方法包括：

(a) 在允许多肽与化合物结合的条件下将多肽与化合物接触，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸；

(b) 检测化合物与该多肽的特异性结合；并

(c) 测定该化合物是否能抑制该多肽，以便鉴定一种能够预防该病毒株感染的化合物。

57. 包含一种多肽或其衍生物以及一种可接受的药用载体的组合物，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，并且这种多肽衍生物的数量能够有效地在被试者中刺激或增强抗体产生。

58. 含有一种肽或其衍生物以及一种可接受的药用载体的组合物，其中所说的肽具有包含被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 298 至 320 位氨基酸残基的氨基酸序列，并且这种肽衍生物的数量能够有效地在被试者中刺激或增强抗体产生。

59. 包含按权利要求 55 的方法鉴定的化合物以及一种有效的药用载体的组合物，其中化合物的数量能够有效治疗肝细胞癌。

60. 包含按权利要求 56 的方法鉴定的化合物以及一种有效的药用载体的组合物，其中化合物的数量能够有效预防肝细胞癌。

61. 包含按权利要求 53 的方法鉴定的化合物以及一种有效的药用载体的组合物，其中化合物的数量能够有效地治疗一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的感染。

62. 包含按权利要求 54 的方法鉴定的化合物以及一种有效的药用载体的组合物，其中化合物的数量能够有效地预防一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的感染。

63. 权利要求 57 或 58 的组合物的应用，用于治疗感染了一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的被试者。

64. 权利要求 61 的组合物的应用，用于治疗感染了一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的被试者。

65. 权利要求 57 或 58 的组合物的应用，用于在被试者中预防一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的感染。

66. 权利要求 62 的组合物的应用，用于在被试者中预防一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的感染。

67. 权利要求 57 或 58 的组合物用于治疗患有肝细胞癌的被试者的应用。

68. 权利要求 59 的组合物用于治疗患有肝细胞癌的被试者的应用。

69. 权利要求 57 或 59 的组合物用于在被试者中预防肝细胞癌的应用。

70. 权利要求 60 的组合物用于在被试者中预防肝细胞癌的应用。

71. 在来自被试者的体液中筛选一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的方法，包括：

(a) 从被试者获得一种合适的体液样品；

(b) 在步骤 (a) 的样品中检测一种多肽的存在，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，以便在样品中筛选该病毒株。

72. 权利要求 71 的方法，其中体液包括血液、血清、或血液或血清的一种核酸样品。

73. 一种肝炎疫苗，该疫苗包含乙型肝炎病毒株的一种突变形式的主要表面抗原，该多肽具有的氨基酸序列与乙型肝炎病毒的主要表面抗原的野生型氨基酸序列不同，其差异在于该多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

74. 权利要求 73 的疫苗，进一步包含一种佐剂。



# 说明书

## 一株突变的人乙型肝炎病毒株及其应用

在整个申请中，各种参考文献在括号内给出。这些出版物的公开内容作为本发明的参考文献在此全文引入，来更全面地描述本发明所属领域的现状。

### 发明背景

本发明涉及从肝细胞癌(HCC)中分离的、在主要表面抗原中的 133 位氨基酸残基处带有一个突变(变蛋氨酸为苏氨酸)的人乙型肝炎病毒基因组、它的核苷酸序列、推导的 4 种主要蛋白的氨基酸序列、抗原、抗体、检测系统、有效疫苗开发和抗病毒试剂。

HCC 是最常见的人肝癌之一，尤其是在亚洲，每年占全世界新发现病例的 70%。它通常由作为慢性肝病的并发症——肝硬化引起。HCC 病人的临床表现是非特异性的症状，它们仅在癌症晚期出现。

慢性肝病的一个主要原因是乙型肝炎病毒感染，乙型肝炎病毒在 1963 年首次被发现是一种非胃肠道传播的人类病毒，HCC 的血清学未定的致病原因中最为常见的是慢性乙型肝炎病毒感染。尽管乙型肝炎病毒并不显示完整的病毒致癌基因的特征，但其参与 HCC 的发展可归结为它与宿主肝细胞相互作用的各个方面。这包括最小病毒蛋白---X 的混杂的转录活性，这种活性提高了许多细胞靶基因包括原癌基因的表达水平。在另一方面，在 HCC 病人中经常发现整合在宿主染色体中的病毒 DNA。主要表面抗原也表现出在 HCC 的发展中起积极的作用。这种蛋白被用作检测乙型肝炎病毒携带者的主要检测标记。最具抗原性的决定簇是一个跨越 23 个氨基酸残基的高保守区域，它位于主要表面抗原的 124 至 147 位氨基酸位置。此小区被命名为群特异性决定簇“a”，它在乙型肝炎病毒基因组的所有亚型和分离株中均被发现。其抗原特性似乎来自其假设的双环结构，疫苗诱导的中和抗体就结合该结构。

我们的流行病学数据表明，在多数 HCC 病人中已发现了野生型主要表面抗原。而且，观察表明，来自 HCC 病人的几种主要表面抗原的变异体可能参与 HCC 的致病。直接测序分析表明，63 个 HCC 病人中有 24 个(约 38%)在主要表面抗原的“a”决定簇处携带有各种突变。当将野生型和变异体病

例合并时，在位于主要表面抗原的“a”决定簇的第一个环的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的变异病毒的比例，在 63 个来自东南亚的 HCC 病人中高达 12.7%，并存在于 5 个当地病例中。然而，在随机人群（多于 100 例）中的乙型肝炎病毒携带者仅 2%发现有同样的突变。基于 145 位氨基酸残基变异（变甘氨酸为精氨酸）病毒的出现率为 8%的事实，133 位氨基酸残基变异体的意义在于突变率被进一步提高了。145 位氨基酸残基的变异率在随机人群的乙型肝炎病毒携带者中保持恒定，众所周知该变异是一种疫苗诱导的突变体，位于“a”决定簇的第二个环。

虽然在 HCC 病人中的主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的变异乙型肝炎病毒株比在疫苗接种后诱导的在主要表面抗原的 145 位氨基酸残基处带有一个突变的突变病毒可能有不同程度的增加，但此病毒株有着与后者相似的特征，即它们都具有稳定性，已经报道了这些病毒株垂直传播的病例，尽管使用了有效的乙型肝炎病毒预防和乙型肝炎免疫球蛋白（HBIG）。

在 HCC 中主要表面抗原的“a”决定簇中带有突变的变异人乙型肝炎病毒的出现值得重视。在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个取代物的突变病毒的高比例尤其值得注意，因为它可能指出了与 HCC 致病的密切相关性。这种相关性将因而急切需要开发特殊的检测系统以及有效的预防性和治疗性疫苗以及抗病毒试剂。测定这种突变病毒的核苷酸序列组成了达到这些目标的第 1 步，并且一定会为上述诊断和治疗方案的开发提供帮助。

## 发明简述

本发明提供一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒分离株，其所组成的病毒基因组已于 1997 年 12 月 15 日在欧洲细胞培养物保藏中心保藏，登记号为 P97121501、P97121502 和 P97121503。

