

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 3 月 27 日 (27.03.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/044067 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 7/04 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/077736
- (22) 国际申请日: 2013 年 6 月 24 日 (24.06.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210350365.8 2012 年 9 月 20 日 (20.09.2012) CN
- (71) 申请人: 厦门大学 (XIAMEN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 厦门万泰沧海生物技术有限公司 (XIAMEN INNOVAX BIOTECH CO., LTD.)
[CN/CN]; 中国福建省厦门市海沧区新园路 130 号, Fujian 361022 (CN)。
- (72) 发明人: 葛胜祥 (GE, Shengxiang); 中国福建省厦门市翔安区翔安南路厦门大学翔安校区科研平台大楼, Fujian 361102 (CN)。 李廷栋 (LI, Tingdong); 中国福建省厦门市翔安区翔安南路厦门大学翔安校区科研平台大楼, Fujian 361102 (CN)。 郭清顺 (GUO, Qingshun); 中国福建省厦门市翔安区翔安南路厦门大学翔安校区科研平台大楼, Fujian 361102 (CN)。 徐飞海 (XU, Feihai); 中国福建省厦门市海沧区新园路 130 号, Fujian 361022 (CN)。 张军 (ZHANG, Jun); 中国福建省厦门市翔安区翔安南路厦门大学翔安校区科研平台大楼, Fujian 361102 (CN)。 夏宁邵 (XIA, Ningshao); 中国福建省厦门市

市翔安区翔安南路厦门大学翔安校区科研平台大楼, Fujian 361102 (CN)。

- (74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区阜成门外大街 2 号万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: IN VITRO PREPARATION METHOD OF ROTAVIRUS DOUBLE-LAYER VIRUS-LIKE PARTICLES

(54) 发明名称: 体外制备轮状病毒双层类病毒颗粒的方法

(57) Abstract: The present invention relates to an in vitro preparation method of rotavirus double-layer virus-like particles, comprising: purifying a rotavirus VP6 protein in a cracked supernatant, and performing in vitro assembly of double-layer virus-like particles formed by a VP2 protein and the VP6 protein. The proteins and the virus-like particles can be used to prevent or alleviate clinical symptoms caused by infection of the rotavirus.

(57) 摘要: 本发明涉及轮状病毒双层类病毒颗粒的制备方法, 包括从裂解上清中纯化轮状病毒 VP6 蛋白, 由 VP2 蛋白和 VP6 蛋白构成的双层类病毒颗粒的体外组装, 所述蛋白和类病毒颗粒可用于预防或减轻轮状病毒感染导致的临床症状。



WO 2014/044067 A1

体外制备轮状病毒双层类病毒颗粒的方法

技术领域

本发明涉及生物化学、分子生物学和分子病毒学领域，具体的，本发明涉及轮状病毒的结构蛋白 VP6 蛋白，其制备方法，以及包含其的类病毒颗粒体外组装的方法，所述蛋白及其类病毒颗粒可用于预防或减轻轮状病毒感染所导致的腹泻。

背景技术

轮状病毒(rotavirus, RV)属于呼肠孤病毒科，轮状病毒属，是引起婴幼儿腹泻的主要病原体，1973 年 Bishop 在胃肠炎病人十二指肠发现(Bishop, Davidson et al. 1973)。研究表明，95%以上的儿童在 5 岁前至少感染过一次轮状病毒，据 WHO 统计，每年因轮状病毒感染而导致的死亡高达 60 万，而腹泻病例则高达 2 亿，仅在美国，每年因轮状病毒感染而造成的经济损失就高达 1 亿美元(Hsu, Staat et al. 2005; Tate, Burton et al. 2011)，造成严重的经济负担和社会负担。

轮状病毒为无包膜 RNA 病毒，基因组由 11 条双链 RNA 组成，分别编码 6 种结构蛋白(VP1-VP4, VP6 和 VP7)和 6 种非结构蛋白(NSP1-NSP6) (Estes and Cohen 1989)。轮状病毒为二十面体对称，其衣壳由三个同心层构成，即由 VP1、VP2 和 VP3 构成的核心层，由 VP6 构成的内衣壳，以及由 VP4 和 VP7 构成的外衣壳。其中 VP6 为组特异性抗原，根据其抗原性不同可将轮状病毒分为 A-G 7 个组，其中 A 组轮状病毒是引起婴幼儿腹泻的主要病原体，该蛋白具有较强的免疫原性，尽管不是中和抗原，却能够产生较好的免疫保护效果(Sabara, Frenchick et al. 1994)。VP4 和 VP7 为主要中和抗原，根据二者抗原性的不同可将 A 组轮状病毒分为不同的 P 血清型和 G 血清型，根据二者基因的不同可分为不同的基因型。G 型和 P 型相互独立又相互影响，常见的组合包括 G1P[8]，G2P[4]，G3P[8]和 G4P[8]，近年来，G9P[8]和 G9P[6]的流行显著增加(Li, Liu et al. 2009)。

目前尚无针对轮状病毒的特效药，安全有效的疫苗是控制轮状病毒感染的重要手段。经过多年的研究，历经单价减毒疫苗，多价基因重配疫苗和基因工程疫苗三个阶段，目前已有四种轮状病毒疫苗相继上市，包括惠氏的四价人-猴基因重配疫苗，兰州所的单价减毒疫苗、默克的五价人-牛基因重配疫苗和葛兰素史克的单价减毒疫苗。但这些疫苗均为减毒活疫苗，存在较大的安全隐患，其中惠氏的疫苗由于肠套叠问题上市半年后即被撤回(Murphy, Gargiullo et al. 2001); 默克和葛兰素史克的疫苗尽管经过大量的临床实验证实其安全性和有效性(Bernstein, Sack et al. 1999; Vesikari, Matson et al. 2006; Linhares, Velázquez et al. 2008; Vesikari, Itzler et al. 2009; Snelling, Andrews et al. 2011)，但在亚洲和非洲等轮状病毒死亡率较高的国家和地区的保护效率远低于欧美等发达国家(Armah, Sow et al. 2010; Zaman, Anh et al. 2010; Madhi, Cunliffe et al. 2011)，且越来越多的证据表明，二者接种后均产生排毒并可导致病毒的水平传播(Anderson 2008; Rivera, Pena et al. 2011; Yen, Jakob et al. 2011)，也有研究表明，免疫缺陷儿童接种疫苗后可产生严重胃肠炎(Steele, Cunliffe et al. 2009; Patel, Hertel et al. 2010); 兰州所的疫苗上市十多年，至今尚未发现严重问题，但仅能预防严重腹泻，不能预防轮状病毒的感染(Fu, Wang et al. 2007)。因此，尽管轮状病毒减毒疫苗的研究取得了可喜的结果，但也还存在一定的问题，其安全性和有效性还有待进一步提高，发展更加安全、有效的疫苗势在必行。非复制型疫苗是目前轮状病毒疫苗研究的主要方向，其中基因工程疫苗由于成本低，安全、有效等特点而备受关注。

基因工程疫苗主要指通过基因工程方法表达轮状病毒的抗原，免疫动物或人，从而达到免疫保护的作用。这类疫苗包括核酸疫苗、合成肽疫苗、重组表达抗原疫苗和类病毒颗粒(virus-like particles, VLPs)疫苗。目前类病毒颗粒疫苗的有效性和安全性已在HBV、HEV和HPV疫苗上得到了充分的证实，已经成为世界公认的新一代最具研究价值的候选疫苗。RV-VLPs疫苗的研究始于上世纪八十年代，且

大量的动物实验结果表明，RV-VLP 疫苗具有较好的保护性，并可介导广泛的异型保护。

RV-VLP 指由结构蛋白构成的在形态结构上与天然病毒颗粒相似，且保留了病毒颗粒的天然构象却不含病毒核酸的类病毒颗粒。该颗粒分为两类，即：一类是由 VP2、VP4、VP6、VP7 构成的三层颗粒，或由 VP6 和 VP4、VP7 构成的双层颗粒，可刺激机体产生中和抗体(Crawford, Estes et al. 1999; Jiang, Estes et al. 1999); 另一类是由 VP2 和 VP6 构成的双层颗粒，以及由 VP6 构成的单层颗粒，由于不含中和抗原，因此不能刺激机体产生中和抗体，但由于可以刺激机体产生较强的细胞免疫，因此也具有较好的保护效果(Coste, Sirard et al. 2000; Yuan, Geyer et al. 2000; Nguyen, Iosef et al. 2003)，由于 VP6 变异性相对较小，因此该颗粒可以产生广泛的异型保护。相对第一类颗粒，第二类颗粒由于具有同样的保护效果，但成分较少，大大降低了其工艺难度和成本，因此更受青睐。

VP2/6-VLP 疫苗研制的关键是能够大量高效的制备均一的 VLP 样品。目前常用的是昆虫-杆状病毒表达系统，在该系统中共表达轮状病毒结构蛋白 VP2、VP6 可以自发形成 VLP(Bertolotti-Ciarlet, Ciarlet et al. 2003)，但真核表达系统成本高，周期长，操作复杂，表达量低，并且组装过程中常常非特异性包裹杂蛋白和核酸，难以实现高效、可控的组装(Palomares and Ramírez 2009); 尽管目前也有对轮状病毒类病毒颗粒的体外组装进行了异性的研究，但其得率较低，限制了 RV VLP 疫苗的进一步发展。

而原核表达系统具有成本低，操作简便等优势，但原核表达系统由于缺少特定的翻译后修饰，导致很多蛋白在原核系统表达中形成包涵体。目前，已有研究通过原核系统表达轮状病毒的结构蛋白，包括 VP6、VP4、VP7，但或以包涵体的形式表达，不能有效复性(Zhao, Chen et al. 2011)，或融合表达(Choi, Basu et al. 2000)，尽管融合表达有助于目的蛋白的纯化，但融合蛋白的切除往往需要价格昂贵的酶，不适合大规模生产。

因此，本领域仍然需要具有低成本，能够实现体外高效、可控的组装，可大规模生产的轮状病毒结构蛋白和类病毒颗粒的制备技术。

发明内容

本发明的目的是提供一种新的制备轮状病毒双层类病毒颗粒的方法，该双层颗粒由轮状病毒 VP2 蛋白和 VP6 蛋白组成。

本发明人经研究出人意料地发现，轮状病毒结构蛋白 VP6 在大肠杆菌内能够以可溶形式表达，纯化后的 VP6 以三聚体形式存在，可自组装形成单层类病毒颗粒 6-VLP，也可与病毒样颗粒或非病毒样颗粒状态的 VP2 共组装形成双层类病毒颗粒 2/6-VLP，且 VP6 蛋白及其类病毒颗粒可用于预防或减轻轮状病毒感染引起的临床症状。

因此，本发明涉及 A 组轮状病毒 VP6 蛋白，该蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化；含该蛋白的类病毒颗粒 2/6-VLP 的体外组装；VP6 蛋白及其类病毒颗粒在预防或减轻轮状病毒感染引起的腹泻中的用途。具体如下：

1. 本发明涉及一种从大肠杆菌中纯化轮状病毒 VP6 蛋白的方法，包括该蛋白在大肠杆菌表达系统中的表达和含有该蛋白的裂解上清的纯化。

在一个优选实施方案中，获得 VP6 蛋白的方法包括：

- a) 在大肠杆菌表达系统中表达 VP6 蛋白；
- b) 将表达了 VP6 蛋白的大肠杆菌裂解，分离得到上清液；
- c) 向 b) 上清液中加入 0.05% ~ 0.5% 的聚乙烯亚胺 (PEI) 或其类似物，也可加入 10 ~ 80mM 的金属离子如 MnCl_2 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 CuCl_2 、 AlCl_3 等，沉淀核酸和部分杂蛋白，分离得到上清液；
- d) 向 c) 上清液中加入硫酸铵，经充分沉淀，收集沉淀；
- e) 将 d) 中沉淀在高盐缓冲液中重新溶解，分离得到溶液，其中含纯度至少 85% 的 VP6 蛋白；
- f) 将 e) 中纯度至少 85% 的 VP6 蛋白经色谱层析进一步纯化，可得到纯度大于 98% 的 VP6 蛋白，经鉴定，纯化后的 VP6 蛋白在溶

