



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105899684 B

(45) 授权公告日 2021.06.11

(21) 申请号 201480049583.5

B01D 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2014.09.09

C07K 16/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105899684 A

(56) 对比文件

US 005714316 A, 1998.02.03

(43) 申请公布日 2016.08.24

Holger Maerz et al.. Improved removal of viruslike particles from purified monoclonal antibody IgM preparation via virus filtration.《Nature Biotechnology》.1996, 第14卷第651页第3栏第1段, 第652页第1栏第3段.

(30) 优先权数据

61/875,729 2013.09.10 US

Holger Maerz et al.. Improved removal of viruslike particles from purified monoclonal antibody IgM preparation via virus filtration.《Nature Biotechnology》.1996, 第14卷第651页第3栏第1段, 第652页第1栏第3段.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016.03.09

Peter A. Kratz et al.. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids.《Proc. Natl. Acad. Sci. USA》.1999, 第96卷摘要, 第1917页右栏第1段.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2014/064352 2014.09.09

审查员 陶治

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/036917 EN 2015.03.19

(73) 专利权人 默克维溶液

地址 美国马里兰

(72) 发明人 大卫·赛特琳 阿鲁·达尔

(74) 专利代理机构 北京法信智言知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)

11737

代理人 刘静荣

(51) Int.Cl.

权利要求书1页 说明书17页

C12Q 1/70 (2006.01)

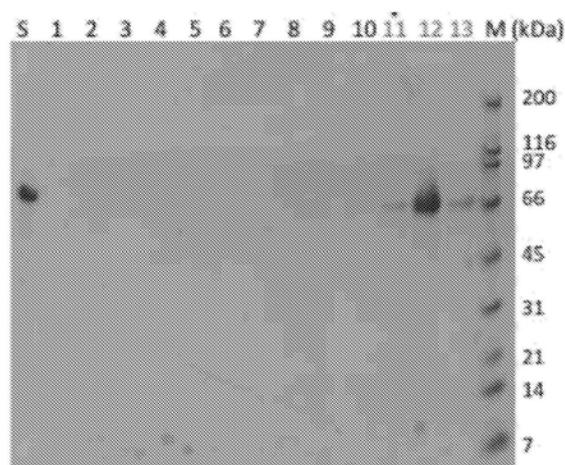
序列表12页 附图2页

(54) 发明名称

从纯化溶液中去除的假病毒颗粒的定量方法及试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及确定从作为通过纯化技术处理结果溶液中去除的假病毒颗粒(MVP)的数量的方法。该方法涉及步骤:向溶液中加入MVP、通过纯化技术处理所述溶液、以及确定从所述溶液中去除的MVP的数量。本发明也涉及试剂盒,所述试剂盒可以与所述方法联合使用。该试剂盒包括至少一种MVP储液以及至少一种定量溶液。



1. 确定从含目的生物物质的溶液中去除的假病毒颗粒的数量的方法, 其特征在于, 所述方法包括步骤:

- a) 向溶液中添加假病毒颗粒, 所述溶液包含目的生物物质, 所述目的生物物质选自包括抗体、非抗体蛋白、疫苗、核酸制品、以及血液或血浆衍生物的组, 假病毒颗粒为非传染性、非复制的组装单元, 其包括病毒壳蛋白、包膜蛋白或壳蛋白和包膜蛋白, 假病毒颗粒与壳或包膜蛋白所源自的特定病毒在生化特性方面类似;
- b) 通过纯化技术处理溶液, 以纯化所述目的生物物质; 以及
- c) 定量从溶液中去除的假病毒颗粒的量。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 通过处理制备所述目的生物物质, 其中, 所述处理为细胞培养方法或发酵方法, 并且, 所述处理利用人细胞、动物细胞、植物细胞、杂交瘤细胞、酵母细胞或细菌细胞。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述动物细胞为昆虫细胞。

4. 根据权利要求1或2所述的方法, 其特征在于, 所述纯化技术为层析、过滤、离心、或病毒灭活技术。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其特征在于, 所述过滤为超滤。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 在步骤a) 中的所述溶液中的假病毒颗粒的量大于b) 步骤后的溶液中的假病毒颗粒的量。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述假病毒颗粒

(i) 包括离体核酸; 和/或

(ii) 包括病毒壳蛋白、包膜蛋白、或病毒壳蛋白和病毒包膜蛋白, 在细菌细胞、酵母细胞、植物细胞、动物细胞中制备所述病毒壳蛋白或包膜蛋白。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其特征在于, 所述动物细胞为昆虫细胞或哺乳动物细胞。

9. 根据权利要求7所述的方法, 其特征在于, 病毒包膜蛋白或壳蛋白来自微小病毒科或逆转录病毒科。

10. 根据权利要求7或9所述的方法, 其特征在于, 所述病毒壳蛋白或包膜蛋白进一步包括异源表位。

11. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述假病毒颗粒包括离体核酸。

12. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 确定从溶液中去除的假病毒颗粒的数量包括利用用于确定溶液中假病毒颗粒数量的定量技术, 包括ELISA、PCR、纳米图像、荧光、酶促法、显微法、分光光度法、透射电镜, 或western杂交技术。

13. 根据权利要求12所述的方法, 其特征在于, 所述定量技术

(i) 使用能与假病毒颗粒表面上存在的壳蛋白表位、包膜蛋白表位、或异源表位结合的抗体;

(ii) 使用能与假病毒颗粒连接的连接分子结合的抗体;

(iii) 使用与假病毒颗粒连接的分子, 以及能结合该分子的抗体, 或者能与该分子所附的核酸片段结合的引物; 或(iv) 使用能与假病毒颗粒内包含的离体核酸序列结合的引物。

从纯化溶液中去除的假病毒颗粒的定量方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及确定从作为通过纯化技术处理结果的溶液中去除的假病毒颗粒 (MVP) 的数量的方法。该方法涉及步骤：向溶液中加入MVP、通过纯化技术处理所述溶液、以及确定从所述溶液中去除的MVP的数量。本发明也涉及试剂盒，所述试剂盒可以与所述方法联合使用。优选地，该试剂盒包括至少一种MVP储液以及至少一种定量溶液。

背景技术

[0002] 生物医药产品，例如单克隆抗体、重组蛋白、疫苗、血液衍生产品以及动物制品具有传播感染性病毒的风险 (Burnouf, 2005; Aranha, 2011)。这是由于用于制备生物医药产品的原材料含有内源病毒，或者在制备过程中外源的“外来”病毒污染含溶液的生物医药产品的风险 (Kerr, 2010)。因此，国际监管机构要求生物医药制品的制备应在其制备过程中包含充分的病毒清除步骤，并且通过提供有力的病毒清除数据确保这些病毒清除步骤有效 (EMEA, 2008; EMEA, 2008; ICH, 1997; ICH, 998; FDA, 1997)。

[0003] 为了使病毒有效去除进行了病毒“尖峰研究”，其中，将活病毒加入生物医药材料中，并且进行缩小纯化过程 (Darling, 2002)。然后通过传染性试验 (TCID₅₀) 或定量聚合酶链反应技术 (Q-PCR) 定量溶液中残余的病毒，从而分析该方法去除病毒的能力。由于繁殖和定量活病毒颗粒所要求的专业性和附加安全措施，因此这些研究通常由第三方签约实验室进行。因此，这些研究是极度昂贵，并且是现实难以实施的。事实上，这些处理步骤在用于评估病毒去除效果之前就典型地开发了数月或数年。由于在监管授权验证研究过程中研究这些处理步骤投入了时间和金钱，但是可能最终失败未能重复去除病毒，因此这些实践增加了监控风险。因此，需要一种在纯化方法发展过程中就能确定病毒去除效率的新的改进方法。

发明内容

[0004] 本发明涉及一种从溶液中去除的假病毒颗粒 (MVP) 的定量方法，其中所述溶液为通过纯化技术处理结果。所述方法包括步骤：向溶液中加入MVP，通过纯化技术处理该溶液，以及确定从溶液中去除的MVP的数量。在优选实施方式中，加入MVP的溶液包括目的生物。在更优选的实施方式中，所述目的生物为抗体、非抗体蛋白、疫苗、核酸产品、血液或血浆衍生生物。在另一更优选的实施方式中，所述目的生物为通过利用人细胞、动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、杂交瘤细胞、酵母细胞或细菌细胞的细胞培养过程或发酵过程所产生的目的生物。在另一优选实施例中，通过纯化技术处理溶液纯化该溶液中存在的目的生物。

[0005] 在另一优选实施方式中，所述处理包含MVP的溶液的纯化技术为层析、过滤、超滤、离心或病毒灭火技术。在另一优选实施方式中，在通过纯化技术处理溶液前加入该溶液的MVP的量大于处理后溶液中残留的MVP的量。

[0006] 在优选实施方式中，MVP包括病毒壳蛋白、病毒包膜蛋白，或“病毒壳蛋白和病毒包膜蛋白”。在另一优选实施方式中，所述壳蛋白或包膜蛋白由细菌细胞、酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞、和/或动物细胞和/或人细胞产生。在另一优选实施例中，所述病毒壳蛋白或

包膜蛋白来自微小病毒科 (Parvoviridae) 或逆转录病毒 (Retroviridae source.)。在另一优选实施方式中,所述病毒壳蛋白或包膜蛋白包括异源表位。在另一优选实施方式中,所述MVP包括离体核酸。

[0007] 根据本发明的优选实施方式,确定从溶液中去除的MVP的数量包括利用确定溶液中MVP数量的定量技术,具体包括酶联免疫吸附试验 (ELISA)、聚合酶链式反应 (PCR)、纳米图像 (nanoimaging)、荧光、酶促法、显微法、分光光度法、透射电镜 (TEM),或western杂交技术。根据本发明的另一优选实施方式,所述定量技术使用能够与所述MVP表面存在的壳蛋白表位、包膜蛋白表位或异源表位结合的抗体。根据本发明的另一优选实施方式,所述定量技术使用能够结合与MVP连接的连接分子的抗体。根据本发明的另一优选实施方式,所述定量技术使用与MVP连接的分子以及能够与该分子结合的抗体,或能够与连接于所述分子的核酸片段结合的引物。根据本发明的另一优选实施例,所述定量技术使用能够与MVP内包含的离体核酸序列结合的引物。

[0008] 根据本发明的方法,包括步骤:将MVP加入溶液中,通过纯化技术处理所述溶液,以及确定从溶液中移除的MVP的量。根据本发明的优选实施例,向溶液中加入第二种的MVP,通过纯化技术处理所述溶液,以及确定从溶液中去除的第二种的MVP的量。根据本发明的优选实施例,将所述第一和第二种MVP同时或顺序加入溶液中。根据本发明的优选实施方式,将两种或多种附加种MVP加入溶液中。

[0009] 本发明也涉及试剂盒,所述试剂盒包括:至少一个包含MVP储液的容器,以及至少一个包含定量溶液的容器。根据本发明的优选实施方式,所述定量溶液包括能与MVP或者与MVP连接的分子结合的抗体。根据本发明的优选实施例,所述试剂盒进一步包括第二抗体,所述第二抗体能够结合所述能与MVP或者与MVP连接的分子结合的抗体。根据本发明的优选实施方式,所述能结合MVP的抗体与酶连接。根据本发明再一优选实施方式,所述第二抗体与酶连接,其中所述第二抗体能够结合所述能与MVP或者与MVP连接的分子结合的抗体。根据本发明的优选实施方式,所述试剂盒进一步包括ELISA板,所述ELISA板包括能结合MVP的固定的抗体或分子。根据本发明再一优选实施方式,所述定量溶液包含引物,所述引物结合离体核酸序列或能够结合能与MVP连接的分子连接的核酸片段。根据本发明的优选实施方式,所述试剂盒还包括用于实施ELISA或其他PCR技术的附加反应试剂。

附图说明

[0010] 通过附图和实施例说明本发明的具体实施方式,但附图和实施例并不限定本发明的保护范围,其中同样的附图标记代表相同的原件。

[0011] 图1:MMV MVP片段的纯度。

[0012] 图2:MMV MVP储液的透射电镜图。

[0013] 图3:异源表位MMV MVP片段的的纯度。

[0014] 图4:异源表位MMV MVP储液的透射电镜图。

具体实施方式

[0015] 通过实施例1和2所述的方法纯化鼠微小病毒 (MMV) MVP。为了确定氯化铯密度梯度组分的纯度,浓缩各密度组分 (泳道1-13) 的样品,并且在4~12%聚丙烯酰胺凝胶上进行电

泳。通过考马斯亮蓝染色显示蛋白条带。泳道“S”为VP2蛋白标准样 (alpha diagnostic, 货号为MVMVP25-R-10) , 作为对照 (VP2蛋白分子量为64kDa) , 分子量标记蛋白在泳道“M”。如图1, 分析由天然VP2蛋白形成的MVP。组分11-13富集形成MVP储液。基于染色结果, 包含MVP的富集储液的浓度大于95%。如图3所示, 分析由重组VP2蛋白结构形成的MVP。富集组分11-13, 形成MVP储液。基于染色结果, 包含MVP的富集储液的浓度为90%。