本发明进一步提供编码如下一种多肽的分离核酸，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

本发明进一步提供一种制备多肽的方法和获得纯化形式多肽以便回收纯

化形式多肽的方法，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

本发明进一步提供一种至少为 15 个核苷酸的寡核苷酸，所说寡核苷酸能够特异性地仅与乙型肝炎病毒的突变病毒株的序列杂交。

本发明进一步提供一种获得针对多肽的抗体的方法以及所制备的抗体。

本发明还提供上面鉴定的核酸、多肽、肽、或抗体的应用，用来测定被试者是否感染了上面鉴定的病毒株。

本发明还提供上面鉴定的核酸、多肽、肽、或抗体的应用，用来测定被试者是否具有肝细胞癌的易感体质。

本发明还提供一种用来预防和治疗肝细胞癌的疫苗，以及一种用来治疗或预防上面鉴定的乙型肝炎病毒突变株感染的疫苗。

本发明还提供一种用来鉴定能够治疗或预防肝细胞癌的化合物的方法，以及含有这种化合物的组合物。

本发明还提供一种用来鉴定能够治疗或预防上面鉴定的突变株感染的化合物的方法，以及含有这种化合物的组合物。

## 附图简述

图 1: 从 HCC 分离的人乙型肝炎病毒基因组的 4 个开放阅读框的结构，（在主要表面抗原的 133 位氨基酸处带有一个变蛋氨酸为苏氨酸的突变，该突变用星号标记）。主要病毒蛋白：DNA 聚合酶、大/中/主要表面抗原、前核心抗原、核心抗原和反式激活蛋白 X 分别注明为 P、PreS 1/PreS 2/S、PreC、C 和 X。

图 2: 同一乙型肝炎病毒基因组的克隆和序列测定策略。

图 3: 从 HCC 分离、在主要表面抗原的 133 位氨基酸处带有一个变蛋氨酸为苏氨酸的突变的人乙型肝炎病毒的完整序列（SEQ ID NO: 1）。该突变在 551-553 号核酸处显示。

图 4: 由图 3 的核苷酸序列推导的 DNA 聚合酶的氨基酸序列（SEQ ID NO: 2）。

图 5: 由图 3 的核苷酸序列推导的大表面抗原的氨基酸序列（SEQ ID NO:

3)。突变氨基酸残基（变蛋氨酸为苏氨酸）的号码为 307。

图 6：由图 3 的核苷酸序列推导的核心蛋白的氨基酸序列（SEQ ID NO: 4）。

图 7：由图 3 的核苷酸序列推导的反式激活蛋白 X 的氨基酸序列（SEQ ID NO: 5）。

图 8：相应于 DNA 聚合酶编码区的起始位点的寡核苷酸序列，位于病毒基因组的 2307，并与编码链匹配（有义寡核苷酸）（SEQ ID NO: 6）。

图 9：相应于病毒核苷酸序列的 250 位置并与互补链匹配的寡核苷酸序列（反义寡核苷酸）（SEQ ID NO: 7）。

图 10：相应于病毒核苷酸序列的 250 位置并与编码链匹配的寡核苷酸序列（有义寡核苷酸）（SEQ ID NO: 8）。

图 11：相应于 DNA 聚合酶编码区的终止密码子的寡核苷酸序列，位于病毒基因组的 1623，并与互补链匹配（反义寡核苷酸）（SEQ ID NO: 9）。

图 12：相应于病毒基因组的 1420 位置并与编码链匹配的寡核苷酸序列（有义寡核苷酸）（SEQ ID NO: 10）。

图 13：相应于病毒基因组的 2340 位置并与互补链匹配的寡核苷酸序列（反义寡核苷酸）（SEQ ID NO: 11）。

## 发明详述

在本发明的整个申请书中，所提到的特殊核苷酸是核酸的编码链上的核苷酸。下面的标准缩写在整个申请书中被用来表示特殊的核苷酸：

C=胞嘧啶    A=腺嘌呤

T=胸嘧啶    G=鸟嘌呤

本发明提供一种从肝细胞癌（HCC）分离的人乙型肝炎病毒基因组的核苷酸序列，该病毒在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸），所说的核苷酸序列由 3215 个核苷酸组成（图 3），编码示于图 4-7 的 4 个重叠的病毒蛋白。

本发明提供 4 种主要病毒蛋白的氨基酸序列，它们包括 DNA 聚合酶、大/中/主要表面抗原、核心抗原和反式激活蛋白 X。这些蛋白可用重组技术制备，并用于开发多克隆或单克隆抗体。

本发明还提供一种人乙型肝炎病毒诊断系统，该系统使用上面介绍的核



苷酸或蛋白序列或抗体，特异性地用于诊断位于主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处的突变（变蛋氨酸为苏氨酸）。

本发明提供一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的人乙型肝炎病毒分离株，其所组成的病毒基因组已经保藏，登记号为 P97121501、P97121502 和 P97121503。

本发明还提供编码如下一种多肽的分离核酸，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。在一个特殊的实施方案中，该多肽由被命名为 SEQ ID NO: 1 的核酸序列的 155 至 835 位核苷酸编码，具体地说，在位置 551-553 含有核苷酸“ATG”，取代原来的“ACG”。

分离核酸可以是 DNA 或 RNA，尤其是 cDNA 或基因组 DNA。

在另一个实施方案中，多肽具有与被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 174 至 400 位氨基酸残基基本上相同的氨基酸序列。

本发明还提供编码一种肽的分离核酸，其中所说的肽由含有 SEQ ID NO: 1 的 527 至 595 位核苷酸的核酸分子编码。

本发明还提供编码一种肽的分离核酸，其中所说的肽具有包含被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 298 至 320 位氨基酸残基的氨基酸序列。

本发明进一步提供一种载体，该载体含有编码一种多肽并与 RNA 转录启动子操纵连接的分离核酸，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

本发明进一步提供一种载体，该载体含有编码一种肽的分离核酸，其中所说的肽由含有 SEQ ID NO: 1 的 527 至 595 位核苷酸的核酸分子编码。

具体地说，上述载体含有病毒 DNA。

本发明还提供一种制备多肽或肽的宿主载体系统，该系统在一种合适的宿主中含有上面鉴定的载体。

本发明还提供一种制备多肽的方法，该方法包括在允许多肽或肽产生的合适条件下培养上述宿主载体系统，并回收这样产生的多肽或肽。

本发明还提供一种获得纯化形式的多肽或肽的方法，该方法包括：(a)

将任何上述载体导入一种合适的宿主细胞；(b) 培养所产生的宿主细胞，来产生该多肽；(c) 回收步骤 (b) 中产生的多肽；并 (d) 纯化这样回收的多肽。

本发明还提供一种纯化的多肽，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。具体地说，可使用上面的方法获得纯化的多肽或肽。

本发明提供一种纯化的肽，其中该肽具有包含被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 298 至 320 位氨基酸残基的氨基酸序列。

本发明还提供一种至少为 15 个核苷酸的寡核苷酸，它能特异性地与一种核酸分子内的独特核苷酸序列杂交，其中所说核酸分子编码一种多肽，该多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸；并且该寡核苷酸不能与编码野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的核酸分子内的任何核苷酸序列杂交。在一个实施方案中，该寡核苷酸包含 SEQ ID NO: 1 的 527 至 595 位核苷酸。

本发明还提供一种能刺激或增强针对该多肽的抗体产生的组合物。

本发明还提供一种获得针对一种多肽的抗体的方法，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，并且这种抗体不能针对野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原，该方法包括：(a) 获取纯化形式的多肽；(b) 免疫一种能够产生针对纯化多肽的抗体的生物；(c) 收集所产生的抗体；

(d) 在能够形成一种复合物的条件下将产生的抗体与纯化多肽混合；并 (e) 确定能够与纯化多肽形成一种复合物的抗体，从而获得针对该多肽的抗体。在一个特殊实施方案中，多肽由被命名为 SEQ ID NO: 1 的核酸序列的 155 至 835 位核苷酸编码。在另一个实施方案中，多肽具有与被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 174 至 400 位氨基酸残基基本上相同的氨基酸序列。

