

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01815071.3

[51] Int. Cl.

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100400101C

[22] 申请日 2001.8.15 [21] 申请号 01815071.3
[30] 优先权

[32] 2000.8.17 [33] US [31] 60/225,767

[32] 2000.8.29 [33] US [31] 60/229,175

[32] 2000.11.3 [33] US [31] 09/705,547

[32] 2000.8.17 [33] US [31] 09/705547

[86] 国际申请 PCT/IB2001/001808 2001.8.15

[87] 国际公布 WO2002/013855 英 2002.2.21

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.3

[73] 专利权人 特里帕普股份公司

地址 瑞典胡丁厄

[72] 发明人 M·萨比尔格 C·胡尔特格伦

[56] 参考文献

Enhancement of hepatitis C virus core antigen
- specific type 1T helper cell response by ribavirin
correlates with the increased level of IL - 2.
CHIANG B L ET AL. Joint annual meeting of the a-
merican association of immunologists and the clini-
cal immunology society. 2000

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 3 页 说明书 116 页 附图 5 页

[54] 发明名称

包含病毒唑的疫苗及其使用方法

[57] 摘要

本发明公开了增强动物(例如家养、运动或宠物物种)和人中疫苗效应的组合物和方法。更具体而言,本发明公开了包含病毒唑和抗原(优选具有丙型肝炎病毒(HCV)上表位的抗原)的疫苗组合物,用于治疗 and 预防疾病,优选 HCV 感染。

1. 一种免疫原性组合物，其包含编码肝炎病毒抗原的核酸和病毒唑。
2. 权利要求1的免疫原性组合物，其中所述肝炎病毒抗原是甲型肝炎病毒（HAV）的病毒抗原。
3. 权利要求1的免疫原性组合物，其中所述肝炎病毒抗原是乙型肝炎病毒（HBV）的病毒抗原，或其免疫原性片段。
4. 权利要求3的免疫原性组合物，其中所述HBV的病毒抗原选自乙型肝炎表面抗原（HBsAg）、肝炎核心抗原（HBcAg）和肝炎E抗原（HBeAg），或其免疫原性片段。
5. 权利要求1的免疫原性组合物，其中所述肝炎病毒抗原是丙型肝炎病毒（HCV）的病毒抗原，或其免疫原性片段。
6. 权利要求5的免疫原性组合物，其中所述HCV的病毒抗原是SEQ ID NO: 1的肽，或其片段。
7. 权利要求5的免疫原性组合物，其中所述HCV的病毒抗原是NS3，或其免疫原性片段。
8. 权利要求5的免疫原性组合物，其中所述HCV的病毒抗原是NS4A，或其免疫原性片段。
9. 权利要求1的免疫原性组合物，其中所述核酸选自SEQ ID NO:13-16，或其免疫原性片段。
10. 一种免疫原性组合物，包含肝炎病毒抗原和病毒唑。
11. 权利要求10的免疫原性组合物，其中所述肝炎病毒抗原是甲型肝炎病毒（HAV）的病毒抗原，或其免疫原性片段。
12. 权利要求10的免疫原性组合物，其中所述肝炎病毒抗原是乙型肝炎病毒（HBV）的病毒抗原，或其免疫原性片段。
13. 权利要求12的免疫原性组合物，其中所述HBV的病毒抗原选自乙型肝炎表面抗原（HBsAg）、乙型肝炎核心抗原（HBcAg）和肝炎E抗原（HBeAg），或其免疫原性片段。

14. 权利要求 10 的免疫原性组合物，其中所述肝炎病毒抗原是丙型肝炎病毒（HCV）的病毒抗原。

15. 权利要求 14 的免疫原性组合物，其中所述 HCV 的病毒抗原是 SEQ ID NO: 1 的肽，或其片段。

16. 权利要求 14 的免疫原性组合物，其中所述 HCV 的病毒抗原是 NS3，或其片段。

17. 权利要求 14 的免疫原性组合物，其中所述 HCV 的病毒抗原是 NS4A，或其片段。

18. 权利要求 8-17 中任一项的免疫原性组合物，其中所述病毒唑的量为至少 0.25mg。

19. 权利要求 8-17 中任一项的免疫原性组合物，其中所述病毒唑的量为大约 0.25-100mg。

20. 权利要求 8-17 中任一项的免疫原性组合物，其中所述病毒唑的量为大约 0.25-25mg。

21. 权利要求 8-17 中任一项的免疫原性组合物，其中所述病毒唑的量为大约 0.25-75mg。

22. 权利要求 8-17 中任一项的免疫原性组合物，其中所述病毒唑的量为大约 0.25-1mg。

23. 一种制备含有编码病毒抗原的核酸的免疫原性组合物的方法，包括：

(i)提供编码肝炎病毒抗原或其免疫原性片段的核酸，

(ii)提供病毒唑，和

(iii)将编码所述肝炎病毒抗原或其免疫原性片段的所述核酸与所述病毒唑组合。

24. 一种制备含有肝炎病毒抗原的免疫原性组合物的方法，包括：

(i)提供肝炎病毒抗原或其免疫原性片段，

(ii)提供病毒唑，和

(iii)将所述肝炎病毒抗原或其免疫原性片段与所述病毒唑组合。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述病毒抗原是肝炎病毒抗原，或

其免疫原性片段。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述肝炎病毒抗原或其免疫原性片段是甲型肝炎病毒（HAV）的病毒抗原，或其免疫原性片段。

27. 权利要求 25 的方法，其中所述肝炎病毒抗原是乙型肝炎病毒（HBV）的病毒抗原，或其免疫原性片段。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述 HBV 的病毒抗原选自乙型肝炎表面抗原（HBsAg）、乙型肝炎核心抗原（HBcAg）和肝炎 E 抗原（HBeAg），或其免疫原性片段。

29. 权利要求 25 的方法，其中所述肝炎病毒抗原是丙型肝炎病毒（HCV）的病毒抗原，或其免疫原性片段。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述 HCV 的病毒抗原是 NS3，或其免疫原性片段。

31. 权利要求 29 的方法，其中所述 HCV 的病毒抗原是 NS4A，或其免疫原性片段。

32. 权利要求 1-22 中任一项的免疫原性组合物在制备药物中的应用，其中所述药物用于增强针对肝炎病毒抗原的免疫应答。

33. 含有病毒唑和核酸的组合物在制备用于增强针对丙型肝炎的免疫应答的药物中的应用，其中所述核酸包含 SEQ ID NO:16 的序列。

34. 含有病毒唑和多肽的组合物在制备用于增强针对丙型肝炎的免疫应答的药物中的应用，其中所述多肽包含 SEQ ID NO:17 的序列。

35. 权利要求 1-22 中任一项的组合物在制备 HCV 免疫原中的应用，其中所述免疫原用于对此需要的受试者进行电穿孔。

包含病毒唑的疫苗及其使用方法

发明领域

本发明涉及增强动物（例如家养、运动或宠物物种）和人中疫苗效应的组合物和方法。更具体而言，优选实施方案涉及病毒唑作为佐剂的用途，以及具有病毒唑和抗原的组合物。

发明背景

利用疫苗预防人、家畜、运动动物和家养宠物的疾病，司空见惯。然而，用于疫苗的抗原常常免疫源性不足，难以将抗体滴度提高到足以防护后续攻击的水平，或者保持经过一段时间后达到该水平的潜力。另外，许多疫苗诱导细胞介导免疫完全不足，而细胞介导免疫是针对细菌和病毒感染主要的免疫防御。大量研究当前集中在开发更有效的疫苗以及增强含抗原制剂的免疫原性。（例如参见 *U.S. Pat. Nos. 6,056,961; 6,060,068; 6,063,380*；以及 Li 等人，*Science* 288:2219-2222 (2000)）。

乙型肝炎疫苗是有名的这种"弱"疫苗。例如针对乙型肝炎病毒的重组疫苗，如 Genhevacc(Pasteur Merieux Serums et Vaccines, 58, Avenue Leclerc 69007 Lyon, France)、Engerixb(Smith, Kline and Symbol French)以及 Recombivaxhb(Merck, Sharp 和 Dhome)，只是在 0、30、和 60 或 180 天至少 3 次注射、继之以一年后必须加强以后才有效。（Chedid 等人，*U.S. Patent No. 6,063,380*）。另外，许多接受这些疫苗的患者即使有应答，也很差。由于世界上许多地区对 HBV 感染具有地方性，现有 HBV 疫苗免疫源性差的特性成为极其严重的问题。

为了获得更强的体液和/或细胞应答，通常在能增强患者对疫苗中抗原免疫应答的物质中施用疫苗。最常用的疫苗规程佐剂为油制剂和明矾。（Chedid 等人，*U.S. Patent No. 6,063,380*）。需要许多安全有效

佐剂。

核苷类似物因其降低病毒复制的能力,已经广泛用于抗病毒治疗。(Hosoya 等人, *J. Inf. Dis.*, 168:641-646 (1993))。病毒唑(1- β -D-呋喃核糖基-1, 2, 4-三唑-3-羧酰胺)是合成的鸟嘌呤核苷类似物,已经用于抑制 RNA 和 DNA 病毒复制。(Huffman 等人, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 3:235 (1973); Sidwell 等人, *Science*, 177:705 (1972))。已经证明病毒唑是肌醇磷酸(IMP)脱氢酶(IMPDH)的竞争性抑制剂, IMPDH 将 IMP 转变为 IMX(其然后转变为 GMP)。De Clercq, Antiviral Agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact, Academic press, Inc., New York N.Y., pp. 1-55 (1993)。病毒唑长期治疗引起细胞内 GTP 池的消耗。

除抗病毒活性之外,研究者观察到某些鸟嘌呤核苷类似物影响免疫系统。(美国专利 No. 6,063,772 和 4,950,647)。已经表明病毒唑抑制功能性体液免疫应答(Peavy 等人, *J. Immunol.*, 126:861-864 (1981); Powers 等人, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 22:108-114 (1982)) 以及 IgE 介导的调节肥大细胞分泌。(Marquardt 等人, *J Pharmacol. Exp. Therapeutics*, 240:145-149 (1987))。据有些研究者报道,病毒唑的日常口服治疗对人和小鼠具有免疫调节作用。(Hultgren 等人, *J. Gen. Virol*, 79:2381-2391 (1998)和 Cramp 等人, *Gastron. Enterol.*, 118:346-355 (2000))。然而,目前关于病毒唑对免疫系统作用的理解尚处于初期。

发明概述

已经发现病毒唑能够用作佐剂,以增强或促进对抗原的免疫应答。此处所述本发明的实施方案包括含有抗原和病毒唑的"强"疫苗制剂。这些制剂一般具有足以增强或促进对抗原免疫应答的相当数量病毒唑。本发明的其它方面包括增强或促进动物、包括人对抗原免疫应答的方法。例如,通过一种方法,鉴别需要对抗原有效免疫应答的动物,然后提供相当数量的病毒唑连同抗原。某些方法中,联合提供病毒唑

和抗原(例如于单一组合物中), 而其它方法中则分别提供病毒唑和抗原。一些实施方案还涉及制造和使用具有病毒唑和抗原的组合物。

尽管包含的组合物包括病毒唑以及实际上任何的抗原或表位, 优选的组合物包含病毒唑和肝炎病毒抗原或表位。抗原或表位可以基于肽或核酸(例如, 编码肽抗原的 RNA 或者引入受试者时表达肽抗原的构建体)。实施方案为具有病毒唑、以及包含甲型肝炎病毒(HAV)抗原或表位的肽或者编码所述肽的核酸的组合物。实施方案为具有病毒唑、以及包含乙型肝炎病毒(HBV)抗原或表位的肽或者编码所述肽的核酸的组合物。合适的 HBV 抗原包括, 例如乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、肝炎核心抗原(HBcAg)、肝炎 e 抗原(HBeAg)以及编码这些分子的核酸。实施方案还是具有病毒唑、并包含丙型肝炎病毒(HCV)抗原或表位的肽或者编码所述肽的核酸的组合物。合适的 HCV 抗原包括而不限于, HCV 序列的一个或多个结构域(例如 NS3 和/或 NS4A)以及编码所述分子的核酸。

还发现了新的 HCV 序列。从感染 HCV 患者克隆并测序了 HCV 基因组新的 NS3/4A 片段(SEQ. ID. NO.: 16)。发现该序列与最紧密相关的 HCV 序列只有 93%的同源性。该新肽(SEQ. ID. NO.: 17)及其至少 3、4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段、编码这些分子的核酸、具有所述核酸的载体以及具有所述载体、核酸或肽的细胞也是本发明的实施方案。特别优选的实施方案是疫苗组合物, 其包含病毒唑以及 SEQ. ID. NO.: 17 的 HCV 肽、或其至少 3、4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段(例如 SEQ. ID. NO.: 25)、或编码所述肽或片段的核酸。

此外, 人们发现截短的突变体以及缺少蛋白水解裂解位点的 NS3/4A 肽的突变体具有高度免疫源性。这些新肽(SEQ. ID. NO.: 29-32 和 43-49)及其至少 3、4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段(例如 SEQ. ID. NO.: 26、27 和 33-42)、编码这些分子的核酸、具有所述核酸的载体以及具有所述载体、核酸或肽的细胞也是实施方案。特别优选的实施方案是疫苗组合物, 其包含病毒唑以及 SEQ. ID. NO.:

29-32 和 43-49 的至少一个 HCV 肽、或其至少 3、4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段(例如 SEQ. ID. NO.: 26、27 和 33 - 42)、或编码所述肽或片段的核酸。

另外, 具有上述抗原混合物的组合物是本发明的实施方案。例如, 一些组合物包含 HBV 抗原、HAV 抗原和病毒唑, 或者 HBV 抗原、HCV 抗原和病毒唑, 或者 HAV 抗原、HCV 抗原和病毒唑, 或者 HBV 抗原、HAV 抗原、HCV 抗原和病毒唑。其它实施方案包含病毒唑和编码上述抗原混合物的核酸。某些实施方案也包括本领域已知的其它佐剂、粘合剂、乳化剂、载体和填料, 包括但不限于明矾、油及其它增强免疫应答的化合物。

本发明的方面也包括此处所述组合物的制造和使用方法。某些方法将病毒唑与肽或核酸抗原(例如 HAV、HBV、HCV 抗原)混合, 制成单一组合物(例如疫苗组合物)而实现。优选的方法包括, 将病毒唑与具有 HCV 一个或多个结构域(例如 NS3 和/或 NS4A)上的表位的 HCV 抗原混合。

此处所述组合物的优选用法包括, 提供有此需要的动物足量的病毒唑和肝炎病毒抗原(例如 HBV 抗原、HAV 抗原、HCV 抗原, 或编码这些抗原之一的核酸或其任意组合)。例如, 通过一种方法, 鉴别需要对肝炎病毒抗原有效免疫应答的动物(例如, 具有肝炎感染的风险或者已经感染上肝炎的动物), 并提供所述动物相当数量的有效增强或促进对肝炎病毒抗原免疫应答的病毒唑和肝炎病毒抗原(于单一组合物中或者分别提供)。优选地, 鉴别需要对 HCV 有效免疫应答的动物, 提供所述动物一种组合物, 其中包含病毒唑和含有 SEQ. ID. NO.: 1、6、7 或 17 所示的抗原或表位的肽、或者编码所述肽的核酸。特别优选的方法包括, 鉴别需要对 HCV 有效免疫应答的动物, 并提供所述动物一种组合物, 其中包含病毒唑和相当数量的 HCV 抗原(例如 NS3/4A(SEQ. ID. NO.: 17)、NS3/4A 突变体 SEQ. ID. NO.: 29-32 和 43-49、或其至少 3、4-10、10-20、20-30、或 30-50 个氨基酸长度的片段(例如 SEQ. ID. NO.: 25-27 和 33-42)或者编码一种或多种这些分子

的核酸), 其足以增强或促进对所述抗原免疫应答。

附图简述

图 1 显示当与单剂量 1mg 病毒唑共同给药时, 对 10 和 100 μ g 重组丙型肝炎病毒(HCV)非结构 3 蛋白质(NS3)的体液应答, 由平均终点滴度确定。

图 2 显示当与单剂量的 0.1、1.0 或 10mg 病毒唑共同给药时, 对 20 μ g 重组丙型肝炎病毒(HCV)非结构 3 蛋白质(NS3)的体液应答, 由平均终点滴度确定。

图 3 显示单剂量 1mg 病毒唑对 NS3 特异性淋巴结增生应答的作用, 由体外记忆性应答确定。

图 4 显示 H-2^d 小鼠初次免疫后针对 NS3 抗体滴度对时间的函数。菱形表示 NS3/4A-pVAX 免疫小鼠的抗体滴度, 正方形表示 NS3-pVAX 免疫小鼠的抗体滴度。

图 5A 显示特异性 CTL 介导的 SP2/0 靶细胞裂解百分比对效应细胞和靶细胞比值的函数。磷酸盐缓冲盐水(PBS)用作对照免疫原。

图 5B 显示特异性 CTL 介导的 SP2/0 靶细胞裂解百分比对效应细胞和靶细胞比值的函数。质粒 NS3/4A-pVAX 用作免疫原。

发明详述

已经发现了包含病毒唑和抗原(例如, 包含病原体如病毒、细菌、霉菌、酵母或寄生虫的表位的分子)的组合物增强和/或促进动物对抗原的免疫应答。更确切地说, 人们发现病毒唑是有效的"佐剂", 为本公开目的, 其是指能够增强或促进对特定抗原免疫应答的物质。病毒唑显著增强免疫介导的抗原防护、提高抗原引起的抗体滴度以及增强增殖性 T 细胞应答证明了其佐剂活性。

此处描述了包含病毒唑和抗原或表位的几种组合物(例如疫苗)。例如, 包含病毒唑的疫苗制剂可以根据病毒唑的量、病毒唑的形式以及抗原类型而变化。抗原可以是肽或核酸(例如, 编码肽抗原的 RNA

或者引入受试者时表达肽抗原的构建体)。优选的组合物包含病毒唑和肝炎病毒抗原(例如 HAV 抗原、HBV 抗原、HCV 抗原、编码这些这些的核酸或其任意组合)。特别地,希望将至少一种 HCV 抗原、或 SEQ. ID. NO.: 1 所示的表位、或编码所述 HCV 抗原的核酸与病毒唑混合,以制备所述组合物。也就是说,某些实施方案包括而限于含有病毒唑以及包含 SEQ. ID. NO.: 1 或其具有 SEQ. ID. NO.: 1 的至少 2500、2000、1600、1200、800、400、200、100、50、10 或 3 个连续氨基酸片段的肽的组合物。另外的实施方案涉及包含病毒唑以及 SEQ. ID. NO.: 13 或其具有 SEQ. ID. NO.: 13 的至少 9、12、15、20、30、50、75、100、200、500 个连续核苷酸的片段的编码核酸。

其它实施方案包括组合物(例如疫苗),其包含病毒唑以及 SEQ. ID. NO.: 1 的特定片段,其中所述片段对应于 HCV 的特定结构域。例如,某些实施方案包含对应于 SEQ. ID. NO.: 1 的 1-182、183-379、380-729、730-1044、1045-1657、1658-1711、1712-1971 或 1972-30111 氨基酸的 HCV 片段。包含病毒唑以及编码一种或多种这些片段的核酸的组合物也是本发明的实施方案。

另外发现了新的 HCV 序列。从感染 HCV 患者克隆了新的核酸以及对应于 HCV NS3/4A 结构域的蛋白质(SEQ. ID. NO.: 16)。Genbank 检索显示该克隆序列与 HCV 序列具有最大的同源性,但与最接近的 HCV 亲本(relative)只有 93%同源性(登录号 AJ 278830)。该新肽(SEQ. ID. NO.: 17)及其至少 3、4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段、编码这些分子的核酸、具有所述核酸的载体以及具有所述载体、核酸或肽的细胞也是本发明的实施方案。另外,此处所述的某些疫苗实施方案包含病毒唑以及该新的 NS3/4A 肽、或其至少 3、4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段(例如 SEQ. ID. NO.: 25)、或编码一种或多种这些分子的核酸。

也制备了该新 NS3/4A 肽的突变体。人们发现截短的突变体(例如 SEQ. ID. NO.: 29)以及缺少蛋白水解裂解位点的突变体,具有高度免疫源性。这些新肽 SEQ. ID. NO.: 29-32 和 43-49 及其至少 3、4、6、8、

10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段(例如 SEQ. ID. NO.: 26、27 和 33-42)、编码这些分子的核酸、具有所述核酸的载体以及具有所述载体、核酸或肽的细胞也是实施方案。此外,此处所述的某些组合物包含病毒唑以及至少一种上述 HCV 肽突变体、或其至少 3、4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段。其它疫苗实施方案包含病毒唑以及编码一种或多种上述肽的核酸(例如 DNA)。

制备和使用上述组合物的方法也是实施方案。例如,通过提供病毒唑、提供抗原(例如包含 HCV 抗原的肽或编码所述肽的核酸)以及将所述病毒唑与所述抗原混合以配制可用于增强或促进受试者对所述抗原免疫应答的组合物,可以制备上述组合物。优选的方法要求将优选抗原或表位(例如包含 SEQ. ID. NO.: 1、6、7 或 17、或其特定片段如 SEQ. ID. NO.: 1 的 1-182、183-379、380-729、730-1044、1045-1657、1658-1711、1712-1971、1972-3011 氨基酸的肽以及编码这些分子的核酸)与病毒唑混合。其它抗原或表位也可以与病毒唑混合,包括而不限于具有 SEQ. ID. NO.: 1 至少 2500、2000、1600、1200、800、400、200、100、50、10 或 3 个连续氨基酸的片段以及编码这些片段的核酸。特别优选的方法涉及制备包含新发现的 NS3/4A 片段或 NS3/4A 突变体(例如截短的突变体或缺少蛋白水解裂解位点的突变体)、或其至少 4 个氨基酸长度的片段、或编码一种或多种这些分子的核酸的疫苗组合物。

增强或促进动物、包括人对抗原免疫应答的方法是本发明的实施方案。例如,通过鉴别需要对抗原/表位有效免疫应答的动物,并提供所述动物包含抗原/表位以及有效增强或促进对抗原/表位免疫应答的相当数量病毒唑的组合物,可以实现这种方法。在某些实施方案中,病毒唑和抗原分别给予,而不是在单一混合物中。在这种情况下,优选在给予抗原之前或之后短时间给予病毒唑。优选的方法包括提供有此需要的动物病毒唑和肝炎抗原(例如 HAV 抗原、HBV 抗原、HCV 抗原、编码这些分子的核酸或其任意组合)。其中某些方法包括 HCV 抗原,例如包含 SEQ. ID. NO.: 1 或其具有 SEQ. ID. NO.: 1 的至少

2500、2000、1600、1200、800、400、200、100、50、10 或 3 个连续氨基酸的片段的肽。另外的方法包括包含病毒唑和 SEQ. ID. NO.: 13 的编码核酸或者编码一种或多种上述片段的核酸的组合物。

例如, 某些优选的方法涉及利用组合物(例如疫苗), 其包含病毒唑以及包含 SEQ. ID. NO.: 1 或其对应于 HCV 结构域的特定片段的肽, 包括但不限于包含 SEQ. ID. NO.: 1 的 1-182、183-379、380-729、730-1044、1045-1657、1658-1711、1712-1971 或者 1972-3011 氨基酸的肽。特别优选的方法涉及利用疫苗组合物, 其包含 SEQ. ID. NO.: 17 的 NS3/4A 片段或缺少蛋白水解裂解位点的 NS3/4A 突变体(例如 SEQ. ID. NO.: 29-32 和 43-49)、或其至少 3、4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段(例如 SEQ. ID. NO.: 26、27 和 33-42)。包含病毒唑以及编码这些片段的核酸的组合物也可以用于此处所述方法。

其它实施方案涉及治疗和预防 HCV 感染的方法。通过一种方法, 病毒唑和 HCV 抗原或表位用于制备治疗和/或预防 HCV 感染的药物。通过另一种方法, 鉴别需要预防和/或治疗 HCV 感染的药物的个体, 并提供所述个体包含病毒唑和 HCV 抗原或表位的药物, 其优选 SEQ. ID. NO.: 1 所示的表位, 更优选具有 SEQ. ID. NO.: 1 至少 2500、2000、1600、1200、800、400、200、100、50、10 或 3 个连续氨基酸的片段, 或最优选 SEQ. ID. NO.: 1 的例如 1-182、183-379、380-729、730-1044、1045-1657、1658-1711、1712-1971 或 1972-3011 的片段, 或编码 SEQ. ID. NO.: 1 或上述片段的核酸。特别优选的方法涉及利用疫苗组合物, 其包含病毒唑以及 SEQ. ID. NO.: 17 的 NS3/4A 片段或缺少蛋白水解裂解位点的 NS3/4A 突变体(例如 SEQ. ID. NO.: 29-32 和 43-49)、或其至少 3、4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段(例如 SEQ. ID. NO.: 25-27 和 33-42)、编码一种或多种这些分子的核酸。下节更详细讨论了病毒唑作为佐剂的用途。

病毒唑

可以根据草药药剂学的以生产给予动物(例如包括人在内的哺乳动物)的药物的常规方法制备此处所述组合物。病毒唑可以从市场供

应商处获得(例如 Sigma 和 ICN)。病毒唑和/或抗原可以经过或未经改变而配制成疫苗。例如,病毒唑和/或抗原可以改变或衍生,以制备更为稳定的分子和/或更有效的佐剂。通过一种方法,可以将分子偶联到支持物,例如亲水聚合物(例如聚乙二醇),从而能增强病毒唑和/或抗原的稳定性。

利用合理药物设计和组合化学的常规方法可以产生很多的病毒唑衍生物。例如, Molecular Simulations Inc.(MSI)以及其它许多供应商,提供能使技术人员构建有机分子组合文库的软件。例如, C2.Analog Builder 程序可以整合 MSI 的 Cerius2 分子多样性软件套件,以产生病毒唑衍生物文库,其能够用于此处所述实施方案。(例如参见 <http://msi.com/life/products/cerius2/index.html>)。

通过一种方法,在计算机可读介质上记录病毒唑的化学结构,可由一种或多种建模软件应用程序访问。C2.Analog Builder 程序与 C2Diversity 程序联用,可以使用户基于例如每个取代基位置的 R-基团的多样性,而产生非常大的虚拟文库。然后利用常规化学方法制备或可以从商业来源获得在虚拟文库中创造的与建模病毒唑衍生物结构相同的化合物。

然后利用试验筛选新制备的病毒唑衍生物,确定分子的佐剂活性大小和/或其调节免疫应答能力的大小。某些试验可以包括虚拟的药物筛选软件,例如 C2.Ludi。C2.Ludi 软件程序使用户探测分子(例如病毒唑衍生物)数据库,确定其与目的蛋白质(例如 RAC2 或另一种 GTP 结合蛋白质)的活性部位相互作用的能力。以虚拟药物筛选软件发现的预测的相互作用为基础,利用常规试验确定佐剂活性和/或分子调节免疫应答的大小,按另外特征排列病毒唑衍生物的优先次序。实施例 1 描述了用于评价病毒唑的佐剂活性的若干试验。

实施例 1

下列试验可用于任何病毒唑衍生物或病毒唑衍生物的组合,以确定特定组合物的佐剂活性程度。第一组实验中,在第 0 和第 4 周用 10 μ g

或 100 μ g 重组丙型肝炎病毒非结构 3(rNS3)蛋白质 i.p (腹膜内) 或 s.c. (皮下) (例如在尾尖) 免疫每组 3-5 只 Balb/c 小鼠(BK Universal, Uppsala, Sweden)。rNS3 溶于磷酸盐缓冲盐水(PBS)或包含 1mg 病毒唑(得自 ICN, Costa Mesa, CA)的 PBS。小鼠每次注射总体积 100 μ l。

在首次 i.p. 免疫后 2、4 和 6 周, 所有小鼠通过后眼窝放血取样。收集血清样品, 分析针对 rNS3 抗体的存在。为确定抗体滴度, 进行酶免疫分析(EIA)。(例如参见 Hultgren 等人, *J Gen Virol.* 79:2381-91 (1998)和 Hultgren 等人, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:630-632 (1997))。将 405nm 处光密度超过非免疫小鼠两倍时的最高血清稀释度, 记为抗体水平。

接受混合 1mg 病毒唑的 10 μ g 或 100 μ g rNS3 的 PBS 的小鼠, 一致显示较高水平的 NS3 抗体。免疫 2 周后 EIA 检测的抗体滴度如表 1 所示。具有 1mg 病毒唑以及 10 μ g 或 100 μ g rNS3 的疫苗制剂诱导的抗体滴度显著高于仅由 rNS3 组成的疫苗制剂。

第二组实验中, 在第 0 和第 4 周用包含 0 mg、1 mg、3 mg 或 10 mg 病毒唑(Sigma)的 10 μ g 或 50 μ g rNS3 的 100 μ l 磷酸盐缓冲盐水腹膜内免疫每组 8 只 Balb/c 小鼠。在第 4、6 和 8 周, 小鼠取血, 分离血清并冷冻。研究完成以后, 如上所述测试血清的重组 NS3 抗体的水平。利用 Student's t 检验(参数分析)或 Mann-Whitney(非参数分析)以及 StatView 4.5 程序包(Abacus Concepts, Berkely, CA)对 rNS3 的平均抗体水平进行组间比较。病毒唑以 3 个剂量加入 10 μ g NS3 时, 其佐剂效应列于表 1。病毒唑以 3 个剂量加入 50 μ g NS3 时, 其佐剂效应列于表 2。接受不同的 10 μ g 或 50 μ g rNS3 以及不同剂量病毒唑的小鼠, 其平均 rNS3 抗体滴度的参数比较分别列于表 3 和 4。接受不同的 10 μ g 或 50 μ g rNS3 以及不同剂量病毒唑的小鼠, 其平均 NS3 抗体滴度的非参数比较分别列于表 5 和 6。给出的数值代表重组 rNS3 的终点滴度。

表 1

病毒唑量 (mg/剂量)	免疫原量 (μ g/剂量)	小鼠 ID	指定周 rNS3 抗体滴度		
			第 4 周	第 6 周	第 8 周
无	10	5:1	300	1500	1500
无	10	5:2	<60	7500	1500
无	10	5:3	<60	1500	300
无	10	5:4	60	1500	1500
无	10	5:5	<60	1500	nt
无	10	5:6	60	1500	1500
无	10	5:7	<60	7500	7500
无	10	5:8	300	37500	7500
组平均滴度 (平均值 $\pm$ SD)			180 $\pm$ 139	7500 $\pm$ 12421	3042 $\pm$ 3076
1	10	6:1	300	37500	37500
1	10	6:2	<60	1500	1500
1	10	6:3	300	37500	187500
1	10	6:4	300	37500	7500
1	10	6:5	60	nt	nt
1	10	6:6	<60	37500	7500
1	10	6:7	<60	37500	7500
1	10	6:8	300	7500	7500
组平均滴度 (平均值 $\pm$ SD)			252 $\pm$ 107	28071 $\pm$ 16195	36642 $\pm$ 67565
3	10	7:1	60	37500	7500
3	10	7:2	60	37500	37500
3	10	7:3	300	7500	7500
3	10	7:4	300	37500	7500
3	10	7:5	300	37500	37500
3	10	7:6	300	37500	37500
3	10	7:7	60	7500	7500
3	10	7:8	60	37500	37500
组平均滴度 (平均值 $\pm$ SD)			180 $\pm$ 128	30000 $\pm$ 13887	22500 $\pm$ 34637
10	10	8:1	300	37500	37500
10	10	8:2	300	37500	37500
10	10	8:3	<60	300	300
10	10	8:4	60	7500	7500
10	10	8:5	<60	300	300
10	10	8:6	<60	37500	37500
10	10	8:7	<60	7500	7500
10	10	8:8	<60	nt	nt
组平均滴度 (平均值 $\pm$ SD)			220 $\pm$ 139	18300 $\pm$ 18199	18300 $\pm$ 18199

