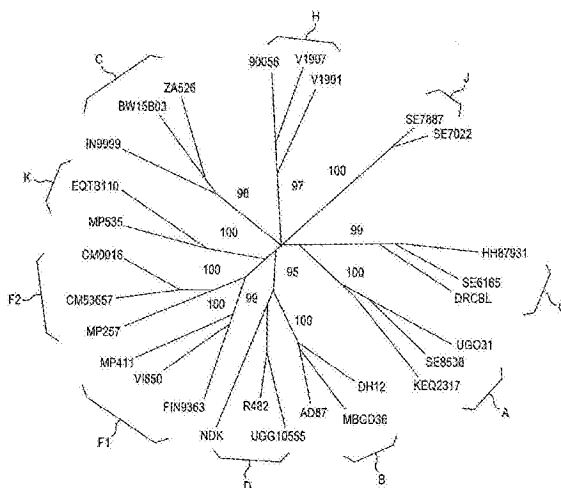




(43)申请公布日 2018.03.30

序列表32页 附图11页

本发明涉及慢病毒包装载体,所述慢病毒包装载体包含非B亚型gag-pol序列,尤其是D亚型gag-pol序列。本发明还涉及用于制备和使用这些载体的方法。本发明还涉及包含HIV-1非B亚型Gag和/或Pol蛋白的慢病毒载体颗粒。



1. 一种复制缺陷型慢病毒包装载体,所述载体缺乏 Ψ 位点且编码D亚型HIV-1Gag-Pol蛋白。
2. 如权利要求1所述的载体,其特征在于,所述HIV-1Gag-Pol蛋白是HIV-1NDK的HIV-1Gag-Pol蛋白。
3. 如权利要求2所述的载体,其特征在于,所述载体编码序列SEQ ID NO:2的氨基酸序列。
4. 如权利要求1~3中任一项所述的载体,其特征在于,所述载体是包含编码D亚型HIV-1Gag-Pol蛋白的核苷酸序列的质粒。
5. 一种用于产生包装载体的方法,所述方法包括:将编码D亚型HIV-1Gag-Pol蛋白的核苷酸序列插入质粒中受非HIV启动子控制,以产生所述包装载体。
6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述HIV-1Gag-Pol蛋白是HIV-1NDK的HIV-1Gag-Pol蛋白。
7. 如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述载体编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列。
8. 一种用于产生慢病毒载体颗粒的方法,所述方法包括:向细胞给予编码D亚型HIV-1Gag-Pol蛋白的包装载体和慢病毒载体。
9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述包装载体和所述慢病毒载体是质粒。
10. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述细胞瞬时表达D亚型HIV-1Gag和Pol蛋白。
11. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,将所述包装载体整合进入所述细胞的基因组。
12. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述HIV-1Gag-Pol蛋白是HIV-1NDK的HIV-1Gag-Pol蛋白。
13. 如权利要求12所述的方法,其特征在于,所述包装载体编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列。
14. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,所述方法还包括选择包装载体,所述包装载体包装的慢病毒载体的效价高于编码B亚型HIV-1Gag-Pol蛋白的相同包装载体。
15. 一种包含权利要求1~3中任一项所述的载体的细胞。
16. 如权利要求15所述的细胞,其特征在于,将所述载体整合进入所述细胞的基因组。
17. 一种包含D亚型HIV-1Gag和Pol蛋白的慢病毒载体颗粒。
18. 如权利要求17所述的慢病毒载体颗粒,其特征在于,所述Gag和Pol蛋白是HIV-1NDK Gag和Pol蛋白。
19. 如权利要求18所述的方法,其特征在于,所述Gag和Pol蛋白是通过编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列的核酸序列表达而产生的Gag和Pol蛋白。

非B亚型GAG蛋白在慢病毒包装中的应用

背景技术

[0001] 重组疫苗已随重组DNA技术的进步而发展,重组DNA技术能够修饰病毒基因组以产生修饰的病毒。通过这种方式,已能够将遗传序列引入非致病性病毒,从而它们编码需要在干扰后于靶细胞内得以表达的免疫原性蛋白质,以在其宿主内发展特定免疫应答。

[0002] 此类疫苗构成了疫苗技术中的重大进步(Kutzler等,Nat Rev Genet,9(10):776-788,2008)。具体而言,它们具有优于传统疫苗的优势:避免活(减毒的)病毒和消除灭活疫苗制造的相关风险。

[0003] 采用经修饰的逆转录病毒(逆转录病毒载体)的基因递送在上世纪80年代早期由Mann等描述(Cell,33(1):153-9,1983)。最常用的致瘤性逆转录病毒基于莫洛尼(Moloney)鼠白血病病毒(MLV)。其基因组简单,从该基因组产生多聚蛋白质Gag、Pol和Env,并以反式形式供病毒复制所需(Breckpot等,2007,Gene Ther,14(11):847-62;He等,2007,Expert Rev vaccines,6(6):913-24)。一般需要的顺式序列是长末端重复序列(LTR)及其如下周边序列:整合所需的反向重复序列(IR或att位点)、包装序列 Ψ 、转运RNA结合位点(引物结合位点,PBS),和逆转录涉及的一些其它序列(LTR内的重复R,以及多嘌呤序列(PPT),正链起始所必需)。为了生成复制缺陷型逆转录病毒载体,通常使gag、pol和env基因全部缺失,并且用表达盒替代。

[0004] 源自慢病毒基因组的逆转录病毒载体(即,慢病毒载体)已涌现为用于基因治疗和免疫治疗目的的有希望的工具,因为它们显示优于其它病毒系统的若干优势。具体而言,慢病毒载体本身无毒,并且不像其它逆转录病毒,慢病毒能够转导非分裂细胞,尤其是树突细胞(He等,2007,Expert Rev vaccines,6(6):913-24),这允许通过内源性通路的抗原递呈。慢病毒代表逆转录病毒科(Retroviridae)的一个慢病毒(slow virus)属,其包括人免疫缺陷病毒(HIV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、马传染性脑炎病毒(EIAV)、山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)和猫免疫缺陷病毒(FIV)。慢病毒可以无限地持续存在于其宿主内,并且在一生的感染期间以不同速度连续复制。所述病毒在其宿主内的持续复制取决于其避开宿主防御的能力。

[0005] 重组慢病毒载体的设计基于所述慢病毒的顺式与反式作用序列的分离。非分裂细胞中的有效整合与复制需要所述慢病毒基因组中存在两种顺式作用序列:中心多嘌呤序列(cPPT)和中心终止序列(CTS)。它们导致形成三链DNA结构,称为中心DNA“瓣(flapp)”,该结构使基因进入非分裂细胞(包括树突细胞(DC))核内的效率最大化(Zennou等,2000,Cell,101(2)173-85;Arhel等,2007,EMBO J,26(12):3025-37)。

[0006] 已经基于由包装构建体为反式包装载体提供B亚型Gag、Pol、Tat和Rev蛋白而生成了HIV-1慢病毒载体(Naldini等,PNAS 15:11382-8(1996);Zufferey等,Nature Biotechnology 15:871-875,1997);Dull等,Journal of Virology(1997))。这些研究采用B亚型Gag和Pol蛋白进行。而HIV-1包装构建体中非B亚型gag和pol序列的作用还未经评估。

[0007] 除B亚型外存在HIV-1的多种不同亚型。HIV-1的一些亚型,例如C、E和A亚型,似乎在转送上比HIV-1B亚型(美国和欧洲的主要亚型)更为有效。Essex等,Adv Virus

Res.1999;53:71-88。在发达西方国家,发现HIV-1优势亚型是进化枝B,这与存在于非洲和亚洲(绝大多数HIV感染人类的居住地)的那些亚型和重组子相差甚远。Spira等, J.Antimicrobial Chemotherapy (2003) 51, 229-240。因此,在北美和欧洲所见的B亚型逆转录病毒与全球范围人类传染的那些病毒亚型之间可能存在严重差异(出处同上)。亚型差异可影响HIV传播模式。同性传播和静脉内药物滥用是在欧洲和美国观察到的进化枝B株系的主要传播模式(出处同上)。相反,进化枝A、C、D和E在非洲和亚洲占优势,在这些地方异性传播为主(出处同上)。此外,一些研究提出艾滋病(AIDS)的进展视感染性亚型而有不同(出处同上)。因此,似乎HIV-1B亚型与其它HIV-1亚型差异很大。

[0008] HIV种系分类法一般基于源自相同分离物的多个亚基因组区域(gag、pol和env)的核苷酸序列,或基于全长基因组序列分析。对于HIV-1的接近全长序列的种系分析揭示,HIV-1B亚型在遗传上与HIV D亚型最紧密相关(图1)。对于HIV-1Gag和Pol蛋白序列的种系分析也显示,HIV-1B亚型在遗传上与HIV D亚型最紧密相关(图2)。

[0009] 不过,HIV-1-NDK(一种D亚型病毒)对CD4+淋巴细胞的细胞致病性显著高于HIV-1-BRU原形(一种B亚型病毒)。这可能归因于D亚型病毒的增强的致融性(fusogenicity)和感染性。De Mareuil等,J.Virol.66:6797(1992)。重组病毒的表型分析表明,来自HIV-1-NDK基质(MA)蛋白N末端部分的75个氨基酸与HIV-1-NDK的包膜糖蛋白一同造成了HIV-1-NDK在CD4+淋巴细胞中增强的致融性以及HIV-1-NDK在一些CD4-细胞系中增强的感染性(出处同上)。

[0010] 本领域需要慢病毒包装构建体来生成更高效价的经包装慢病毒载体,以减少注射体积,提高剂量,降低疫苗接种的成本,并且增加能在一批次中治疗的患者的数量。本发明满足了这一需要。

[0011] 发明概述

[0012] 用D亚型HIV-1的gag-pol基因替代慢病毒包装质粒(构建体p8.74)中的HIV-1B亚型的gag-pol基因,以生成构建体pThV-GP-N。所述构建体用于慢病毒载体的生成。相较于构建体p8.74,使用pThV-GP-N质粒获得约2倍高的效价。因此,相对于B亚型病毒的Gag-Pol,D亚型病毒的Gag-Pol提高了慢病毒载体颗粒的效价。本发明涉及包含D亚型gag-pol序列,尤其是来自HIV-1NDK的D亚型gag-pol序列的慢病毒包装载体。在一个优选实施方式中,所述慢病毒包装载体包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列。在一个优选实施方式中,所述慢病毒包装载体编码SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0013] SEQ ID NO 1的核苷酸序列是:

[0014]

```
atgggtgcgagagcgctcagtatttaagcgggggaaaattagatacatgggaaagaattcggttacggccaggaggaaa  
gaaaaaatatgcactaaaacatttgatatgggcaagcaggagctagaacgatttacacttaatcctggccttttag  
agacatcagaaggctgtaaacaaataataggacagctacaaccatctattcaaacaggatcagaagaaattagatca  
ttatataatacagtagcaaccctctatttgtgtacatgaaaggatagaggtaaaagacaccaaagaagctgtagaaaa  
gatggaggaagaacaaaacaaaagtaagaaaaagacacagcaagcagcagctgatagcagccagggtcagccaaaatt  
accctatagtgagaaacctacaggggcaaattggtacatcaggccatatcacctagaactttgaacgcatgggtaaaa  
gtaatagaagaaaaggccttcagcccgaagtaatacccatgttttcagcattatcagaaggagccacccacaaga  
tttaaacaccatgctaaacacagtggggggacatcaagcagctatgcaaatgctaaaagagaccatcaatgacgaag
```