可以从生物如兔或小鼠中获得这些抗体。

本发明还提供获得针对一种肽的抗体的方法，其中所说的肽具有包含被

命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 298 至 320 位氨基酸残基的氨基酸序列，该方法包括：(a) 获取纯化形式的肽；(b) 免疫一种能够产生针对纯化肽的抗体的生物；(c) 收集所产生的抗体；(d) 在能够形成一种复合物的条件下将产生的抗体与纯化肽混合；并 (e) 确定能够与纯化肽形成一种复合物的所产生抗体，从而获得针对该肽的抗体。

本发明还提供用上述方法获得的抗体，特别是单克隆抗体。

本发明还提供能够检测一种多肽的抗体，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，并且这种抗体不能检测野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原。

本发明进一步提供能够检测一种肽的抗体，其中所说的肽具有包含被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 298 至 320 位氨基酸残基的氨基酸序列。

本发明提供编码一种多肽的核酸的应用，其中多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，用来检测被试者是否被一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原- 'S' -133 On 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒分离株感染，其中这种检测包括：(a) 从被试者中获得一种合适的核酸样品；并 (b) 测定步骤 (a) 的核酸样品是否为或来自编码一种多肽的核酸，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

在一个实施方案中，步骤 (a) 的核酸样品包含对应于编码一种多肽的 DNA 的转录物的 mRNA，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，其中步骤 (b) 的测定包括：(i) 在允许 mRNA 与寡核苷酸结合的条件下将 mRNA 与上述寡核苷酸接触，以形成一种复合物；(ii) 分离这样形成的复合物；并 (iii) 鉴定分离复合物中的 mRNA，从而测定 mRNA 是否为或来自编码该多肽的核酸。

在另一个实施方案中，步骤（a）的核酸样品包含对应于编码一种多肽的 DNA 的转录物的 mRNA，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，其中步骤（b）的测定包括：（i）在合适条件下翻译 mRNA，以获得氨基酸序列；（ii）将步骤（i）的氨基酸序列与上面介绍的分离核酸编码的氨基酸序列进行比较，从而测定核酸样品是否为或来自一种编码该多肽的核酸。

而且，可以这样进行步骤（b）的测定：（i）扩增步骤（a）的样品中存在的核酸；并（ii）在所产生的扩增核酸中检测多肽的存在。

本发明还提供能识别一种多肽的抗体的应用，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，用来测定被试者是否被一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 On 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株感染，其中这种测定包括：（a）从被试者中获得一种合适的核酸样品；并（b）测定步骤（a）的核酸样品是否为或来自编码一种多肽的核酸分子，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，这通过下述方法完成，在合适条件下将样品与识别多肽的抗体结合，以便确定被试者是否受感染。

在上述应用中，分离核酸、寡核苷酸或抗体可用一种可检测的标记物标记。可检测标记物的例子包括放射性同位素、荧光素和酶。

在实施方案中，样品可包括血液、组织或血清。

本发明提供编码一种多肽的核酸的应用，其中多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，用来检测被试者是否具有肝细胞癌的易感体质，其中这种检测包括：（a）从被试者中获得一种合适的核酸样品；并（b）测定步骤（a）的核酸样品是否为或来自编码一种多肽的核酸，其中所说多

肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

在一个实施方案中，步骤 (a) 的核酸样品包含对应于编码一种多肽的 DNA 的转录物的 mRNA，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，其中步骤 (b) 的测定包括：(i) 在允许 mRNA 与寡核苷酸结合的条件下将 mRNA 与上述寡核苷酸接触，以形成一种复合物；(ii) 分离这样形成的复合物；并 (iii) 鉴定分离复合物中的 mRNA，从而测定 mRNA 是否为或来自编码该多肽的核酸。

在另一个实施方案中，步骤 (a) 的核酸样品包含对应于编码一种多肽的 DNA 的转录物的 mRNA，所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，其中步骤 (b) 的测定包括：(i) 在合适条件下翻译 mRNA，以获得氨基酸序列；(ii) 将步骤 (i) 的氨基酸序列与编码一种多肽的分离核酸的氨基酸序列进行比较，其中所说多肽具有与被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 174 至 400 位氨基酸残基基本上相同的氨基酸序列，从而测定核酸样品是否为或来自一种编码该多肽的核酸。

在另一个实施方案中，步骤 (b) 的测定包括：(i) 扩增步骤 (a) 的样品中存在的核酸；并 (ii) 在所产生的扩增核酸中检测多肽的存在。

本发明进一步提供能识别一种多肽的抗体的应用，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，用来测定被试者是否具有肝细胞癌的易感体质，其中这种测定包括：(a) 从被试者中获得一种合适的核酸样品；并 (b) 测定步骤 (a) 的核酸样品是否为或来自编码一种多肽的核酸分子，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，这通

过下述方法完成，在合适条件下将样品与识别多肽的抗体结合，以便确定被试者是否感染。

在上述应用中，分离核酸、寡核苷酸或抗体可用一种可检测的标记物标记。可检测标记物的例子包括放射性同位素、荧光素和酶。

在实施方案中，样品可包括血液、组织或血清。

本发明还提供一种为药物生产而鉴定化合物的方法，所说的药物能够治疗一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的感染，该方法包括：（a）在允许多肽与化合物结合的条件下将多肽与化合物接触，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸；（b）检测化合物与该多肽的特异性结合；并（c）测定该化合物是否能抑制该多肽，以便鉴定一种能够治疗该病毒株感染的化合物。

本发明还提供一种为药物生产而鉴定化合物的方法，所说的药物能够预防一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的感染，该方法包括：（a）在允许多肽与化合物结合的条件下将多肽与化合物接触，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸；（b）检测化合物与该多肽的特异性结合；并（c）测定该化合物是否能抑制该多肽，以便鉴定一种能够预防该病毒株感染的化合物。

本发明还提供一种为药物生产而鉴定化合物的方法，所说的药物能够治疗肝细胞癌，该方法包括：（a）在允许多肽与化合物之间结合的条件下将多肽与化合物接触，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸；（b）检测化合物与该多肽的特异性结合；并（c）测定该化合物是否能抑制该多肽，以便鉴定一种能够治疗该病毒株感染的化合物。。

本发明还提供一种为药物生产而鉴定化合物的方法，所说的药物能够预

防肝细胞癌，该方法包括：(a) 在允许多肽与化合物之间结合的条件下将多肽与化合物接触，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸；(b) 检测化合物与该多肽的特异性结合；并 (c) 测定该化合物是否能抑制该多肽，以便鉴定一种能够预防该病毒株感染的化合物。

本发明还提供包含用上面介绍的方法鉴定的化合物和一种药效载体的组合物，其中化合物的数量能够有效地治疗或预防该病毒株的感染。

本发明提供包含一种多肽或其衍生物以及一种可药用载体的组合物，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，并且这种多肽的数量能够有效地在被试者中刺激或增强抗体产生。

实际的有效数量将依赖于多肽的大小、多肽的生物降解性、多肽的生物活性以及多肽的生物利用性。如果多肽不被迅速降解、能够被生物利用并且活性高，有效数量就只需要较小的数量。有效数量对本领域的技术人员来说将是已知的，它也依赖于多肽的形式、多肽的大小以及多肽的生物活性。例如，佐剂的使用可减少所需的多肽数量。本领域的技术人员可进行常规的实验性活性试验来测定生物试验中的生物活性，并因而测定有效数量。