液中以非颗粒形式存在。

2. 本发明再一方面涉及轮状病毒双层类病毒颗粒 2/6-VLP 的体外组装工艺。

在一个优选实施方案中，2/6-VLP 的体外组装工艺如下：将纯化后的 VP6 蛋白与非颗粒状态的 VP2 蛋白混合，并将缓冲液更换至组装缓冲液，主要包括以下方面：

a) 组装缓冲液的 pH 介于 3.0 ~ 7.0，优选 pH4.0 ~ 6.4，最优选 pH6.4；

b) 组装缓冲液中含 0-2M 盐，优选 NaCl，更优选 150mM ~ 1M NaCl，最优选 300mM NaCl；

c) VP2 蛋白和 VP6 蛋白的质量比介于 1: 1 ~ 1: 10，优选 1: 2 ~ 1: 3，最优选 1: 2.6；

3. 本发明再一方面涉及 VP6、6-VLP 和 2/6-VLP 在预防或减轻轮状病毒感染引起的腹泻中的用途。免疫途径包括但不限于皮下免疫和肌肉注射，佐剂包括但不限于铝佐剂和弗氏佐剂。

本发明中相关术语的说明及解释

根据本发明，术语“大肠杆菌表达系统”是指由大肠杆菌(菌株)与载体组成，其中大肠杆菌(菌株)来源于市场上可得到的，在此举例但不限于：ER2566, BL21(DE3), TG1, DH5 α 及 JM109。

根据本发明，术语“载体”一词指的是，可将某编码蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可以通过转化，转导或者转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。举例来说，载体包括：质粒；噬菌体；柯斯质粒等等。

根据本发明，术语“色谱层析”包括但不限于：离子交换色谱（例如阳离子交换色谱）、疏水相互作用色谱、吸附层析法（例如羟基磷灰石色谱）、凝胶过滤（凝胶排阻）层析以及亲和层析色谱。

根据本发明，在本发明获得 VP2 和 VP6 蛋白的方法中，缓冲液是指可在一定范围内维持 pH 值稳定的溶液，包括但不限于，Tris-HCl

缓冲液，磷酸盐缓冲液，HEPES 缓冲液，MOPS 缓冲液等等。

根据本发明，所述原核宿主细胞破碎包括但不限于通过匀浆器破碎、均质机破碎、超声波处理、研磨、高压匀浆、溶菌酶处理中的一项或者多项方法来实现；

根据本发明，在本发明获得 VP6 蛋白的方法中，所用的盐包括但不限于中性盐，特别是碱金属盐、铵盐、盐酸盐、硫酸盐，碳酸氢盐，磷酸盐或磷酸氢盐，特别是 NaCl、KCl、NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄ 中的一种或几种，优选 NaCl。

根据本发明，在本发明获得 VP6 蛋白的方法中，所用聚乙烯亚胺及其类似物是指表面带正电荷的聚合物，包括但不限于直链聚乙烯亚胺、支链聚乙烯亚胺及其衍生物，其分子量介于 1300 ~ 750000，优选分子量 750000 的聚乙烯亚胺。

根据本发明，在本发明获得 VP6 蛋白的方法中，所用二价和三价金属离子包括但不限于 Ca²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺和 Al³⁺等，优选 Ca²⁺和 Mn²⁺，最优选 Ca²⁺。

根据本发明，获得类病毒颗粒 2/6-VLP 的方法中，缓冲液是指能在一定范围内维持弱酸性 pH (pH3.0 ~ 7.0) 稳定的溶液，包括但不限于，磷酸盐缓冲液，MES 缓冲液，柠檬酸盐缓冲液等等。

发明的有益效果

目前轮状病毒 VLP 制备均采用真核表达系统，应用最多的是昆虫-杆状病毒表达系统。

在真核表达系统中表达的 VP2、VP6 蛋白构象更接近天然蛋白，能够在体内自发形成 VLP，但是真核表达系统表达周期长，操作复杂，表达量低，组装过程中常常非特异性包裹杂蛋白和核酸，特别是多蛋白共表达过程中会形成不同类型的病毒样颗粒，后期纯化困难，难以实现高效、可控的组装，再加上高昂的成本，给大规模工业化生产带来了极大困难。

而原核表达系统特别是大肠杆菌表达系统具有成本低，周期短，

表达量大的优势，是重组蛋白最常用、最成熟的表达系统。但在大肠杆菌表达系统中表达的轮状病毒衣壳蛋白往往不能形成正确构象，以包涵体形式表达，而包涵体复性难度大、效率低，难以用于大规模生产。融合表达可实现 VP6 的可溶性表达，但融合蛋白的切割往往需要价格昂贵的酶，无法应用于大规模生产。

本发明在大肠杆菌表达系统中表达了 A 组轮状病毒内衣壳蛋白 VP6，经过 PEI 或金属离子沉淀预处理可去除大部分的核酸和部分杂蛋白，而 VP6 蛋白仍以可溶形式保留于上清中，进一步通过盐析和色谱层析纯化，可获得纯度高于 95% 的 VP6 蛋白；经分析，该蛋白在溶液中以三聚体的形式存在，保持了 VP6 蛋白的正确构象。该工艺操作简便，成本低廉，得率较高，可应用于大规模工业化生产。通过以上步骤获得纯化后的 VP6 蛋白可以自组装为单层颗粒 6-VLP，也可与颗粒或非颗粒状态的 VP2 共组装形成双层颗粒 2/6-VLP，其工艺简单、可控且组装效率高于 95%，显著高于真核表达自组装的效率；经小鼠实验证实，原核表达的 VP6 蛋白及其类病毒颗粒具有较高的免疫原性和较好的保护性，具有成为轮状病毒候选疫苗的潜力。

由此可见，本发明具有以下优点：本发明的制备方法既不需要真核表达的高昂成本，复杂工艺，也不需要昂贵的酶，操作简便，成本低廉；纯化工艺中没有经过剧烈的变性、复性，保留了 VP6 蛋白的正确构象，该蛋白可自组装形成 6-VLP 或与 VP2 共组装形成 2/6-VLP，具有较好的免疫原性，且在小鼠实验中表现出较好的免疫保护性；本发明的 VP6 蛋白和类病毒颗粒的制备方法可用于大规模的工业化生产；本发明的 VP6 蛋白及其类病毒颗粒可用于预防轮状病毒感染引起的腹泻。

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将理解，下列附图和实施例仅用于说明本发明，而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述，本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

附图说明

图 1 显示了实施例 1 中不同纯化阶段的 VP6 蛋白经 10%SDS-PAGE 分离的结果。图 1A 显示了 PEI 沉淀的结果, 1: 裂解上清, 2~9: 不同 PEI 浓度条件下 40%硫酸铵沉淀的结果, 2: 无 PEI, 3: 0.05% PEI; 4: 0.08% PEI; 5: 0.1% PEI; 6: 0.15% PEI; 7: 0.2% PEI, 8: 0.3% PEI; 9: 0.5% PEI; 图 1B 显示了金属离子沉淀+40% 硫酸铵沉淀的结果, 1: 20mM $MnCl_2$, 2: 10mM $CaCl_2$, 3: 20mM $CaCl_2$, 4: 50mM $CaCl_2$, 5: 100mM $CaCl_2$; 其中以 20mM $CaCl_2$ 条件下的纯度最高; 图 1C 显示了 20mM $CaCl_2$ 沉淀→25%硫酸铵沉淀→Phenyl-HP 纯化的结果, 1: 菌体裂解上清; 2: $CaCl_2$ 沉淀后上清; 3: 硫酸铵沉淀后溶解上清; 4: Phenyl-HP 2M NaCl 洗脱组分。结果显示, 通过二价离子沉淀、硫酸铵沉淀粗纯后, VP6 的纯度由 10% 左右提高到 85%左右, 进一步通过疏水层析纯化后其纯度达到 98%以上。

图 2 显示了实施例 2 中不同纯化阶段 VP2 蛋白经 10%SDS-PAGE 分离的结果。1: 菌体裂解上清; 2: PEI 沉淀上清; 3: 硫酸铵沉淀后溶解上清; 4: SP FF 500mM NaCl 洗脱组分。结果显示, 通过 PEI 沉淀、硫酸铵沉淀粗纯后, VP2 纯度从 5%左右, 提高到了约 80%左右, 进一步通过阳离子交换色谱纯化后其纯度达到 95%左右。

图 3 显示了纯化后的 VP2 蛋白和 VP6 蛋白经 SDS-PAGE、分子筛层析和分析超离鉴定的结果。其中图 A 显示了 SDS-PAGE 鉴定的结果, 1 为分子量 Marker; 2-5 为纯化后的 VP2 蛋白, 6-9 为纯化后的 VP6 蛋白, 其中 2&5 为上样缓冲液含巯基乙醇, 100℃水浴 10min 的结果, 3&6 为上样缓冲液含巯基乙醇, 未经热处理的结果, 4&8 为上样缓冲液中不含巯基乙醇, 100℃水浴 10min 的结果; 5&9 为上样缓冲液中不含巯基乙醇, 无热处理的结果。可见, VP2 蛋白和 VP6 蛋白的纯度均达到 95%以上, VP2 蛋白以单体形式存在, 可能 SDS 破坏了 VP2 单体间的相互作用, 而 VP6 以聚体形式存在。图 B 显示了纯化后的 VP2 蛋白和 VP6 蛋白经 Sepherdex200 分子筛层析鉴定的结

果, VP2 蛋白和 VP6 蛋白的保留时间分别为 27.34min 和 33.91min。图 3C 显示了 VP2 蛋白经分析超离鉴定的结果, 其分子量为 204.4 ± 5.6 KD, 接近二聚体的分子量。图 3D 显示了 VP6 蛋白经分析超离鉴定的结果, 其分子量为 114.9 ± 1.6 KD, 接近三聚体的分子量。

图 4 显示了实施例 4 中 RV 类病毒颗粒 2-VLP 的透射电镜结果, 视野中可见大量直径 50-60nm 的类病毒颗粒, 与理论值相符。

图 5 显示了实施例 5 中所得类病毒颗粒 6-VLP 鉴定的结果。A 为透射电镜观察结果, 可见大量直径 70nm 左右的颗粒, 结构较为松散; B 为动态光散射的结果, 6-VLP 的水花分子动力学半径为 40.36nm, 颗粒组装百分比为 100%; C 为 G5000PWL 分子筛层析的结果, 6-VLP 的保留时间为 10.551min, 颗粒组装效率高于 95%。

图 6 显示了实施例 5 中通过两步法组装的类病毒颗粒 2/6-VLP 鉴定的结果。A 为分析型超速离心的结果; B 为 pH6.0 条件下透射电镜观察的结果, 可见直径 60nm 左右的类病毒颗粒。

图 7 显示了实施例 5 中不同缓冲体系下 2/6-VLP 鉴定的结果。A: 50MM MES6.0, 可见大量直径 70nm 左右的单层颗粒; B: 50MM MES6.0+150mM NaCl, 可见直径 70nm 左右的单层颗粒和 60nm 左右的双层颗粒; C: 50MM MES6.0+300mM NaCl, 可见直径 60nm 左右的双层颗粒, 大小均一; D: 50MM MES6.0+500mM NaCl, 可见直径 60nm 左右的双层颗粒, 大小均一; E: PB5.8+300mM NaCl, 可见直径 60nm 左右的双层颗粒; F: PB6.0+300mM NaCl, 可见直径 60nm 左右的双层颗粒; G: PB6.4+300mM NaCl 可见直径 60nm 左右的双层颗粒, 大小均一; H: 6-VLP 对照, 可见直径 70nm 左右的单层颗粒。

图 8 显示了实施例 5 中 VP2 和 VP6 不同比例下 2/6-VLP 鉴定的结果。A 为透射电镜观察的结果, 在 VP2 和 VP6 的质量比介于 1: 2-1: 6 的条件下, 视野中均为直径 60nm 左右的双层颗粒 2/6-VLP, 而在 VP2 与 VP6 的质量比为 1: 10 的条件下, 视野中则既有直径 60nm 左右的 2/6-VLP, 也有直径 70nm 左右的 6-VLP; B 和 C 为实施例 4 中

通过两步法组装的 2/6-VLP 分析超离的结果,其沉降系数在 251-264S, VP2 和 VP6 的最佳质量比为 1: 2.6。

图 9 显示了实施例 5 中最佳条件下 2/6-VLP 鉴定的结果。A 为透射电镜观察的结果,可见大量直径 60nm 左右的类病毒颗粒,为双层结构,大小和形态与理论相符,均匀一致; B 为动态光散射的结果,其水化分子动力学半径为 34.27nm,颗粒组装百分比为 100%; C 为 G5000PWXL 分子筛层析的结果, 2/6-VLP 的保留时间为 10.821min, 组装效率高于 95%。