ctgcagaatgggacagattacatccagtgcatgcagggcctgttgaccaggccaaatgagagaaccaaggggaagt
gatatagcaggaactactagtagcccttcaggaacaaaatagcatggatgacaagcaaccacctatcccagtaggaga
aatctataaaagatggataatcctgggattaaataaaaatagtaagaatgtatagccctgtcagcatttttgacataa
gacagggaccaaaaggaaccttttagagactatgtagaccggttctataaaaactctaagagccgagcaagcttcacag
gatgtaaaaaactggatgacagaaaccttgttgggtccaaaatgcaaaccagattgtaaaactatcttaaaagcatt
gggaccacaggctacactagaagaaatgatgacagcatgccagggagtgggggggcccggccataaagcaagagttt
tggctgaggcaatgagccaagtaacagggttcagctactgcagtaatgatgcagagaggcaattttaagggcccaaga
aaaagtattaagtgtttcaactgtggcaaggaagggcacacagcaaaaaattgcagggcccttagaaaaaagggtg
tttgaaatgcggaagggaaggacaccaaatgaaagattgcactgaaagacaggctaatttttagggaagatttggc
cttcccacaagggaaggccggggaattttcttcagagcagaccagagccaacagccccaccagcagagagcttcggg
tttggggaggagataacccccctcagaaacaggagcagaaaagacaaggaactgtatccttttagcttccctcaaate
actcttttgcaacgacccccctcgtcacaataaagatagggggacagctaaaggaagctctattagatacaggagcaga
tgatacagtagtattagaagaaataaatttgcaggaaaaatggaaagccaaaaatgatagggggaattggaggtttatca
aagtaagacagtagatgataaatactcatagaaatctgtggataaaagctatgggtacagtagtagtaggacctaca
cctgtcaacataattggaagaaatttgttgaccagattggctgcactttaattttccaatttagtccatttgaaac
tgtaccagtaaaattaaagccaggaatggatggcccaaaagttaaacaatggccattgacgaagaaaaataaaagc
attaacagaaatttgtacagaaatggaaaaggaaggaaaaatttcaagaattgggctgaaaaatccatataatactc
caatatttggcataaagaaaaagacagtaccaagtggagaaaaattagtagatttcagagaacttaataagagaact
caagatttctgggaggttcaattaggaataccgcatacctgcagggctgaaaaagaaaaatcagtaacagtagtgga
tgtgggtgatgcatatttctcagttcccttagatgaagattttaggaaatataccgcatttaccatacctagtataa
acaatgagacaccagggttagatatcagtacaatgtgtctccacagggttggaaggatcaccggcaatatttcaa
agtagcatgacaaaaatcttagagccctttagaaaacaaaaatccagaaatagttatctatcaatacatggatgattt
gtatgtaggatctgacttagaaatagggcagcatagaacaaaaatagaggaattaagagaacatctattgaggtggg
gatttaccacaccagataaaaaacatcagaaagaacctccatttctttggatgggttatgaactccatcctgataaa
tggacagtacagcctataaacctgccagaaaaagaaagctggactgtcaatgatatacagaagtttagtggggaaatt
aaactgggcaagccagatttatgcaggaattaaagtaaagcaattatgtaaactccttaggggaaccaagcactaa
cagaagtagtagcactaacagaagaagcagaattagaactggcagaaaacagggaatttctaaaagaaccagtacat
ggagtgtattatgacctatcaaaagacttaatagcagaactacagaacaaggggacggccaatggacataccaaat
ttatcaagaaccattttaaaaatctaaaaacaggaaagtatgcaagaacgaggggtgccacactaatgatgtaaaac
aattaacagaggcagtgcaaaaaatagccacagaaagcatagtgatatggggaaagactcctaaatttaaactacc
atacaaaaggaaacatgggaaacatgggtggatagagtattggcaagccacctggattcctgagtgggaatttgtcaa
taccctccttttagtaaaattatggtaccagttagagaaggaaccataataggagcagaaactttctatgtagatg
gggcagctaatagagagactaaataggaaaagcaggatatgttactgacagaggaagacagaaagttgtccctttc
actgacacgacaaatcagaagactgagttacaagcaattaatctagctttacaggattcgggattagaagtaaaca
agtaacagattcacaatatgcactaggaatcattcaagcacaccagataagagtgaatcagagttagtcagtcaaa
taatagagcagctaataaaaaaaggaaaaggtttacctggcatgggtaccagcacacaaaggaattggaggaaaatgaa
caagtagataaatttagtcagtcagggaatcaggaaagtactattttggatggaaatagataaggctcaggaagaaca
tgagaaatatcacaacaattggagagcaatggctagtgattttaacctaccacctgtggtagcgaaagaaatagtag
ctagctgtgataaatgtcagctaaaaggagaagccatgcatggacaagtagactgtagtccaggaatatggcaatta

gattgtacacatctggaaggaaaagttatcctggtagcagttcatgtagccagtggtctatatagaagcagaagttat
tccagcagaaacggggcaagaacagcatactttctcttaaaatttagcaggaagatggccagtaaaagtagtacata
cagataatggcagcaatttcaccagtgctacagttaaggccgcctgttggtgggcagggatcaaacaggaatttggga
attccctacaatccccaagtaagagtagtagaatctatgaataaagaattaaagaaaattataggacaggttaag
agatcaagctgaacatcttaagacagcagtacaaatggcagtatccacaatttttaaagaaaaggggggattg
ggggatacagtgagggggaagaataatagacataatagcaacagacatacaaactagagaattacaaaaacaaatc
ataaaaaattcaaaattttcggggtttattacagggacagcagagatccaatttggaaaggaccagcaaagcttctctg
gaaaggtgaaggggcagtagtaatacaagacaatagtgacataaaggtagtagtaaccaagaagaaaagtaagatcatta
gggattatggaaaacagatggcaggtgatgattgtgtggcaagtagacaggatgaggattaac (SEQ ID NO 1) .

[0015] SEQ ID NO 2的氨基酸序列是:

[0016]

MGARASVLSGGKLDAWERIRLRPGGKKKYALKHLI WASRELERIALNPGLLETSEGCKQIIGQLQPSIQTGSEELRS
LYNTIATLYCVHERIEVKDTKEAVEKMEEEQNKSKKKKTQQAADSSQVSQNYPIVQNLQGQMVHQAISPRTLNAWVK
VIEEKAFSPEVIPMFSALESGATPQDLNLTMLNTVGGHQAAMQMLKETINDEAAEWDRLEHPVHAGPVAPGQMREPRGS
DIAGTTSTLQEQIAWMTSNPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSVPSILDIRQGPKPEFRDYVDRFYKTLRAEQASQ
DVKNWMTETLLVQANPDCKTILKALGPQATLEEMMTACQGVGGPGHKARVLAEAMSQVTGSVTAVMMQRGNFKGPR
KSIKCFNCGKEGHTAKNCRAPRKKGCWKCGRGHQMKDCSERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPTAPPAESFG
FGEEITPSQKQEQKDKELYPLASLSLFGNDPSSQFFREDLAFPQKGAGEFSSEQTRANSPTSREL RVWGGDNPLSE
TGAEGQGTVSFSFPQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMNLP GKWKPKMIGGIGGFIKVRQYDQILI
EICGYKAMGTVLVGPTPVNIIGRNLLTQIGCTLNFPISPIETVPVKLKP GMDGPKVKQWPLTEEKIKALTEICTEME
KEGKISRIGPENPYNTPIFAIKKKDSTKWRKLVDFREL NKRKTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKSVTVLVDVGDAYFSVP
LDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNP EIVIYQYMDDLVYGSDLEIG
QHRTKIEELREHLLRWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIKLPEKESWTVNDIQKL VGKLNWASQIYAG
IKVKQLCKLLRGTKALTEVVPLTEEALELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAELQKQGDGQWYQIYQEPFKNLK
TGKYARTRGAHTNDVKQLTEAVQKIATESI VIWGKTPKFKLPIQKETWETWWIEYWQATWIPEWEFVNTPLVKLWY
QLEKEPIIGAETFYVDGAANRET KL GKAGYVTD RGRQKVVPFTDTTNQKTELQAINLALQDSGLEVNIVTDSQYALG
IIQAQPKSESELVSQIIIEQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLV SQGIRKVLFLDGDIDKAQEEHEKYHNNWRA
MASDFNLPPVVAKEIVASCDKQKLGKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTHLEGKVLVAVHVASGYIEAEVIPAETGQETA
YFLLKLAGRWPVKVVHTDNGSNFTSATVKAACWWAGIKQEF GIPYNPQSQGVVESMNKELKKIIGQVRDQAEHLKTA
VQMAVFIHNFKRKGGIGGYSAGERIIDIIATDIQTRELQKQIIKIQNFRVYYRDSRDPIWKGP AKLLWKGE GAVVIQ
DNSDIKVVPRRKVKIIRDYGKQ MAGDDCVASRQDED (SEQ ID NO:2) .

[0017] 本发明涉及包含D亚型MA序列,尤其是来自HIV-1NDK的D亚型MA序列的慢病毒包装载体。在一个优选实施方式中,所述慢病毒包装载体编码含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的MA蛋白。

[0018] SEQ ID NO 3的氨基酸序列是:

[0019]

MGARASVLSGGKLD TWERIRLRPGGKKKYALKHLI WASRELERFTLNPGLLETSEGCKQIIGQLQPSIQTGSEEIRS
LYNTVATLYCVHERIEVKDTKEAVEKMEEEQNKSKKKKTQQAADSSQVSQNY (SEQ ID NO 3) .

[0020] 优选地,相较于编码HIV-1BRU的HIV Gag MA蛋白的慢病毒包装载体(例如,

p8.74),所述编码HIV Gag MA蛋白的慢病毒包装载体产生的经包装慢病毒载体效价至少增至1.5倍,或至少增至2倍。优选地,所述慢病毒包装载体是复制缺陷型的,并且缺乏 Ψ 位点。

[0021] 在一个优选实施方式中,所述慢病毒包装载体编码的HIV Gag MA蛋白在12位的氨基酸不是谷氨酸且在15位的氨基酸不是精氨酸。优选地,所述慢病毒包装载体不会同时在第46位具有缬氨酸且在第61位具有亮氨酸。

[0022] 在一个优选实施方式中,所述MA蛋白的第12位氨基酸是赖氨酸。在一个优选实施方式中,第15位氨基酸是苏氨酸。在一个优选实施方式中,第15位氨基酸是丙氨酸。在一个优选实施方式中,第46位氨基酸是亮氨酸。在一个优选实施方式中,第61位氨基酸是异亮氨酸。在一个优选实施方式中,第61位氨基酸是甲硫氨酸。

[0023] 在一个实施方式中,所述载体不编码功能性Env蛋白。

[0024] 本发明还涉及用于制备上述慢病毒包装载体的方法和使用这些慢病毒包装载体的方法。

附图说明

[0025] 通过参考附图更加完整地理解本发明。

[0026] 图1描述HIV病毒的种系发生树。

[0027] 图2A和B描述HIV GAG (A) 和POL (B) 蛋白的种系发生树。

[0028] GAG和POL蛋白的序列获自以下网址:<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEALIGN/align.html>。就各已知的HIV进化枝而言,随机选择一名患者(进化枝B)或两名患者的病毒序列,并且将GAG和POL蛋白序列与参比进化枝B蛋白(B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455)作比较。使用Vector NTI高级11(英杰公司(Invitrogen))来进行比对。

[0029] 图3描述使用p8.74和pThV-GP-N质粒供载体生成所获得的效价。使用原病毒质粒(pFLAP-CMV-GFP)、假型(pseudotyping)质粒(pTHV-VSV.G)以及常用的包装质粒(源自BRU株系,p8.74)或NDK源性的包装质粒(pTHV-GP-N)来产生慢病毒颗粒。各包装质粒进行18次独立转染,并且通过FACS分析来检测颗粒效价。采用使用原病毒质粒的载体也获得相似结果,所述原病毒质粒包含驱动HIV抗原表达的 β 2微球蛋白启动子。

[0030] 图4描述野生型BRU和NDK病毒的生成,以及对其各自早期效率的评价。用野生型BRU(pBRU)或NDK(pNDK-N)病毒的编码质粒转染293T细胞。48小时后收集病毒上清液,并稀释以感染P4-CCR5细胞(包含稳定的荧光素酶报告基因,该报告基因的表达由HIV LTR驱动,允许在TAT蛋白(由病毒带来)存在下产生荧光素酶)。使用BRU或NDK病毒的系列稀释物来感染P4-CCR5细胞,并且检测荧光素酶表达(A)或荧光素酶/P24比(B)。

[0031] 图5描述采用源自包装质粒的不同比例的BRU(p8.74)和NDK(pThV GP-N)的载体生成。就各条件而言(从0 μ g NDK+10 μ g BRU到10 μ g NDK+0 μ g BRU),检测效价(灰色柱)和P24水平(黑色方块)。

[0032] 图6描述使用源自包装质粒的BRU(8.74)或NDK(pThV GP-N)所产生载体上清液的Western印迹。使用NIH抗-P24MAB(183-H12-5C)来进行P24蛋白和前体检测。

[0033] 图7描述进化枝B病毒(BRU;SEQ ID NO:3)和进化枝D病毒(NDK;SEQ ID NO:4)的N末端MA序列的序列比对。

[0034] 图8描述多种进化枝B病毒的N末端MA序列的序列比对。

[0035] 图9描述多种进化枝D病毒的N末端MA序列的序列比对。

[0036] 图10描述进化枝B病毒 (BRU) 和其它进化枝病毒的N末端MA序列的序列比对。

具体实施方式

[0037] B亚型HIV-1病毒与其它HIV-1亚型的不同之处在于,B亚型病毒似乎具有较低的传播效率和不同的传播模式。不过,B亚型病毒已被广泛应用于HIV-1慢病毒载体和慢病毒包装载体的生成。为了确定非B亚型病毒的Gag和Pol蛋白是否能用于慢病毒包装载体的生成,将慢病毒包装质粒(构建体p8.74)中HIV-1B亚型的gag-pol基因用D亚型HIV-1的gag-pol基因替代,以生成构建体pThV-GP-N。所述构建体用于慢病毒载体生成。使用pThV-GP-N质粒获得的效价约是构建体p8.74所得的2倍(图3)。因此,所述包装载体中的D亚型HIV-1Gag-Pol提高所述慢病毒载体的效价,使其超过采用B亚型HIV-1Gag-Pol所观察到的效价。

[0038] 所述慢病毒载体效价的增加益处在于允许减少给定剂量慢病毒载体中的污染物。这能促进减小注射体积和增加可用剂量。效价增加还通过减少达到特定剂量所必需的材料和劳动量,以及增加单批慢病毒载体能够治疗的患者数量,来促进降低疫苗接种成本。