表 2

病毒唑量 (mg/剂量)	免疫原量 (μ g/剂量)	小鼠 ID	指定周 rNS3 抗体滴度		
			第 4 周	第 6 周	第 8 周
无	50	1:1	60	7500	7500
无	50	1:2	60	7500	7500
无	50	1:3	60	7500	7500
无	50	1:4	<60	1500	300
无	50	1:5	300	37500	37500
无	50	1:6	60	7500	7500
无	50	1:7	60	37500	7500
无	50	1:8	.	.	.
组平均滴度 (平均值 $\pm$ SD)			100 $\pm$ 98	15214 $\pm$ 15380	10757 $\pm$ 12094
1	50	2:1	60	7500	7500
1	50	2:2	300	37500	7500
1	50	2:3	60	187500	7500
1	50	2:4	60	37500	187500
1	50	2:5	60	37500	7500
1	50	2:6	60	37500	37500
1	50	2:7	300	37500	7500
1	50	2:8	300	37500	37500
组平均滴度 (平均值 $\pm$ SD)			150 $\pm$ 124	52500 $\pm$ 55549	37500 $\pm$ 62105
3	50	3:1	60	37500	7500
3	50	3:2	300	37500	37500
3	50	3:3	300	37500	7500
3	50	3:4	60	37500	7500
3	50	3:5	300	37500	7500
3	50	3:6	60	37500	7500
3	50	3:7	-	7500	37500
3	50	3:8	1500	7500	37500
组平均滴度 (平均值 $\pm$ SD)			387 $\pm$ 513	30000 $\pm$ 13887	18750 $\pm$ 15526
10	50	4:1	300	7500	7500
10	50	4:2	300	37500	37500
10	50	4:3	60	7500	7500
10	50	4:4	60	7500	7500
10	50	4:5	60	1500	1500
10	50	4:6	60	7500	37500
10	50	4:7	-	7500	7500
10	50	8:8	60	37500	7500
组平均滴度 (平均值 $\pm$ SD)			140 $\pm$ 124	10929 $\pm$ 11928	15214 $\pm$ 15380

表 3

组	周	平均值±SD	组	平均值±SD	分析	p 值
10μg NS3/ 无病毒唑	4	180 ±139	10 μg NS3/ 1 mg 病毒唑	252 ±107	Students t 检验	0.4071
	6	7500 ±12421		28071 ±16195	Students t 检验	0.0156
	8	3042 ±3076		36642 ±67565	Students t 检验	0.2133
10μg NS3/ 无病毒唑	4	180 ±139	10 μg NS3/ 3 mg 病毒唑	180± 128	Students t 检验	1.000
	6	7500 ±12421		30000± 13887	Students t 检验	0.0042
	8	3042 ±3076		22500± 34637	Students t 检验	0.0077
10μg NS3/ 无病毒唑	4	180 ±139	10 μg NS3/ 10mg 病毒唑	220± 139	Students t 检验	0.7210
	6	7500 ±12421		18300± 18199	Students t 检验	0.1974
	8	3042 ±3076		18300± 18199	Students t 检验	0.0493

表 4

组	周	平均值±SD	组	平均值±SD	分析	p 值
50μg NS3/ 无病毒唑	4	100 ±98	50 μg NS3/ 1 mg 病毒唑	150 ±124	Students t 检验	0.4326
	6	15214 ±15380		52500 ±55549	Students t 检验	0.1106
	8	10757 ±12094		37500 ±62105	Students t 检验	0.2847
50μg NS3/ 无病毒唑	4	100 ±98	50 μg NS3/ 3 mg 病毒唑	387 ±513	Students t 检验	0.2355
	6	15214 ±15380		30000 ±13887	Students t 检验	0.0721
	8	10757 ±12094		18750 ±15526	Students t 检验	0.2915
50μg NS3/ 无病毒唑	4	100 ±98	50 μg NS3/ 10mg 病毒唑	140 ±124	Students t 检验	0.5490
	6	15214 ±15380		10929 ±11928	Students t 检验	0.5710
	8	10757 ±12094		15214 ±15380	Students t 检验	0.5579

显著性水平: NS = 不显著; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$

表 5

组	周	平均值±SD	组	平均值±SD	分析	p 值
10μg NS3/ 无病毒唑	4	180 ±139	10 μg NS3/ 1 mg 病毒唑	252 ±107	Mann- Whitney	0.4280
	6	7500 ±12421		28071 ±16195	Mann- Whitney	0.0253
	8	3042 ±3076		36642 ±67565	Mann- Whitney	0.0245
10μg NS3/ 无病毒唑	4	180 ±139	10 μg NS3/ 3 mg 病毒唑	180± 128	Mann- Whitney	0.0736
	6	7500 ±12421		30000± 13887	Mann- Whitney	0.0050
	8	3042 ±3076		22500± 34637	Mann- Whitney	0.0034
10μg NS3/ 无病毒唑	4	180 ±139	10 μg NS3/ 10mg 病毒唑	220± 139	Mann- Whitney	0.8986
	6	7500 ±12421		18300± 18199	Mann- Whitney	0.4346
	8	3042 ±3076		18300± 18199	Mann- Whitney	0.2102

表 6

组	周	平均值±SD	组	平均值±SD	分析	p 值
50μg NS3/ 无病毒唑	4	100 ±98	50 μg NS3/ 1 mg 病毒唑	150 ±124	Mann- Whitney	0.1128
	6	15214 ±15380		52500 ±55549	Mann- Whitney	0.0210
	8	10757 ±12094		37500 ±62105	Mann- Whitney	0.1883
50μg NS3/ 无病毒唑	4	100 ±98	50 μg NS3/ 3 mg 病毒唑	387 ±513	Mann- Whitney	0.1400
	6	15214 ±15380		30000 ±13887	Mann- Whitney	0.0679
	8	10757 ±12094		18750 ±15526	Mann- Whitney	0.2091
50μg NS3/ 无病毒唑	4	100 ±98	50 μg NS3/ 10 mg 病毒唑	140 ±124	Mann- Whitney	0.4292
	6	15214 ±15380		10929 ±11928	Mann- Whitney	0.9473
	8	10757 ±12094		15214 ±15380	Mann- Whitney	0.6279

显著性水平: NS = 不显著; *= $p<0.05$; **= $p<0.01$; ***= $p<0.001$

上述数据证明,病毒唑促进或增强对 HCV 抗原或 HCV 表位的免疫应答。用包含仅仅 1 mg 病毒唑和 10 μ g rNS3 抗原的疫苗组合物免疫以后,激发了对 rNS3 的有效免疫应答。上述数据也提供了证据,表明足以促进 25-30 g 小鼠对抗原免疫应答的病毒唑的量介于每次注射 1-3 mg。然而,应该明白该量仅仅意在指导,而不应理解为以任何方式限制本发明的范畴。尽管如此,数据表明包含大约 1-3 mg 剂量病毒唑的疫苗组合物,诱导的免疫应答比没有病毒唑激发的免疫应答高出 12 倍多(表 3 和 4)。因此,病毒唑对动物体液免疫应答具有显著的佐剂效应,从而增强或促进对抗原的免疫应答。以下实施例描述了为更好地理解增强或促进对抗原免疫应答所需的病毒唑量进行的实验。

实施例 2

为确定足以提供佐剂效应的病毒唑剂量,进行下列实验。第一组实验中,用单独 20 μ g rNS3 或 20 μ g rNS3 与 0.1 mg、1 mg 或 10 mg 病毒唑的混合物免疫各组小鼠(每组 3 只)。然后通过 EIA 测定针对抗原的抗体水平。绘制第 1 和第 3 周的平均终点滴度曲线,如图 2 所示。发现病毒唑提供的佐剂效应依赖所提供病毒唑的剂量而具有不同的动力学。例如,发现低剂量(<1 mg)病毒唑甚至在第 1 周而不是第 3 周增强抗体水平,然而发现较高剂量(1-10 mg)在第 3 周增强抗体水平。

也进行了第二组实验。在这些实验中,各组小鼠注射包含不同量病毒唑和 rNS3 的疫苗组合物,并监控这些动物中的 IgG 应答。疫苗组合物包含大约 100 μ l 磷酸盐缓冲盐水和 20 μ g rNS3,以及含或不合 0.1 mg、1.0 mg 或 10 mg 病毒唑(Sigma)。第 6 周小鼠取血,如前所述通过 EIA 确定 rNS3 特异性 IgG 水平。如表 7 所示,对 25-30g 小鼠在每次注射 1-10 mg 剂量范围内,维持抗体水平的佐剂效应最显著。

表 7

免疫原	与免疫原混合的病毒唑的量 (mg)	小鼠 ID	指定周 rNS3 IgG 终点滴度		
			第 1 周	第 2 周	第 3 周
20 μ g rNS3	无	1	60	360	360
20 μ g rNS3	无	2	360	360	2160
20 μ g rNS3	无	3	360	2160	2160
		平均	260 $\pm$ 173	960 $\pm$ 1039	1560 $\pm$ 1039
20 μ g rNS3	0.1	4	2160	12960	2160
20 μ g rNS3	0.1	5	60	60	60
20 μ g rNS3	0.1	6	<60	2160	2160
			1110 $\pm$ 1484	5060 $\pm$ 6921	1460 $\pm$ 1212
20 μ g rNS3	1.0	7	<60	60	12960
20 μ g rNS3	1.0	8	<60	2160	2160
20 μ g rNS3	1.0	9	360	2160	2160
		平均	360	1460 $\pm$ 1212	5760 $\pm$ 6235
20 μ g rNS3	10.0	10	360	12960	77760
20 μ g rNS3	10.0	11	<60	2160	12960
20 μ g rNS3	10.0	12	360	2160	2160
		平均	360	5760 $\pm$ 6235	30960 $\pm$ 40888

第三组实验中, 研究首次和加强注射后病毒唑的佐剂效应。在这些实验中, 小鼠两次腹膜内注射包含 10 μ g rNS3 以及含或不含病毒唑的疫苗组合物, 如前所述监控对抗原的 IgG 亚类应答。相应的, 在第 0 周和第 4 周用包含单独 10 μ g 重组 NS3、含或不含 0.1 或 1.0 mg 病毒唑(Sigma)的 100 μ l 磷酸盐缓冲液免疫小鼠。第 6 周小鼠取血, 如前所述通过 EIA 确定 NS3 特异性 IgG 亚类。如表 8 所示, 注射之前于免疫原中加入病毒唑, 不改变 NS3 特异性免疫应答中 IgG 亚类应答。因此, Th1/Th2 平衡的改变无法解释包含病毒唑和抗原的疫苗组合物的佐剂效应。似乎另一机理可能负责病毒唑的佐剂效应。

表 8

免疫原	与免疫原混合的病毒唑的量 (mg)	小鼠 ID	指定的 NS3 IgG 亚类终点滴度			
			IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
10 μ g rNS3	无	1	360	60	<60	60
10 μ g rNS3	无	2	360	<60	<60	60
10 μ g rNS3	无	3	2160	60	<60	360
		平均	960 $\pm$ 1039	60	-	160 $\pm$ 173
10 μ g rNS3	0.1	4	360	<60	<60	60
10 μ g rNS3	0.1	5	60	<60	<60	<60
10 μ g rNS3	0.1	6	2160	60	60	360
			860 $\pm$ 1136	60	60	210 $\pm$ 212
10 μ g rNS3	1.0	7	2160	<60	<60	60
10 μ g rNS3	1.0	8	360	<60	<60	<60
10 μ g rNS3	1.0	9	2160	<60	<60	60
		平均	1560 $\pm$ 1039	-	-	60

本实施例的数据另外证明, 病毒唑可以作为佐剂给药, 并证实病毒唑的剂量可以调节佐剂效应的动力学。以下实施例描述了为评价病毒唑增强或促进对抗原免疫应答的能力进行的另一项试验。

实施例 3

这项试验可用于任何病毒唑衍生物或病毒唑衍生物的组合, 以确定特定疫苗制剂调节细胞免疫应答的程度。为了确定 CD4⁺T 细胞对包含病毒唑疫苗的应答, 用 100 μ g rNS3 的 PBS 或者 100 μ g rNS3 和 1 mg 病毒唑的 PBS s.c.免疫各组小鼠。免疫 10 天后处死小鼠, 采集其淋巴结并引流(drain)。然后进行体外记忆试验。(例如参见 Hultgren 等人, *J Gen Virol.* 79:2381-91 (1998)以及 Hultgren 等人, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:630-632 (1997))。由培养 96 h 掺入的 [³H]胸苷测定 CD4⁺T 细胞增殖量。

如图 3 所示, 用混合 1 mg 病毒唑的 100 μ g rNS3 免疫的小鼠, 其 T 细胞增殖应答比用 100 μ g rNS3 的 PBS 免疫的小鼠大很多。这些数据提供了病毒唑增强或促进细胞免疫应答(例如, 通过促进有效致敏 T 细胞)的进一步证据。下节讨论可用于此处所述实施方案的一些抗原和

表位。

抗原和表位

实际上能用于在动物中产生免疫应答的任何抗原都可以与病毒唑组合，以制备此处所述组合物。也就是说，能够掺入该组合物(例如疫苗)的抗原包含细菌抗原或表位、真菌抗原或表位、植物抗原或表位、霉菌抗原或表位、病毒抗原或表位、癌细胞抗原或表位、毒素抗原或表位、化学抗原或表位以及自身抗原或表位。尽管这些分子中许多无需佐剂诱导显著的免疫应答，病毒唑能够连同或结合"强"或"弱"抗原或表位而给药，以增强或促进对所述抗原或表位的免疫应答。此外，利用病毒唑为佐剂可以允许使用更少量的抗原而保持免疫原性。

除肽抗原之外，基于核酸的抗原可用于此处所述疫苗组合物。已知多种基于核酸的疫苗，预期通过利用病毒唑重新配制，能够加强这些组合物以及免疫治疗方法。(例如参见 U.S. Pat. No. 5,589,466 和 6,235,888)。例如，通过一种方法，编码目的多肽抗原的基因克隆到引入受试者中能够表达该多肽的表达载体。利用与病毒唑的混合物或者连同病毒唑一起(例如，在表达构建体之后不久，于相同位点给予病毒唑)，将该表达构建体引入受试者。另选地，利用与病毒唑的混合物或者连同病毒唑一起，将编码目的多肽抗原的 RNA 提供给受试者。

抗原是 DNA 时(例如 DNA 疫苗组合物制剂)，可以使用合适启动子，包括猿猴病毒 40(SV40)、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子、人类免疫缺陷性病毒(HIV)例如 HIV 长末端重复(LTR)启动子、莫洛尼(Moloney)病毒、ALV、巨细胞病毒(CMV)例如 CMV 立即早期启动子、Epstein Barr 病毒(埃-巴二氏病毒，EB 病毒)(EBV)、劳氏肉瘤病毒(RSV)以及人类基因例如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸和人金属硫蛋白的启动子。某些实施方案，特别是生产人基因疫苗中利用的多腺苷酸化信号的实例，包括而不限于 SV40 多腺苷酸化信号和 LTR 多腺苷酸化信号。特别使用 pCEP4 质粒(Invitrogen, San Diego Calif.)中的 SV40 多腺苷酸化信号(称为 SV40 多腺苷酸化信号)。

除基因表达所需调节元件之外，基因构建体中还可能包括其它元件。这些另外的元件包括增强子。增强子可能选自包括而限于：人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸以及病毒增强子，例如来自 CMV、RSV 和 EBV。基因构建体能够具备哺乳动物复制起点，以使该构建体在染色体外维持并于细胞中产生多拷贝的构建体。Invitrogen(San Diego, CA)的质粒 pCEP4 和 pREP4 包含 Epstein Barr 病毒复制起点以及核抗原 EBNA-1 编码区，其不整合而产生高拷贝的附加型复制。一切形式的 DNA，不论复制型或非复制型，只要不整合到基因组中，并且可以表达，都可以使用。以下实施例描述了包含基于核酸的抗原以及病毒唑的组合物的用途。

实施例 4

以下描述了用包含基于核酸的抗原以及病毒唑的疫苗免疫动物。5-6 周龄雌雄 Balb/c 小鼠通过腹膜内注射 0.3ml 2.5%阿佛丁(Avertin)进行麻醉。在前大腿造成 1.5cm 切口，四头肌直接可见。一组小鼠注射大约 20:g 具有巨细胞病毒(CMV)启动子驱动的 gp-120 基因的表达构建体，另一组小鼠注射大约 5:g 编码 gp-120 的加帽的体外转录 RNA(例如 SP6、T7 或 T3(Ambion))。这两组是对照。第三组小鼠注射与 1 mg 病毒唑混合的大约 20:g 具有 gp-120 基因和 CMV 启动子的表达载体，第四组小鼠注射与 1 mg 病毒唑混合的大约 5:g 加帽的体外转录 RNA。疫苗在 0.1 ml 溶液中通过 1 cc 注射器 27 口径针头注射一分钟，从肌肉远端插入点大约 0.5cm 处插入膝部大约 0.2cm 深。为将来定位，注射部位放置缝线，用不锈钢夹封闭皮肤。

注射前(第 0 天)直到注射后 40 天以上获取血样。各样品血清系列稀释，利用酵母中制备的重组 gp-120 蛋白质为抗原，以标准 ELISA 技术分析检测抗体。所有样品都将检测到 gp-120 特异性的 IgG 和 IgM 抗体，但根据血清中检测的抗体量和/或滴度测量包含病毒唑的第 3 和第 4 组将具有较高的对 gp-120 的免疫应答。

本发明优选实施方案包含病毒唑和病毒优选肝炎病毒抗原或表

位。例如，组合物包含病毒唑和 HAV 抗原、HBV 抗原、HCV 抗原、或一种或多种这些病毒上这些抗原和表位的任何组合。肝炎抗原可以是肽或核酸。例如，可用于抗 HAV 感染接种的组合物包含病毒唑以及具有 SEQ ID. NO.: 12 的长度为至少 3-10 个连续氨基酸、10-50 个连续氨基酸、50-100 个连续氨基酸、100-200 个连续氨基酸、200-400 个连续氨基酸、400-800 个连续氨基酸、800-1200 个连续氨基酸、1200-1600 个连续氨基酸、1600-2000 个连续氨基酸以及 2000-2227 个连续氨基酸的 HAV 肽。

此外，上述包含病毒唑和编码一种或多种 HAV 肽的核酸的组合物可以用于治疗或预防 HAV 感染。优选的基于核酸的抗原包括 HAV 序列的至少 9 个连续核苷酸的核苷酸序列(例如 SEQ. ID. NO.: 15)。也就是说，基于核酸的抗原可以包含 SEQ. ID. NO.: 15 的至少 9-25 个连续核苷酸、25-50 个连续核苷酸、50-100 个连续核苷酸、100-200 个连续核苷酸、200-500 个连续核苷酸、500-1000 个连续核苷酸、1000-2000 个连续核苷酸、2000-4000 个连续核苷酸、4000-8000 个连续核苷酸以及 8000-9416 个连续核苷酸、或者对应于这些序列的 RNA。

类似地，优选的 HBV 疫苗实施方案包含病毒唑以及 HBsAg(SEQ. ID. NO.: 10)或 HBcAg 和 HBeAg(SEQ. ID. NO.: 11)的至少 3 个连续氨基酸的 HBV 肽。也就是说，某些实施方案具有病毒唑以及具有 SEQ. ID. NO.: 10 或 SEQ. ID. NO.: 11 的长为至少 3-10 个连续氨基酸、10-15 个连续氨基酸、50-100 个连续氨基酸、100-150 个连续氨基酸、150-200 个连续氨基酸以及 200-226 个连续氨基酸的 HBV 肽。

此外，上述包含病毒唑和编码一种或多种 HBV 肽的核酸的组合物，可以用于治疗或预防 HBV 感染。优选的基于核酸的抗原包括 HBV 的至少 9 个连续核苷酸的核苷酸序列(例如 SEQ. ID. NO.: 14)。也就是说，基于核酸的抗原可以包含 SEQ. ID. NO.: 14 的至少 9-25 个连续核苷酸、25-50 个连续核苷酸、50-100 个连续核苷酸、100-200 个连续核苷酸、200-500 个连续核苷酸、500-1000 个连续核苷酸、1000-2000 个连续核苷酸、2000-4000 个连续核苷酸、4000-8000 个连续核苷酸以及

8000-9416 个连续核苷酸、或者对应于这些序列的 RNA。以下实施例描述了病毒唑连同商品化 HBV 疫苗制剂的用途。

实施例 5

与包含 HBsAg 和明矾的两个剂量商品化疫苗(Engerix, SKB)混合，测定病毒唑的佐剂效应。大约 0.2 μg 或 2μg Engerix 疫苗与 PBS 或 1 mg 病毒唑的 PBS 混合，混合物腹膜内注射各组小鼠(每组 3 只)。第 4 周给与包含相同混合物的加强剂量，所有小鼠第 6 周取血。血清样品从 1:60 稀释到 1:37500，如上所述 EIA 测定稀释物，只是以纯化的人 HBsAg 用作固相抗原。如表 9 所示，具有病毒唑的疫苗制剂增强对 2 μg 现有疫苗的应答，即使该疫苗已经含有明矾。也就是说，通过将病毒唑加入亚适疫苗剂量(即单独不诱导可检测抗体的剂量)，抗体变得可以检测，提供证据证明加入病毒唑可以使在疫苗制剂中使用较低的抗原量，而不影响免疫应答。

表 9

周	EIA 中 HBsAg 的终点抗体滴度											
	0.02μg Engerix						0.2μg Engerix					
	无病毒唑			1mg 病毒唑			无病毒唑			1mg 病毒唑		
	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3
6	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	<60	300	60	<60

某些 HCV 疫苗组合物包含病毒唑和 SEQ. ID. NO.: 1 的至少 3 个连续氨基酸的 HCV 肽、或者编码所述 HCV 肽的核酸。也就是说，疫苗组合物可以包含病毒唑以及具有 SEQ ID. NO.: 12 的长度至少为 3-10 个连续氨基酸、10-50 个连续氨基酸、50-100 个连续氨基酸、100-200 个连续氨基酸、200-400 个连续氨基酸、400-800 个连续氨基酸、800-1200 个连续氨基酸、1200-1600 个连续氨基酸、1600-2000 个连续氨基酸、2000-2500 个连续氨基酸以及 2500-3011 个连续氨基酸的

一种或多种 HCV 肽、或者编码一种或多种所述片段的核酸。

优选的 HCV 组合物包含病毒唑以及 HCV 核心蛋白质(SEQ. ID. NO.: 2)、HCV E1 蛋白质(SEQ. ID. NO.: 3)、HCV E2 蛋白质(SEQ. ID. NO.: 4)、HCV NS2(SEQ. ID. NO.: 5)、HCV NS3(SEQ. ID. NO.: 6)、HCV NS4A(SEQ. ID. NO.: 7)、HCV NS4B(SEQ. ID. NO.: 8)或者 HCV NS5A/B(SEQ. ID. NO.: 9)的至少 3 个连续氨基酸的肽、或者由这些结构域的组合组成的肽。也就是说, 优选的 HCV 疫苗包含病毒唑以及具有(SEQ. ID. NO.: 2-9)中任意一种或多种的长为至少 3-10 个连续氨基酸、10-50 个连续氨基酸、50-100 个连续氨基酸、100-200 个连续氨基酸、200-400 个连续氨基酸、400-800 个连续氨基酸以及 800-1040 个连续氨基酸的肽。这些结构域对应于 SEQ. ID. NO.: 1 的氨基酸残基 1-182、183-379、380-729、730-1044、1045-1657、1658-1711、1712-1971 或 1972-3011。因此, 优选实施方案也包括 SEQ. ID. NO.: 1 的 1-182、183-379、380-729、730-1044、1045-1657、1658-1711、1712-1971 或 1972-3011 中的一种或多种、或其片段。

包含病毒唑以及编码一种或多种上述肽的疫苗组合物也是实施方案。优选的基于核酸的抗原包括 HCV 的至少 9 个连续核苷酸的核苷酸序列(SEQ. ID. NO.: 13)。也就是说, 基于核酸的抗原可以包含 SEQ. ID. NO.: 13 中任何一个的至少 9-25 个连续核苷酸、25-50 个连续核苷酸、50-100 个连续核苷酸、100-200 个连续核苷酸、200-500 个连续核苷酸、500-1000 个连续核苷酸、1000-2000 个连续核苷酸、2000-4000 个连续核苷酸、4000-8000 个连续核苷酸以及 8000-9416 个连续核苷酸、或者对应于这些序列的 RNA。下节讨论包含病毒唑和抗原的某些组合物。

包含病毒唑和抗原的组合物

包含病毒唑和病原体(例如病毒、细菌、霉菌、酵母和寄生虫)的抗原或表位的组合物(例如疫苗)可能包含其它成分, 包括但不限于佐剂、粘合剂、赋形剂例如稳定剂(以促进长期储存)、乳化剂、增稠剂、盐、防腐剂、溶剂、分散剂、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂以及吸

收延迟剂等。这些组合物适合于治疗动物，作为预防措施避免疾病或不适、或者作为治疗手段治疗已经受疾病或不适折磨的动物。

疫苗中可以存在其它许多成分。例如，病毒唑和抗原可以与常规赋形剂（例如不与病毒唑和/或抗原发生有害反应的、适于肠道外、肠内（例如经口）或局部施用的、药学可接受的有机或无机载体物质）混合使用。药学可接受的合适载体包括而不限于水、盐溶液、醇、阿拉伯胶、植物油、苯甲醇、聚乙二醇、明胶、碳水化合物例如乳糖、直链淀粉或淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、芳香油、脂肪酸、甘油一酯和甘油二酯、季戊四醇脂肪酸酯、羟基甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮等。Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 15 版, Easton:Mack Publishing Company, 1405-1412 和 1461-1487 页(1975) 以及 The National Formulary XIV, 第 14 版, Washington, American Pharmaceutical Association(1975)描述了更多的合适载体。

此处所述基因构建体可能用试剂配制或连同试剂一起给药，相对于缺少该试剂时给予相同基因疫苗时细胞对基因构建体的摄取和表达，该试剂增加细胞摄取和/或表达该基因构建体。1993.1.26 申请的美国系列 No. 08/008,342、1993.3.11 申请的美国系列 No. 08/029,336、1993.9.21 申请的美国系列 No. 08/125,012、1994.1.26 申请的 PCT 专利申请序号 PCT/US94/00899 以及 1994.4.1 申请的美国系列 No. 08/221,579 中描述了该试剂及其连同基因构建体的给药规程。该试剂的实例包括：CaPO₄, DEAE 葡聚糖，阴离子脂类；细胞外基质活化酶类；皂甙类；凝集素类；雌激素化合物和甾类激素；羟基化低级烷；二甲基亚砷(DMSO)；脲；以及苯甲酸酯酰基苯胺(anilides)、脘、氨基甲酸乙酯及其盐酸盐，例如局部麻醉剂家族。此外，该基因构建体封进脂类/聚阳离子复合物胶囊内部，或连同脂类/聚阳离子复合物一起给药。

疫苗可以被灭菌，并且如果需要，可以混合辅助剂，例如不与病毒唑或抗原发生有害反应的润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等。

可以根据患者个体和疾病的类型与阶段,以及本领域技术人员已知的其它因素,改变特定疫苗制剂给药的有效剂量和方法。利用细胞培养或实验动物的标准药理学程序,例如 ED_{50} (50%群体的有效治疗剂量),确定疫苗的疗效和毒性。细胞培养分析和动物研究获取的数据,可用于制订人用剂量范围。疫苗剂量最好处于包括 ED_{50} 而无毒的循环浓度范围内。在此范围内,依赖病毒唑衍生物和抗原的类型、使用的剂型、患者的敏感性以及给药途径而改变剂量。

病毒唑已经上市几年了,已知很多剂型和给药途径。此处所述实施方案的范围内可以提供所有已知的剂型和给药途径。优选地,有效增强动物对抗原免疫应答的病毒唑量可以认为是足以在动物中达到大约 $0.25-12.5\mu\text{g/ml}$ 、优选大约 $2.8\mu\text{g/ml}$ 的抗原血清水平的量。某些实施方案中,根据给予疫苗的动物的体重确定病毒唑的量。因此,疫苗制剂中病毒唑的量可以为大约 $0.1-6.0\text{ mg/kg}$ 体重。也就是说,某些实施方案具有相当于大约 $0.1-1.0\text{ mg/kg}$ 、 $1.1-2.0\text{ mg/kg}$ 、 $2.1-3.0\text{ mg/kg}$ 、 $3.1-4.0\text{ mg/kg}$ 、 $4.1-5.0\text{ mg/kg}$ 、 5.1 和 6.0 mg/kg 动物体重的病毒唑的量。疫苗更常规包含大约 $0.25\text{ mg}-2000\text{ mg}$ 病毒唑的毒唑的量。也就是说,某些实施方案具有大约 $250\mu\text{g}$ 、 $500\mu\text{g}$ 、 1 mg 、 25 mg 、 50 mg 、 100 mg 、 150 mg 、 200 mg 、 250 mg 、 300 mg 、 350 mg 、 400 mg 、 450 mg 、 500 mg 、 550 mg 、 600 mg 、 650 mg 、 700 mg 、 750 mg 、 800 mg 、 850 mg 、 900 mg 、 1 g 、 1.1 g 、 1.2 g 、 1.3 g 、 1.4 g 、 1.5 g 、 1.6 g 、 1.7 g 、 1.8 g 、 1.9 g 和 2 g 的病毒唑。

可以通过加入足以增强对抗原免疫应答的相当数量病毒唑而改变常规疫苗制剂。也就是说,通过制剂中简单加入病毒唑,或者通过连同病毒唑施用常规疫苗(例如在提供抗原之前或之后不久),可以改变现有常规疫苗制剂。本领域技术人员应当理解,疫苗中抗原量可以依赖抗原类型及其免疫原性而变化。可以相应地改变疫苗中抗原数量。尽管如此,作为一般指导,疫苗可以具有大约 $0.25\text{ mg}-5\text{ mg}$ 、 $5-10\text{ mg}$ 、 $10-100\text{ mg}$ 、 $100-500\text{ mg}$ 以及 2000 mg 以上的抗原(例如肝炎病毒抗原)。

此处所述某些方法中,由医生个人考虑所治疗的患者选择精确的

病毒唑和/或抗原量。另外，病毒唑的量可以与相同或相当量的抗原联合或分别加入，在特定疫苗接种程序期间可以根据特定患者或特定抗原的因素调整这些量，以便提供充足水平。因此，可以考虑的特定患者和特定抗原的因素包括而不限于，患者疾病状态的严重性、年龄和患者体重、饮食、给药时间和频率、药物组合、反应敏感性以及对治疗的耐受/反应。下节描述可用于此处所述实施方案的新的 HCV 基因的发现以及突变体 HCV 序列的制备。

新的 NS3/4A 和突变体 NS3/4A 序列

从感染 HCV 患者克隆了新的核酸以及对应于 HCV NS3/4A 结构域的蛋白质(SEQ. ID. NOs.: 16 和 17)。检索 Genbank, 显示该克隆序列与 HCV 序列具有最大的同源性, 但与最接近的 HCV 亲本只有 93% 同源性(登录号 AJ 278830)。也制备了新 NS3/4A 肽的截短突变体以及缺少蛋白水解裂解位点的 NS3/4A 突变体。发现这些新肽和编码所述肽的核酸是有效的免疫原, 其可以混合病毒唑, 从而制备提供受者对 HCV 有效免疫应答的组合物。以下实施例描述了新 NS3/4A 结构域的克隆以及各种 NS3/4A 突变体的制备。

实施例 6

利用聚合酶链式反应(PCR)从感染 HCV 患者(HCV 基因型 1a)的血清扩增 NS3/4A 序列。根据标准程序从血清提取总 RNA、合成 cDNA、进行 PCR(Chen M 等人, J. Med. Virol. 43:223-226 (1995))。利用反义引物"NS4KR" (5'-CCG TCT AGA TCA GCA CTC TTC CAT TTC ATC-3' (SEQ. ID. NO.: 18))起始 cDNA 合成。由此 cDNA 扩增 2079bp 的 HCV DNA 片段, 对应于包含 NS3 和 NS4A 基因的 1007-1711 氨基酸。高保真度聚合酶 (Expand High Fidelity PCR, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany 用于 "NS3KF" 引物 (5'-CCT GAA TTC ATG GCG CCT ATC ACG GCC TAT-3' (SEQ. ID. NO.: 19) 和 NS4KR 引物。NS3KF 引物包含 EcoRI 限制酶裂解位点和起始密码子, NS4KR 引物包含 XbaI 限制酶裂解位点和终止密码