图 10 显示了实施例 1 中的 VP6 蛋白, 实施例 5 中的 6-VLP 和 2/6-VLP 以及 MA104 细胞培养的 A 组轮状病毒免疫后小鼠血清中 VP6 抗体的滴度, 与培养病毒相比, VP6, 6-VLP 以及 2/6-VLP 均具有较高的免疫原性。

图 11 显示了实施例 1 中的 VP6 蛋白, 实施例 5 中的 6-VLP 和 2/6-VLP 以及 MA104 细胞培养的 A 组轮状病毒 10ug 剂量下经肌肉注射免疫三次后母鼠和乳鼠血清中针对 VP6 的抗体滴度,其中 A 为不同免疫组母鼠血清抗体滴度, B 为不同免疫组乳鼠血清抗体滴度。

图 12 显示了实施例 1 中的 VP6 蛋白, 实施例 5 中的 6-VLP 和 2/6-VLP 以及 MA104 细胞培养的 A 组轮状病毒母传抗体对乳鼠感染轮状病毒后发生腹泻的情况。

图 13 显示了实施例 1 中的 VP6 蛋白, 实施例 5 中的 6-VLP 和 2/6-VLP 以及 MA104 细胞培养的 A 组轮状病毒母传抗体对乳鼠感染轮状病毒后排毒的影响及保护效果,其中 A 为不同免疫组小肠内容物通过 ELISA 检测的病毒滴度的情况, B 为不同免疫组与对照组相比排毒量降低的比例。

序列信息

本发明涉及的序列的信息提供于下面的表 1 中

表 1: 引物列表

引物名称	引物序列
VP6-DF	GCTTTWAAACGAAGTCTTC

VP6-DR GGTACATCCTCTCACTA

VP6-1F GGATCCCAT ATGGATGTCCTTTATTCTT

VP6-397R AAGCTT TCATTTAATAAGCATGCT

下面结合实施例对本发明进一步举例描述。这些实施例是非限制性的。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市购获得的常规产品。

实施例 1: VP6 在大肠杆菌中的表达和纯化

用作模板的 VP6 基因的制备

轮状病毒毒株(北京万泰生物药业有限公司)，通过 Trizol 试剂提取其基因组 RNA，以 VP6-DR 为引物，用 MMLV 反转录酶进行反转录，按照如下体系 55℃反转录 30min，得到 VP6 cDNA。

RNA 模板	dNTP	VP6-DR	ddH2O	5×buffer	MML	RNAsin
5ul	1ul	0.6ul	8.2ul	4ul	1ul	0.2ul

以上一步所得 cDNA 为模板，以 VP6-DF 为正向引物，以 VP6-DR 为反向引物，在 PCR 热循环仪 (Biometra, T3) 中按照如下条件进行 PCR 反应，扩增 VP6 的基因。

94℃变性 5min	1 个循环
94℃变性 30s	
56℃退火 30s	35 个循环
72℃延伸 90s	
72℃延伸 10min	1 个循环

扩增得到大小特异的 1.3kb 左右的 PCR 产物，通过胶回收试剂盒

回收后与商售载体 PMD18-T (takara) 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α ; 提取质粒, 通过 PstI/EcoR I 酶切鉴定, 得到含 VP6 基因的阳性克隆 PMD18-T-VP6F。

通过 M13F 和 M13R 引物(上海博亚生物工程有限公司)进行测序, 结果表明, 该基因与 A 组轮状病毒基因的同源性高于 90%。

表达 VP6 蛋白的非融合表达载体的构建

以前一步骤所得 PMD18-T-VP6F 为模板, 以 VP6-1F 为正向引物, 其 5'端引入 BamH I/Nde I 酶切位点, 以 VP6-397R 为反向引物, 其 5'端引入 Hind III 酶切位点, 在 PCR 热循环仪 (Biometra T3) 中按照如下条件进行 PCR 反应。

94℃变性 5min	1 个循环
94℃变性 30s	15 个循环
56℃退火 30s	
72℃延伸 90s	
72℃延伸 10min	1 个循环

扩增得到 1.2kb 左右的大小特异的 DNA 片段, 将该片段与 PMD18-T 载体连接, 转入大肠杆菌 DH5 α ; 提取质粒, 通过 NdeI/Hind III 酶切鉴定, 得到插入目的基因 VP6 的阳性克隆 PMD18-T-VP6。

利用 M13F 和 M13R 引物(上海博亚生物工程有限公司)进行测序, 测得 PMD18-T-VP6 中插入的目的片段的核苷酸序列与 PMD18-T-VP6F 中插入序列的同源性为 100%。

将上述的 PMD18-T-VP6 质粒通过 Nde I/Hind III 进行酶切, 获得 VP6 的基因片段。将该片段与 Nde I/Hind III 酶切的商售载体 Pet30a(Novagen)连接, 转化大肠杆菌 DH5 α ; 提取质粒, 通过 NdeI/Hind III 酶切鉴定, 获得插入 VP6 基因的质粒 P-VP6。

VP6 蛋白在大肠杆菌中的表达

取 1 μ L P-VP6 质粒, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3); 挑取单菌落至 4mL 卡那霉素抗性的 LB 培养基 37℃振荡培养, 至 OD600 0.6 左右, 从中取 0.5ml 菌液加入终浓度为 10%的甘油于 -20℃或-80℃保存, 剩

余菌体加入 IPTG 至 0.8mM, 37℃继续培养 2-4h 后收集 1.5mL 菌体, 加入 100uL ddH₂O 重悬菌体, 加入 20uL 6×Loading Buffer 混匀, 100℃水浴 10min, 通过 10%的 SDS-PAGE 鉴定, 可见清晰的大小约 45KD 的蛋白条带。

从 -80℃冰箱取出上一步骤获得的携带重组质粒 P-VP6 的甘油菌, 化冻后取 5uL 接入卡那霉素抗性的 50mL LB 培养基中。200rpm、37℃培养过夜, 作为种子液。将种子液按照 1: 1000 的比例接入 15 瓶 500mL 自动诱导培养基 (每升含 10g 蛋白胨, 5g 酵母粉, 10g 氯化钠, 0.5g 葡萄糖, 5mL 甘油和 5g α-乳糖, 通过氢氧化钠溶液调节 pH 至中性), 180rpm、37℃摇瓶培养至 OD₆₀₀ 约 0.6 时, 调低温度至 20℃, 20h 后离心收集菌体, 获得可以表达 VP6 蛋白的菌体约 30g。纯度约 85%的 VP6 蛋白的制备

按 1g 菌体对应 15mL 裂解液的比例重悬菌体, 在冰水浴条件下通过超声破碎菌体, 4min 每 g 菌体, 隔 2s 暂停 4s; 使用 JA-14 转头以 13000rpm/min 离心菌体破碎液 15min, 留取上清, 通过 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 此时上清中 VP6 的纯度约为 10%。(如图 1, 泳道 1)。

将裂解上清分装成 1ml 每管, 向其中加入 0.05%~0.5%的聚乙烯亚胺 (PEI) 或 10~100mM 的 MnCl₂, MgCl₂ 或 CaCl₂, 混匀, 30min 后离心, 取上清, 并加入饱和硫酸铵至 40%, 混匀, 静置 0.5~2h, 离心, 弃上清, 将沉淀以 1/5 体积的缓冲液重新溶解, 通过 10%的 SDS-PAGE 检测可知, PEI 或金属离子沉淀可去除大量的核酸和杂蛋白, 经硫酸铵沉淀后进一步纯化和浓缩, VP6 蛋白的纯度得到较大程度的提高, 其中以 20mM CaCl₂ 条件最佳 (如图 1B, 泳道 2);

在冰水浴条件下向离心后的菌体破碎液中边搅拌边加入 2M 的氯化钙溶液至终浓度为 20mM, 30min 后, 通过 JA-14 转头 13000rpm/min 离心 15min, 留取上清; 在冰水浴中, 边搅拌边加入固体硫酸铵至 25% 饱和度, 继续冰水浴 1-2h, 通过 JA-14 转头 13000rpm/min 离心 15mi, 留取沉淀并以 1/10 体积的 50mM Tris-HCl 缓冲液 pH7.0+3M NaCl 重

悬沉淀，JA-14 转头，13000rpm/min 离心 15min，取上清。通过 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测可知，CaCl₂ 沉淀可除去大量的核酸和杂蛋白，经硫酸铵沉淀后进一步纯化和浓缩，VP6 的纯度由 10%提高至 85%左右（如图 1，泳道 2 和 3）。

VP6 蛋白的色谱纯化

疏水相互作用色谱

仪器系统：GE Healthcare（原 Amersham Pharmacia 公司）生产的 AKTA Purifier UPC-100 型制备型液相色谱系统。

层析介质：Phenyl Sepharose 6B High Performance（GE Healthcare 公司）。

柱体积：5.5cm×20cm。

缓冲液：50mM Tris-HCl, pH7.0,

50mM Tris-HCl, pH7.0+4M NaCl。

流速：8mL/min。

检测器波长：280nm。

样品为实施例 1 中获得的经 0.22μm 滤膜过滤的，纯度约 85%的 VP6 蛋白溶液。

洗脱程序为：2M NaCl 洗脱目的蛋白，50mM Tris-HCl, pH7.0 洗脱杂蛋白，收集 2M NaCl 洗脱产物，经 10%SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色鉴定，纯度约 98%（如图 1，泳道 4）；同时通过 DU800 测定蛋白的浓度和核酸含量，结果如下：OD₂₈₀ 为 1.124, OD₂₆₀ 为 0.638, OD₃₂₀ 为 0.006，通过公式计算蛋白浓度为 1.6mg/mL，核酸含量 <0.25%，得率高于 50%。

实施例 2：VP2 蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

P-VP2 质粒为本中心构建（厦门大学，李廷栋，轮状病毒结构蛋白在大肠杆菌中的表达及其类病毒颗粒的体外组装，2009），表达菌株为 BL21（DE3）。将 P-VP2 质粒转化 BL21(DE3)，挑取单克隆至卡那霉素抗性的 LB 培养基，37℃培养至 OD₆₀₀ 0.6 左右，取 0.5mL 菌

液，加入甘油至终浓度为 10%，-80℃保存。从-80℃冰箱取出携带 P-VP2 质粒的甘油菌，化冻后接种于 50mL 卡那霉素抗性的 LB 培养基中，37℃振荡培养过夜，之后接种于 500mL 卡那霉素抗性的 LB 培养基中，培养至 OD600 0.6 左右，将摇床温度调至 25℃，冷却后加入 0.8mM IPTG 进行诱导，继续培养 6h，收集菌体。

以 TB8.0+150mM NaCl+0.5mM EDTA 按照 15mL/g 菌体的比例重悬菌体，通过超声方式进行菌体破碎，离心，收集上清，搅拌条件下加入终浓度为 0.25% 的 PEI，30min 后离心，取上清；在冰水浴条件下加入饱和硫酸铵至终浓度为 30%，搅拌 1-2h，离心，取沉淀，以 1/10 的体积的 50mM Tris-HCl，pH8.0 重悬沉淀，离心，取上清，此时 VP2 的纯度可达 80% 以上（如图 2，泳道 3）。

阳离子交换色谱

仪器系统：GE Healthcare（原 Amershan Pharmacia 公司）生产的 AKTA Purifier UPC-100 型制备型液相色谱系统。

层析介质：SP Sepharose Fast Flow（GE Healthcare 公司）。

柱体积：5.5cm×20cm。

缓冲液：50mM Tris-HCl，pH8.0，

50mM Tris-HCl，pH8.0+2M NaCl。

流速：10mL/min。

检测器波长：280nm。

样品为上一步骤中获得的经 0.22μm 滤膜过滤的，纯度约 80% 的 VP2 蛋白溶液。

洗脱程序为：150mM NaCl 洗脱杂蛋白，500mM NaCl 洗脱 VP2 蛋白，收集 500mM NaCl 洗脱产物，经 10%SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色鉴定，纯度约 95%（如图 2，泳道 4），得率高于 50%。