[0039] HIV-1BRU和HIV-1NDK病毒的系列稀释物表明,HIV-1NDK病毒在病毒生存周期的早期更为有效(图4)。通过混合不同量的B亚型和D亚型包装载体,显示D亚型包装载体提高所述慢病毒载体制备物中的效价和p24水平(图5)。还观察到,采用所述D亚型包装载体的慢病毒载体制备物中的p24的加工完成度较低,显示更高水平的p24前体(图6)。因此,D亚型包装载体中的Gag显示与B亚型包装载体有多种差异。

[0040] 对于HIV-1Env,HIV-1-NDK基质(MA)蛋白自N末端部分起的75个氨基酸是造成HIV-1-NDK在CD4+淋巴细胞中致融性增强的原因,并且造成HIV-1-NDK在一些CD4-细胞系中增强的感染性。De Mareuil等,J.Virol.66:6797(1992)。由于采用B亚型和D亚型包装载体的慢病毒载体生成中所用的Env蛋白是相同的(即,VSV),仅在B亚型和D亚型包装载体的HIV-1MA有差异。

[0041] 检测来自不同进化枝的HIV-1病毒的M的N末端75个氨基酸的氨基酸保守度和发散度。显示HIV-1NDK与来自HIV-1BRU的氨基酸具有10种差异(图7)。然而,将HIV-1NDK与20种不同HIV-1B亚型病毒的组合作比较时,仅观察到这些差异中的8种(图8)。将其它D亚型病毒纳入比较时,这些差异中仅有4种保留(图9)。这些差异是:D亚型病毒的氨基酸第12位没有谷氨酸,氨基酸第15位没有精氨酸,氨基酸第46位没有缬氨酸,以及氨基酸第61位没有亮氨酸。

[0042] 将其它亚型的病毒纳入比较时,所述其它亚型似乎与D亚型对齐,保留了几乎全部这些差异(图10)。几乎全部这些非B亚型病毒在第12位呈现赖氨酸。这些非B亚型病毒中的许多在第15位呈现丙氨酸。几乎全部所述非B亚型病毒在第46位呈现亮氨酸。几乎全部所述非B亚型病毒在第61位呈现甲硫氨酸或异亮氨酸。所述非B亚型病毒显示普遍性,在第12位呈现赖氨酸,在第15位都呈现非精氨酸的氨基酸,在第46位呈现亮氨酸,且在第61位呈现异亮氨酸或甲硫氨酸。

[0043] 本发明涉及编码非B亚型Gag和/或Pol蛋白的包装载体,以及包含这些载体的宿主细胞。本发明还涉及用于制备编码非B亚型Gag和/或Pol蛋白的包装载体的方法。本发明还

涉及使用这些包装载体用于生成慢病毒载体的方法,以及包含非B亚型Gag和/或Pol蛋白的慢病毒载体。

[0044] 包装载体

[0045] 本发明涉及编码非B亚型Gag和/或Pol蛋白的包装载体。慢病毒“包装载体”在本文中定义为下述核酸序列:在与包含包装所需慢病毒顺式作用信号的载体共转染时,所述核酸序列不编码功能性HIV-1Env并且缺乏 Ψ 位点,但能够表达可纳入病毒颗粒的慢病毒Gag和/或Pol蛋白。本发明的慢病毒包装载体无法通过包装和逆转录其自身序列来自体复制。

[0046] 所述包装载体可以是RNA载体或DNA载体。所述非B亚型Gag和Pol蛋白可选自:A亚型、C亚型、D亚型、E亚型、F1亚型、F2亚型、G亚型、H亚型和J亚型蛋白,及其重组子。优选的包装载体包含SEQ ID NO:1或编码SEQ ID NO:2。

[0047] 本发明涉及编码非B亚型Gag蛋白的包装载体,以及包含这些载体的宿主细胞。所述非B亚型Gag蛋白可选自:A亚型、C亚型、D亚型、E亚型、F1亚型、F2亚型、G亚型、H亚型和J亚型蛋白,及其重组子。优选的包装载体编码SEQ ID NO:2的Gag蛋白部分。

[0048] 本发明涉及编码非B亚型MA蛋白的包装载体,以及包含这些载体的宿主细胞。所述非B亚型MA蛋白可选自:A亚型、C亚型、D亚型、E亚型、F1亚型、F2亚型、G亚型、H亚型和J亚型蛋白,及其重组子。优选的包装载体编码SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:2的MA蛋白部分。

[0049] 在不同实施方式中,所述包装载体包含SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1具有至少95%、96%、97%、98%、99%相同性的核酸序列。在不同实施方式中,所述包装载体编码SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3,或与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3具有至少95%、96%、97%、98%、99%相同性的氨基酸序列。

[0050] 如本文所用,两种核酸序列的相同性百分比可通过比较序列信息来确定,所述比较采用GAP计算机程序6.0版(由Devereux等描述(Nucl.Acids Res.12:387,1984),并且可获自威斯康星大学遗传学计算机团队(UWGCG)),采用GAP程序的默认参数,包括:(1)针对核苷酸的一元比较矩阵(包括对相同取值为1,对不同取值为0),以及Gribskov和Burgess, Nucl.Acids Res.14:6745,1986的加权比较矩阵(如Schwartz和Dayhoff编,Atlas of Protein Sequence and Structure(《蛋白序列和结构图册》),国家生物医学研究基金会(National Biomedical Research Foundation),第353-358页,1979所述);(2)对各缺口的3.0的罚分和对各缺口标志的额外0.10的罚分;以及(3)对末端缺口不罚分。

[0051] 在不同实施方式中,所述载体包含编码HIV-1MA蛋白的序列,其具有一种或多种以下特征:

[0052] 在氨基酸第12位没有谷氨酸;

[0053] 在氨基酸第15位没有精氨酸;

[0054] 在氨基酸第46位没有缬氨酸;和

[0055] 在氨基酸第61位没有亮氨酸。

[0056] 在不同实施方式中,所述载体包含编码HIV-1MA蛋白的序列,其具有一种或多种以下特征:

[0057] 第12位氨基酸是赖氨酸;

[0058] 第15位氨基酸是苏氨酸;

[0059] 第15位氨基酸是丙氨酸;

[0060] 第46位氨基酸是亮氨酸;

[0061] 第61位氨基酸是异亮氨酸;和/或

[0062] 第61位氨基酸是甲硫氨酸。

[0063] 所述包装载体优选编码HIV-1Gag和Pol。最优选地,所述包装载体编码HIV-1Gag MA蛋白。

[0064] 所述包装载体可包含用于Gag和Pol表达的病毒性序列或非病毒序列。所述包装载体可包含HIV-1LTR或HIV-1LTR的U3区域。在其它实施方式中,所述包装载体不包含HIV-1LTR。可使用任何启动子来驱动Gag和Pol的表达。优选地,所述启动子在人细胞中是强启动子。最优选地,所述包装载体包含巨细胞病毒(CMV)启动子、CMV早期增强子/鸡β肌动蛋白(CAG)启动子、劳斯氏肉瘤病毒(RSV)启动子、人磷酸甘油酸激酶(hPGK)启动子或来自LTR的U3(例如,骨髓增殖性肉瘤病毒(MPSV)U3)启动子来驱动所编码基因如gag和pol的表达。

[0065] 优选地,所述包装载体包含聚腺苷酸化信号。可以是任何聚腺苷酸化信号。优选地,所述聚腺苷酸化信号在人细胞中是强信号。最优选地,所述聚腺苷酸化信号是人α2球蛋白或牛生长激素(BGH)聚腺苷酸化信号。优选地,所述包装载体包含Rev应答元件(RRE)。在一个优选实施方式中,所述包装载体表达HIV-1Rev蛋白。在一个优选实施方式中,所述包装载体包含至少一个剪接供体位点和至少一个剪接受体位点。在一个实施方式中,所述包装载体表达HIV-1Tat蛋白。

[0066] 在一个优选实施方式中,所述包装载体缺乏编码HIV-1Vif、Vpr、Vpu、和/或Nef的序列。所述包装载体可包含编码具有一种或多种本文所述特征的HIV-1MA蛋白的序列。

[0067] 在一个实施方式中,所述包装载体仅编码1种HIV-1蛋白,Gag。在一个实施方式中,所述包装载体仅编码2种HIV-1蛋白,Gag和Pol。在一个实施方式中,所述包装载体仅编码3种HIV-1蛋白,选自Gag、Pol、Rev和Tat。在一个实施方式中,所述包装载体仅编码4种HIV-1蛋白,Gag、Pol、Rev和Tat。

[0068] 在一个实施方式中,所述载体包含(从5'至3'):CMV启动子、编码HIV-1Gag-Pol的核酸序列、编码Tat和Rev的部分的外显子、剪接供体位点、包含RRE的内含子、剪接受体位点、编码Tat和Rev的部分的外显子,以及聚腺苷酸化信号。优选地,所述HIV-1Gag-Pol是D亚型HIV-1Gag-Pol。

[0069] 所述包装载体还可包含用于在细菌或真菌细胞中复制的起点。所述包装载体可包含选择性标志物基因用以选择细菌或真菌细胞。

[0070] 本发明涉及包含本发明包装载体的宿主细胞。所述宿主细胞可用本发明的包装载体瞬时转染。所述宿主细胞可以是本发明包装载体已纳入所述宿主细胞基因组的细胞系。多种不同的细胞是合适的宿主细胞。优选地,所述细胞是人细胞,最优选地是永生化人细胞系。在一个实施方式中,所述细胞是HEK 293T细胞。在一个实施方式中,所述细胞是HeLA、HT1080或PER C6细胞(Delenda等,Cells for Gene Therapy and vector Production(用于基因治疗和载体生成的细胞),收录于Methods in Biotechnology(《生物技术方法》),第24卷:Animal Cell Biotechnology:Methods and Protocols(动物细胞生物技术:方法与方案),第二版,R.Pörtner编,新泽西州托托瓦的胡马纳出版公司(Humana Press Inc.))。

[0071] 包装系统

[0072] 本发明涉及慢病毒包装系统,所述慢病毒包装系统包含表达非B亚型Gag和/或Pol

蛋白的细胞。慢病毒“包装系统”在本文中定义为基于细胞的系统,所述系统包含在 Ψ 位点缺失下至少表达慢病毒Gag和Pol蛋白,并且能够包装并逆转录包含 Ψ 位点的外源核酸的细胞。所述慢病毒包装系统的细胞还能表达其它病毒蛋白。优选地,所述慢病毒包装系统表达包膜蛋白。所述包膜蛋白可以是慢病毒的(例如,HIV-1Env)或非慢病毒的(例如,VSV、辛德毕斯病毒、狂犬病病毒)包膜蛋白。在不同的实施方式中,所述慢病毒包装系统表达HIV-1Tat和/或Rev蛋白。

[0073] 在不同的实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞包含稳定整合进入其基因组的编码HIV-1Gag和/或Pol的序列。在不同的实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞包含稳定整合进入其基因组的编码包膜蛋白的序列。在不同的实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞包含稳定整合进入其基因组的编码HIV-1Tat和/或Rev的序列。

[0074] 在不同的实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞瞬时表达HIV-1Gag和/或Pol蛋白。在不同实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞瞬时表达包膜蛋白。在不同实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞瞬时表达HIV-1Tat和/或Rev蛋白。

[0075] 所述慢病毒包装系统的细胞可表达非B亚型Gag和Pol蛋白,选自A亚型、C亚型、D亚型、E亚型、F1亚型、F2亚型、G亚型、H亚型和J亚型蛋白及其重组子。在一个实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞包含SEQ ID NO:1或表达SEQ ID NO:2。

[0076] 在不同实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞表达非B亚型Gag蛋白。所述非B亚型Gag蛋白可选自:A亚型、C亚型、D亚型、E亚型、F1亚型、F2亚型、G亚型、H亚型和J亚型蛋白,及其重组子。

[0077] 在不同实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞表达非B亚型MA蛋白。所述非B亚型MA蛋白可选自:A亚型、C亚型、D亚型、E亚型、F1亚型、F2亚型、G亚型、H亚型和J亚型蛋白,及其重组子。优选的包装载体编码SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:2的MA蛋白部分。

[0078] 在不同实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞可包含本发明的任何慢病毒载体。

[0079] 在不同实施方式中,所述慢病毒包装系统的细胞包含SEQ ID NO:1或与SEQ ID NO:1具有至少95%、96%、97%、98%、99%相同性的核酸序列。在不同实施方式中,所述慢病毒包装载体的细胞表达具有SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3具有至少95%、96%、97%、98%、99%相同性的氨基酸序列的蛋白质。

[0080] 制备包装载体的方法

[0081] 本发明涉及用于制备编码非B亚型Gag和/或Pol蛋白的包装载体的方法。所述包装载体可具有任何本文所述特征。

[0082] 在一个实施方式中,所述方法包括:将来自非B亚型HIV-1病毒的Gag和/或Pol序列插入受非HIV启动子(例如,CMV启动子)控制的质粒,以生成包装载体。在一个实施方式中,所述包装载体仅编码1种HIV-1蛋白。在一个实施方式中,所述包装载体仅编码两种HIV-1蛋白。在一个实施方式中,所述包装载体仅编码3种HIV-1蛋白,选自Gag、Pol、Rev和Tat。在一个实施方式中,所述包装载体仅编码4种HIV-1蛋白,Gag、Pol、Rev和Tat。