子。

然后测序扩增的片段 SEQ. ID. NO.: 16。序列比较分析揭示, 该基因片段确实扩增自基因型 1a 的病毒株。利用 NCBI 站点对 Genbank 数据库进行计算机 BLAST 检索, 揭示最靠近的 HCV 同源物具有 93% 的核苷酸序列一致性。

然后用 EcoRI 和 XbaI 消化扩增的 DNA 片段, 插入用相同酶消化的 pcDNA3.1/His 质粒(Invitrogen)。然后用 EcoRI 和 Xba I 消化质粒 NS3/4A-pcDNA3.1, 利用 QiaQuick 试剂盒 (Qiagen, Hamburg, Germany) 纯化插入片段, 连接到 EcoRI/Xba I 消化的 pVAX 载体 (Invitrogen), 得到 NS3/4A-pVAX 质粒。

通过缺失 NS3/4A DNA 的 NS4A 序列, 获得 rNS3 截短突变体。相应地, 利用分别包含 EcoRI 和 Not I 限制性位点的引物 NS3KF 和 3'NotI(5'-CCA CGC GGC CGC GAC GAC CTA CAG-3' (SEQ. ID. NO.: 20)), PCR 扩增 NS3/4A-pVAX 的 NS3 基因序列。NS3 片段(1850 bp)然后连接 EcoRI 和 Not I 消化的 pVAX 质粒, 得到 NS3-pVAX 载体。质粒在 BL21 大肠杆菌 (E.coli) 细胞中扩增。质粒测序, 利用限制性裂解检验, 结果与依据原始序列所预期的一致。

为改变 NS3 和 NS4A 之间的蛋白水解裂解位点, 利用 QUICKCHANGE™ 诱变试剂盒(Stratagene), 按照厂家说明, 诱变 NS3/4A-pVAX 质粒。为产生 "TPT" 突变, 利用引物 5'-CTGGAGGTCG TCACGCCTACCTGGGTGCTCGTT-3'(SEQ. ID. NO.: 21)和 5'-AC CGAGCACCCAGGTAGGCGTGACGACCTCCAG-3'(SEQ. TD. NO.: 22)扩增质粒, 得到 NS3/4A-TPT-pVAX。为产生 "RGT" 突变, 利用引物 5'-CTGGAGGTCGTCCGCGGTACCTGGGTGCTCGTT-3' (SEQ. ID. NO.: 23)和 5'-ACCGAGCACCCAGGTACC-GCGGACGACCT CCAG-3' (SEQ. ID. NO.: 24)扩增质粒, 得到 NS3/4A-RGT-pVAX。

测序所有诱变构建体以验证已经正确产生了突变。质粒在感受态 BL21 大肠杆菌中扩增。根据厂家说明(Qiagen GmbH, Hilden, FRG), 利用 Qiagen DNA 纯化柱纯化用来体内注射的质粒 DNA。分光光度法

(Dynaquant, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)测定得到的质粒 DNA 的浓度, 纯化的 DNA 以 1 mg/ml 浓度溶于无菌磷酸盐缓冲盐溶液(PBS)中。野生型和突变接头的氨基酸序列如表 10 所示。下节描述编码 HCV 肽的若干核酸。

表 10

质粒	推测的氨基酸序列
*NS3/4A-pVAX	TKYMTCMSADLEVVTSTWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 25)
NS3/4A-TGT-pVAX	TKYMTCMSADLEVVTGTWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 26)
NS3/4A-RGT-pVAX	TKYMTCMSADLEVVRGTWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 27)
NS3/4A-TPT-pVAX	TKYMTCMSADLEVVTPTWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 33)
NS3/4A-RPT-pVAX	TKYMTCMSADLEVVRPTWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 34)
NS3/4A-RPA-pVAX	TKYMTCMSADLEVVRPAWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 35)
NS3/4A-CST-pVAX	TKYMTCMSADLEVVCSTWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 36)
NS3/4A-CCST-pVAX	TKYMTCMSADLEVCCSTWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 37)
NS3/4A-SSST-pVAX	TKYMTCMSADLEVSSSTWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 38)
NS3/4A-SSSSCST-pVAX	TKYMTCMSADSSSSCSTWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 39)
NS3A/4A-VVVVTST-pVAX	TKYMTCMSADVVTSTWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 40)
NS5-pVAX	ÅSEDVVCCSMSYTWG (SEQ. ID. NO.: 41)
NS5A/B-pVAX	SSSEDVVCCSMWVLVGGVL (SEQ. ID. NO.: 42)

*NS3/4A 片段的野生型序列是 NS3/4A-pVAX。NS3/4A 断裂点由下划线标出, 其中 P1 位置对应第一个 Thr(T), P1'位置对应 NS3/4A-pVAX 序列的下一个后续氨基酸。野生型 NS3/4A 序列中, NS3 蛋白酶在 P1 和 P1'位置之间断裂。

编码 HCV 肽的核酸

核酸实施方案包括此处所述编码 HCV 肽的核苷酸(例如 SEQ. ID. NO.: 17、29、31、32 和 43-49)或其至少 4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段(例如 SEQ. ID. NOs.: 25-27 以及 33-42)。例如, 某些实施方案包括编码这些 HCV 肽的基因组 DNA、RNA 以及 cDNA。HCV 核苷酸实施方案不仅包括序列表所示 DNA 序列(例如 SEQ. ID. NO.: 16), 而且包括编码序列表所示氨基酸顺序的核苷酸序列(例如 SEQ. ID. NO.: 17), 以及在严谨条件(例如, 在 0.5 M NaHPO₄、7.0% 十二烷基磺酸钠(SDS)、1 mM EDTA、50°C 下与结合滤膜的 DNA 杂交)以及 0.2 X SSC/0.2% SDS、50°C 洗涤条件下与序列表所示 DNA 序列杂交的任何核苷酸序列, 以及在较低严谨性的条件下(例如在 0.5 M

NaHPO₄、7.0%十二烷基磺酸钠(SDS)、1 mM EDTA、37°C 杂交, 于 0.2XSSC/0.2% SDS、37°C 洗涤)与编码序列表提供的氨基酸序列(SEQ. ID. NOs.: 17)的 DNA 序列杂交的任何核苷酸序列。

核酸实施方案也包括上述序列的片段、修饰物、衍生物以及变体。例如, 理想实施方案包括具有一个新的 HCV 序列的至少 12 个连续碱基的核酸或其互补序列, 优选片段包括编码 SEQ. ID. NO.: 17 的 NS3/4A 分子的核酸的至少 12 个连续碱基或其互补序列。

在这方面, 本发明核酸实施方案可以具有 12-约 2079 个连续核苷酸。例如, 本发明的某些 DNA 片段包括具有 SEQ. ID. NO.: 16 的至少 12-15、15-20、20-30、30-50、50-100、100-200、200-500、500-1000、1000-1500、1500-2079 个连续核苷酸的核酸或其互补序列。核酸实施方案还可以通过突变例如置换、添加或缺失而改变。例如, 由于核苷酸编码序列的简并性, 编码与 SEQ. ID. NOs.: 17 所述基本上相同的 HCV 氨基酸序列的其它 DNA 序列可用于某些实施方案。这些包括而不仅限于已经改变的编码全部或部分 NS3/4A(SEQ. ID. NO.: 16)的核酸序列, 或者与该序列全部或部分互补的核酸, 其通过置换为编码序列内部功能等价的氨基酸残基的不同密码子而产生沉默变化, 或者置换编码序列内部功能不同的氨基酸残基的不同密码子而产生可检测的变化。

利用上述核酸序列, 可以设计与这些分子互补的探针, 并通过寡核苷酸合成制备。理想探针包含该 HCV 分离物特异的核酸序列(SEQ. ID. NO.: 16)。这些探针可用于从患者中筛选 cDNA, 以分离天然来源的 HCV, 其中有些可能本身即是新的 HCV 序列。例如, 可以通过滤膜杂交或 PCR 筛选。对于滤膜杂交, 标记探针优选包含该 NS3/4A 肽特异的(SEQ. ID. NO.: 16)核酸序列至少 15-30bp 的碱基对。使用的杂交洗涤条件优选高严谨性的介质。可以在 0.5M NaHPO₄、7.0%十二烷基磺酸钠(SDS)、1 mM EDTA 中 42°C 过夜进行杂交, 在 0.2X SSC/0.2% SDS 中 42°C 进行洗涤。有关该条件的指南, 参见例如 Sambrook 等人, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold

Springs Harbor Press, N.Y.; 以及 Ausubel 等人, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.

还可以利用此处所述核酸从感染 HCV 的患者分离 HCV 核酸。(也参见实施例 6)。相应地, 从感染 HCV 的患者获得的 RNA 反转录, 利用 PCR 或另一扩增技术扩增获得的 cDNA。引物优选自 NS3/4A 序列 (SEQ. ID. NO.: 16)。

PCR 技术的综述参见 Molecular Cloning to Genetic Engineering, White, B.A. Ed. in Methods in Molecular Biology 67: Humana Press, Totowa (1997) 以及题为 "PCR Methods and Applications" (1991, Cold Spring Harbor Laboratory Press) 的出版物。在本发明范畴内, 为扩增 mRNA, mRNA 反转录为 cDNA, 随后 PCR(RT-PCR); 或者使用如美国专利号 5,322,770 所述的单个酶进行两步操作。另一技术涉及利用反转录酶非对称性缺口连接酶链式反应 (Reverse Transcriptase Asymmetric Gap Ligase Chain Reaction, RT-AGLCR), 如 Marshall R.L. 等人所述 (*PCR Methods and Applications* 4:80-84, 1994)。

简言之, 按照标准程序分离 RNA。利用扩增片段的最 5' 端寡核苷酸引物作为第一链合成的引物, 对 RNA 进行反转录反应。然后利用标准末端转移酶反应, 将得到的 RNA/DNA 杂合体用鸟嘌呤 "加尾"。然后用 RNase H 消化该杂合体, 用 poly-C 引物引发第二链合成。从而易于分离扩增片段上游的 cDNA 序列。可以使用的克隆策略的综述, 参见例如上述 Sambrook 等人, 1989, 同前。

在其中每个扩增程序中, 待扩增序列两侧的引物均加入适当制备的核酸样品、以及 dNTPs 和耐热聚合酶, 例如 Taq 聚合酶、Pfu 聚合酶或 Vent 聚合酶。样品中核酸变性, 引物与样品中互补核酸序列特异性杂交。杂交的引物然后延伸。此后, 开始另一轮变性、杂交和延伸的循环。循环重复多次, 以产生包含引物位点之间核酸序列的扩增片段。若干专利, 包括美国专利 4,683,195、4,683,202 和 4,965,188 进一步描述了 PCR。

选择与 NS3/4A 分子特有的(SEQ. ID. NO.: 16)核酸序列的一部分基本上互补的引物,从而使引物之间序列被扩增。引物优选至少 16-20、20-25 或 25-30 个核苷酸长度。稳定杂合体的形成有赖于 DNA 的解链温度(T_m)。T_m 取决于引物长度、溶液的离子强度以及 G+C 含量。G:C 对带有 3 个氢键,而 A:T 对只有 2 个,因而引物的 G+C 含量越高,解链温度越高。此处所述所述扩增引物的 G+C 含量优选介于 10-75%,更优选介于 35-60%,最优选介于 40-55%。在一套特定分析条件下的适当的引物长度可以由本领域技术人员按经验确定。

引物间距与欲扩增片段的长度有关。在此处所述实施方案的范围内,携带编码 HCV 肽的核酸序列的扩增片段,其大小可以从至少大约 25bp 到全长 HCV 基因组范围内。典型为 25-1000bp 扩增片段,优选为 50-1000bp 片段,非常优选 100-600bp 片段。应当理解,扩增引物可以是允许特异性扩增 NS3/4A 区域的任何序列,并且可以例如包括如便于克隆的限制性位点的修改。

可以亚克隆和测序 PCR 产物以保证扩增序列显示 HCV 肽序列。然后该 PCR 片段可以通过多种方法用于分离全长 cDNA 克隆。例如,可以标记扩增片段,用于筛选 cDNA 文库,例如噬菌体 cDNA 文库。通过筛选基因组文库,标记片段可另外用于分离基因组克隆。此外,利用例如从感染患者分离的 RNA 合成的 cDNA 可以构建表达文库。照这样,利用标准抗体筛选技术连同针对 HCV 基因产物产生的抗体,可以分离 HCV 基因产物。(筛选技术参见例如 Harlow, E.和 Lane, eds., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.)

实施方案还包括(a)包含任何上述核酸序列和/或其互补序列(即反义序列)的 DNA 载体; (b) 包含与指导该核酸表达的调节元件有效连接的任何上述核酸序列的 DNA 表达载体; 以及(c) 包含与宿主细胞中指导该编码序列表达的调节元件有效连接的任何上述核酸序列的基因工程宿主细胞。这些重组构建体在宿主细胞中能够自主复制。另外,重组构建体可以整合到宿主细胞染色体 DNA 中。这种重组多核苷酸一

般包含依靠人工操作半合成、或合成的 HCV 基因组或 cDNA 多核苷酸。因此，提供包含这些序列及其互补序列的非天然存在的重组核酸。

尽管可以使用天然存在的编码 HCV 肽的核酸或者具有 HCV 基因互补序列的核酸，它们可能常常通过例如缺失、置换或插入而改变，并可以带有人类不存在的序列。此处所用调节元件包括而限于诱导型和非诱导型启动子、增强子、操纵子以及为本领域技术人员已知的驱动和调节表达的其它元件。这种调节元件包括而限于巨细胞病毒 hCMV 立即早期基因、SV40 腺病毒早期或晚期启动子、lac 系统、trp 系统、TAC 系统、TRC 系统、噬菌体 A 的主要操纵子和启动子区、fd 外壳蛋白的控制区、3-磷酸甘油酸激酶启动子、酸性磷酸酶启动子以及酵母 α -交配因子的启动子。

此外，可以改造重组 HCV 肽的编码核酸序列及其互补序列，以便改变其加工或表达。例如，但并非为了限制，此处所述 HCV 核酸可以结合启动子序列和/或核糖体结合位点，或者在 HCV 肽编码序列上游插入信号序列，而使肽分泌，因而便于收集或生物利用。另外，给定的 HCV 核酸可以在体外或体内突变，以产生和/或破坏翻译、起始和/或终止序列，或者在编码区引起变异，和/或形成新的限制性位点或破坏先前存在的位点，或便于体外进一步改造。(参见实施例 6)。可以使用本领域已知的任何诱变技术，包括而限于体外定点诱变。(Hutchinson 等人, *J. Biol. Chem.*, 253:6551 (1978))。

此外，编码其它蛋白质或其它蛋白质的结构域的核酸可以连接至 HCV 肽的编码核酸以形成融合蛋白质。编码融合蛋白质的核苷酸可以包括而限于与无关蛋白质或肽(例如，如下所述聚组氨酸、红细胞凝集素、酶、荧光蛋白质或发光蛋白质)融合的全长 NS3/4A 序列(SEQ. ID. NO.: 16)、截短的 NS3/4A 序列或 NS3/4A 序列的肽片段。

令人吃惊的是，发现 NS3-pVAX 和 NS3/4A-pVAX 载体注入免疫活性的哺乳动物时，能够激发有效的免疫应答。以下实施例更详细地描述了这些实验。

实施例 7

为确定 NS3-pVAX 和 NS3/4A-pVAX 载体是否激发体液免疫应答, 利用 Qiagen DNA 纯化系统, 根据厂家说明书纯化实施例 6 所述表达构建体, 纯化的 DNA 载体用于免疫每组 4-10 只 Balb/c 小鼠。质粒直接注射进再生的胫骨前肌(TA)肌肉中, 如前所述。(Davis 等人, *Human Gene Therapy* 4(6):733 (1993))。简言之, 小鼠用 50 μ l/TA、0.01mM 心脏毒素(Latoxan, Rosans, France)的 0.9% 无菌 NaCl 肌肉注射。5 天后, 各个 TA 肌肉注射包含 rNS3 或 DNA 的 50 μ l PBS。

小鼠近交系 C57/13L6(H-2b)Balb/C(H-2d)和 CBA(H-2k)得自 Møllegård Denmark, Charles River Uppsala, Sweden 或 B&K Sollentuna Sweden 的育种场。所有小鼠均为雌性, 在 4-8 周龄使用。为了监控体液应答, 所有小鼠每 4 周接受一次 50 μ l/TA 的质粒 DNA 加强注射。此外, 给予某些小鼠如此处所述纯化的重组 NS3(rNS3)蛋白质。接受 rNS3 的小鼠仅仅免疫两次。所有小鼠每月取血两次。

酶免疫吸附分析(EIA)用于检测小鼠 NS3 抗体的存在。基本上如 (Chen 等人, *Hepatology* 28(1):219(1998))所述进行这些分析。简言之, 96 孔微量滴定板(Nunc, Copenhagen, Denmark)4°C 过夜被动吸附 50 mM 碳酸钠缓冲液(pH 9.6)中的 1 μ g/ml rNS3。然后用包含 PBS、2% 山羊血清和 1% 牛血清白蛋白的稀释缓冲液 37°C 温育 1 小时封闭平板。然后, 小鼠血清从 1:60 开始的系列稀释物在平板上温育 1 小时。利用碱性磷酸酶缀合的山羊抗小鼠 IgG(Sigma Cell Products, Saint Louis, MO)、随后加入 pNPP 底物(1 片/5ml 的 1M 二乙醇胺、0.5 mM MgCl₂ 缓冲液), 检测结合的小鼠血清抗体。加入 1M NaOH 终止反应, 读取 405 nm 吸光度。

4 周后, 用 NS3/4A-pVAX 免疫的 5 只小鼠中 4 只产生 NS3 抗体, 而用 NS3-pVAX 免疫的 5 只小鼠中 1 只产生抗体(图 4)。6 周后, 用 NS3/4A-pVAX 免疫的 5 只小鼠中 4 只产生高水平(>10⁴)NS3 抗体(平均水平 10800 $\pm$ 4830), 1 只滴度为 2160。尽管用 NS3-pVAX 免疫的所有小鼠都产生 NS3 抗体, 但均未产生高达 NS3/4A-pVAX 构建体所产生

的水平(平均水平 1800 ± 805)。6 周时, NS3/4A 融合构建体激发的抗体水平显著高于 NS3-pVAX 诱导的抗体水平(平均秩 7.6 对比 3.4, $p<0.05$, Mann Whitney 秩和检验,以及 $p<0.01$, Students t 检验)。因此, 用 NS3-pVAX 或 NS3/4A-pVAX 免疫导致抗 NS3 抗体产生, 但 NS3/4A 融合基因是更有效的免疫原。以下实施例描述了为确定 NS3/4A-TPT-pVAX 构建体是否激发有效免疫应答而进行的实验。

实施例 8

为测试 NS3/4A 增强的免疫原性是否可以只归因于 NS4A 的存在, 或者 NS3/4A 融合蛋白质此外是否必须在 NS3/4A 接点处断裂, 进行新的实验。一个实验中, 在 Balb/c 小鼠中比较 NS3-pVAX、NS3/4A-pVAX 和 NS3/4A-TPT-pVAX 载体的免疫原性。如上所述在第 0 周免疫小鼠, 所有小鼠 2 周后取血, 确定 1:60 血清稀释度时 NS3 抗体的存在(表 11)。小鼠第 4 周再次取血。虽然 NS3/4A-TPT-pVAX 载体与 NS3-pVAX 载体相似(4/10 对比 0/10; NS, Fisher's 精确检验), 但 NS3/4A-pVAX 载体一直是最有效的免疫原。因此, 所有引入小鼠的 HCV 构建体都能激发针对 NS3 的免疫应答, 但是 NS4A 序列以及位于 NS3 和 NS4A 序列之间的功能性蛋白水解断裂位点提供更有效的免疫应答。

表 11

首次免疫后周数	一次 100µgi.m 免疫后各自免疫原的抗体响应数		
	NS3-pVAX	NS3/4A-pVAX	NS3/4A-TPT-pVAX
2	0/10	17/20	4/10
4	0/10 (<60)	20/20 (2415±3715) 55% > 10 ³ 10% > 10 ⁴	10/10 (390±639) 50% > 10 ² 10% > 10 ³

在感染的慢性期, HCV 在肝细胞中复制, 肝内传播。对抗慢性和持续性病毒感染的主要因素是细胞介导的免疫防御系统。CD4+和

CD8+淋巴细胞在 HCV 感染的慢性期浸润肝脏，但不能清除病毒或预防肝损害。此外，持续性 HCV 感染与肝细胞癌(HCC)的发生有关。以下实施例描述了为确定 NS3 和 NS3/4A 构建体是否能够激发针对 NS3 的 T 细胞介导免疫应答而进行的实验。

实施例 9

为研究上述构建体是否能够激发针对 NS3 的细胞介导应答，进行体内肿瘤生长测定。为此制备了用 NS3/4A 基因稳定转染的 SP2/0 肿瘤细胞系。利用 BglII 消化，将包含 NS3/4A 基因的 pcDNA3.1 质粒线性化。总共 5 μ g 线性化质粒 DNA 与 60 μ g 转染试剂(Superfect, Qiagen, Germany)混合，混合物加到 35mm 平皿中 50%贴壁的 SP2/0 细胞层。转染的 SP2/0 细胞(NS3/4A-SP2/0)在 800 μ g/ml 遗传霉素(geneticin)存在下生长 14 天，分离单个克隆。利用 PCR 和 RTPCR 鉴定稳定表达 NS3/4A 的 SP2/0 克隆。克隆的细胞系在包含 10%胎牛血清、L-谷氨酰胺和青霉素-链霉素的 DMEM 中培养。

然后在 Balb/c 小鼠中评价 SP2/0 和 NS3/4A-SP2/0 细胞系的体内生长动力学。小鼠右肋皮下注射 2×10^6 肿瘤细胞。每天透过皮肤确定肿瘤大小。两个细胞系的生长动力学类似。例如，任何时间点两个细胞系之间的肿瘤平均大小没有差别(参见表 12)。以下实施例描述了为确定 NS3/4A 构建体免疫的小鼠是否已经产生针对 NS3 的 T 细胞应答而进行的实验。

表 12

小鼠 ID	肿瘤细胞系	指定时间点最大体内肿瘤大小								
		5	6	7	8	11	12	13	14	15
1	SP2/0	1.6	2.5	4.5	6.0	10.0	10.5	11.0	12.0	12.0
2	SP2/0	1.0	1.0	2.0	3.0	7.5	7.5	8.0	11.5	11.5
3	SP2/0	2.0	5.0	7.5	8.0	11.0	11.5	12.0	12.0	13.0
4	SP2/0	4.0	7.0	8.0	10.0	13.0	15.0	16.5	16.5	17.0
5	SP2/0	1.0	1.0	3.0	4.0	5.0	6.0	6.0	6.0	7.0
组平均		1.92	3.3	5.0	6.2	9.3	10.1	10.7	11.6	12.1
6	NS3/4A-SP2/0	1.0	2.0	3.0	3.5	4.0	5.5	6.0	7.0	8.0
7	NS3/4A-SP2/0	2.0	2.5	3.0	5.0	7.0	9.0	9.5	9.5	11.0
8	NS3/4A-SP2/0	1.0	2.0	3.5	3.5	9.5	11.0	12.0	14.0	14.0
9	NS3/4A-SP2/0	1.0	1.0	2.0	6.0	11.5	13.0	14.5	16.0	18.0
10	NS3/4A-SP2/0	3.5	6.0	7.0	10.5	15.0	15.0	15.0	15.5	20.0
组平均		1.7	2.7	3.7	5.7	9.4	10.7	11.4	12.4	14.2
组平均值之间 Student's t 检验的 p 值		0.7736	0.6918	0.4027	0.7903	0.9670	0.7986	0.7927	0.7508	0.4623

实施例 10

为检测 NS3/4A 免疫是否激发 T 细胞应答, 分析免疫小鼠的免疫防御系统攻击表达 NS3 的肿瘤细胞的能力。先前已细致描述了检测 Balb/c 小鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞肿瘤生长体内抑制的方法(Encke 等人, *J. Immunol.* 161:4917 (1998))。此模型中肿瘤生长的抑制取决于细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的引发。简言之, 各组 10 只小鼠用 100 μ g NS3-pVAX 或 100 μ g NS3/4A-pVAX i.m. 免疫 5 次, 每次间隔一个月。末次免疫 2 周以后, 每只小鼠的右肋注入 2×10^6 SP2/0 或 NS3/4A-SP2/0 细胞。2 周以后处死小鼠, 测量最大肿瘤大小。NS3-pVAX 免疫小鼠的 SP2/0 和 NS3/4A-SP2/0 肿瘤平均大小之间没有差异(参见表 13)。

表 13

小鼠 ID	免疫原	剂量 (μg)	肿瘤细胞系	肿瘤生长	最大肿瘤大小 (mm)
1	NS3-pVAX	100	SP2/0	是	5
2	NS3-pVAX	100	SP2/0	是	15
3	NS3-pVAX	100	SP2/0	否	-
4	NS3-pVAX	100	SP2/0	是	6
5	NS3-pVAX	100	SP2/0	是	13
组总数				4/5	9.75±4.992
6	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	是	9
7	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	是	8
8	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	是	7
9	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	否	-
10	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	否	-
				3/5	8.00±1.00

注：统计分析(StatView)：最大肿瘤大小的 Student's t 检验。P 值 <0.05 认为显著。

最大直径的不配对 t 检验

成组变量：第 1 列

假设差异 = 0

排扣除：NS3DNA-肿瘤-001213

	平均差	DF	t 值	P 值
NS3-sp2, NS3-spNS3	1.750	5	0.58	0.584

最大直径的成组信息

成组变量：第 1 列

排扣除：NS3DNA-肿瘤-001213

	计数	平均值	方差	标准差	标准误
NS3-sp2	4	9.750	24.917	4.992	2.496
NS3-spNS3	3	8.000	1.000	1.000	0.57

下一组实验中，评价 NS3/4A-pVAX 免疫的 Balb/c 小鼠中 SP2/0 或 NS3/4A-SP2/0 肿瘤生长的抑制。NS3/4A-pVAX 质粒免疫的小鼠，

其 NS3/4A-SP2/0 肿瘤细胞与未转染的 SP2/0 细胞相比, 生长显著受抑制(参见表 14)。因此, NS3/4A-pVAX 免疫激发 CTL 抑制体内 NS3/4A 表达细胞的生长。以下实施例描述了为分析各种包含 NS3 组合物激发针对 NS3 的细胞介导应答的效率而进行的实验。

表 14

小鼠 ID	免疫原	剂量 (μg)	肿瘤细胞系	肿瘤生长	最大肿瘤大小 (mm)
11	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	否	-
12	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	是	24
13	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	是	9
14	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	是	11
15	NS3/4A-pVAX	100	SP2/0	是	25
				4/5	17.25 $\pm$ 8.421
16	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	否	-
17	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	是	9
18	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	是	7
19	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	是	5
20	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	是	4
				4/5	6.25 $\pm$ 2.217

注意：统计分析(StatView)：最大肿瘤大小的 Student's t 检验。P 值<0.05 认为显著。

最大直径的不配对 t 检验

成组变量：第 1 列

假设差异 = 0

排除：NS3DNA-肿瘤-001213

	平均差	DF	t 值	P 值
NS3/4-sp2, NS3/4-spNS3	11.000	6	2.526	0.044

最大直径的成组信息

成组变量：第 1 列

排除：NS3DNA-肿瘤-001213

	计数	平均值	方差	标准差	标准误
NS3/4-sp2	4	17.250	70.917	8.421	4.211
NS3/4-spNS3	4	6.250	4.917	2.217	1.109

实施例 11

为分析给予包含 NS3 的不同组合物是否影响激发细胞介导的免疫反应，如上所述用 PBS、rNS3、无关 DNA 或 NS3/4A 构建体免疫小鼠，测定肿瘤大小。只有 NS3/4A 构建体能够激发足以导致肿瘤大小统计上显著降低的 T 细胞应答(参见表 15)。下列实施例描述了为确定肿瘤大小降低是否能够归因于产生 NS3 特异性 T 淋巴细胞而进行的实验。

表 15

小鼠 ID	免疫原	剂量 (μ g)	肿瘤细胞系	抗-NS3	肿瘤 生长	最大肿瘤 大小 (mm)
1	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	12.0
2	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	20.0
3	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	60	+	18.0
4	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	13.0
5	NS3-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	17.0
组平均				60	5/5	16.0 $\pm$ 3.391
6	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	10.0
7	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
8	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
9	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	360	-	-
10	NS3-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	12.5
组平均				1260	2/5	11.25 $\pm$ 1.768
11	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	10.0
12	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
13	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
14	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	13.0
15	NS3/4A-pVAX	10	NS3/4A-SP2/0	<60	+	13.5
组平均				<60	3/5	12.167 $\pm$ 1.893
16	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	60	+	10.0
17	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	360	-	-
18	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	8.0
19	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	12.0
20	NS3/4A-pVAX	100	NS3/4A-SP2/0	2160	+	7.0
组平均				1380	4/5	9.25 $\pm$ 2.217
36	p17-pcDNA3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	20.0
37	p17-pcDNA3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	7.0
38	p17-pcDNA3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	11.0
39	p17-pcDNA3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	15.0
40	p17-pcDNA3	100	NS3/4A-SP2/0	<60	+	18.0
组平均				<60	5/5	14.20 $\pm$ 5.263
41	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	13.0
42	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	-	-
43	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	3.5
44	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	22.0
45	rNS3/CFA	20	NS3/4A-SP2/0	>466560	+	17.0
组平均				466560	4/5	17.333 $\pm$ 4.509
46	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	10.0
47	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	16.5
48	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	60	+	15.0
49	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	21.0
50	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	+	15.0
51	PBS	-	NS3/4A-SP2/0	<60	-	-
组平均				60	5/6	15.50 $\pm$ 3.937

注意：统计分析(StatView)：最大肿瘤大小的 Student's t 检验。P 值<0.05 认为显著。

最大肿瘤的不配对 t 检验

成组变量：组

假设差异 = 0

	平均差	DF	t- 值	p- 值
p17-sp3-4, NS3-100-sp3-4	2.950	5	.739	.4933
p17-sp3-4, NS3/4-10-sp3-4	2.033	6	.628	.5532
p17-sp3-4, NS3-10-sp3-4	-1.800	8	-.643	.5383
p17-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	4.950	7	1.742	.1250
p17-sp3-4, PBS-sp3-4	-1.300	8	-.442	.6700
p17-sp3-4, rNS3-sp3-4	-3.133	6	-.854	.4259
NS3-100-sp3-4, NS3/4-10-sp3-4	-.917	3	-.542	.6254
NS3-100-sp3-4, NS3-10-sp3-4	-4.750	5	-1.811	.1299
NS3-100-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	2.000	4	1.092	.3360
NS3-100-sp3-4, PBS-sp3-4	-4.250	5	-1.408	.2183
NS3-100-sp3-4, rNS3-sp3-4	-6.083	3	-1.744	.1795
NS3/4-10-sp3-4, NS3-10-sp3-4	-3.833	6	-1.763	.1283
NS3/4-10-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	2.917	5	1.824	.1277
NS3/4-10-sp3-4, PBS-sp3-4	-3.333	6	-1.344	.2274
NS3/4-10-sp3-4, rNS3-sp3-4	-5.167	4	-1.830	.1412
NS3-10-sp3-4, NS3/4-100-sp3-4	6.750	7	3.416	.0112
NS3-10-sp3-4, PBS-sp3-4	.500	8	.215	.8350
NS3-10-sp3-4, rNS3-sp3-4	-1.333	6	-.480	.6480
NS3/4-100-sp3-4, PBS-sp3-4	-6.250	7	-2.814	.0260
NS3/4-100-sp3-4, rNS3-sp3-4	-8.083	5	-3.179	.0246
PBS-sp3-4, rNS3-sp3-4	-1.833	6	-.607	.5662

