

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680021813.2

[43] 公开日 2009年8月5日

[11] 公开号 CN 101500601A

[22] 申请日 2006.4.14

[21] 申请号 200680021813.2

[30] 优先权

[32] 2005.4.18 [33] US [31] 60/672,838

[86] 国际申请 PCT/US2006/014240 2006.4.14

[87] 国际公布 WO2006/113528 英 2006.10.26

[85] 进入国家阶段日期 2007.12.17

[71] 申请人 诺华疫苗和诊断公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 A·麦迪那-赛尔比 D·科伊特

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陶家蓉

权利要求书5页 说明书41页 序列表7页

[54] 发明名称

表达用于制备疫苗的乙型肝炎病毒表面抗原

[57] 摘要

在携带含有 HBsAg 编码序列的质粒的酿酒酵母宿主中表达 HBsAg，其中该质粒包含：(1) 来自甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的上游启动子，用于控制 HBsAg 编码序列的表达；和(2) 位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子。该质粒也可包含：(3) LEU2 选择标记物；(4) 2 μ 质粒序列；和(5) 在大肠杆菌中有功能的复制起点。可以在此宿主中表达 HBsAg，并可将其纯化以用于生产疫苗，具体是生产含有非明矾佐剂的组合疫苗和新型单价 HBV 疫苗。

1. 一种制备多价免疫原性组合物的方法，所述方法包括以下步骤：

(a)通过在携带含有 HBsAg 编码序列的质粒的酿酒酵母宿主中表达后纯化 HBsAg 制备 HBV 组分，其中所述质粒包含：(1)甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的上游启动子，用于控制 HBsAg 编码序列的表达；和(2)位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子；

(b)制备至少一种非 HBV 组分；和

(c)混合所述 HBV 和非 HBV 组分，以得到所述多价组合物。

2. 一种多价免疫原性组合物，其包含：

(a)包含在携带含有 HBsAg 编码序列的质粒的酿酒酵母宿主中表达的 HBsAg 的 HBV 组分，其中所述质粒包含：(1)甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的上游启动子，用于控制 HBsAg 编码序列的表达；和(2)所述 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子；

(b)至少一种非 HBV 组分。

3. 如权利要求 2 所述的组合物，其特征在于，所述组合物还包含一种或多种佐剂。

4. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物，其特征在于，所述非 HBV 组分包含白喉类毒素。

5. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物，其特征在于，所述非 HBV 组分包含破伤风类毒素。

6. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物，其特征在于，所述非 HBV 组分包含细胞百日咳抗原。

7. 如权利要求 1-5 中任一项所述的方法或组合物，其特征在于，所述非 HBV 组分包含非细胞百日咳抗原。

8. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物，其特征在于，所述非 HBV 组分包含甲型肝炎病毒抗原。

9. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物，其特征在于，所述非 HBV 组分包含偶联的 B 型流感嗜血杆菌荚膜糖。

10. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物，其特征在于，所述非 HBV 组分包含灭活的脊髓灰质炎病毒。

11. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述非 HBV 组分包含偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清组 C 荚膜糖。

12. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述非 HBV 组分包含偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 荚膜糖。

13. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述非 HBV 组分包含偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清组 W135 荚膜糖。

14. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述非 HBV 组分包含偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清组 Y 荚膜糖。

15. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是二价 HBV-HAV 组合物。

16. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是二价 HBV-Hib 组合物。

17. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是三价 HBV-D-T 组合物。

18. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是四价 HBV-D-T-Pa 组合物。

19. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是四价 HBV-D-T-Pw 组合物。

20. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是四价 HBV-HAV 组合物。

21. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是五价 HBV-D-T-Pa-IPV 组合物。

22. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是五价 HBV-D-T-Pw-Hib 组合物。

23. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是五价 HBV-D-T-Pa-Hib 组合物。

24. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是六价 HBV-D-T-Pa-Hib-IPV 组合物。

25. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是七价 HBV-D-T-Pw-Hib-MenA-MenC 组合物。

26. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物是

七价 HBV-D-T-Pa-Hib-IPV-MenC 组合物。

27. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物含有氢氧化铝佐剂和磷酸铝佐剂。

28. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述 HBsAg 包括聚山梨酯 20。

29. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述 HBsAg 包括磷脂酰肌醇。

30. 一种制备单价免疫原性组合物的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a)通过在携带含有 HBsAg 编码序列的质粒的酿酒酵母宿主中表达后纯化 HBsAg 制备 HBV 组分, 其中所述质粒包含: (1) 甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的上游启动子, 用于控制 HBsAg 编码序列的表达; 和(2)位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子; 和

(b)将所述 HBsAg 与佐剂混合, 得到所述免疫原性组合物, 限制条件是所述佐剂不是氢氧化铝佐剂。

31. 一种制备单价免疫原性组合物的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a)通过在携带含有 HBsAg 编码序列的质粒的酿酒酵母宿主中表达后纯化 HBsAg 制备 HBV 组分, 其中所述质粒包含: (1)甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的上游启动子, 用于控制 HBsAg 编码序列的表达; 和(2)位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子; 和

(b)将所述 HBsAg 与佐剂混合, 得到所述免疫原性组合物, 限制条件是所述佐剂不仅由铝盐组成。

32. 一种单价免疫原性组合物, 其包含:

(a)包含在携带含有 HBsAg 编码序列的质粒的酿酒酵母宿主中表达的 HBsAg 的 HBV 组分, 其中所述质粒包含: (1)甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的上游启动子, 用于控制 HBsAg 编码序列的表达; 和(2)位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子; 和

(b)不是氢氧化铝的佐剂。

33. 一种单价免疫原性组合物, 其包含:

(a)包含在携带含有 HBsAg 编码序列的质粒的酿酒酵母宿主中表达的 HBsAg 的 HBV 组分, 其中所述质粒包含: (1)甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的上游启动子, 用于控制 HBsAg 编码序列的表达; 和(2)位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子;

和

(b)不仅由铝盐组成的佐剂。

34. 如权利要求 30 或 31 所述的方法, 或权利要求 32 或 33 所述的组合物, 其特征在于, 所述佐剂包含磷酸铝佐剂和 3D-MPL 佐剂的混合物。

35. 如权利要求 34 所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述 3D-MPL 和 HBsAg 都吸附于磷酸铝。

36. 如权利要求 30-35 中任一项所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述 HBsAg 包含聚山梨酯 20。

37. 如权利要求 30-36 中任一项所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述 HBsAg 包含磷脂酰肌醇。

38. 如权利要求 30-37 中任一项所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物用于血液透析患者或血液透析前的患者。

39. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述质粒也包含: (3)LEU2 选择标记物; (4)2 μ 质粒序列; 和(5)在大肠杆菌中有功能的复制起点。

40. 如权利要求 39 所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述酿酒酵母宿主是亮氨酸营养缺陷型, 但所述质粒 LEU2 标记物能使宿主在没有亮氨酸来源的情况下生长。

41. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述上游启动子包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 1。

42. 如权利要求 41 所述的方法或组合物, 其特征在于, SEQ ID NO: 1 直接后接 HBsAg 的起始密码子。

43. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述 HBsAg 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 3。

44. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述质粒中由核苷酸序列 SEQ ID NO: 4 编码所述 HBsAg。

45. 如权利要求 44 所述的方法或组合物, 其特征在于, SEQ ID NO: 4 直接后接赭石终止密码子。

46. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述 ARG3 终止子包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 8。

47. 如权利要求 46 所述的方法或组合物, 其特征在于, SEQ ID NO: 8 恰好位于所述 HBsAg 编码序列的终止密码子的下游。

48. 如前述任一项权利要求所述的方法或组合物, 其特征在于, 所述组合物的渗透压为 200 mOsm/kg - 400 mOsm/kg。

49. 一种在患者中产生免疫应答的方法, 所述方法包括将前述任一项权利要求所述的组合物给予患者的步骤。

50. (i)在携带含有 HBsAg 编码序列的质粒的酿酒酵母宿主中表达的 HBsAg, 其中所述质粒包含: (1)甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的上游启动子, 用于控制 HBsAg 编码序列的表达; 和(2)位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子; 和(ii)一种或多种非-HBV 抗原, 在生产给予患者的药物中的应用。

51. (i)在携带含有 HBsAg 编码序列的质粒的酿酒酵母宿主中表达的 HBsAg, 其中所述质粒包含: (1)甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的上游启动子, 用于控制 HBsAg 编码序列的表达; 和(2)位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子; 和(ii) 除氢氧化铝外的佐剂, 在生产给予患者的药物中的应用。

52. 一种质粒, 其包含:

(1)编码氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 的 HBsAg 编码序列;

(2)位于 HBsAg 编码序列上游并控制其表达的甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的启动子, 其中所述启动子包含核苷酸序列 SEQ ID NO: 1; 和

(3)位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子, 其中所述终止子包含 SEQ ID NO: 8。

53. 如权利要求 52 所述的质粒, 其含有 14500-15000 个碱基对。

54. 一种携带权利要求 52 或权利要求 53 所述的质粒的酵母。

表达用于制备疫苗的乙型肝炎病毒表面抗原

将本文引用的所有文献以全文纳入本文作参考。

技术领域

本发明属于蛋白质表达领域，具体说，表达用于制备疫苗的乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)。

背景技术

乙型肝炎疫苗已经使用了许多年(参见例如参考文献 1 的第 16 章)，其活性成分是乙型肝炎病毒(HBV)的表面抗原(HBsAg)。最初的 HBV 疫苗采用从人血中纯化的 HBsAg，但在 20 世纪 90 年代开始广泛采用基于重组表达的 HBsAg 的疫苗。从那时起，HBsAg 也作为多价疫苗(即含有来自一种以上病原体的免疫原的混合物的疫苗)的组分掺入其中，以便在给予疫苗的同时用一种以上病原体免疫对象。这些多价疫苗一般包含 HBsAg 和至少'DTP'(白喉、破伤风和百日咳)抗原。

最初的单价重组 HBV 疫苗 ENGERIX B™包含氢氧化铝佐剂。近年来，已经出现基于更现代的佐剂的单价 HBV 疫苗，例如采用'AS04'佐剂[2]的 GSK 的 FENDRIX™产品，采用 RC-529 佐剂的 Berna Biotech 的 SUPERV AX™产品，或来自 Coley Pharmaceuticals 的 CpG 寡核苷酸佐剂如 CPG7909[3]。

在 HBsAg 的重组表达中，描述了各种系统。已经采用的表达宿主包括细菌、酵母(包括酿酒酵母(*Saccharomyces*)、汉逊酵母(*Hansenula*)和毕赤酵母(*Pichia*))、哺乳动物细胞培养物(包括 CHO 细胞、COS 细胞、Bu3 细胞)、昆虫细胞(采用杆状病毒载体)和植物细胞(如'可食用疫苗')。

本发明的目的是提供其它改进的 HBsAg 重组表达系统，具体用于制备组合疫苗(如含有 DTP 抗原的疫苗)或新型单价 HBV 疫苗所用的 HBsAg。

发明内容

重组 HBsAg 表达的早期报道集中于大肠杆菌(*E. coli*)[4-6]、小鼠细胞[7]、人细

胞[8]、猴细胞[9]和酵母[10-12]。然而近年来，在重组植物中表达引起了广泛关注[13-24]，在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)[25,26]和多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)[27,28]中的表达也一样。