[0016] 通过实施例1和2所述的方法制备MMV MVP储液。如图2所示, 显示由60个拷贝的天然(未修饰)VP2蛋白获得的MMVMVP储液的TEM图。如图4所示, 显示由60个拷贝的重组VP2蛋白获得的MMV MVP储液的TEM图, 其中, 各VP2重组蛋白包含异源表位 (strep II标签氨基酸序列)。图像是负染色后捕获的。将各储液2微升置于单独的formva/碳涂覆的电子显微网格, 然后置于空气中干燥。十分钟后, 吸走所述网格上的残余物。然后固定网格, 向各网格滴加2微升2.0%、pH7.0的磷钨酸 (PTA) , 放置一分钟进行染色。然后取出多余, 使用FEI Tecnai Spirit Twin显微镜放大165,000倍对网格进行检查、定量以及拍照。结果显示MMV MVP储液的浓度分别为 3.06×10^{13} MMV MVP/ml (图2) 、 3.56×10^{13} MMV MVP/ml (图4) 。

[0017] 详细描述

[0018] 在本发明中, 术语“假病毒颗粒 (MVP)”指非传染性、非复制的组装单元, 其包括合成制备 (如重组表达或化学合成) 的病毒壳蛋白、包膜蛋白或壳蛋白和包膜蛋白。MVP不指天然发现的病毒颗粒, 但不限于活病毒颗粒, 已经自然地丧失了传染性能的天然发现的病毒颗粒, 或已经体外丧失传染能力的病毒颗粒, 例如“紫外线照射”、“热杀死”或“热灭火”的病毒颗粒。因此, MVP的合成特性使其与其他形式的现有技术中使用的病毒颗粒相比能够易制备、易在市售套装中使用。术语“病毒壳蛋白”指任何包含围绕基因组的壳的病毒的蛋白。术语“病毒包膜蛋白”指包被壳蛋白外壳、且为部分病毒外层的任何病毒蛋白。特定的病毒壳蛋白和包膜蛋白对于特定病毒分类族的病毒是常见的。MVP可以由这些病毒家族的壳或包膜蛋白制备, 从而获得与来自这些家族的特定病毒类似的生化特性的单元。然而, MVP的组装单元缺少与这些病毒类似的遗传特性 (MVP不包含任何核酸)。以下表1列出了主要病毒壳蛋白和包膜蛋白的实例 (这些蛋白的通用名称是现有技术已知的) , 与其相关的病毒家族, 以及可以由这些蛋白中的一种或多种蛋白组装的MVP的实例。

[0019] 表1

病毒家族	已知的壳蛋白实例	已知的包膜蛋白实例	MVP 实例
Parvoviridae	VP1, VP2, VP3, VP4	无	鼠微小病毒-MVP
Retroviridae	MA, CA, NC (gag-蛋白)	SU、TM、LP (env蛋白) Sag	异嗜性小鼠白血病 病 毒 (xenotropic murine leukemia virus) -MVP
Retroviridae	μ 1、 μ 2、 μ A、 μ B、 λ 1、 λ 2、 λ 3、 λ A、 λ B、 λ C、	无	3型呼肠病毒-MVP

[0021]

	σ1、, σ2、, σ3、, σA、 σB、 σC、VPi、VP2、VP 3、 VP4、 VP5、 VP6、 VP7、 CSP、 LPP, TP、 P1、 P2、 P3、 P5、 P7、 P8		
Caliciviridae	VP60、VP62、VP8.5、 VP10、 CP	无	猫卡力里西病毒 (Feline calicivirus)-MVP
Tymoviridae	CP	无	酸浆斑驳病毒 (Physalis mottle virus) -MVP
Herpesviridae	VPS、 VP1-3、 VP23、 VP26、 VP19C、 VP21、 VP24、 VP22、 UL 16、 MCP、 CP622 U56、 U29、 U57	gM、 gB、 gD、 gL、 g-H、 gC、,gE、 gO、 gi、 gG、 gK、 gj、 gN 、 BMRF2 、 BDFL2、 UL45H、 UL34、 US9	单纯疱疹病毒 (Herpes simplex) -MVP
Togaviridae	CP	E1、E2、E3	风疹 (rubella) -MVP
Coronaviridae	N	S、M、E、HE	传染性支气管 (Infectious bronchitis) -MVP
Orthomyxaviridae	NP、PA、PB ₁ 、PB ₂	HA、NA、M ₁ 、M ₂ 、 HEF、 GP、 NB、 BM ₂ 、 CM ₂	流感病毒 (influenza) A-MVP
Flaviviridae	NP、VP30、VP35、L	GP、VP24、VP40	埃博拉 (Ebola) -MVP
Hepadnaviridae	HBc	L、M、S	肝炎病毒 (Hepatitis) B-MVP
Paramyxoviridae	VP、P	M、F、HN、SH、G、 H	人副流感病毒 (Human Parainfluenza

[0022]

) 3-MVP
Flaviviridae	C	M、E、prM、E ^{m5} 、E1、E2	牛病毒性腹泻病毒 (bovine viral diarrhea virus) -MVP
Picornavirus	VP1、VP2、VP3、VP4、Vpg,、VP0	无	肝炎病毒 (Hepatitis) A-MVP
Polyomaviridae	VP1、VP2、VP3	无	猴病毒 (simian virus) 40-MVP

[0023] 根据本发明,MVP作为体外重组表达或化学合成病毒壳或包膜蛋白的结果而组装。优选地,组装形成MVP的病毒壳和包膜蛋白为天然发生的病毒蛋白核酸序列的表达产物。可选择地,组装形成MVP的病毒壳和包膜蛋白为已被体外改变或修饰的病毒蛋白核酸序列的表达产物。在本发明中,“重组”蛋白指由作为改变或修饰的核酸序列的表达结果的被改变或修饰的氨基酸序列组成的蛋白产物。改变或修饰天然发生的病毒蛋白核酸序列以表达重组病毒壳或包膜蛋白的方式是本领域公知的(例如,参见Gilllock1998)。优选地,根据基于BLAST同源性分析的标准蛋白,重组MVP壳或包膜蛋白与其天然病毒蛋白来源的同源性为99%或更高。可选择地,根据基于BLAST同源性分析的标准蛋白,重组MVP壳或包膜蛋白与其天然壳和/或包膜蛋白来源的同源性至少为50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高。

[0024] 优选地,组装形成MVP的病毒壳或包膜蛋白通过在细菌、酵母、植物、昆虫、动物或人细胞中表达其基因而被制备。替代组装MVP制备这些蛋白的方式是本领域公知的(例如,参见Makarova,2011)。例如,首先将天然或修饰的病毒核酸蛋白序列克隆到表达载体中。优选地,所述表达载体为基于酵母的表达载体、基于细菌的表达载体、基于杆状病毒的表达载体、和/或基于哺乳动物的表达载体、和/或基于植物的表达载体。然后以表达载体转染细胞。优选地,可以被转染的细胞包括、但不限于:细菌、酵母、植物、昆虫、动物、哺乳动物和/或人细胞。优选地,天然或重组病毒壳或包膜蛋白表达后,所述蛋白自发地组装为MVP。可选择地,MVP的组装不会自发发生。在这些实例中,可以用化学试剂和/或蛋白质处理未组装的蛋白包含液,以增加MVP组装的发生。可选择地,纯化所述未组装的蛋白包含液,以增加溶液中壳或包膜蛋白相对于溶液中其他分子的数量。

[0025] 优选地,表达制备用于组装形成MVP的病毒壳或包膜蛋白的所述核酸序列来自Parvoviridae或Retroviridae基因组来源。源自Parvoviridae的核酸序列来源的实例包括、但不限于鼠微小病毒(Mouse Minute Virus)、犬细小病毒(Canine Parvovirus)、猫细小病毒(Feline Parvovirus)、猪细小病毒(Porcine Parvovirus)、B-19病毒(B 19vims)、腺相关病毒1(Adeno-associated virus 1)、鹿眼蛱蝶浓核病毒(Junonia coenia densovirus)、家蚕病毒(Bombyx mori virus)以及埃及伊蚊浓核病毒(Aedes aegypti densovirus)的基因组。可以由这些基因组制备并组装形成MVP的病毒壳蛋白的实例包括、

但不限于:VP1、VP2、VP3或VP4蛋白。源自Retroviridae的核酸序列来源的实例包括、但不限于以下病毒的基因组:鸟类成红细胞增多症病毒(Avian Erythroblastosis Virus)、鸟类白血病病毒(Avian Leukosis Virus)、禽成髓细胞瘤病毒(Avian Myeloblastosis Virus)、鸟类肉瘤病毒(Avian Sarcoma Virus),禽髓细胞瘤病病毒(Avian Myelocytomatosis Virus)、ESH肉瘤病毒(Esh Sarcoma Virus)、弗吉纳米肿瘤病毒(Fujinami Sarcoma Virus)、金黄色病毒(Golden Pheasant Virus)、诱导白血病病毒(Induced Leukemia Virus)、造淋巴组织细胞增生病毒(Lymphoid Leukosis Virus)、骨髓母细胞增多症相关病毒(Myeloblastosis-associated Virus)、髓细胞组织增生病毒(Myelocytomatosis Virus)、鲁斯相关病毒(Rous-associated Virus)、环颈雉病毒(Ring-necked Pheasant Virus)、劳氏肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)、NK-24、SKV、狒狒内源性病毒(Baboon Endogenous Virus)、BEV、CCC、CERV-CI、CPC4、玉米蛇逆转录病毒(Corn Snake Retrovirus)、鸡合胞体病毒(Chicken Syncytial Virus),鸭传染性贫血病毒(Duck Infectious Anemia Virus)、鹿肾病毒(Deer Kidney Virus)、DPC4、马皮肤纤维肉瘤病毒(Equine Dermal Fibrosarcoma Virus)、猫白血病毒;(Feline Leukemia Virus)、FeLV-AIDS、猫肉瘤病毒(Feline Sarcoma Virus)、Fr-MLV、Fr-SFFV、FS-1、长臂猿白血病病毒(Gibbon Ape Leukemia Virus)、仓鼠白血病病毒(Hamster Leukemia Virus)、淋巴组织增生病病毒(Lymphoproliferative Disease Virus)、貂致细胞灶病毒(Mink Cell Focus-inducing Virus)、MAIDS、MDEV、貂白血病病毒(Mink Leukemia Virus)、鼠白血病病毒(Murine Leukemia Virus)、MMCA、鼠肉瘤病毒(Murine Sarcoma Virus)、髓系白血病病毒(Myeloid Leukemia Virus)、OMCA、PK-1S、R-35、RadLV、大鼠白血病病毒(Rat Leukemia Virus)、Ra-MCF、Ra-MLV、Ra-SFFV、大鼠肉瘤病毒(Rat Sarcoma Virus)、RDL14、网状内皮组织增殖相关病毒(Reticuloendotheliosis-associated Virus)、形成脾脏病灶病毒(Spleen Focus-forming Virus)、毛猿肉瘤相关病毒(Simian Sarcoma Virus)、猴淋巴瘤病毒(Simian Lymphoma Virus)、猴髓细胞白血病病毒(Simian Myelogenous Leukemia Virus)、脾坏死病毒(Spleen Necrosis Virus)、猿猴肉瘤相关病毒(Simian Sarcoma-associated Virus)、毛猿肉瘤相关病毒(Simian Sarcoma Virus)、TRV4、Vand C-I、蝰蛇逆病毒(Viper Retrovirus)、毛猴病毒(Woolly Monkey Virus)、毛猴白血病病毒(Woolly Monkey Leukemia Virus)、牛白血病病毒;(Bovine Leukemia Virus)、BoLV、人T细胞白血病病毒(Human T-cell Leukemia Virus)、猿T细胞白血病病毒(Simian T-cell Leukemia Virus)、STLVpan-p、牛合胞病毒(Bovine Syncytial Virus),猫合胞体病毒(Feline Syncytium-forming Virus)、人合胞病毒(Human Foamy Virus)、猿合胞病毒(Simian Foamy Virus)、牛免疫缺陷病毒(Bovine Immunodeficiency Virus)、山羊关节炎-脑炎病毒(Caprine Encephalitis-arthritis Virus)、马传染性贫血病毒(Equine Infectious Anemia Virus)、猫免疫缺陷病毒(Feline Immunodeficiency Virus)、山羊脑白质炎病毒(Goat Leukoencephalitis Virus)、人免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus)、维斯那-梅迪病毒(Jembrana, Maedi/visna Virus)、进行性肺炎病毒(Progressive Pneumonia Virus)、猿猴免疫缺陷病毒(Simian Immunodeficiency Virus)、鼠乳腺癌病毒(Mouse Mammary Tumor Virus)、M432、M832、MNV、梅森-菲泽猴病毒(Mason-Pfizer Monkey Virus)、PMFV、P0-1-Lu、松鼠猴逆转录病毒(Squirrel Monkey Retrovirus)、猴逆转录病

毒(Simian Retrovirus)、绵羊肺腺瘤病毒(Jaagsiekte Retrovirus)、大眼梭鲈皮肤肉瘤病毒(Walleye Dermal Sarcoma Virus)、大眼梭鲈鱼表皮过度增生病毒(Walleye Dermal Hyperplasia Virus)以及Gypsy基因组。可以由这些源自Retroviridae的基因组制备并组装形成MVP的病毒壳蛋白的实例包括、但不限于:gag蛋白(MA、CA、NC) env蛋白(SU、TM、LP)、以及sag蛋白。更优选地,Retroviridae源的蛋白源包括哺乳动物细胞内源性逆转录病毒及逆转录病毒样颗粒的基因组序列。哺乳动物细胞内源性逆转录病毒及逆转录病毒样颗粒的实例包括、但不限于:小鼠白血病病毒(Ab、AKT8、Cas-Br-E、Du5H MAIDS、FMCF-98、Fr、Graffi、Gross、LP-BM5、Ki、Mo、MPLV、NT40、PVC-211、Ra、RadLV、SL3-3、TRI-3、XMuLV)以及内淋巴间隙A型颗粒。可能包含内源性逆转录病毒及逆转录病毒样颗粒的哺乳细胞的实例包括CHO、NS0、NS-1、Sp20Ag14、MH、BHK、以及RH细胞。