[0083] 在不同实施方式中,所述质粒包含CMV启动子、编码Tat和Rev的部分的外显子、剪接供体位点、包含RRE的内含子、剪接受体位点、编码Tat和Rev的部分的外显子,和聚腺苷酸化信号中的一种或多种。

[0084] 在不同实施方式中,所述包装载体包含CMV启动子、编码Tat和Rev的部分的外显子、剪接供体位点、包含RRE的内含子、剪接受体位点、编码Tat和Rev的部分的外显子,和聚腺苷酸化信号。

[0085] 所述非B亚型HIV-1病毒可选自:A亚型、C亚型、D亚型、E亚型、F1亚型、F2亚型、G亚型、H亚型,和J亚型病毒,及其重组子。

[0086] 在一个实施方式中,所述方法包括提供包含HIV-1B亚型病毒的Gag序列的包装载体,和用来自HIV-1非B亚型病毒的序列替代所述载体中的Gag序列。

[0087] 所述非B亚型HIV-1病毒可选自:A亚型、C亚型、D亚型、E亚型、F1亚型、F2亚型、G亚型、H亚型,和J亚型病毒,及其重组子。在一个优选实施方式中,非B亚型HIV-1病毒是HIV-1NDK。

[0088] 制备慢病毒载体的方法

[0089] 本发明还涉及使用编码HIV-1非B亚型Gag和/或Pol蛋白的包装载体来生成慢病毒载体的方法。在一个实施方式中,本发明涉及向具有慢病毒载体的细胞给予编码HIV-1非B亚型Gag或Pol蛋白的包装载体。所述包装载体可具有任何本文所述特征。

[0090] 所述慢病毒载体包含用于包装和逆转录的顺式作用序列,包括 Ψ 位点和引物结合位点。优选地,所述慢病毒载体包含两个HIV-1LTR序列。在一个实施方式中,所述LTR之一被删除,用于U3和R序列。优选地,所述慢病毒载体包含中心多嘌呤序列(cPPT)和中心终止序列(CTS)。所述慢病毒载体优选编码慢病毒或非慢病毒蛋白,例如选择性标志物或肿瘤抗原。

[0091] 在一个实施方式中,所述慢病毒载体包含一种或多种HIV抗原,优选HIV-1抗原。最优选地,所述抗原是Gag、Pol、Env、Vif、Vpr、Vpu、Nef、Tat或Rev抗原。所述抗原可以是来自这些蛋白质的单一抗原、抗原混合物、抗原性多肽或抗原性多肽的混合物。在一个优选实施方式中,所述慢病毒载体包含HIV-1p24Gag抗原。

[0092] 在一个优选实施方式中,本发明涉及包含含有NIS的启动子的慢病毒载体。“含有NIS的启动子”包含NF-K κ B结合位点、干扰素刺激应答元件(ISRE)和SXY组件(SXY)。天然产生的含有NIS的启动子的示例有 β 2m启动子和MHC I类基因启动子。这些天然产生的含有NIS的启动子一般克隆或再生自以下基因的启动子区: β 2m蛋白或MHC I类蛋白的编码基因,或基因组数据库(如:NCBI多核苷酸数据库<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna>)中推定为编码此类蛋白质的基因。 β 2m和I类MHC蛋白都进入主要组织相容性复合体(MHC)。 β 2m和I类MHC启动子序列在基因组数据库中也常如此提及,即,注释为 β 2m和I类MHC的启动子序列。

[0093] MHC I类和 β 2-微球蛋白启动子包含含有NIS的启动子的共有结构同源性。这些启动子也共有在树突细胞中被强激活的能力,以及,在大多数其它人体组织中以较低强度激活的能力。

[0094] 在一个实施方式中,所述包装载体和慢病毒载体被一同引入细胞,以允许形成包含由所述包装载体产生的Gag蛋白和由所述慢病毒载体产生的核酸的慢病毒载体颗粒。优选地,这通过用所述包装载体和所述慢病毒载体共转染细胞来实现。所述细胞还可转染有编码Env蛋白(优选VSV糖蛋白G)的核酸。优选地,所述慢病毒载体颗粒能够进入合适的宿主细胞,并在所述宿主细胞内逆转录和表达。

[0095] 在一个实施方式中,所述包装载体或慢病毒载体稳定地整合入细胞,并且将非整合载体转染入所述细胞,以允许形成慢病毒载体颗粒。

[0096] 在一个实施方式中,所述方法还包括收集由所述细胞生成的慢病毒载体。

[0097] 在一个实施方式中,所述方法还包括选择包装载体,所选择的包装载体包装的慢病毒载体效价高于编码B亚型Gag或Pol蛋白的相同包装载体。优选地,所述效价相对于编码B亚型Gag或Pol蛋白的包装载体而言增加至至少1.5倍或2倍。

[0098] 慢病毒载体颗粒

[0099] 本发明还涉及包含HIV-1非B亚型Gag和/或Pol蛋白的慢病毒载体颗粒。所述非B亚型Gag和Pol蛋白可具有本文所述的任何特征。

[0100] 所述慢病毒载体颗粒包含含有用于包装和逆转录的顺式作用序列的核酸,包括与Gag、Pol和Env蛋白相关联的 Ψ 位点和引物结合位点。优选地,所述核酸包含两个HIV-1LTR序列。在一个实施方式中,所述LTR之一被删除,用于U3和R序列。优选地,所述慢病毒载体颗粒的核酸包含中心多嘌呤序列(cPPT)和中心终止序列(CTS)。所述核酸优选编码慢病毒或非慢病毒蛋白,例如选择性标志物或肿瘤抗原。优选地,所述慢病毒载体颗粒包含VSV糖蛋白。

[0101] 优选地,所述慢病毒载体包含含有NIS的启动子。在一个实施方式中,所述启动子是 β 2m启动子。

[0102] 在一个实施方式中,所述慢病毒载体包含一种或多种HIV抗原,优选HIV-1抗原。最优选地,所述抗原是Gag、Pol、Env、Vif、Vpr、Vpu、Nef、Tat或Rev抗原。

[0103] 可将本发明的慢病毒载体给予宿主细胞(包括人宿主)。

[0104] 所述慢病毒载体颗粒可包含针对特定细胞类型的靶向机制。参见,例如,Yang等, Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo (体内靶向慢病毒载体到特定细胞类型),PNAS 113(31):11479-11484(2006),其通过引用纳入本文。靶向可通过与细胞上的细胞表面蛋白结合的抗体来实现。靶细胞类型优选是树突细胞、T细胞、B细胞。优选靶向树突细胞类型,并且可通过与DC表面蛋白特异性结合的包膜蛋白来实现。参见,例如,Yang等,Engineered Lentivector Targeting of Dendritic Cells for In Vivo (工程改造的慢病毒载体对树突细胞的体内靶向),Nat Biotechnol.2008March;26(3):326-334,其通过引用纳入本文。本发明还涉及本发明的慢病毒载体,尤其是慢病毒载体颗粒形式,用于制备治疗性组合物或疫苗的应用,所述治疗性组合物或疫苗能够诱导或造成针对表位发生免疫反应或该反应的增强,所述免疫反应更特定地是针对由存在于所述载体中的转基因编码的那些表位。

[0105] 实施例

[0106] 实施例1.质粒构建

[0107] gag-pol基因采用通过PCR扩增得到,使用两个引物并以HIV-1NDK的克隆pNDK-N作为模板。为了获得pThV-GP-N质粒,所得PCR产物用EagI/SalI消化并插入同样用EagI/SalI消化的包装构建体p8.74。

[0108] 实施例2.通过转染生成慢病毒载体

[0109] 使用pFLAP CMV GFP bis和pTHV-VSV.G(INDI-CO)bis联合p8.74或pThV-GP-N。进行了36次转染,18次采用p8.74且18次采用pThV-GP-N。所有上清液贮存在-80℃。

[0110] 质粒pFLAP-CMV GFP bis编码绿色荧光蛋白 (GFP), 其表达可通过流式细胞术来检测。

[0111] 实施例3. 慢病毒载体产量的滴定检测

[0112] 载体效价通过293T细胞中GFP表达的频率来测定。细胞在24孔板内培养于含有10%FBS的DMEM中, 直至其达到 1×10^5 细胞/孔的密度。然后, 用内含不同体积载体上清液的300 μ L终体积转导细胞。2小时后, 向各孔添加700 μ L含有10%FBS的新鲜培养基。转导后72小时, 移去培养基并在Dulbecco磷酸盐缓冲盐水 (DPBS; 吉布可公司 (Gibco)) 中洗涤细胞。用0.05% Trypsin-EDTA (吉布可公司) 移出细胞。通过添加300 μ L完全DMEM来停止胰酶消化, 并将细胞转移至管以供FACS, 此后采用FACSCalibur (BD生命科学公司) 用509nm的激发波长对表达GFP的细胞计数。仅考虑30%以下的GFP阳性细胞百分比。

[0113] 结果见图3。观察到pThV-GP-N和p8.74载体产量之间有显著差异, 采用pThV-GP-N质粒获得较高效价。事实上, 采用包装质粒pThV-GP-N所得载体效价是采用常规应用的质粒p8.74所得载体效价的两倍 (据斯氏检验: $p < 0.001$)。

[0114] 实施例4. 采用pThV-GP-N的慢病毒载体效价增加

[0115] HIV-1BRU和HIV-1NDK病毒由293T细胞制备, 并且用于转导P4CCR5细胞。这些细胞包含HIV LTR控制下的稳定的荧光素酶基因: 若其被转导了TAT蛋白 (这是其被野生型HIV感染的情况), LacZ基因被表达并且能够测得荧光素酶表达。检测HIV-1Gag p24和荧光素酶表达。结果示于图4, 并且确定野生型NDK病毒的转导率高于野生型BRU病毒。

[0116] 实施例5. 采用pThV-GP-N使p24和效价增加

[0117] 采用不同比例的p8.74和pSD GP NDK包装载体来生成慢病毒载体颗粒。对于各比例, 检测效价和P24水平。结果示于图5, 并且证明存在NDK包装质粒, 其造成产出效价和P24水平的升高。

[0118] 实施例6. 采用pThV-GP-N使p24加工减少

[0119] 采用包装载体p8.74和pTHV-GP-N来生成包含慢病毒载体颗粒的上清液。使用NIH抗-P24MAB (183-H12-5C) 对所述上清液进行Western印迹实验。结果示于图6, 并且根据P24蛋白和前体的产量确定NDK和BRU包装质粒之间有差异, NDK看来产生更高的P24合成 (在病毒上清液中存在P24前体), 而BRU在病毒上清液中仅显示有P24。

序列表

<110> 赛拉福柯蒂斯公司(Theravectys)

巴斯德研究所(Institut Pasteur)

<120> 非B亚型GAG蛋白在慢病毒包装中的应用

<130> THERA.11.3

<140> PCT/US2012/

<141> 2012-09-25

<150> 11306222.8

<151> 2011-09-26

<160> 67

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 4298

<212> DNA

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 1

```

atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggaaaattag atacatggga aagaattcgg 60
ttacggccag gaggaaagaa aaaatatgca ctaaacatt tgatatgggc aagcaggag 120
ctagaacgat ttacacttaa tcctggcctt ttagagacat cagaaggctg taaacaaata 180
ataggacagc tacaaccatc tattcaaaca ggatcagaag aaattagatc attatataat 240
acagtagcaa ccctctattg tgtacatgaa aggatagagg taaaagacac caaagaagct 300
gtagaaaaga tggaggaaga acaaaacaaa agtaagaaaa agacacagca agcagcagct 360
gatagcagcc aggtcagcca aaattaccct atagtgcaga acctacaggg gcaaatggta 420
catcaggcca tatcacctag aactttgaac gcatgggtaa aagtaataga agaaaaggcc 480
ttcagcccg aagtaatacc catgttttca gcattatcag aaggagccac cccacaagat 540
ttaaacacca tgctaaacac agtgggggga catcaagcag ctatgcaaat gctaaaagag 600
accatcaatg acgaagctgc agaatgggac agattacatc cagtgcagtc agggcctgtt 660
gcaccaggcc aaatgagaga accaagggga agtgatatag caggaaactac tagtaccctt 720
caggaacaaa tagcatggat gacaagcaac ccacctatcc cagtaggaga aatctataaa 780
agatggataa tcctgggatt aaataaaaata gtaagaatgt atagccctgt cagcattttg 840
gacataagac agggacccaaa ggaacctttt agagactatg tagaccggtt ctataaaact 900
ctaagagccg agcaagcttc acaggatgta aaaaactgga tgacagaaac cttgttggtc 960
caaaatgcaa acccagattg taaaactatc ttaaaagcat tgggaccaca ggctacacta 1020
gaagaaatga tgacagcatg ccagggagtg ggggggcccc gccataaagc aagagttttg 1080
gctgaggcaa tgagccaagt aacaggttca gctactgcag taatgatgca gagaggcaat 1140
tttaagggcc caagaaaaag tattaagtgt ttcaactgtg gcaaggaagg gcacacagca 1200
aaaaattgca gggcccctag aaaaaagggc tgttggaaat gcggaaggga aggacaccaa 1260
atgaaagatt gcactgaaag acaggctaatt ttttaggga agatttggtc ttcccacaag 1320