尽管向这些现代表达系统靠近，但本发明在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)宿主中表达 HBsAg。采用基于酵母表达 HBsAg 时有各种选择，包括选择酵母种类和菌株、培养条件、用于控制表达的启动子、基因终止序列、密码子使用等。按照本发明，在携带含有 HBsAg 编码序列的质粒的酿酒酵母宿主中表达 HBsAg，其中所述质粒包含：(1)甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的上游启动子，用于控制 HBsAg 编码序列的表达；和(2)位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子。所述质粒一般也含有：(3)LEU2 选择标记物；(4)2 μ 质粒序列；和(5)在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中有功能的复制起点。

可以在此种酿酒酵母宿主中表达 HBsAg，并可将其纯化用于生产疫苗，具体是生产组合疫苗和新型单价 HBV 疫苗。这种酵母表达材料适用于这些复合疫苗，尽管参考文献 29 的报道称酿酒酵母-表达的 HBsAg 可能具有免疫抑制潜能。

多价疫苗

因此，本发明提供了一种制备多价免疫原性组合物的方法，所述方法包括以下步骤：(a)在本发明的酿酒酵母宿主中表达后纯化 HBsAg，从而制备 HBV 组件；(b)制备至少一种非 HBV 组件；和(c)混合所述 HBV 和非 HBV 组件，得到所述多价组合物。

本发明也提供了一种多价免疫原性组合物，其包含：(a)含有本发明酿酒酵母宿主表达的 HBsAg 的 HBV 组件；和(b)至少一种非 HBV 组件。该组合物一般也包含一种或多种佐剂。

这些多价组合物具体可用于同时保护儿童免受 HBV 和非-HBV 病原体的感染。典型的患者是一岁以内的患者，在出生后 6-9 周接受第一个剂量的组合物。一般还以约 6-8 周的间隔给予两个或三个剂量。也可采用该组合物完成不同疫苗的初免方案。该组合物也可用作加强剂，如给予 1-16 岁的儿童。

单价疫苗

本发明也提供了一种制备单价免疫原性组合物的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 在本发明酿酒酵母宿主中表达后纯化 HBsAg，从而制备 HBV 组分；(b)将所述

HBsAg 与佐剂混合, 得到所述免疫原性组合物。该佐剂优选不是氢氧化铝佐剂, 更优选不仅为铝盐佐剂。

本发明也提供了一种单价免疫原性组合物, 其包含: (a)含有在本发明酿酒酵母宿主中表达的 HBsAg 的 HBV 组分; 和(b)佐剂。

这些单价组合物具体可用于保护使用现有含佐剂疫苗(如 ENGERIX B™产品)无效的患者免受乙型肝炎病毒感染和/或治疗其乙型肝炎病毒感染。特别适合采用该组合物的患者亚群包括: 免疫缺陷患者; 血液透析患者; 血液透析前的患者; 肾功能不全的患者; 肾衰竭患者; 需要血液透析之前的早期肾衰竭患者; 等待肝脏移植(如等候名单)的患者; 末期肾衰竭患者; 第一次给予本发明疫苗前 6 个月内接受过器官移植(特别是肝脏移植)的患者; 正在接受(或在第一次给予本发明疫苗前 6 个月内接受过)乙型肝炎免疫球蛋白(HBIg)治疗的患者; 具有 HLA DQ2 单体型的患者[30]; 具有 HLA DR3 单体型的患者[30]; 具有 HLA DR7 单体型的患者[30]; 具有 HLA 等位基因 DQB 1*0202 的患者[31]; 感染了 HIV 的患者; 慢性 HBV 携带者; 近期接受过输血的患者; 正在接受免疫抑制药物的患者; AIDS 患者; 有腹水的患者; 肝硬化患者; 脑病患者; 接受干扰素治疗, 尤其是 ifn- α 治疗的患者; 吸烟患者; 吸雪茄烟的患者; 体重指数 $>30 \text{ kg/m}^2$ 的患者; 和接受过 HBsAg 疫苗但没有发生血清转化的患者(例如标准初免方案如 3 个剂量的 ENGERIX B™后其血清抗-HBsAg 效价 $<10 \text{ mlU/ml}$)。

这些患者的肌酐清除率可小于 30ml/分钟(正常健康范围为: 男性~100-140 ml/分钟, 女性 90-130 ml/分钟)。患者优选至少 15 岁, 如 15-40 岁、15-60 岁、40-60 岁, 或者 60 以上。55 岁以上的患者, 无论患有任何疾病, 均可进行治疗。

乙型肝炎表面抗原

HBV 病毒颗粒由围绕着内核的外被蛋白或衣壳组成。衣壳的主要组分是称为 'HBsAg' 的蛋白质。目前, 所有乙型肝炎疫苗都含有 HBsAg, 当这种抗原给予正常的疫苗接受者时, 它能刺激产生抗-HBsAg 抗体, 保护其免受 HBV 感染。

在疫苗生产中, 可以用两种方式制备 HBsAg。第一种方法包括从慢性乙型肝炎携带者的血浆中纯化颗粒形式的抗原, 因为在 HBV 感染过程中大量 HBsAg 在肝脏中合成, 并释放到血流中。第二种方式包括用重组 DNA 方法表达该蛋白。用于本发明的 HBsAg 是用酿酒酵母重组表达的。

不像天然 HBsAg(即血浆纯化产物中的 HBsAg), 本发明所用的 HBsAg 是非糖基

化的。优选此种形式的 HBsAg，因为它的免疫原性高，并且其制备没有血液产品污染的风险。

酵母表达的 HBsAg 优选为基本呈球形的颗粒(平均直径约为 20nm)的形式，包括含有磷脂的脂质基质。不像血浆衍生的 HBsAg 颗粒，酵母表达的颗粒可能包含磷脂酰肌醇。而且，脂质基质可包含非离子表面活性剂，如聚山梨酯 20，在纯化该来自酵母表达宿主的抗原的过程中可将其掺入该基质。在 HBsAg 纯化开始时破坏重组酵母细胞期间采用聚山梨酯 20 是可将其引入 HBsAg 颗粒的一种方式。聚山梨酯 20 的重量比一般为每 100 μg HBsAg 至少 5 μg 。

所有已知的 HBV 亚型都含有共同的决定簇'a'。与其它决定簇和亚决定簇联合，鉴定到九种亚型：ayw1、ayw2、ayw3、ayw4、ayr、adw2、adw4、adrq-和 adrq+。除了这些亚型，已经出现其它变体，如在免疫个体中检测到的 HBV 突变体("逃逸突变体")。虽然一些研究发现，大部分非应答者(如血液透析患者)的血清被 adw4 或 ayw3 亚型感染(参见例如参考文献 32，其中 75%血清是 adw4，在血液透析患者中提高到 88%；以及参考文献 33，其中 58%来自血液透析患者的亚型样品是 ayw3)，但用于本发明的最优的 HBV 亚型是 adw2。此种亚型发现于一例血液透析患者(参考文献 32)，以及 1994 年加利福尼亚和内布拉斯加州[34]以及随后在巴西[35,36]暴发的血液透析患者 HBV 感染中的少数病例，但它在超过 98%的血液透析患者中免疫原性高并且有效。

优选的 HBsAg 含有以下 226-个氨基酸的序列(SEQ ID NO: 3):

```
MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPOSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNNHSPTSCPPICPGYR
WMCLRRFIIIFLPIILLCLIFLLVLLDYQGMLEPVCPLIPGSTTTNTIGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGN
CTCIPIPSSWAFAYLWVWASVRFVSWLSLLVFPVQWVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFIPLLPIF
FCLWVYI
```

本发明可采用 SEQ ID NO: 3，或与 SEQ ID NO: 3 的差异在于至多 10(即 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10)个单氨基酸取代的序列。

HBsAg-编码序列可以是以下 678-个核苷酸的序列(SEQ DD NO: 4):

```
atggagaacatcacatcaggattcctagggaccctgctcgtgttacaggcgggggttttcttggttgacaagaa
tcctcacaataccgcagagctctagactcgtgggtggacttctctcaattttctagggggatcaccctgtgtgtct
tggccaaaattcgcagtcaccaaacctccaatcactcaccacactcctgtcctccaatttgtcctgggtatcgc
tggatgtgtctgcggcggttttatcatattcctcttcactcctgctgctatgcctcatcttcttattgggtcttc
tggattatcaaggatgtgtgcccgtttgtcctctaattccaggatcaacaacaaccaatacgggaccatgcaa
aacctgcacgactcctgctcaaggcaactctatgtttccctcatgttgctgtacaaaacctacggatggaaat
tgcacctgtattcccatcccatcgtcctgggctttcgcaaaaatacctatgggagtgggcctcagtcctgtttct
cttggctcagtttactagtgccatttgttcagtggttcgtagggctttccccactgtttggctttcagctat
atggatgatgtggtatbggggccaagtctgtacagcatcgtgagtcctttataccgctgttaccattttc
tttctctctgggtatacatt
```

HBsAg-编码序列的最后一个密码子优选后接 TAA 终止密码子(赭石密码子)。

除'S'序列以外，表面抗原可包含所有或部分前-S 序列，如所有或部分前-S1 和/或前-S2 序列。然而，优选仅采用 S 序列，如上所示。

GAPDH 启动子

根据本发明，在携带含有甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因，尤其是酵母 GAPDH 的上游启动子的质粒的酿酒酵母宿主中表达 HBsAg[37-40]。将该启动子连接于 HBsAg-编码序列，以调节其转录。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶是糖酵解酶，发现其启动子特别适合控制 HBsAg 在酿酒酵母中的表达[41]。参考文献 41 中公开的 GAPDH 启动子含有以下 1061-个核苷酸的序列(SEQ ID NO: 5):

```
aagcttaccagttctcacacggaacaccactaatggacacaaaattcgaaatactttgaccctatthttcgagga
ccttgtcaccttgagcccaagagagccaagatthtaattttcctatgacttgatgcaaatthcccaaagcta
aacatgcaagacacgtacgggtcaagaagacatatttgacctcttaactgggttcagacgcgactgcctcatcag
taagaccogttgaaaagaacttacctgaaaaaacgaatatatactagcgttgatgttagcgtcaacaacaa
gaagtttaatgacgcggaggccaaggcaaaaagattccttgattacgtaagggagttagaatcattthtgaata
aaaaacacgctthttcagttcgagtttatcattatcaatactgccattthcaagaatacgtaaataatthtaata
gtagtgtattthcctaactthatttagtcaaaaattagcctthtaattctgctgtaaccogtcatgcccacaaa
tagggggcggttacacagaatatataacatcgtaggtgtctgggtgaacagtttatccctggcatccactaa
atataatggagctcgctthtaagctggcatccagaaaaaaaagaatcccagcaccacaaaatattgtthttctc
accaaccatcagttcataggtccattctcttagcgcgaactacagagaacagggggcacaaaacaggcaaaaaacg
ggcacaacctcaatggagtgatgcaacctgcctggagtaaatgatgacacaaggcaattgaccacgcgatgta
tctatctcattthttacaccttctattaccttctgctctctctgatttgaaaaagctgaaaaaaaagggtg
aaaccagttccctgaaattatthccctacttgactaataagtatataaagacggtaggtattgattgtaattc
tgtaaatctattthttaaacttcttaaatctactthttatagtttagtctthtttttagtthttaaacaccaag
aacttagtttcgaataaacacacataaacacaaacaagctt
```