实施例 3：轮状病毒 VP6 和 VP2 蛋白的鉴定

样品为实施例 1 中获得的纯度高于 98% 的 VP6 蛋白和实施例 2 中获得的纯度高于 95% 的 VP2 蛋白。

SDS-PAGE

样品按照以下 4 种方式分别处理：1)、上样缓冲液有巯基乙醇，100℃水浴 10min；2) 上样缓冲液有巯基乙醇；3) 上样缓冲液无巯基乙醇，100℃水浴 10min；4) 上样缓冲液无巯基乙醇。经 10%的 SDS-PAGE 分离，考马斯亮蓝染色鉴定。由 SDS-PAGE 结果可以看出，纯化后的 VP2 以单体形式或疏水性聚体存在，但构象受二硫键的影响，而 VP6 以聚体的形式存在。

分子筛层析分析

仪器系统：GE Healthcare 公司生产的 AKTA Purifier UPC-100 制备型液相色谱仪

层析柱：Superdex200, 10mm×300mm(GE Healthcare)，柱体积为 24mL

缓冲液：VP2 为 Tris-HCl, pH8.0+500mM NaCl, VP6 为 Tris-HCl, pH7.0+2M NaCl

系统流速：0.5mL/min

检测波长：UV_{280nm}

结果显示，纯化后的 VP2 蛋白和 VP6 蛋白均为单一组分，保留时间分别为 27.34 和 33.91min，均一性较好。

分析超离

仪器为 Beckman XL-A 型分析超速离心机，方法为沉降速率法和沉降平衡法，首先通过沉降速率法分析 VP2 蛋白和 VP6 蛋白的沉降系数，通过 SEDFIT 软件进行 C(S)分析，并初步计算 VP2 蛋白和 VP6 蛋白的分子量。结果显示，VP2 蛋白和 VP6 蛋白可能分别以二聚体和三聚体的形式存在；在此基础上，进一步通过沉降平衡法分析 VP2 蛋白和 VP6 蛋白的精确分子量，通过 Origin 版的 Nonlin 软件和 SEDPHAT 软件进行 SE 分析，结果显示 VP2 蛋白和 VP6 蛋白的分子量分别为 204±5.6KD 和 114.9±1.6KD（图 3C 和图 3D）

天然状态的 VP2 蛋白以二聚体的形式存在，而 VP6 蛋白以三聚体的形式存在，理论分子量分别为 205KD 和 135KD，我们纯化后的

VP2 蛋白经分析超离鉴定分子量为 $204\pm 5.6\text{KD}$ ，与理论分子量相符，但由于 SDS 可以破坏氢键和疏水作用，因此，在 SDS-PAGE 中 VP2 主要体现为单体；而纯化后的 VP6 经分析超离鉴定分子量为 $114.9\pm 1.6\text{KD}$ ，而 SDS-PAGE 中以聚体的形式存在，大小介于 119 和 211 之间，综合 SDS-PAGE 和分析超离的结果，纯化后的 VP6 蛋白以三聚体形式存在。这与分子筛层析中 VP2 蛋白的保留时间小于 VP6 蛋白是一致的。由此可见，原核表达的 VP2 和 VP6 蛋白保留了其天然构象，且整体工艺简便，便于操作，具有真核表达无法比拟的优势。

实施例 4: VP2 类病毒颗粒 2-VLP 的组装

样品为实施例 2 中所得纯度高于 95% 的 VP2 蛋白。

方法：将 VP2 蛋白 4°C 条件下透析至组装缓冲液 50mM TB8.0+0.2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，每隔 12h 更换一次缓冲液，透析 24h 以上，透析结束后，10000rpm 离心 15min，收集沉淀，并以 50mM TB8.0 溶解，10000rpm 离心 15min，收集上清，即为 VP2 组成的单层类病毒颗粒 2-VLP。

实施例 5: 6-VLP 和 2/6-VLP 的组装

样品为实施例 1 中获得的纯度高于 98% 的 VP6 蛋白，实施例 2 中获得的纯度高于 95% 的 VP2 蛋白以及实施例 4 中获得的 2-VLP。

6-VLP 的组装

将 VP6 蛋白透析至表 2 所示组装缓冲液，每隔 12h 更换一次缓冲液，透析 24h 以上，离心，收集上清，即为 6-VLP。

表 2: 6-VLP 在不同缓冲体系中的组装

	pH	NaCl 浓度	结果
1	3.0	0	三聚体
2	3.0	0.5M	聚集
3	3.0	1M	聚集

4	4.0	0	球形颗粒
5	4.0	0.2M	球形颗粒
6	4.35	0	球形颗粒
7	4.35	0.5M	球形颗粒
8	4.35	1M	沉淀
9	5.0	0	球形颗粒
10	6.0	0	球形颗粒
11	6.0	0.5M	球形颗粒
12	6.0	1M	球形颗粒
13	6.4	0.3M	球形颗粒
14	7.0	0	三聚体
15	7.0	0.5M	三聚体
16	7.0	1M	三聚体

2/6-VLP 的组装

方法一：将 2-VLP 与 VP6 蛋白按照 1: 3 的质量比混合，透析至 CN4.0、CN5.0 或 MES6.0，每隔 12h 更换一次缓冲液，透析 24h 以上，透析结束后，10000rpm 离心 15min，收集上清，即为 2/6-VLP。

方法二：将未组装形成 VLP 的 VP2 蛋白和 VP6 蛋白按一定比例混合，透析至组装缓冲液（表 3），VP2 和 VP6 的比例见表 4，每隔 12h 更换一次缓冲液，透析 24h 以上，透析结束后，10000rpm 离心 15min，收集上清，即为 2/6-VLP。

表 3: 2/6-VLP 在不同缓冲体系中的组装

	pH	NaCl 浓度	结果
1	3.0	0	聚体
2	4.35	0	2/6-VLP
3	4.35	0.5M	2/6-VLP
4	6.0	0	6-VLP

5	6.0	0.15M	6-VLP 和 2/6-VLP
6	6.0	0.3M	2/6-VLP
7	6.0	0.5M	2/6-VLP
8	6.4	0.3M	2/6-VLP
9	6.4	0.5M	2/6-VLP
10	6.4	1M	2/6-VLP
11	7.0	0.3M	聚体
12	8.0	0	聚体
13	8.0	0.5M	聚体

表 4: 2/6-VLP 组装中 VP2 和 VP6 比例

	VP2:VP6	结果
1	1: 2	2/6-VLP
2	1: 2.2	2/6-VLP
3	1: 2.4	2/6-VLP
4	1: 2.6	2/6-VLP
5	1: 2.8	2/6-VLP
6	1: 3	2/6-VLP
7	1: 4	6-VLP 和 2/6-VLP
8	1: 5	6-VLP 和 2/6-VLP
9	1: 6	6-VLP 和 2/6-VLP
10	1: 8	6-VLP 和 2/6-VLP
11	1: 10	6-VLP 和 2/6-VLP
12	0: 1	6-VLP

实施例 6: 轮状病毒类病毒颗粒的形态学检测及组装效率评价

轮状病毒类病毒颗粒的透射电镜观察

使用的仪器为日本电子公司生产的 100kV 透射电镜, 放大倍数为 100,000 倍。将实施例 4 中获得的 2-VLP 固定于喷碳的铜网上, 用 2% 的磷钨酸 pH7.4 负染 30min 后进行观察, 可见大量空心的病毒样颗粒, 直径 50-60nm (图 4); 将实施例 5 中获得的 6-VLP 或 2/6-VLP 固定于喷碳的铜网上, 用 2% 磷钨酸 pH4.5 负染 1min 后进行观察, 可见大量空心的病毒样颗粒, 直径分别为 70nm (图 5A) 和 60nm (图 6B、8A 和 9A) 左右。

RV 病毒样颗粒动态光散射观察

使用的仪器为美国 Protein Solutions 公司生产的 DynaPro MS/X 型动态光散射仪 (含温度控制器), 使用算法为 Regulation 算法。样品为实施例 5 中获得的 6-VLP 和 2/6-VLP。样品经 12000rpm 离心 10min 后进行测量。结果显示 6-VLP 及 2/6-VLP 的水化分子动力学半径分别为 40.36nm (图 5B) 和 34.27nm (图 9B), 组装效率均为 100%。

RV 病毒样颗粒的分子筛层析分析

仪器系统: 安捷伦 1200 高效液相色谱仪

层析柱: G5000PWXL 7.8mm×30cm (日本 TOSOH 公司), 柱体积为 13.4ml

缓冲液: 20mM 磷酸盐缓冲液 pH6.4+300mMNaCl

流速: 0.5ml/min

检测波长: 280nm

样品: 实施例 4 中获得的 6-VLP 和 2/6-VLP

结果显示 6-VLP 的保留时间分别为 10.551min, 组装效率为 94.6% (图 5C); 2/6-VLP 的保留时间分别为 10.821min, 组装效率为 95.8% (图 9C)。

RV 病毒样颗粒的分析超速离心分析

仪器为 Beckman XL-A 型分析超速离心机, 样品为实施例 5 中获得的 6-VLP 和 2/6-VLP, 方法为沉降速率法, 通过 SEDIFIT 软件进

行 C(S)分析。结果显示, 在 pH4.0-6.0 的条件下, 在不同的缓冲体系中, 类病毒颗粒的沉降速率存在一定差异, 6-VLP 的沉降速率介于 237-240S, 而 2/6-VLP 的沉降速率介于 278-290S, 在 pH4.0-6.0 条件下均可组装形成 (图 6A)。

综上, 体外组装的 6-VLP 和 2/6-VLP 均一性较好, 且组装效率高于 90%, 其制备工艺简便, 便于操作, 与真核表达产生多种不同组分的病毒样颗粒相比具有明显的优势。

实施例 7: VP6 蛋白免疫原性的评价

以小鼠模型评价 VP6 蛋白的免疫原性。免疫动物为 5-8 周龄 SPF 级雌性 Balb/C 小鼠 (购自上海斯莱克实验动物有限公司), 每组 3 只, 样品为实施例 1 中获得的 VP6 蛋白, 实施例 5 中获得的 6-VLP 和 2/6-VLP 以及 MA104 培养的 A 组轮状病毒。将上述样品与等体积的弗氏佐剂 (初次免疫为完全弗氏佐剂, 加强免疫为不完全弗氏佐剂) 混合, 免疫剂量为 100 μ g, 免疫途径为皮下免疫; 或铝佐剂混合, 免疫剂量为 1-100 μ g, 免疫途径为肌肉注射。免疫程序均为: 0 天初免, 第 7 天和第 14 天各加强免疫一次。

每周抽取小鼠的外周静脉血, 分离血清, 通过 EIA 的方法检测血清中 VP6 抗体的滴度。具体流程如下:

- 1) 包被: 样品为实施例 1 中获得的 VP6 蛋白, 缓冲液为 50mM 的碳酸盐缓冲液 pH9.6, 包被浓度为 500ng/mL, 包被量 100 μ L 每孔, 包被条件 37 $^{\circ}$ C, 2h;
- 2) 洗涤: PBST (20mM PBS+0.05% Tween20), 一次, 扣干;
- 3) 封闭: 封闭液为 PBS+0.5% 酪蛋白, 200 μ L 每孔, 37 $^{\circ}$ C, 2h, 封闭结束后扣干;
- 4) 加样: 样品: 小鼠血清, 稀释液 PBS+10%小牛血清, 10 倍梯度稀释, 100 μ L 每孔, 37 $^{\circ}$ C, 30min;
- 5) 洗涤: PBST, 5 次, 扣干;
- 6) 加酶标二抗: 酶标二抗为 GAM-HRP, 稀释液为 PBS+0.5%

的酪蛋白，稀释倍数为 1: 5000，100 μ L 每孔，37 $^{\circ}$ C，30min；

7) 洗涤：PBST，5 次，扣干；

8) 显色：TMB 显色液 100 μ L 每孔，37 $^{\circ}$ C，15min；

9) 终止：终止液 50 μ L 每孔；

10) 数据读取：安图酶标仪，OD450/600。

以 OD450/600 高于 0.2 的最大稀释倍数作为小鼠血清抗体滴度，结果表明，与等量的灭活病毒相比，VP6 抗原具有较高的免疫原性，且与铝佐剂相比，弗氏佐剂可更大程度的提高 VP6 蛋白的免疫原性（图 10）。