实施例 12

使用体外 T 细胞介导的肿瘤细胞裂解分析确定 NS3 特异性 T 细胞是否由 NS314A 免疫激发。该分析先前已经详细描述于(Townsend 等人, *J. Virol.* 71:3365 (1997))。简言之, 各组 5 只 Balb/c 小鼠用 100μg NS3/4A-pVAX *i.m* 免疫 3 次。末次注射 2 周以后, 处死小鼠, 收集脾细胞。用 3 x 10⁶ 脾细胞和 3 x 10⁶ NS3/4A-SP2/0 细胞进行再刺激培养。5 天后利用 NS3/4A-SP2/0 或 SP2/0 细胞为靶细胞进行标准的 Cr⁵¹ 释放分析。以 NS3/4A-SP2/0 细胞裂解与 SP2/0 细胞裂解之间的比值计算特异性裂解百分比。利用效应细胞与靶细胞之比为 20:1, 5 只测试小鼠的 4 只中, 只有用 NS3/4A-pVAX 免疫的小鼠显示特异性裂解超过 10%(参见图 5A 和 B)。相应的, NS3/4A 免疫的小鼠显示癌细胞增殖减少和/或 NS3/4A 引起的癌细胞裂解。下节详细描述了包含的若干 HCV 多肽。

HCV 肽

可以利用常规分子生物学技术操作上节所述编码 HCV 肽的核酸以便产生表达 HCV 肽的重组构建体。包含的 HCV 肽或其衍生物包括但不限于, 包含基本上如序列表(SEQ. ID. NO.: 17、29-32 和 43-49)所示全部氨基酸序列为主要氨基酸序列, 及其至少 4 个氨基酸长度的片段(例如 SEQ. ID. NO.: 25-27 以及 33-42), 包括改变的序列, 其中该序列内的残基置换为功能相同的氨基酸残基而导致沉默变化。序列 SEQ. ID. NO.: 17、29-32 以及 43-49 的优选片段为至少 4 个氨基酸, 并包含发现的 NS3/4A 肽(SEQ. ID. NO.: 17)特异的氨基酸序列, 包括改变的序列, 其中该序列内的残基置换为功能相同的氨基酸残基而导致沉默变化。例如, HCV 肽可以是至少 12-15, 15-20, 20-25, 25-50, 50-100, 100-150, 150-250, 250-500 或 500-704 个氨基酸长度。其它片段(例如 SEQ. ID. NO.: 25-27 和 33-42)也是本发明的方面。

本发明的实施方案也包括与如上所述基本上相同的 HCV 肽。也就是具有 SEQ. ID. NO.: 17 内一个或多个氨基酸残基的 HCV 肽及其片段, 其被行使相同功能、极性相似的另一个氨基酸置换而导致沉默变化。序列内部的氨基酸置换可以选自该氨基酸所属类别的其它成员。例如, 非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天门冬酰胺和谷氨酰胺。带正电(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。芳香族氨基酸包括苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。

可以利用本领域已知技术, 例如 Merrifield 等人, J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1964), Houghten 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:51:32 (1985), Stewart 和 Young (Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem Co., Rockford, IL (1984), 以及 Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y.所述技术, 通过化学合成方法(例如固相肽合成)方法制备此处所述 HCV 肽。可以合成氨基端有或者没有甲硫氨酸的多肽。化学合成的 HCV 肽可以利用这些参考文献所述方法氧化, 形成二硫键。

虽然此处所述 HCV 肽可以化学合成,可以利用 DNA 重组技术更有效地制备这些多肽。例如,该方法可用于构建包含上述 HCV 核苷酸序列以及合适的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括,例如体外重组 DNA 技术、合成技术以及体内基因重组。另外,利用例如合成仪,可以化学合成能够编码 HCV 核苷酸序列的 RNA。例如参见 *Oligonucleotide Synthesis*, 1984, Gait, M. J. ed., IRL Press, Oxford 所述技术。因此,若干实施方案涉及为表达包含的 HCV 肽而改造的细胞系。例如,制备表达(SEQ. ID. NO.: 17、29-32 以及 43-49)的 HCV 肽或这些分子的片段的一些细胞。

可以利用多种宿主表达载体系统表达包含的 HCV 肽。合适的表达系统包括而不限于用包含 HCV 核苷酸序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的微生物,例如细菌(例如大肠杆菌或枯草杆菌(*B. subtilis*));用包含 HCV 核苷酸序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如酿酒酵母(*Saccharomyces*)、毕赤氏(*Pichia*)酵母);用包含 HCV 序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用包含 HCV 序列的重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒 CaMV;烟草花叶病毒 TMV)感染、或者用包含 HCV 序列的重组质粒表达载体(例如 Ti 质粒)转化的植物细胞系统;或者带有包含来源于哺乳动物细胞基因组(例如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒(例如腺病毒晚期启动子;痘苗病毒 7.5K 启动子)的启动子的重组表达构建体哺乳动物细胞系统(例如 COS、CHO、BHK、293、3T3)。

在细菌系统中,根据所表达的 HCV 基因产物的用途,可以方便地选择许多表达载体。例如,为制备 HCV 肽的药物组合物或者为产生 HCV 肽的抗体而大量生产该蛋白质时,需要指导高水平表达易于纯化的融合蛋白质产物的载体。这种载体包括而不限于大肠杆菌表达载体 pUR278(Ruther 等人, *EMBO J.*, 2:1791(1983), 其中 HCV 编码序列与 lacZ 编码区可以分别符合读框地连接到该载体,以产生融合蛋白质); pIN 载体 (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.*, 264:5503-5509 (1989));

等等。也可以使用 pGEX 载体, 将外源多肽表达为与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)的融合蛋白质。这种融合蛋白质一般可溶, 并可通过吸附谷胱甘肽琼脂糖小珠, 然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱, 能够从裂解的细胞中进行纯化。PGEX 载体设计为包括凝血酶或 Xa 因子蛋白酶裂解位点, 因此能够从 GST 部分释放克隆的靶基因产物。

在昆虫系统中, 苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒(AcNPV)用作表达外源基因的载体。病毒在草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。HCV 编码序列可以分别克隆到病毒的非必需区域(例如多角体蛋白基因), 并置于 AcNPV 启动子(例如多角体蛋白启动子)控制之下。HCV 基因编码序列的成功插入将导致多角体蛋白基因失活, 产生非封闭型重组病毒(即缺少多角体蛋白基因编码的蛋白质外壳)。这些重组病毒然后用于感染草地夜蛾细胞, 在其中表达插入的基因。(例如参见 Smith 等人, *J. Virol.* 46: 584 (1983); 以及 Smith, U.S. Pat. No. 4,215,051)。

在哺乳动物宿主细胞中, 可以使用许多基于病毒的表达系统。如果腺病毒用作表达载体, 目的 HCV 核苷酸序列可以连接至腺病毒转录/翻译控制复合物, 例如晚期启动子和三联前导序列。该嵌合基因然后通过体外或体内重组插入腺病毒基因组。插入病毒基因组的非必需区(例如 E1 或 E3 区)将产生能够在受感染宿主中表达 HCV 基因产物的活的重组病毒。(例如参见 Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659 (1984))。有效翻译插入的 HCV 核苷酸序列还会需要特定起始信号。这些信号包括 ATG 起始密码子和邻近序列。

然而, 如果只插入一部分 HCV 编码序列, 可以提供外源翻译控制信号, 或许包括 ATG 起始密码子。此外, 起始密码子可以与目的编码序列的阅读框架相位相符, 以确保翻译整个插入序列。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是天然和合成的多种来源。通过包含合适的转录增强子元件、转录终止子等可以增强表达效率。(参见 Bittner 等人, *Methods in Enzymol.*, 153:516-544 (1987))。

此外, 可以选择调节插入序列表达、或按所要求的特定方式修饰

和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这种修饰(例如糖基化)和加工(例如断裂)对于蛋白质的功能是重要的。不同的宿主细胞具有蛋白质和基因产物翻译后加工和修饰的特性和特有机制。可以选择合适的细胞系或宿主系统,以确保所表达的外源蛋白质正确的修饰和加工。为此目的,可以使用真核宿主细胞,其具有供原初转录产物适当加工、基因产物糖基化和磷酸化的细胞器。这种哺乳动物宿主细胞包括而限于 CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3 和 W138。

为长期、高产率生产重组蛋白质,优选稳定表达。例如,可以改造稳定表达上述 HCV 肽的细胞系。与其利用包含病毒复制起点的表达载体,不如可以利用合适的表达控制元件(例如启动子、增强子序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)控制的 DNA 和选择标志转化宿主细胞。引入外源 DNA 之后,使改造的细胞在丰富培养基中生长 1-2 天;然后转到选择培养基。重组质粒的选择标志赋予选择抗性,使细胞稳定整合质粒到其染色体,生长形成斑点,其依次被克隆并扩增为细胞系。该方法方便地用于改造表达 HCV 基因产物的细胞系。

可以使用多种选择系统,包括而限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler 等人, *Cell* 11:223 (1977)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:2026 (1962), 以及腺嘌呤磷酸核糖转移酶(Lowy 等人, *Cell* 22:817 (1980)基因可以分别用于 tk⁻、hgprt⁻或 aprt⁻细胞。此外,可以使用抗代谢物抗性作为基础选择下列基因:带来氨甲蝶呤抗性的 dhfr(Wigler 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567 (1980); O'Hare 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1527 (1981); 带来霉酚酸抗性的 gpt(Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2072 (1981); 带来氨基糖苷类 G-418 抗性的 neo(ColberreGarapin 等人, *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981); 以及带来潮霉素抗性的 hygromycin^r(Santerre 等人, *Gene* 30:147 (1984))。

另外,利用表达的融合蛋白质特异性的抗体能够容易纯化任何融合蛋白质。例如, Janknecht 等人描述的系统能迅速纯化人细胞系中

表达的非变性融合蛋白质。(Janknecht 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8972-8976 (1991)). 在该系统中, 目的基因亚克隆到牛痘重组质粒, 使该基因的开放阅读框架翻译上融合由 6 个组氨酸残基组成的氨基端标记。重组牛痘病毒感染细胞的提取物上样 Ni^{2+} 氮川乙酸琼脂糖柱, 用包含咪唑的缓冲液选择性洗脱组氨酸标记的蛋白质。以下实施例描述了用于表达由包含的核酸编码的 HCV 肽的方法。

实施例 13

为了表征 NS3/4A 融合蛋白质及其截短和突变的变体, 体外转录并翻译实施例 6 所述载体构建体, 通过十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)观察得到的多肽。利用 T7 偶联的网织红细胞裂解产物系统(Promega, Madison, WI), 按照厂家说明, 进行体外转录和翻译。利用 ^{35}S 标记的甲硫氨酸(Amersham International, Plc, Buckinghamshire, UK), 在 30°C 进行表达构建体的全部体外翻译反应。利用 12% SDS-PAGE 凝胶分离标记的蛋白质, 通过 X 光胶片(Hyper Film-MP, Amersham)曝光 6-18 小时进行观察。

体外分析揭示, 各自表达构建体的所有蛋白质均高量表达。rNS3 构建体(NS3-pVAX 载体)产生大约 61kDa 的单肽, 而 TPT 构建体(NS3/4A-TPT-pVAX)和 RGT 构建体(NS3/4A-RGT-pVAX)产生大约 67 kDa 的单多肽, 与 NS3/4A-pVAX 构建体产生的未断裂的 NS3/4A 肽的分子量相同。表达的 NS3/4A 肽产生的断裂产物大约 61 kDa, 与 NS3-pVAX 载体产生的 rNS3 大小相同。这些结果表明, 表达构建体是功能性的, NS3/4A 构建体具有酶活性, rNS3 产生预计大小的肽, TPT 和 RGT 突变完全消除了 NS3-NS4A 接点处的断裂。

序列、构建体、载体、克隆以及包括包含的 HCV 核酸和肽的其它材料可以是浓缩(enriched)或分离形式。此处所用"浓缩"是指物质的浓度至少是其天然浓度的约 2、5、10、100 或 1000 倍(例如), 方便按重量为 0.01%, 优选按重量至少约 0.1%。也包括按重量大约 0.5%、1%、5%、10%和 20%的浓缩制剂。术语"分离"要求该物质从其原始环境(例

如,如果是天然存在,则为自然环境)移去。例如,活的动物中天然存在的多核苷酸不是分离的,但是与天然体系中某些或全部共存物质分离的相同的多核苷酸,就是分离的。序列处于纯化形式也是有利的。术语"纯化"不要求绝对纯净;更确切些,是指相对定义。分离的蛋白质通常纯化为例如经过考马斯染色电泳均一性。特别包括原材料或天然物质纯度至少为1个数量级,优选2或3个数量级,更优选4或5个数量级。

还可以在植物、昆虫和动物中表达此处所述 HCV 基因产物,产生转基因生物。具有 HCV 肽的理想的转基因植物系统包括拟南芥属 (*Arabidopsis*)、玉蜀黍和衣藻属 (*Chlamydomonas*)。具有 HCV 肽的理想的昆虫系统包括而不限于黑尾果蝇 (*D. melanogaster*) 和小卵翅蝗 (*C. elegans*)。任何物种的动物,包括但不限于两栖类、爬行类、鸟类、小鼠、仓鼠、大鼠、兔、豚鼠、猪、小型猪、山羊、狗、猫以及非人灵长类,例如狒狒、猴子和黑猩猩,可用于产生具有包含的 HCV 分子的转基因动物。这些转基因生物期望地显示此处所述 HCV 肽的种系传递。

本领域已知的任何技术优选用于将 HCV 转基因引入动物,产生转基因动物的原始系,或者敲除或替换现有的 HCV 基因。这种技术包括而不限于原核的显微注射(Hoppe, P. C.和 Wagner, T. E., 1989, U.S. Pat. No. 4,873,191); 逆转录病毒介导基因转入生殖系(Van der Putten 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82:6148-6152 (1985); 胚胎干细胞在基因打靶(Thompson 等人, *Cell* 56:313-321 (1989); 胚胎的电穿孔(Lo, *Mol. Cell. Biol.* 3:1803-1814 (1983); 以及精子介导的基因转移(Lavitrano 等人, *Cell* 57:717-723 (1989); 也参见 Gordon, *Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol.* 115:171-229 (1989)。下节描述制备与此处所述 HCV 肽相互作用的抗体。

抗 HCV 抗体

合成或表达以及分离或纯化 HCV 肽以后,分离或纯化的肽可用于产生抗体。根据情况,术语"抗体"可以包括多克隆、单克隆、嵌合、

单链、Fab 片段以及由 Fab 表达文库产生的片段。识别 HCV 肽的抗体具有多种用途，包括但不限于生物技术应用、治疗/预防应用以及诊断应用。

为了产生抗体，可以通过注射 HCV 肽而免疫多种宿主，包括山羊、兔、大鼠、小鼠和人等。根据宿主物种，多种佐剂可用于增强免疫应答。这种佐剂包括而不限于病毒唑、弗氏佐剂、矿物胶例如氢氧化铝，以及表面活性物质，例如溶血卵磷脂、多聚醇、聚阴离子、肽、乳化油、匙孔血蓝蛋白和二硝基酚。BCG(卡介苗)和小棒状杆菌(*corynebacterium parvum*)也是非常有用的佐剂。

用于诱导特异性抗体的肽可以具有由至少 4 个氨基酸、优选至少 10-15 个氨基酸组成的氨基酸序列。一种方法，编码 NS3/4A 片段的短链氨基酸与另一蛋白质，例如匙孔血蓝蛋白的短链氨基酸融合，以便产生针对该嵌合分子的抗体。另外，给予动物包含病毒唑以及 NS3/4A(SEQ. ID. NO.: 17)、其至少 4、6、8、10、12、15 或 20 个氨基酸长度的片段、或编码一种或多种这些分子的核酸的组合物。虽然通过注射小鼠对应于 HCV 肽的合成的三聚体、十聚体和 15 聚体的肽可以产生能够特异性识别 HCV 的抗体，利用如上所述制备的重组 HCV 肽可以产生更多种类的抗体。

为了产生 HCV 肽的抗体，从转染或转化细胞中分离基本纯的肽。调整最终制剂中肽的浓度到几微克/ml 的水平，例如通过 Amicon 过滤装置浓缩。因此能够如下制备目的肽的单克隆或多克隆抗体：

可以利用通过培养的传代细胞系提供抗体分子产生的任何技术制备 HCV 肽的单克隆抗体。这些技术包括而不限于：Koehler 和 Milstein 最先描述的杂交瘤技术(*Nature* 256:495-497 (1975))，人 B 细胞杂交瘤技术(Kosbor 等人，*Immunol Today* 4:72 (1983))；Cote 等人，*Proc Natl Acad Sci* 80:2026-2030 (1983)，以及 EBV 杂交瘤技术 Cole 等人，Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc, New York N.Y., pp 77-96 (1985)。此外，可以使用为制备"嵌合抗体"而开发的技术，将小鼠抗体基因与人抗体基因拼接，获得具有适当的抗原特

异性以及生物活性的分子。(Morrison 等人, *Proc Natl Acad Sci* 81:6851-6855 (1984); Neuberger 等人, *Nature* 312:604-608(1984); Takeda 等人, *Nature* 314:452-454(1985)。另外, 为制备单链抗体而描述的技术(美国专利号 4,946,778)可以适于制备 HCV 特异性单链抗体。还可以通过诱导淋巴细胞群体的体内产生或者筛选重组免疫球蛋白文库或高特异性结合试剂组而制备抗体, 如 Orlandi 等人, *Proc Natl Acad Sci* 86: 3833-3837 (1989)以及 Winter G.和 Milstein C; *Nature* 349:293-299 (1991)所公开。

还可以产生包含 HCV 肽特异性结合位点的抗体片段。例如, 这种片段包括而不限于, 可以由胃蛋白酶消化抗体分子产生的 F(ab')₂ 片段, 以及可以由还原 F(ab')₂ 片段的二硫键产生的 Fab 片段。另外, 可以构建 Fab 表达文库, 以能够快速、容易地鉴别具有目的特异性的单克隆 Fab 片段。(Huse W. D.等人, *Science* 256:1275-1281 (1989))。

利用一种方法, 如下制备 HCV 肽的单克隆抗体。简言之, 小鼠在几周之内反复输注几微克选择的蛋白质或由其得到的肽。然后处死小鼠, 分离脾的产抗体细胞。脾细胞在聚乙二醇存在下与小鼠骨髓瘤细胞融合, 通过该体系在包含氨基蝶呤的选择培养基(HAT 培养基)中生长, 破坏过剩的未融合细胞。稀释成功融合的细胞, 稀释物等份放入微量滴定板的孔中, 培养物继续生长。通过免疫测定方法, 例如 ELISA, 检测孔中上清液的抗体, 鉴定产生抗体克隆, 如最初由 Engvall, E., *Meth. Enzymol.* 70:419(1980)及其衍生方法所述。选择阳性克隆扩增, 收集其单克隆抗体产物备用。Davis, L.等人 *Basic Methods in Molecular Biology* Elsevier, New York. 21 章-2 描述了制备单克隆抗体的详细步骤。

通过用如上所述表达的蛋白质或由其得到的肽(可以未修饰、或修饰以增强免疫原性)免疫合适的动物, 可以制备含有单个蛋白质异源表位的抗体的多克隆抗血清。有效的多克隆抗体生产受与抗原和宿主物种有关的多种因素影响。例如, 小分子往往比其它分子的免疫原性小, 需要利用载体和佐剂。宿主动物也因接种位点和剂量而不同,

抗原剂量不足或过量均导致低滴度抗血清。皮下多位点给予小剂量(ng 水平)抗原, 似乎最可靠。在 Vaitukaitis, J.等人, *J Clin. Endocrinol Metab.* 33:988-991 (1971)中可以找到家兔的有效免疫规程。

每隔一定间隔给以加强注射, 其抗体滴度开始下降时收集抗血清, 抗体滴度由半定量测定, 例如通过针对已知浓度抗原的琼脂双向免疫扩散方法。例如参见 Ouchterlony, O.等人, Handbook of Experimental Immunology 第十九章, D. Wier (ed) Blackwell (1973)。抗体的平台期浓度通常为 $0.1\text{-}0.2\text{ mg/ml}$ 血清 (大约 $12\mu\text{M}$)。制备竞争性结合曲线测定抗血清对抗原的亲合力, 例如 Fisher, D. Manual of Clinical Immunology, 2d Ed, 第 42 章. (Rose and Friedman, Eds.) Amer. Soc. For Microbiol., Washington, D.C. (1980)所述。按照每种方法制备的抗体制剂用于确定生物样品中抗原结合物质的浓度的定量免疫测定法; 也半定量或定性使用(例如, 在鉴定生物样品中 HCV 存在的诊断性实施方案中)。下节详细描述一些诊断性实施方案。

诊断性实施方案

一般根据使用基于核酸还是蛋白质的分析, 对包含的诊断进行分类。一些诊断分析检测从患者获得的样品中存在或不存在包含的 HCV 核酸序列, 其它分析则设法鉴定从患者获得的样品中是否存在包含的 HCV 肽。另外, 也包含生产包括此处所述试剂和方法、能快速检测和鉴定 HCV 的试剂盒。这些诊断试剂盒可以包括, 例如包含的特异性检测 HCV 的核酸探针或抗体。一般与以下一种或多种试剂组合提供试剂盒的检测组分。通常提供能够吸收或结合 DNA、RNA 或蛋白质的支持物。可用的支持物包括硝酸纤维、尼龙或衍生的尼龙薄膜, 其特征在于带有正电荷取代基阵列。这些试剂盒可以备有一种或多种限制酶、对照试剂、缓冲液、扩增酶以及类似小牛胸腺或鲑鱼精 DNA 的非人多核苷酸。

基于核酸的有用的诊断包括而不限于直接 DNA 测序、Southern 印迹分析、点印迹分析、核酸扩增以及这些方法的组合。这些分析的起点在于, 从怀疑感染 HCV 或者有感染 HCV 风险的患者获得的生物

样品中分离或纯化核酸。从样品中提取核酸，然后通过利用对应于包含的 HCV 核酸序列(例如 NS3/4A (SEQ. ID. NO.: 16))侧翼区域的引物进行 RT-PCR 扩增和/或 DNA 扩增。

某些实施方案中，与 HCV 序列特异性杂交的核酸探针按有序阵列附于支持物，其中核酸探针附于支持物的不同区域，彼此不重叠。这种有序阵列优选设计为"可以寻址的(addressable)"，记录探针的不同位置，并可作为分析程序的一部分。这些探针在不同的已知位置与支持物连接。知道每个核酸探针的精确位置，使得这些"可寻址"阵列对结合分析特别有用。然后通过常规方法(例如放射性或者荧光)标记来源于若干生物样品制剂的核酸，标记的样品在允许杂交的条件下施加到该阵列。

如果样品中核酸与阵列上的探针杂交，在支持物上对应杂合体的位置将检测到信号。由于每种标记样品的身份已知，施加标记样品的支持物的区域已知，因此可以快速确定存在多态性变体。利用本领域技术人员已知的高通量诊断或检测分析技术，这些方法易于自动化。

另外，可以使用与以上介绍相反的方法。可以将生物样品中存在的核酸置于支持物上产生可寻址的阵列。样品优选置于支持物上不重叠的已知位置。通过施加标记的核酸探针，其在阵列上相应于放置生物样品的位置与编码 HCV 肽的核酸互补，以确定每个样品中 HCV 核酸的存在。由于已知生物样品的身份及其在阵列上的位置，因此可以快速确定已经感染 HCV 的患者。利用本领域技术人员已知的高通量诊断分析技术，这些方法也易于自动化。

可以使用本领域已知的任何可寻址阵列技术。一个特定的多核苷酸阵列实施方案称为 Genechips™，已经一般描述于美国专利 5,143,854; PCT 公布 WO 90/15070 和 92/10092。一般利用机械合成方法或者光控合成方法(其引入光刻方法以及固相寡核苷酸的组合)生产这些阵列。(Fodor 等人, *Science*, 251:767-777, (1991))。通过开发一种通称为"超大规模固化聚合物合成"(VLSPIS™)的技术(其中探针一般以高密度阵列固化于芯片的固相表面)在固相支持物上固化寡核苷

酸阵列已经成为可能。美国专利 5,143,854 和 5,412,087 以及 PCT 公布 WO 90/15070、WO 92/10092 和 WO 95/11995 提供了 VLSPIS™ 技术的实例，其描述了通过例如光控合成技术形成寡核苷酸阵列的方法。在设计旨在提供固化于固相支持物上的核苷酸阵列的策略中，发展了另外的展示策略，在芯片上排序并显示寡核苷酸阵列，试图最佳化杂交模式和诊断信息。这种展示策略的实例公开于 PCT 公布 WO 94/12305、WO 94/11530、WO 97/29212 和 WO 97/31256 中。

本领域技术人员已知多种标记和连接技术可用于多种核酸分析。有若干方法制备供杂交或 PCR 的标记核酸，包括但不限于寡标记 (oligolabeling)、切口平移、末端标记或利用标记的核苷酸进行 PCR 扩增。另外，可以将编码 HCV 肽的核酸克隆到载体中，以制备 mRNA 探针。这种载体为本领域已知，能够商业获得，通过添加适当的 RNA 聚合酶，例如 T7、T3 或 SP6 以及标记的核苷酸，可用于体外合成 RNA 探针。许多公司，例如 Pharmacia Biotech(Piscataway N.J.)、Promega(Madison Wis.)和 U.S. Biochemical Corp(Cleveland Ohio)供应这些方法的商品试剂盒和规程。合适的报告分子或标记包括放射性核素、酶、荧光、化学发光或生色剂，以及底物、辅因子、抑制剂、磁颗粒等。

利用常规分析和此处所述实施方案还可以检测在来自患者的蛋白质样品中存在的 HCV 肽。例如，与公开的 HCV 肽免疫反应的抗体可用于筛选生物样品存在的 HCV 感染。优选实施方案中，与包含的 HCV 肽反应的抗体用于从生物样品中免疫沉淀公开的 HCV 肽，或者用于 Western 或免疫印迹中与来自生物样品的蛋白质反应。优选的诊断性实施方案也包括酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、免疫放射分析(IRMA)以及免疫酶分析(IEMA)，其包括利用公开的 HCV 肽特异性的单克隆和/或多克隆抗体的夹心分析。David 等人在美国专利号 4,376,110 和 4,486,530 中描述了典型的夹心分析。其它实施方案使用美国专利号 5,290,678; 5,604,105; 5,710,008; 5,744,358 和 5,747,274 公开的免疫条带 (immune-strip) 技术。

另一个优选的基于蛋白质的诊断中，此处所述抗体以有序阵列附于支持物，其中多数抗体附于支持物的不同区域，彼此不重叠。如同基于核酸的阵列一样，基于蛋白质的阵列设计为“可寻址”的排序阵列，以便记录不同位置，并作为分析程序的一部分。这些探针在不同的已知位置与支持物连接。知道每个核酸探针的精确位置使得这些“可寻址”阵列对结合分析特别有用。例如，可寻址阵列可以包含具有若干区域与多数抗体探针相连的支持物，该探针特异性识别生物样品中存在的 HCV 肽，并区分此处鉴定的同型 HCV。

通过一种方法，从生物样品获得蛋白质，然后利用常规方法(例如放射性、生色或荧光)标记。然后在允许结合的条件下，将标记的样品施加于阵列。如果样品中蛋白质结合阵列上的抗体探针，在支持物上对应抗体-蛋白质复合物的位置将检测到信号。由于每个标记样品的身份已知，施加标记样品的支持物的区域已知，可以快速确定存在、浓度和/或表达水平。也就是说，通过使用标记的已知浓度 HCV 肽的标准物，研究者可以精确测定测试样品中特定肽的蛋白质浓度，还可以评价 HCV 肽的表达水平。也可以使用常规光密度分析方法，更精确测定 HCV 肽的浓度或表达水平。利用本领域技术人员已知的高通量诊断分析技术，这些方法易于自动化。

另一个实施方案中，可以使用与以上介绍相反的方法。可以将生物样品中存在的蛋白质置于支持物上产生可寻址的阵列。蛋白质样品优选置于支持物上不重叠的已知位置。然后通过施加标记的、识别 HCV 肽特异性表位的抗体探针确定每个样品中存在的 HCV 肽。由于已知生物样品的身份及其在阵列上的位置，因此可以快速确定 HCV 肽的存在、浓度和/或表达水平。

也就是说，通过使用标记的已知浓度 HCV 肽的标准物，研究者可以精确测定样品中肽的浓度，并可以由此信息评价肽的表达水平。也可以使用常规光密度分析方法更精确测定 HCV 肽的浓度或表达水平。利用本领域技术人员已知的高通量诊断分析技术，这些方法也易于自动化。如上详述，可以使用本领域已知的任何可寻址阵列技术。

下节描述能够具有一种或多种包含的 HCV 核酸或 HCV 肽的一些组合物。

含有包含的 HCV 核酸或肽的组合物

某些实施方案包含至少一种与支持物连接的 HCV 核酸或肽。优选地, 制备这些支持物, 以便产生多聚体介质。这些多聚体介质以获得足够的分子亲合力的形式或方式提供 HCV 肽或核酸。通过将目的分子与大分子支持物相连可以获得具有 HCV 核酸或肽的多聚体介质。"支持物"可以是用于连接或固化这种分子的载体、蛋白质、树脂、细胞膜或任何大分子结构。固相支持物包括而限于反应板(reaction tray)的孔壁、试管聚苯乙烯小珠、磁性小珠、硝化纤维素条、薄膜、微粒例如胶乳粒子、动物细胞、Duracyte®、人工细胞等。HCV 核酸或肽还可以通过例如羟基、羧基或氨基与载体上反应基团的共价键连接无机载体, 例如二氧化硅物质(例如硅胶、沸石、硅藻土或胺化玻璃)。

在若干多聚体介质中, 大分子支持物具有通过疏水性非共价相互作用与 HCV 核酸或肽的一部分相互作用的疏水表面。有时支持物的疏水表面是诸如塑料的高聚物或任何其它高聚物, 其中疏水基团已经联接诸如聚苯乙烯、聚乙烯或聚乙烯基。另外, HCV 核酸或肽可以共价连接包含蛋白质和寡/多糖(例如纤维素、淀粉、糖原、甲壳素(chitosane)或胺化琼脂糖凝胶)的载体。在这些后面的多聚体介质中, 分子上的反应基团, 例如羟基或氨基, 用于连接载体上的反应基团, 以便形成共价键。另外的多聚体介质包括具有其它反应基团的支持物, 该反应基团化学活化的, 以便连接 HCV 核酸或肽。例如, 使用溴化氰活化介质、环氧活化介质、硫化和硫丙基(thiopropyl)凝胶、硝基苯基氯甲酸酯和 N-羟基琥珀酰亚胺氯甲酸酯连接物、或丙烯酸环氧乙烷支持物。(Sigma)。

供体内使用(即供预防或治疗应用)的载体期望生理性、无毒, 优选无免疫反应性的。供体内使用的合适载体包括聚 L-赖氨酸、聚 D、L-丙氨酸、脂质体以及 Chromosorb®(Johns-Manville Products, Denver Co.)。结合 Chromosorb®的配基(Synsorb-Pk)已经在人中测试了其预防

溶血性尿毒综合征, 据报告不存在不良反应。(Armstrong 等人, *J. Infectious Diseases* 171:1042-1045 (1995)). 某些实施方案给予"裸"载体(即缺少结合的 HCV 核酸或肽), 其在生物体内具有结合 HCV 核酸或肽的能力。通过这种方法, 预见到"前药类型"的治疗, 其中裸载体和 HCV 核酸或肽分开给予, 一旦两者均处于生物体内, 载体和 HCV 核酸或肽组合为多聚体复合物。