```

```

ggaaggccgg ggaattttct tcagagcaga ccagagccaa cagccccacc agcagagagc 1380
ttcgggtttg gggaggagat aacccccctc cagaaacagg agcagaaaga caaggaactg 1440
tatectttag ctccccca atcactcttt ggcaacgacc cctcgtcaca ataaagatag 1500
ggggacagct aaaggaagct ctattagata caggagcaga tgatacagta ttagaagaaa 1560
taaatttgcc aggaaaatgg aagccaaaaa tgataggggg aattggaggt tttatcaaag 1620
taagacagta tgatcaaata ctcatagaaa tctgtggata taaagctatg ggtacagtat 1680
tagtaggacc tacacctgtc aacataattg gaagaaatgt gttgaccag attggctgca 1740
ctttaaatgt tccaattagt cctattgaaa ctgtaccagt aaaattaaag ccaggaatgg 1800
atggcccaaa agttaaacaa tggccattga cgaagaaaaa ataaaagcat taacagaaat 1860
ttgtacagaa atggaaaagg aaggaaaaat ttcaagaatt gggcctgaaa atccatataa 1920
tactccaata tttgccataa agaaaaaaga cagtaccaag tggagaaaat tagtagattt 1980
cagagaactt aataagagaa ctcaagattt ctgggaggtt caattaggaa taccgcatcc 2040
tgcagggtg aaaaagaaaa aatcagtaac agtactggat gtgggtgatg catatttctc 2100
agttccctta gatgaagatt ttaggaaata taccgcatgt accataccta gtataacaa 2160
tgagacacca gggattagat atcagtacaa tgtgtccca cagggatgga aaggatcacc 2220
ggcaatattc caaagtagca tgacaaaaat cttagagccc tttagaaaac aaaatccaga 2280
aatagttatc tatcaataca tggatgattt gtatgtagga tctgacttag aaatagggca 2340
gcatagaaca aaaatagagg aattaagaga acatctattg aggtggggat ttaccacacc 2400
agataaaaaa catcagaaag aacctccatt tctttggatg gggttatgaac tccatcctga 2460
taaattggaca gtacagccta taaacctgcc agaaaaagaa agctggactg tcaatgatat 2520
acagaagtta gtggggaaat taaactgggc aagccagatt tatgcaggaa ttaaagtaaa 2580
gcaattatgt aaactcctta ggggaaccaa agcactaaca gaagtagtac cactaacaga 2640
agaagcagaa ttagaactgg cagaaaacag ggaaattcta aaagaaccag tacatggagt 2700
gtattatgac ccatcaaaag acttaatagc agaactacag aaacaagggg acggccaatg 2760
gacataccaa atttatcaag aaccatttaa aaatctaaaa acaggaaagt atgcaagaac 2820
gaggggtgcc cacactaatg atgtaaaaca attaacagag gcagtgcaaa aaatagccac 2880
agaaagcata gtgatatggg gaaagactcc taaatttaaa ctaccatac aaaaggaaac 2940
atgggaaaca tgggtgtag agtattggca agccacctgg attcctgagt gggaatttgt 3000
caatacccct cctttagtaa aattatggta ccagttagag aaggaacca taataggagc 3060
agaaactttc tatgtagatg gggcagctaa tagagagact aaattaggaa aagcaggata 3120
tgttactgac agaggaagac agaaaagttgt ccttttact gacacgaca atcagaagac 3180
tgagttacaa gcaattaatc tagctttaca ggattcggga ttagaagtaa acatagtaac 3240
agattcaca tatgcactag gaatcattca agcacaacca gataagagt aatcagagtt 3300
agtcagtcaa ataatagagc agctaataaa aaaggaaaag gtttacctgg catgggtacc 3360
agcacacaaa ggaattggag gaaatgaaca agtagataaa ttagtcagtc agggaatcag 3420
gaaagtacta tttttggatg gaatagataa ggctcaggaa gaacatgaga aatatcaca 3480
caattggaga gcaatggcta gtgattttaa cctaccacct gtggtagcga aagaaatagt 3540
agctagctgt gataaatgtc agctaaaagg agaagccatg catggacaag tagactgtag 3600
tccaggaata tggcaattag attgtacaca tctggaagga aaagtatatcc tggtagcagt 3660

```

tcatgtagcc agtggctata tagaagcaga agttattcca gcagaaacgg ggcaagaaac 3720
 agcatacttt ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaagtagtac atacagataa 3780
 tggcagcaat ttcaccagtg ctacagttaa ggccgcctgt tggtagggcag ggatcaaaca 3840
 ggaattttgga attccctaca atccccaaag tcaaggagta gtagaatcta tgaataaaga 3900
 attaaagaaa attataggac aggtaagaga tcaagctgaa catcttaaga cagcagtaca 3960
 aatggcagta tttatccaca attttaaaag aaaagggggg attgggggat acagtgcagg 4020
 ggaaagaata atagacataa tagcaacaga catacaaact agagaattac aaaaacaaat 4080
 cataaaaaatt caaaattttc gggtttatta cagggacagc agagatccaa tttggaaagg 4140
 accagcaaag cttctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagaca atagtgcacat 4200
 aaaggtagta ccaagaagaa aagtaaagat cattagggat tatggaaaac agatggcagg 4260
 tgatgattgt gtggcaagta gacaggatga ggattaac 4298

<210> 2

<211> 1499

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 2

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

180	185	190
Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Asp Glu Ala Ala Glu		
195	200	205
Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Val Ala Pro Gly Gln		
210	215	220
Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu		
225	230	235
Gln Glu Gln Ile Ala Trp Met Thr Ser Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly		
245	250	255
Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg		
260	265	270
Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu		
275	280	285
Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu		
290	295	300
Gln Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val		
305	310	315
Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro		
325	330	335
Gln Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly		
340	345	350
Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr		
355	360	365
Gly Ser Val Thr Ala Val Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Lys Gly Pro		
370	375	380
Arg Lys Ser Ile Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Thr Ala		
385	390	395
Lys Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Arg		
405	410	415
Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Ser Glu Arg Gln Ala Asn Phe Leu		
420	425	430
Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe Leu Gln		
435	440	445
Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ser Phe Gly Phe Gly		
450	455	460
Glu Glu Ile Thr Pro Ser Gln Lys Gln Glu Gln Lys Asp Lys Glu Leu		
465	470	475
Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro Ser Ser		
485	490	495

Gln Phe Phe Arg Glu Asp Leu Ala Phe Pro Gln Gly Lys Ala Gly Glu		
500	505	510
Phe Ser Ser Glu Gln Thr Arg Ala Asn Ser Pro Thr Ser Arg Glu Leu		
515	520	525
Arg Val Trp Gly Gly Asp Asn Pro Leu Ser Glu Thr Gly Ala Glu Gly		
530	535	540
Gln Gly Thr Val Ser Phe Ser Phe Pro Gln Ile Thr Leu Trp Gln Arg		
545	550	555
Pro Leu Val Thr Ile Lys Ile Gly Gly Gln Leu Lys Glu Ala Leu Leu		
565	570	575
Asp Thr Gly Ala Asp Asp Thr Val Leu Glu Glu Met Asn Leu Pro Gly		
580	585	590
Lys Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly Gly Ile Gly Gly Phe Ile Lys Val		
595	600	605
Arg Gln Tyr Asp Gln Ile Leu Ile Glu Ile Cys Gly Tyr Lys Ala Met		
610	615	620
Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr Pro Val Asn Ile Ile Gly Arg Asn		
625	630	635
Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr Leu Asn Phe Pro Ile Ser Pro Ile		
645	650	655
Glu Thr Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val		
660	665	670
Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Thr Glu Ile		
675	680	685
Cys Thr Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser Arg Ile Gly Pro Glu		
690	695	700
Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Ile Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr		
705	710	715
Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln		
725	730	735
Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys		
740	745	750
Lys Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser		
755	760	765
Val Pro Leu Asp Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro		
770	775	780
Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu		
785	790	795
Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr		

	805	810	815
Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Glu Ile Val Ile Tyr			
	820	825	830
Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln			
	835	840	845
His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Glu His Leu Leu Arg Trp Gly			
	850	855	860
Phe Thr Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys Glu Pro Pro Phe Leu Trp			
865	870	875	880
Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Lys			
	885	890	895
Leu Pro Glu Lys Glu Ser Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu Val			
	900	905	910
Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Ala Gly Ile Lys Val Lys			
	915	920	925
Gln Leu Cys Lys Leu Leu Arg Gly Thr Lys Ala Leu Thr Glu Val Val			
	930	935	940
Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile			
945	950	955	960
Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu			
	965	970	975
Ile Ala Glu Leu Gln Lys Gln Gly Asp Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile			
	980	985	990
Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Lys Tyr Ala Arg Thr			
	995	1000	1005
Arg Gly Ala His Thr Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala Val			
	1010	1015	1020
Gln Lys Ile Ala Thr Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly Lys Thr Pro			
	1025	1030	1035
Lys Phe Lys Leu Pro Ile Gln Lys Glu Thr Trp Glu Thr Trp Trp			
	1040	1045	1050
Ile Glu Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp Glu Phe Val			
	1055	1060	1065
Asn Thr Pro Pro Leu Val Lys Leu Trp Tyr Gln Leu Glu Lys Glu			
	1070	1075	1080
Pro Ile Ile Gly Ala Glu Thr Phe Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn			
	1085	1090	1095
Arg Glu Thr Lys Leu Gly Lys Ala Gly Tyr Val Thr Asp Arg Gly			
	1100	1105	1110

Arg Gln Lys Val Val Pro Phe Thr Asp Thr Thr Asn Gln Lys Thr		
1115	1120	1125
Glu Leu Gln Ala Ile Asn Leu Ala Leu Gln Asp Ser Gly Leu Glu		
1130	1135	1140
Val Asn Ile Val Thr Asp Ser Gln Tyr Ala Leu Gly Ile Ile Gln		
1145	1150	1155
Ala Gln Pro Asp Lys Ser Glu Ser Glu Leu Val Ser Gln Ile Ile		
1160	1165	1170
Glu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Lys Val Tyr Leu Ala Trp Val Pro		
1175	1180	1185
Ala His Lys Gly Ile Gly Gly Asn Glu Gln Val Asp Lys Leu Val		
1190	1195	1200
Ser Gln Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys		
1205	1210	1215
Ala Gln Glu Glu His Glu Lys Tyr His Asn Asn Trp Arg Ala Met		
1220	1225	1230
Ala Ser Asp Phe Asn Leu Pro Pro Val Val Ala Lys Glu Ile Val		
1235	1240	1245
Ala Ser Cys Asp Lys Cys Gln Leu Lys Gly Glu Ala Met His Gly		
1250	1255	1260
Gln Val Asp Cys Ser Pro Gly Ile Trp Gln Leu Asp Cys Thr His		
1265	1270	1275
Leu Glu Gly Lys Val Ile Leu Val Ala Val His Val Ala Ser Gly		
1280	1285	1290
Tyr Ile Glu Ala Glu Val Ile Pro Ala Glu Thr Gly Gln Glu Thr		
1295	1300	1305
Ala Tyr Phe Leu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Trp Pro Val Lys Val		
1310	1315	1320
Val His Thr Asp Asn Gly Ser Asn Phe Thr Ser Ala Thr Val Lys		
1325	1330	1335
Ala Ala Cys Trp Trp Ala Gly Ile Lys Gln Glu Phe Gly Ile Pro		
1340	1345	1350
Tyr Asn Pro Gln Ser Gln Gly Val Val Glu Ser Met Asn Lys Glu		
1355	1360	1365
Leu Lys Lys Ile Ile Gly Gln Val Arg Asp Gln Ala Glu His Leu		
1370	1375	1380
Lys Thr Ala Val Gln Met Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg		
1385	1390	1395
Lys Gly Gly Ile Gly Gly Tyr Ser Ala Gly Glu Arg Ile Ile Asp		

1400	1405	1410
Ile Ile Ala Thr Asp Ile Gln Thr Arg Glu Leu Gln Lys Gln Ile		
1415	1420	1425
Ile Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp		
1430	1435	1440
Pro Ile Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly		
1445	1450	1455
Ala Val Val Ile Gln Asp Asn Ser Asp Ile Lys Val Val Pro Arg		
1460	1465	1470
Arg Lys Val Lys Ile Ile Arg Asp Tyr Gly Lys Gln Met Ala Gly		
1475	1480	1485
Asp Asp Cys Val Ala Ser Arg Gln Asp Glu Asp		
1490	1495	
<210> 3		
<211> 129		
<212> PRT		
<213> 人免疫缺陷病毒1型		
<400> 3		
Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Thr Trp		
1	5	10
Glu Arg Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Ala Leu Lys		
20	25	30
His Leu Ile Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Thr Leu Asn Pro		
35	40	45
Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Gly Gln Leu		
50	55	60
Gln Pro Ser Ile Gln Thr Gly Ser Glu Glu Ile Arg Ser Leu Tyr Asn		
65	70	75
Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Glu Arg Ile Glu Val Lys Asp		
85	90	95
Thr Lys Glu Ala Val Glu Lys Met Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys		
100	105	110
Lys Lys Thr Gln Gln Ala Ala Ala Asp Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn		
115	120	125
Tyr		
<210> 4		
<211> 129		
<212> PRT		
<213> 人免疫缺陷病毒1型		