可药用的载体对本领域的技术人员来说是熟知的，它们包括但不限于 0.01-0.1M、优选为 0.05M 的磷酸缓冲液或者 0.8% 的盐水。此外，这种可药用载体可以是水或非水的溶液、悬液和乳剂。非水溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油以及可注射的有机酯如油酸乙酯。水载体包括水、酒精/水溶液、乳剂或悬液，包括盐水和缓冲介质。非胃肠道型载体包括氯化钠溶液、林格氏葡聚糖、葡聚糖和氯化钠、乳酸化的林格氏液或固定油。静脉载体包括流体和营养补充物、电解质补充物如以林格氏葡聚糖为基础的补充物等等。防腐剂和其他添加剂也可以存在，举例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等等。

本发明还提供含有一种肽或其衍生物以及一种可药用载体的组合物，其中所说的肽具有包含被命名为 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的 298 至 320 位氨基酸残基的氨基酸序列，并且这种肽的数量能够有效地在被试者中刺激或

增强抗体产生。

本发明还提供包含按上述方法鉴定的化合物以及一种药效载体的组合物，其中化合物的数量能够有效地治疗或预防肝细胞癌。

本发明还提供包含按上述方法鉴定的化合物以及一种可药用载体的组合物，其中化合物的数量能够有效地治疗或预防一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的感染。

本发明进一步提供上面鉴定的组合物用于治疗感染了一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的被试者的应用。

本发明还提供上面鉴定的组合物用于在被试者中预防一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株感染的应用。

本发明还提供上面介绍的组合物用于治疗或预防肝细胞癌的应用。

本发明还提供在来自被试者的体液中筛选一种被命名为人乙型肝炎病毒表面抗原-‘S’-133 0on 株（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒株的方法，包括（a）从被试者获得一种合适的体液样品；（b）在步骤（a）的样品中检测一种多肽的存在，其中所说多肽是乙型肝炎病毒株的一种突变的主要表面抗原，所说多肽具有的氨基酸序列与野生型乙型肝炎病毒的主要表面抗原的氨基酸序列不同，其差异在于所说多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸，以便在样品中筛选该病毒株。具体地说，其中体液包括血液、血清、或血液或血清的一种核酸样品。

本发明进一步提供一种治疗感染了此病毒株的被试者的方法。

本发明还提供一种在组织和体液中筛选此病毒株的方法。

本发明提供一种肝炎疫苗，该疫苗包含乙型肝炎病毒的一种突变形式的主要表面抗原，该多肽具有的氨基酸序列与乙型肝炎病毒的主要表面抗原的野生型氨基酸序列不同，其差异在于该多肽在位置 133 的氨基酸是苏氨酸而不是蛋氨酸。

本发明还提供上述疫苗，进一步包含一种佐剂。

本发明在后面的实验细节章节中说明。这些章节用来协助理解本发明，而不是为了或者不应当被理解为以任何方式限制本发明以及在其之后列出的权利要求。

## 实验细节

在下面介绍的方法中，分离了在主要表面抗原的 133 位氨基酸处带有突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的人乙型肝炎病毒，并测定了其核苷酸序列。

血清样品（5194）获自一个 63 岁的华裔女性的表面抗原携带者病人，她在随后的活检中被证实为 HCC 病人。来自她的血清的乙型肝炎病毒在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸），如前面对“a”决定簇的测序分析所示。在本发明中，在测定其序列之前，首先抽提病毒 DNA。

如下面实施例的介绍，在主要表面抗原的 133 位氨基酸处带有一个突变的来自 HCC 的这种乙型肝炎突变病毒的基因组由 3215 个核苷酸组成，这与相同亚型（adr）的野生型病毒的基因组长度相同。当与野生型病毒比较时，编码主要病毒蛋白的开放阅读框（ORFs）被发现位于相当的位置。突变乙型肝炎病毒基因组的位置 1 按照野生型的相应位置定义。

突变人类病毒基因组的不同 ORFs 的结构在图 1 中简要报告，它们的位置如下：

-DNA 聚合酶基因从位置 2307 开始，在位置 1623 结束，因此它由 2523 个核苷酸组成，编码 843 个氨基酸残基；

-大表面抗原基因从位置 2848 开始，在位置 835 结束，因此它由 1203 个核苷酸组成，编码 400 个氨基酸残基。该大表面抗原与中表面抗原和主要表面抗原重叠，后两者分别从位置 3205 和 155 开始。中表面抗原（由 281 个氨基酸残基组成）和主要表面抗原（由 226 个氨基酸残基组成）都在与大表面抗原相同的位置结束。

-核心抗原基因从位置 1814 开始，在位置 2452 结束，因此它由 639 个核苷酸组成，编码 212 个氨基酸残基。

-反式激活蛋白 X 基因从位置 1374 开始，在位置 1838 结束，因此它由 465 个核苷酸组成，编码 154 个氨基酸残基。

而且，序列分析已经证实，该突变乙型肝炎病毒属于 adr 亚型，其标志为在主要表面抗原的位置 122 和 160 分别为赖氨酸和精氨酸残基。与以前通过直接测序对“a”决定簇的分析一致，在主要表面抗原的 133 位氨基酸处发现了一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）。

与 Genbank 数据库中登录的野生型乙型肝炎病毒（登录号 D16665）相

比，该乙型肝炎病毒株的核苷酸序列的同一性为 90.3%。本发明的乙型肝炎病毒的不同病毒蛋白与相应的野生型蛋白相比，DNA 聚合酶（PIR-蛋白鉴定资源登录号 S43491）、大表面抗原（PIR 登录号 JQ2107）、核心抗原（PIR 登录号 S43490）和反式激活蛋白 X（PIR 登录号 S35529）的同一性分别为 95.8%、97.5%、95.1%和 94.8%。但与野生型相比，每个病毒蛋白都存在多个氨基酸取代物，这包括：DNA 聚合酶中的 5 个突变，大表面抗原中的 5 个突变（包括主要表面抗原起始密码子由蛋氨酸变为苏氨酸的改变），核心抗原中的 5 个突变以及反式激活蛋白 X 中的 4 个突变。

从 HCC 分离并在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的本发明的人乙型肝炎病毒基因组，可以用作原料来设计对突变病毒基因组特异的寡核苷酸。这些寡核苷酸可用作原料来制备高特异性的诊断试剂，用于检测来自 HCC 并在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变的病毒。

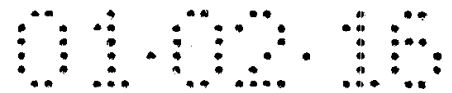
在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的本发明的人乙型肝炎病毒基因组，可以用作原料来制备本发明的蛋白，这可通过标准的 DNA 重组技术表达携带相关编码区的载体来实现，其中所说载体能在一种宿主细胞如大肠杆菌中复制。

本发明的蛋白可用作原料来制备高特异性的诊断试剂，后者能够检测来自 HCC 并在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变的乙型肝炎病毒。使用已知方法，相同的这些蛋白可用于制备多克隆和单克隆抗体。

多克隆和单克隆抗体可用作原料来制备诊断试剂，用于高特异性检测来自 HCC 并在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒的抗原。

使用本发明的每种蛋白或带有氨基酸部分取代的蛋白的检测系统，和使用针对这种蛋白的多克隆或单克隆抗体的检测系统，都可用作能够检测来自 HCC 的人乙型肝炎病毒的高特异性诊断试剂，来在携带了乙型肝炎表面抗原并且可能处于发生 HCC 的高危病人中检出这种病毒。这些蛋白或针对这些蛋白的抗体可用作原料来开发针对这种病毒的预防性和治疗性疫苗。