可按照本发明使用此启动子，但优选采用含有以下 1060-个核苷酸的序列(SEQ ID NO: 1)的启动子:

```
aagcttaccagttctcacacggaacaccactaatggacacacattcgaaatactttgaccctatthttcgagga
ccttgtcaccttgagcccaagagagccaagatthtaattttcctatgacttgatgcaaatthcccaaagcta
aacatgcaagacacgtacgggtcaagaagacatatttgacctcttaacaggttcagacgcgactgcctcatcag
taagaccogttgaaaagaacttacctgaaaaaacgaatatatactagcgttgatgttagcgtcaacaacaa
gaagtttactgacgcggaggccaaggcaaaaagattccttgattacgtaagggagttagaatcattthtgaata
aaaaacacgctthttcagttcgagtttatcattatcaatactgccattthcaagaatacgtaaataatthtaata
gtagtgtattthcctaactthatttagtcaaaaattagcctthtaattctgctgtaaccogtcatgcccacaaa
atagggggcggttacacagaatatataacatcgtaggtgtctgggtgaacagtttatccctggcatccacta
aatataatggagcccctthtttaagctggcatccagaaaaaaaagaatcccagcaccacaaaatattgtthttct
tcaccaaccatcagttcataggtccattctcttagcgcgaactacagagaacagggggcacaaaacaggcaaaaa
cgggcacaacctcaatggagtgatgcaacctgcctggagtaaatgatgacacaaggcaattgaccacgcgatg
tatctatctcattthttacaccttctattaccttctgctctctctgatttgaaaaagctgaaaaaaaagggt
tgaaaccagttccctgaaattatthccctacttgactaataagtatataaagacggtaggtattgattgtaatt
ctgtgaaatctattthttaaacttcttaaatctactthttatagtttagtctthtttttagtthttaaacacca
agaacttagtttcgaataaacacacataaacacaaacaaa
```

此序列与 SEQ ID NO: 5 的差异如下: (1)核苷酸 42 上的 A/C 取代; (2)核苷酸 194 上的 T/A 取代; (3)核苷酸 301 上的 C/A 突变; (4)核苷酸 471 上插入 A; (5)残基 569 上的 C/T 取代; (6)残基 597 上的 T/C 取代; (7)核苷酸 604 上插入 T(用五个 T 代替四个 T); 和(8)用一个 A 取代 3'GCTT 序列。

本发明可采用 SEQ ID NO: 1 启动子序列, 或与 SEQ ID NO: 1 的差异在于至多 20(即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20)个点突变的序列, 各点突变是缺失、取代或插入一个核苷酸。

1060 个核苷酸的序列优选恰好位于编码 HBsAg 的 N 末端的 ATG 起始密码子上游(SEQ ID NO: 2), 如:

```
aagcttaccagttctcacacggaacaccactaatggacacacattcgaataactttgaccctatthttcgagga
ccttgtcaccttgagcccaagagagccaagatttaaatthttcctatgacttgatgcaaattcccaaagcta
aacatgcaagacacgtacggccaagaagacatatthtgacctttaaaggttcagacgcgactgcctcatcag
taagaccggttgaaaagaacttacctgaaaaaacgaatatatactagcgttgaatggttagcgtcaacaaca
gaagtttactgacgcggaggccaaggcaaaaagattccttgattacgtaagggagttagaatcattthtgaata
aaaaacacgctthttcagttcagtttatcattatcaatactgccatttcaagaatacgtaaataattaata
gtagtgtatthttcctaactthtttagtcaaaaaattagcctthttaaattctgctgtaacccgtacatgccaaa
atagggggcgggttacacagaatatataacatcgttaggtgtctgggtgaacagtttattcctggcatccacta
aatataatggagcccgctthtttaagctggcatccagaaaaaaaagaatcccagcaccaaaatattgtttct
tcaccaaccatcagttcataggtccattctcttagcgcactacagagaacaggggcacaaacaggcaaaaaa
cgggcacaacctcaatggagtgtgcaacctgcctggagtaaatgatgacacaaggcaattgaccacgcgatg
tatctatctcattthtttacaccttctattaccttctgctctctctgatttggaaaaagctgaaaaaaaagg
tgaaaccagttccctgaaattatccctacttgactaataagtatataaagacggtaggtattgattgtaaat
ctgttaaattctattthtttaacttcttaaatctactthttatagtttagtctthtttttagtthtttaaacac
agaacttagtttcgaataaacacacataaacacaaaATG...
```

ARG3 终止子

根据本发明, 在携带含有 ARG3 的下游转录终止子的质粒的酿酒酵母宿主中表达 HBsAg。将该终止子连接于 HBsAg 编码序列, 以调节其转录。

酵母的 ARG3 基因编码鸟氨酸氨甲酰基转移酶[42], 其转录终止序列已被用于数种酵母重组表达系统[43-45]。可用它控制 HBsAg 在酵母中的表达, 尤其是与 GAPDH 启动子联用时。

恰好位于 ARG3 终止密码子下游的序列(如 GenBank 条目 GI:171076 所示)是以下 450-个核苷酸的序列(SEQ ID NO: 6):

```
tccttctttcgtgttcttaataactaatatataaatacagatatagatgcatgaataatgatatacattgatt
atthttgcaatgtcaattaaaaaaaaaaatgtagtaaaactatgttacattccaagcaataaagcacttgg
ttaaacgaaattaacgtthtttaagacagccagaccggtctaaaaatttaaatatacactgccacaaattc
cttcgagttgtccaatttccacctthttatattthttcatcaacttcagcagattcaaccttctcatagaaca
ttggaataaacagccttaacaccactthtcaagtttgacagcgtaatatgaggaattttgttttgacaacaca
accctthtaattthttctcattgtthttcatcaattatgcatccatctttatctthtagacagttccactacaatagc
aatagttthtttc
```

如果向编码序列中延伸 250 个核苷酸, ARG3 基因包含以下 700 个核苷酸的序列(SEQ ID NO: 7):

agaatttgcgaaacaggccaagctgaaacaattcaaagggttttcaaatacaatcaagaacttgtctctgtggct
gatccaaactacaaatttatgcatgtctgccaagacatcaagaagaagttagtgatgatgtcttttatggag
agcattccatagtccttgaagaagcagaaaacagattatatgcagctatgtctgccattgatatccttggtaa
taataaaggtaatttcaaggacttgaaaTAAccttcttctggtgtcttaataactaatatataaatacagat
atagatgcatgaataatgatatacattgattatttgcaatgtcaattaaaaaaaaaaaaatgtagtaaaact
atgttacattccaagcaataaagcacttgggttaaacgaaattaacggtttttaagacagccagaccgaggctc
aaaaatttaataatacactgccaacaaattccttcgagttgtccaatttcaccacttttatattttcatcaac
ttcagcagattcaaccttctcacatagaacattggaataaacagccttaacaccactttcaagtttgacagc
gtaatatgaggaattttgttttgacaacacaacccttaattttctcattgttttcatcaattatgcatccat
ctttatcttttagacagttccactacaatagcaatagtttttttc

SEQ ID NO: 7 的转录终止发生在有下划线的 *Sac*II 位点区域。

用于本发明的优选终止子包含此 ARG3 区域的编码序列和下游序列的部分，具体包含以下 689-个核苷酸的序列(SEQ ID NO: 8)，它的 3'末端与 SEQ ID NO: 7 相同：

cgaattccaagctgaaacaattcaaagggttttcaaatacaatcaagaacttgtctctgtggctgatccaaacta
caaatttatgcatgtctgccaagacatcaagaagaagttagtgatgatgtcttttatggagagcattccata
gtcttgaagaagcagaaaacagattatatgcagctatgtctgccattgatatccttggtaataataaaggta
atttcaaggacttgaaataatccttcttctggtgtcttaataactaatatataaatacagatatagatgcatg
aataatgatatacattgattatttgcaatgtcaattaaaaaaaaaaaaatgtagtaaaactatgttacattc
caagcaataaagcacttgggttaaacgaaattaacggtttttaagacagccagaccgaggctcaaaaaatttaa
tatacactgccaacaaattccttcgagttgtccaatttcaccacttttatattttcatcaacttcagcagatt
caaccttctcacatagaacattggaataaacagccttaacaccactttcaagtttgacagcagtaatatgagg
aattttgttttgacaacacaacccttaattttctcattgttttcatcaattatgcatccatctttatcttta
gacagttccactacaatagcaatagtttttttc

此序列的 5'末端包含有用的 *Eco*RI 位点(下划线)，该位点有利于将终止子插入所需位置。

也可存在 ARG3 的其它下游终止子序列。可包含 ARG3 的至多 1500 个核苷酸(即至多再包含 SEQ ID NO: 7 下游的 800 个核苷酸)，如至多 1200 个核苷酸，或约 1150 个核苷酸。

本发明可采用 SEQ ID NO: 8 终止子序列，或者与 SEQ ID NO: 8 的差异为多达 30(即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40)个点突变的序列，各点突变为缺失、取代或插入一个核苷酸。

689-个核苷酸的序列优选恰好位于 HBsAg 的 C 末端的终止密码子区下游(SEQ ID NO: 9)，如：

...TAAcgaattccaagctgaaacaattcaaagggttttcaaatacaatcaagaacttgtctctgtggctgatcc
aaactacaaatttatgcatgtctgccaagacatcaagaagaagttagtgatgatgtcttttatggagagcatt
tccatagtccttgaagaagcagaaaacagattatatgcagctatgtctgccattgatatccttggtaataata
aaggtaatttcaaggacttgaaataatccttcttctggtgtcttaataactaatatataaatacagatataga
tgcattgaataatgatatacattgattattttgcattgtcaattaaaaaaaaaaaaatgtagtaaaactatgtt
acattccaagcaataaagcacttgggttaaacgaaattaacggtttttaagacagccagaccgaggctcaaaaa
tttaaatatacactgccaacaaattccttcgagttgtccaatttcaccacttttatattttcatcaacttcag
cagattcaaccttctcacatagaacattggaataaacagccttaacaccactttcaagtttgacagcagtaata
atgaggaattttgttttgacaacacaacccttaattttctcattgttttcatcaattatgcatccatctttta
tcttttagacagttccactacaatagcaatagtttttttc

质粒

编码 HBsAg 的基因、GAPDH 启动子和 ARG3 终止子都作为同一质粒的一部分操作性连接在一起。本发明质粒一般也包含 1、2 或(优选)所有 3 个以下元件：LEU2 选择标记物；2 μ 质粒序列；和在大肠杆菌中有功能的复制起点。以前在用于 HBsAg 表达的质粒中描述过这三个元件[45]。

LEU2 选择标记物常常用于酵母遗传学。LEU2 编码 3-异丙基苹果酸脱氢酶，它是亮氨酸生物合成途径中的第三种酶。质粒上的 LEU2 标记物产生由代谢前体合成亮氨酸的能力，并用于作为亮氨酸营养缺陷型如 LEU2 无效突变体的宿主细胞。因此，LEU2 标记物允许通常在不供给亮氨酸时无法正常生长的亮氨酸营养缺陷型在没有亮氨酸的条件下生长。

2 μ 质粒序列也是酵母基因组中常见的[46]，被用来提高质粒的拷贝数。任何合适的 2 μ 质粒序列均可用于本发明质粒中。所述质粒包括酵母复制起点，一般由 2 μ 序列提供。