还包含插入的接头, 例如在 HCV 核酸或肽与支持物之间适当长度的接头(例如, 类似 λ 噬菌体柔性区而改造的" λ 接头"), 以便促进 HCV 肽、杂合体或结合配偶体更大的柔韧性, 从而克服可由支持物引起的任何空间位阻。通过在本说明书详述的分析中筛选具有不同接头的 HCV 核酸或肽, 可以确定产生最佳细胞应答或缺乏其的适当长度的接头。

也预见了包含一种以上类型的 HCV 核酸或肽的复合体支持物。"复合体支持物"可以是用于结合或固化两种或多种不同的 HCV 核酸或肽的载体、树脂或任何大分子结构。同上, 也包含在 HCV 核酸或肽与支持物之间具有适当长度的插入的接头, 例如 λ 接头, 以促进分子中更大的柔韧性, 从而克服能够发生的任何空间位阻。通过在本说明书详述的分析中筛选具有不同接头的 HCV 核酸或肽, 可以确定产生最佳细胞应答或缺乏其的适当长度的接头。

其它实施方案中, 上述多聚体和复合体支持物可以结合多聚化的 HCV 核酸或肽, 以分别形成"多聚化-多聚体支持物"以及"多聚化-组合物支持物"。例如, 利用常规分子生物学方法, 串联偶联两个或多个 HCV 核酸或肽, 可以获得多聚化配基。多聚化形式的 HCV 核酸或肽由于例如能够获得较高亲合力的介质, 而可以有利于许多应用。在组成多聚化介质的各个结构域之间引入接头或间隔物, 例如柔性 λ 接头, 也可以有利于某些实施方案。例如, 在蛋白质结合结构域之间插入适当长度的 λ 接头, 可以促进分子中更大的柔韧性并克服空间位阻。类似地, 在多聚化 HCV 核酸或肽与支持物之间插入接头, 可以促进更大的柔韧性, 并限制由支持物引起的空间位阻。通过在本说明书详述

的分析中筛选 HCV 核酸或肽可以确定接头的适当长度。

如上所述,本发明的实施方案也包括基因疫苗。这些组合物优选包含病毒唑以及编码 NS3/4A(SEQ. ID. NO.: 17)、NS3(SEQ. ID. NO.: 29)或突变体(例如 SEQ. ID. NO.: 30-32 和 43-49)或其片段(例如 SEQ. ID. NO.: 25-27 和 33-42)的核酸。以下实施例描述了制备适合人用的基因疫苗。

实施例 14

设计 HCV 表达质粒用来表达 NS3/4A 肽。通过用 EcoRI 和 XbaI 消化,去除 NS3/4A-pVAX 的 NS3/4A 编码序列,分离的片段插入质粒 A 中,因此其位于 CMV 启动子和 RSV 增强子元件的转录控制之下。(参见 Pachuk 等人,美国专利号 6,235,888)。质粒 A 主链长度为 3969bp;它包含供大肠杆菌中复制的 PBR 复制起点以及卡那霉素抗性基因。插入序列,例如 NS3/4A,克隆到多接头区,其将插入序列置于启动子和多聚腺苷酸化信号之间,并与其有效连接。在 CMV 启动子和 RSV 增强子元件的控制之下,转录克隆的插入序列。由刚好位于克隆位点的 3'的 SV40 多聚腺苷酸化信号其提供多聚腺苷酸化信号。然后将 500µg rNS3/4A 构建体与 1 mg 病毒唑混合,制备包含 NS3/4A 的疫苗组合物。

所述疫苗组合物可用于在哺乳动物(例如小鼠或家兔)中产生抗体,或者可以肌肉注射到人,产生抗体,优选慢性感染 HCV 病毒的人。受者优选接受该混合物 3 次加强免疫,间隔 4 周。通过第三次加强,HCV 特异性抗体的滴度将显著提高。另外,通过 EIA 检测到 NS3 特异性抗体成分增加,RT-PCR 检测到病毒负荷减少,证明所述受试者此时将经受增强的针对 NS3 的抗体和 T 细胞介导的免疫应答。

实施方案也包括 NS3/4A 融合蛋白质或者编码这些分子的核酸。例如,通过加入辅助氨基酸形成"标签",可能有利于生产和纯化重组蛋白质。这种标签包括而限于 His-6、Flag、Myc 和 GST。标签可以加到 C 端、N 端或 NS3/4A 氨基酸序列内部。另外的实施方案包括

氨基或羧基端截短、或内部缺失、或者氨基或羧基末端、或内部加入另外的多肽序列的 NS3/4A 融合蛋白质。其它实施方案包括 NS3/4A 融合蛋白质、或其截短或突变的变体，其中 NS3/4A 蛋白水解断裂位点的残基已经被置换。这种置换包括而不限于，P1'位点为 Ser、Gly 或 Pro 或者 P1 位点为 Arg 的序列，或者其 P8-P4' 序列为 Ser-Ala-Asp-Leu-Glu-Val-Val-Thr-Ser-Thr-Trp-Val (SEQ. ID. NO.: 28)。

其它实施方案涉及包含 NS3/4A 融合蛋白质、或其截短或修饰的变体的免疫源，其能够激发针对 NS3 的增强的免疫应答。能够以基本纯的形式提供免疫原，这意味着已经基本使得免疫原没有其它蛋白质、脂类、碳水化合物或与其天然结合的其它化合物。实施方案也包括包含 NS3/4A 融合蛋白质(SEQ. ID. NO.: 17)、或其截短或突变的变体(例如 SEQ. ID. NO.: 29-32 和 43-49)或其片段(例如 SEQ. ID. NO.: 25-27 和 33-42)以及佐剂(例如病毒唑)的疫苗组合物。以下实施例描述了制备包含 NS3/4A 融合蛋白质和佐剂的疫苗组合物的方法。

实施例 15

为了产生带标签的 NS3/4A 构建体，通过 EcoRI 和 XbaI 消化去除 NS3/4A-pVAX 的 NS3/4A 编码序列，分离的片段插入 Xpress 载体(Invitrogen)。Xpress 载体能制备重组融合蛋白质，其具有短的 N 端前导肽，对二价阳离子具有高亲和力。利用镍螯合树脂(Invitrogen)，能够一步纯化重组蛋白质，随后可以用肠激酶断裂除去前导序列。优选载体为 pBlueBacHis2 Xpress。pBlueBacHis2 Xpress 载体是杆状病毒表达载体，包含多克隆位点、氨苄青霉素抗性基因以及 lac z 基因。消化的扩增片段于是克隆到 pBlueBacHis2 Xpress 载体，感染 SF9 细胞。然后根据厂家说明书分离或纯化表达的蛋白质。然后将 100µg rNS3/4A 与 1mg 病毒唑混合，制备包含 NS3/4A 的疫苗组合物。

所述疫苗组合物可用于在哺乳动物(例如小鼠或家兔)中产生抗体，或者可以肌肉注射到人，产生抗体，优选慢性感染 HCV 病毒的

人。受者优选接受该混合物 3 次免疫加强, 间隔 4 周。通过第三次加强, HCV 特异性抗体的滴度将显著提高。另外, 通过 EIA 检测到 NS3 特异性抗体成分增加, RT-PCR 检测到病毒负荷减少, 证明所述受试者此时将经受增强的针对 NS3 的抗体和 T 细胞介导的免疫应答。下节提供涉及此处所述组合物使用方法的更多说明。

包含病毒唑和抗原的组合物使用方法

此处所述疫苗的给药途径包括而不限于透过皮肤、肠胃外、肠胃、透过支气管(transbronchial)以及透过肺泡(transalveolar)。透过皮肤给药可以施用乳膏、冲洗剂、凝胶或者能够让病毒唑和抗原渗入皮肤的其它化合物。肠胃外给药途径包括而不限于, 用电或直接注射, 例如直接注入中央静脉、静脉内、肌肉内、腹膜内、真皮内或皮下注射。肠胃给药途径包括而不限于口服(ingestion)和直肠。透过支气管和透过肺泡给药途径包括而不限于通过口腔或鼻内吸入。

适于透过皮肤给药的具有病毒唑和抗原的组合物包括而不限于药理学可接受的混悬液、油剂、乳膏剂和软膏, 直接施用皮肤或者掺入保护性载体, 例如透皮装置("透皮片")。例如, 在 Physician's Desk Reference 中可以找到合适乳膏剂、软膏等的实例。例如, Chinen 等人 1989 年 4 月 4 日发布的美国专利号 4,818,540 描述了合适的透皮装置的实例。

适于肠胃外投药的具有病毒唑和抗原的组合物, 包括而不限于药理学可接受的无菌等渗溶液。这种溶液包括而不限于供注入中央静脉、静脉内、肌肉内、腹膜内、真皮内或皮下注射的盐、磷酸盐缓冲盐溶液以及油制剂。

适于透过支气管或透过肺泡给药的具有病毒唑和抗原的组合物包括但不限于供吸入的各种类型气雾剂。适于其透过支气管和透过肺泡给药的装置也是实施方案。这种装置包括而不限于喷雾器和汽化器。现用的多种形式喷雾器和汽化器可以轻易适合输送具有病毒唑和抗原的疫苗。

适于肠胃给药的具有病毒唑和抗原的组合物, 包括但不限于药理学

可接受的口服粉剂、丸剂或液体，以及供直肠给药的栓剂。

此处所述基因构建体可能特别通过包括但不限于传统的注射器、无针注入装置或者“微弹轰击基因枪(microprojectile bombardment gene guns)”的方法给药。另外，可能通过多种方法将基因疫苗引入离开个体的细胞中。这种方法包括，例如体外转染、电穿孔、显微注射以及微弹轰击。细胞摄取基因构建体以后，重新植入个体。可以预计，即使免疫接种的细胞最初取自另一个体，可以将其中带有基因构建体的另外的非免疫原性细胞植入个体。

根据某些实施方案，利用无针注入装置将基因构建体给予个体。根据某些实施方案，利用无针注入装置将基因构建体同时皮内、皮下和肌肉内给予个体。无针注入装置众所周知并广泛应用。本领域普通技术人员按照此处指导，可以使用无针注入装置输送遗传物质给个体的细胞。无针注入装置很适于输送遗传物质给所有组织。它们特别用于输送遗传物质给皮肤和肌肉细胞。某些实施方案中，无针注入装置可能用来向个体的皮肤表面推进包含DNA分子的液体。以足够速度推进液体，压紧皮肤，液体渗入皮肤表面，弥漫其下的皮肤和肌肉组织。遗传物质从而同时皮内、皮下和肌肉内给药。某些实施方案中，无针注入装置可能用来输送遗传物质到其它器官的组织，将核酸分子引入该器官的细胞。

包含病毒唑和抗原的疫苗可用于治疗和预防广谱的疾病，能够增强动物对抗原的免疫应答。本领域技术人员应当理解，需要治疗或预防细菌性疾病、病毒性疾病、真菌性疾病以及癌症的患者已经给予常规疫苗。由于此处所述疫苗包括已经通过加入病毒唑而改变的常规疫苗，此处所述方法包括利用包含抗原和病毒唑的疫苗治疗和预防疾病。

优选实施方案涉及治疗或预防肝炎感染的方法。这些实施方案中，提供有此需要的动物肝炎抗原(例如肽抗原或基于核酸的抗原)以及足以及在所述动物中显示佐剂活性的相当量的病毒唑。相应地，利用现有的诊断测试或临床评价方法，可以鉴定有此需要的动物。这些实施方案可以使用的肝炎病毒抗原的范围多样。优选的肝炎病毒抗原包括

HBV 抗原、HAV 抗原、HCV 抗原、编码这些这抗原的核酸、或其任意组合。非常优选的实施方案包括选自乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、肝炎核心抗原(HBcAg)以及肝炎 E 抗原(HBeAg)的 HBV 抗原,特别是上述肽和基于核酸的抗原。病毒唑和抗原可以分别或联合提供,其它佐剂(例如油、明矾或者增强免疫应答的其它试剂)也可以提供给有此需要的动物。因此,优选实施方案包括通过鉴定受感染动物或者有感染风险的动物,并提供所述动物肝炎抗原(例如 HBsAg、HBcAg 和 HBeAg)以及足以显示佐剂活性的相当量的病毒唑,而治疗或预防动物中肝炎的方法。

其它实施方案包括通过提供给有此需要的动物有效增强所述免疫应答的相当量的病毒唑而增强对抗原免疫应答的方法。这些实施方案中,利用现用的诊断测试或临床评价方法鉴定需要增强对抗原免疫应答的动物。这些个体将时常罹患疾病(例如细菌性、真菌性、霉菌性、病毒性或癌症),或者有感染疾病的风险。但是,需要增强免疫应答的动物可以是已经中毒(例如受有毒昆虫或动物叮咬),或者已经暴露于毒素或其它有毒化合物的动物。这些动物一旦鉴定,即提供给适当的抗原以及有效增强动物免疫应答的相当量的病毒唑。

同上,这些实施方案可以使用的肝炎病毒抗原,包括而不限于 HBV 抗原、HAV 抗原、HCV 抗原、编码这些这分子的核酸或其任意组合。非常优选的实施方案包括选自乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、肝炎核心抗原(HBcAg)以及肝炎 E 抗原(HBeAg)的 HBV 抗原,特别是上述肽和基于核酸的抗原。病毒唑和抗原可以分别或联合提供,其它佐剂(例如油、明矾或者增强免疫应答的其它试剂)也可以提供给所需动物。因此,优选实施方案包括通过鉴定有此需要的动物,并提供该动物肝炎抗原(例如 HBsAg、HBcAg 和 HBeAg)以及有效增强动物免疫应答的相当量的病毒唑,而增强对肝炎抗原(例如 HBV)免疫应答的方法。

一种方法,例如提供给未感染个体量足以激发对 NS3 的细胞和体液免疫应答的上述疫苗组合物,以便保护所述个体免受 HCV 感染。另一实施方案中,鉴定 HCV 感染的个体,并提供给包含病毒唑以及

量足以增强对 NS3 的细胞和体液免疫应答的 NS3，以便降低或消除 HCV 感染。这种个体可能处于感染的慢性或急性期。另一实施方案中，提供给罹患 HCC 的 HCV 感染个体组合物，其包含病毒唑和 NS3/4A 融合基因，其量足以激发针对表达 NS3 的肿瘤细胞的细胞和体液免疫应答。

虽然已经参考实施方案以及实施例描述了本发明，应当理解可以不背离本发明的精神而进行各种修饰。因此，本发明只受以下权利要求的限制。

序列表

<110> TRIPEP AB
Matti SALLBERG
Catharina HULTGREN

<120> 包含病毒唑的疫苗及其使用方法

<130> TRIPEP.023VPC

<150> US 09/705,547

<151> 2000-11-03

<150> US 60/229,175

<151> 2000-08-29

<150> US 60/225,767

<151> 2000-08-17

<160> 49

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3011

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 丙型肝炎病毒序列

<400> 1

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

Gly	Val	Asn	Tyr	Ala	Thr	Gly	Asn	Leu	Pro	Gly	Cys	Ser	Phe	Ser	Ile	
				165					170					175		
Phe	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Leu	Thr	Val	Pro	Ala	Ser	Ala	Tyr	
			180					185					190			
Gln	Val	Arg	Asn	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	His	Val	Thr	Asn	Asp	Cys	Pro	
		195					200					205				
Asn	Ser	Ser	Val	Val	Tyr	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Ile	Leu	His	Thr	Pro	
	210					215					220					
Gly	Cys	Val	Pro	Cys	Val	Arg	Glu	Gly	Asn	Ala	Ser	Arg	Cys	Trp	Val	
225					230					235					240	
Ala	Val	Thr	Pro	Thr	Val	Ala	Thr	Arg	Asp	Gly	Lys	Leu	Pro	Thr	Thr	
				245					250					255		
Gln	Leu	Arg	Arg	His	Ile	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ser	Ala	Thr	Leu	Cys	
			260				265						270			
Ser	Ala	Leu	Tyr	Val	Gly	Asp	Leu	Cys	Gly	Ser	Val	Phe	Leu	Val	Gly	
		275					280					285				
Gln	Leu	Phe	Thr	Phe	Ser	Pro	Arg	His	His	Trp	Thr	Thr	Gln	Asp	Cys	
	290					295					300					
Asn	Cys	Ser	Ile	Tyr	Pro	Gly	His	Ile	Thr	Gly	His	Arg	Met	Ala	Trp	
305					310					315					320	
Asn	Met	Met	Met	Asn	Trp	Ser	Pro	Thr	Ala	Ala	Leu	Val	Val	Ala	Gln	
				325					330					335		
Leu	Leu	Arg	Ile	Pro	Gln	Ala	Ile	Met	Asp	Met	Ile	Ala	Gly	Ala	His	
		340					345						350			
Trp	Gly	Val	Leu	Ala	Gly	Ile	Lys	Tyr	Phe	Ser	Met	Val	Gly	Asn	Trp	
	355					360						365				
Ala	Lys	Val	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Phe	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Glu		
	370					375				380						
Thr	His	Val	Thr	Gly	Gly	Asn	Ala	Gly	Arg	Thr	Thr	Ala	Gly	Leu	Val	
385					390					395					400	
Gly	Leu	Leu	Thr	Pro	Gly	Ala	Lys	Gln	Asn	Ile	Gln	Leu	Ile	Asn	Thr	
				405					410					415		
Asn	Gly	Ser	Trp	His	Ile	Asn	Ser	Thr	Ala	Leu	Asn	Cys	Asn	Glu	Ser	
			420					425					430			
Leu	Asn	Thr	Gly	Trp	Leu	Ala	Gly	Leu	Phe	Tyr	Gln	His	Lys	Phe	Asn	
		435					440					445				
Ser	Ser	Gly	Cys	Pro	Glu	Arg	Leu	Ala	Ser	Cys	Arg	Arg	Leu	Thr	Asp	
	450					455					460					
Phe	Ala	Gln	Gly	Trp	Gly	Pro	Ile	Ser	Tyr	Ala	Asn	Gly	Ser	Gly	Leu	
465					470					475					480	
Asp	Glu	Arg	Pro	Tyr	Cys	Trp	His	Tyr	Pro	Pro	Arg	Pro	Cys	Gly	Ile	
				485					490					495		
Val	Pro	Ala	Lys	Ser	Val	Cys	Gly	Pro	Val	Tyr	Cys	Phe	Thr	Pro	Ser	
			500					505					510			
Pro	Val	Val	Val	Gly	Thr	Thr	Asp	Arg	Ser	Gly	Ala	Pro	Thr	Tyr	Ser	
		515					520					525				
Trp	Gly	Ala	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Phe	Val	Leu	Asn	Asn	Thr	Arg	Pro	
	530					535					540					
Pro	Leu	Gly	Asn	Trp	Phe	Gly	Cys	Thr	Trp	Met	Asn	Ser	Thr	Gly	Phe	
545					550					555					560	
Thr	Lys	Val	Cys	Gly	Ala	Pro	Pro	Cys	Val	Ile	Gly	Gly	Val	Gly	Asn	
				565					570					575		
Asn	Thr	Leu	Leu	Cys	Pro	Thr	Asp	Cys	Phe	Arg	Lys	Tyr	Pro	Glu	Ala	
			580					585					590			
Thr	Tyr	Ser	Arg	Cys	Gly	Ser	Gly	Pro	Arg	Ile	Thr	Pro	Arg	Cys	Met	

Val	Asp	Tyr	Pro	Tyr	Arg	Leu	Trp	His	Tyr	Pro	Cys	Thr	Ile	Asn	Tyr
610						615					620				
Thr	Ile	Phe	Lys	Val	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Gly	Val	Glu	His	Arg	Leu
625					630						635				640
Glu	Ala	Ala	Cys	Asn	Trp	Thr	Arg	Gly	Glu	Arg	Cys	Asp	Leu	Glu	Asp
				645							650				655
Arg	Asp	Arg	Ser	Glu	Leu	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Ser	Thr	Thr	Gln	Trp
			660								665				670
Gln	Val	Leu	Pro	Cys	Ser	Phe	Thr	Thr	Leu	Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Gly
		675													685
Leu	Ile	His	Leu	His	Gln	Asn	Ile	Val	Asp	Val	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Gly
690						695									700
Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Ala	Ser	Trp	Ala	Ile	Lys	Trp	Glu	Tyr	Val	Val
705					710						715				720
Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Asp	Ala	Arg	Val	Cys	Ser	Cys	Leu	Trp
					725						730				735
Met	Met	Leu	Leu	Ile	Ser	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	Asn	Leu	Val
			740												750
Ile	Leu	Asn	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly	Thr	His	Gly	Leu	Val	Ser	Phe
		755													765
Leu	Val	Phe	Phe	Cys	Phe	Ala	Trp	Tyr	Leu	Lys	Gly	Arg	Trp	Val	Pro
770						775									780
Gly	Ala	Val	Tyr	Ala	Leu	Tyr	Gly	Met	Trp	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
785					790						795				800
Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Arg	Ala	Tyr	Ala	Leu	Asp	Thr	Glu	Val	Ala	Ala
				805							810				815
Ser	Cys	Gly	Gly	Val	Val	Leu	Val	Gly	Leu	Met	Ala	Leu	Thr	Leu	Ser
			820												830
Pro	Tyr	Tyr	Lys	Arg	Tyr	Ile	Ser	Trp	Cys	Met	Trp	Trp	Leu	Gln	Tyr
			835												845
Phe	Leu	Thr	Arg	Val	Glu	Ala	Gln	Leu	His	Val	Trp	Val	Pro	Pro	Leu
850						855									860
Asn	Val	Arg	Gly	Gly	Arg	Asp	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Thr	Cys	Val	Val
865					870										880
His	Pro	Ala	Leu	Val	Phe	Asp	Ile	Thr	Lys	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Phe
				885											895
Gly	Pro	Leu	Trp	Ile	Leu	Gln	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Val	Pro	Tyr	Phe
			900												910
Val	Arg	Val	Gln	Gly	Leu	Leu	Arg	Ile	Cys	Ala	Leu	Ala	Arg	Lys	Ile
			915												925
Ala	Gly	Gly	His	Tyr	Val	Gln	Met	Ala	Ile	Ile	Lys	Leu	Gly	Ala	Leu
930						935									940
Thr	Gly	Thr	Cys	Val	Tyr	Asn	His	Leu	Ala	Pro	Leu	Arg	Asp	Trp	Ala
945					950						955				960
His	Asn	Gly	Leu	Arg	Asp	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Glu	Pro	Val	Val	Phe
				965							970				975
Ser	Arg	Met	Glu	Thr	Lys	Leu	Ile	Thr	Trp	Gly	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala
			980												990
Cys	Gly	Asp	Ile	Ile	Asn	Gly	Leu	Pro	Val	Ser	Ala	Arg	Arg	Gly	Gln
		995					1000								1005
Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Pro	Ala	Asp	Gly	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Trp	Arg
1010						1015									1020
Leu	Leu	Ala	Pro	Ile	Thr	Ala	Tyr	Ala	Gln	Gln	Thr	Arg	Gly	Leu	Leu
1025					1030						1035				1040

Gly	Cys	Ile	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Gly	Arg	Asp	Lys	Asn	Gln	Val	Glu	
				1045				1050					1055			
Gly	Glu	Val	Gln	Ile	Val	Ser	Thr	Ala	Thr	Gln	Thr	Phe	Leu	Ala	Thr	
			1060					1065					1070			
Cys	Ile	Asn	Gly	Val	Cys	Trp	Thr	Val	Tyr	His	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	
		1075					1080					1085				
Thr	Ile	Ala	Ser	Pro	Lys	Gly	Pro	Val	Ile	Gln	Thr	Tyr	Thr	Asn	Val	
		1090				1095					1100					
Asp	Gln	Asp	Leu	Val	Gly	Trp	Pro	Ala	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Ser	Leu	
1105					1110					1115					1120	
Thr	Pro	Cys	Thr	Cys	Gly	Ser	Ser	Asp	Leu	Tyr	Leu	Val	Thr	Arg	His	
				1125				1130						1135		
Ala	Asp	Val	Ile	Pro	Val	Arg	Arg	Arg	Gly	Asp	Ser	Arg	Gly	Ser	Leu	
			1140					1145					1150			
Leu	Ser	Pro	Arg	Pro	Ile	Ser	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	
		1155					1160					1165				
Leu	Leu	Cys	Pro	Thr	Gly	His	Ala	Val	Gly	Leu	Phe	Arg	Ala	Ala	Val	
		1170				1175					1180					
Cys	Thr	Arg	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Val	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Asn	
1185				1190						1195					1200	
Leu	Glu	Thr	Thr	Met	Arg	Ser	Pro	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	
				1205					1210					1215		
Pro	Ala	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Gln	Val	Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	
			1220					1225					1230			
Gly	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Val	Pro	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Lys	Gly	
		1235					1240					1245				
Tyr	Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Phe	
		1250				1255					1260					
Gly	Ala	Tyr	Met	Ser	Lys	Ala	His	Gly	Val	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	
1265				1270						1275					1280	
Gly	Val	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Gly	Ser	Pro	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	
				1285					1290					1295		
Gly	Lys	Phe	Leu	Ala	Asp	Ala	Gly	Cys	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ile	
			1300					1305					1310			
Ile	Ile	Cys	Asp	Glu	Cys	His	Ser	Thr	Asp	Ala	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	
		1315					1320					1325				
Ile	Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Val	
		1330				1335					1340					
Val	Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Ser	His	Pro	
1345				1350						1355					1360	
Asn	Ile															

1475	1480	1485
Gly Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro		
1490	1495	1500
Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys		
1505	1510	1515
Tyr Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr		
1525	1530	1535
Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln		
1540	1545	1550
Asp His Leu Gly Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile		
1555	1560	1565
Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Phe Pro		
1570	1575	1580
Tyr Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro		
1585	1590	1595
Pro Pro Ser Trp Asp Gln Met Arg Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro		
1605	1610	1615
Thr Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln		
1620	1625	1630
Asn Glu Val Thr Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys		
1635	1640	1645
Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly		
1650	1655	1660
Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val		
1665	1670	1675
Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro		
1685	1690	1695
Asp Arg Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys Ser		
1700	1705	1710
Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu Gln Phe		
1715	1720	1725
Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ser Arg His Ala Glu		
1730	1735	1740
Val Ile Thr Pro Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys Leu Glu Val Phe		
1745	1750	1755
Trp Ala Lys His Met Trp Asn Phe Ile Ser Gly Ile Gln Tyr Leu Ala		
1765	1770	1775
Gly Leu Ser Thr Leu Pro Gly Asn Pro Ala Ile Ala Ser Leu Met Ala		
1780	1785	1790
Phe Thr Ala Ala Val Thr Ser Pro Leu Thr Thr Gly Gln Thr Leu Leu		
1795	1800	1805
Phe Asn Ile Leu Gly Gly Trp Val Ala Ala Gln Leu Ala Ala Pro Gly		
1810	1815	1820
Ala Ala Thr Ala Phe Val Gly Ala Gly Leu Ala Gly Ala Ala Leu Asp		
1825	1830	1835
Ser Val Gly Leu Gly Lys Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly		
1845	1850	1855
Ala Gly Val Ala Gly Ala Leu Val Ala Phe Lys Ile Met Ser Gly Glu		
1860	1865	1870
Val Pro Ser Thr Glu Asp Leu Val Asn Leu Leu Pro Ala Ile Leu Ser		
1875	1880	1885
Pro Gly Ala Leu Ala Val Gly Val Val Phe Ala Ser Ile Leu Arg Arg		
1890	1895	1900
Arg Val Gly Pro Gly Glu Gly Ala Val Gln Trp Met Asn Arg Leu Ile		
1905	1910	1915
		1920


```

      2355      2360      2365
Ser Glu Pro Ala Pro Ser Gly Cys Pro Pro Asp Ser Asp Val Glu Ser
  2370      2375      2380
Tyr Ser Ser Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu
2385      2390      2395      2400
Ser Asp Gly Ser Trp Ser Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Thr Glu Asp
      2405      2410      2415
Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr
  2420      2425      2430
Pro Cys Ala Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn
  2435      2440      2445
Ser Leu Leu Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser
  2450      2455      2460
Ala Cys Gln Arg Lys Lys Lys Val Thr Phe Asp Arg Leu Gln Val Leu
2465      2470      2475      2480
Asp Ser His Tyr Gln Asp Val Leu Lys Glu Val Lys Ala Ala Ala Ser
      2485      2490      2495
Lys Val Lys Ala Asn Leu Leu Ser Val Glu Glu Ala Cys Ser Leu Ala
  2500      2505      2510
Pro Pro His Ser Ala Lys Ser Lys Phe Gly Tyr Gly Ala Lys Asp Val
  2515      2520      2525
Arg Cys His Ala Arg Lys Ala Val Ala His Ile Asn Ser Val Trp Lys
  2530      2535      2540
Asp Leu Leu Glu Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Thr Thr Ile Met Ala
2545      2550      2555      2560
Lys Asn Glu Val Phe Cys Val Gln Pro Glu Lys Gly Gly Arg Lys Pro
      2565      2570      2575
Ala Arg Leu Ile Val Phe Pro Asp Leu Gly Val Arg Val Cys Glu Lys
  2580      2585      2590
Met Ala Leu Tyr Asp Val Val Ser Lys Leu Pro Leu Ala Val Met Gly
  2595      2600      2605
Ser Ser Tyr Gly Phe Gln Tyr Ser Pro Gly Gln Arg Val Glu Phe Leu
  2610      2615      2620
Val Gln Ala Trp Lys Ser Lys Lys Thr Pro Met Gly Leu Ser Tyr Asp
2625      2630      2635      2640
Thr Arg Cys Phe Asp Ser Thr Val Thr Glu Ser Asp Ile Arg Thr Glu
      2645      2650      2655
Glu Ala Ile Tyr Gln Cys Cys Asp Leu Asp Pro Gln Ala Arg Val Ala
  2660      2665      2670
Ile Lys Ser Leu Thr Glu Arg Leu Tyr Val Gly Gly Pro Leu Thr Asn
  2675      2680      2685
Ser Arg Gly Glu Asn Cys Gly Tyr Arg Arg Cys Arg Ala Ser Arg Val
  2690      2695      2700
Leu Thr Thr Ser Cys Gly Asn Thr Leu Thr Arg Tyr Ile Lys Ala Arg
2705      2710      2715      2720
Ala Ala Cys Arg Ala Ala Gly Leu Gln Asp Cys Thr Met Leu Val Cys
      2725      2730      2735
Gly Asp Asp Leu Val Val Ile Cys Glu Ser Ala Gly Val Gln Glu Asp
  2740      2745      2750
Ala Ala Ser Leu Arg Ala Phe Thr Glu Ala Met Thr Arg Tyr Ser Ala
  2755      2760      2765
Pro Pro Gly Asp Pro Pro Gln Pro Glu Tyr Asp Leu Glu Leu Ile Thr
  2770      2775      2780
Ser Cys Ser Ser Asn Val Ser Val Ala His Asp Gly Ala Gly Lys Arg
2785      2790      2795      2800

```

```

Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Asp Pro Thr Thr Pro Leu Ala Arg Ala Ala
      2805                      2810                      2815
Trp Glu Thr Ala Arg His Thr Pro Val Asn Ser Trp Leu Gly Asn Ile
      2820                      2825                      2830
Ile Met Phe Ala Pro Thr Leu Trp Ala Arg Met Ile Leu Met Thr His
      2835                      2840                      2845
Phe Phe Ser Val Leu Ile Ala Arg Asp Gln Leu Glu Gln Ala Leu Asn
      2850                      2855                      2860
Cys Glu Ile Tyr Gly Ala Cys Tyr Ser Ile Glu Pro Leu Asp Leu Pro
2865                      2870                      2875                      2880
Pro Ile Ile Gln Arg Leu His Gly Leu Ser Ala Phe Ser Leu His Ser
      2885                      2890                      2895
Tyr Ser Pro Gly Glu Ile Asn Arg Val Ala Ala Cys Leu Arg Lys Leu
      2900                      2905                      2910
Gly Val Pro Pro Leu Arg Ala Trp Arg His Arg Ala Trp Ser Val Arg
      2915                      2920                      2925
Ala Arg Leu Leu Ala Arg Gly Gly Lys Ala Ala Ile Cys Gly Lys Tyr
      2930                      2935                      2940
Leu Phe Asn Trp Ala Val Arg Thr Lys Leu Lys Leu Thr Pro Ile Thr
2945                      2950                      2955                      2960
Ala Ala Gly Arg Leu Asp Leu Ser Gly Trp Phe Thr Ala Gly Tyr Ser
      2965                      2970                      2975
Gly Gly Asp Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Phe
      2980                      2985                      2990
Trp Phe Cys Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu
      2995                      3000                      3005
Pro Asn Arg
      3010