[0026] 优选地,病毒壳或包膜蛋白组装形成表面显示表位的MVP。在本发明中,“表位”是MVP的外表面显示的特定氨基酸序列。表位可以用于定量溶液中存在的MVP的量(及其从溶液中去除),而无需传染性试验、QPCR,或其它传染性或非传染性病毒颗粒去除的定量领域的繁荣且昂贵的常规方法。在一些实例中,重组病毒壳或包膜蛋白组装形成MVP。在这些实例中,MVP在其表面是可能具有异源表位。在本发明中,“异源表位”指重组壳或包膜蛋白的表达所形成表位。此外,MVP在其由重组蛋白组装时可以包含异源表位。异源表位的实例包括、但不限于:strept-tag(例如氨基酸序列WSHPQFEK(SEQ ID No:1))、flag tag(例如氨基酸序列DYKDDDDK(SEQ ID No:2))以及His-tag(例如氨基酸序列HHHHHH(SEQ ID No:3))。优选地,MVP的每个蛋白单元可以包含一个拷贝的表位或异源表位。可选择地,MVP的每个蛋白单元可以包含多个拷贝的表位或异源表位。异源表位可以将确定溶液中MVP数量所用定量方法的灵敏性提高至超过本领域常规使用的传染性试验、QPCR,或其它常规试验的水平。

[0027] 优选地,MVP不包含任何核酸。可选择地,MVP可以包含离体核酸片段。在本发明中,“离体核酸片段”指在颗粒组装时特意引入MVP溶液的特定核酸序列,从而所得MVP包含一个拷贝的该序列。因此,与所有其他本领域已知的颗粒不同,MVP不依赖于用于确定溶液中MVP数量的病毒基因组的遗传材料。在本发明中,术语“遗传材料”指复制或复制缺陷病毒颗粒中存在的所有天然包括的核酸。例如,在现有技术中,传染性病毒颗粒的定量涉及感染性测量(天然包含的基因组核酸表达的结果),或QPCR(使用其天然包含的基因组核酸的引物)(Shi, 2004)。此外,现有技术中,非复制内源逆转录病毒样颗粒的定量涉及利用天然包含的基因组核酸的引物的QPCR,或者测量病毒逆转录酶活性的定量产物增强逆转录酶(Q-PERT)(Zhang, 2008)。优选地,离体核酸片段可以指核酸的合成衍生序列。可选择地,离体核酸序列可以指天然衍生的序列。优选地,在天然衍生序列的实例中,序列的长度约为衍生序列源自的生物体的基因组的约1%或更少,5%或更少,10%或更少,25%或更少,30%或更少,40%或更少,50%或更少,60%或更少,70%或更少,75%或更少,90%或更少,95%或更少,99%或更少。如本领域的常规方法所测量,离体核酸的量不够MVP的复制和传染。本领域常规使用的测量传染性的方法之一是TCID₅₀。与其他本领域的常规病毒颗粒不同,MVP不具有正被感染或曾经感染的风险。在一些实施例中,离体核酸片段可以源自病毒源。在其他实例中,离体核酸源自非病毒源。离体核酸来源的实例包括但不限于:病毒、细菌、酵母、昆虫、动物和/或植物。优选地,在离体核酸源自病毒来源的实例中,所述病毒来源可以与MVP的壳或包膜蛋白源自同一来源。可选择地,在离体核酸源自病毒来源的实例中,所述病毒来源与

MVP的壳或包膜蛋白来源不同。更优选地，在任何情况下，所述离体核酸的5'端和3'端可以包含该序列源自的基因组不存在的特定序列。

[0028] 优选地，组装后，使用本领域已知的方法纯化MVP (Hernando, 2000)。并且，纯化后，在其组装溶液中MVP的纯度可以达到溶液中所有蛋白的不到65%为非MVP相关的，溶液中所有蛋白的不到55%为非MVP相关的，溶液中所有蛋白的不到35%为非MVP相关的，溶液中所有蛋白的不到25%为非MVP相关的，溶液中所有蛋白的不到15%为非MVP相关的，溶液中所有蛋白的不到5%为非MVP相关的。在本发明中，术语“非MVP相关蛋白”指没有组装形成MVP的所有非壳和/或非包膜蛋白。纯化MVP的方法的实例之一为蔗糖密度梯度。另一实例为离心。再一实例为层析。储液中MVP的纯度可以通过本领域的常规方法确定，所述方法包括但不限于：聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)、高压液相色谱、质谱、流式细胞、ELISA、动态光散射、凝胶过滤或超滤。在一些实例中，组装后，引入MVP，并与连接分子反应，从而MVP连接该连接分子至其表面。在本发明中，术语“连接分子”指能够与另一分子共价地或离子相连的合成聚合物或天然聚合物(例如蛋白)。

[0029] 如前所述，MVP由病毒壳或包膜蛋白组装。在本发明中，根据其病毒蛋白来源指代MVP。例如，由鼠微小病毒的VP2蛋白(或VP2蛋白的重组版)组装的MVP被称作“MMV MVP”。另一实例是，将由异嗜性小鼠白血病病毒(XMuLV)的env和/或gag蛋白(或env和/或gag蛋白的重组版)组装的MVP被称作“XMuLV MVP”。在本发明中，优选地，MVP包括微小病毒科(Parvoviridae)或逆转录病毒科(Retroviridae)核酸来源所制备的天然或重组蛋白。可选择地，MVP包括其他病毒家族的核酸来源所制备的病毒蛋白，这些病毒家族包括但不限于杯状病毒科(Caliciviridae)、逆转录病毒科(Retroviridae)、芜菁黄花叶病毒科(Tymoviridae)、披膜病毒科(Togaviridae)、疱疹病毒科(Herpesviridae)、冠状病毒科(Coronaviridae)、正黏液病毒科(Orthomyxo viridae)、丝状病毒科(Filoviridae)、肝病毒科(Hepadnaviridae)、副粘病毒科(Paramyxoviridae)、Fkwiviridae、小RNA病毒科(Picornaviridae)和/或多瘤病毒科(Polyomaviridae)。优选地，MVP由源自一个病毒来源的蛋白组装。MVP由源自一个病毒来源的蛋白组装的实例为“MMV MVP”，由天然或重组MMV VP2壳蛋白组装。可选择地，MVP可以由源自多个病毒来源的蛋白组装。MVP由多个病毒蛋白来源组装的实例为XMuLV MVP，其由天然或重组XMuLV gag蛋白和天然或重组HIV env蛋白组装而成。

[0030] 在本发明中，术语“MVP种类”指包括相同的蛋白、且具有这些蛋白的同样拷贝数的所有蛋白。例如，一类MVP是所有包括60个拷贝的MMV VP2蛋白的MVP。根据MVP的进一步优选限定，蛋白的重组形式被认为与其起源的天然蛋白相同。例如，包括60个拷贝的重组MMV VP2蛋白的MVP与包括60个拷贝的天然MMV VP2蛋白的MVP是同一种类。

[0031] 优选地，向溶液中添加MVP的操作指向溶液中仅添加一种MVP。可选择地，所述向溶液中添加MVP的操作指向溶液中添加再一种MVP。优选地，在这些实例中，同时向溶液中加入第一和第二种MVP。可选择地，在这些实例中，顺序添加第一、第二种MVP。向溶液中顺序添加两种MVP的实例是向溶液中首先加入MMV MVP，然后向同一溶液中再加入XMuLV MVP。向溶液中同时加入两种MVP的实例为将包含MMV MVP和XMuLV MVP的溶液加入另一溶液中。在另一实施例中，向溶液中加入MVP的操作指向溶液中加入两种或多种MVP。

[0032] 优选地，向溶液中加入MVP指向另一不含特定种类MVP的溶液中加入一定体积的含

义特定种类MVP的溶液。在本发明中,所述不含特定种类MVP的溶液直至向其中加入该种类的MVP的过程称作“处理溶液”。例如,将MMV MVP溶液加入还未含有MMV MVP的CHO细胞悬浮液的处理溶液。在另一实例中,将XMuLV MVP溶液加入含有MMV MVP但还未包含XMuLV MVP的CHO细胞悬浮液的处理溶液。在本发明中,加入到处理溶液中的含MVP的溶液可以被称作“MVP储液”。优选地,与本领域常规使用的非传染颗粒的储液不同,MVP储液具有已知浓度的MVP。例如,本发明的具体实施方式中的试剂盒内包含的MVP储液包括MVP浓度信息。而且MVP储液具有高于本领域其它非传染性颗粒的浓度的MVP。例如,储液中MVP的浓度至少为 1×10^5 MVP/mL, 1×10^6 MVP/ml, 1×10^7 MVP/ml, 1×10^8 MVP/ml, 1×10^9 MVP/ml, 1×10^{10} MVP/ml, 1×10^{11} MVP/ml, 1×10^{12} MVP/ml, 1×10^{13} MVP/ml, 1×10^{14} MVP/ml, 1×10^{15} MVP/mL, 1×10^{16} MVP/mL或更高。此外,MVP储液含有比本领域常规使用的其它非感染颗粒更高纯度的MVP。例如,MVP储液中非MVP相关蛋白不到溶液中所有蛋白的65%,不到溶液中所有蛋白的55%,不到溶液中所有蛋白的45%,不到溶液中所有蛋白的35%,不到溶液中所有蛋白的25%,不到溶液中所有蛋白的15%,不到溶液中所有蛋白的5%。储液中MVP的纯度可以通过本领域的常规方法确定,所述方法包括但不限于:聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、高压液相色谱、质谱、流式细胞、ELISA、动态光散射、凝胶过滤或超滤。在实施例部分描述制备MVP储液的实例。优选地,MVP储液含有一种MVP。含有一种MVP的MVP储液的实例之一为含有MMV MVP的MVP储液。可选择地,MVP储液可以含有多种MVP。含有多种MVP的MVP储液的实例为含有MMVMVP和XMuLV MVP的MVP储液。

[0033] 加入到操作液中的MVP溶液的量随多种因素而变化,这些因素包括但不限于:操作液的体积,添加后在所述操作液中MVP储液的目的比例(v/v),以及MVP储液中MVP的浓度。优选地,MVP储液的添加体积可以为微升或毫升的数量级。例如,添加体积可以为约100微升或更少,约200微升或更少,约500微升或更少,约1毫升或更少,约2毫升或更少,约5毫升或更少,约10毫升或更少,约100毫升或更少,约1000毫升或更少。可选择地,添加体积为升。例如,添加体积可以为约1升或更少,约2升或更少,约5升或更少,约10升或更少。优选地,添加后,在所述操作液中MVP储液的比例为约1%(v/v)或更少,约2%(v/v)或更少,约3%(v/v)或更少,约4%(v/v)或更少,约5%(v/v)或更少,约10%(v/v)或更少,约25%(v/v)或更少,或约50%(v/v)或更少。

[0034] 优选地,所述操作液含有目的生物。在本发明中,术语“目的生物”指通过可以展示治疗潜能的生物学过程制备的任何分子。在本发明中所述生物学过程的实例为细胞蛋白表达。在有些情况下,目的生物可以包括蔗糖、蛋白、核酸或这些物质的组合体。或者,目的生物可以为如细胞和/或组织的活体。优选地,目的生物为抗体、非抗体蛋白、疫苗、核酸、血液或血浆衍生物。作为目的生物的抗体的实例为曲妥单抗,其以HerceptinTM的商品名称销售。另一实例为Rituxiniab,其以RituxanTM的商品名称销售。另一实例为贝泛单抗,其以asrinTM的商品名称销售。作为目的生物的非抗体蛋白的实例包括但不限于:粒细胞集落刺激因子(GCSF)、干细胞因子、瘦素(leptin,)、荷尔蒙,细胞素、成血因子、生长因子、肥胖因子、营养因子、抗炎症因子、受体,、可溶性受体、酶、和/或这些蛋白任一一种的突变体、衍生物或类似物。其他目的生物的优选实例包括但不限于:胰岛素、胃泌素,催乳素、促肾上腺皮质激素(AC'I1i)、促甲状腺激素(TSH)、黄体化激素(LH)、促卵泡激素(FSH)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、胃动素、干扰素(如 α 、 β 、或 γ)、白细胞介素(例如,IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-