<400> 4

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

Tyr

<210> 5

<211> 132

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 5

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

Ser Gln Asn Tyr

130

<210> 6

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 6

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp

1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys

20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro

35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu

50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu

65 70 75

<210> 7

<211> 73

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 7

Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu Lys

1 5 10 15

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys His Ile

20 25 30

Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly Leu

35 40 45

Leu Glu Thr Thr Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu Gln Pro

50 55 60

Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu

65 70

<210> 8

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 8

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Gln Leu Asp Arg Trp

1 5 10 15

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

<210> 9

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 9

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

<210> 10

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 10

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

<210> 11

<211> 73

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 11

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

<210> 12

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 12

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

<210> 13

<211> 73

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 13

Ala Arg Ala Ser Ile Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu Lys
1 5 10 15
Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys His Ile
 20 25 30
Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro Gly Leu

<400> 15

〈213〉 人免疫缺陷病毒1型

<400> 16

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

<210> 17

<211> 73

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 17

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

<210> 18

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 18

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

<400> 19

 $\langle 400 \rangle$ 20

<400> 21

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

<210> 22

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 22

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

<210> 23

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 23

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

<210> 24

<211> 72

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<220>

<221> misc_feature

<222> (18) .. (18)

<223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (51) .. (51)

<223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸

<400> 24

```

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

```

<210> 25

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 25

```

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

```

<210> 26

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 26

```

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

```

<210> 27

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 27

```

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

```

<210> 28

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 28

```

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

```

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Gly Gln Leu
50 55 60

Gln Pro Ser Ile Gln Thr Gly Ser Glu Glu Ile
65 70 75

<210> 29

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 29

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Ile Ser Gln Leu
50 55 60

Gln Pro Ser Leu Lys Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65 70 75

<210> 30

<211> 75

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 30

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Glu Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Arg Lys Thr Tyr Lys Leu Lys
20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Ala Gln Leu
50 55 60

Gln Ser Ser Ile Gln Thr Gly Ser Glu Glu Ile
65 70 75

<210> 31

<211> 73

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 31

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

<210> 32

<211> 73

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 32

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

<210> 33

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 33

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

<210> 34

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 34

```

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

```

<210> 35

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 35

```

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

```

<210> 36

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 36

```

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

```

<210> 37

<211> 59

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 37

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

<210> 38

<211> 59

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 38

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

<210> 39

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 39

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

<210> 40

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<220>

<221> misc_feature

<222> (54) .. (54)

<223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (61) .. (61)

<223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸

<400> 40

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ser Trp

1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Met Lys

20 25 30

His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Met Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro

35 40 45

Asp Leu Leu Glu Thr Xaa Glu Gly Cys Gln Gln Ile Xaa

50 55 60

<210> 41

<211> 59

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 41

Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp Glu Lys

1 5 10 15

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Ile Lys His Leu

20 25 30

Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro Gly Leu

35 40 45

Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Met

50 55

<210> 42

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 42

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp

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

<210> 43

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 43

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

<210> 44

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 44

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

<210> 45

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 45

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp

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

<210> 46

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<220>

<221> misc_feature

<222> (42) .. (42)

<223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (49) .. (49)

<223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸

<400> 46

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

<210> 47

<211> 59

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 47

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

Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Gln Gln Ile Ile
50 55

<210> 48

<211> 59

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 48

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

<210> 49

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 49

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

<210> 50

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 50

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

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Arg Gln Ile Ile
50 55 60

<210> 51

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 51

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Arg Gly Glu Lys Leu Asp Thr Trp
1 5 10 15

Glu Arg Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Met Met Lys
20 25 30

His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Ala Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Arg Gln Ile Ile
50 55 60

<210> 52

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 52

Met Gly Ala Arg Ala Ser Ile Leu Arg Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Gln Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Arg Tyr Met Leu Lys
20 25 30

His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Arg Gln Ile Ile
50 55 60

<210> 53

<211> 59

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 53

Ala Arg Ala Ser Ile Leu Arg Gly Gly Gln Leu Asp Arg Trp Glu Lys
1 5 10 15

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys His Tyr Met Leu Lys His Leu
20 25 30

Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Val Leu Asn Pro Gly Leu
35 40 45

Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Lys Gln Ile Met
50 55

<210> 54

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 54

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

<210> 55

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 55

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

<210> 56

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 56

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

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Ile
50 55 60

<210> 57

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 57

Met Gly Ala Arg Ala Ser Ile Leu Thr Gly Glu Lys Leu Asp Ala Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Met Ile Lys
20 25 30

His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Ile
50 55 60

<210> 58

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 58

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Asp Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Gln Tyr Lys Leu Lys
20 25 30

His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Lys Ile Ile
50 55 60

<210> 59

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 59

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp
1 5 10 15

Glu Arg Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Met Lys
20 25 30

His Leu Ile Trp Ala Gly Arg Glu Leu Asp Arg Phe Ala Leu Asp Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Lys Ile Ile
 50 55 60

<210> 60

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 60

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp
 1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Met Lys
 20 25 30

His Leu Ile Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asp Ser
 35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Thr Glu Gly Cys Arg Lys Ile Ile
 50 55 60

<210> 61

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 61

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp
 1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Arg Lys Lys Tyr Lys Met Lys
 20 25 30

His Leu Ile Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asp Pro
 35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Lys Ile Ile
 50 55 60

<210> 62

<211> 38

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 62

Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys His Leu Val Trp Ala Ser Arg
 1 5 10 15

Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro Gly Leu Leu Glu Thr Thr Glu
 20 25 30