众所周知，DNA 中的一个或多个核苷酸可被其他核苷酸取代而产生相同的蛋白。本发明也涉及编码本发明所报告的蛋白的这种核苷酸改变。同样也众所周知，蛋白序列中的一个或多个氨基酸可被其他同类的氨基酸取代，产



生氨基酸序列的类似物，氨基酸的同类物由它们的亲水特征或电荷来定义。涉及氨基酸取代、删除、或通过同构物（与蛋白氨基酸具有非常相似的结构和空间的修饰氨基酸）、添加的任何本发明的蛋白的类似物都可以使用，只要所产生的序列能够激发可识别来自 HCC 的在主要表面抗原的 133 位氨基酸突变处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒的抗体。

## 实施例

从 HCC 分离并在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的人乙型肝炎病毒的核苷酸序列和诱导的氨基酸序列按如下方式测定：

### 1. 病毒 DNA 的分离

从一份血清样品（5194）中分离病毒 DNA，该血清样品获自获自一个 63 岁的华裔女性的表面抗原携带者病人，她在活检中被证实为 HCC 病人。来自她的血清的乙型肝炎病毒在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸），如同我们以前的“a”决定簇测序分析所示。

所用的分离方法是：

在 200 ul 血清样品中加入 400 ul 的消散缓冲液（Tris-Cl 10 mM, pH7.4, EDTA 1 mM, 和十二烷基硫酸钠 2%）和 25 ul 的蛋白酶 K（20 mg/ml），在 65°C 孵育 3 小时。然后用酚/氯仿抽提病毒 DNA，并用乙醇沉淀。

### 2. 通过聚合酶链反应（PCR）扩增病毒 DNA

使用 3 套重叠的寡核苷酸通过聚合酶链反应（PCR）扩增本发明的病毒基因组，这些寡核苷酸根据野生型乙型肝炎病毒设计。包含了各种限制酶切位点来方便 PCR 产物的克隆。这些寡核苷酸的位置示于图 2，并表示如下：

-Flag1 (ATAAGCTTATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGGA) (SEQ ID NO: 6)

从 DNA 聚合酶的编码区的起始位点开始，该位点位于病毒核苷酸序列的位置 2307，并且 Flag1 与编码链匹配（有义寡核苷酸）。划线部分是一个添加的 HindIII 限制酶切位点。

-Xba3 (GAGTCTAGACTCTGCGGTATTGTGA) (SEQ ID NO: 7) 从 XbaI 的限制性内切酶位点开始，该位点位于病毒核苷酸序列的位置 250，该寡核苷酸与

互补链匹配（反义寡核苷酸）。划线部分是一个添加的 XbaI 限制酶切位点。

-Xba5 (GAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCT) (SEQ ID NO: 8) 从 XbaI 的内切位点开始，与 Xba3 寡核苷酸在相同的位点，但它与编码链匹配（有义寡核苷酸）。划线部分是一个添加的 XbaI 限制酶切位点。

-Common3 (TGAGAATTCTCACGGTGGTCTCCATGCGACGT) (SEQ ID NO: 9) 从 DNA 聚合酶的终止密码子开始，该位点位于病毒核苷酸序列的位置 1623，与互补链匹配（反义寡核苷酸）。划线部分是一个添加的 EcoRI 限制酶切位点。

-V11 (TTTGTTTACGTCCCGT) (SEQ ID NO: 10) 从 X 基因的起始位点附近开始，该位点位于病毒核苷酸序列的位置 1420，与编码链匹配（有义寡核苷酸）。

-HindIIIADW3 (CTAAGCTTAGTTTCCGGAAGTGTGAT) (SEQ ID NO: 11) 从 DNA 聚合酶切的起始位点附近开始，该位点位于位置 2340，与互补链匹配（反义寡核苷酸）。划线部分是一个添加的 HindIII 限制酶切位点。

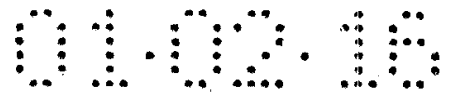
以病毒 DNA 为模板，在 DNA 热循环仪 (Perkin-Elmer, Cetus) 上使用 pfu 聚合酶 (Stratagene, USA) 进行 35 个循环的 PCR，每个循环包括 94°C 的变性温度 1.5 分钟，53°C 的退火温度 2 分钟，72°C 的延伸温度 4 分钟。使用下列组合的寡核苷酸：Flag1/Xba3、Xba5/Common3 和 V11/HindIIIADW3 分别产生 1.2 kb、1.4 kb 和 1.1 kb 的扩增片段。

### 3. 病毒 DNA 扩增片段的克隆

先用 HindIII 和 XbaI 对来自 Flag1/Xba3 的病毒 DNA 扩增片段 (1.2 kb) 进行限制酶消化，然后克隆到用相同限制酶预先处理的 BlueScript 质粒中。采用 XbaI 和 EcoRI 对 Xba5/Common3 的 PCR 产物 (1.4 kb) 进行类似的消化，然后克隆到用 XbaI 和 EcoRI 预先处理的 BlueScript 质粒中。另一方面，将带有 V11 和 HindIII 的扩增的 DNA 片段 (1.1 kb) 直接克隆到 ZeroBlunt 质粒中，后者是 InvitroGen (USA) 开发来用于克隆平末端 DNA 片段的质粒。

### 4. 核苷酸序列的测定

本发明报告的、从 HCC 分离的人乙型肝炎病毒的核苷酸序列在质粒 DNA 模板上通过链终止抑制剂进行测定，使用测序酶 DNA 测序试剂盒 (United States Biochemical Corp)。为方便测序过程，按照野生型乙型肝炎病毒设



计了各种内部寡核苷酸（从 V1 至 V16），它们的位置示于图 2。

根据上述分析，测定了从 HCC 分离并在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的乙型肝炎病毒的全长核苷酸序列，如图 3 所示。所诱导的编码主要病毒蛋白的氨基酸序列示于图 4-7：乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶（图 4）、大表面抗原（包括中表面抗原和主要表面抗原）（图 5）、核心抗原蛋白（图 6）和反式激活蛋白 X（图 7）。

将本发明的病毒序列与 GenBank 数据库中获得的其他乙型肝炎病毒进行排列比较，就可指出特殊的序列差异，后者又可用来设计 DNA 探针。然后就可开发一种使用聚合酶链反应（PCR）的检测系统。这种 PCR 反应将包括寡核苷酸的组合，其中所说的寡核苷酸特异性地针对本发明的、在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的人乙型肝炎病毒，这样就允许高特异性地检测这些突变病毒 DNA。简而言之，病毒 DNA 按本发明的介绍抽提，使用特殊寡核苷酸用上面介绍的相似循环条件进行 PCR 反应，在 1%琼脂糖凝胶上回收 PCR 产物后，分析结果。

按照已知的免疫学方法，可以测定蛋白序列如图 4-7 的蛋白序列上的决定簇。对这些从 HCC 分离并在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变的人乙型肝炎病毒的特异决定簇的测定，将使我们可以使用已知的遗传工程方法合成肽、合成蛋白、制备特异针对这些决定簇的抗体、开发特异性诊断试剂、开发预防性和治疗性疫苗以及抗病毒试剂。

用于检测针对从 HCC 分离并在主要表面抗原的 133 位氨基酸处带有一个突变的乙型肝炎病毒的抗体的检测系统，可以使用聚乙烯微滴定板和夹心法来开发。简而言之，将 50  $\mu$ l 的浓度为 5  $\mu$ g/ml 的从 HCC 分离并在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变的人乙型肝炎病毒的肽分配于微滴定板的每个孔，并在室温下孵育过夜进行固定。相似的方法可用于纯化自宿主如大肠杆菌的's'蛋白。微滴定板的孔用含有 0.05% Tween20 的生理盐水溶液洗涤 5 次。为进行过量包被，将 100  $\mu$ l 含有 30% (v/v) 的小牛血清和 0.05% Tween20 的 NaCl 缓冲液（CS 缓冲液）分配于每个孔，在室温孵育 30 分钟后倾去。