```

<210> 2
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 丙型肝炎病毒核心蛋白序列

```

<400> 2
Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
 1          5          10          15
Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
      20          25          30
Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
      35          40          45
Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
      50          55          60
Ile Pro Lys Ala Arg Arg Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly
65          70          75          80
Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp
      85          90          95
Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
      100         105         110
Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
      115         120         125

```



```

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu
  130                135                140
Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
 145                150                155                160
Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Cys Ser Phe Ser Ile
                165                170                175
Phe Leu Leu Ala Leu Leu
                180

```

<210> 3

<211> 197

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 丙型肝炎病毒 E1 蛋白序列

<400> 3

```

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

```

<210> 4

<211> 350

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 丙型肝炎病毒 E2 蛋白序列

<400> 4

```

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

```

<210> 5

<211> 315

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 丙型肝炎病毒 NS2 蛋白序列

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 613

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白序列

<400> 6

```

Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln
 1           5           10           15
Ile Val Ser Thr Ala Thr Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys Ile Asn Gly

```

20				25				30							
Val	Cys	Trp	Thr	Val	Tyr	His	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Thr	Ile	Ala	Ser
35				40				45							
Pro	Lys	Gly	Pro	Val	Ile	Gln	Thr	Tyr	Thr	Asn	Val	Asp	Gln	Asp	Leu
50				55				60							
Val	Gly	Trp	Pro	Ala	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Ser	Leu	Thr	Pro	Cys	Thr
65					70					75					80
Cys	Gly	Ser	Ser	Asp	Leu	Tyr	Leu	Val	Thr	Arg	His	Ala	Asp	Val	Ile
				85					90					95	
Pro	Val	Arg	Arg	Arg	Gly	Asp	Ser	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Ser	Pro	Arg
				100					105					110	
Pro	Ile	Ser	Tyr	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Leu	Cys	Pro
				115					120					125	
Thr	Gly	His	Ala	Val	Gly	Leu	Phe	Arg	Ala	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Gly
				130					135					140	
Val	Ala	Lys	Ala	Val	Asp	Phe	Ile	Pro	Val	Glu	Asn	Leu	Glu	Thr	Thr
145					150					155					160
Met	Arg	Ser	Pro	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Ser	Ser	Pro	Pro	Ala	Val	Pro
				165					170					175	
Gln	Ser	Phe	Gln	Val	Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys
				180					185					190	
Ser	Thr	Lys	Val	Pro	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Lys	Gly	Tyr	Lys	Val	Leu
				195					200					205	
Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	Tyr	Met
				210					215					220	
Ser	Lys	Ala	His	Gly	Val	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly	Val	Arg	Thr
225					230					235					240
Ile	Thr	Thr	Gly	Ser	Pro	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Gly	Lys	Phe	Leu
				245					250					255	
Ala	Asp	Ala	Gly	Cys	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ile	Ile	Cys	Asp
				260					265					270	
Glu	Cys	His	Ser	Thr	Asp	Ala	Thr	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Gly	Thr	Val
				275					280					285	
Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Val	Val	Leu	Ala	Thr
				290					295					300	
Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Ser	His	Pro	Asn	Ile	Glu	Glu
305					310					315					320
Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly	Lys	Ala	Ile
				325					330					335	
Pro	Leu	Glu	Val	Ile	Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe	Cys	His	Ser
				340					345					350	
Lys	Lys	Lys	Cys	Asp	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ile
				355					360					365	
Asn	Ala	Val	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Thr
				370					375					380	
Ser	Gly	Asp	Val	Val	Val	Val	Ser	Thr	Asp	Ala	Leu	Met	Thr	Gly	Phe
385					390					395					400
Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Thr	Gln
				405					410					415	
Thr	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp									

```

Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr Asp Ala Gly
465                      470                      475                      480
Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg
                      485                      490                      495
Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp His Leu Gly
                      500                      505                      510
Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp Ala His Phe
                      515                      520                      525
Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Phe Pro Tyr Leu Val Ala
                      530                      535                      540
Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro Pro Ser Trp
545                      550                      555                      560
Asp Gln Met Arg Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly
                      565                      570                      575
Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn Glu Val Thr
                      580                      585                      590
Leu Thr His Pro Ile Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met Ser Ala Asp
                      595                      600                      605
Leu Glu Val Val Thr
610

```

<210> 7
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 丙型肝炎病毒 NS4A 蛋白序列

```

<400> 7
Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr
1                      5                      10                      15
Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser
                      20                      25                      30
Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Gln Glu Phe
                      35                      40                      45
Asp Glu Met Glu Glu Cys
50

```

<210> 8
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 丙型肝炎病毒 NS4B 蛋白序列

```

<400> 8
Ser Gln His Leu Pro Tyr Ile Glu Gln Gly Met Met Leu Ala Glu Gln
1                      5                      10                      15
Phe Lys Gln Lys Ala Leu Gly Leu Leu Gln Thr Ala Ser Arg His Ala
                      20                      25                      30
Glu Val Ile Thr Pro Ala Val Gln Thr Asn Trp Gln Lys Leu Glu Val

```

```

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

```

<210> 9
 <211> 1040
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 丙型肝炎病毒 NS5A/B 蛋白序列

```

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

```

		115					120					125				
His Tyr Val Ser Gly Met Thr Thr Asp Asn Leu Lys Cys Pro Cys Gln																
130						135					140					
Ile Pro Ser Pro Glu Phe Phe Thr Glu Leu Asp Gly Val Arg Leu His																
145					150					155						160
Arg Phe Ala Pro Pro Cys Lys Pro Leu Leu Arg Glu Glu Val Ser Phe																
				165						170					175	
Arg Val Gly Leu His Glu Tyr Pro Val Gly Ser Gln Leu Pro Cys Glu																
				180					185						190	
Pro Glu Pro Asp Val Ala Val Leu Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser																
				195				200						205		
His Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Arg Arg Leu Ala Arg Gly Ser Pro																
210						215						220				
Pro Ser Met Ala Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu																
225					230						235					240
Lys Ala Thr Cys Thr Ala Asn His Asp Ser Pro Asp Ala Glu Leu Ile																
				245						250						255
Glu Ala Asn Leu Leu Trp Arg Gln Glu Met Gly Gly Asn Ile Thr Arg																
				260					265						270	
Val Glu Ser Glu Asn Lys Val Val Ile Leu Asp Ser Phe Asp Pro Leu																
				275				280						285		
Val Ala Glu Glu Asp Glu Arg Glu Val Ser Val Pro Ala Glu Ile Leu																
290						295						300				
Arg Lys Ser Arg Arg Phe Ala Pro Ala Leu Pro Val Trp Ala Arg Pro						310					315					320
305																
Asp Tyr Asn Pro Leu Leu Val Glu Thr Trp Lys Lys Pro Asp Tyr Glu																
				325						330						335
Pro Pro Val Val His Gly Cys Pro Leu Pro Pro Pro Arg Ser Pro Pro																
				340						345					350	
Val Pro Pro Pro Arg Lys Lys Arg Thr Val Val Leu Thr Glu Ser Thr																
				355				360						365		
Leu Pro Thr Ala Leu Ala Glu Leu Ala Thr Lys Ser Phe Gly Ser Ser																
370						375						380				
Ser Thr Ser Gly Ile Thr Gly Asp Asn Thr Thr Thr Ser Ser Glu Pro																
385					390						395					400
Ala Pro Ser Gly Cys Pro Pro Asp Ser Asp Val Glu Ser Tyr Ser Ser																
				405						410						415
Met Pro Pro Leu Glu Gly Glu Pro Gly Asp Pro Asp Leu Ser Asp Gly																
				420					425						430	
Ser Trp Ser Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Thr Glu Asp Val Val Cys																
				435				440							445	
Cys Ser Met Ser Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Leu Val Thr Pro Cys Ala																
450						455						460				
Ala Glu Glu Gln Lys Leu Pro Ile Asn Ala Leu Ser Asn Ser Leu Leu																
465					470							475				480
Arg His His Asn Leu Val Tyr Ser Thr Thr Ser Arg Ser Ala Cys Gln																


```

          995              1000              1005
Ile Tyr His Ser Val Ser His Ala Arg Pro Arg Trp Phe Trp Phe Cys
    1010              1015              1020
Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Val Gly Ile Tyr Leu Leu Pro Asn Arg
    1025              1030              1035              1040

```

<210> 10
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 乙型肝炎病毒 S 抗原 (HBsAg) 序列

```

<400> 10
Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
 1              5              10              15
Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
    20              25              30
Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asp Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
    35              40              45
Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
    50              55              60
Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
    65              70              75              80
Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
    85              90              95
Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly
    100             105             110
Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Arg Thr Cys Met Thr Thr Ala
    115             120             125
Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
    130             135             140
Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys
    145             150             155             160
Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
    165             170             175
Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
    180             185             190
Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
    195             200             205
Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
    210             215             220
Tyr Ile
    225

```

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

<220>
 <223> 乙型肝炎病毒 C 抗原和 e 抗原 (HBcAg/HBeAg) 序列

<400> 11

```

Met Gln Leu Phe His 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 Gly Met Asp Ile
           20           25           30
Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu
           35           40           45
Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val 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 Thr
           85           90           95
Leu Ala Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp
           100          105          110
Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln
           115          120          125
Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val
           130          135          140
Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro 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 Cys
           210

```

<210> 12

<211> 2227

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 甲型肝炎病毒序列

<400> 12

```

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

```

100					105					110					
Glu	Gln	Phe	Ala	Val	Gln	Gly	Leu	Leu	Arg	Tyr	His	Thr	Tyr	Ala	Arg
115					120					125					
Phe	Gly	Ile	Glu	Ile	Gln	Val	Gln	Ile	Asn	Pro	Thr	Pro	Phe	Gln	Gln
130					135					140					
Gly	Gly	Leu	Ile	Cys	Ala	Met	Val	Pro	Gly	Asp	Gln	Ser	Tyr	Gly	Ser
145	150					155					160				
Ile	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	Tyr	Pro	His	Gly	Leu	Leu	Asn	Cys	Asn	Ile
165					170					175					
Asn	Asn	Val	Val	Arg	Ile	Lys	Val	Pro	Phe	Ile	Tyr	Thr	Arg	Gly	Ala
180					185					190					
Tyr	His	Phe	Lys	Asp	Pro	Gln	Tyr	Pro	Val	Trp	Glu	Leu	Thr	Ile	Arg
195					200					205					
Val	Trp	Ser	Glu	Leu	Asn	Ile	Gly	Thr	Gly	Thr	Ser	Ala	Tyr	Thr	Ser
210					215					220					
Leu	Asn	Val	Leu	Ala	Arg	Phe	Thr	Asp	Leu	Glu	Leu	His	Gly	Leu	Thr
225	230					235					240				
Pro	Leu	Ser	Thr	Gln	Met	Met	Arg	Asn	Glu	Phe	Arg	Val	Ser	Thr	Thr
245					250					255					
Glu	Asn	Val	Val	Asn	Leu	Ser	Asn	Tyr	Glu	Asp	Ala	Arg	Ala	Lys	Met
260					265					270					
Ser	Phe	Ala	Leu	Asp	Gln	Glu	Asp	Trp	Lys	Ser	Asp	Pro	Ser	Gln	Gly
275					280					285					
Gly	Gly	Ile	Lys	Ile	Thr	His	Phe	Thr	Thr	Trp	Thr	Ser	Ile	Pro	Thr
290					295					300					
Leu	Ala	Ala	Gln	Phe	Pro	Phe	Asn	Ala	Ser	Asp	Ser	Val	Gly	Gln	Gln
305	310					315					320				
Ile	Lys	Val	Ile	Pro	Val	Asp	Pro	Tyr	Phe	Phe	Gln	Met	Thr	Asn	Thr
325					330					335					
Asn	Pro	Asp	Gln	Lys	Cys	Ile	Thr	Ala	Leu	Ala	Ser	Ile	Cys	Gln	Met
340					345					350					
Phe	Cys	Phe	Trp	Arg	Gly	Asp	Leu	Val	Phe	Asp	Phe	Gln	Val	Phe	Pro
355					360					365					
Thr	Lys	Tyr	His	Ser	Gly	Arg	Leu	Leu	Phe	Cys	Phe	Val	Pro	Gly	Asn
370					375					380					
Glu	Leu	Ile	Asp	Val	Thr	Gly	Ile	Thr	Leu	Lys	Gln	Ala	Thr	Thr	Ala
385	390					395					400				
Pro	Cys	Ala	Val	Met	Asp	Ile	Thr	Gly	Val	Gln	Ser	Thr	Leu	Arg	Phe
405					410					415					
Arg	Val	Pro	Trp	Ile	Ser	Asp	Thr	Pro	Tyr	Arg	Val	Asn	Arg	Tyr	Thr
420					425					430					
Lys	Ser	Ala	His	Gln	Lys	Gly	Glu	Tyr	Thr	Ala	Ile	Gly	Lys	Leu	Ile
435					440					445					
Val	Tyr	Cys	Tyr	Asn	Arg	Leu	Thr	Ser	Pro	Ser	Asn	Val	Ala	Ser	His
450					455					460					
Val	Arg	Val	Asn	Val	Tyr	Leu	Ser	Ala	Ile	Asn	Leu	Glu	Cys	Phe	Ala
465					470					475					
Pro	Leu	Tyr	His	Ala	Met	Asp	Val	Thr	Thr	Gln	Val	Gly	Asp	Asp	Ser
485					490					495					
Gly	Gly	Phe	Ser	Thr	Thr	Val	Ser	Thr	Glu	Gln	Asn	Val	Pro	Asp	Pro
500					505					510					
Gln	Val	Gly	Ile	Thr	Thr	Met	Arg	Asp	Leu	Lys	Gly	Lys	Ala	Asn	Arg
515					520					525					
Gly	Lys	Met	Asp												

Gln Gln Leu Asn Asp Pro Val Leu Ala Lys Lys Val Pro Glu Thr Phe
 545 550 555 560
 Pro Glu Leu Lys Pro Gly Glu Ser Arg His Thr Ser Asp His Met Ser
 565 570 575
 Ile Tyr Lys Phe Met Gly Arg Ser His Phe Leu Cys Thr Phe Thr Phe
 580 585 590
 Asn Ser Asn Asn Lys Glu Tyr Thr Phe Pro Ile Thr Leu Ser Ser Thr
 595 600 605
 Ser Asn Pro Pro His Gly Leu Pro Ser Thr Leu Arg Trp Phe Phe Asn
 610 615 620
 Leu Phe Gln Leu Tyr Arg Gly Pro Leu Asp Leu Thr Ile Ile Ile Thr
 625 630 635 640
 Gly Ala Thr Asp Val Asp Gly Met Ala Trp Phe Thr Pro Val Gly Leu
 645 650 655
 Ala Val Asp Pro Trp Val Glu Lys Glu Ser Ala Leu Ser Ile Asp Tyr
 660 665 670
 Lys Thr Ala Leu Gly Ala Val Arg Phe Asn Thr Arg Arg Thr Gly Asn
 675 680 685
 Ile Gln Ile Arg Leu Pro Trp Tyr Ser Tyr Leu Tyr Ala Val Ser Gly
 690 695 700
 Ala Leu Asp Gly Leu Gly Asp Lys Thr Asp Ser Thr Phe Gly Leu Phe
 705 710 715 720
 Leu Phe Glu Ile Ala Asn Tyr Asn His Ser Asp Glu Tyr Leu Ser Phe
 725 730 735
 Ser Cys Tyr Leu Ser Val Thr Glu Gln Ser Glu Phe Tyr Phe Pro Arg
 740 745 750
 Ala Pro Leu Asn Ser Asn Ala Met Leu Ser Thr Glu Ser Met Met Ser
 755 760 765
 Arg Ile Ala Ala Gly Asp Leu Glu Ser Ser Val Asp Asp Pro Arg Ser
 770 775 780
 Glu Glu Asp Arg Arg Phe Glu Ser His Ile Glu Cys Arg Lys Pro Tyr
 785 790 795 800
 Lys Glu Leu Arg Leu Glu Val Gly Lys Gln Arg Leu Lys Tyr Ala Gln
 805 810 815
 Glu Glu Leu Ser Asn Glu Val Leu Pro Pro Pro Arg Lys Met Lys Gly
 820 825 830
 Leu Phe Ser Gln Ala Lys Ile Ser Leu Phe Tyr Thr Glu Glu His Glu
 835 840 845
 Ile Met Lys Phe Ser Trp Arg Gly Val Thr Ala Asp Thr Arg Ala Leu
 850 855 860
 Arg Arg Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ala Gly Arg Ser Val Trp Thr Leu
 865 870 875 880
 Glu Met Asp Ala Gly Val Leu Thr Gly Arg Leu Ile Arg Leu Asn Asp
 885 890 895
 Glu Lys Trp Thr Glu Met Lys Asp Asp Lys Ile Val Ser Leu Ile Glu
 900 905 910
 Lys Phe Thr Ser Asn Lys Tyr Trp Ser Lys Val Asn Phe Pro His Gly
 915 920 925
 Met Leu Asp Leu Glu Glu Ile Ala Ala Asn Ser Lys Asp Phe Pro Asn
 930 935 940
 Met Ser Glu Thr Asp Leu Cys Phe Leu Leu His Trp Leu Asn Pro Lys
 945 950 955 960
 Lys Ile Asn Leu Ala Asp Arg Met Leu Gly Leu Ser Gly Val Gln Glu
 965 970 975
 Ile Lys Glu Gln Gly Val Gly Leu Ile Ala Glu Cys Arg Thr Phe Leu

```

          980          985          990
Asp Ser Ile Ala Gly Thr Leu Lys Ser Met Met Phe Gly Phe His His
          995          1000          1005
Ser Val Thr Val Glu Ile Ile Asn Thr Val Leu Cys Phe Val Lys Ser
          1010          1015          1020
Gly Ile Leu Leu Tyr Val Ile Gln Gln Leu Asn Gln Asp Glu His Ser
1025          1030          1035          1040
His Ile Ile Gly Leu Leu Arg Val Met Asn Tyr Ala Asp Ile Gly Cys
          1045          1050          1055
Ser Val Ile Ser Cys Gly Lys Val Phe Ser Lys Met Leu Glu Thr Val
          1060          1065          1070
Phe Asn Trp Gln Met Asp Ser Arg Met Met Glu Leu Arg Thr Gln Ser
          1075          1080          1085
Phe Ser Asn Trp Leu Arg Asp Ile Cys Ser Gly Ile Thr Ile Phe Lys
          1090          1095          1100
Ser Phe Lys Asp Ala Ile Tyr Trp Leu Tyr Thr Lys Leu Lys Asp Phe
1105          1110          1115          1120
Tyr Glu Val Asn Tyr Gly Lys Lys Lys Asp Ile Leu Asn Ile Leu Lys
          1125          1130          1135
Asp Asn Gln Gln Lys Ile Glu Lys Ala Ile Glu Glu Ala Asp Asn Phe
          1140          1145          1150
Cys Ile Leu Gln Ile Gln Asp Val Glu Lys Phe Asp Gln Tyr Gln Lys
          1155          1160          1165
Gly Val Asp Leu Ile Gln Lys Leu Arg Thr Val His Ser Met Ala Gln
          1170          1175          1180
Val Asp Pro Asn Leu Gly Val His Leu Ser Pro Leu Arg Asp Cys Ile
1185          1190          1195          1200
Ala Arg Val His Gln Lys Leu Lys Asn Leu Gly Ser Ile Asn Gln Ala
          1205          1210          1215
Met Val Thr Arg Cys Glu Pro Val Val Cys Tyr Leu Tyr Gly Lys Arg
          1220          1225          1230
Gly Gly Gly Lys Ser Leu Thr Ser Ile Ala Leu Ala Thr Lys Ile Cys
          1235          1240          1245
Lys His Tyr Gly Val Glu Pro Glu Lys Asn Ile Tyr Thr Lys Pro Val
          1250          1255          1260
Ala Ser Asp Tyr Trp Asp Gly Tyr Ser Gly Gln Leu Val Cys Ile Ile
1265          1270          1275          1280
Asp Asp Ile Gly Gln Asn Thr Thr Asp Glu Asp Trp Ser Asp Phe Cys
          1285          1290          1295
Gln Leu Val Ser Gly Cys Pro Met Arg Leu Asn Met Ala Ser Leu Glu
          1300          1305          1310
Glu Lys Gly Arg His Phe Ser Ser Pro Phe Ile Ile Ala Thr Ser Asn
          1315          1320          1325
Trp Ser Asn Pro Ser Pro Lys Thr Val Tyr Val Lys Glu Ala Ile Asp
          1330          1335          1340
Arg Arg Leu His Phe Lys Val Glu Val Lys Pro Ala Ser Phe Phe Lys
1345          1350          1355          1360
Asn Pro His Asn Asp Met Leu Asn Val Asn Leu Ala Lys Thr Asn Asp
          1365          1370          1375
Ala Ile Lys Asp Met Ser Cys Val Asp Leu Ile Met Asp Gly His Asn
          1380          1385          1390
Ile Ser Leu Met Asp Leu Leu Ser Ser Leu Val Met Thr Val Glu Ile
          1395          1400          1405
Arg Lys Gln Asn Met Ser Glu Phe Met Glu Leu Trp Ser Gln Gly Ile
          1410          1415          1420

```

Ser Asp Asp Asp Asn Asp Ser Ala Val Ala Glu Phe Phe Gln Ser Phe
 1425 1430 1435 1440
 Pro Ser Gly Glu Pro Ser Asn Trp Lys Leu Ser Ser Phe Phe Gln Ser
 1445 1450 1455
 Val Thr Asn His Lys Trp Val Ala Val Gly Ala Ala Val Gly Ile Leu
 1460 1465 1470
 Gly Val Leu Val Gly Gly Trp Phe Val Tyr Lys His Phe Ser Arg Lys
 1475 1480 1485
 Glu Glu Glu Pro Ile Pro Ala Glu Gly Val Tyr His Gly Val Thr Lys
 1490 1495 1500
 Pro Lys Gln Val Ile Lys Leu Asp Ala Asp Pro Val Glu Ser Gln Ser
 1505 1510 1515 1520
 Thr Leu Glu Ile Ala Gly Leu Val Arg Lys Asn Leu Val Gln Phe Gly
 1525 1530 1535
 Val Gly Glu Lys Asn Gly Cys Val Arg Trp Val Met Asn Ala Leu Gly
 1540 1545 1550
 Val Lys Asp Asp Trp Leu Leu Val Pro Ser His Ala Tyr Lys Phe Glu
 1555 1560 1565
 Lys Asp Tyr Glu Met Met Glu Phe Tyr Phe Asn Arg Gly Gly Thr Tyr
 1570 1575 1580
 Tyr Ser Ile Ser Ala Gly Asn Val Val Ile Gln Ser Leu Asp Val Gly
 1585 1590 1595 1600
 Phe Gln Asp Val Val Leu Met Lys Val Pro Thr Ile Pro Lys Phe Arg
 1605 1610 1615
 Asp Ile Thr Gln His Phe Ile Lys Lys Gly Asp Val Pro Arg Ala Leu
 1620 1625 1630
 Asn Arg Leu Ala Thr Leu Val Thr Thr Val Asn Gly Thr Pro Met Leu
 1635 1640 1645
 Ile Ser Glu Gly Pro Leu Lys Met Glu Glu Lys Ala Thr Tyr Val His
 1650 1655 1660
 Lys Lys Asn Asp Gly Thr Val Asp Leu Thr Val Asp Gln Ala Trp
 1665 1670 1675 1680
 Arg Gly Lys Gly Glu Gly Leu Pro Gly Met Cys Gly Gly Ala Leu Val
 1685 1690 1695
 Ser Ser Asn Gln Ser Ile Gln Asn Ala Ile Leu Gly Ile His Val Ala
 1700 1705 1710
 Gly Gly Asn Ser Ile Leu Val Ala Lys Leu Val Thr Gln Glu Met Phe
 1715 1720 1725
 Gln Asn Ile Asp Lys Lys Ile Glu Ser Gln Arg Ile Met Lys Val Glu
 1730 1735 1740
 Phe Thr Gln Cys Ser Met Asn Val Val Ser Lys Thr Leu Phe Arg Lys
 1745 1750 1755 1760
 Ser Pro Ile His His His Ile Asp Lys Thr Met Ile Asn Phe Pro Ala
 1765 1770 1775
 Ala Met Pro Phe Ser Lys Ala Glu Ile Asp Pro Met Ala Met Met Leu
 1780 1785 1790
 Ser Lys Tyr Ser Leu Pro Ile Val Glu Glu Pro Glu Asp Tyr Lys Glu
 1795 1800 1805
 Ala Ser Val Phe Tyr Gln Asn Lys Ile Val Gly Lys Thr Gln Leu Val
 1810 1815 1820
 Asp Asp Phe Leu Asp Leu Asp Met Ala Ile Thr Gly Ala Pro Gly Ile
 1825 1830 1835 1840
 Asp Ala Ile Asn Met Asp Ser Ser Pro Gly Phe Pro Tyr Val Gln Glu
 1845 1850 1855
 Lys Leu Thr Lys Arg Asp Leu Ile Trp Leu Asp Glu Asn Gly Leu Leu

	1860		1865		1870
Leu Gly Val His Pro Arg Leu Ala Gln Arg Ile Leu Phe Asn Thr Val					
1875		1880		1885	
Met Met Glu Asn Cys Ser Asp Leu Asp Val Val Phe Thr Thr Cys Pro					
1890		1895		1900	
Lys Asp Glu Leu Arg Pro Leu Glu Lys Val Leu Glu Ser Lys Thr Arg					
1905		1910		1915	1920
Ala Ile Asp Ala Cys Pro Leu Asp Tyr Thr Ile Leu Cys Arg Met Tyr					
	1925		1930		1935
Trp Gly Pro Ala Ile Ser Tyr Phe His Leu Asn Pro Gly Phe His Thr					
	1940		1945		1950
Gly Val Ala Ile Gly Ile Asp Pro Asp Arg Gln Trp Asp Glu Leu Phe					
	1955		1960		1965
Lys Thr Met Ile Arg Phe Gly Asp Val Gly Leu Asp Leu Asp Phe Ser					
	1970		1975		1980
Ala Phe Asp Ala Ser Leu Ser Pro Phe Met Ile Arg Glu Ala Gly Arg					
1985		1990		1995	2000
Ile Met Ser Glu Leu Ser Gly Thr Pro Ser His Phe Gly Thr Ala Leu					
	2005		2010		2015
Ile Asn Thr Ile Ile Tyr Ser Lys His Leu Leu Tyr Asn Cys Cys Tyr					
	2020		2025		2030
His Val Cys Gly Ser Met Pro Ser Gly Ser Pro Cys Thr Ala Leu Leu					
	2035		2040		2045
Asn Ser Ile Ile Asn Asn Ile Asn Leu Tyr Tyr Val Phe Ser Lys Ile					
	2050		2055		2060
Phe Gly Lys Ser Pro Val Phe Phe Cys Gln Ala Leu Arg Ile Leu Cys					
2065		2070		2075	2080
Tyr Gly Asp Asp Val Leu Ile Val Phe Ser Arg Asp Val Gln Ile Asp					
	2085		2090		2095
Asn Leu Asp Leu Ile Gly Gln Lys Ile Val Asp Glu Phe Lys Lys Leu					
	2100		2105		2110
Gly Met Thr Ala Thr Ser Ala Asp Lys Asn Val Pro Gln Leu Lys Pro					
	2115		2120		2125
Val Ser Glu Leu Thr Phe Leu Lys Arg Ser Phe Asn Leu Val Glu Asp					
	2130		2135		2140
Arg Ile Arg Pro Ala Ile Ser Glu Lys Thr Ile Trp Ser Leu Met Ala					
2145		2150		2155	2160
Trp Gln Arg Ser Asn Ala Glu Phe Glu Gln Asn Leu Glu Asn Ala Gln					
	2165		2170		2175
Trp Phe Ala Phe Met His Gly Tyr Glu Phe Tyr Gln Lys Phe Tyr Tyr					
	2180		2185		2190
Phe Val Gln Ser Cys Leu Glu Lys Glu Met Ile Glu Tyr Arg Leu Lys					
	2195		2200		2205
Ser Tyr Asp Trp Trp Arg Met Arg Phe Tyr Asp Gln Cys Phe Ile Cys					
	2210		2215		2220
Asp Leu Ser					
2225					

<210> 13

<211> 9416

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 丙型肝炎病毒序列

<400> 13

```

gccagccccc tgatgggggc gacactccac catgaatcac tcccctgtga ggaactactg 60
tcttcacgca gaaagcgtct agccatggcg ttagtatgag tgtcgtgcag cctccaggac 120
ccccctccc gggagagcca tagtggctcg cggaaccggg gagtacaccg gaattgccag 180
gacgaccggg tcccttcttg gataaacccg ctcaatgcct ggagatttgg gcgtgcccc 240
gcaagactgc tagccgagta gtgttgggtc gcgaaaggcc ttgtgggtact gcctgatagg 300
gtgcttgcca gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 360
ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacc gtgcgccaca ggacgtcaag ttcccggggtg 420
gcggtcagat cgttgggtgga gtttacttgt tgcgcgcag gggccctaga ttgggtgtgc 480
gcgcgacgag gaagacttcc gagcggtcgc aacctcgagg tagacgtcag cctatcccca 540
aggcacgtcg gcccgagggc aggacctggg ctccgcccgg gtacctttgg cccctctatg 600
gcaatgaggg ttgcgggtgg gcgggatggc tctgtctcc cgtggctct cggcctagct 660
ggggccccc agacccccgg cgtaggtcgc gcaatttggg taaggtcac gataccctta 720
cgtgcggctt cgcgcacctc atggggtaca taccgtctgt cggcgccctt cttggaggcg 780
ctgccagggc cctggcgcac ggcgccggg ttctggaaga cggcgtgaac tatgcaacag 840
ggaaccttcc tggttgtctt ttctctatct tcttctggc cctgtctct tgcctgactg 900
tgcccgcttc agcctacca gtgcgcaatt cctcggggt ttacctgtc accaatgatt 960
gccttaactc gagtgttgtg tacgaggcgg ccgatgccat cctgcacact cgggggtgtg 1020
tcccttgctt tcgcgagggg aacgcctcga ggtgttgggt ggcggtgacc cccacgggtg 1080
ccaccaggga cggcaaacct cccacaacgc agcttcgacg tcatatcgat ctgcttgtcg 1140
ggagcgccac cctctgctcg gccctctacg tgggggacct gtgcgggtct gtcttctctg 1200
ttggtcaact gtttaccttc tctcccaggc accactggac gacgcaagac tgcaattggt 1260
ctatctatcc cggccatata acgggtcacc gcatggcatg gaatatgat atgaactgg 1320
cccctacggc agcgttgggt gtagctcagc tgctccgaat cccacaagcc atcatggaca 1380
tgatcgctgg cgcacctgg ggagtcctgg cgggcataaa gtatttctcc atgggtgggga 1440
actggggcga ggtcctggta gtgctgtgc tatttgccgg cgtcgacgcg gaaacccacg 1500
tcaccggggg aaatgcgggc cgcaccacgg ctgggcttgt tggctctctt acaccaggcg 1560
ccaagcagaa catccaactg atcaacacca acggcagttg gcacatcaat agcacggcct 1620
tgaactgcaa tgaaagcctt aacaccggct ggtagcagg gctcttctat cagcacaat 1680
tcaactcttc aggctgtcct gagaggttgg ccagctgccg acgccttacc gattttgccc 1740
agggctgggg tctatcagt tatgccaacg gaagcgccct cgacgaacgc cctactgtct 1800
ggcactaccc tccaagacct tgtggcattg tgcgcgcaa gacgtgtgt ggcccggtat 1860
attgcttcac tcccagcccc gtgggtgtgg gaacgaccga caggtcgggc gcgcctacct 1920
acagctgggg tgcaaatgat acggatgtct tgcctctaa caacaccagg ccaccgctgg 1980
gcaattgggt cggttgtacc tggatgaact caactggatt caccaaagt tgccggagcg 2040
cccttgtgt catcgagggt gtgggcaaca acaccttgc ctgcccact gattgtctcc 2100
gcaaatatcc ggaagccaca tactctcggt ggggtccgg tcccaggatt acaccaggt 2160
gcatggtcga ctaccgctat aggttttggc actatcctg taccatcaat tacaccatat 2220
tcaaagtcag gatgtacgt ggaggggtcg agcacaggct ggaagcgcc tgcaactgga 2280
cgcgggcgga acgctgtgat ctggaagaca gggacaggtc cgagctcagc ccgttgctgc 2340
tgtccaccac acagtggcag gtccctccgt gttctttcac gaccctgcc gcttgtcca 2400
ccggcctcat ccacctccac cagaacattg tggacgtgca gtacttgtac ggggtagggt 2460
caagcatcgc gtccctgggc attaagtgg agtacgtgt tctcctgttc cttctgcttg 2520
cagacgcgcg cgtctgttcc tgotgttgga tgatgttact catatccaa gcggaggcgg 2580
ctttggagaa cctcgtaata ctcaatgcag catocctggc cgggacgcat ggtcttgtgt 2640
ccttctctgt gttcttctgc tttgcgtgg atctgaagg taggtgggtg cccggagcgg 2700
tctacgcct ctacgggatg tggcctctcc tctgtctct gctggcgttg cctcagcggg 2760
catacgcact ggacacggag gtggccgcgt cgtgtggcgg cgttgttctt gtcgggttaa 2820
tggcgctgac tctgtgcga tattacaagc gctatatcag ctgggtgcat tgggtgcttc 2880
agtattttct gaccagagta gaagcgcaac tgcacgtgtg gggtccccc ctcaacgtcc 2940
ggggggggcg cgatgcgcgt atcttactca cgtgtgtagt acaccggcc ctggtatttg 3000
acatcaccaa actactcctg gccatcttcg gaccctttg gattcttcaa gccagtttgc 3060
ttaagtccc ctacttctgt cgcgttcaag gccttctccg gatctgcgcg ctagcgcgga 3120