Gly Cys Lys Gln Ile Ile
 35

<210> 63

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 63

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

<210> 64

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 64

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

<210> 65

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 65

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

<210> 66

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<220>

<221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> Xaa可以是任何天然产生的氨基酸

<400> 66

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

<210> 67

<211> 61

<212> PRT

<213> 人免疫缺陷病毒1型

<400> 67

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

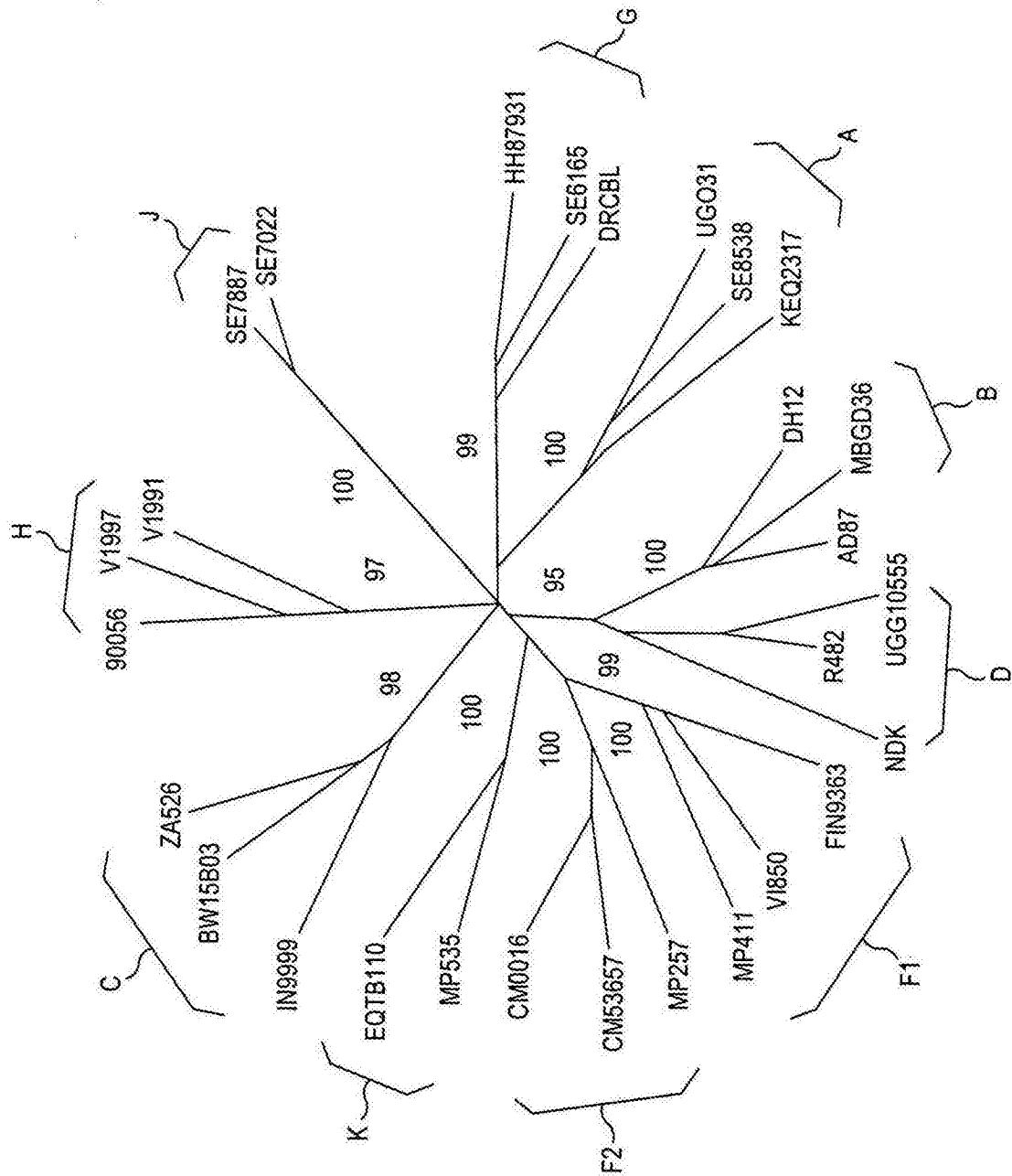


图1

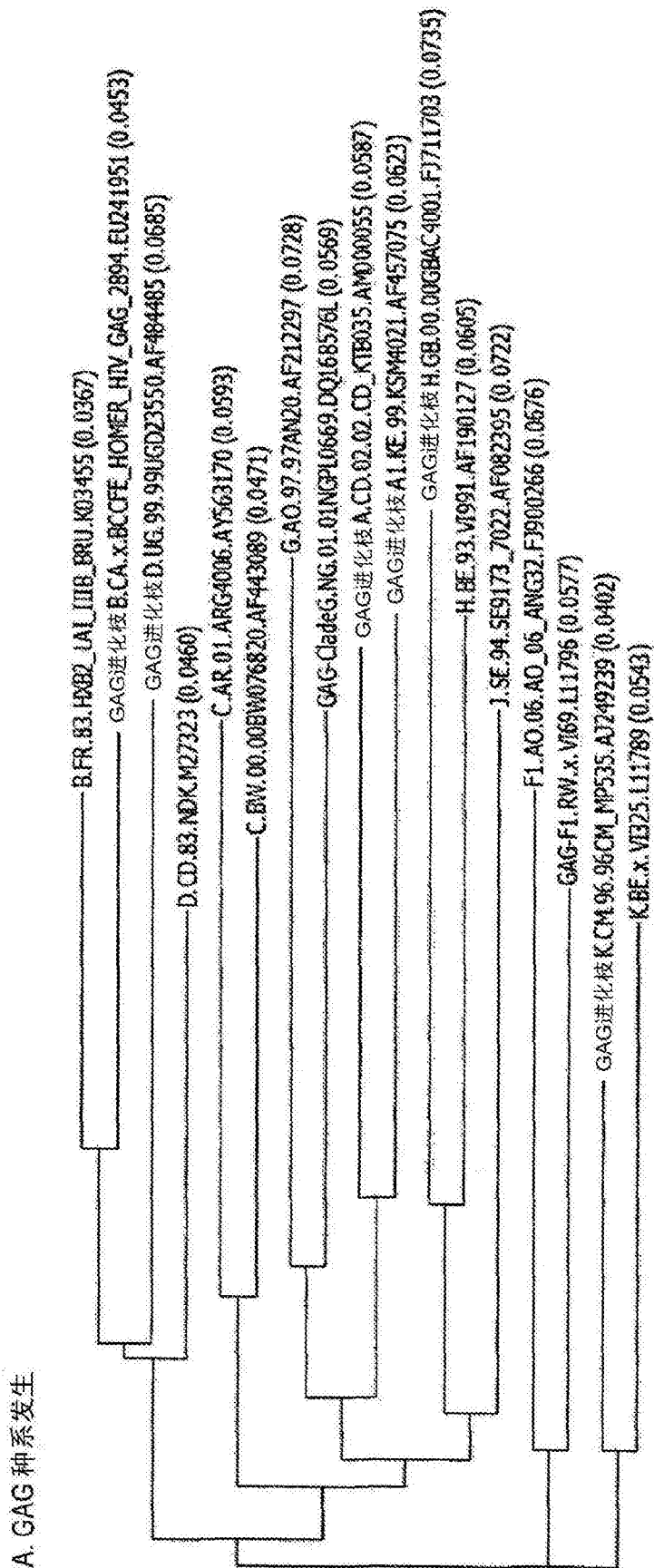


图2

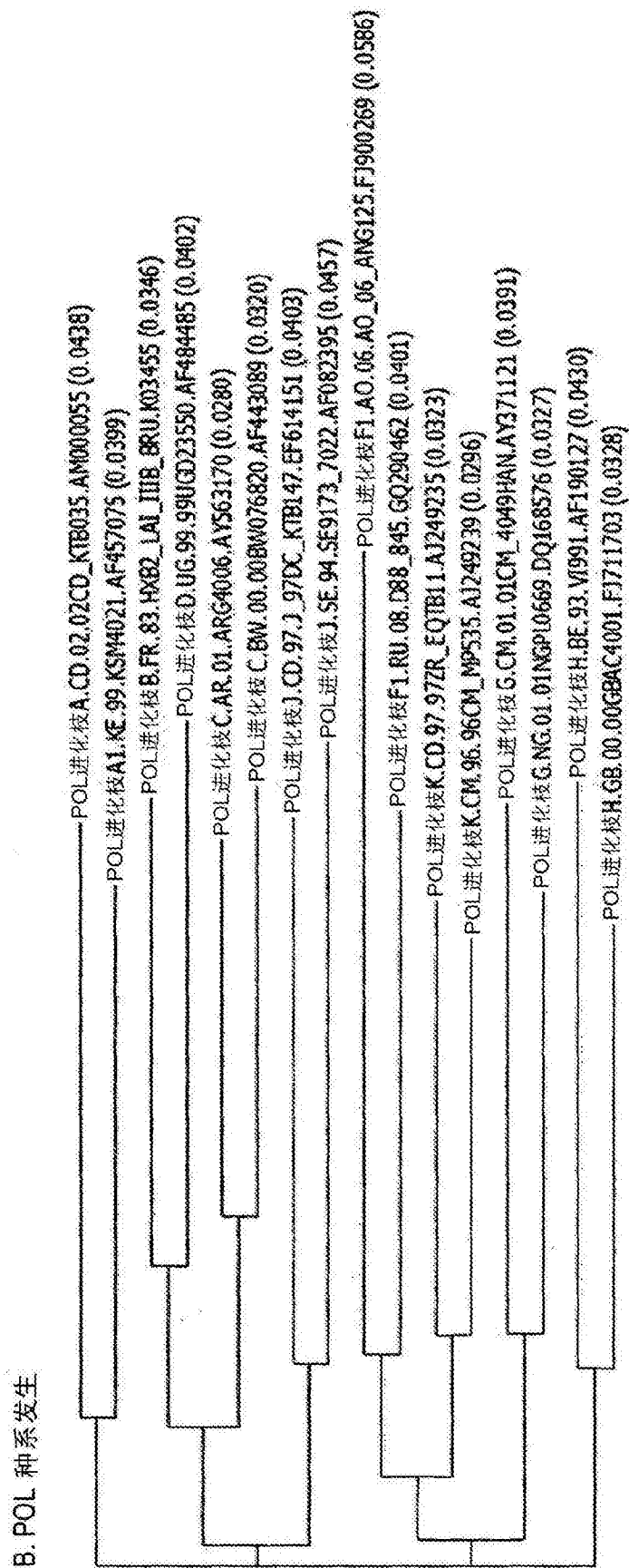


图2(续)

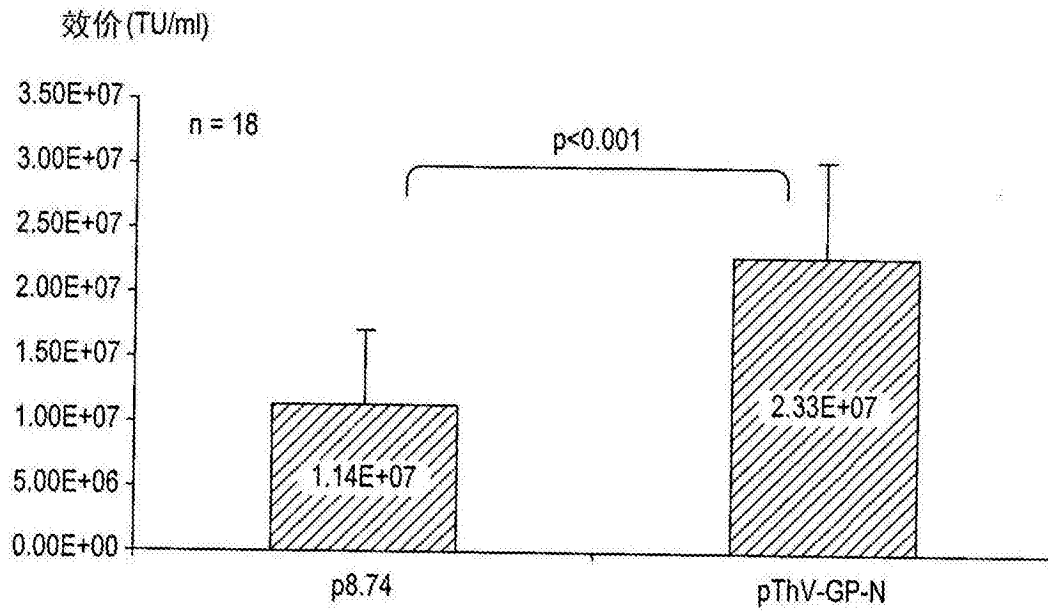


图3

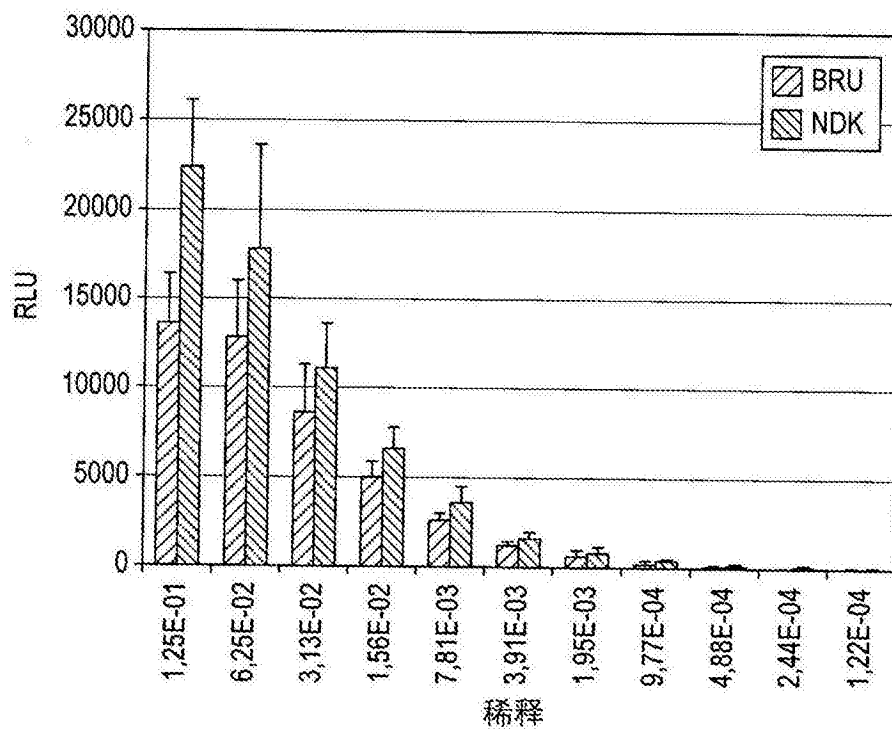


图4A

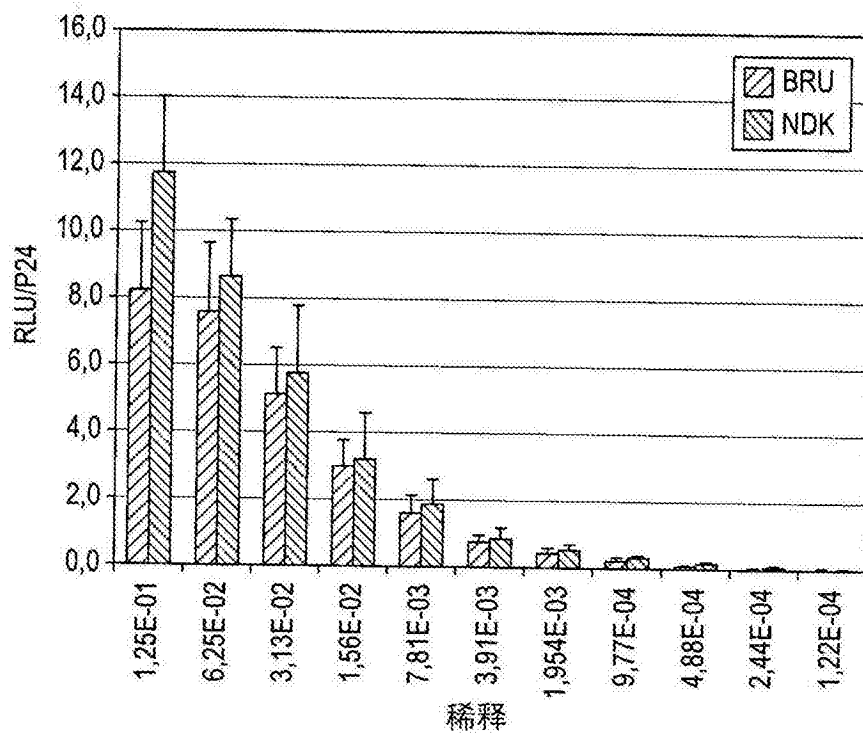


图4B

	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3	I3	J3	K3
pThV GP-N	0μl	1μl	2μl	3μl	4μl	5μl	6μl	7μl	8μl	9μl	10μl
P8,74	10μl	9μl	8μl	7μl	6μl	5μl	4μl	3μl	2μl	1μl	0μl
效价	6.39E+06	8.68E+06	1.16E+07	3.67E+07	5.00E+07	4.31E+07	4.40E+07	2.75E+07	3.32E+07	3.80E+07	3.50E+07
P24	430	400	361	521	958	800	1075	742	600	620	790