实施例 8：VP6 蛋白及其类病毒颗粒免疫保护性评价

由于 VP6 抗体无体外中和活性，成年鼠对轮状病毒的敏感性较差，因此使用孕鼠-乳鼠模型评价 VP6 蛋白的免疫保护性。将 4-5 周龄 SPF 级雌性 Balb/c 小鼠分成五组，将实施例 1 中获得的 VP6，实施例 5 中获得的 6-VLP 和 2/6-VLP，MA104 细胞培养的 A 组轮状病毒或 PBS 与等体积的弗氏佐剂（初次免疫为完全弗氏佐剂，加强免疫时使用不完全弗氏佐剂）混合，免疫方式为皮下免疫，免疫剂量为 10 μ g VP6 每只小鼠，免疫程序为：0 天初免，10 天，20 天加强免疫一次，30 天以同等剂量与铝佐剂混合的抗原通过肌肉注射方式加强免疫一次。最后一次免疫后两周抽取外周静脉血，分离血清，保存待检，并将雌鼠与雄鼠合笼，待交配完成后取出雄鼠。乳鼠出生后 4-6 天进行攻毒，攻毒剂量为 5×10^6 TCID₅₀ 每只乳鼠，病毒为 MA104 细胞适应培养的人轮状病毒，攻毒后观察并记录乳鼠的健康状况，如腹泻情况，体重变化；并在 0，24，48，72hpc 各处死一只小鼠，解剖后观察小鼠的组织病变，取小肠组织，通过免疫组化、EIA 等方法检测病毒；同时分离血清，通过 EIA 检测血清抗体的滴度。

VP6 的免疫原性和母源抗体的传递

通过 EIA 检测不同免疫组母鼠和乳鼠血清中 VP6 抗体的滴度，包被抗原为大肠杆菌重组表达的 VP6 蛋白，包被量为 50ng/孔，检测

方法同实施例 7。图 11A 显示了母鼠血清中 VP6 抗体的滴度，VP6，6-VLP 和 2/6-VLP 均具有较高的免疫原性且三者无显著差异，图 11B 显示了乳鼠血清中 VP6 抗体的滴度，可见，非黏膜免疫的母源抗体可有效地通过胎盘和母乳传递至子代。

VP6 母传抗体对乳鼠腹泻的保护性

攻毒后每天监测乳鼠的腹泻情况，并根据粪便的颜色、形状进行打分，发现攻毒后 24h 乳鼠腹泻最严重，结果见表 5，对照组攻毒后 24h 内出现明显的腹泻症状，而实验组无腹泻或腹泻症状较轻，VP6、6-VLP、2/6-VLP 和灭活病毒母传抗体均可减轻乳鼠腹泻的症状，VP6 和 2/6-VLP 与灭活病毒母传抗体的保护性无显著差异（P 值分别为 0.070 和 0.946），而 6-VLP 免疫保护性显著低于 RV（ $P=0.001$ ）和 2/6-VLP（ $P<0.001$ ）。

表 5: 轮状病毒感染后 24h 乳鼠腹泻情况

分数	VP6	6-VLP	2/6-VLP	RV	PBS
1					
2	6		12	7	
3	5	11	2	1	5
4	2	3			4
5	1				4

1. 正常粪便；2. 棕色成型粪便；3. 棕色-黄色软粪便；4. 黄色不成型粪便；5. 水样便

分数 ≥ 3 判定为腹泻，分数 >3 判定为严重腹泻，图 12 显示了不同免疫组子代小鼠未发生腹泻和严重腹泻的比例，表 6 显示了不同免疫组母传抗体对乳鼠轮状病毒感染性腹泻和严重腹泻的保护效率，结果表明，VP6，6-VLP，2/6-VLP 与灭活病毒母传抗体均可有效预防轮状病毒感染性严重腹泻，且 VP6，6-VLP 和 2/6-VLP 的保护性与灭活病毒相比均无显著差异（P 值分别为 0.159, 0.159, 1.0）；在预防腹泻方面，2/6-VLP 与灭活病毒的保护性最好，且二者无显著差异（ $P=0.907$ ），

VP6 具有一定的保护性，但显著低于灭活病毒（ $P=0.04$ ）和 2/6-VLP（ $P=0.018$ ），而 6-VLP 无保护性。

表 6: VP6 母传抗体对轮状病毒感染性腹泻的保护效率

	腹泻	严重腹泻
VP6	42.86%* (-37.86%,76.31%)	65.18%*,& (-31.24%,90.76%)
6-VLP	/	65.18%*,& (-31.24%,90.76%)
2/6-VLP	85.71%*,& (36.7%,96.78%)	100%*,& (?,100%)
RV	87.5%* (4.46%,98.36%)	100%* (?,100%)

*: 与 PBS 对比具有显著性差异; &: 与灭活 RV 相比具有显著性差异

VP6 母传抗体抑制轮状病毒的复制

攻毒后每隔 24h 处死 1-2 只乳鼠，观察组织病变，发现对照组肠组织充气严重。取肠组织并通过高压匀浆法将组织进行研磨、破碎，离心，取上清，通过双抗体夹心法对其中的 VP6 抗原进行检测，具体方法如下：

- 1) 包被：VP6 单克隆抗体 9F10，缓冲液 20mM PB7.4，包被浓度 4 μ g/mL，包被量 100 μ L 每孔，包被条件 37 $^{\circ}$ C，2h；
- 2) 洗涤：以 PBST（20mM PBS+0.05% Tween20），400 μ L 每孔，一次，纸上扣干；
- 3) 封闭：20mM PBS+0.5%酪蛋白，200 μ L 每孔，37 $^{\circ}$ C，2h，封闭结束纸上扣干；
- 4) 加样：将小肠组织匀浆以 PBS+10%小牛血清 2 倍梯度稀释，100 μ L 每孔，37 $^{\circ}$ C，30min；

- 5) 洗涤: PBST, 400 μ L 每孔, 5 次, 扣干;
- 6) 加酶标抗体: 将 HRP 标记的 VP6 单克隆抗体 15H10-HRP, 稀释液 20mM PBS+0.5%酪蛋白, 稀释 5000 倍, 100 μ L 每孔, 37 $^{\circ}$ C, 30min;
- 7) 洗涤: PBST, 400 μ L 每孔, 5 次, 扣干;
- 8) 显色: TMB 显色液, 100 μ L 每孔, 37 $^{\circ}$ C, 15min;
- 9) 终止: 终止液, 50 μ L 每孔;
- 10) 数据读取: 安图酶标仪, 检测 OD450/600, 取 OD450/600 读值高于 0.2 的最大稀释倍数为病毒滴度。

结果表明, VP6 抗体可有效的抑制轮状病毒的感染与复制, 图 13A 显示了不同免疫组子代乳鼠感染轮状病毒后不同时间小肠组织病毒滴度的变化趋势, 图 13B 显示了 VP6 抗体对轮状病毒复制的抑制效率, 其中 VP6 母源抗体对轮状病毒复制的抑制效率为 94.7%, 而 6-VLP、2/6-VLP 以及灭活病毒的抑制效率均为 100%。

综上所述, VP6、6-VLP 和 2/6-VLP 母传抗体对轮状病毒感染和轮状病毒感染性腹泻均具有保护作用, 其中以 2/6-VLP 的保护效果最好, 在预防严重腹泻和腹泻方面与同等剂量的灭活病毒相比均无显著差异。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导, 可以对那些细节进行各种修改和替换, 这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 一种制备轮状病毒双层类病毒颗粒的方法，所述双层类病毒颗粒包含轮状病毒 VP2 蛋白和 VP6 蛋白，所述方法包括以下步骤：

a) 在原核表达系统中以可溶形式表达 VP6，并进行纯化，纯化后的 VP6 蛋白保持其正确构象，以三聚体形式存在；

b) 将纯化后的 VP6 与颗粒或非颗粒状态的 VP2 共组装形成双层颗粒 2/6-VLP。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述 VP6 蛋白通过以下步骤制备：

1) 在大肠杆菌中表达轮状病毒 VP6 蛋白；

2) 向含 VP6 蛋白的裂解上清中加入聚乙烯亚胺 (PEI) 或其类似物，或二价或三价金属离子，以沉淀核酸和部分杂蛋白，PEI 的浓度介于 0.05%-0.2%，优选 0.1%；金属离子包括但不限于 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Al^{3+} ，优选 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} ，最优选 Ca^{2+} ； Ca^{2+} 的浓度介于 10 ~ 80mM，优选 15 ~ 50mM，最优选 20mM；

3) 离心，使蛋白质上清液经历盐析和色谱层析纯化。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述盐析使用饱和硫酸铵进行。

4. 权利要求 2 的方法，其中所述色谱层析包括：疏水相互作用色谱和离子交换色谱，优选疏水作用色谱，其中最优选 3M NaCl 条件下经 Phenyl HP (GE)，其中核酸穿透，VP6 蛋白在 2M NaCl 条件下洗脱，杂蛋白在无盐条件下洗脱。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述 VP2 蛋白是通过以下步骤制备的非颗粒状态的 VP2 蛋白：

1) 在大肠杆菌中表达轮状病毒 VP2 蛋白；

2) 向含 VP2 蛋白的裂解上清中加入聚乙烯亚胺 (PEI)，PEI

的浓度介于 0.05%-1%，优选 0.3%-0.5%，最优选 0.5%；

3) 离心，使蛋白上清液经盐析和色谱层析纯化。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述盐析使用硫酸铵进行。

7. 权利要求 5 的方法，其中所述色谱层析包括离子交换色谱和疏水相互作用色谱，优选阳离子交换色谱，最优选 Tris-HCl (pH8.0) 条件下通过 SP FF (GE) 进行纯化，其中核酸和部分杂蛋白穿透或在 150mM NaCl 条件下洗脱，VP2 蛋白在 500mM NaCl 条件下洗脱。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述颗粒状态的 VP2 是由 VP2 蛋白组成的单层类病毒颗粒 2-VLP。

9. 权利要求 1-8 任一项的方法，其中所述双层类病毒颗粒 2/6-VLP 的组装包括将 VP6 和 VP2 蛋白混合后，将缓冲液更换至组装缓冲液而组装成双层类病毒颗粒，其中：

a) VP2、VP6 为未组装成颗粒的纯化的蛋白，其纯度为 95%以上；

b) 组装缓冲液为磷酸盐缓冲液，MES 缓冲液或柠檬酸盐缓冲液，其 pH 介于 3.0 ~ 7.0，优选 pH4.0 ~ pH6.4，最优选地，该缓冲液的 pH 为 6.4；