5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-3.1和/或IL-12)、肿瘤坏死因子(TNF)、肿瘤坏死因子结合蛋白(TNF-bp)、脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质源性神经生长因子(GDNF),神经营养因子3(NT3)、成纤维细胞生长因子(FGF)、神经营养生长因子(NGF)、骨生长因子such as, for example, 骨保护素(OPG)、胰岛素样生长因子(IGFs)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、外细胞衍生生长因子(MGDF)、角质化细胞生长因子(GF)、促血小板生成素、血小板源生长因子(PGDF)、菌落生长因子(CSFs)、骨形态生成蛋白(BMP)、超氧化物歧化酶(SOD)、组织纤维蛋白溶酶原激活剂(TPA)、尿激酶、链激酶、或激肽释放酶,和/或这些蛋白任一一种的变体、衍生物或类似物。疫苗作为目的生物的优选实施例为乙肝疫苗(Recombivax HB)。另一疫苗优选实施例为Gaxdasil。另一疫苗优选实施例为Optaflu。另一疫苗优选实施例为Cervarix。目的生物为核酸的优选实施例为fomivirsen,其市场销售名称为VitraveneTM。另一目的生物为核酸的优选实施例为mipomersen,其市场销售名称为KynamroTM。另一优选实施例为Pegaptanib,其市场销售名称为MacugenTM。血液或血浆衍生物作为目的生物的实例为白蛋白。另一血液或血浆衍生物作为目的生物的实例为抗血友病因子。另一优选实施例为抗血友病因子/血管假性血友病因子复合体。本发明中其它目的生物的实例包括但不限于:抗凝血复合抑制剂抗凝血酶(重组),氯酯酶抑制剂、凝血因子、corifact、纤维蛋白、,纤维蛋白原、免疫球蛋白、profilnine SD复合因子、kcentra凝血酶原复合体浓缩物,人)、蛋白C浓缩物(人)、凝血酶、骨髓制品、以及胚胎液产品。

[0035] 优选地,所述操作液中的目的生物通过细胞组织培养方法或发酵方法制备。在本发明中,术语“细胞组织培养”指细胞在可控条件下生长以表达特定基因(典型地体外诱导)的过程。在本发明中,术语“发酵表达方法”指微生物在特性条件下生长以表达特定基因(典型地体外诱导)的过程。优选地,用于细胞组织培养和发酵表达的细胞系为人、动物、植物、昆虫、杂交瘤、酵母或细菌来源的。人细胞系的实例包括但不限于:HeLa、NCI60、DU 145、MCF-7、PC3、ARH-77、和/或HEK-293细胞。动物细胞系的实例包括但不限于:CHO、BHK、NS0、MDCK、Vera、GH3、PC12、和/或MC3T3细胞。植物细胞系的实例包括但不限于:Tobacco BY-2cells。昆虫细胞系的实例包括但不限于:sf9、High Five、和/或C6/36细胞。酵母细胞系来自的酵母种类的实例包括但不限于:啤酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和/或毕赤细胞系。细菌细胞系来源的细菌种类的实例包括但不限于:大肠杆菌和/或乳酸菌。可选择地,用于细胞组织培养或发酵表达的细胞系是其他来源的。其他细胞系的实例包括但不限于ZF4、AB9和/或非洲爪蟾A6肾上皮细胞。

[0036] 在本发明中,术语“杂交瘤”指在实验室内由抗体生成淋巴细胞和非抗体生成癌细胞融合制备的细胞,优选骨髓瘤或淋巴瘤。此外,本发明的杂交瘤细胞能够繁殖和产生连续供给的特定单克隆抗体。杂交瘤细胞系的实例包括但不限于RFT5、SP2/o细胞和/或HB54细胞。

[0037] 在一些实例中,表达目的生物的细胞组织培养或发酵过程共表达其他生物物质或分子。在本发明中,在细胞组织培养或发酵过程中共表达非目的生物物质的所有生物物质或分子被称作“杂质”。杂质的实例包括但不限于:宿主细胞蛋白(除目的生物物质外表达的其他蛋白),核酸(除了目的生物外的核酸),目的生物物质的电荷变体,聚合复合体,β-葡聚糖,和/或病毒。此外,杂质指所有加入到含目的生物的溶液中的所有生物物质、分子或化学

物质。因此,杂质的实例为向操作液中加入MVP后的MVP。在一些实例中,在原始细胞培养或发酵表达溶液中,操作液与所有的初始杂质共存。在其他实例中,这些溶液在加入MVP之前,可能通过本领域公知的“纯化技术”由其初始状态被纯化。在本发明中,术语“纯化”指降低同一溶液中杂质相对于非杂质的数量的操作。优选地,非杂质指溶液中存在的目的生物物质。在加入MVP前已纯化操作液的纯化技术的实例包括但不限于:离心、层析、过滤、沉淀、浓缩、渗滤、巴氏杀菌或病毒灭活。在某些实例中,在加入MVP前,对溶液进行其他技术操作或严格操作,这些操作包括但不限于:冷冻、融化、pH调节,和/或稀释。

[0038] 本发明的第一具体实施方式涉及“通过纯化技术处理溶液”。在所述方法的该步骤中,术语“溶液”指已经加入一定量的MVP储液的操作液。优选地,该溶液包括目的生物物质。如前所述,也可能存在包括MVP的非目的生物物质,杂质。在本发明的第一实施例中,该溶液“通过纯化技术被处理”。在本发明中,术语“纯化技术”指纯化溶液的技术,即,降低同一溶液中存在的相对于非杂质的杂质数量。优选地,非杂质指目的生物物质。因此,本发明的再一优选实施方式为纯化操作液中的目的生物物质,其中,所述纯化为通过纯化技术处理所述操作液的操作。

[0039] 优选地,用于处理操作液的纯化技术为层析、过滤、超滤、离心、或病毒灭活技术。在本发明中,层析、过滤、超滤、或离心可以被称作“分离技术”。分离技术是将溶液的组分分散至两种或多种不同溶液中的质量转移方法。分离技术基于溶液的各种组分之间的不同物理和化学性质进行的,包括但不限于:大小、形状、和/或化学亲和力。分离技术的实例包括但不限于:亲和层析、离子交换层析、疏水层析、逆向层析、混合式层析、深度过滤、基于粒径的过滤(包括纳米过滤、无菌过滤或超滤),以及离心。病毒灭活技术指旨在减少其病毒功能至保留其正确结构或复制的任何方法。病毒灭活技术的实例包括暴露于溶剂或试剂,或者化学处理、低pH、加热或紫外线照射。

[0040] 本发明的第一实施方式涉及通过纯化技术“处理”溶液。在本发明中,术语“处理”指物理地实施纯化技术的操作。处理分离技术的不同物理操作包括但不限于:加泵、施压、离心、重力、或震荡。在一些实例中,根据分离技术的形式,一种分离技术可以实施多种操作。例如,离子交换层析技术的形式可以为填充柱、过滤、或96孔板。因此,该离子交换层析技术的处理操作可以包括加泵、施压、离心、重力、或震荡。实施病毒灭活技术的不同物理处理包括但不限于:加入有机溶剂、试剂或酸溶液,微波,暴露于紫外光,热水浴中浸没,巴氏灭菌,或蒸汽处理。

[0041] 在一些实例中,通过分离技术处理溶液降低溶液中的杂质的数量,因而称之为溶液“纯化”。向操作液中加入MVP后,MVP当作杂质。优选地,通过处理操作,与操作之前相比,降低了操作液中存在的MVP的量。可选择地,通过处理未减少操作液中MVP的量。纯化技术降低溶液中杂质的数量的能力依赖于本领域技术人员公知的系列技术参数或“可变输入”。可变输入的实例包括但不限于:被处理溶液的pH、电导率、以及温度。另一可变输入的实例包括但不限于:施加的压力、暴露的时间、或溶液的流速。另一实例是溶液中组分的浓度。其他实例为用于处理溶液的缓冲液的pH、电导率、或化学组成。另一实例为在处理过程中或处理后,收集操作液所用的标准。因此,通过纯化技术处理溶液所用的系列参数影响纯化技术减少杂质(如MVP)相对于非杂质(例如目的生物物质)的量的能力和效率。

[0042] 在一些实例中,在处理过程中或处理后收集操作液所用有效的参数使杂质更少。

一旦处理操作开始,收集操作液的方法论是本领域普通技术人员公知的。在本发明中,从处理操作开始就已经收集的操作液为称作“操作收集物”。在纯化过程中,用于收集操作收集物的方法包括但不限于:光吸收检测以及设定体积。优选地,本领域普通技术人员在操作过程中或操作之后可以利用有效的收集参数,从而操作收集物包含较处理前包含更少的杂质。更优选地,利用收集标准,从而操作收集物较处理前的操作液相比含有更少的MVP。

[0043] 在本发明中,在处理过程中收集不同的操作收集物。在处理过程中如何收集不同的操作收集物的实例为在层析分离技术的负载相的过程中收集柱洗脱液。另一实例为在层析分离技术的清洗相的过程中收集柱洗脱液。另一实例为在层析分离技术的洗脱相的过程中收集柱洗脱液。另一实例为收集过滤的滤液。另一实例为在低pH滴定过程中收集溶液。另一实例为在UV光照射或化学处理过程中收集溶液。可选择地,在处理后可以收集各种不同的处理收集物。处理后如何收集不同的操作液的实例为通过在层析分离技术的剥离相的过程中在收集柱洗脱液。另一实例为在低pH滴定、随后提高pH并过滤后收集溶液。另一实例为在UV光照射或化学处理后收集溶液。

[0044] 本发明的第一实施例涉及“从溶液中去除MVP的量的定量”。在该特定实施方式中,“定量”操作指本领域普通技术人员数学计算从操作液中被去除的MVP的量的方法。优选地,该数值可以表示为“对数下降值”(LRV)。可选择地,该数值可以表示为MVP总克数中的、和/或MVP总分子数中的摩尔浓度(mol/L)。优选地,本领域普通技术人员通过将处理后的溶液中残留MVP的量与处理前溶液中MVP的量相关联的等式可以数学计算从溶液中去除的MVP的量。优选地,通过将加入到操作液中的MVP储液的体积乘以MVP储液的MVP浓度,就可以获知处理前溶液中MVP的量。更优选地,可以实证检验确定处理前溶液中存在的MVP的数量。此外,优选地,可以实证检验确定操作收集物中残留的MVP的量。可以利用不同技术实证检验确定溶液中存在的MVP的量。在本发明中,这些技术被称作“定量技术”。在实施例部分说明如何确定从溶液中去除的MVP的量的优选实施例。

[0045] 优选地,实证检验确定溶液中MVP的量所用的“定量技术”包括ELISA、PCR、纳米图像(nanoimaging)、荧光、酶促法、显微法、分光光度法、透射电镜(TEM),或western杂交技术。在本发明的实施例中,从中确定MVP的数量的“溶液”指加入MVP后的操作液、操作收集物、或从上述两种取得的液体。在该实施例中,所述溶液可以被称作“MVP包含液”。优选地,当实施定量技术时,将包含能够结合MVP的试剂或与MVP连接的分子的溶液加入MVP包含液中。所述试剂的实例为抗体。可选择地,当实施定量技术时,向MVP包含液中加入含PCR引物的溶液,所述PCR引物能够结合离体核酸,或者能够结合与分子连接的核酸序列,其中所述分子可以事先与MVP连接。在本发明中,含试剂或PCR引物的溶液被称作“定量溶液”。

[0046] 优选地,在确定溶液中MVP的数量的操作中,制备溶于操作液的MVP的系列稀释液,并通过定量技术分析。优选地,此分析的数据将溶液中的MVP的量与作为定量技术的结果接收的信号关联。作为定量技术的一部分被接收的信号的实例包括但不限于:直观密度(OD)、吸收单位、每mL pRNA拷贝、每mL pDNA、每mL RNA拷贝数、每mLDNA拷贝数、或逆转录酶活性单位。更优选地,使用最佳的试剂盒,结合将由未知数量的MVP所产生的定量信号与已知量的MVP所产生的信号关联的数据。在实施例部分详细说明相关实施例,其中制备并利用稀释液确定溶液中MVP的数量,替代定量从溶液中去除的MVP。

[0047] 在某些实例中,MVP包括天然或重组病毒壳或包膜蛋白,并且在其表面具有表位或

异源表位。优选地,在这些实例中,在使用定量技术确定溶液中存在的MVP的量的过程中可以使用结合这些表位或异源表位的抗体。结合MVP上的表位的抗体如何被用于确定MVP的量的实例为在ELISA定量技术过程中,向MMV MVP包含溶液中加入直接抗天然或重组VP2壳蛋白的抗-VP2抗体。结合MVP上的异源表位的抗体如何被用于确定MVP的量的实例为在ELISA定量技术过程中,向MVP包含溶液中加入直接抗其His标签(MVP表面上存在的异源表位)的抗-His抗体。优选地,本领域中已知的能够结合MVP所包含的表位或异源表位的抗体可以为定量溶液中使用的试剂。更优选地,通过使用MVP作为生物体的免疫原制备的新型抗体可以为定量溶液中所使用的试剂。因此,通过本领域常规的基于非遗传材料的技术可以实现惊人灵敏的定量测量和MVP去除计算。

[0048] 在其他实例中,MVP与连接分子相连。优选地,在这些实例中,在定量技术确定溶液中存在的MVP的量的过程中,结合连接分子的抗体可以被加入MVP包含液中。在其他实例中,在加入定量溶液前,可以将含分子的溶液加入MVP包含液中。在本发明中,术语“分子”指具有MVP亲和性的天然或人造小分子或蛋白。