包含在大肠杆菌中有功能的复制起点的质粒可用作酵母和大肠杆菌之间的穿梭载体，从而能够利用大肠杆菌系统操作质粒。

因此，本发明提供了含有以下元件的质粒：(1)HBsAg 编码序列；(2)位于 HBsAg 编码序列上游并控制其表达的甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的启动子；和(3)位于 HBsAg 编码序列下游的 ARG3 转录终止子。该质粒也可包含以下元件：(4)LEU2 选择标记物；(5)2 μ 质粒序列；和(6)在大肠杆菌中有功能的复制起点。HBsAg 编码序列优选编码氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 或与 SEQ ID NO: 3 的差别为至多 10(即 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10)个单氨基酸取代的序列的 HBsAg。GAPDH 启动子序列优选包含 SEQ ID NO: 1 或与 SEQ ID NO: 1 的差异在于至多 20(即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20)个点突变的序列。ARG3 终止子优选包含 SEQ ID NO: 8 或与 SEQ ID NO: 8 的差异在于至多 20(即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20)个点突变的序列。可以用酿酒酵母宿主维持该质粒，该质粒可用于表达 HBsAg。

优选 14500-15000 bp，如 14600-14700 bp 的质粒。

酿酒酵母宿主

酿酒酵母是广泛用于重组表达的酵母宿主。本发明可采用任何合适的酿酒酵母

宿主。然而，优选采用亮氨酸营养缺陷型宿主，以致于 LEU2 选择标记物可用于该质粒。宿主细胞可以是 leu2-3 leu2-112 突变体。

优选酵母宿主的其它特征是 his3 和/或 can1-11。最优选的酵母宿主是 leu2-3 leu2-112 his3 can1-11，如 DC5 菌株。

本发明提供了携带本发明质粒的酵母。本发明也提供了这种酵母在制备本发明组合物中的应用。

HBsAg 表达和纯化

培养酵母以表达重组蛋白的技术是本领域熟知的。可以用合成培养基，如含有纯化氨基酸(在采用 LEU2 标记物时一般省去亮氨酸)、维生素、盐等的培养基培养酵母。然后，可通过包括(例如)沉淀、离子交换色谱和超滤等步骤的方法纯化 HBsAg。纯化过程中可采用的其它步骤包括凝胶渗透层析和氯化铯超速离心。

整个纯化过程中特别优选包含的步骤是用非离子去污剂，如 Triton-X100 或聚氧乙烯山梨聚糖醇的脂肪酸酯，如聚氧乙烯山梨聚糖醇单油酸酯(也称为聚山梨酯 80)或更优选的聚氧乙烯山梨聚糖醇单月桂酸酯(也称为聚山梨酯 20)破坏细胞的步骤。接着，可离心破坏的细胞得到发现有 HBsAg 的上清液。然后用参考文献 47 所述的方法纯化上清液中的该蛋白。

纯化后，可对 HBsAg 进行透析(如用半胱氨酸)，透析可用于去除任何含汞的防腐剂如在 HBsAg 制备期间有可能采用的硫柳汞[48]。

按照本发明表达和纯化的 HBsAg 可与其它非 HBV 抗原混合，以得到多价疫苗，或者可与新型佐剂混合，以制备改进的单价疫苗。

单价免疫原性组合物

按照本发明表达和纯化的 HBsAg 可与新型佐剂混合，以制备改进的单价疫苗。用于单价 HBV 疫苗的三种特别感兴趣的佐剂是：CpG 寡核苷酸；氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸衍生物；3d-MPL 与铝盐的混合物。

CpG 寡核苷酸佐剂是免疫刺激性寡核苷酸，它包含含有 CpG 基序(未甲基化的胞嘧啶二核苷酸序列，后接鸟苷)的核苷酸序列。含有回文或聚(dG)序列的细菌双链 RNA 或寡核苷酸也显示出免疫刺激性。CpG 可包括核苷酸修饰/类似物如硫代磷酸酯修饰，并且可以是双链或单链。任选地，鸟苷可被类似物如 2'-脱氧-7-脱氮鸟苷取代。参考文献 49-51 给出了可能的类似物取代的例子。参考文献 52-57 中进一步讨论了

CpG 寡核苷酸的佐剂效应。

CpG 序列可以导向 TLR9, 如基序 GTCGTT (SEQ ID NO: 11) 或 TTCGTT (SEQ ID NO: 12) [58]。CpG 序列可以特异性诱导 Th1 免疫应答, 如 CpG-A ODN, 或者它可以更特异地诱导 B 细胞应答, 如 CpG-B ODN。参考文献 59-61 中讨论了 CpG-A 和 CpG-B ODN。CpG 优选是 CpG-A ODN。

优选地, 构建 CpG 寡核苷酸以使 5'端可接触到受体。优选地, 构建 CpG 寡核苷酸以使 5'端可被受体识别。任选地, 两种 CpG 寡核苷酸序列可在其 3'端连接, 以形成"免疫聚体"。参见例如, 参考文献 58 和 62-64。

氨基烷基氨基葡萄糖苷磷酸(AGP)衍生物包括 RC-529[65-68], 它是 Corixa Corporation 出售的氨基烷基氨基葡萄糖苷 4-磷酸。

AS04 是铝盐佐剂和 3D-MPL 佐剂的混合物[69]。采用 AS04 时, 优选将 HBsAg 吸附到铝盐上, 如参考文献 70 所述。铝盐优选为磷酸铝, 全部 HBsAg 的至少 50 重量%, 如 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 98\%$ 或更多吸附于磷酸铝。可通过(例如离心, 其中铝-吸附抗原容易形成沉淀, 而未吸附抗原保持在上清液中)分离吸附材料与未吸附的材料, 从而方便地测定吸附的百分数。可用组合物中的 HBsAg 总量减去上清液中的 HBsAg 含量(如用抗-HBsAg ELISA 测定), 然后计算吸附百分数。优选的是, HBsAg 全部吸附, 即上清液中检测不到 HBsAg。

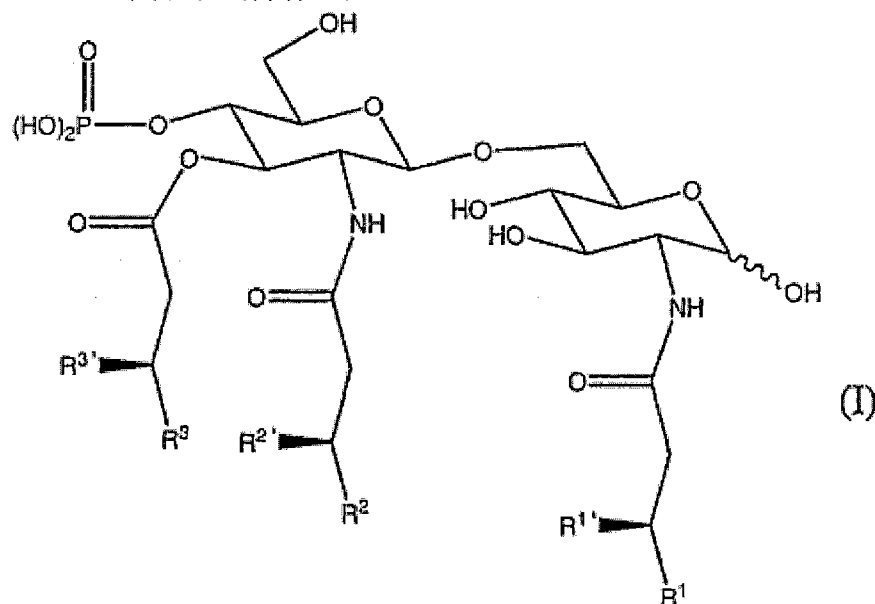
3D-MPL 佐剂也可吸附到磷酸铝上。优选地, 至少 50 重量%, 如 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 、 $\geq 95\%$ 、 $\geq 98\%$ 或更多的 3D-MPL 吸附。可通过与 HBsAg 相同的方式测定吸附百分数。在 3D-MPL 总浓度为 $50\mu\text{g/ml}$ 的组合物中, 未吸附 3D-MPL 的浓度应小于 $25\mu\text{g/ml}$, 例如 $\leq 20\mu\text{g/ml}$ 、 $\leq 15\mu\text{g/ml}$ 、 $\leq 10\mu\text{g/ml}$ 、 $\leq 5\mu\text{g/ml}$ 、 $\leq 20\mu\text{g/ml}$ 、 $\leq 1\mu\text{g/ml}$ 等。

下面开始更详细地描述磷酸铝佐剂。

3-O-脱酰基化的单磷酰基脂质 A(3D-MPL)也被称为 3 脱-O-酰基化的单磷酰基脂质 A 或 3-O-脱酰基-4'-单磷酰基脂质 A。该名称表明, 单磷酰基脂质 A 中的还原端葡萄糖胺的 3 位被脱酰基化。它可由明尼苏达沙门菌(*Salmonella minnesota*)的无庚糖突体制备, 在化学上类似于脂质 A, 但缺少酸-不稳定性磷酰基和碱-不稳定性酰基。它能激活单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞, 并刺激释放几种细胞因子, 包括 IL-1、IL-12、TNF- α 和 GM-CSF。最初在参考文献 71 中描述了 3D-MPL 的制备, 该产品由 Corixa Corporation 生产并以商品名 MPL™出售。其它详情可参见参考文献 72-75。3D-MPL 可与三乙醇胺、三乙铵或三乙胺离子联用。

3D-MPL 可以取酰基化不同的相关分子(如具有 3、4、5 或 6 个酰基链, 它们的长度可以不同)的混合物的形式。两个 2-脱氧-2-氨基-葡萄糖单糖在其 2-位(即 2 和 2' 位)碳上 N-酰基化, 3'位上也有 O-酰基化。连接于碳 2 的基团具有下式: $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^1\text{R}^1'$ 。

连接于碳 2'的基团具有下式: $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^2\text{R}^2'$ 。连接于碳 3'的基团具有下式: $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CR}^3\text{R}^3'$ 。代表性结构见下:



基团 R^1 、 R^2 和 R^3 各自独立地是 $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ 。n 值优选为 8-16, 更优选为 9-12, 最优选为 10。

基团 R^1' 、 R^2' 和 R^3' 各自独立地是: (a)-H; (b)-OH; 或(c)-O-CO- R^4 , 其中 R^4 是-H 或 $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}_3$, 其中 m 值优选为 8-16, 更优选为 10、12 或 14。在 2 位上, m 优选为 14。在 2'位上, m 优选为 10。在 3'位上, m 优选为 12。因此基团 R^1' 、 R^2' 和 R^3' 优选为来自十二烷酸、十四烷酸或十六烷酸的-O-酰基。

R^1 、 R^2 和 R^3 均为-H 时, 3D-MPL 仅含有 3 条酰基链(2、2'和 3'位置上各有一条)。 R^1 、 R^2 和 R^3 中仅有两个是-H 时, 3D-MPL 可含有 4 条酰基链。 R^1 、 R^2 和 R^3 中仅有一个是-H 时, 3D-MPL 可含有 5 条酰基链。 R^1 、 R^2 和 R^3 中没有一个是-H 时, 3D-MPL 可含有 6 条酰基链。本发明所用的 3D-MPL 佐剂可以是含有 3-6 条酰基链的这些形式的混合物, 但混合物中优选包含具有 6 条酰基链的 3D-MPL, 具体说, 保证 6 条酰基链的形式占 3D-MPL 总重的至少 10%, 例如 $\geq 20\%$ 、 $\geq 30\%$ 、 $\geq 40\%$ 、 $\geq 50\%$ 或更多。发现具有 6 条酰基链的 3D-MPL 是佐剂活性最高的形式。