为测定血清中对突变（位于主要表面抗原的 133 位氨基酸残基的变蛋氨酸为苏氨酸）乙型肝炎病毒特异的抗体，可以按如下方法进行初次反应，将 50  $\mu$ l 的 CS 缓冲液和 10  $\mu$ l 的血清样品分配于每个微板孔，在微板振荡器上

在室温下孵温育 1 小时。完成初次反应后，微板孔按上面的介绍洗涤 5 次。

在第二反应中，将 1 ng 的辣根过氧化物酶标记的小鼠抗人 IgG 单克隆抗体溶于 50 ul 的牛血清，并分配于每个微板孔，在微板振荡器上在室温下温育 1 小时。完成后，孔用相同方式洗涤 5 次。在每个孔中加入过氧化氢（作为底物）和 50 ul 的邻苯二胺溶液（作为显色剂），在室温下孵育 30 分钟后，在每个孔中加入 50 ul 的 4M 硫酸终止进一步的显色，并在 490 nm 处读吸收值。

本发明使得可以检测突变的人乙型肝炎病毒，特别是在主要表面抗原的 133 位氨基酸残基处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的人乙型肝炎病毒。本发明还提供能够高特异性和敏感性地在感染早期或者当 HCC 可被治疗时，治愈 HCC 的发展的进行检测的检测系统。

此外，这些特征使我们能够在 HCC 的早期对病人进行精确的诊断，并且还可帮助高特异性地抑制突变的乙型肝炎病毒。

本发明的蛋白和它们的抗体可用于开发预防性和治疗性疫苗，以及免疫药物。这些突变病毒的结构基因的序列信息将有助于开发相关蛋白抗原和抗体的检测系统。

抗原-抗体复合物可用已知方法进行检测。特异性单克隆和多克隆抗体可通过用对从 HCC 分离的突变乙型肝炎病毒来说特异的肽或蛋白免疫动物如小鼠和兔来产生。抑制性抗病毒试剂可针对细胞培养物中或体内的这些蛋白和分子进行设计并靶向它们。

本发明以从 HCC 分离并在主要表面抗原的 133 位氨基酸处带有一个突变（变蛋氨酸为苏氨酸）的人乙型肝炎病毒基因组的研究为基础。本发明使得可以高特异性地检测这些来自 HCC 的突变乙型肝炎病毒，并提供材料如蛋白、多克隆和单克隆抗体用于开发这种检测系统。

## 参考文献

1. Oon, C-J., “新加坡的乙型肝炎病毒: 流行病学, 预防和控制-监测乙型肝炎计划以及携带者的管理”《J. Royal College Physic. London》(1997) (待发表)。
2. Ogata, N. 等, “在疫苗接种的幼仔中出现的乙型肝炎病毒的表面基因突变

- 体在黑猩猩中的感染性和致病性”《传染病杂志》(1997) 175: 511-523。
3. Oon, C-J., “与 HBV 突变株相关的报道”《J. Royal College Physic. London》(1997) (待发表)。
  4. Oon, C-J. 等, “乙型肝炎表面抗原(HBsAg)突变体及其意义”《新加坡医学年鉴》(1997) (待发表)。
  5. Tsai, J. F. 等, “乙型肝炎表面抗原和 e 抗原的修饰对肝细胞癌发生的相加影响”《不列颠癌症杂志》73: 1498-1502。
  6. Oon, C-J., “乙型肝炎'a'变异体和突变体的分子流行病学: 免疫群体中的意义”《JAMA》(1996) 12: 5-6。
  7. Goh, K-T. 等, “新加坡的乙型肝炎免疫接种”《柳叶刀》(1996) 348: 1385-1386。
  8. Oon, C-J. 等, “乙型肝炎表面抗原突变体在儿童中的天然史”《柳叶刀》(1996) 348: 1524-1525。
  9. Harrison, T. J., “乙型肝炎病毒的遗传变异”《欧洲消化肝病杂志》(1996) 8: 306-311。
  10. Oon, C-J. 等, “乙型肝炎病毒疫苗变异体在新加坡的分子流行病学”《疫苗》(1995) 13: 699-702。
  11. Oon, C-J. 等, “乙型肝炎疫苗变异体和突变体的分子流行病学-意义和传染性”《Proc. 3rd Internatl. Symp. Viral Hepatitis & HCC, Singapore》(1995), 39-43。
  12. Carman, W. 等, “病毒遗传变异: 乙型肝炎病毒作为一种临床例子”《柳叶刀》(1993) 341: 349-353。
  13. Harrison, T. J., “乙型肝炎病毒的变异体”《Vox Sang》(1992) 63: 161-167。
  14. Carman, W. F. 等, “乙型肝炎病毒的疫苗诱导的逃逸突变体”《柳叶刀》(1990) 336: 325-329。

## 序列表

## (1) 一般信息:

(i) 发明题目: 一株突变的人乙型肝炎病毒株及其应用

(ii) 序列数: 11

## (2) SEQ ID NO: 1 信息: (图 3)

## (i) 序列特征:

(A) 长度: 3215 碱基对

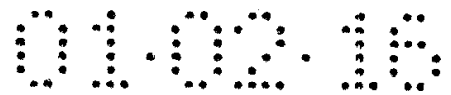
(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑学: 环形

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

CTCCACAACA TTCCACCAAG CTCTGCTAGA TCCCAGGGTG AGGGGCCTAT ATTTTCCTGC	60
TGGTGGCTCC AGTTCCGGAA CAGTAAACCC TGTTCCGACT ACTGCCTCTC CCATATCGTC	120
AATCTTCTCG AGGACTGGGG ACCCTGCACC GAACATGGAG AACACAACAT CAGGATTCCCT	180
AGGACCCCTG CTCGTGTTAC AGGCGGGGTT TTTCTCGTTG ACAAGAATCC TCACAATACC	240
GCAGAGTCTA GACTCTGGTG GACTTCTCTC AATTTTCTAG GGGGAGCACC CACGTGTTCC	300
TGGCCAAAAT TCGCAGTCCC CAACCTCCAA TCACTCACCA ACCTCTTGTC CTCCAATTTG	360
TCCTGGCTAT CGCTGGATGT GTCTGCGGCG TTTTATCATA TTCCTCTTCA TCCTGCTGCT	420
ATGCCTCATC TTCTTGTTGG TTCTTCTGGA CTACCAAGGT ATGTTGCCCG TTTGTCCTCT	480
ACTTCCAGGA ACATCAACCA CCAGCACGGG GCCATGCAAG ACCTGCACGA CTCCTGCTCA	540
AGGAAACTCT ACGTTTCCCT CTTGTTGCTG TACAAAACCT TCGGACGGAA ACTGCACTTG	600
TATTCCCATC CCATCATCCT GGGCTTTTCGC AAGATTCCTA TGGGAGTGGG CCTCAGTCCG	660
TTTCTCCTGG CTCAGTTTAC TAGTGCCATT TGTTCACTGG TTCGTAGGGC TTTCCCCCAC	720
TGTTTGGCTT TCAGTTATAT GGATGATGTG GTATTGGGGG CGAAGTCTGT ACAACATCTT	780
GAGTCCCTTT TTACCTCTAT TACCAATTTT CTTTGTCTT TGGGTATACA TTTAAACCCT	840
AATAAAACCA AACGTTGGGG CTACTCCCTT AACTTCATGG GATATGTAAT TGGAAGTTGG	900
GGTACTTTAC CGCAGGAACA TATTGTAATA AACTCAAGC AATGTTTTTCG AAAACTGCCT	960
GTAATAGAC CTATTGATTG GAAAGTATGT CAAAGAATTG TGGGTCTTTT GGGCTTTGCT	1020