[0049] 在一些实例中,向MVP包含液中加入分子,以形成MVP-分子复合物。优选地,在这些实例中,分子不具有在其表面上连接和显示的核酸序列。在其他实例中,分子可以具有在其表面上连接和显示的核酸序列。优选地,例如,当向MVP包含溶液中加入含分子的溶液时,然后加入定量溶液以通过定量技术确定溶液中存在的MVP的量。如何通过加入含分子的溶液确定溶液中存在的MVP的量的实例是:首先向含Strep标签-MVP的溶液(MVP包括Strep标签异源表位)中加入含链霉肌动蛋白的溶液,然后通过ELISA定量技术使用抗-链霉肌动蛋白抗体确定MVP的数量。另一实例是,首先向MVP包含溶液中加入核酸共联的链霉肌动蛋白溶液(链霉肌动蛋白含有核酸的连接片段),然后通过PCR定量技术使用核酸片段的引物确定MVP的量。

[0050] 在一些实例中,MVP在其结构内部包含离体核酸片段。优选地,在这些实例中,含与MVP结构内包含的离体核酸结合的引物的定量溶液可以被用于通过PCR定量技术确定MVP的量。在这些实例中,可以使用本领域公知的增强通过定量技术产生的信号的方法。增强通过定量技术产生的信号的方法的实例涉及金属增强荧光。

[0051] 优选地,去除的MVP的量的定量指MVP的种类。优选地,在这些实例中,将一种MVP加入通过纯化技术处理的操作液中。可选择地,当将两种或多种MVP加入通过纯化技术处理的操作液中时,去除的MVP的量的定量可以指多种MVP。优选地,在这些实例中,在确定溶液中多种MVP数量中使用相同定量技术的实例是在分别的ELISA定量技术中使用抗VP2抗体和抗env-抗体,其中,所述抗VP2抗体结合MMV MVP,所述抗env-抗体结合XMuLV MVP。可选择地,不同定量技术可以用于确定溶液中的多种MVP的量。使用不同定量技术的实例为使用基于ELISA的技术确定溶液中MMV MVP的量,以及使用PCR技术确定相同溶液中XMuLVMVP的量。

[0052] 优选地,不间断地顺序实施以下步骤:向溶液中加入MVP、通过纯化技术处理溶液、以及确定从溶液中去除的MVP的量。可选择地,根据合理的试验设计可以包括附加步骤。可以根据合理的试验设计包括的附加步骤的实例包括但不限于:在将操作液加入储液之前进一步纯化MVP储液(经过滤、层析或其他技术),在将MVP储液加入操作液之前进行透析或渗滤,在加入MVP之前或之后,向操作液加入非-MVP溶液。非MVP溶液的实例为不含病毒的活病毒制剂的细胞悬浮培养物。其他附加步骤的实例可以包括在添加MVP之后、但在通过纯化技

术处理之前取操作液试样,在实施定量技术之前离心或稀释操作收集物或操作收集物的试样,和/或在实施定量技术之前冷冻或溶解用于定量技术的试样。

[0053] 因此,本发明的具体实施方式之一为确定从溶液去除的MVP的量的方法。本发明的另一具体实施方式为用于实施所述方法的试剂盒。优选地,所述试剂盒包括包含单一种类MVP的储液的容器,以及包含定量溶液的容器。可选择地,所述试剂盒包含多种MVP的MVP储液的容器。优选地,在该实施例中,所述试剂盒还包括用于实验验证确定储液瓶中存在的各MVP种类的数量的多个定量溶液的容器。根据纳米的实施例,其中所述试剂盒包含多个MVP储液瓶(含不同种MVP),所述试剂盒还包括用于确定各种MVP的数量的多个定量溶液瓶。

[0054] 在本发明中,包含MVP储液的容器指试剂盒内包含的瓶,所述试剂盒包含已知浓度(MVP浓度)的MVP储液。此外,储液容器中的MVP的浓度和纯度超过本领域常规的其他非传染性颗粒的浓度和纯度水平。例如,储液容器中的MVP浓度可以至少为 1×10^5 MVP/mL、 1×10^6 MVP/mL、 1×10^7 MVP/mL、 1×10^8 MVP/mL、 1×10^9 MVP/mL、 1×10^{10} MVP/mL、 1×10^{11} MVP/mL、 1×10^{12} MVP/mL、 1×10^{13} MVP/mL、 1×10^{14} MVP/mL、 1×10^{15} MVP/mL、 1×10^{16} MVP/mL或更高,并且,非MVP相关蛋白的比例不到溶液中所有蛋白的65%,不到溶液中所有蛋白的55%,不到溶液中所有蛋白的45%,不到溶液中所有蛋白的35%,不到溶液中所有蛋白的25%,不到溶液中所有蛋白的15%,不到溶液中所有蛋白的5%。优选地,储液瓶中的MVP可以为MVP组装成的源细胞培养物或基于发酵的表达溶液。更优选地,纯化溶液储液的MVP,从而与MVP组成的原始表达溶液相比降低了非MVP相关蛋白的浓度、核酸的浓度、或溶液中脂类的浓度。更优选,储液瓶中的MVP从MVP组装的原始表达溶液中被高度纯化。在一些实例中,MVP储液可以包含加入的缓冲液组分。优选地,单个MVP储液瓶仅含一种特定的MVP。可选择地,单一的储液瓶含多种MVP。

[0055] 在本发明中,“含定量溶液的容器”指试剂盒内包含的瓶,所述试剂盒包括含能够结合MVP试剂的定量溶液,离体核酸,与MVP连接的分子,或与所述分子连接的核酸序列。优选地,定量瓶包括含抗体的定量溶液,所述抗体能结合MVP或者能与MVP连接的分子。包括含抗体的定量溶液的定量瓶的实例为包括含抗-VP2抗体的定量溶液的定量溶液瓶,其中,可以在ELISA定量技术中使用抗-VP2抗体,以确定溶液中MMV MVP的量。在这些实例中,抗体可以结合MVP上存在的表位或异源表位,或结合分子上存在的表位。在本发明的另一优选实施方式中,所述试剂盒还包括第二抗体的溶液,所述第二抗体能够结合主要抗体,所述主要抗体结合MVP或与MVP连接的分子。优选地,在加入能够结合MVP或分子的抗体后,在实施定量技术的过程中,加入第二抗体溶液。

[0056] 在一些实例中,能够结合MVP或结合与MVP连接的分子的抗体不与酶连接。可选择地,在本发明的另一优选实施方式中,定量溶液中所包含的能结合MVP或结合与MVP连接的分子的抗体与酶连接。可以与抗体连接的酶的实例为辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶。此外,在另一优选实施方式中,第二抗体与酶连接,其中,所述第二抗体结合能结合MVP或结合与MVP相连的分子的抗体。

[0057] 在本发明的优选实施例中,所述试剂盒进一步包括含结合MVP的固定抗体或分子的ELISA板。优选地,该板包括96个孔。可选择地,该板包含少于96个孔。优选地,ELISA板内固定的抗体或分子结合同一试剂盒的MVP储液瓶内包含的MVP。

[0058] 可选择地,在另一优选实施方式中,定量瓶包括含引物的定量溶液,所述引物能够

结合离体核酸序列或与分子连接的核酸片段,所述分子可以与MVP连接。优选地,在这些实例中,定量溶液瓶可以包含MVP内包含的离体核酸片段的特异性PCR引物。可选择地,在这些实例中,在定量步骤中,定量溶液瓶可以包含于分子连接的核酸片段的特异性PCR引物,所述分子可以先与MVP连接。

[0059] 在本发明的优选实施中,所述试剂盒包括能够结合MVP分子的溶液。该分子的溶液的实例为含链霉肌动蛋白的溶液。该分子的溶液的另一实例为含有显示短核酸序列的链霉肌动蛋白的溶液。优选地,在加入定量溶液前,在实施定量技术过程中加入该溶液。

[0060] 在本发明的优选实施例中,试剂盒中包括实施ELISA或PCR的附加试剂。实施ELISA或PCR的附加试剂的实例包括本领域常规使用的缓冲液、酶、或分子。

[0061] 尽管结合具体的实施例描述了实施方式,显然对这些实施例进行各种修饰和改变没,而不超出本发明的本质和保护范围。因此,说明书和附图被认为是用于说明的,而非限制含义。

[0062] 实施例

[0063] 实施例1:鼠微小病毒(MMV)假病毒克隆的克隆、表达及纯化,制备储液

[0064] 鼠微小病毒(MMV)为含属于感染脊椎动物宿主的微小病毒科(Parvoviridae)的病毒单链DNA。使用各种杆状病毒表达系统可以克隆并表达鼠微小病毒壳蛋白基因VP2,以产生MVP(Hernando, 2000)。为了克隆并表达MMV MVP,由公开的MMVVP2模板合成壳蛋白基因VP2 (GenBank J02275.1, nucleotides 2794-4557, SEQ ID No. 4)。在合成过程中优化特定的密码子,从而提高翻译的效率 (SEQ ID No. 5)。所得氨基酸序列 (SEQ ID No. 6) 与公开的VP2 序列100%同源 (GenBank AAA67114.1, SEQ ID No. 7)。将该基因插入克隆载体pUC57,然后被亚克隆至pFastBac表达字体。然后该载体被用于转化DH10Bac细胞。筛选阳性克隆后,杆状病毒质粒DNA被用于转化Sf9细胞。从Sf9细胞培养悬浮液收集携带MMV VP2基因的重组杆状病毒。然后扩大初始的重组杆状病毒储液,并且在感染后4天收集。在Grace培养基中培养该储液,并补充10%FBS,然后在多重感染为4.0时转化Sf9细胞。然后在感染后3天收集细胞,然后在水解缓冲液中悬浮。然后冷冻、融化该悬浮液3次。通过离心回收可溶性的溶菌液,然后通过以下公开的程序纯化所得MVP (Hernando, 2000)。通过考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE (图1) 和western杂交(未显示) 确定氯化铯密度梯度分离后的MVP的纯度。基于此结果,收集组分形成MMV MVP储液。通过利用负染色的透射电镜 (图2) 实现MMV MVP储液的可视化以及浓度确定。

[0065] 实施例2:克隆、表达以及纯化异源表位MMV MVP以制备储液

[0066] 制备MMV MVP,在其表面显示异源表位,因此能够用作MVP定量的靶标。为了克隆显示异源表位的MMV MVP,首先合成MMV VP2基因的天然核苷酸序列(利用GenBank J02275.1, nucleotides 2794-4557, SEQ ID No. 4作为模板),同时优化特定的密码子,以增加翻译效率 (SEQ ID No. 5)。然后在氨基酸位置2处突变该序列 (SEQ ID No. 8),获得包括插入含streptavidin II标签的10个氨基酸序列的氨基酸序列 (SEQ ID No. 9)。然后使用与实施例1相同的方法和程序克隆、表达、纯化以及制备含异源表位(streptavidin II标签)的MVP储液。通过考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE (图3) 和western杂交(未显示) 确定氯化铯密度梯度分离后的MVP的纯度。基于此结果,收集组分形成MMV MVP储液。通过利用负染色的透射电镜 (图4) 实现MMV MVP储液的可视化以及浓度确定。通过利用链霉肌动蛋白和抗标签的mAb (未显示) 的ELISA试验

进一步实现所得显示strep II标签的可视化。

[0067] 实施例3:克隆、表达以及纯化异嗜性小鼠白血病病毒(XMuLV)MVP以制备储液

[0068] 之前已显示使用共表达XMRV env和gag基因的Ad5载体感染细胞导致产生非感染颗粒(Makarova, 2011)。首先,可以使用基因的公开序列作为模板定制合成XMuLV gag和env基因(分别为:GenBank accession number JF908817.1, nucleotides 546-2156, SEQ ID No.10, and accession number K02730.1, nucleotides 291-2225, SEQ ID No.11)。然后可以将核实序列克隆至pUC57载体。然后,将env序列亚克隆至pDP1穿梭载体的CMV驱动的表达卡盒,并且,将gag序列亚克隆至同一载体的MCMV驱动的表达卡盒,得到pDP1-XMuLV Venvgag。然后,在共转染293-AD细胞以制备重组Ad5-XMuLV之前,可以将所述pDP1-XMuLV Venvgag质粒线性化,并与pAdEasy-1质粒混合。可以通过在氯化铯梯度上双离心纯化重组腺病毒。为了制备MVP储液,可以使用用友病毒吸收的Ad5-XMuLV感染Mv1Lu。然后,感染48小时后收集培养基,通过0.45mm过滤,并且通过蔗糖梯度超滤进行浓缩/纯化。

[0069] 实施例4:克隆、表达以及纯化含异源表位的XMuLV MVP,以制备储液

[0070] 可以通过Suomalainen等1994中讨论的方法制备在其结构的表面含异源表位的XMuLV MVP。可选择地,可以合成XMuLV gag和/或env基因(分别为GenBank accession number JF908817.1, nucleotides 546-2156, SEQ ID No.10, and accession number K02730.1, nucleotides 291-2225, SEQ ID No.11)之一的核苷酸序列,以包括用于异源标签的序列,所述异源标签包括但不限于astrep-tag(氨基酸序列WSHPQFEK (SEQ ID No:1))、Flag tag(氨基酸序列DYKDDDDK (SEQ ID No:2))、或His-tag(氨基酸序列HHHHHH (SEQ ID No:3))。通过以上实施例3所述的方法克隆、表达以及纯化。

[0071] 实施例5:组装含核酸的XMuLV MVP

[0072] 为了制备含核酸片段的XMuLV MVP,如实施例4所述,可以首先从哺乳动物细胞表达XMuLV gag和/或env蛋白。然后,根据公开的试验手册可以实施XMuLV gag和/或env蛋白的离体组装,以包含可以我DNA或RNA的核酸(Gross等,1997; Yu等,2001)。