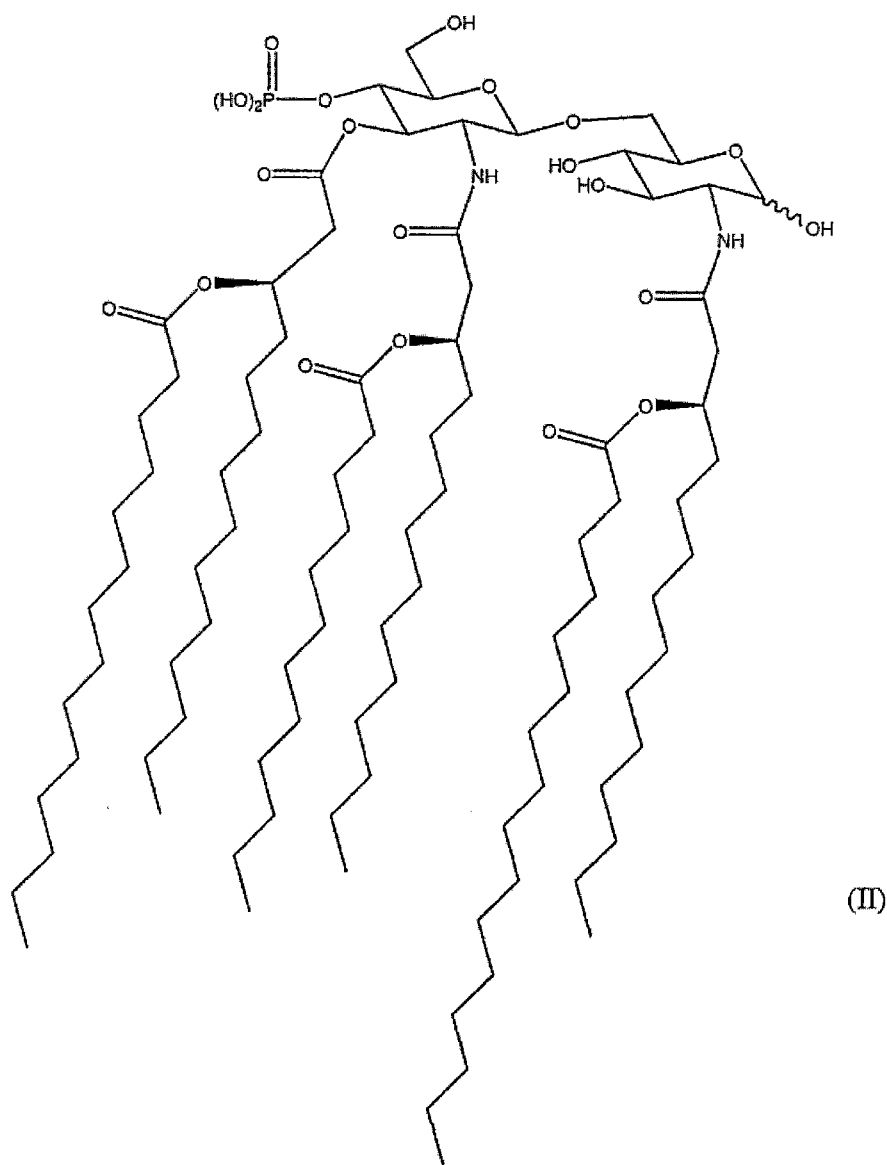
因此, 本发明组合物包含的 3D-MPL 的最优选形式具有下式(II)。

在水性条件下, 3D-MPL 可形成不同大小, 如直径 $< 150\text{nm}$ 或 $> 500\text{nm}$ 的胶束聚

集体或颗粒。其中一种或两种可用于本发明，可通过常规实验选择更好的颗粒。据报道最好是较小颗粒(如小到足以产生澄清的 3D-MPL 水悬液)[76]，本发明使用这种颗粒。优选颗粒的平均直径小于 220 nm，更优选小于 200 nm，小于 150 nm，或小于 120 nm。它们的直径甚至可以小于 100 nm。然而在大多数情况下，平均直径不小于 50nm。

当 3D-MPL 吸附于磷酸铝时，可能不能直接测定 3D-MPL 的粒度，但可以在发生吸附之前测定粒度。

可用揭示平均粒径的常规技术动态光散射评价粒径。据称颗粒的平均直径为 x nm 时，粒径通常分布在此平均值附近，但至少 50 数量%(例如 $\geq 60\%$ 、 $\geq 70\%$ 、 $\geq 80\%$ 、 $\geq 90\%$ 或更多)颗粒的直径在 $x \pm 20\%$ 的范围内。



多价免疫原性组合物

按照本发明表达和纯化的 HBsAg 可与一种或多种非 HBV 抗原混合，以制备多价疫苗。所述非 HBV 抗原可包括细菌和/或病毒抗原。用于本发明的非 HBV 组分一般包括但不限于：

- 白喉类毒素('D')
- 破伤风类毒素(T')
- 百日咳抗原(T'), 可以是细胞('wP')或非细胞('aP')的抗原
- 甲型肝炎病毒(HAV)抗原
- 偶联的 B 型流感嗜血杆菌荚膜糖('Hib')
- 灭活的脊髓灰质炎病毒(IPV)
- 偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清组 C 荚膜糖('MenC')
- 偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清组 A 荚膜糖('MenA')
- 偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清组 W135 荚膜糖('MenW135')
- 偶联的脑膜炎奈瑟球菌血清组 Y 荚膜糖('MenY')
- 偶联的肺炎链球菌荚膜糖
- 麻疹病毒抗原
- 腮腺炎病毒抗原
- 风疹病毒抗原
- 水痘带状疱疹病毒抗原
- 流感病毒抗原

可采用这些非 HBV 抗原中一种以上。特别优选以下抗原组合：

- 二价疫苗：HBV-HAV；HBV-Hib。
- 三价疫苗：HBV-D-T。
- 四价疫苗：HBV-D-T-P。
- 五价疫苗：HBV-D-T-P-Hib；HBV-D-T-P-IPV。
- 六价疫苗：HBV-D-T-P-Hib-IPV。
- 七价疫苗：HBV-D-T-P-Hib-MenA-MenC；HBV-D-T-P-Hib-IPV-MenC。

参考文献 1 的第 13 章更详细地公开了白喉类毒素('D')。优选的白喉类毒素是经过甲醛处理的毒素。用可以补充牛提取物的生长培养基(如 Fenton 培养基, 或 Linggoud 和 Fenton 培养基)培养白喉棒杆菌(*C. diphtheriae*)，接着进行甲醛处理、超滤和沉淀，从而获得白喉类毒素。通过包括无菌过滤和/或透析的方法处理此类毒素化物质。可用国际单位(IU)表示白喉类毒素的量。例如，NIBSC 提供了'吸附的白喉类毒素的第

三国际标准 1999' [77,78], 其含有 160 IU/安瓿。作为 IU 系统的替代形式, 'Lf单位("絮凝单位"或"边界絮凝剂量")定义为与一个国际单位的抗毒素混合时, 产生最优絮凝混合物的类毒素量[79]。例如, NIBSC 提供了'白喉类毒素, Plain' [80], 其含有 300 Lf/安瓿, 也提供了'用于絮凝试验的白喉类毒素的第一国际参比试剂'[81], 其含有 900 Lf/安瓿。

参考文献 1 的第 27 章更详细地公开了破伤风类毒素('T')。优选的破伤风类毒素是通过甲醛处理制备的。用生长培养基(如衍生自牛酪蛋白的 Latham 培养基)培养破伤风梭菌(*C. tetani*), 然后进行甲醛处理、超滤和沉淀, 从而获得破伤风类毒素。通过包括无菌过滤和/或透析的方法处理此物质。可用国际单位(IU)表示破伤风类毒素的量。例如, NIBSC 提供了'吸附的破伤风类毒素的第三国际标准 2000' [82,83], 其含有 469 IU/安瓿。作为 IU 系统的替代形式, 'Lf单位("絮凝单位"或"边界絮凝剂量")定义为与一个国际单位的抗毒素混合时, 产生最优絮凝混合物的类毒素量[79]。例如, NIBSC 提供了'用于絮凝试验的破伤风类毒素的第一国际参比试剂'[84], 其含有 1000 Lf/安瓿。

百日咳抗原('P')可以是细胞('wP')或无细胞('aP')的抗原。细胞百日咳抗原一般是灭活的百日咳博德特菌(*B. pertussis*)细胞的形式。已经详尽记录了细胞百日咳抗原的制备(参见例如参考文献 1 的第 21 章), 例如, 可通过加热灭活百日咳博德特菌的 I 期培养物获得该抗原。可用国际单位(IU)表示 wP 抗原的量。例如, NIBSC 提供了'百日咳疫苗的第三国际标准'[85], 其含有 46 IU/安瓿。各安瓿含有用 8 升 M/15 Sorensen 缓冲液 pH 7.0 稀释的 10 升细菌悬液(根据美国不透明标准, 等同于 180 不透明单位)的水溶液的 2.0 ml 等份的冻干残留物。作为 IU 系统的替代形式, 也采用'OU'单位("不透明单位")(如 4 OU 可以约为 1 IU)。目前用于疫苗的无细胞百日咳抗原包括百日咳类毒素(PT)、丝状血细胞凝集素(FHA)、百日咳杆菌粘附素(也称为'69 千道尔顿外膜蛋白')和菌毛(如凝集原 2 和 3)。本发明优选采用 PT、FHA 和百日咳杆菌粘附素中的至少两种, 优选全部三种(即不采用菌毛)。优选从改良的 Stainer-Scholte 液体培养基培养的百日咳博德特菌培养物中分离制备这三种抗原。可从发酵肉汤中(如通过吸附于羟基磷灰石凝胶)分离 PT 和 FHA, 但可通过加热处理和絮凝(如采用氯化钡)从细胞中提取百日咳杆菌粘附素。可用连续的色谱和/或沉淀步骤纯化抗原。可通过疏水性层析、亲和层析和大小排阻层析纯化 PT 和 FHA。可通过离子交换层析、疏水性层析和大小排阻层析纯化百日咳杆菌粘附素。在用于本发明之前, 可用甲醛处理 FHA 和百日咳杆菌粘附素。优选通过甲醛和/或戊二醛处理使 PT 脱毒。作为这种

化学脱毒方法的替代形式，PT 可以通过诱变降低了酶活性的突变 PT[86]，但优选用化学处理脱毒。无细胞百日咳抗原的量一般用微克表示。

参考文献 1 的第 15 章公开了甲型肝炎病毒(HAV)疫苗。优选的 HAV 组分组分基于灭活病毒，可通过甲醛处理实现灭活。可以在人胚肺双倍体成纤维细胞，如 MRC-5 细胞上培养病毒。优选的 HAV 毒株是 HM175，但也可采用 CR326F。可以在允许病毒生长的条件下培养细胞。裂解细胞，可通过超滤和凝胶渗透层析纯化得到的悬液。

参考文献 1 的第 14 章更详细地公开了 B 型流感嗜血杆菌荚膜糖('Hib')偶联物。将 Hib 荚膜糖偶联于载体蛋白，以提高其免疫原性，尤其是在儿童中的免疫原性。可采用各种载体蛋白，包括白喉类毒素、CRM 197、脑膜炎球菌血清组 B 的外膜蛋白复合物、流感嗜血杆菌蛋白 D 或破伤风类毒素。破伤风类毒素是优选的载体，产品中采用的统称为'PRP-T'。用溴化氰激活 Hib 荚膜多糖，将活化的糖偶联于己二酸接头(如(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺)，一般是盐酸盐)，然后将该接头-糖与破伤风类毒素载体蛋白反应，从而制备 PRP-T。Hib 偶联物的糖部分可含有由 Hib 细菌制备的全长聚核糖基核糖醇磷酸(PRP)，和/或该部分可以含有全长 PRP 的片段。可采用糖:蛋白之比(w/w)为 1:5(即蛋白过量)至 5:1(即糖过量)的偶联物，如该比例为 1:2-5:1，该比例为 1:1.25-1:2.5。在优选的偶联物中，糖与载体蛋白的重量比为 1:2.5-1:3.5。在破伤风类毒素以抗原和载体蛋白的形式存在的疫苗中，偶联物中糖与载体蛋白的重量比可以是 1:0.3-1:2[87]。给予 Hib 偶联物优选导致抗-PRP 抗体浓度 $\geq 0.15 \mu\text{g/ml}$ ，更优选 $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ ，这些是标准的可接受的应答阈值。