GCCCCTTTTA	CACAATGTGG	CTATCCTGCC	TTGATGCCTT	TATATGCATG	TATACAATCT	1080
AAGCAGGCTT	TCACCTTCTC	GCCAACTTAC	AAGGCCTTTC	TGTGTAAACA	ATATCTGAAC	1140
CTTTACCCCG	TTGCCCGGCA	ACGGTCCGGT	CTCTGCCAAG	TGTTTGCTGA	CGCAACCCCC	1200
ACTGGATGGG	GCTTGGCCAT	AGGCCATCAG	CGCATGGCTG	GAACCTTTCT	GGCTCCTCTG	1260
CCGATCCATA	CTGCGGAACT	CCTAGCAGCT	TGTTTTGCTC	GCAGCCGGTC	TGGAGCAAAA	1320
CTTATCGGAA	CCGACAACCTC	TGTTGTCCTC	TCTCGGAAAT	ACACCTCCTT	TCCATGGCTG	1380
CTAGGGTGTG	CTGCCAACTG	GATCCTGCGC	GGGACGTCCT	TTGTCTACGT	CCCGTCGGCG	1440
CTGAATCCCG	CGGACGACCC	GTCTCGGGGC	CGTTTGGGGC	TCTACCGTCC	CCTTCTTCAT	1500
CTGCCGTTCC	GGCCGACCAC	GGGGCGCACC	TCTCTTTACG	CGGTCTCCCC	GTATGTGCCT	1560
TCTCATCTGC	CGGACCGTGT	GCACTTCGCT	TCACCTCTGC	ACGTCCGATG	GAGACCACCG	1620
TGAACGCACG	CCAGGTCTTG	CCCAAGGTCT	TATATAAGAG	GACTCTTGGA	CTCTCAGCAA	1680
TGTCAACGAC	CGACCTTGAG	GCATACTTCA	AAGACTGTGT	GTTTAAAGAC	TGGGAGGAGT	1740
TGGGGGAGGA	GATTAGGTTA	AAGATTTATG	TACTAGGAGG	CTGTAGGCAT	AAATTGGTCT	1800
GTTCAACCAGC	ACCATGCAAC	TTTTTCTCCT	CTGCCTAATC	ATCTCATGTT	CATGTCCTAC	1860
TGTTCAAGCC	TCCAAGCTGT	GCCTTGGGTG	GCTTTGGGAC	ATGGACATTG	ACCCGTATAA	1920
AGAATTTGGA	GCATCTGCTG	AGTTACTCTC	TTTTTTGCCT	TCTGACTTCT	TTCCGTCTAT	1980
TCGAGATCTC	CTCGACACCG	CCTCTGCTCT	GTATCGGGAG	GCCTTAGAGT	CTCCGGAACA	2040
TTGTTGCGCT	CACCATACAG	CACTCAGGCA	AGCTATTTTG	TGTTGGGGTG	AGTTGATGAA	2100
TCTGGCCACC	TGGGTGGGAA	GTAATTTGGA	AGATCCAGCA	TCCAGGGAAT	TAGTAGTCAG	2160
CTATGTCAAC	GTTAATATGG	GCCTAAAACCT	CAGACAAATA	TTGTGGTTTC	ACATTTCTCTG	2220
TCTTACTTTT	GGAAGAGAAA	CTGTTCTTGA	GTACTTGGTA	TCTTTTGGAG	TGTGGATTCTG	2280
CACTCCTACC	GCTTACAGAC	CACCAAATGC	CCCTATCTTA	TCAACACTTC	CGGAAACTAC	2340
TGTTGTTAGA	CGACGAGGCA	GGTCCCCTAG	AAGAAGAACT	CCCTCGCCTC	GCAGACGAAG	2400
GTCTCAATCG	CCGCGTCGCA	GAAGATCTCA	ATCTCGGGAA	TCTCAACGTT	AGTATTCCTT	2460
GGACTCATAA	GGTGGGAAAC	TTTACTGGGC	TTTATTCTTC	TACTGTACCT	GTCTTTAATC	2520
CCGAGTGGCA	AATTCCTTCC	TTTCCTCACA	TTCATTTACA	AGAGGACATT	ATTAATAGAT	2580
GTCAACAATA	TGTGGGCCCT	CTTACAGTTA	ATGAAAAAAG	AAGATTAAAA	TTAATTATGC	2640
CTGCTAGGTT	TTATCCTAAC	CTTACTAAAT	ATTTGCCCTT	AGACAAAGGC	ATTAAACCGT	2700
ATTATCCTGA	ACATGCAGTT	AATCATTACT	TCAAAACTAG	GCATTATTTA	CATACTCTGT	2760

GGAAGGCTGG CATTCTATAT AAGAGAGAAA CTACACGCAG CGCCTCATTT TGTGGGTCAC 2820  
 CATATTCTTG GGAACAAGAG CTACAGCATG GGAGGTTGGT CTTCCAAACC TCGACAAGGC 2880  
 ATGGGGAGCA ATCTTGCTGT TCCCAATCCT CTGGGATTCT TTCCCGATCA CCAGTTGGAC 2940  
 CCTGCGTTTCG GAGCCAATC AAACAATCCA GATTGGGACT TCAACCCCAA CAAGGATCAC 3000  
 TGGCCAGAGG CAAATCAGGT AGGAGTGGGA GCATTCGGGC CAGGGTTCAC CCCACCACAC 3060  
 GGCGGTCTTT TGGGGGGGAG CCCTCAGGCT CAGGGCATAT TGACAACAGT GCCAGCAGCA 3120  
 CCTCCTCCTG CCTCCACCAA TCGGCAGTCA GGAAGACAGC CTACTCCCAT CTCTCCACCT 3180  
 CTAAGAGACA GTCATCCTCA GGCCACGCAG TGGAA 3215

(2) SEQ ID NO: 2 信息: (图 4)

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 843 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线形