[0073] 实施例6:通过离子交换树脂定量处理后从含mAb溶液中去除的MMV MVP

[0074] 取出-80℃保藏的含单克隆抗体(mAb1)的NS0收获细胞培养液体,并融化。以1MTris滴定材料至pH7.5,然后通过0.22μm滤膜过滤。将100微升的含60个拷贝的显示异源表位strep II标签表位的VP2壳蛋白的MMV MVP(浓度为1x 10⁹MVP/ml)储液加入10mLd mAb操作液中(1% v/v添加)。因此,操作液的浓度为9.9x 10⁶MVP/ml ((0.1ml x 1x 10⁹MVP/ml) / 10.1mLs)。然后按照供应商(GE healthcare)建议的说明书组装0.66cm x 2cm的Q Sepharose Fast Flow,并且用AKTA explorer以50mM Tris-HCl, 50mM NaCl (pH 7.5)、60cm/hr流速进行平衡。平衡后,将10.1mLs的含MVP操作液以60cm/hr的流速负载柱子。收集操作收集物作为蛋白流过所显示的UV280痕迹。取200μL的收集物样品。

[0075] 然后实施ELISA定量技术,确定从纯化处理中各个操作收集物去除的MVP的量。事先以兔多克隆抗MMVVP2抗体(Alpha Diagnostic, Cat#MVMVP21-S)覆盖微孔板。向涂覆的微孔中加入50μL各操作收集物样品,孵育1小时,并且以1x的磷酸缓冲液(PBS)清洗3次。在初始处理材料时制备MMV MVP储液的系列稀释液,获得MVP浓度为1x 10⁸MVP/ml、1x 10⁶MVP/ml、和1x 10⁴MVP/ml。将50μL的各稀释液加入微孔、孵育并清洗。然后向各微孔加入兔多克隆抗MMV VP2抗体,孵育1小时,并以1x的磷酸缓冲液(PBS)清洗3次。然后加入HRP连接的抗

兔抗体(1:500),孵育1小时,并以1x的磷酸缓冲液(PBS)清洗3次。加入TMB底物溶液,通过加入停止液停止反应。测量450nm处的光密度(OD)。以下表2显示OD₄₅₀结果。

[0076] 表2:MMV MVP去除研究的OD₄₅₀测量值

样品	OD ₄₅₀ 测量值
MVP稀释液1 (1x 10 ⁸ MVP/ml)	1.1
MVP稀释液2 (1x 10 ⁶ MVP/ml)	0.9
MVP稀释液3 (1x 10 ⁴ MVP/ml)	0.52
MVP稀释液对照(操作溶液)	0.03
操作收集物1	0.04
操作收集物2	0.01

[0078] 以三种已知浓度的稀释液样品(相关OD₄₅₀和MVP浓度)确定了最佳试剂盒的线性方程。该线性方程的等式为:

[0079] $Y = 0.05251n(x) + 0.1235$

[0080] 通过处理两种操作收集物的OD₄₅₀结果,确定这些样品中的MVP浓度。因此,试验确定任一已知操作收集物中残留0MVP/ml。由于该ELISA试剂盒的检测限值是未知的,因此设定该限值为最低测试MVP浓度(1x 10⁴MVP/ml)。由操作液中MVP的已知数量计算MMV MVP的对数减少值。该值>9.9x 10²,因此为通过纯化技术处理溶液后从该溶液中去除的MVP的量。

[0081] 实施例7:通过细小病毒过滤处理后从含Mab的溶液中去除的XMuLV MVP的定量

[0082] 可以通过使用本领域常规的方法,利用蛋白亲和以及离子交换层析柱纯化含单克隆抗体的生物技术操作液。该溶液可以在-80℃冷冻数月,然后融化,并通过0.22μm滤膜过滤。然后将12.5mL的XMuLV MVP储液滴加到250mL的过滤的操作液(5%峰值v/v)。取1mL该添加了MVP的操作液样品,用于随后的定量。将所述操作液(含XMuLV MVP)以30psi加压通过Vpro细小病毒过滤,收集过滤物。取1mL的该过滤物样品(操作液)。

[0083] 以MVP稀释液制备系列XMuLV MVP操作液的系列稀释液,操作液的MVP浓度为1x 10⁹、1x 10⁷、1x 10⁵、以及1x 10³MVP/ml的稀释液。然后向涂覆抗XMuLV env表位的抗体的微孔加入50μL的各稀释液。然后孵育1小时,并以1x PBS清洗3次。加入TMB底物溶液,通过加入停止液停止反应。测量450nm处的光密度(OD),以生成反应OD和MVP浓度关系的数据曲线。以下表3显示OD₄₅₀结果。

[0084] 表3:XMuLV MVP去除研究的OD₄₅₀测量值

稀释液浓度(MVP/ml)	OD ₄₅₀ 测量值
1x10 ⁹	1.47
1x10 ⁷	0.9
1x10 ⁵	0.56
1x10 ³	0.33
0(操作液对照)	0.01

[0086] 通过细小病毒过滤出来去除的XMuLV MVP的数量可以试验定量。如上系列稀释液样品所述,将1mL的操作液样品(添加MVP后)和操作收集物进行相同的ELISA方法。将所得OD₄₅₀值带入最符合表3数据的等式,预测过滤前后溶液中MVP的数量。如实施例6所述,根据定量去除病毒领域的常规方法,由该数据可以计算XMuLV MVP LRV。

<110> 默克维溶液

<120> 从纯化溶液中去除的假病毒颗粒的定量方法及试剂盒

<130> MVP-01

<150> 61875729

<151> 2013-09-10

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Synthetic

[0001]

<400> 1

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成

<400> 2

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 3

<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成

<400> 3

His His His His His

1 5

<210> 4

<211> 1764

<212> DNA

<213> 鼠微小病毒

<400> 4

acatacggta cattttctg gaaaggaaaa ctaaccatga gagcaaaact tagagcta	1620
accacttgg a cccagtgt a ccaagtaagt gctgaagaca atggcaactc atacatgagt	1680
gtaactaaat gtttaccaac tgctactgga aacatgcagt ctgtgccgt tataacaaga	1740
cctgttgc a gaaatactt a ctta	1764

<210> 5

<211> 1764

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 由鼠微小病毒修饰

<400> 5

atgtctgatg gcacttcaca accggattct ggaaacgctg ttcaactggc tgctagggtg	60
gaaaggcctg ctgatggacc tggcgatcc ggtggaggag gttctgggtgg aggtggatgc	120
ggagttcca ctggtttta cgacaaccag acacactacc gtttctggg cgatggatgg	180
gtcgagatca ccgccttcgc cactcgctt gttcacctga acatgcctaa gtcggaaaac	240
tactgccc tccgcgttca caacaccact gacacctctg tgaaggtaa caiggtcta	300
gacgatgccc acgagcaat ctggactct tggagcttgg tggacgctaa cgcctggg	360
gttggctgc agccatcaga ttgcaatac atctgttaca ccatgtcgca gctcaacttgc	420
gtctccctgg accaagaaat ctcaacgtg gtcctcaaga ccgtgactga acaggacttg	480
ggaggtcaag ctatcaagat ttacaacaac gacctcaccc cttgcattat ggtggccgtc	540
gatcttacaaca acatcttgc ttacacccca gtcgccaaca gcatggagac tctgggttgc	600
tacccgttgg a gcccaccat ccgcctcacct taccgttact acitctgtgt tgaccgcgt	660
ctgtcggtga cttacggagaa ccaggaaggc actgtggaaac acaacgtcat gggcacccca	720
aagggaatga actcccaatt ctccacaatc gagaacaccc agcaaatac tctgtcagg	780
acaggcgacg agttcgctac aggaacctac tacttcgata ctaacagcgt gaagctca	840
cacacatggc agacaaacag acagttgggt caacccctt tgcgtcaac attccctgag	900
gctgacacccg atgcggcac cctgactgtc cagggttcca ggcacggcac aacccaaatg	960
ggagttact ggggtctga ggttatcagg accagacccg cccaaatggg attctgcca	1020
ccccacaacg acttcgaggc ttccctgtc ggtccatcg ctgcctttaa ggtccctagct	1080
gacatcaactc agggagttga taaggaggcc aacgggttcag tgcgtactc gtacggaaag	1140
caacacggtg aaaactgggc tagccacggc cctgctccag agaggtacac ctgggacgaa	1200
actagcttcg gttcaggcag agacaccaag gatggattca tccagttgc tccgctgg	1260
gtgccacccgc ccctgaacgg tatcttaca aacgccaacc ctatggcac caagaacgac	1320
atccacttca gcaacgttta caactcatac ggtccactga ccgccttcgc gcaaccatcc	1380
ccagtgtaacc cacagggaca aatctggac aaggagctgg atctgaaca caagcctcgc	1440
ctccacatca ctgtccatt cgtctgtt aacaacgctc caggacat gtcgtgagg	1500
ttgggaccta acctgacaga ccaatacgtt ccaaaccggcg ctacccttc cagaatgtc	1560
acttacggta cattttctg gaagggtcaag ttgaccatgc gtgttaagct ggcggccaa	1620
actacatgg a cccagtcta ccaggttcc gccgaggac a cggaaactc ttacatgagc	1680
gtgactaagt ggctccccac agctaccgg aacatgcaat ctgtgccgtt gatcaacttgc	1740

cccgctgcca gaaacacata ctaa

1764

<210> 6
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> 鼠微小病毒

<400> 6

Met Ser Asp Gly Thr Ser Gln Pro Asp Ser Gly Asn Ala Val His Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Val Glu Arg Ala Ala Asp Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Tyr Asp
 35 40 45
 Asn Gln Thr His Tyr Arg Phe Leu Gly Asp Gly Trp Val Glu Ile Thr
 50 55 60
 Ala Leu Ala Thr Arg Leu Val His Leu Asn Met Pro Lys Ser Glu Asn
 65 70 75 80
 Tyr Cys Arg Ile Arg Val His Asn Thr Thr Asp Thr Ser Val Lys Gly
 85 90 95
 [0004] Asn Met Ala Lys Asp Asp Ala His Glu Gln Ile Trp Thr Pro Trp Ser
 100 105 110
 Leu Val Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Leu Gln Pro Ser Asp Trp
 115 120 125
 Gln Tyr Ile Cys Asn Thr Met Ser Gln Leu Asn Leu Val Ser Leu Asp
 130 135 140
 Gln Glu Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Val Thr Glu Gln Asp Leu
 145 150 155 160
 Gly Gly Gln Ala Ile Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Cys Met
 165 170 175
 Met Val Ala Val Asp Ser Asn Asn Ile Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala
 180 185 190
 Asn Ser Met Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Lys Pro Thr Ile Ala
 195 200 205
 Ser Pro Tyr Arg Tyr Tyr Phe Cys Val Asp Arg Asp Leu Ser Val Thr
 210 215 220
 Tyr Glu Asn Gln Glu Gly Thr Val Glu His Asn Val Met Gly Thr Pro
 225 230 235 240
 Lys Gly Met Asn Ser Gln Phe Phe Thr Ile Glu Asn Thr Gln Gln Ile
 245 250 255
 Thr Leu Leu Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ala Thr Gly Thr Tyr Tyr Phe
 260 265 270
 Asp Thr Asn Ser Val Lys Leu Thr His Thr Trp Gln Thr Asn Arg Gln

275	280	285
Leu Gly Gln Pro Pro Leu Leu Ser Thr Phe Pro Glu Ala Asp Thr Asp		
290	295	300
Ala Gly Thr Leu Thr Ala Gln Gly Ser Arg His Gly Thr Thr Gln Met		
305	310	315
Gly Val Asn Trp Val Ser Glu Ala Ile Arg Thr Arg Pro Ala Gln Val		
325	330	335
Gly Phe Cys Gln Pro His Asn Asp Phe Glu Ala Ser Arg Ala Gly Pro		
340	345	350
Phe Ala Ala Pro Lys Val Pro Ala Asp Ile Thr Gln Gly Val Asp Lys		
355	360	365
Glu Ala Asn Gly Ser Val Arg Tyr Ser Tyr Gly Lys Gln His Gly Glu		
370	375	380
Asn Trp Ala Ser His Gly Pro Ala Pro Glu Arg Tyr Thr Trp Asp Glu		
385	390	395
Thr Ser Phe Gly Ser Gly Arg Asp Thr Lys Asp Gly Phe Ile Gln Ser		
405	410	415
Ala Pro Leu Val Val Pro Pro Leu Asn Gly Ile Leu Thr Asn Ala		
420	425	430
Asn Pro Ile Gly Thr Lys Asn Asp Ile His Phe Ser Asn Val Phe Asn		
435	440	445
Ser Tyr Gly Pro Leu Thr Ala Phe Ser His Pro Ser Pro Val Tyr Pro		
[0005]	450	455
Gln Gly Gln Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Leu Glu His Lys Pro Arg		
465	470	475
Leu His Ile Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Ala Pro Gly Gln		
485	490	495
Met Leu Val Arg Leu Gly Pro Asn Leu Thr Asp Gln Tyr Asp Pro Asn		
500	505	510
Gly Ala Thr Leu Ser Arg Ile Val Thr Tyr Gly Thr Phe Phe Trp Lys		
515	520	525
Gly Lys Leu Thr Met Arg Ala Lys Leu Arg Ala Asn Thr Thr Trp Asn		
530	535	540
Pro Val Tyr Gln Val Ser Ala Glu Asp Asn Gly Asn Ser Tyr Met Ser		
545	550	555
Val Thr Lys Trp Leu Pro Thr Ala Thr Gly Asn Met Gln Ser Val Pro		
565	570	575
Leu Ile Thr Arg Pro Val Ala Arg Asn Thr Tyr		
580	585	
<210> 7		
<211> 587		
<212> PRT		
<213> 鼠微小病毒		
<400> 7		