在参考文献 1 的第 24 章更详细地公开了灭活的脊髓灰质炎病毒疫苗(IPV)。可以在细胞培养物中培养脊髓灰质炎病毒，优选的培养采用衍生自猴肾的 Vero 细胞系。Vero 细胞可方便地培养成小载体。培养后，可用诸如超滤、渗滤和层析纯化病毒颗粒。给予患者前，脊髓灰质炎病毒必须被灭活，可通过甲醛处理实现这种灭活。脊髓灰质炎可能由三种类型的脊髓灰质炎病毒之一引起。这三种类型相似，并且引起相同的症状，但它们的抗原性差异很大，被一种类型感染后并不能保护其免受其它类型的感染。因此，本发明优选采用三种脊髓灰质炎病毒抗原：1 型脊髓灰质炎病毒(如 Mahoney 毒株)、2 型脊髓灰质炎病毒(如 MEF-1 毒株)和 3 型脊髓灰质炎病毒(如 Saukett 毒株)。优选单独培养、纯化和灭活病毒，然后合并形成批量三价混合物，用于本发明。一般用'DU'单位("D-抗原单位"[88])表示 IPV 量。

偶联的脑膜炎球菌抗原含有偶联于载体蛋白的脑膜炎奈瑟球菌(*N. meningitidis*)

的荚膜糖抗原。针对血清组 C 的偶联疫苗已被批准用于人，其包含 MENJUGATE™ [89]、MENINGITEC™和 NEISVAC-C™。已知血清组 A+C 的偶联物的混合物[90, 91]，已报道了血清组 A+C+W135+Y 的偶联物的混合物[92-95]，并于 2005 被批准作为 MENACTRA™产品上市。用于本发明的脑膜炎球菌糖可以来自血清组 A、C、W135 和 Y 中的一种或多种，如 A+C、A+W135、A+Y、C+W135、C+Y、W135+Y、A+C+W135、A+C+Y、C+W135+Y、A+C+W135+Y。优选至少采用血清组 C 的糖，优选采用来自血清组 A 和 C 的糖。MENJUGATE™和 MENINGITEC™产品采用 CRM197 载体蛋白，这种载体也可用于本发明。NEISVAC-C™产品采用破伤风类毒素载体蛋白，如白喉类毒素一样，这种载体也可用于本发明。用于脑膜炎球菌偶联物的特别优选的载体蛋白是流感嗜血杆菌的蛋白 D，它不存在于任何目前批准的偶联物疫苗中。该偶联物的糖部分可含有由脑膜炎球菌制备的全长糖，和/或它可包含全长糖的片段。可由 OAc+或 OAc-菌株制备血清组 C 糖。就血清组糖而言，优选至少 50%(如至少 60%、70%、80%、90%、95%或更多)的甘露糖胺残基的 C-3 位置上被 O-乙酰基化。可采用糖:蛋白之比(w/w)为 1:10 (即蛋白过量)至 10:1(即糖过量)的脑膜炎球菌偶联物，如该比例为 1:5-5:1，1:2.5-2.5:1，或者是 1:1.25-1.25:1。给予偶联物优选导致对相关血清组的血清杀菌试验(SBA)效价增加至少 4 倍，优选至少 8 倍。可用小兔补体或人补体测定 SBA 效价[96]。

偶联的肺炎球菌抗原包含偶联于载体蛋白的肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)的荚膜糖抗原[例如，参考文献 97-99]。优选包含来自肺炎链球菌一种以上血清型的糖：广泛采用 23 种不同血清型的多糖的混合物，如同采用 5-11 中不同血清型的多糖的偶联疫苗[100]。例如，PrevNar™ [101]含有来自 7 种血清型(4、6B、9V、14、18C、19F 和 23F)的抗原，其中各糖通过还原胺化单独偶联于 CRM₁₉₇，每 0.5 ml 剂量(4μg 血清型 6B)含有 2μg 各糖，偶联物吸附于磷酸铝佐剂。本发明组合物优选至少包含血清型 6B、14、19F 和 23F。其它血清型优选选自：1、3、4、5、7F、9V 和 18C。

提供针对麻疹、腮腺炎和风疹病毒的保护的抗原一般是活病毒，正如已知的单价和三价('MMR')疫苗那样。参考文献 1 的第 19 章更详细地描述了麻疹病毒疫苗。参考文献 1 的第 20 章更详细地描述了腮腺炎病毒疫苗。参考文献 1 的第 26 章更详细地描述了风疹病毒疫苗。典型的麻疹病毒毒株包括：Moraten; Connaught; Schwarz; Edmonston-Zagreb; CAM-70; AIK-C; TD97; Leningrad-16; Shanghai-191; 等。在美国和欧洲 Schwarz 和 Moraten 毒株不是最常用的毒株。典型的腮腺炎病毒毒株包括：Jeryl Lynn; RIT 4385; Urabe; Hoshino; Rubini; Leningrad-3; Leningrad-Zagreb;

Miyahara; Torii; NK M-46; S-12; 等。Jeryl Lynn、RIT 4385、Urabe 和 Leningrad-Zagreb 毒株是最常见的毒株。典型的风疹病毒毒株包括：RA27/3; Matsuba; TCRB 19; Takahashi; Matsuura; TP-336; 等。RA27/3 毒株是西方最常用的毒株。

提供针对水痘的保护的 VZV 抗原一般是活病毒，根据该病毒 Oka 毒株。参考文献 1 的第 28 章更详细地描述了 VZV 疫苗。

参考文献 1 的第 17 和 18 章更详细地描述了流感病毒抗原。广泛来看，流感病毒疫苗可以基于活病毒或灭活病毒，灭活疫苗可以基于完整病毒、'分裂'病毒或纯化的表面抗原(包括血凝素和神经氨酸酶)。可以在鸡蛋或细胞培养物上培养用于制备疫苗的病毒。流感病毒的疫苗株随季节而变。在目前的大流行间期，疫苗一般包括两种 A 型流感毒株(H1N1 和 H3N2)和一种 B 型流感毒株，一般是三价疫苗。本发明也可采用大流行毒株(即疫苗接受者和普通人群没有与其发生过免疫接触的毒株)的病毒，如 H2、H5、H7 或 H9 亚型毒株(聚体是 A 型流感病毒)，大流行毒株的流感疫苗可以是单价疫苗，或者可以基于补充有大流行毒株的正常三价疫苗。流感病毒可以是再分类毒株，并可通过逆向遗传学技术获得。可使该病毒减毒。该病毒可以是温度敏感型。该病毒可以是冷适应性病毒。

制备多价组合疫苗时，抗原可以连续单独混合，或者可以将它们预混或加在一起。例如，可通过包括将 HBsAg、D、T 和 P 抗原连续加入容器，或通过预先混合 D、T 和 P 抗原，接着混合 HBsAg 与 DTP 混合物的方法制备 4 价 DTP-HBsAg 疫苗。

可以任何合适顺序混合抗原组分。

本发明组合物中包含白喉和破伤风类毒素时，优选在与 HBsAg 混合前将它们预先混合。因此，本发明方法包括将含有 HBsAg 的第一组分与含有 D 和 T 抗原的第二组分混合。因此，优选采用预先混合的 D-T 组分。此二价组分可用于本发明方法，如可将该二价组分与 HBsAg 混合，以制备三价 D-T-HBV 组分。或者，可将预先混合的 D-T 组分与其它非 HBV 抗原(如非细胞百日咳抗原)混合，然后将该组分与 HBsAg 混合，等。

类似地，组合物中包含白喉类毒素、破伤风类毒素和完整细胞百日咳抗原时，优选将它们预先混合，因此本发明方法包括将含有 HBsAg 的第一组分与含有 D、T 和 Pw 抗原的第二组分混合。

因此，优选采用预先混合的 D-T-Pw 组分，然后在本发明方法中采用这种组分。

当本发明组合物中包含佐剂时，可以在任何阶段加入佐剂。一般地，在用于本发明方法之前将抗原与佐剂混合(如在用于本发明方法之前将二价 D-T 混合物吸附于

铝盐佐剂),但也可能在混合抗原之后加入佐剂,或者将抗原加入佐剂(如以水性佐剂开始,然后加入抗原,可以是单独加入或预先混合)。如下所述,优选使 HBsAg 组分吸附于磷酸铝佐剂,然后与非 HBV 抗原性组分混合。

HBsAg 融合蛋白

除用于表达 HBsAg 外,本发明可用于表达在同一多肽中含有 HBsAg 序列和非-HBsAg 序列的杂交抗原。可将非-HBsAg 序列插入 HBsAg 序列,或者可将其融合于 HBsAg 序列的 N 末端或 C 末端。

已知将 HBsAg 序列融合于异源抗原,以利用 HBsAg 的能力组合成颗粒。例如,参考文献 102 报道了 HIV-1 gp120 与 HBsAg 融合得到能自发性组装成颗粒的蛋白质,所述颗粒的大小和密度类似于天然 HBsAg 颗粒,脂质组分约占 25%,gp120 含量约为每颗粒 100 个。gp120 能够在融合物中折叠成天然构型,并限制其生物学活性。相似地,通过与 HBsAg 发生内部融合改进 HIV gp41 表位,该融合蛋白在酵母中自身组装成 22nm 脂蛋白颗粒[103]。

此方法也被用于疟疾疫苗。参考文献 104 报道了将来自疟疾 gp190 抗原的至多 61aa 的表位插入 HBsAg 序列,表达的杂交颗粒可在动物中引发抗-gp190 免疫应答。参考文献 105 报道了含有 16 个重复的环孢子体蛋白 4-单体序列的蛋白质,表达为 HBsAg 的融合蛋白。参考文献 106 报道了在酵母中产生由融合于 HbsAg 的 Pfs16 组成的病毒样颗粒。参考文献 107 公开了环孢子体蛋白融合于 HBsAg 的杂交抗原。参考文献 108 公开了间日疟原虫(*P. vivax*)的裂殖子表面 1 蛋白的 C 末端区的融合物,它形成的免疫原性颗粒的大小为 20-45 nm。因此,本领域熟知采用 HBsAg 以自身组装颗粒形式递呈疟疾抗原。

此方法特别适用于将 HBsAg 序列与 HIV、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、三日疟原虫(*Plasmodium malaria*)或卵圆疟原虫(*Plasmodium ovale*)的抗原融合。适用于制备 HBsAg 杂交子的 HIV 抗原包括包膜糖蛋白 gp120 或其抗原性片段[102]。适用于制备 HBsAg 杂交子的恶性疟原虫抗原可以基于环孢子体表面抗原("CSP")的亚基,例如它们可包含 3-20 个重复的 NANP 基序(SEQ ID NO: 14),和/或它们可包含 CSP 的 C 末端区(但一般不包含 C 末端的最后 12 个氨基酸)。例如,本发明可采用称为"RTS"的抗原,其含有恶性疟原虫 NF54 或 7G8 分离物的 CSP 的 C 末端的一大部分(氨基酸 210-398,其含有 19 个 NANP 重复和氨基酸 367-390 的 T 细胞表位区),该部分通过 HBsAg 的前 S2 部分四个氨基酸融合于 HBsAg 的 N 末端。在酵母中表达时,RTS 形成颗粒,该颗粒除蛋白质以外还含有脂