```



```

agatagccgg aggtcattac gtgcaaatgg ccatcatcaa gttagggggcg cttactggca 3180
cctgtgtgta taaccatctc gtcctctctc gagactgggc gcacaacggc ctgcgagatc 3240
tggcgcgtggc tgtggaacca gtgcgtctctc ccogaatgga gaccaagctc atcacgtggg 3300
gggcagatac cgcgcgcgtgc ggtgacatca tcaacggctt gcccgctctc gcccgtaggg 3360
gccaggagat actgcttggg ccagccgacg -gaatggtctc caaggggttg aggttgctgg 3420
cgcccatcac ggcgtagcgc cagcagacga gaggcctcct aggggtgtata atcaccagcc 3480
tgactggccg ggacaaaaac caagtggagg gtgagggtcca gatcgtgtca actgctaccc 3540
agaccttctt ggcaacgtgc atcaatgggg tatgctggac tgtctaccac ggggcccggaa 3600
cgaggacat cgcatacccc aagggtcctg tcatccagac gtataccaat gtggatcaag 3660
acctcgtggg ctggcccgct cctcaagggt cccgctcatt gacaccctgc acctgcggct 3720
cctcggacct ttacctggtc acgaggcacg ccgatgtcat tcccggtgcg cggcgagggtg 3780
atagcagggg tagcctgctt tcgccccggc ccatttctta cttgaaaggc tcctcggggg 3840
gtccgtggtt gtgccccacg ggacacgcgc tgggcctatt cagggccgcg gtgtgcaccc 3900
gtggagtggc taaggcggtg gactttatcc ctgtggagaa cctagagaca accatgagat 3960
ccccggtggt cacggacaac tcctctccac cagcagtgc ccagagcttc caggtagccc 4020
acctgcatgc tcccaccggc agcggtaaga gcaccaaggt cccggctgcg tacgcagcca 4080
agggctacaa ggtgttggtg ctcaacccct ctgttgctgc aacctgggc tttggtgctt 4140
acatgtccaa ggcccatggg gttgatccta atatcaggac cggggtgaga acaattacca 4200
ctggcagccc catcacgtac tcacctaag gcaagttcct tgccgacgcc ggggtgctcag 4260
gaggtgctta tgacataata atttgtgac agtgccactc cacggatgcc acatccatct 4320
cgggcacgag cactgtcctt gaccaagcag gactgcggg ggcgagactg gttgtgctcg 4380
ccactgctac ccctccgggc tcctgtcactg tgtcccatcc taacatcgag gaggttgctc 4440
tgtccaccac cggagagatc cccttttagg gcaaggctat cccctcagag gtgatcaagg 4500
ggggaagaca tctcatcttc tgccactcaa agaagaagtg cgacgagctc gccggaagg 4560
tggtcgcatt gggcatcaat gccgtggcct actaccgcg tcttgacgtg tctgtcatcc 4620
cgaccagcgg cgatgttgct gtctgttgcg ccgatgctct catgactggc tttaccggcg 4680
acttcgactc tgtgatagac tgcaacacgt gtgtcactca gacagtcat tttagccttg 4740
acctacctt taccattgag acaaccacg -tccccagga tgctgtctcc aggactcaac 4800
gccggggcag gactggcagg ggggaagccag gcatctatag atttgtggca cggggggagc 4860
gcccctccgg catgttcgac tcgtccgtcc tctgtgagtg ctatgacgcg ggctgtgctt 4920
ggtatgagct cagccccgc gagactacag ttaggctacg agcgtacatg aacaccccg 4980
ggcttcccg gtgccaggac catcttggt tttgggagg cgtctttacg ggccctactc 5040
atatagatgc ccactttcta tcccagacaa agcagagtgg ggagaacttt ccttacctgg 5100
tagcgtacca agccaccgtg tgcgttaggg ctcaagcccc tccccatcg tgggaccaga 5160
tgccgaagtg tttgatccgc cttaaaccca ccctccatgg gccaacaccc ctgctataca 5220
gactgggcgc tgttcagaat gaagtcaccc tgacgcaccc aatcaccaa tacatcatga 5280
catgcatgtc ggccgacctg gaggtcgtca cgagcacctg ggtgctcgtt ggcggcgctc 5340
tggctgctct ggccgcgtat tgccgtgcaa caggctgcgt ggtcatagtg ggcaggatcg 5400
tcttgctcgg gaagccggca attatacctg acagggagg tctctaccag gagttcgatg 5460
agatggaaga gtgctctcag cacttacctg acatcgagca agggatgatg ctcgctgagc 5520
agttcaagca gaaggccctc ggccctcctg agaccgcgtc ccgccatgca gaggttatca 5580
cccctgctgt ccagaccaac tggcagaaac tcgaggctct tggggcgaag cacatgtgga 5640
atttcacatcag tgggatacaa tacttgggcg gcctgtcaac gctgcctggg aaccccgcca 5700
ttgcttcatt gatggctttt acagctgcgc tcaccagccc actaaccact ggccaaaccc 5760
tcctcttcaa catattgggg ggggtgggtg ctgccagct cgcgcgcctc ggtgcgccta 5820
ccgcctttgt gggcgctggc ttagctgggg ccgcactcga cagcgttggc ctgggggaagg 5880
tcctcgtgga cattcttgca ggctatggcg cgggcgtggc gggagctctt gtggcattca 5940
agatcatgag cggtgagggt ccctccacgg aggacctggt caatctgotg ccgcctatcc 6000
tctcacctgg agcccttgca gtcggtgtgg tctttgcac aatactgcgc cggcgtgttg 6060
gcccgggcga gggggcagtg caatggatga accggcta at agccttcgcc tcccggggga 6120
accatgtttc cccacacac tacgtgccgg agagcgatgc agccgcgcgc gtcactgcca 6180
tactcagcag cctcactgta accagctcc tgaggcgact gcatcagtgg ataagctcgg 6240
agtgtaccac tccatgctcc ggttctggc taaggacat ctgggactgg atatgcgagg 6300
tgctgagcga ctttaagacc tggctgaaag ccaagctcat gccacaactg cctgggattc 6360
cctttgtgtc ctgccagcgc gggatatagg ggtctggcg aggagacggc attatgcaca 6420

```

```

ctcgctgcca ctgtggagct gagatcactg gacatgtcaa aaacgggacg atgaggatcg 6480
tcggtcctag gacctgcaag aacatgtgga gtgggacgtt cttcattaat gcctacacca 6540
cgggccccctg tactccccctt cctgcgccga actataagtt cgcgctgtgg aggggtgtctg 6600
cagaggaata cgtggagata aggcgggtgg gggacttcca ctacgtatcg ggcagtacta 6660
ctgacaatct caaatgcccc tgccagatcc catcgccoga atttttcaca gaattggacg 6720
gggtgcgcct acatagggtt ggcggccctt gcaagccctt gctgcgggag gaggtatcat 6780
tcagagtagg actccacgag taccgggtgg ggtcgcaatt accttgcgag cccgaaccgg 6840
acgtagccgt gttgacgtcc atgctcactg atccctccca tataacagca gaggcggccg 6900
ggagaagggtt ggcgagaggg tcacccctt ctatggccag ctccctcggt agccagctgt 6960
ccgctccatc tctcaaggca acttgcaccg ccaaccatga ctccctgac gccagactca 7020
tagaggctaa cctcctgtgg aggcaggaga tggcgggcaa catcaccagg gttgagtcag 7080
agaacaaagt ggtgattctg gactccttcg atccgcttgt ggcagaggag gatgagcggg 7140
aggctctcgt acccgacagaa attctgcgga agtctcgag attcgcccca gccctgcccg 7200
tctgggcgcg gccggactac aaccccttgc tagtagagac gtggaaaaag cctgactacg 7260
aaccacatgt ggtccatggc tgcccgctac cacctccacg gtccctcctt gtgcctccgc 7320
ctcggaaaaa gogtacgggtg gtcctcaccg aatcaaccct acctactgcc ttggccgagc 7380
ttgccaccaa aagttttggc agctcctcaa cttccggcat tacgggcgac aatacgacaa 7440
catcctctga gcccggccct tctggctgcc ccccgactc cgacgttgag tcctattctt 7500
ccatgcccc cctggagggg gagcctgggg atccggatct cagcgacggg tcatggctga 7560
cggtcagtag tggggccgac acggaagatg tcgtgtgctg ctcaatgtct tattcctgga 7620
caggcgact cgtcaccccg tgcgctgcgg aggaacaaaa actgccatc aacgcactga 7680
gcaactcgtt gctacgccat cacaatctgg tgtattccac cacttcacgc agtgcttgcc 7740
aaaggaagaa gaaagtcaca tttgacagac tgcaagttct ggacagccat taccaggacg 7800
tgctcaagga ggtcaaagca gggcgctcaa aagtgaaggc taacttgcta tccgtagagg 7860
aagcttgacg cctggcgccc ccacattcag ccaaattcaa gtttggctat ggggcaaaag 7920
acgtccgttg ccatgccaga aaggccgtag cccacatcaa ctccgtgtgg aaagaccttc 7980
tggaagacag tgtaacacca atagacacta ccatcatggc caagaacgag gttttctgcg 8040
ttcagcctga gaaggggggt cgtaagccag ctcgctctcat cgtgttcccc gacctgggcg 8100
tgcgctgtg cgagaagatg gccctgtaog acgtgggttag caagctcccc ttggccgtga 8160
tggaagctc ctacggattc caatactcac caggacagcg ggttgaattc ctcgtgcaag 8220
cgtggaagtc caagaagacc ccgatggggc tctcgtatga taccgctgt tttgactcca 8280
cagtcactga gagcgacatc cgtacggagg aggcatttta ccaatgttgt gacctggacc 8340
cccaagccc cgtggccatc aagtccctca ctgagaggct ttatgttggg ggccctctta 8400
ctaattcaag gggggaaaac tgcggctacc gcaggtgccg cgcgagcaga gtactgacaa 8460
ctagctgtgg taacaccctc actcgctaca tcaaggcccg ggcagcctgt cgagccgcag 8520
ggctccagga ctgcaccatg ctcggtgtgtg gcgacgactt agtcgttato tgtgaaagtg 8580
cgggggtcca ggaggacgcg gcgagcctga gagccttcac ggaggctatg accagggtact 8640
ccgccccccc cggggacccc ccacaaccag aatacgactt ggagcttata acatcatgct 8700
cctccaacgt gtcagtgcgc cacgacggcg ctggaaagag ggtctactac cttaccctgt 8760
accctacaac cccctcgcg agagccgcgt gggagacagc aagacacact ccagtcaatt 8820
cctggctagg caacataatc atgtttgccc ccacactgtg ggcgaggatg atactgatga 8880
cccacttctt tagcgtcctc atagccaggg atcagcttga acaggctctc aactgcgaga 8940
tctacggagc ctgctactcc atagaaccac tggatctacc tccaatcatt caaagactcc 9000
atggcctcag cgcattttca ctccacagtt actctccagg tgaaattaat aggggtggccg 9060
catgcctcag aaaacttggg gtcccgcctt tgcgagcttg gagacaccgg gcctggagcg 9120
tccgcgctag gcttctggcc agaggaggca aggcgtgccat atgtggcaag tacctcttca 9180
actgggcagt aagaacaaag ctcaaactca ctccgataac ggccgctggc cggctggact 9240
tgtccggctg gttcacggct ggctacagcg ggggagacat ttatcacagc gtgtctcatg 9300
cccggccccg ctggttctgg ttttgcttac tctgcttg gcaggggta ggcattctacc 9360
tctcccccaa ccgatgaaga ttgggctaac cactccaggc caataggcca ttccct 9416

```

<210> 14

<211> 3182

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 乙型肝炎病毒序列

<400> 14

```

aattccacaa cettccacca aactctgcaa gatcccagag tgagaggcct gtatttccct 60
gctggtggct ccagttcagg aacagtaaac cctgttctga ctactgcctc tcccttatcg 120
tcaatcttct cgaggattgg ggaccctgcg ctgaacatgg agaacatcac atcaggattc 180
ctaggacccc ttctcgtgtt acaggcgggg tttttcttgt tgacaagaat cctcacata 240
ccgcagagtc tagactcgtg gtggacttct ctcaattttc tagggggaac taccgtgtgt 300
cttgccaaaa attgcagtc cccaacctcc aatcactcac caacctcttg tcctccaact 360
tgtcctgggt atcgtcggat gtgtctgcgg cgttttatca tcttctctt catcctgctg 420
ctatgcctca tcttcttgtt ggttcttctg gactatcaag gtatgttgcc cgtttgtcct 480
ctaattccag gatcctcaac aaccagcacg ggaccatgcc ggacctgcat gactactgct 540
caaggaacct ctatgtatcc ctctgttgcc tgtacaaaac cttcggacgg aaattgcacc 600
tgtattccca tcccatcatc ctgggcttcc ggaataatcc tatgggagtg ggcctcagcc 660
cgtttctcct ggctcagttt actagtgcga tttgttcagt ggctcgtagg gctttcccc 720
actgtttggc tttcagttat atggatgatg tggatttggg ggccaagtct gtacagcatc 780
ttgagtcctt ttttaccgct gttaccaatt tcttttgtc tttgggtata cattaaacc 840
ctaacaaaac aaagagatgg ggttactctc taaattttat gggttatgtc attggatgtt 900
atgggtcctt gccacaagaa cacatcatc aaaaaatcaa agaattgttt agaaaacttc 960
ctattaacag gcctattgat tggaaagtat gtcaacgaat tgtgggtcct ttgggttttg 1020
ctgccccctt tacacaattg ggttatcctg cgttgatgcc tttgtatgca tgtattcaat 1080
ctaagcaggc tttcactttc tcgccaactt acaaggcctt tctgtgtaaa caatacctga 1140
acctttaccg cgttgcccg gcaacggccag gtctgtgcca agtgtttgct gacgcaacc 1200
ccactggctg gggcttggtc atgggccatc agcgcagtc tggaacctt tcggctctc 1260
tgccgatcca tactgcggaa ctctagccg cttgttttgc tcgcagcagg tctggagcaa 1320
acattatcgg gactgataac tctgttgtcc tatcccgcaa atatacatc tttccatggc 1380
tgctaggctg tgctgccaac tggatcctgc ggggacgtc ctttgtttac gtcccgctcg 1440
cgctgaatcc tgccgacgac cttctcggg gtgccttggg actctctcgt ccccttctcc 1500
gtctgccgtt ccgaccgacc acggggcgca cctctcttta cgcggactcc cgtctgtg 1560
cttctcatct gccggaccgt gtgcacttct cttcacctct gcacgtcgca tggagaccac 1620
cgtgaacgcc caccaaatat tgcccaaggt cttacataag aggactcttg gactctcagc 1680
aatgtcaacg accgaccttg aggcatactt caaagactgt ttgtttaaag actgggagga 1740
gttgggggag gagattaggt taaaggctct tgtactagga ggctgtaggc ataaattgg 1800
ctgcgcacca gcaccatgca actttttcac ctctgcctaa tcatctcttg ttcattgtct 1860
actgttcaag cctccaagct gtgccttggg tggctttggg gcatggacat cgaccttat 1920
aaagaatttg gagctactgt ggagttactc tcgtttttgc cttctgactt ctttctctca 1980
gtacgagatc ttctagatac cgcctcagct ctgtatcggg aagccttaga gtctcctgag 2040
cattgttcac ctccaccatac tgcactcagg caagcaattc tttgctgggg ggaactaatg 2100
actctagcta cctgggtggg tgttaatttg gaagatccag cgtctagaga cctagtagtc 2160
agttatgtca acactaatat gggcctaaag ttcaggcaac tcttgtggtt tcacatttct 2220
tgtctcactt ttggaagaga aacagttata gagtatgttg tgtctttcgg agtgtggatt 2280
cgcactcctc cagcttatag accaccaaact gccctatcc tatcaacact tccggagact 2340
actgttggtt gacgacgagg caggctccct agaagaagaa ctccctcgcc tcgcagacga 2400
aggtctcaat ccgcgcgtcg cagaagatct caatctcggg aatctcaatg ttagtattcc 2460
ttggactcat aagggtggga actttactgg gctttattct tctactgtac ctgtctttaa 2520
tctcatttg aaaacacccat cttttcctaa tatacattta caccaagaca ttatcaaaaa 2580
atgtgaacag tttgtaggcc cactcacagt taatgagaaa agaagattgc aattgattat 2640
gcctgccagg ttttatccaa aggttaccaa atatttacca ttggataagg gtattaaacc 2700
ttattatcca gaacatctag ttaatcatta ctccaaaact agacactatt tacacactct 2760
atggaaggcg ggtatattat ataagagaga aacaacacat agcgctcat tttgtgggtc 2820
accatattct tgggaacaag atctacagca tggggcgaga tctttccacc agcaatctc 2880

```

```

tggtgattcctt tcccgaccac cagttggatc cagccttcag agcaaacacc gcaaatccag 2940
attgggactt caatcccaac aaggacacct ggccagacgc caacaaggta ggagctggag 3000
cattcgggct gggtttcacc ccaccgcacg gaggcctttt ggggtggagc cctcaggctc 3060
agggcatact acaaaactttg ccagcaaadc cgctcctgc ctccaccaat cgccagtcag 3120
gaaggcagcc taccocgctg tctccacctt tgagaaacac tcatcctcag gccatgcagt 3180
gg

```

<210> 15

<211> 7478

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 甲型肝炎病毒序列

<400> 15

```

ttcaagaggg gtctccggag gtttccggag cccctcttgg aagtccatgg tgaggggact 60
tgatacctca ccgccgtttg cctaggctat aggctaaatt tccctttccc tgtccctccc 120
ttatttccct ttgttttgct tgtaaatatt aattcctgca gggtcagggg tctttaatct 180
gtttctctat aagaacactc aattttcacg ctttctgtct tctttcttcc agggctctcc 240
ccttgcccta ggctctggcc gttgcgcccg ggggggtcaa ctccatgatt agcatggagc 300
tgtaggagtc taaattgggg acgcagatgt ttgggacgtc accttgcaat gttaacttgg 360
ctctcatgaa cctctttgat cttccacaag gggtaggcta cgggtgaaac ctcttaggct 420
aatacttcta tgaagagatg ctttgatag ggtaacagcg gcgatattg gtgagttggt 480
aagacaaaaa ccattcaacg ccggaggact ggctctcatc cagtggatgc attgagtgga 540
ttgattgtca gggctgtctc taggtttaat ctccagacct tctgtgctta gggcaaacac 600
catttgccct taaatggat cctgtgagag ggggtccctc cattgacagc tggactgttc 660
tttggggcct tatgtggtgt ttgcctctga ggtactcagg ggcatttagg tttttcctca 720
ttcttaaaaa ataataaata tgtaaaaaa aggaattttc cagactgttg ggagtggcct 780
tgaccacatc ctgtcttttg cagatattga ggaagagcaa atgattcagt ccgttgatag 840
gactgcagtg actggagctt cttacttcac ttctgtggac caatcttcag ttcatactgc 900
tgaggttggc tcacatcaaa ttgaaccttt gaaaacctct gttgataaac ctgggttctaa 960
gaaaactcag ggggaaaagt ttttcctgat tcattctgct gattggctca ctacacatgc 1020
tctctttcat gaagtggcaa aattggatgt ggtgaaacta ctgtataatg agcagtttgc 1080
cgtccaaggt ttgttgagat accatacata tgcaagattt ggcattgaga ttcaagttca 1140
gataaatccc acaccctttc agcaaggagg actaatttgt gccatggttc ctgggtgacca 1200
aagttatggg tcaatagcat ccttgactgt ttatcctcat ggtctgttaa attgcaatat 1260
caacaatgta gttagaataa aggttccatt tatttatact agaggtgctt atcatttttaa 1320
agatccacag taccagttt gggaattgac aatcagagtt tggtcagagt tgaatattgg 1380
aacaggaaact tcagcttaca cttcactcaa tgttttagct aggtttacag atttggagtt 1440
gcatggatta actcctcttt ctacacagat gatgagaaat gaatttaggg tcagtactac 1500
tgaaaatggt gtaaatgtgt caaattatga agatgcaagg gcaaaaatgt cttttgcttt 1560
ggatcaggaa gattggaagt ctgatccttc ccaagggtgg ggaattaaaa ttactcattt 1620
tactacctgg acatccatt caaccttagc tgctcagttt ccatttaatg cttcagattc 1680
agttggacaa caaattaaag ttattccagt ggaccatac tttttccaaa tgacaaacac 1740
taatcctgat caaaaatgta taactgcctt ggcctctatt tgtcagatgt tctgcttttg 1800
gaggggagat cttgtttttg attttcaggt ttttccaacc aaatatcatt caggtagact 1860
gttggtttgt tttgttcctg ggaatgagtt aatagatgtt actggaatta cattaaaaca 1920
ggcaactact gtccttctgt cagtgatgga cattacagga gtgcagtcaa ccttgagatt 1980
tcgtgttctt tggatttctg atacacctta tcgagtgaat aggtacacga agtcagcaca 2040
tcaaaaagggt gagtacctg ccattgggaa gcttattgtg tattgttata acagactgac 2100
ttctccttct aatgttgctt ctcatgttag agttaatgtt tatctttcag caattaattt 2160
ggaatgtttt gtcctctttt accatgctat ggatgttact acacaggttg gagatgattc 2220
aggaggtttt tcaacaacag tttctacaga gcagaatgtt cctgatcccc aagttgggat 2280
aacaaccatg agggatttaa aaggaaaagc caatagggga aagatggatg tttcaggagt 2340

```

gcaagcacct cgtgggagct atcagcaada attgaacgat ccagtttttag caaagaaagt 2400
 acctgagaca tttcctgaat tgaagcctgg agagtccaga catacatcag atcacatgtc 2460
 tattttataaa ttcattgggaa ggtctcattt tttgtgcact tttactttca attcaataaa 2520
 taaagagtac acatttccaa taacctgtgc ttgcacttct aatcctcctc atgggtttacc 2580
 atcaacatta aggtgggttct tcaatttggt tcagttgtat agaggaccat tggatttaac 2640
 aattataatc acaggagcca ctgatgtgga tggatggcc tggtttactc cagtgggcct 2700
 tgctgtcgac ccttgggtgg aaaaggagtc agctttgtct attgattata aaactgccct 2760
 tggagctgtt agattttaata caagaagaac aggaaacatt caaattagat tgcctgggta 2820
 ttcttatttg tatgccgtgt ctggagcact ggatggcctg ggggataaga cagattctac 2880
 atttggtattg tttctattcg agattgcaaa ttacaatcat tctgatgaat atttgcctt 2940
 cagttgttat ttgtctgtca cagagcaatc agagttctat tttcctagag ctccattaaa 3000
 ttcaaatgct atgttgtcca ctgaatccat gatgagtaga attgcagctg gagacttgga 3060
 gtcatcagtg gatgatccca gatcagagga ggatagaaga tttgagagtc atatagaatg 3120
 taggaaacca tacaaagaat tgagactgga ggttgggaaa caaagactca aatatgctca 3180
 ggaagagtta tcaaatgaag tgcttccacc tcttaggaaa atgaaggggt tattttcaca 3240
 agctaaaatt tctctttttt atactgagga gcatgaaata atgaagtttt cttggagagg 3300
 agtgactgct gatactaggg ctttgagaag atttggattc tctctggctg ctggtagaag 3360
 tgtgtggact cttgaaatgg atgctggagt tcttactgga agattgatca gattgaatga 3420
 tgagaaatgg acagaaatga aggatgataa gattgtttca ttaattgaaa agttcacaa 3480
 caataaatat tgggtctaaag tgaattttcc acatggaatg ttggatcttg aagaaattgc 3540
 tgccaattct aaggattttc caaatatgtc tgagacagat ttgtgtttcc tgttacattg 3600
 gctaaatcca aagaaaatca atttagcaga tagaatgctt ggattgtctg gagtgcagga 3660
 aattaaggaa caggggtgtt gactgatagc agagtgtaga actttcttgg attctattgc 3720
 tgggactttg aaatctatga tgtttgggtt tcatcattct gtgactgttg aaattataaa 3780
 tactgtgctt tgttttggtt agagtggaat cctgctttat gtcatacaac aattgaacca 3840
 agatgaacac tctcacataa ttgggttggt gagagttatg aattatgcag atattggctg 3900
 ttcagttatt tcatgtggta aagttttttc caaatgtta gaaacagttt ttaattggca 3960
 aatggattct agaattgatg agctgaggac tcagagcttc tctaattggt taagagatat 4020
 ttgttcagga attactattt ttaaaagttt taaggatgcc atatattggt tatatacaaa 4080
 attgaaggat ttttatgaag taaattatgg caagaaaaag gatattctta atattctcaa 4140
 agataatcag caaaaaatag aaaaagccat tgaagaagca gacaattttt gcatttttga 4200
 aattcaagat gtagagaaat ttgatcagta tcagaaaggg gttgatttaa tacaaaagct 4260
 gagaactgtc cattcaatgg cgcaagtga ccccaatttg ggggttcatt tgtcacctct 4320
 cagagattgc atagcaagag tccacaaaaa gctcaagaat cttggatcta taaatcaggc 4380
 catggtaaca agatgtgagc cagttgtttg ctatttgtat ggcaaaagag ggggagggaa 4440
 aagcttgact tcaattgcat tggcaacca aatttgtaaa cactatgggt ttgaacctga 4500
 gaaaaatatt tacaccaaac ctgtggcctc agattatttg gatggatata gtggacaatt 4560
 agtttgcatt attgatgata ttggccaaaa cacaacagat gaagattggt cagatttttg 4620
 tcaattagtg tcaggatgcc caatgagatt gaatatggct tctctagagg agaagggcag 4680
 acatttttcc tctcctttta taatagcaac ttcaaatgg tcaaatccaa gtccaaaaac 4740
 agtttatgtt aaggaagcaa ttgatcgtag gcttcatttt aaggttgaag ttaaacctgc 4800
 ttcatttttt aaaaatcctc acaatgatat gttgaatgtt aatttggcca aaacaaatga 4860
 tgcaattaag gacatgtctt gtgttgattt aataatggat ggacacaata tttcattgat 4920
 ggatttactt agttccttag tgatgacagt tgaaattagg aaacagaata ttgagtgaatt 4980
 catggagtgt tgggtctcagg gaatttcaga tgatgacaat gatagtgcag tggctgagtt 5040
 tttccagttc tttccatctg gtgaaccatc aaattggaag ttatctagtt ttttccaatc 5100
 tgtcactaat cacaagtggg ttgctgtggg agctgcagtt ggcattcttg gagtgcctgt 5160
 gggaggatgg tttgtgtata agcatttttc ccgcaaagag gaagaaccaa ttccagctga 5220
 aggggtttat catggcgtga ctaagcccaa acaagtgatt aaattggatg cagatccagt 5280
 agagtccag tcaactctag aaatagcagg attagttagg aaaaatctgg ttcagtttgg 5340
 agtttgtgag aaaaatggat gtgtgagatg ggtcatgaat gccttaggag tgaaggatga 5400
 ttggttggtt gtaccttctc atgcttataa atttgaaaag gattatgaaa tgatggagtt 5460
 ttacttcaat agaggtggaa cttactattc aatttcagct ggtaatgttg ttattcaatc 5520
 tttagatgtg ggatttcaag atgttgtttt aatgaagggt cctacaattc ccaagtttag 5580
 agatattact caacacttta ttaagaaagg agatgtgcct agagccttaa atcgcttggc 5640

```

aacattagtg acaaccgtta atggaactcc tatgttaatt tctgagggac cattaaagat 5700
ggaagaaaaa gccacttatg ttcataagaa gaatgatggg actacagttg atttgactgt 5760
agatcaggca tggagaggaa aaggatgaag tcttcctgga atgtgtgggtg gggccctagt 5820
gtcatcaa at cagtcatac aga atgcaat tttgggtatt catgttgctg gaggaattc 5880
aattcttgtg gcaaagctgg ttactcaaga aatgtttcaa aacattgata agaaaattga 5940
aagtcagaga ata atgaaag tgggaatttac tcaatgttca atgaatgtag tctccaaaac 6000
gcttttttaga aagagtccca ttcatcacca cattgataaa accatgatta attttcctgc 6060
agctatgcct ttctctaaag ctgaaattga tccaatggct atgatgttgt ccaaattatc 6120
attacctatt gtggagggaac cagaggatta caagggaagct tcagtttttt atcaaaaaca 6180
aatagtaggc aagactcagc tagttgatga ctttttagat cttgatattg ctattacagg 6240
ggctccaggc attgatgcta tcaatatgga ttcatctcct gggtttcctt atgttcaaga 6300
aaaattgacc aaaagagatt taatttggtt ggatgaaaat ggtttgctgt taggagttca 6360
cccaagattg gccagagaa ttttatttaa tactgtcatg atggaaaatt gttctgactt 6420
agatgttggt tttacaactt gtccaaaaga tgaattgaga ccattagaga aagttttgga 6480
atcaaaaaca agagccattg atgcttgctc tttggattat acaattctat gtcgaatgta 6540
ttgggggtcca gctatcagtt atttccattt gaatccaggg tttcacacag gtgttgctat 6600
tggcatagat cctgatagac agtgggatga attattttaa acaatgataa gatttgagga 6660
tgttggtcct gatttagatt tctctgcttt tgatgccagt cttagtccat ttatgattag 6720
ggaagcaggt aga atcatga gtgaattatc tggaaacacca tctcattttg gaacagctct 6780
tatcaatact atcatttatt ctaa acatct gctgtacaac tggtgttatc atgtttgtgg 6840
ttcaatgcct tctgggtctc cttgcacagc tttgttgaat tcaattatta ataatttaa 6900
tctgtattat gtgttttcta aaatatttgg aaagtctcca gttttctttt gtcaagcttt 6960
gaggatcctt tgttacggag atgatgtttt gatagttttt tccagagatg ttcaaattga 7020
caatcttgac ttgattggac agaaaattgt agatgagttc aaaaaacttg gcatgacagc 7080
cacctcagct gataaaaaatg tgcctcaact gaagccagtt tcagaattga cttttctcaa 7140
aagatctttc aatttggtgg aggatagaat tagacctgca atttcagaaa agacaatttg 7200
gtctttgatg gcttggcaga gaagtaacgc tgagtttgag cagaatttag aaaatgctca 7260
gtggtttgct tttatgcatg gctatgagtt ctatcagaaa ttttattatt ttgttcagtc 7320
ctggtttggag aaagagatga tagaatatag acttaa atct tatgattggg ggagaatgag 7380
attttatgac cagtgtttca tttgtgacct ttc atgattt gtttaaaca attttcttac 7440
tctttctgag gtttgtttat ttcttttgtc cgctaact 7478