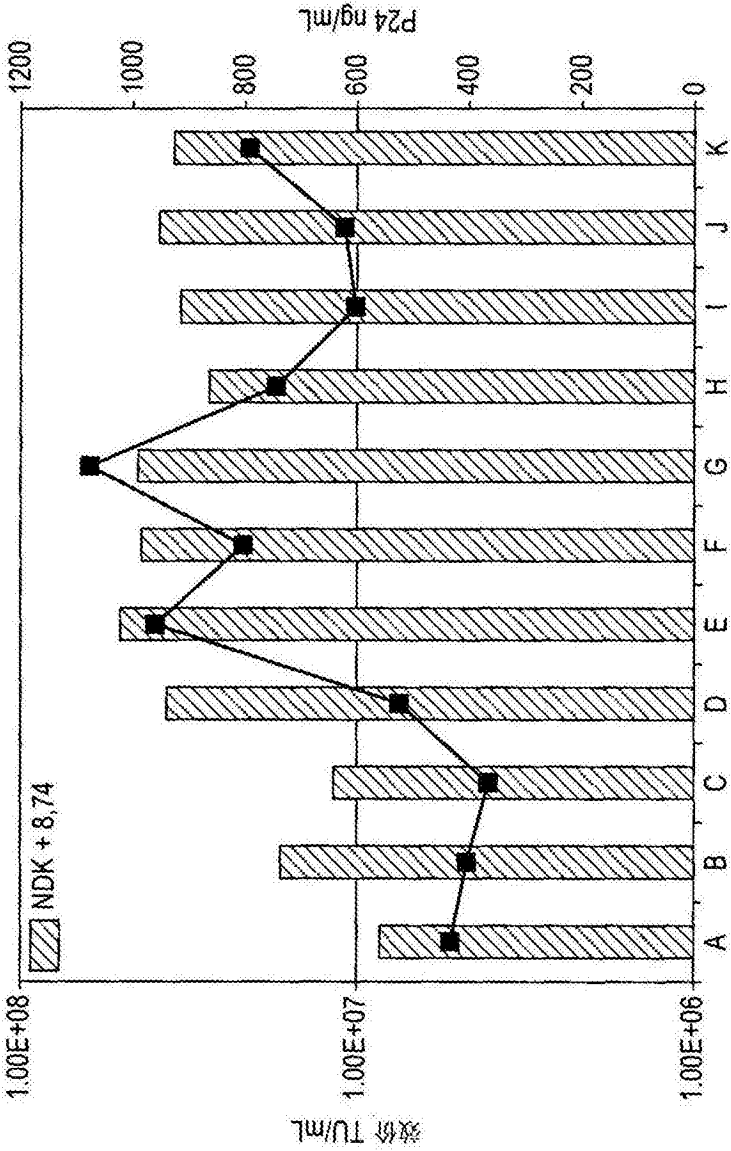


图5

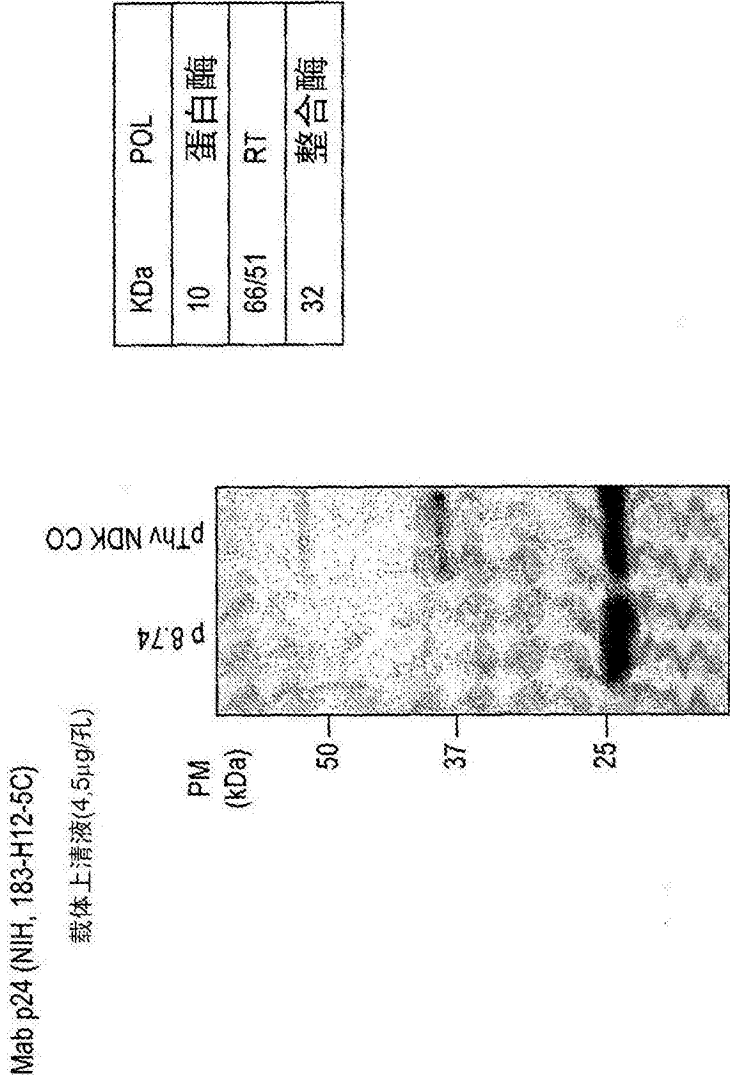


图6

P17-进化枝B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455	1	MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGL	*	*	*	*	**	50
P17-CladD.CD.83_NDK.M27323	(1)	MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKKYALKHILIWASRELERFTLNPGI						
	(1)	MGARASVLSGGKIDTWERIRLRPGGKKKKYALKHILIWASRELERFTLNPGI						
P17-进化枝B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455	51	LETSEGCROILGOLQPSLQGTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEA	*	*	*	*		100
P17-CladD.CD.83_NDK.M27323	(51)	LETSEGCROILGOLQPSLQGTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEA						
	(51)	LETSEGCROILGOLQPSLQGTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEA						
P17-进化枝B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455	101	LDKIEEEQNKSKKKKQAAADTGHSNQVSNY						132
P17-CladD.CD.83_NDK.M27323	(101)	LDKIEEEQNKSKKKKQAAADTGHSNQVSNY						
	(101)	VEKMEEEQNKSKKKKQAAADS--S-QVSNY						

图7

P17-进化枝B.FR.83.HXB2.IAI.IIIB.ERU.K03455	(1)	MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCROIILGOLQPSLOTGSSEL
P17-B.UY.01.01UTRA1092.AY781126	(1)	--ARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYRLKHIVWASRELERFAVNPGLIETTEGCRITLIGQLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.CN.05.05CNHB.dw107.DQ6833416	(1)	MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYRLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCGRIIEQLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.US.x.B4522TOB80.GQ371250	(1)	MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSGCGRILLEGQLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.ZA.03.03ZAP6045MB2.DQ396398	(1)	MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYRLKHIVWASRELERFAVNPGLIETTSAGCROILGOLHSPLOTGSSEL
P17-进化枝B.CO.01.PCM074.AY561240	(1)	-ARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCRILAOLQPSLTGSSEL
P17-进化枝B.CY.05.CY075.FJ388916	(1)	MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCRILGOLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.YE.02.02YE508.AY795905	(1)	--ARASILSSGELDREWKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCOILGOLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.US.x.X1537TOB80.GQ371695	(1)	MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCRILGOLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.US.02.L81249.FJ469741	(1)	MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKQYKLKHIVWASRELERFALNPGLIETSEGCRILLEGQLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.CY.03.CY005.EU673412	(1)	MGARASILSSGELDREWKIRLRPGGKKQYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSGGCKOILAOHLSPLOTGSSEL
P17-进化枝B.AR.04.04AR143170.DQ383750	(1)	-ARASILSSGELDREWKIRLRPGGKKRYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCKOIIRLOLPLOTGSSEL
P17-进化枝B.AU.87.MBC925.AF042101	(1)	MGARASVLSGGELDREWKIRLRPGGKKKYLDKHIVWASRELERFSNPGLIETSEGCRILROLPALQTGSADF
P17-进化枝B.US.x.AC150T9Day1034Dom.EU616649	(1)	MGARASVLSGGELDREWKIRLRPGGKKKYRLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCRILGOLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.US.x.X5597TOB80.GQ371704	(1)	MGARASVLSGGELDREWKIRLRPGGSKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCKOILGOLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.AR.05.2005.03.FJ155192	(1)	MGARASVLSGGELDREWKIRLRPGGKKKYLDKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCRILGOLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.CA.x.BCCFEHOMERH1VGAG2991.EU242048	(1)	MGARASVLSGGELDREWKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSEGCRIOILGOLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝B.AR.05.2005.11.FJ155200	(1)	MGARASVLSGGELDREWKIRLRPGGKKKYRLKHIVWASRELERFAVNPGLIETAEGCKOILAOHLSPLOTGSSEL
P17-进化枝B.AU.x.4922142.AY857059	(1)	---RASVLSSGELDREWKIRXRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETXEGCRILLEGQLPALQTGSSEL
P17-进化枝B.US.04.E58.43.EF363126	(1)	MGARASVLSGGELDREWKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLIETSGGCRHOILGOLQPSLOTGSSEL
P17-进化枝D.CD.83.NDK.M27323	(1)	MGARASVLSGGKLDTWIRLRPGRKKKYALKSHLIVWASRELERTINPGLIETSTSCCKOILGOLQPSLOTGSSEL

图 8

1 P17-进化枝B.FR.83.HXB2 LA1 IITB_HRU.K03455 (1) MGARASVLSGGKLDREKIRIRPGGKKKKYKLKHIVASRELERFAVNPGLLETSEGCROILGQLOPSIQOTGSEEL *
 P17-进化枝D.CD.83.NDK.N27323 (1) MGARASVLSGGKLDREKIRIRPGGKKKKYALKHLIIVASRELERFTLNPGLLETSEGCROILGQLOPSIQOTGSEEI *
 P17-进化枝D.FR.x.Vis20.FJ649608 (1) MGARASVLSGGKLDREKIRIRPGGKKKKYKLKHIVASRELERFALNPGLLETSEGCROILGQLOPSIQOTGSEEL
 P17-进化枝D.UG.02.TC025704.AY803405 (1) MGARASVLSGGKLDREKIRIRPGGKKKKYKLKHIVASRELERFALNPGLLETSEGCROILGQLOPSIQOTGSEEI
 P17-进化枝D.UG.99.99UGD23550.AF484485 (1) -ARASVLSGGKLDREKIRIRPGGKKKKYKLKHIVASRELERFALNPGLLETSEGCROILGQLOPSIQOTGSEEL
 P17-进化枝D.CM.01.01CM_0009BEY.AY371155 (1) --ARASVLSGGKLDREKIRIRPGGKKKKYKLKHIVASRELERFALNPGLLETSEGCROILGQLOPSIQOTGSEEL

图9

P17-进化枝 B.FR.83.HXB2 LAI I.IIB BRU.K03455	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHIVWASRELERFALPGLLETSEGCQQII
P17-进化枝 D.CD.83.NDK.M27323	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYALKHLIWASRELERFINPGLLETSEGCQQII
P17-进化枝 D.FR.x.VIS20.FJ649608	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHIVWASRELERFALNPGILLETSEGCQQII
P17-进化枝 D.UG.02.TC025704.AY803405	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGRKTYRLKHIVWASRELERFALNPGILLETSEGCQQII
P17-进化枝 D.UG.99.99UGD23550.AF484485	(1)	--ARASVLSGGKLDWEKIQLRPGCHKRYRLKHIVWASRELERFALNPGILLETSGGCRQII
P17-进化枝 D.CM.01.OICM.0009BBY.AY371155	(1)	--ARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGRKRYRLKHIVWASRELERFALNPGILLETSEGCQQII
P17-进化枝 G.CU.99.Cu87.AY586549	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRMKHLVWASRELERFALNPGILETAEGCKQLM
P17-进化枝 G.CM.04.944.5.FJ389366	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRMKHLVWASREMERFALNPDLLETXEGCQQIX
P17-进化枝 G.NG.01.0INGPL0669.DQ168576L	(1)	--ARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRIKHLVWASRELERFALNPGILETAEGCQQIM
P17-进化枝 G.BE.96.DRCBL.AF084936	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKRYRMKHLVWASRELDREFALNPGLLETAEGCQKIM
P17-进化枝 G.SE.93.SEG165.AF061642	(1)	MGARASVLTGCKLDWEKIRLRPGGKRKSYPKIKHLVWASRELERFALNPDLLETAEGCQQIM
P17-进化枝 A.CD.02.02.CD KTB035.AM000055	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELDREFALNPDLLETSEGCQQII
P17-进化枝 A.RW.x.VI415.LI11791	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGRKKYRMKHLVWASRELDREFALNPGLLETAEGCQQII
P17-进化枝 A1.AU.04.PS1044.Day177.DQ676873	(1)	MGARASILSGCKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELXRFAINPXILLESAGCCQQIM
P17-进化枝 A1.KE.00.MSA4070.AF457081	(1)	--ARASVLSGGKLDWEKIQLRPGGKKKYRLKHLVWASRELERFALNPDLLETSEGCQQII
P17-进化枝 A1.KE.99.KSM4021.AF457075	(1)	--ARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELERFALNPDLLETSEGCQQIM
P17-进化枝 C.BR.04.04BR013.AY727522	(1)	MGARASVLRGCKLDWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETAEGCQQIM
P17-进化枝 C.ZM.05.ZM1223M.FJ606168	(1)	MGARASILRGCKLDWEKIQLRPGCKKRYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETAEGCQQII
P17-进化枝 C.BR.04.04BR013.AY727522#2	(1)	MGARASVLRGEKLDWEKIRLRPGGKKKYMMKHLVWASRELERFALAPCLLETAEGCRQII
P17-进化枝 C.ZM.05.ZM1223M.FJ606168#2	(1)	MGARASILRGCKLDWEKIQLRPGGKKKYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETAEGCQQII
P17-进化枝 C.IL.99.99ET7.AY255824	(1)	--ARASILRGCKLDWEKIRLRPGGKKHYMLKHLVWASRELERFALNPGLLETAEGCQQIM
P17-进化枝 AE.HK.2004.HK001	(1)	MGARASILTGECKLDWEKIRLRPGGKKKYIMKHLVWASRELERFALNPGLLETAEGCQQII
P17-01_AE.TH.1995.95TNH022	(1)	MGARASILSGCKLDWEKIRLRPGGKKKYRMKHLVWASRELERFALNPGLLETAEGCQQLI
P17-01_AE.TH.1993.93TH062	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYQLKHVVWASRELERFALNPGLLETAEGCQQII
P17-01_AE.HK.2004.HK001	(1)	MGARASILTGECKLDWEKIRLRPGGKKKYNIKHLVWASRELERFALNPGLLETAEGCQQII
P17-进化枝 F1.AO.06.AO.06 ANG32.FJ900266	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKNQYKLKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCRRKI
P17-进化枝 F1.AR.06.2006_03.FJ155204	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYEMKHLIWAGRELDREFALOPGLLETSEGCRRKI
P17-进化枝 F1.BR.02.02BE170.FJ771007	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRMKHLIWASRELERFALDSGLLETTEGCRRKI
P17-进化枝 F1.RW.x.VI69.LI1796	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYMKHLIWASRELERFALDPGLLETSEGCRRKI
P17-进化枝 F2.CM.x.CA16.AF247520	(1)	-----GGKKYRLKHLVWASRELERFALNPGLLETTEGCQQII
P17-进化枝 H.BE.93.VI991.AF190127	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELERFALNPDLLETAEGCQQII
P17-进化枝 H.CD.91.VI557.LI1793	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELERFALNPDLLETAEGCQLOI
P17-进化枝 H.CF.90.056.AF005496	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELERFALNPGLLETPEGCLOI
P17-进化枝 H.GB.00.00GBAC4001.FJ711703	(1)	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKKYRLKHLVWASRELDREFALNPDLLETAEGCLKIX
P17-进化枝 J.SE.94.SE9173_7022.AF082395	(1)	MGARASILSGCKLDWEKIRLRPGGKKQYRIKHLVWASRELDREFALNPGLLESAGCQQII

图 10