磷酸铝通常是无定形的,尤其是羟基磷酸盐。典型的佐剂是 PO_4/Al 摩尔比为 0.84-0.92 的无定形的羟基磷酸铝,包含 0.6mg Al^{3+}/ml 。磷酸铝通常是颗粒。抗原吸附后颗粒直径一般是 0.5-20 μm (如约 5-10 μm)。

磷酸铝的 PZC 与磷酸对羟基的取代程度逆相关,这种取代程度可能取决于用于通过沉淀制备盐的反应条件和反应物浓度。也通过改变溶液中游离磷酸根离子的浓度(更多磷酸根=更多酸性 PZC)或加入缓冲液如组氨酸缓冲液(使 PZC 碱性更强)改变 PZC。本发明所用的磷酸铝的 PZC 通常为 4.0-7.0,更优选为 5.0-6.5,例如约为 5.7。

用于制备本发明组合物的磷酸铝溶液可以,但不一定含有缓冲液(如磷酸盐或组氨酸或 Tris 缓冲液)。磷酸铝溶液优选为无菌和无热原。磷酸铝溶液可含有游离的水性磷酸根离子,如浓度为 1.0-20 mM,优选 5-15 mM,更优选约 10 mM 的磷酸根离子。磷酸铝溶液也可含有氯化钠。氯化钠浓度优选为 0.1-100 mg/ml(如 0.5-50 mg/ml, 1-20 mg/ml, 2-10 mg/ml),更优选约为 3 ± 1 mg/ml。NaCl 的存在有助于在抗原吸附前正确测定 pH。

铝盐可用于吸附任何 HBV 和非 HBV 抗原。HBsAg 优选吸附于磷酸铝佐剂[70]。白喉类毒素优选吸附于氢氧化铝佐剂。破伤风类毒素优选(但不一定)吸附于氢氧化铝佐剂(如可采用吸附 0-10%的破伤风类毒素)。无细胞百日咳抗原,具体是 69kDa 抗原,优选吸附于氢氧化铝佐剂。偶联的 Hib 抗原可吸附于磷酸铝[112,113]或可以不吸附。以此种方式吸附的 Hib 特别可用于含有 D-T-Pw-Hib-HBsAg 抗原的疫苗。其它偶联抗原(如脑膜炎球菌、肺炎球菌)可类似地吸附于铝盐(如磷酸盐),或者可以不吸附[114]。IPV 抗原在用于本发明方法之前一般不吸附于任何佐剂,但它们可吸附于用其它组分产生的铝佐剂。

就 HBsAg 吸附而言,磷酸铝佐剂优选以加入 HBsAg 的水溶液形式使用(NB:将水性磷酸铝称为"溶液"是标准称法,但从严格的物理化学观点来看,钙盐是不溶的,形成了悬液)。优选在加入 HBsAg 之前将磷酸铝稀释至所需浓度,并保证形成均一溶液。加入 HBsAg 之前 Al^{3+} 的浓度通常为 0-10 mg/ml。优选的 Al^{3+} 浓度为 2-6 mg/ml。

用于本发明方法的两种优选组分是:(1)二价 D-T 组分,含有氢氧化铝佐剂;和(2)三价 D-T-Pw 组分,含有氢氧化铝和磷酸铝佐剂。

药物组合物

除佐剂和抗原组分以外,本发明组合物可包含其它组分。这些组分可来自各种来源。例如,它们可存在于生产过程中使用的抗原或佐剂组分之一中,或者可与抗原性组分分别添加。

优选的本发明组合物包含一种或多种药物载体和/或赋形剂。

为了控制张力, 优选包含生理性盐如钠盐。优选氯化钠(NaCl), 它的浓度可以是 1-20 mg/ml。

组合物的渗透压通常为 200 mOsm/kg-400 mOsm/kg, 优选为 240-360 mOsm/kg, 更优选为 290-300 mOsm/kg。虽然以前报道过渗透压对疫苗接种引起的疼痛无影响 [115], 但优选将渗透压保持在此范围内。

本发明组合物可含有一种或多种缓冲液。缓冲液一般包括: 磷酸盐缓冲液; Tris 缓冲液; 硼酸盐缓冲液; 琥珀酸盐缓冲液; 组氨酸缓冲液; 或柠檬酸缓冲液。包含的缓冲液的浓度一般是 5-20 mM。

本发明组合物的 pH 通常为 5.0-7.5, 更一般为 5.0-6.0(最佳稳定性), 或者为 6.0-7.0。因此, 本发明方法可包括在包装前调整混合疫苗 pH 的步骤。

本发明组合物优选为无菌组合物。

本发明组合物优选无热原, 如每剂量含有 <1EU(内毒素单位, 标准量度), 优选每剂量 <0.1 EU。

本发明组合物优选不含谷蛋白。

任何水性包装疫苗材料的 pH 优选为 5-8, 例如 5.5-6.5。

由于 HBsAg 的吸附特性, 最终疫苗产品可以是看上去混浊的悬浮液。这种外观意味着不容易观察到微生物污染, 因此该疫苗优选含有抗微生物剂。当疫苗包装在多剂量容器中时这点尤其重要。所包含的抗微生物剂优选为 2-苯氧基乙醇和硫柳汞。然而, 在本发明方法中优选不用含汞防腐剂(如硫柳汞)。然而, 如果在用于制备本发明组合物之前用这种防腐剂处理 HBsAg 则无法避免存在痕量的这种防腐剂。但是, 出于安全性考虑, 优选最终组合物含有的汞少于约 25 ng/ml。更优选地, 最终疫苗产品所含的硫柳汞无法检测到。通常通过在加入本发明方法之前去除抗原制剂中的含汞防腐剂或在用于制备组合物的组分的制备过程中避免采用硫柳汞来实现此目的。

在本发明方法中使用二价 D-T 混合物时, 应该不含硫柳汞。在一些实施方式中, D-T 混合物可含有 2-苯氧基乙醇, 但在其它情况下不含硫柳汞和 2-苯氧基乙醇。在本发明方法中使用三价 D-T-Pw 混合物时, 可以不含 2-苯氧基乙醇, 但可包含硫柳汞。

在生产过程中, 通常用 WFI(注射用水)稀释组分以得到所需的终浓度。

表示为 Al^{3+} 的本发明组合物中的磷酸铝浓度优选小于 5 mg/ml, 例如 ≤ 4 mg/ml、 ≤ 3 mg/ml、 ≤ 2 mg/ml、 ≤ 1 mg/ml 等。

本发明组合物中任何 3D-MPL 的浓度优选小于 200 μ g/ml, 例如 ≤ 150 μ g/ml、 ≤ 125

µg/ml、≤110 µg/ml、≤100 µg/ml 等。

本发明组合物中的 HBsAg 浓度优选小于 60 µg/ml，例如≤55 µg/ml、≤50 µg/ml、≤45 µg/ml、≤40 µg/ml 等。浓度一般约为 20 µg/ml。

本发明组合物中的白喉类毒素浓度一般至少为 50 IU/ml。

本发明组合物中的破伤风类毒素浓度一般至少为 100 IU/ml。

本发明组合物中白喉类毒素与破伤风类毒素的比例通常为 2:1-3:1(以 Lf 单位计)，优选为 2.4:1-2.6:1，更优选为 2.5:1。

采用细胞百日咳抗原时，一般至少为 8 IU/ml；采用无细胞抗原时，一般为每剂量 25-75µg PT、25-75µg FHA 和约 10-20µg 百日咳杆菌粘附素。

以糖计，本发明组合物中 Hib 偶联物的含量一般为 10-30 µg/ml。

以 EU(Elisa 单位)计，HAV 抗原的含量一般为至少 600EU/ml。

IPV 抗原的含量取决于毒株血清型。就 1 型病毒而言，组合物一般含有约 80 DU/ml。就 2 型病毒而言，组合物一般含有约 16 DU/ml。就 3 型病毒而言，组合物一般含有约 65 DU/ml。以糖计，本发明组合物中脑膜炎球菌各血清组偶联物的含量一般为 5-25 µg/ml。

以糖计，本发明组合物中肺炎球菌各血清组偶联物的含量一般为 2-20 µg/ml。

优选以 0.5 ml 剂量给予患者本发明组合物。应理解，0.5ml 剂量含有正常差异，如 0.5ml±0.05ml。

本发明可提供适合包装到单个剂量中的混合物质，随后可分配给予患者。上述浓度一般是最终包装剂量中的浓度，因此混合疫苗中的浓度可能更高(如通过稀释降低至最终浓度)。

本发明组合物通常是水性形式。

包装本发明组合物

混合 HBsAg 和佐剂后，本发明方法可包括将 0.5ml 混合物样品提取和包装到容器中的步骤。在多剂量的情况下，可将多个剂量提取和包装到一个容器中。

本发明可包括将疫苗包装到容器中待用的其它步骤。合适的容器包括药瓶和一次性注射器(优选无菌注射器)。

将本发明组合物包装到药瓶中时，药瓶优选由玻璃或塑料制成。在将组合物加入药瓶之前，优选对其进行消毒。为了避免胶乳敏感型患者的问题，优选无胶乳的塞子密封药瓶。药瓶可包括单一剂量的疫苗，或者可以包括一个以上剂量('多剂量'药瓶)，如 10 个剂量。采用多剂量药瓶时，应用无菌针头和注射器在严格无菌的条

件下取出各剂量，小心避免污染药瓶内容物。优选的药品由无色玻璃制成。

药瓶可以有适合的帽(如 Luer 锁)，以便将预填充注射器插入该帽，可以将注射器的内容物推入药瓶(如在其中重建冻干物质)，可以将药瓶的内容物吸回注射器中。从药瓶中拔出注射器后，可连上针头，将该组合物给予患者。该帽优选位于封口或盖子内侧，以便在封口或盖子打开后才能接触到该帽。

将组合物包装到注射器中时，注射器通常不会连接有针头，但可提供单独的针头与注射器组装和使用。优选安全性针头。一般是 1-英寸 23-号、1-英寸 25-号和 5/8-英寸 25-号针头。可提供有剥离标签的注射器，该标签上可打印上批号和过期日期，以帮助记录保存。注射器的活塞优选带有抑止装置，以防止活塞在吸出时偶然脱出。注射器可以有胶乳橡胶帽和/或活塞。一次性注射器含有单一剂量的疫苗。注射器通常带有顶帽，以在连接针头前密封顶端，顶帽优选由丁基橡胶制成。如果注射器和针头分开包装，那么针头优选装有丁基橡胶护罩。优选灰色丁基橡胶。优选的注射器是以商品名"Tip-Lok"TM出售的注射器。

采用玻璃容器(如注射器或药瓶)时，优选采用由硼硅酸盐玻璃，而非钠钙玻璃制成的容器。

将组合物包装到容器中后，可将容器密封到用于分销的箱子，如纸板箱中，该箱子标上该疫苗的详细情况，例如其商品名、疫苗所含抗原的列表(如'乙型肝炎重组物'等)、提供的容器(如'一次性预填充 Tip-Lok 注射器'或'10 x 0.5 ml 单剂量药瓶')、其剂量(如'各自含有一个 0.5 ml 剂量')、警告(如'仅用于成年人'或'仅用于儿童')、过期日期、说明(如'激活对所有已知亚型引起的乙型肝炎病毒(HBV)感染的免疫，用于肾功能不全(包括血液透析前和血液透析)、年龄为 15 岁以上的患者等)、专利号等。各箱含有一个以上的包装疫苗，例如 5-10 个包装疫苗(具体是药瓶)。如果疫苗包含在注射器中，那么该包装可显示注射器的照片。