Met Ser Asp Gly Thr Ser Gln Pro Asp Ser Gly Asn Ala Val His Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Val Glu Arg Ala Ala Asp Gly Pro Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Tyr Asp
 35 40 45
 Asn Gln Thr His Tyr Arg Phe Leu Gly Asp Gly Trp Val Glu Ile Thr
 50 55 60
 Ala Leu Ala Thr Arg Leu Val His Leu Asn Met Pro Lys Ser Glu Asn
 65 70 75 80
 Tyr Cys Arg Ile Arg Val His Asn Thr Thr Asp Thr Ser Val Lys Gly
 85 90 95
 Asn Met Ala Lys Asp Asp Ala His Glu Gln Ile Trp Thr Pro Trp Ser
 100 105 110
 Leu Val Asp Ala Asn Ala Trp Gly Val Trp Leu Gln Pro Ser Asp Trp
 115 120 125
 Gln Tyr Ile Cys Asn Thr Met Ser Gln Leu Asn Leu Val Ser Leu Asp
 130 135 140
 Gln Glu Ile Phe Asn Val Val Leu Lys Thr Val Thr Glu Gln Asp Leu
 145 150 155 160
 Gly Gly Gln Ala Ile Lys Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Cys Met
 165 170 175
 [0006] Met Val Ala Val Asp Ser Asn Asn Ile Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala
 180 185 190
 Asn Ser Met Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp Lys Pro Thr Ile Ala
 195 200 205
 Ser Pro Tyr Arg Tyr Tyr Phe Cys Val Asp Arg Asp Leu Ser Val Thr
 210 215 220
 Tyr Glu Asn Gln Glu Gly Thr Val Glu His Asn Val Met Gly Thr Pro
 225 230 235 240
 Lys Gly Met Asn Ser Gln Phe Phe Thr Ile Glu Asn Thr Gln Gln Ile
 245 250 255
 Thr Leu Leu Arg Thr Gly Asp Glu Phe Ala Thr Gly Thr Tyr Phe
 260 265 270
 Asp Thr Asn Ser Val Lys Leu Thr His Thr Trp Gln Thr Asn Arg Gln
 275 280 285
 Leu Gly Gln Pro Pro Leu Leu Ser Thr Phe Pro Glu Ala Asp Thr Asp
 290 295 300
 Ala Gly Thr Leu Thr Ala Gln Gly Ser Arg His Gly Thr Thr Gln Met
 305 310 315 320
 Gly Val Asn Trp Val Ser Glu Ala Ile Arg Thr Arg Pro Ala Gln Val
 325 330 335
 Gly Phe Cys Gln Pro His Asn Asp Phe Glu Ala Ser Arg Ala Gly Pro
 340 345 350

Phe Ala Ala Pro Lys Val Pro Ala Asp Ile Thr Gln Gly Val Asp Lys			
355	360	365	
Glu Ala Asn Gly Ser Val Arg Tyr Ser Tyr Gly Lys Gln His Gly Glu			
370	375	380	
Asn Trp Ala Ser His Gly Pro Ala Pro Glu Arg Tyr Thr Trp Asp Glu			
385	390	395	400
Thr Ser Phe Gly Ser Gly Arg Asp Thr Lys Asp Gly Phe Ile Gln Ser			
405	410	415	
Ala Pro Leu Val Val Pro Pro Leu Asn Gly Ile Leu Thr Asn Ala			
420	425	430	
Asn Pro Ile Gly Thr Lys Asn Asp Ile His Phe Ser Asn Val Phe Asn			
435	440	445	
Ser Tyr Gly Pro Leu Thr Ala Phe Ser His Pro Ser Pro Val Tyr Pro			
450	455	460	
Gln Gly Gln Ile Trp Asp Lys Glu Leu Asp Leu Glu His Lys Pro Arg			
465	470	475	480
Leu His Ile Thr Ala Pro Phe Val Cys Lys Asn Asn Ala Pro Gly Gln			
485	490	495	
Met Leu Val Arg Leu Gly Pro Asn Leu Thr Asp Gln Tyr Asp Pro Asn			
500	505	510	
Gly Ala Thr Leu Ser Arg Ile Val Thr Tyr Gly Thr Phe Phe Trp Lys			
515	520	525	
[0007] Gly Lys Leu Thr Met Arg Ala Lys Leu Arg Ala Asn Thr Thr Trp Asn			
530	535	540	
Pro Val Tyr Gln Val Ser Ala Glu Asp Asn Gly Asn Ser Tyr Met Ser			
545	550	555	560
Val Thr Lys Trp Leu Pro Thr Ala Thr Gly Asn Met Gln Ser Val Pro			
565	570	575	
Leu Ile Thr Arg Pro Val Ala Arg Asn Thr Tyr			
580	585		
<210> 8			
<211> 1794			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 由鼠微小病毒修饰			
<400> 8			
atgggatgga gccaccccca gttcgagaag ggatctgatg gcacttcaca accggattct			60
ggaaacgcgt ttcactcgcc tgcttagggtg gaaaggcgt ctgatggacc tggcggtatcc			120
ggtgaggag gttctgggttgg aggtggagtc ggagtttcca ctgggttctta cgacaaccag			180
acacactacc gttccctggg cgatggatgg gtcgagatca ccgcctctgc cactcgcttg			240
gttcacctga acatgcctaa gtcggaaaac tactgcccgtta tccgcgttca caacaccact			300
gacaccccttg tgaagggttaa catggcttaag gacgatgccc acgagcaa at ctggactct			360
tggagcttgg tggacgcctaa cgcctggggc gtttggctgc agccatcaga ttggcaatac			420

atctgttaaca ccatgtcgca gctcaacttg gtcctccctgg accaagaaat cttcaacgtg	480
gtcctcaaga ccgtgactga acaggacttg ggaggtaag ctatcaagat ttacaacaac	540
gacccacccg ctggcatgtat ggtggccgtc gattctaaca acatcttgcctt acacacccca	600
gctgccaaca gcatggagac tctgggttac taccctgtggaa agccacccat cgcctcaccc	660
taccgttact acttctgttgat tgaccgcgtat cttacggatccat cctacgagaa ccaggaaggc	720
actgtggaaac acaacgtcat gggcacccca aaggaaatga actcccaattt cttcacaatc	780
gagaacaccc agcaaatcac tctgttcagg acaggcgacg agttcgatc aggaacccat	840
tacttcgata ctaacacgtgtat gaagtcactt cacatgc agacaaacag acagttgggt	900
caacccctt tgcgtcaac attccctgag gctgacacccg atgcggcgcac cctgactgt	960
cagggttcca ggcacggcac aacccaaatg ggatctactt ggggtctga ggctatcagg	1020
accagacccgg cccaaatgtggg attctgccaac ccccaacaacg acttcgaggtt ttcgggtgt	1080
ggtcatttcg ctgtcccaa ggtcccgatc gacatcactc agggatgtga taaggaggcc	1140
aacgggttcag tgcgtactc gtacggaaag caacacggtg aaaactgggc tagccacggc	1200
cctgctccag agaggtacac ctgggacgaa actagttcg gttcaggcag agacaccaag	1260
gatggattca tccagtcgc tccgtgggtt gtgcacccgc ccctgaacgg tattctcaca	1320
aacgccaacc ctatcgacac caagaacgac atccacttca gcaacgttta caactcatac	1380
ggtccactga ccgttttcgc acacccatcc ccagtgttacc cacagggaca aatctgggac	1440
aaggagctgg atctcgaaaca caagcctcgc ctccacatca ctgtccatt cgtctgttaag	1500
aacaacgttc caggacagat gctcgtgagg ttgggaccta acctgacaga ccaatacgt	1560
ccaaacggcg ctacccttc cagaatcgatc acttacggta cattttctg gaaggggcaag	1620
ttgaccatgc gtgctaagct ggcggccaaactacatggaa acccagtcta ccagggttcc	1680
gccgaggaca acggaaactc ttacatgagc gtgactaagt ggctccac agctaccgg	1740
[0008] aacatgcaat ctgtggcgat gatcaacttgg cccgtcgccca gaaacacata ctaa	1794

<210> 9

<211> 597

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 由鼠微小病毒修饰

<400> 9

Met Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ser Asp Gly Thr Ser

1 5 10 15

Gln Pro Asp Ser Gly Asn Ala Val His Ser Ala Ala Arg Val Glu Arg

20 25 30

Ala Ala Asp Gly Pro Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly

35 40 45

Gly Val Gly Val Ser Thr Gly Ser Tyr Asp Asn Gln Thr His Tyr Arg

50 55 60

Phe Leu Gly Asp Gly Trp Val Glu Ile Thr Ala Leu Ala Thr Arg Leu

65 70 75 80

Val His Leu Asn Met Pro Lys Ser Glu Asn Tyr Cys Arg Ile Arg Val

	85	90	95
His Asn Thr Thr Asp Thr Ser Val Lys Gly Asn Met Ala Lys Asp Asp			
100	105	110	
Ala His Glu Gln Ile Trp Thr Pro Trp Ser Leu Val Asp Ala Asn Ala			
115	120	125	
Trp Gly Val Trp Leu Gln Pro Ser Asp Trp Gln Tyr Ile Cys Asn Thr			
130	135	140	
Met Ser Gln Leu Asn Leu Val Ser Leu Asp Gln Glu Ile Phe Asn Val			
145	150	155	160
Val Leu Lys Thr Val Thr Glu Gln Asp Leu Gly Gly Gln Ala Ile Lys			
165	170	175	
Ile Tyr Asn Asn Asp Leu Thr Ala Cys Met Met Val Ala Val Asp Ser			
180	185	190	
Asn Asn Ile Leu Pro Tyr Thr Pro Ala Ala Asn Ser Met Glu Thr Leu			
195	200	205	
Gly Phe Tyr Pro Trp Lys Pro Thr Ile Ala Ser Pro Tyr Arg Tyr Tyr			
210	215	220	
Phe Cys Val Asp Arg Asp Leu Ser Val Thr Tyr Glu Asn Gln Glu Gly			
225	230	235	240
Thr Val Glu His Asn Val Met Gly Thr Pro Lys Gly Met Asn Ser Gln			
245	250	255	
Phe Phe Thr Ile Glu Asn Thr Gln Gln Ile Thr Leu Leu Arg Thr Gly			
[0009]	260	265	270
Asp Glu Phe Ala Thr Gly Thr Tyr Tyr Phe Asp Thr Asn Ser Val Lys			
275	280	285	
Leu Thr His Thr Trp Gln Thr Asn Arg Gln Leu Gly Gln Pro Pro Leu			
290	295	300	
Leu Ser Thr Phe Pro Glu Ala Asp Thr Asp Ala Gly Thr Leu Thr Ala			
305	310	315	320
Gln Gly Ser Arg His Gly Thr Thr Gln Met Gly Val Asn Trp Val Ser			
325	330	335	
Glu Ala Ile Arg Thr Arg Pro Ala Gln Val Gly Phe Cys Gln Pro His			
340	345	350	
Asn Asp Phe Glu Ala Ser Arg Ala Gly Pro Phe Ala Ala Pro Lys Val			
355	360	365	
Pro Ala Asp Ile Thr Gln Gly Val Asp Lys Glu Ala Asn Gly Ser Val			
370	375	380	
Arg Tyr Ser Tyr Gly Lys Gln His Gly Glu Asn Trp Ala Ser His Gly			
385	390	395	400
Pro Ala Pro Glu Arg Tyr Thr Trp Asp Glu Thr Ser Phe Gly Ser Gly			
405	410	415	
Arg Asp Thr Lys Asp Gly Phe Ile Gln Ser Ala Pro Leu Val Val Pro			
420	425	430	
Pro Pro Leu Asn Gly Ile Leu Thr Asn Ala Asn Pro Ile Gly Thr Lys			
435	440	445	

Asn Asp Ile His Phe Ser Asn Val Phe Asn Ser Tyr Gly Pro Leu Thr
 450 455 460
 Ala Phe Ser His Pro Ser Pro Val Tyr Pro Gln Gly Gln Ile Trp Asp
 465 470 475 480
 Lys Glu Leu Asp Leu Glu His Lys Pro Arg Leu His Ile Thr Ala Pro
 485 490 495
 Phe Val Cys Lys Asn Asn Ala Pro Gly Gln Met Leu Val Arg Leu Gly
 500 505 510
 Pro Asn Leu Thr Asp Gln Tyr Asp Pro Asn Gly Ala Thr Leu Ser Arg
 515 520 525
 Ile Val Thr Tyr Gly Thr Phe Phe Trp Lys Gly Lys Leu Thr Met Arg
 530 535 540
 Ala Lys Leu Arg Ala Asn Thr Thr Trp Asn Pro Val Tyr Gln Val Ser
 545 550 555 560
 Ala Glu Asp Asn Gly Asn Ser Tyr Met Ser Val Thr Lys Trp Leu Pro
 565 570 575
 Thr Ala Thr Gly Asn Met Gln Ser Val Pro Leu Ile Thr Arg Pro Val
 580 585 590
 Ala Arg Asn Thr Tyr
 595