c) 组装缓冲液含 0 ~ 2M 的盐离子，优选 NaCl，更优选地，该缓冲液含 150-2M NaCl，最优选地，该缓冲液含 300mM NaCl；

d) VP2 和 VP6 的质量比介于 1: 1 ~ 1: 10，优选地，该比例为 1: 2 ~ 1: 3，最优选地，该比例为 1: 2.6。

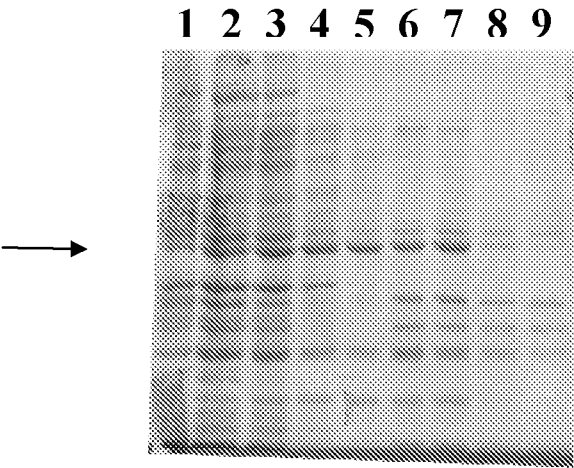


Fig 1A

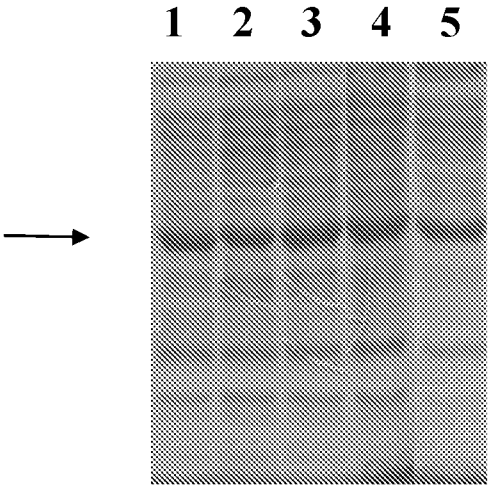


Fig 1B

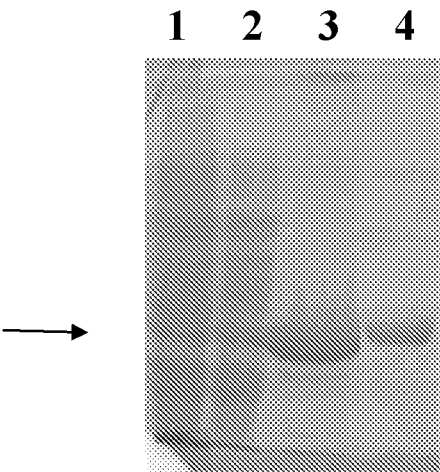


Fig 1C

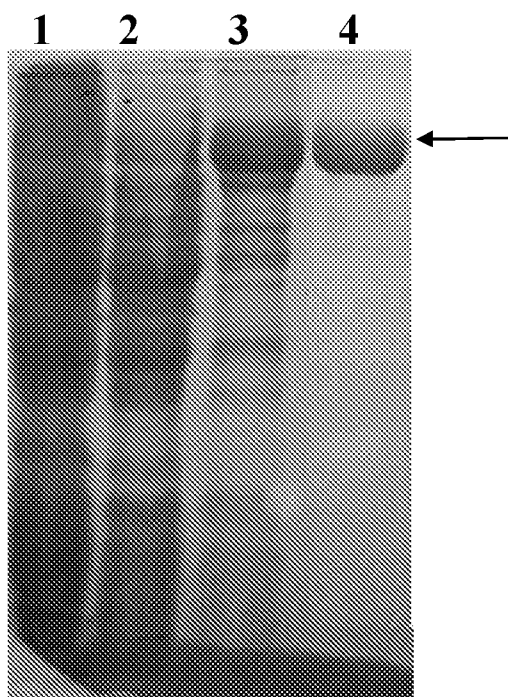


Fig 2

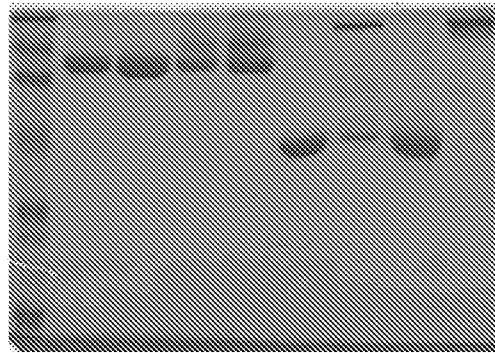


Fig 3A

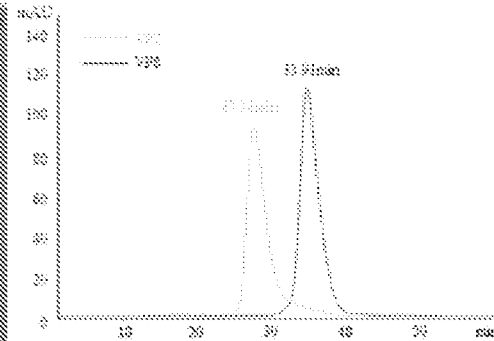


Fig 3B

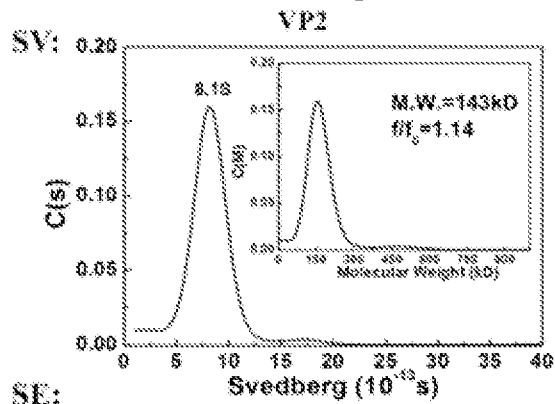


Fig 3C

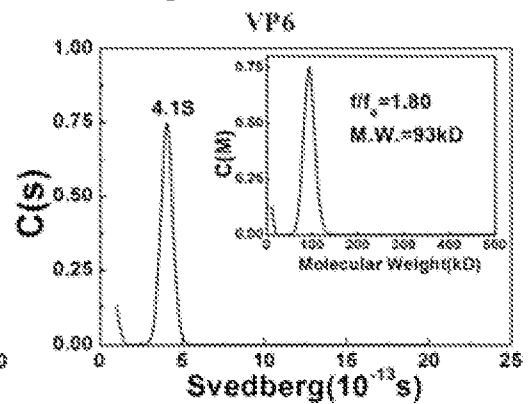


Fig 3D

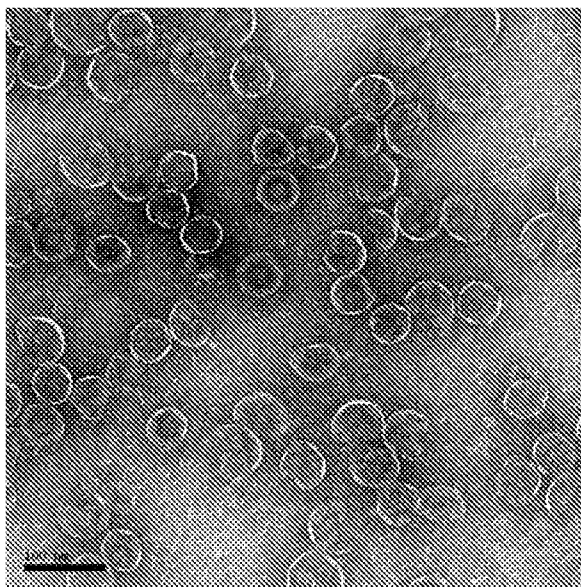


Fig 4

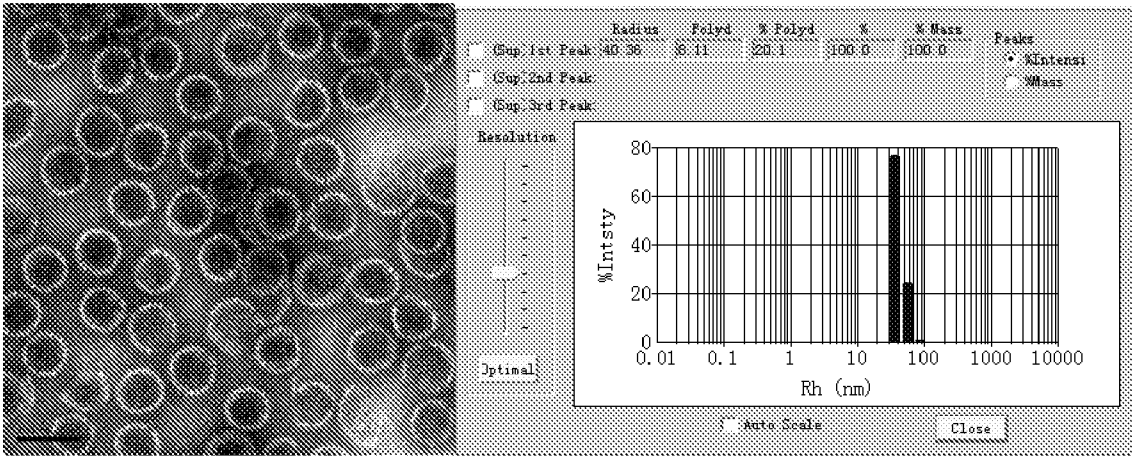


Fig 5A

Fig 5B

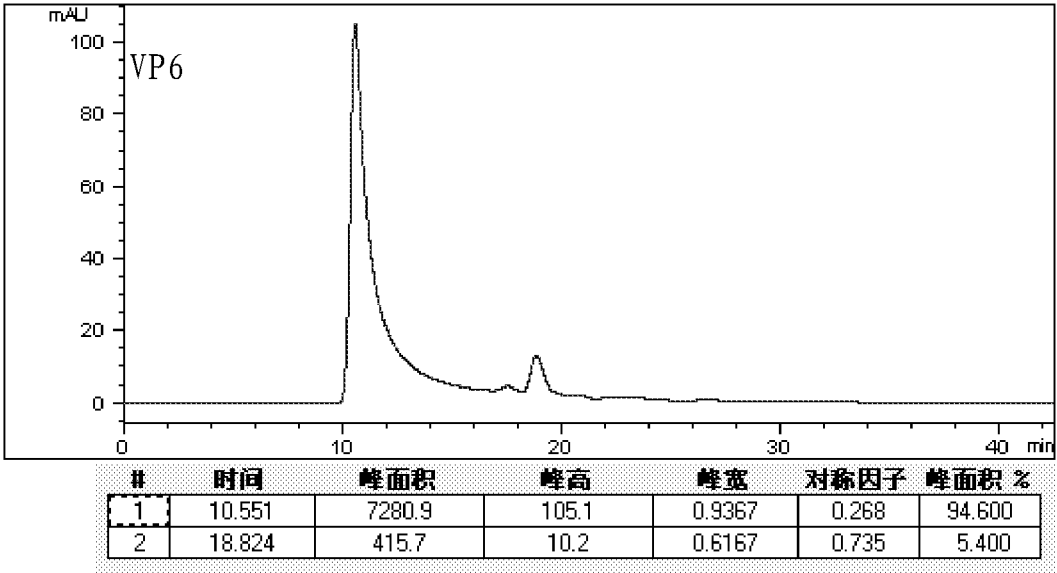


Fig 5C

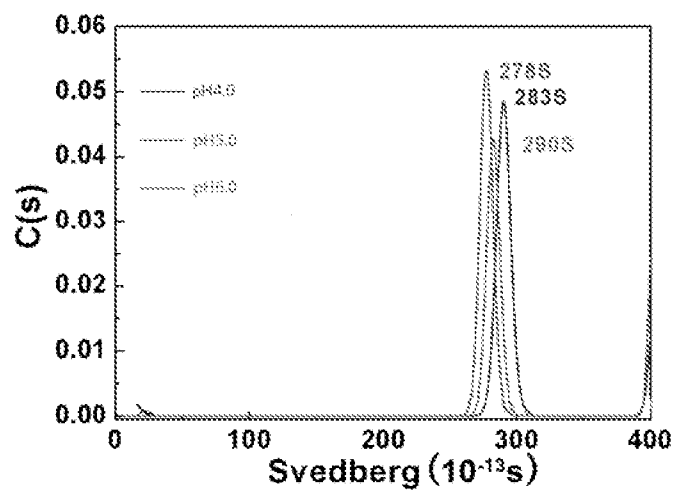


Fig 6A

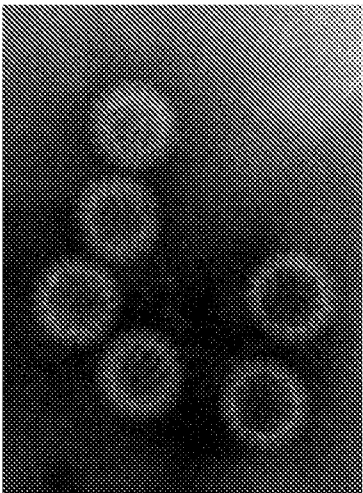


Fig 6B

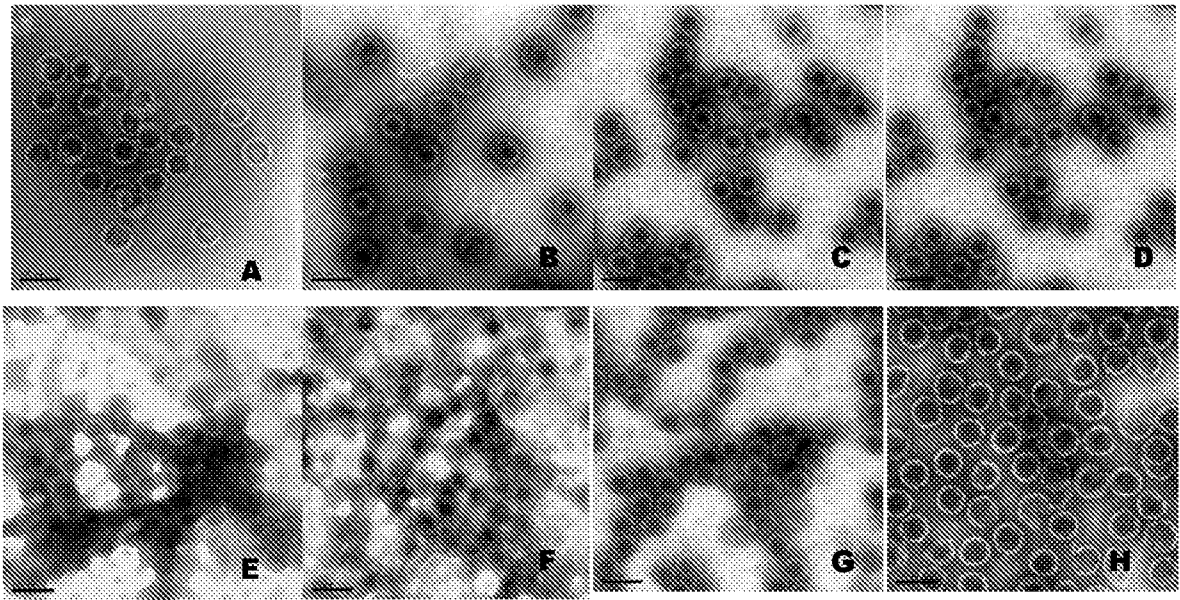


Fig 7

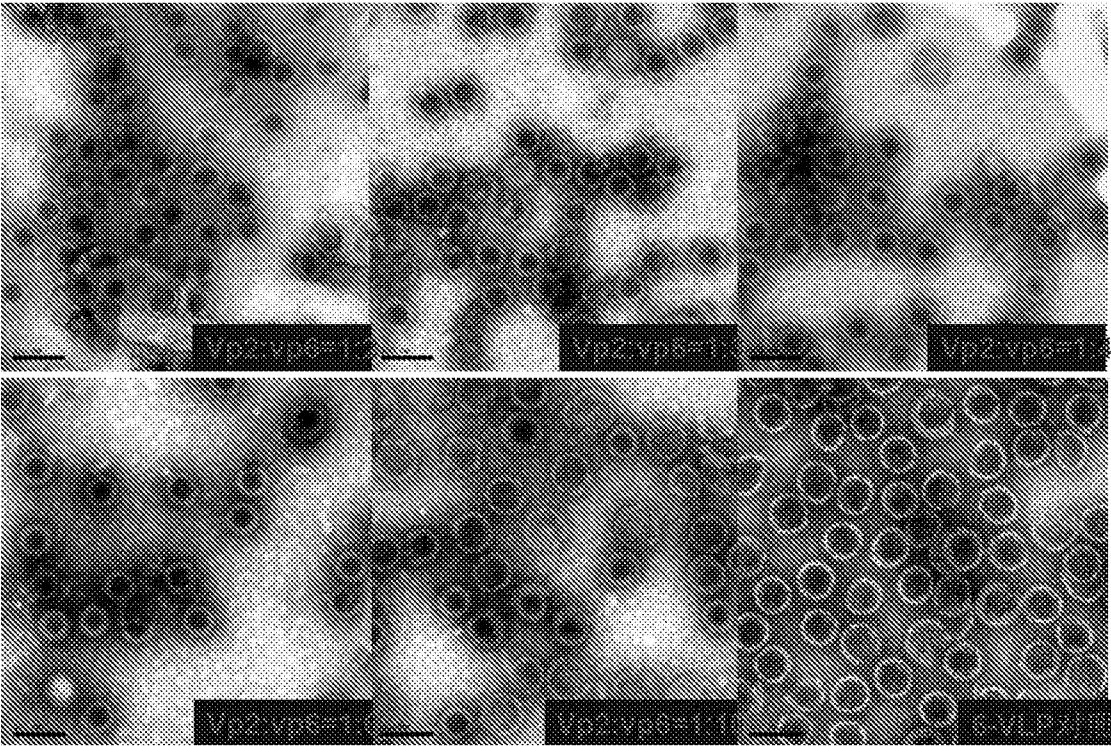


Fig 8A

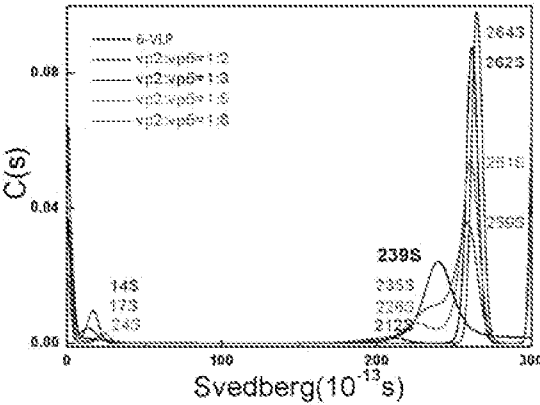


Fig 8B

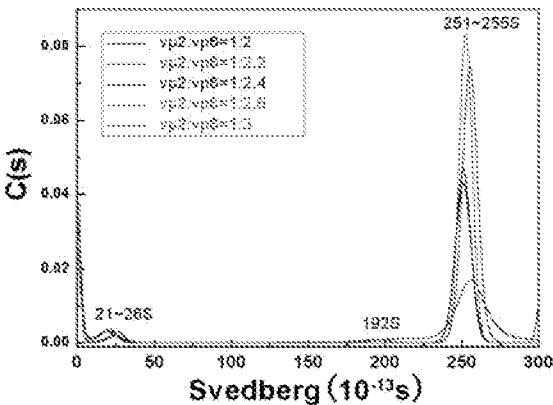


Fig 8C

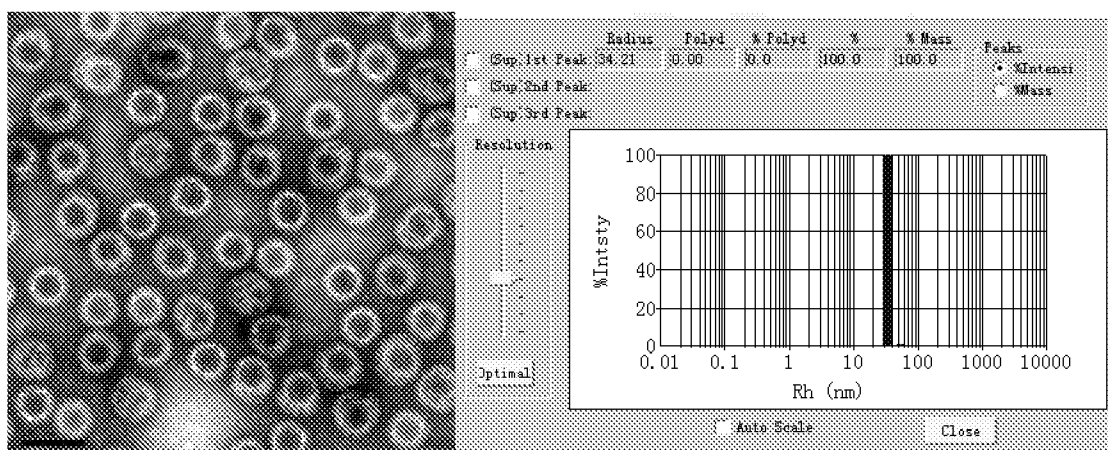


Fig 9A

Fig 9B

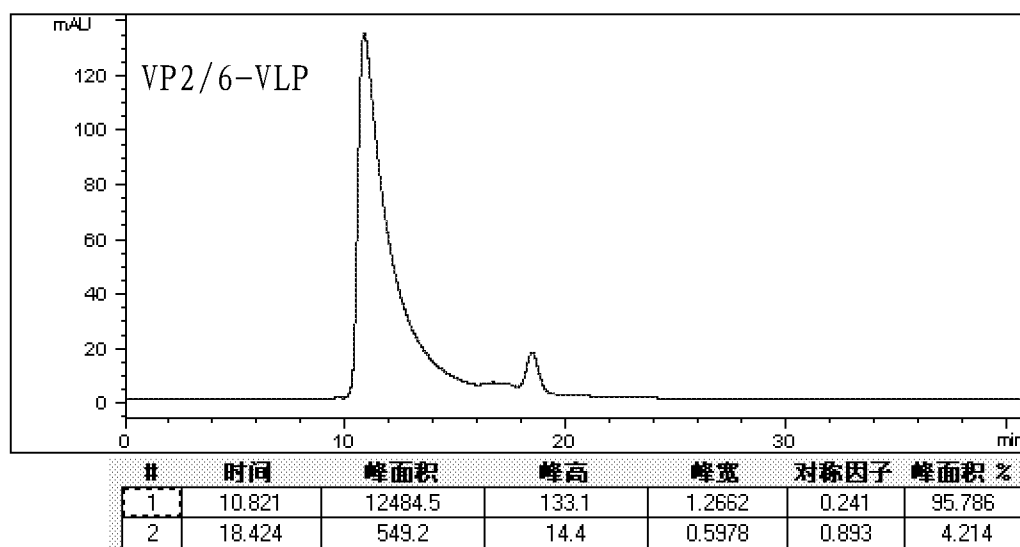


Fig 9C

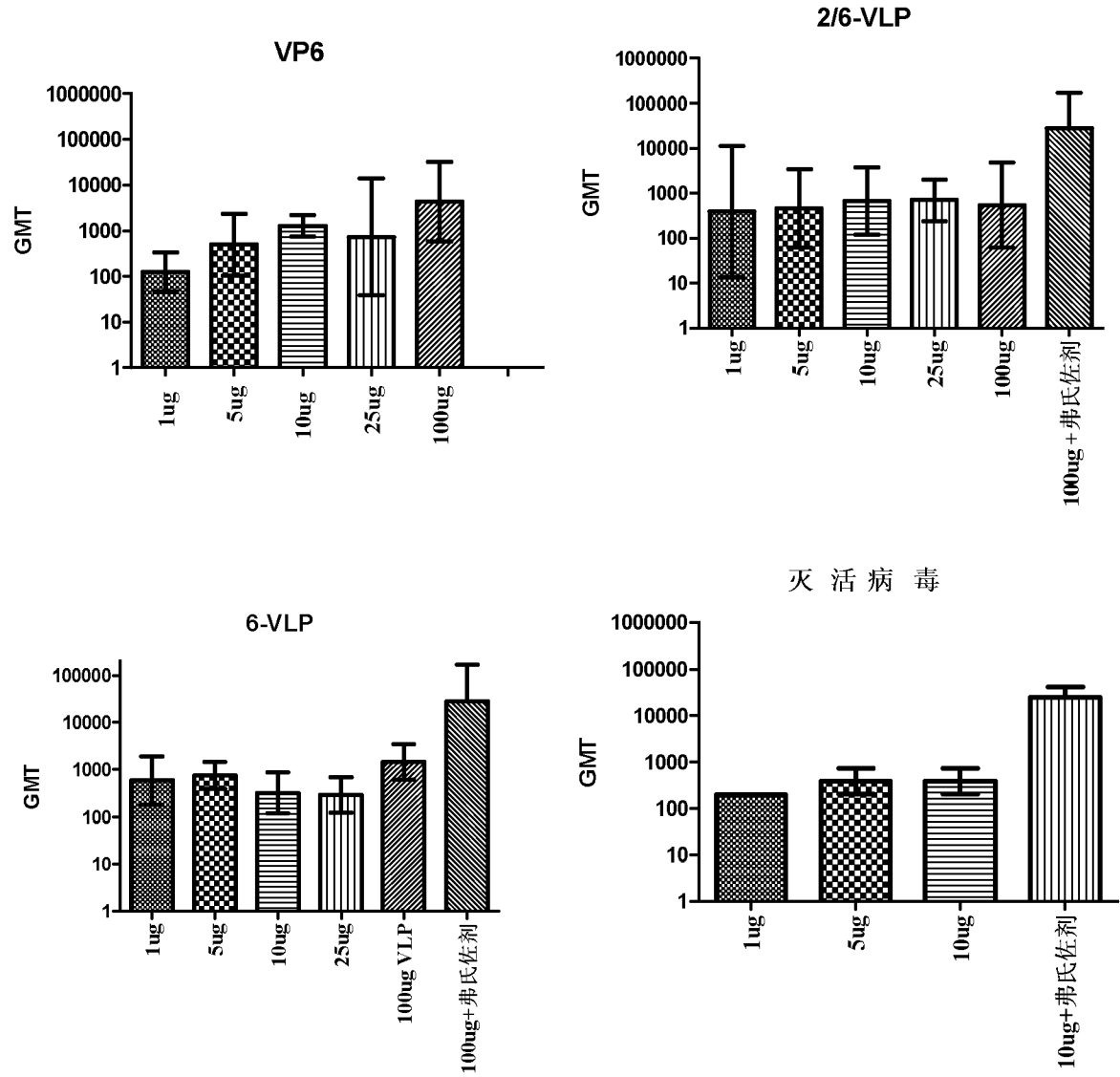


Fig 10

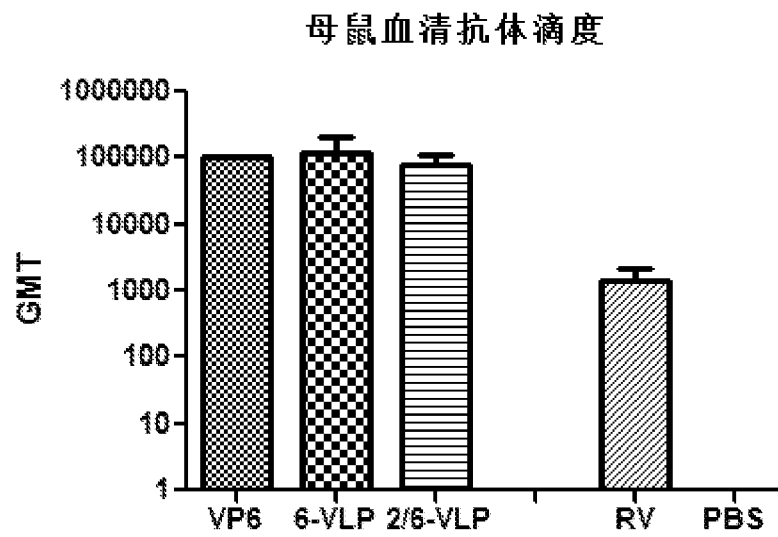


Fig 11A

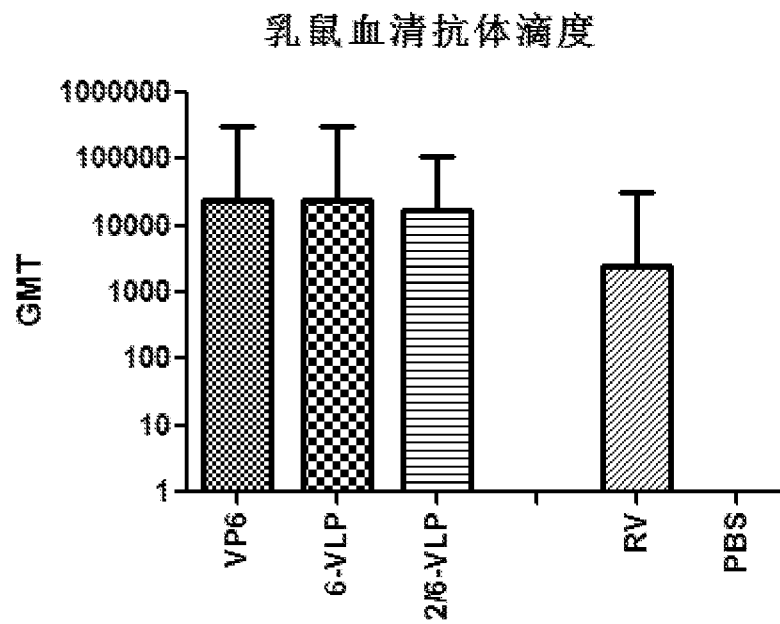
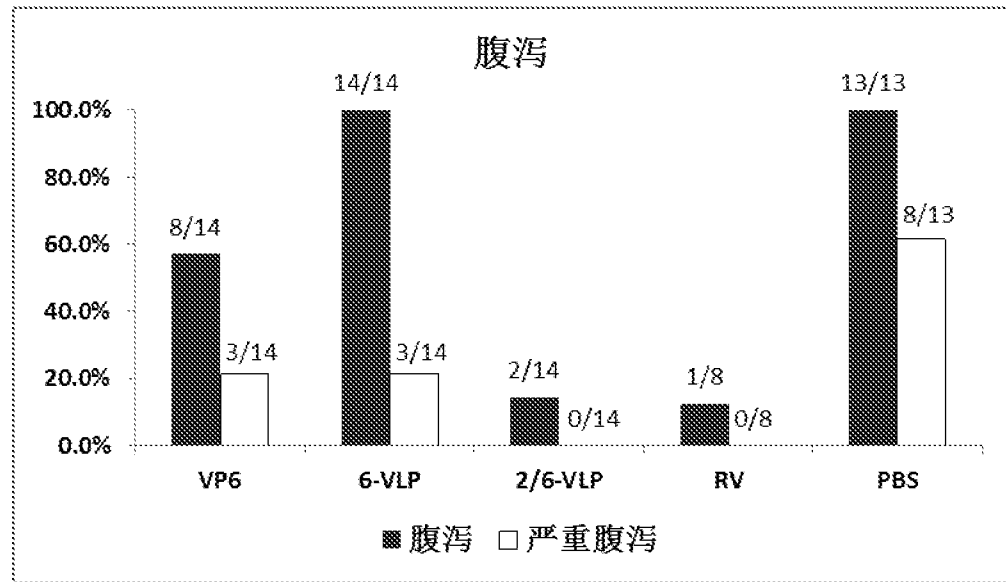


Fig 11B

**Fig 12**

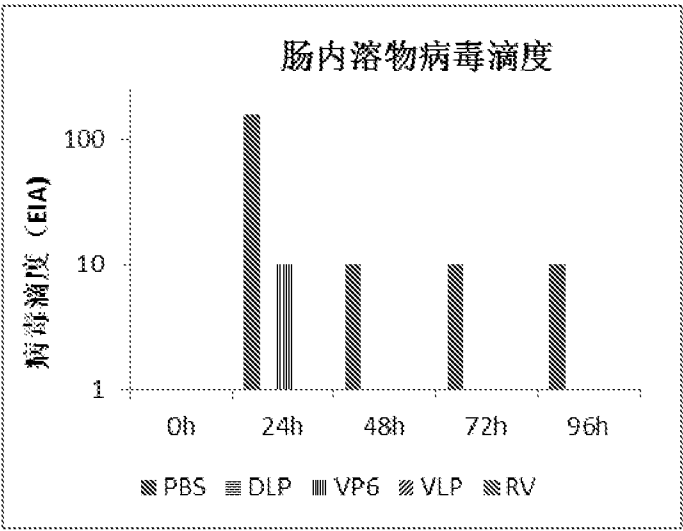


Fig 13A

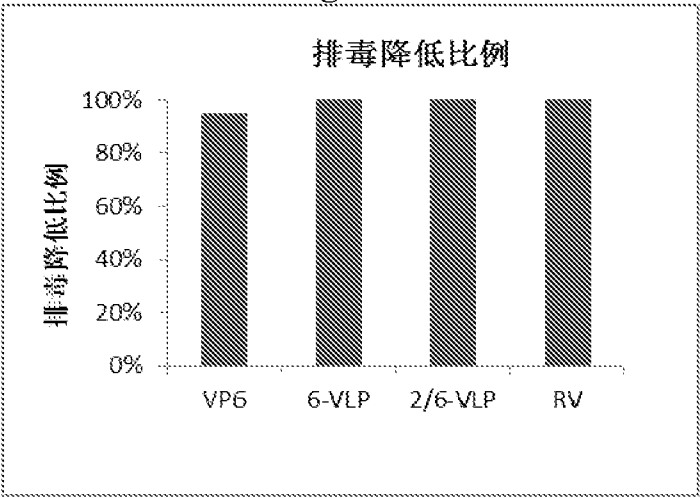


Fig 13B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/077736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N 7/-; C12P 21/-; C07K 1/-

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

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

WPI, EPODOC, CNPAT, WANFANG DATA, Google, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct: rotavirus, VP2, VP6, assembly, in vitro, double layered, prokaryotic, Escherichia, coli, soluble, double layer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GONZALEZ, S.A. et al. Assembly of double-layered virus-like particles in mammalian cells by coexpression of human rotavirus VP2 and VP6. Journal of General Virology. September 1995, vol. 76, pages 2357-2360, especially the abstract, page 2357 and page 2359	1-9