```

<210> 16

<211> 2061

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 丙型肝炎病毒 NS3/4A 编码区

<400> 16

```

atggcgccta tcacggccta tgcccagcag acaagggggc ttttgggatg cataatcacc 60
agcttgaccg gccgggacaa aaaccagggt gaggggtgagg ttccagatcgt gtcaactgct 120
gccagactt tcttggcaac ctgcattaa- ggggtgtgtt ggactgtcta ccatggagcc 180
ggaacaagga ccattgcgtc acctaagggt cctgttatcc agatgtacac caatgtggac 240
caagacctcg taggtggcc cgctcccaa ggtgcccgtt cataacacc atgcacttgc 300
ggctcctcgg acctttacct ggtcacgagg cacgccgatg tcattcctgt ggcgcgacgg 360
ggtgatggca ggggcagcct gctttcgccc cggcctatct cttacttgaa aggtcctcgt 420
ggaggccctc tgctgtgccc cgcaggacat gccgtaggca tattcagagc cgcggtatgc 480
accctgaggag tggctaaggc ggtggacttc atccccgtag agagcttaga gacaaccatg 540
aggtccccgg tgttctcaga caactcctcc ccaccagcag tgccccagag ctaccaagtg 600
gccacactgc atgctccac cggcagcggt aagagcacca aggtcccggc cgcatacgca 660
gctcagggct acaagggtgct ggtgctcaac cctccggtt ctgcaacaat gggctttggg 720

```

```

gcttacatgt ccaaggccca tgggattgat cctaacaatca ggactgggggt gaggacaatt 780
actactggga gcccgatcac gtattccacc tacggcaagt tccttgccga cggcggggtgt 840
tcaggggggtg cttatgacat aataatttgt gacgagtgcc actccacgga tgcaacatcc 900
atcttgggca ttggcactgt ccttgaccaa gcagagaccg cgggggagag actgactgtg 960
ctcgccaccg ctaccctcc gggtccgtc actgtgcccc atcctaacat cgaggagggtt 1020
gctctgtcca ctaccggaga gatccccctt tatggcaagg ctattcccct tgaagcaatt 1080
aaggggggga gacatctcat cttctgccac tcaaagaaga agtgcgacga gctcgccgca 1140
aaactgggtcg cgttgggctg caatgcctg gcttactacc ggggccttga tgtgtccgtc 1200
atcccgacca gtggtgacgt tgtcgtcgtg gcaactgacg cctcatgac cggctttacc 1260
ggcgacttcg attcgggtgat agactgcaac acgtgtgtca cccagacagt cgacttcagc 1320
cttgacctta ccttcacat tgagacaatc acgcttcccc aggatgctgt ctcccgact 1380
caacgtcggg gtaggactgg cagagggaag ccaggcatct acagatttgt ggcaccgggg 1440
gagcgtcctt ctggcatgtt tgactcgtct gtctctcgtg agtgctatga cgcgggttgt 1500
gcttggtatg agcttacgac cgcgagacc acagttaggc tacgagcata catgaacacc 1560
ccgggacttc ccgtgtgcca agaccatctt gaattttggg agggcgtctt tacgggtctc 1620
accacatag acgcccactt cctatcccag acaaagcaga gtggggaaaa ccttccctat 1680
ctggtagcgt accaagccac cgtgtgcgt agagctcaag cccctcccc gtcgtgggac 1740
cagatgtgga agtgcttgat ccgtctcaag cccaccctcc atgggccaac acctctgcta 1800
tatagactgg gcgctgtcca gaatgaagtc accctgacgc acccagtcac caagtatatc 1860
atgacatgta tgcggtgta cctggaggtc gtcacgagta cctgggtgct cgttggcggc 1920
gttctggctg ctttggccgc gtattgcta tccacaggct gcgtggcat agtaggtagg 1980
attgtcttgt ccggaaagcc ggcaatcata cccgacaggg aagtcctcta ccgggagttc 2040
gatgaaatgg aagagtgtg a 2061

```

<210> 17

<211> 686

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 17

```

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

```

Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400
 Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
 405 410 415
 Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys
 420 425 430
 Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
 435 440 445
 Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
 450 455 460
 Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly
 465 470 475 480
 Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
 485 490 495
 Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val
 500 505 510
 Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
 515 520 525
 His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 530 535 540
 Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr
 545 550 555 560
 Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
 565 570 575
 Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
 580 585 590
 Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn
 595 600 605
 Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met

610 615 620
Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
625 630 635 640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
645 650 655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
660 665 670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
675 680 685

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆寡核苷酸

<400> 18
ccgtctagat cagcactctt ccatttcac 30

<210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆寡核苷酸

<400> 19
cctgaattca tggcgccctat cacggcctat 30

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆寡核苷酸

<400> 20
ccacgcggcc gcgacgacct acag 24

<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 克隆寡核苷酸

<400> 21
ctggaggtcg tcacgcctac ctgggtgctc gtt 33

<210> 22
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克隆寡核苷酸

<400> 22
 accgagcacc caggtaggcg tgacgacctc cag 33

<210> 23
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克隆寡核苷酸

<400> 23
 ctggaggtcg tccgcggtac ctgggtgctc gtt 33

<210> 24
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 克隆寡核苷酸

<400> 24
 accgagcacc caggtaccgc ggacgacctc cag 33

<210> 25
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 25
 Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser
 1 5 10 15
 Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
 20 25

<210> 26
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 26

```

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Gly
 1           5           10           15
Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
      20           25

```

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 27

```

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Gly
 1           5           - 10           15
Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
      20           25

```

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 28

```

Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Ser Thr Trp Val
 1           5           10

```

<210> 29

<211> 632

<212> PRT

<213> 丙型肝炎病毒 NS3 肽人工序列

<220>

<223> 丙型肝炎病毒 NS3 肽

<400> 29

```

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

```

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu Thr
 85 90 95
 Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
 100 105 110
 Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160
 Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400
 Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
 405 410 415
 Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys
 420 425 430
 Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
 435 440 445
 Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
 450 455 460
 Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly
 465 470 475 480
 Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
 485 490 495
 Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val
 500 505 510
 Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp

```

      515              520              525
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 530              535              540
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr
545              550              555              560
Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
      565              570              575
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
      580              585              590
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn
      595              600              605
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
      610              615              620
Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr
625              630

```

<210> 30
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 丙型肝炎病毒 NS4A 肽

```

<400> 30
Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr
 1              5              10              15
Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser
      20              25              30
Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe
      35              40              45
Asp Glu Met Glu Glu Cys
      50

```

<210> 31
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A

```

<400> 31
Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
 1              5              10              15
Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly
      20              25              30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
      35              40              45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
      50              55              60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65              70              75              80

```

Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu Thr
 85 90 95
 Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
 100 105 110
 Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
 115 120 125
 Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
 130 135 140
 Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
 145 150 155 160
 Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
 165 170 175
 Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400
 Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
 405 410 415
 Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys
 420 425 430
 Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
 435 440 445
 Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
 450 455 460
 Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly
 465 470 475 480
 Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
 485 490 495
 Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val
 500 505 510
 Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp

```

      515              520              525
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
  530              535              540
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr
  545              550              555              560
Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
      565              570              575
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
      580              585              590
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn
      595              600              605
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
      610              615              620
Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Gly Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
  625              630              635              640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
      645              650              655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
      660              665              670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
      675              680              685

```

<210> 32

<211> 686

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A

<400> 32

```

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

```

180						185						190					
Ala	Val	Pro	Gln	Ser	Tyr	Gln	Val	Ala	His	Leu	His	Ala	Pro	Thr	Gly		
195						200						205					
Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Lys	Val	Pro	Ala	Ala	Tyr	Ala	Ala	Gln	Gly	Tyr		
210						215						220					
Lys	Val	Leu	Val	Leu	Asn	Pro	Ser	Val	Ala	Ala	Thr	Met	Gly	Phe	Gly		
225						230						235					
Ala	Tyr	Met	Ser	Lys	Ala	His	Gly	Ile	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Thr	Gly		
245						250						255					
Val	Arg	Thr	Ile	Thr	Thr	Gly	Ser	Pro	Ile	Thr	Tyr	Ser	Thr	Tyr	Gly		
260						265						270					
Lys	Phe	Leu	Ala	Asp	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Gly	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ile		
275						280						285					
Ile	Cys	Asp	Glu	Cys	His	Ser	Thr	Asp	Ala	Thr	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile		
290						295						300					
Gly	Thr	Val	Leu	Asp	Gln	Ala	Glu	Thr	Ala	Gly	Ala	Arg	Leu	Thr	Val		
305						310						315					
Leu	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Val	Pro	His	Pro	Asn		
325						330						335					
Ile	Glu	Glu	Val	Ala	Leu	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Pro	Phe	Tyr	Gly		
340						345						350					
Lys	Ala	Ile	Pro	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Gly	Gly	Arg	His	Leu	Ile	Phe		
355						360						365					
Cys	His	Ser	Lys	Lys	Lys	Cys	Asp	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Leu	Val	Ala		
370						375						380					
Leu	Gly	Val	Asn	Ala	Val	Ala	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Leu	Asp	Val	Ser	Val		
385						390						395					
Ile	Pro	Thr	Ser	Gly	Asp	Val	Val	Val	Val	Ala	Thr	Asp	Ala	Leu	Met		
405						410						415					
Thr	Gly	Phe	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Ser	Val	Ile	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys		
420						425						430					
Val	Thr	Gln	Thr	Val	Asp	Phe	Ser	Leu	Asp	Pro	Thr	Phe	Thr	Ile	Glu		
435						440						445					
Thr	Ile	Thr	Leu	Pro	Gln	Asp	Ala	Val	Ser	Arg	Thr	Gln	Arg	Arg	Gly		
450						455						460					
Arg	Thr	Gly	Arg	Gly	Lys	Pro	Gly	Ile	Tyr	Arg	Phe	Val	Ala	Pro	Gly		
465						470						475					
Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Met	Phe	Asp	Ser	Ser	Val	Leu	Cys	Glu	Cys	Tyr		
485						490						495					
Asp	Ala	Gly	Cys	Ala	Trp	Tyr	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Glu	Thr	Thr	Val		
500						505						510					
Arg	Leu	Arg	Ala	Tyr	Met	Asn	Thr	Pro	Gly	Leu	Pro	Val	Cys	Gln	Asp		
515						520						525					
His	Leu	Glu	Phe	Trp	Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp		
530						535						540					
Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu	Pro	Tyr		
545						550						555					
Leu	Val	Ala	Tyr	Gln	Ala	Thr	Val	Cys	Ala	Arg	Ala	Gln	Ala	Pro	Pro		
565						570						575					
Pro	Ser	Trp	Asp	Gln	Met	Trp	Lys	Cys	Leu	Ile	Arg	Leu	Lys	Pro	Thr		
580						585						590					
Leu	His	Gly	Pro	Thr	Pro	Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Asn		
595						600						605					
Glu	Val	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Val	Thr	Lys								


```

Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Gly Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
625                630                635                640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
                645                650                655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
                660                665                670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
        675                680                685

```

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 33

```

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Pro
1          5          10          15
Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
        20          25

```

<210> 34

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 34

```

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Pro
1          5          10          15
Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
        20          25

```

<210> 35

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 35

```

Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Pro
1          5          10          15
Ala Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
        20          25

```

<210> 36
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 36
Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Cys Ser
1 5 10 15
Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
20 25

<210> 37
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 37
Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Cys Cys Ser
1 5 10 15
Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
20 25

<210> 38
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 38
Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Leu Glu Val Ser Ser Ser
1 5 10 15
Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
20 25

<210> 39
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

<400> 39
Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Ser Ser Ser Ser Cys Ser

```

      1             5             10             15
Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
      20             25

```

<210> 40
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A 肽

```

<400> 40
Thr Lys Tyr Met Thr Cys Met Ser Ala Asp Val Val Val Val Thr Ser
 1             5             10             15
Thr Trp Val Leu Val Gly Gly Val Leu
      20             25

```

<210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 丙型肝炎病毒 NS5 肽

```

<400> 41
Ala Ser Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly
 1             5             10             15

```

<210> 42
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的丙型肝炎病毒 NS5A/B 肽

```

<400> 42
Ser Ser Glu Asp Val Val Cys Cys Ser Met Trp Val Leu Val Gly Gly
 1             5             10             15
Val Leu

```

<210> 43
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A

<400> 43

```

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
 1           5           10           15
Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly
      20           25           30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
      35           40           45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
      50           55           60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65           70           75           80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu Thr
      85           90           95
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
      100          105          110
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
      115          120          125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
      130          135          140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
145          150          155          160
Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
      165          170          175
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
      180          185          190
Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
      195          200          205
Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
      210          215          220
Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
225          230          235          240
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
      245          250          255
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
      260          265          270
Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
      275          280          285
Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
      290          295          300
Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
305          310          315          320
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
      325          330          335
Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
      340          345          350
Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
      355          360          365
Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
      370          375          380
Leu Gly Val Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
385          390          395          400
Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
      405          410          415
Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys

```

```

          420          425          430
Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
          435          440          445
Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
          450          455          460
Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly
          465          470          475          480
Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
          485          490          495
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val
          500          505          510
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
          515          520          525
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
          530          535          540
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr
          545          550          555          560
Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
          565          570          575
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
          580          585          590
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn
          595          600          605
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
          610          615          620
Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Thr Pro Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
          625          630          635          640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
          645          650          655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
          660          665          670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
          675          680          685

```

<210> 44

<211> 686

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A

<400> 44

```

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

```



```

His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 530                      535                      540
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr
545                      550                      555                      560
Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
                      565                      570                      575
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
                      580                      585                      590
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn
                      595                      600                      605
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
                      610                      615                      620
Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Pro Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
625                      630                      635                      640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
                      645                      650                      655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
                      660                      665                      670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
                      675                      680                      685

```

<210> 45

<211> 686

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A

<400> 45

```

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

```

Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
 195 200 205
 Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
 210 215 220
 Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
 245 250 255
 Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
 260 265 270
 Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
 275 280 285
 Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
 290 295 300
 Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
 325 330 335
 Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
 340 345 350
 Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
 355 360 365
 Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
 370 375 380
 Leu Gly Val Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
 385 390 395 400
 Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
 405 410 415
 Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys
 420 425 430
 Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
 435 440 445
 Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
 450 455 460
 Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly
 465 470 475 480
 Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
 485 490 495
 Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val
 500 505 510
 Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
 515 520 525
 His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
 530 535 540
 Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr
 545 550 555 560
 Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
 565 570 575
 Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
 580 585 590
 Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn
 595 600 605
 Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
 610 615 620
 Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Arg Pro Ala Trp Val Leu Val Gly Gly


```

625          630          635          640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
          645          650          655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
          660          665          670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
          675          680          685

```

<210> 46
 <211> 686
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A

```

<400> 46
Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
 1          5          10          15
Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly
          20          25          30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
          35          40          45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
          50          55          60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
          65          70          75          80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu Thr
          85          90          95
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
          100          105          110
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
          115          120          125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
          130          135          140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
          145          150          155          160
Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
          165          170          175
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
          180          185          190
Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
          195          200          205
Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
          210          215          220
Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
          225          230          235          240
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
          245          250          255
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
          260          265          270
Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
          275          280          285
Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile

```

290	295	300
Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val		
305	310	315
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn		
	325	330
Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly		335
	340	345
Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe		350
	355	360
Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala		365
	370	375
Leu Gly Val Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val		380
385	390	395
Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met		400
	405	410
Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys		415
	420	425
Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu		430
	435	440
Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly		445
	450	455
Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly		460
465	470	475
Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr		480
	485	490
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val		495
	500	505
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp		510
	515	520
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp		525
	530	535
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr		540
545	550	555
Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro		560
	565	570
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr		575
	580	585
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn		590
	595	600
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met		605
	610	615
Ser Ala Asp Leu Glu Val Val Cys Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly		620
625	630	635
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val		640
	645	650
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp		655
	660	665
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys		670
	675	680
		685

<210> 47

<211> 686

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A

<400> 47

```

Met Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg Gly Leu Leu Gly
 1           5           10           15
Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val Glu Gly
          20           25           30
Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu Ala Thr Cys
          35           40           45
Ile Asn Gly Val Cys Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr
          50           55           60
Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65           70           75           80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu Thr
          85           90           95
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
          100          105          110
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
          115          120          125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
          130          135          140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
145          150          155          160
Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
          165          170          175
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
          180          185          190
Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
          195          200          205
Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
          210          215          220
Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
225          230          235          240
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
          245          250          255
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
          260          265          270
Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
          275          280          285
Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
          290          295          300
Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
305          310          315          320
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
          325          330          335
Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
          340          345          350
Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
          355          360          365
Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
          370          375          380
Leu Gly Val Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
385          390          395          400

```

```

Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
              405                      410                      415
Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys
              420                      425                      430
Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
              435                      440                      445
Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
              450                      455                      460
Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly
465                      470                      475                      480
Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
              485                      490                      495
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val
              500                      505                      510
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
              515                      520                      525
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
530                      535                      540
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr
545                      550                      555                      560
Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
              565                      570                      575
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
              580                      585                      590
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn
              595                      600                      605
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
610                      615                      620
Ser Ala Asp Leu Glu Val Cys Cys Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
625                      630                      635                      640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
              645                      650                      655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
              660                      665                      670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
              675                      680                      685

```

<210> 48

<211> 686

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A

<400> 48

```

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

```

```

Ile Ala Ser Pro Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp
65          70          75          80
Gln Asp Leu Val Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ala Arg Ser Leu Thr
          85          90          95
Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala
          100         105         110
Asp Val Ile Pro Val Arg Arg Arg Gly Asp Gly Arg Gly Ser Leu Leu
          115         120         125
Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser Ser Gly Gly Pro Leu
          130         135         140
Leu Cys Pro Ala Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys
145          150         155         160
Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Ser Leu
          165         170         175
Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Ser Asp Asn Ser Ser Pro Pro
          180         185         190
Ala Val Pro Gln Ser Tyr Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly
          195         200         205
Ser Gly Lys Ser Thr Lys Val Pro Ala Ala Tyr Ala Ala Gln Gly Tyr
          210         215         220
Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Met Gly Phe Gly
225          230         235         240
Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly
          245         250         255
Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly
          260         265         270
Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly Cys Ser Gly Gly Ala Tyr Asp Ile Ile
          275         280         285
Ile Cys Asp Glu Cys His Ser Thr Asp Ala Thr Ser Ile Leu Gly Ile
          290         295         300
Gly Thr Val Leu Asp Gln Ala Glu Thr Ala Gly Ala Arg Leu Thr Val
305          310         315         320
Leu Ala Thr Ala Thr Pro Pro Gly Ser Val Thr Val Pro His Pro Asn
          325         330         335
Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
          340         345         350
Lys Ala Ile Pro Leu Glu Ala Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe
          355         360         365
Cys His Ser Lys Lys Lys Cys Asp Glu Leu Ala Ala Lys Leu Val Ala
          370         375         380
Leu Gly Val Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg Gly Leu Asp Val Ser Val
385          390         395         400
Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val Val Val Val Ala Thr Asp Ala Leu Met
          405         410         415
Thr Gly Phe Thr Gly Asp Phe Asp Ser Val Ile Asp Cys Asn Thr Cys
          420         425         430
Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr Ile Glu
          435         440         445
Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala Val Ser Arg Thr Gln Arg Arg Gly
          450         455         460
Arg Thr Gly Arg Gly Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly
465          470         475         480
Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp Ser Ser Val Leu Cys Glu Cys Tyr
          485         490         495
Asp Ala Gly Cys Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val

```

```

      500      505      510
Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Cys Gln Asp
      515      520      525
His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile Asp
      530      535      540
Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu Pro Tyr
545      550      555      560
Leu Val Ala Tyr Gln Ala Thr Val Cys Ala Arg Ala Gln Ala Pro Pro
      565      570      575
Pro Ser Trp Asp Gln Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr
      580      585      590
Leu His Gly Pro Thr Pro Leu Leu Tyr Arg Leu Gly Ala Val Gln Asn
      595      600      605
Glu Val Thr Leu Thr His Pro Val Thr Lys Tyr Ile Met Thr Cys Met
      610      615      620
Ser Ala Asp Leu Glu Val Ser Ser Ser Thr Trp Val Leu Val Gly Gly
625      630      635      640
Val Leu Ala Ala Leu Ala Ala Tyr Cys Leu Ser Thr Gly Cys Val Val
      645      650      655
Ile Val Gly Arg Ile Val Leu Ser Gly Lys Pro Ala Ile Ile Pro Asp
      660      665      670
Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
      675      680      685

```

<210> 49

<211> 686

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>突变的丙型肝炎病毒 NS3/4A

<400> 49

```

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

```

Glu	Val	Thr	Leu	Thr	His	Pro	Val	Thr	Lys	Tyr	Ile	Met	Thr	Cys	Met
610						615					620				
Ser	Ala	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Trp	Val	Leu	Val	Gly	Gly
625					630					635					640
Val	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Tyr	Cys	Leu	Ser	Thr	Gly	Cys	Val	Val
				645						650				655	
Ile	Val	Gly	Arg	Ile	Val	Leu	Ser	Gly	Lys	Pro	Ala	Ile	Ile	Pro	Asp
			660					665						670	
Arg	Glu	Val	Leu	Tyr	Arg	Glu	Phe	Asp	Glu	Met	Glu	Glu	Cys		
	675						680						685		

图1

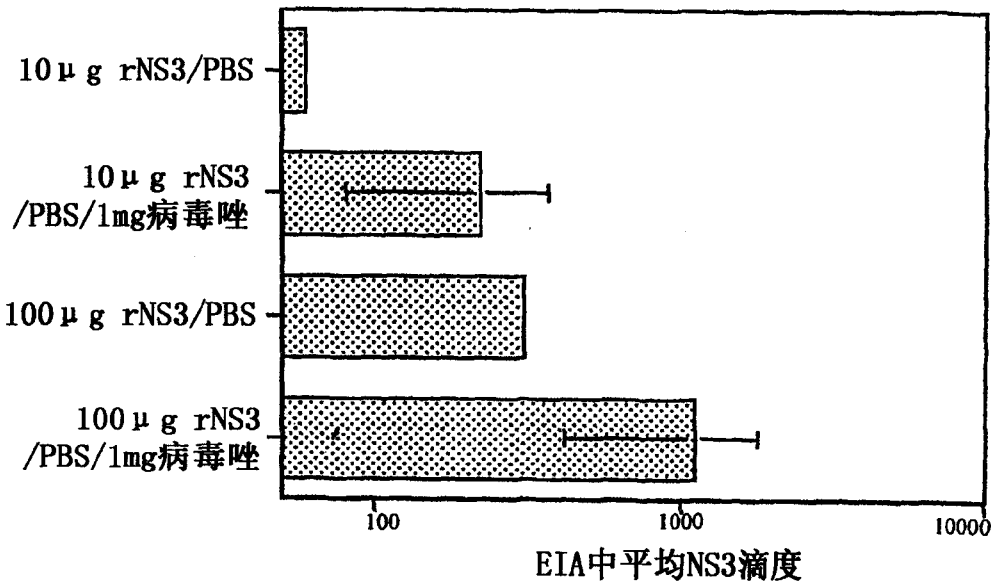


图2

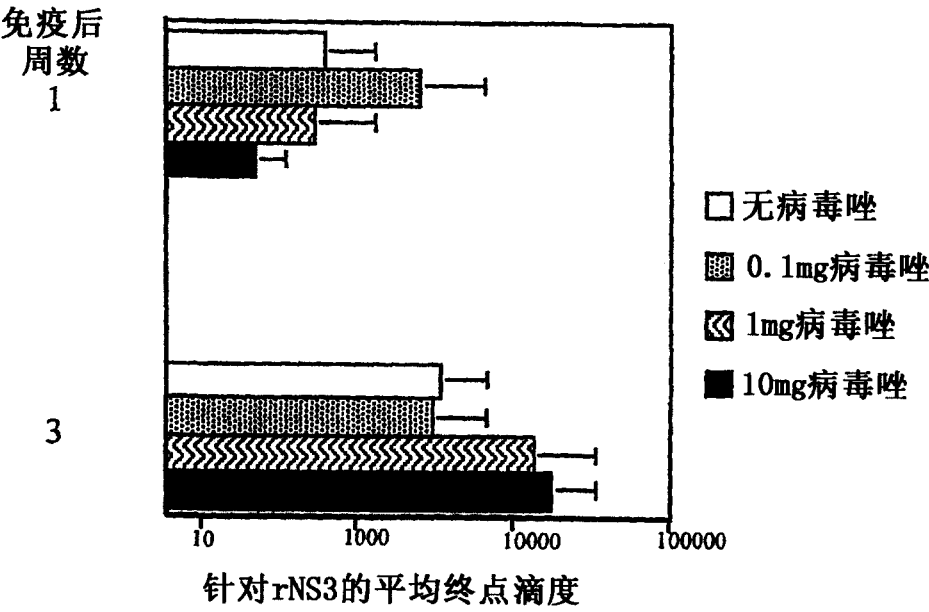


图3

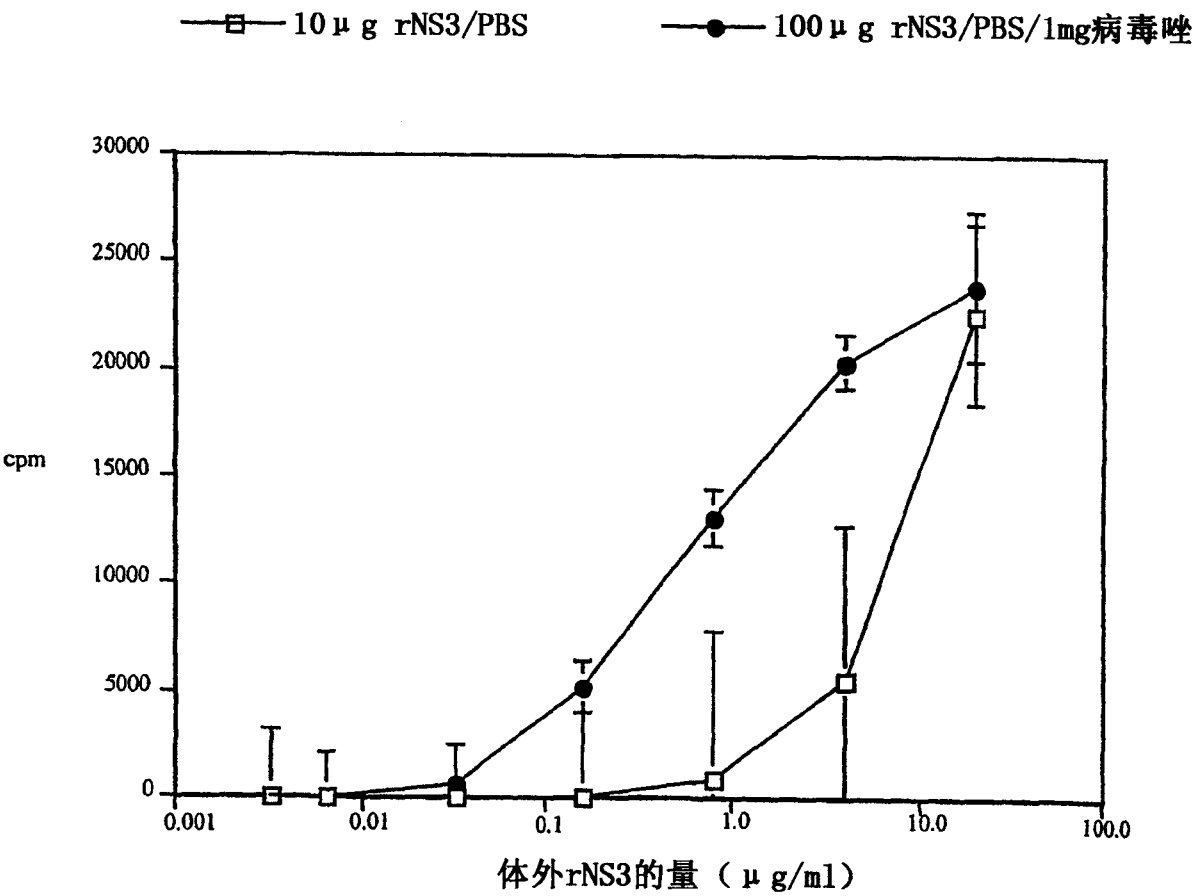


图4

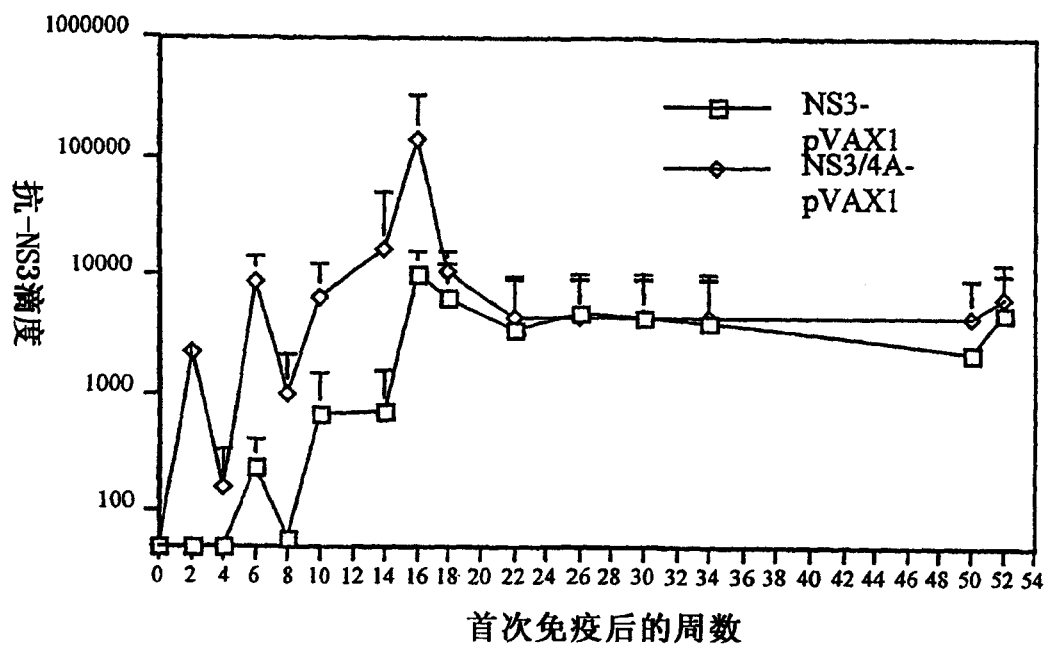


图5A

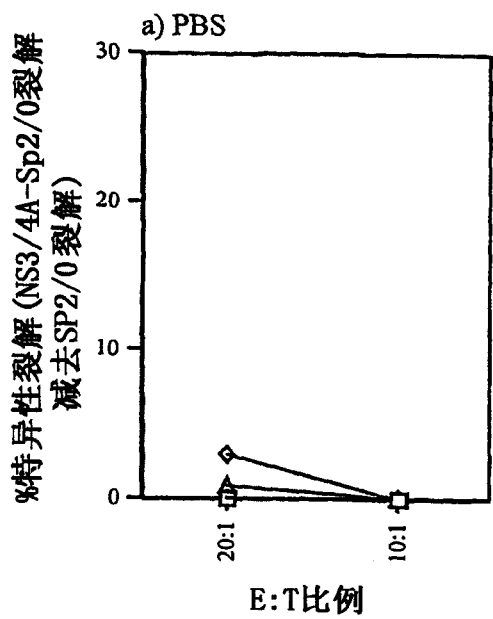


图5B