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

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

Arg His Tyr Leu His Thr Leu Trp Lys Ala Gly Ile Leu Tyr Lys Arg  
 145 150 155 160  
 Glu Thr Thr Arg Ser Ala Ser Phe Cys Gly Ser Pro Tyr Ser Trp Glu  
 165 170 175  
 Gln Glu Leu Gln His Gly Arg Leu Val Phe Gln Thr Ser Thr Arg His  
 180 185 190  
 Gly Asp Glu Ser Cys Cys Ser Gln Ser Ser Gly Ile Leu Ser Arg Ser  
 195 200 205  
 Pro Val Gly Pro Cys Val Arg Ser Gln Leu Lys Gln Ser Arg Leu Gly  
 210 215 220  
 Leu Gln Pro Gln Gln Gly Ser Leu Ala Arg Gly Lys Ser Gly Arg Ser  
 225 230 235 240  
 Gly Ser Ile Arg Ala Arg Val His Pro Thr Thr Arg Arg Ser Phe Gly  
 245 250 255  
 Gly Glu Pro Ser Gly Ser Gly His Ile Asp Asn Ser Ala Ser Ser Thr  
 260 265 270  
 Ser Ser Cys Leu His Gln Ser Ala Val Arg Lys Thr Ala Tyr Ser His  
 275 280 285  
 Leu Ser Thr Ser Lys Arg Gln Ser Ser Ser Gly His Ala Val Glu Leu  
 290 295 300  
 His Asn Ile Pro Pro Ser Ser Ala Arg Ser Gln Gly Glu Gly Pro Ile  
 305 310 315 320  
 Phe Ser Cys Trp Trp Leu Gln Phe Arg Asn Ser Lys Pro Cys Ser Asp  
 325 330 335  
 Tyr Cys Leu Ser His Ile Val Asn Leu Leu Glu Asp Trp Gly Pro Cys  
 340 345 350  
 Thr Glu His Gly Glu His Asn Ile Arg Ile Pro Arg Thr Pro Ala Arg  
 355 360 365  
 Val Thr Gly Gly Val Phe Leu Val Asp Lys Asn Pro His Asn Thr Ala  
 370 375 380  
 Glu Ser Arg Leu Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro  
 385 390 395 400  
 Thr Cys Ser Trp Pro Lys Phe Ala Val Pro Asn Leu Gln Ser Leu Thr  
 405 410 415  
 Asn Leu Leu Ser Ser Asn Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala  
 420 425 430  
 Ala Phe Tyr His Ile Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu  
 435 440 445

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

Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Phe Pro Trp Leu Leu Gly Cys Ala Ala  
 755 760 765  
 Asn Trp Ile Leu Arg Gly Thr Ser Phe Val Tyr Val Pro Ser Ala Leu  
 770 775 780  
 Asn Pro Ala Asp Asp Pro Ser Arg Gly Arg Leu Gly Leu Tyr Arg Pro  
 785 790 795 800  
 Leu Leu His Leu Pro Phe Arg Pro Thr Thr Gly Arg Thr Ser Leu Tyr  
 805 810 815  
 Ala Val Ser Pro Tyr Val Pro Ser His Leu Pro Asp Arg Val His Phe  
 820 825 830  
 Ala Ser Pro Leu His Val Ala Trp Arg Pro Pro  
 835 840

## (2) SEQ ID NO: 3 信息: (图 5)

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 400 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线形

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

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

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

## (2) SEQ ID NO: 4 信息: (图 6)

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 212 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线形

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

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

## (2) SEQ ID NO: 5 信息: (图 7)

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 154 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线形

## (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

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

## (2) SEQ ID NO: 6 信息: (图 8)

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 36 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线形

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

ATAAGCTTAT GCCCCTATCT TATCAACACT TCCGGA

## (2) SEQ ID NO: 7 信息: (图 9)

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 25 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线形

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

GAGTCTAGAC TCTGCGGTAT TGTGA

## (2) SEQ ID NO: 8 信息: (图 10)

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 25 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线形

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8:

GAGTCTAGAC TCGTGGTGA CTCT

## (2) SEQ ID NO: 9 信息: (图 11)

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 32 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线形

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 9:

TGAGAATTCT CACGGTGGTC TCCATGCGAC GT

## (2) SEQ ID NO: 10 信息: (图 12)

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 16 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线形

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 10:

TTGTTTACG TCCCGT

## (2) SEQ ID NO: 11 信息: (图 13)

## (i) 序列特征:

- (A) 长度: 36 碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 拓扑学: 线形

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11:

ATAAGCTTAT GCCCCTATCT TATCAACACT TCCGGA

说明书附图

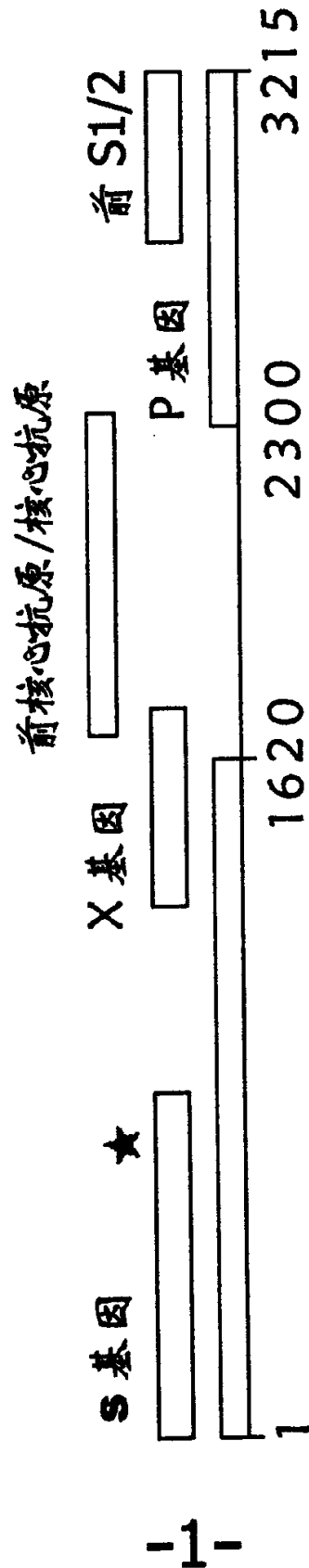


图1

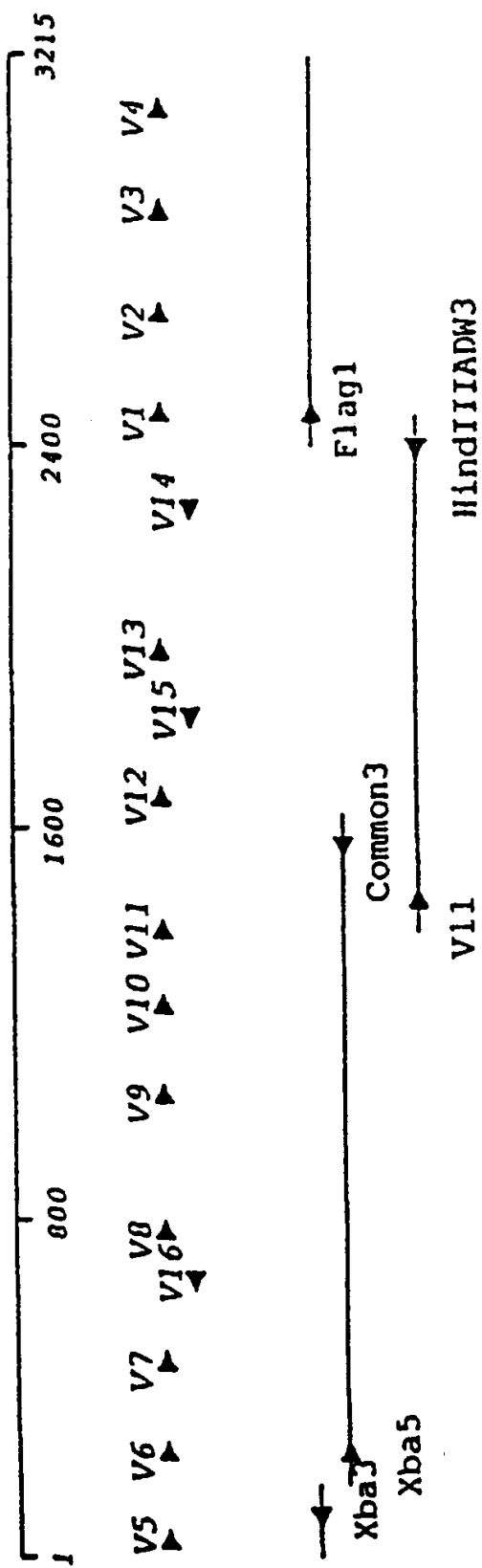


图 2