[0010] <210> 10
 <211> 1611
 <212> DNA
 <213> 异嗜性小鼠白血病病毒

<400> 10
 atggcacaga ccgtaaccac tcctttagt ctgaccctag aacactgggg agacgtccag 60
 cgcattgcgt ccaaccagtc cgtggacgta aagaagagac gttgggtcac cttctgcct 120
 gccgagtgcc caacttgcg tgggggtgg cgcgaagatg gtactttaa ttggacatt 180
 atttacagg ttaaatctaa ggtttctct cccggcccc acggacaccc ggatcaggta 240
 ccatacattg tcacctggga ggcacttgcc tatgacccccc ctccgtgggt caaaccgtt 300
 gtctctccaa aaccccccctt cttaccgaca gtcggcgatc tccggccgg tcctctgcg 360
 caaccctccgt cccgatctgc ccttaccct gccccttaccc cctctataaa gtccaaaccc 420
 cctaagcccc aggttctccc tggatcgccc ggacctctca ttgaccttct cacagaggac 480
 ccccccggcgt acggagcaca accttccctt cttggccagag aaaacaatga agaagaggcg 540
 gcccggccaccc cccgagggttc ccccccctt cccatgggtt ctcgactgcg gggaaaggagg 600
 gaccctcccc cagcggactc cacccttcc caggcattcc cactccgcat gggggggagat 660
 ggccagcttc agtattggcc gtttcccttcc tggacttat acaattggaa aaataataac 720
 ctttcccttt ctgaagaccc aggtaaattt acggcccttga ttgagtcgt cctcatcacc 780
 caccagccca cttgggacga ctgtcagcag ttgttagggc ccctgcgtac cggagaagaa 840
 aagcagcggg tgctccataga ggctagaaag gcagtcggg gcaatgtatgg acgccccact 900
 cagttgcctta atgaagtcaa tgctgccttt ccccttgaac gccccgattt ggattacacc 960
 actacagaag gtaggaacca cctagtcctc tatgccttgcgt tgctcttagc gggctccaa 1020
 aacgcggggca gaagccccac caattggcc aaggtaaaag ggataacccca gggaccta 1080

gagtcctccc	cagccctttt	agagagactc	aaggaggcct	atgcaggta	cactccttat	1140
gaccctgagg	acccagggca	agaaaaccaat	gtgtctatgt	cattcatctg	gcagtcgtcc	1200
ccggatatacg	ggcgaaagtt	agagcggta	gaagatttaa	agagcaagac	cttaggagat	1260
ttagtgaggg	aagctgaaaa	gatcttaat	aagcgagaaa	ccccggaaga	aagagaggaa	1320
cgtatcagga	gagaaacaga	ggaaaaagaa	gaacgcccgt	gggcagagga	tgaggcagaga	1380
gagaaagaaa	gggaccgcag	aagacataga	gagatgagca	agctctggc	cactgttagtt	1440
attggtcaga	gacaggatag	acagggggga	gagcggagga	ggccccaact	tgataaggac	1500
caatgcgcct	actgcaaaga	aaagggacac	tggcttaagg	actgccccaa	gaagccacga	1560
gggccccgag	gaccgaggcc	ccagacctcc	ctcctgacct	tagtgacta	g	1611
<210> 11						
<211> 1935						
<212> DNA						
<213> 异嗜性小鼠白血病病毒						
<	4	0	0	>	1	1
atggaaggtt	cagcgttctc	aaaacccctt	aaagataaga	ttaaccctgt	gggcccccta	60
atagttatgg	ggatcttgg	gagggcagga	gcctcggtac	aacgtgacag	ccctcaccag	120
atcttcaatg	ttacttggag	agttaccaac	ctaatgacag	gacaaacacgc	taacgccacc	180
tccctccctgg	ggacgatgac	agacaccttc	cctaaactat	attttgacct	gtgtgattta	240
gtaggagact	actgggatga	cccagaaccc	gatattgggg	atggttggcc	cactcccccgg	300
ggaagaagaa	ggacaagact	gtatgacttc	tatgtttgcc	ccggtcatac	tgtaccaata	360
gggtgtggag	ggccgggaga	gggctactgt	ggcaaatggg	gatgtgagac	cactggacag	420
gcatactgga	agccatcate	atcatggac	ctaatttccc	ttaagcgagg	aaacacccct	480
aaggatcagg	gcccctgtta	tgattccctcg	gtctccagtg	gcgtccaggg	tgccacaccg	540
gggggtcgat	gcaacccctt	ggtcttagaa	ttcactgacg	cgggtagaaaa	ggccagctgg	600
gatgccccca	aagtttgggg	actaagactc	tatcgatcca	cagggccga	cccgtgtacc	660
cgggtctctt	tgacccgcca	ggtctcaat	gtaggacccc	gcgtccccat	tggccctaatt	720
cccgtgatca	ctgaccagct	acccccatcc	caacccgtgc	agatcatgtc	ccccaggcct	780
cctcatectc	ctccttcagg	cacggctctc	atggtacctg	gggcctccccc	gcctctcaat	840
caacctggga	cgggagacag	gctgctaaat	ctggttagaag	gagcctacca	agcaactcaac	900
ctcaccagtc	ctgacaaaac	ccaagagtgc	tggttgtgtc	tggtatcggg	accccccctac	960
taogaagggg	ttgcgtctt	aggtacctac	tccaaaccata	cctctggccc	agctaactgc	1020
tccgtggcct	cccaacacaa	gctgaccctg	tccgaagtaa	ccggacagagg	actctgcgt	1080
ggagcagttc	ccaaaaccca	tcaggccctg	tgtataatcca	cccagaagac	gagcgtacggg	1140
tcctactatc	tggctgtcc	cggcgggacc	atctggcctt	gcaacacccgg	gctcactccc	1200
tgcctatcta	ctactgtact	caacctcacc	accgattact	gtgtcctgtt	tgagctctgg	1260
ccaaaggtaa	cctaccactc	ccctgattat	gtttatggcc	agtttgaaaa	gaaaactaaaa	1320
tataaaagag	agccgggtgtc	attaaactctg	gccctgtgt	tgggaggact	tactatggc	1380
ggcatagctg	caggagtagg	aacaggact	acagccctag	tggccaccaa	acaatccgag	1440
caactccagg	cagccataaca	tacagacctt	ggggccctag	aaaaatcagt	cagtccctaa	1500
aaaaagtctc	tgacctcggtt	gtctgagggt	gtcctacaga	accggagagg	attagatctg	1560
ctgttcccaa	aagaaggagg	attatgtgt	gcctaaaag	aagaatgcgt	tttctacgcg	1620
gaccacactg	gcgttagtaag	ggatagcatg	gctaagctaa	gagagagact	aaaccagaga	1680
aaaaaattgt	tcaaatcagg	acaagggtgg	tttggggac	tgtttaacag	gtccccatgg	1740

[0012]	ttcacgaccc tgcataccac cattatggc cctctgatag tactttatt aatcctactc ctcggaccct gcattctcaa ccgcgtggc cagttgtaa aagacagaat ttcagtagta caggccctga ttctgaccca acagtatcac caactcaa at caatagaacc agaagaagta gaatcgcgtg aataa	1800 1860 1920 1935
--------	--	------------------------------

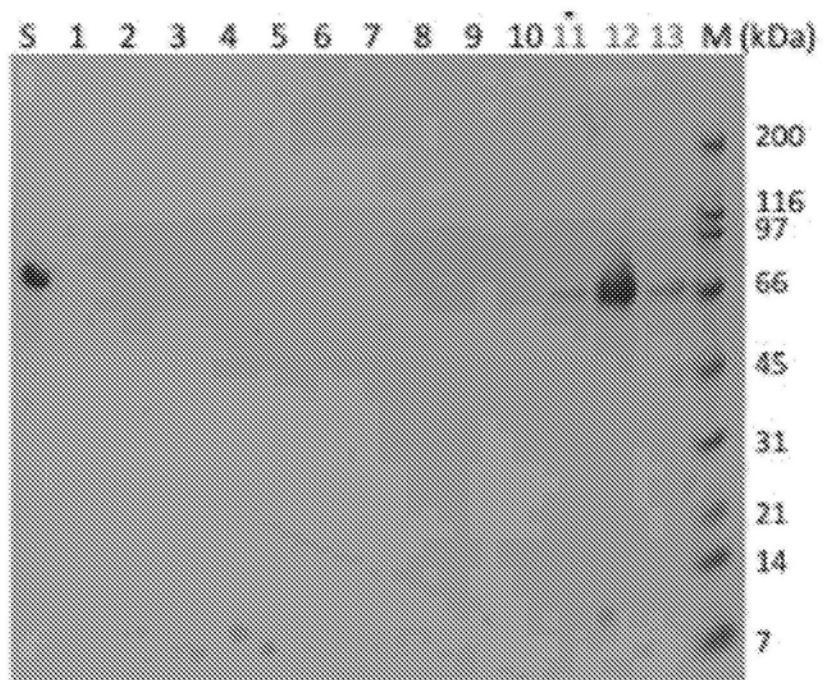


图1

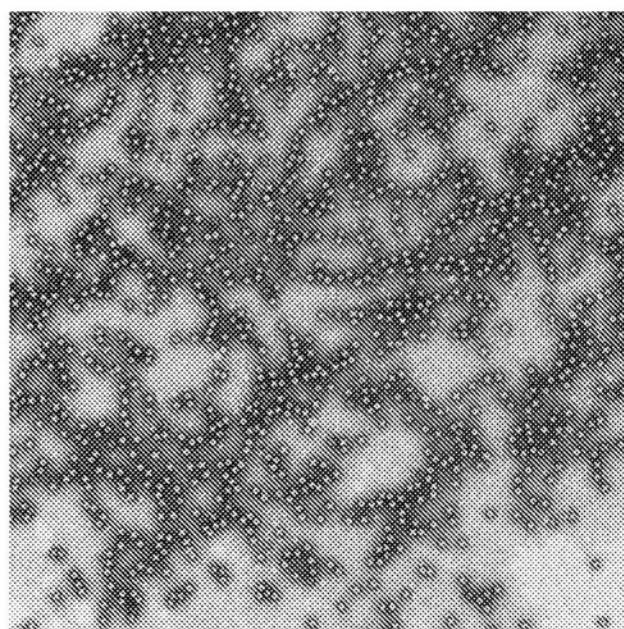


图2

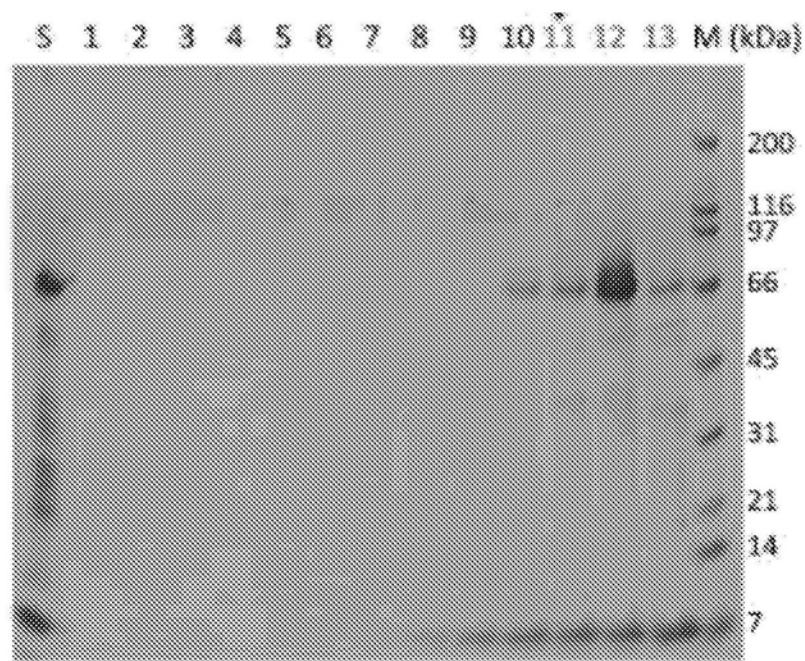


图3

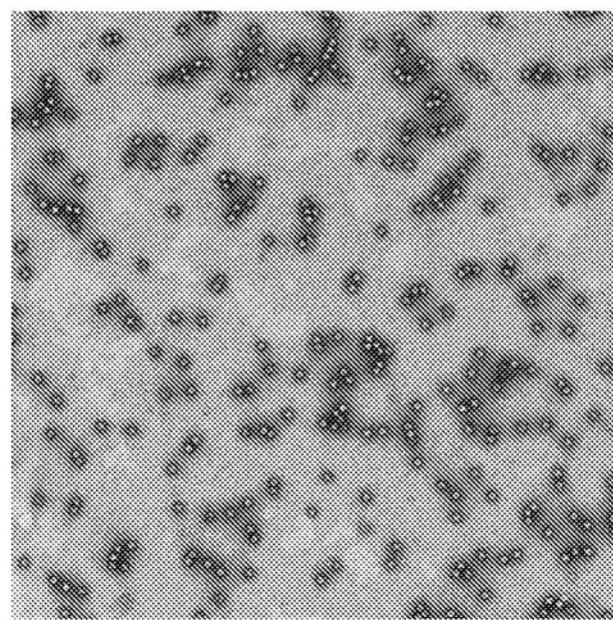


图4