Y	REDMOND, M. J. et al. Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. Vaccine. 1993, vol. 11, no. 2, pages 273-281, especially page 275, and fig. 1	1-9
Y	Li, Tingdong, Expression of Rotavirus Structure Protein in Escherichia coli and Assembly of Virus-like Particles thereof In Vitro, Chinese Master's Theses Full-text Database Medicine and Health Sciences, 15 December 2009 (15. 12. 2009) no. 12, page E069-19, especially pages 42-63 of the thesis	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 September 2013 (13.09.2013)	Date of mailing of the international search report 26 September 2013 (26.09.2013)
---	--

Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, Zhongwei Telephone No. (86-10) 62414097
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/077736

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/049366 A1 (VESIKARI, T. et al.) 19 April 2012 (19.04.2012) , the whole document	1-9
A	EP 1576877 A1 (BIOPROTEIN TECHNOLOGIES) 21 September 2005 (21.09.2005) , the whole document	1-9
A	ZHAO, Q. et al. Self-Assembled Virus-Like Particles from Rotavirus Structural Protein VP6 for Targeted Drug Delivery. Bioconjugate Chem. 21 February 2011 (21.02.2011), vol. 22, no. 3, pages 346-352	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/077736

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2012/049366 A1	19.04.2012	FI 122520 B	15.03.2012
		US 2012/0093884 A1	19.04.2012
		CA 2814175 A1	19.04.2012
		TW 201217530 A	01.05.2012
		AU 2011315405 A1	23.05.2013
		SG 189398 A1	31.05.2013
		EP 2627353 A1	21.08.2013
		CN 103260645 A	21.08.2013
EP 1576877 A1	21.09.2005	CA 2557953 A1	15.09.2005
		EP 1727423 A1	06.12.2006
		JP 2007525991 A	13.09.2007
		US 2010/0028371 A1	04.02.2010
		WO 2005/084427 A1	15.09.2005

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/077736

Continuation of: second sheet : A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 7/04 (2006.01) i

C12P 21/02 (2006.01) i

C07K 1/16 (2006.01) i

C07K 1/14 (2006.01) i

C12R 1/19 (2006.01) n

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2013/077736

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N 7/-; C12P 21/-; C07K 1/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, CNPAT, 万方数据资源系统, Google, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct: 轮状病毒, rotavirus, VP2, VP6, assembly, in vitro, double layered, 双层, 组装, 原核, prokaryotic, Escherichia, coli, 大肠杆菌, 可溶, soluble

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	GONZALEZ, S.A. et al. Assembly of double-layered virus-like particles in mammalian cells by coexpression of human rotavirus VP2 and VP6. Journal of General Virology. 9 月 1995, 第 76 卷, 第 2357-2360 页, 尤其摘要, 第 2357 和 2359 页	1-9
Y	REDMOND, M. J. et al. Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. Vaccine. 1993 年, 第 11 卷, 第 2 期, 第 273-281 页, 尤其第 275 页图 1	1-9
Y	李廷栋, 轮状病毒结构蛋白在大肠杆菌中的表达及其类病毒颗粒的体外组装, 中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 15.12 月 2009 (15.12.2009), 第 12 期, 第 E069-19 页, 尤其该论文第 42-63 页	1-9

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

13.9 月 2013 (13.09.2013)

国际检索报告邮寄日期

26.9 月 2013 (26.09.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

陈中伟

电话号码: (86-10) **62414097**

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2012/049366 A1 (VESIKARI, T. et al) 19.4 月 2012 (19.04.2012), 全文	1-9
A	EP 1576877 A1 (BIOPROTEIN TECHNOLOGIES) 21.9 月 2005 (21.09.2005), 全文	1-9
A	ZHAO, Q. et al. Self-Assembled Virus-Like Particles from Rotavirus Structural Protein VP6 for Targeted Drug Delivery. Bioconjugate Chem. 21.2 月 2011 (21.02.2011), 第 22 卷, 第 3 期, 第 346-352 页	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/077736

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO 2012/049366 A1	19.04.2012	FI 122520 B	15.03.2012
		US 2012/0093884 A1	19.04.2012
		CA 2814175 A1	19.04.2012
		TW 201217530 A	01.05.2012
		AU 2011315405 A1	23.05.2013
		SG 189398 A1	31.05.2013
		EP 2627353 A1	21.08.2013
		CN 103260645 A	21.08.2013
		CA 2557953 A1	15.09.2005
EP 1576877 A1	21.09.2005	EP 1727423 A1	06.12.2006
		JP 2007525991 A	13.09.2007
		US 2010/0028371 A1	04.02.2010
		WO 2005/084427 A1	15.09.2005

续：第 2 页：A. 主题的分类

C12N 7/04 (2006.01) i

C12P 21/02 (2006.01) i

C07K 1/16 (2006.01) i

C07K 1/14 (2006.01) i

C12R 1/19 (2006.01) n