可将疫苗与单页宣传品包装在一起(在同一个箱子中)，所述单页宣传品包括疫苗的详细情况如给药说明书、疫苗内所含抗原的详情等。说明书也可包含警告，(例如)准备好肾上腺素溶液以应对疫苗接种后发生过敏反应的情况等。

包装疫苗优选保存于 2°C-8°C。不应被冷冻。

在生产过程中可以全液体形式提供疫苗(即所有抗原性组分都在水溶液或悬液中)，或者可以一些组分是液体形式、另一些组分是冻干形式的形式制备。因此，可以在使用时通过混合以下两种组分当场制备最终疫苗：(a)含有水性抗原的第一种组分；和(b)含有冻干抗原的第二种组分。这两种组分优选装在不同的容器(如小瓶和/

或注射器)中, 本发明提供了包括组分(a)和(b)的药盒。这种形式特别可用于包含偶联物组分, 特别是 Hib 和/或脑膜炎球菌偶联物的疫苗, 因为它们可能在冻干形式中更稳定。因此, 可在用于本发明之前将偶联物冻干。也可在冻干前加入其它组分, 如稳定剂。所包含的稳定剂优选为乳糖、蔗糖和甘露醇, 及其混合物, 如乳糖/蔗糖混合物、蔗糖/甘露醇混合物等。因此, 最终疫苗可含有乳糖和/或蔗糖。采用蔗糖/甘露醇混合物可加速干燥过程。

因此, 本发明提供了制备双容器组合疫苗的方法, 所述方法包括以下步骤:

-如上所述制备组合疫苗水溶液, 但其中所述一种或多种抗原不包括偶联的荚膜糖抗原;

-将所述组合疫苗包装到第一种容器(如注射器)中;

-制备冻干形式的偶联荚膜糖抗原;

-将所述冻干抗原包装到第二种容器(如药瓶)中; 和

-将所述第一种容器和第二种容器一起包装到药盒中。

然后可将该药盒分配给医生。

D、T、P 和 HBsAg 组分优选为液体形式。

治疗方法和疫苗的给药

本发明组合物适合给予人类患者, 本发明提供了在患者中产生免疫应答的方法, 包括将本发明组合物给予患者的步骤。

本发明也提供了用于药物的本发明组合物。

本发明也提供了将(i)按照本发明表达的 HBsAg 和(ii)一种或多种非-HBV 抗原用于制备给予患者的药物的应用。

本发明也提供了将(i)按照本发明表达的 HBsAg 和(ii)除氢氧化铝外的佐剂用于制备给予患者的药物的应用。所述药物优选为单价疫苗。接受此种疫苗的优选患者群体如上所述。

本发明免疫原性组合物优选用于预防和/或治疗至少乙型肝炎病毒感染的疫苗。在第一次免疫后 6 周测定时, 接受本发明组合物的患者的血清抗-HBsAg GM 效价优选 $\geq 500\text{mIU/ml}$ 。更优选地, 在 12 个月后测定时, 该效价 $\geq 500\text{mIU/ml}$ 。

为了达到完全效能, 典型的儿童免疫方案可包括给予一个以上的剂量。例如, 剂量可以是: 0 和 6 个月(时间 0 点为第一个剂量); 0、1、2 和 6 个月; 第 0 天、第 21 天, 然后在 6-12 个月给予第三个剂量; 或者是 0、1、2、6 和 12 个月。

可通过肌肉内注射到(例如)手臂或腿中给予本发明组合物。

本发明生产的疫苗可与单独肺炎球菌偶联疫苗如 Prevnar™同时给予患者。

当本发明组合物包含铝基佐剂时，在储存期间可能发生成分沉淀。因此，在给予患者之前应该振荡该混合物。振荡过的组合物是混浊的白色悬液。

优选疫苗

本发明的具体多价免疫原性组合物包括：

- 含有 HBsAg 和 HAV 的二价组合物。该疫苗为水性形式。它包含氢氧化铝和磷酸铝佐剂。HBsAg 吸附于磷酸铝。HAV 吸附于氢氧化铝。每毫升含有：约 720 ELISA 单位 HAV；约 20 μ g HBsAg。剂量：约 1 ml。可以在预填充注射器中提供。

- 含有 HBsAg、D、T、Pa 和 IPV 的五价组合物。该疫苗为水性形式。它包含氢氧化铝和磷酸铝佐剂。HBsAg 吸附于磷酸铝。D、T 和 Pa 吸附于氢氧化铝。每毫升含有：约 50 Lf 白喉类毒素；约 20 Lf 破伤风类毒素；约 50/Ag PT；约 50 μ g FHA；约 16 μ g 百日咳杆菌粘附素；约 20 μ g HBsAg；约 80 DU 1 型脊髓灰质炎病毒；约 16 DU 2 型脊髓灰质炎病毒；约 64 DU 3 型脊髓灰质炎病毒。剂量：约 0.5ml。可以在预填充注射器中提供。

- 含有 HBsAg、D、T、Pa 和 IPV 的五价组合物。该疫苗为水性形式。它包含氢氧化铝和磷酸铝佐剂。HBsAg 吸附于磷酸铝。D、T 和 Pa 吸附于氢氧化铝。每毫升含有：至少 60 IU 白喉类毒素；至少 80 IU 破伤风类毒素；约 50 μ g PT；约 50 μ g FHA；约 16 μ g 百日咳杆菌粘附素；约 20 μ g HBsAg；约 80 DU 1 型脊髓灰质炎病毒；约 16 DU 2 型脊髓灰质炎病毒；约 64 DU 3 型脊髓灰质炎病毒。剂量：约 0.5ml。可以在预填充注射器中提供。

- 含有 HBsAg、D、T 和 Pw 的四价组合物。这些组分是水性形式。它包含氢氧化铝和磷酸铝佐剂。HBsAg 吸附于磷酸铝。D 和 T 吸附于氢氧化铝。该组合物包含硫柳汞，但优选不含 2-苯氧基乙醇。每毫升含有：至少 60 IU 白喉类毒素；至少 120 IU 破伤风类毒素；至少 8 IU Pw；约 20 μ g HBsAg。剂量：约 0.5ml。

- 含有 HBsAg、D、T、Pw 和 Hib-T 偶联物的五价组合物。HBsAg、D、T 和 Pw 组分是水性形式；Hib-T 是冻干形式。它包含氢氧化铝和磷酸铝佐剂。D 和 T 吸附于氢氧化铝。HBsAg 和 Hib-T 吸附于磷酸铝。冻干的 Hib-T 包含乳糖。水性组分可含有硫柳汞。每毫升含有：至少 60 IU 白喉类毒素；至少 120 IU 破伤风类毒素(以及 5-25 μ g 破伤风类毒素作为 Hib-T 中的载体)；至少 8 IU Pw；约 20 μ g HBsAg；约 5 μ g Hib-T(以糖计)。剂量：约 0.5ml。

这些组合物可单独使用，或者作为其它疫苗的组分。例如，本发明提供了含有

上述五价 HBsAg-D-T-Pa-IPV 组合物和冻干 Hib-T 偶联物的六价组合物。冻干的 Hib-T 优选不吸附于铝盐。本发明也提供了含有上述四价 HBsAg-D-T-Pw 组合物和冻干 Hib-T 偶联物的五价组合物。本发明也提供了含有上述四价 HBsAg-D-T-Pw 组合物以及 Hib-T 偶联物、MenA 偶联物和 MenC 偶联物的冻干混合物的七价组合物。最终疫苗可通过在使用时用含 HBsAg 的含水物质重建冻干物质制备，优选将冻干组分和含水组分一起包装在药盒中，如上所述。

本发明的具体单价免疫原性组合物是：

- 与磷酸铝佐剂和 3D-MPL 佐剂混合的 HBsAg，其中 HBsAg 和 3D-MPL 都吸附于磷酸铝。每剂量含有：约 20 μ g HBsAg，约 50 μ g 3D-MPL，约 0.5mg Al³⁺。

本发明的具体方法包括以下步骤：

- 按照本发明表达后纯化 HBsAg；将 HBsAg 吸附于磷酸铝佐剂；获得不含硫柳汞的二价 D-T 与氢氧化铝佐剂的混合物；获得用于 Pa 组分的 PT、FHA 和百日咳杆菌粘附素；以 1、2 和 3 型混合物的形式获得 IPV 抗原，优选不含铝盐佐剂；以任何顺序混合 D-T、Pa、IPV 和 HBsAg，得到最终五价混合物；任选地，包装到注射器中。

- 按照本发明表达后纯化 HBsAg；将 HBsAg 吸附于磷酸铝佐剂；获得不含 2-苯氧基乙醇、含硫柳汞的三价 D-T-Pw 与氢氧化铝和磷酸铝佐剂的混合物；混合 D-T-Pw 与 HBsAg，得到最终的四价混合物；任选地，包装到注射器中；任选地，与冻干偶联物组分如 Hib-T、MenA、MenC 一起包装。

- 按照本发明表达后纯化 HBsAg；将 HBsAg 吸附于磷酸铝佐剂；获得不含 2-苯氧基乙醇、含硫柳汞的三价 D-T-Pw 与氢氧化铝和磷酸铝佐剂的混合物；获得冻干的 Hib-T 偶联物；混合 D-T-Pw 与 HBsAg，得到含水的四价组分；将含水的四价组分包装到玻璃药瓶中；将冻干的 Hib-T 包装到玻璃药瓶中；将这两个药瓶合并到一个药盒中，以重建得到五价组合疫苗。玻璃药瓶可以是 I 型玻璃并装有丁基橡胶塞。

- 按照本发明表达后纯化 HBsAg；将 HBsAg 吸附于磷酸铝佐剂；获得不含 2-苯氧基乙醇、含硫柳汞的三价 D-T-Pw 与氢氧化铝和磷酸铝佐剂的混合物；以 1、2 和 3 型混合物的形式获得 IPV 抗原，优选不含铝盐佐剂；以任何顺序混合 D-T-Pw、IPV 和 HBsAg，得到最终的五价混合物；任选地，包装到注射器中；任选地，与冻干偶联物组分如 Hib-T、MenA、MenC 一起包装。

在任何阶段可加入其它组分，如氯化钠、佐剂、防腐剂等。可采用这些方法(例如)来制备上述疫苗。

不同的方法步骤可以在基本相同的时间进行，或者可以分别进行。可以在相同位置或不同位置，甚至在不同国家进行，例如，HBsAg 表达可能发生在不同于 Hib-T 偶联物冻干的地点。

偶联物的载体蛋白

偶联的糖抗原包含直接或通过接头共价连接于糖的载体蛋白。关于偶联的普通信息可参见参考文献 116。

已知各种蛋白质可用作载体，优选的载体蛋白是细菌毒素或类毒素，如白喉类毒素或破伤风类毒素。其它合适的载体蛋白包括但不限于：白喉毒素的 CRM197 突变体[117-119]、脑膜炎奈瑟球菌外膜蛋白[120]、合成肽[121, 122]、热激蛋白[123,124]、百日咳蛋白[125,126]、细胞因子[127]、淋巴因子[127]、激素[127]、生长因子[127]、含有各种病原体衍生抗原的多种人 CD4+ T 细胞表位的人工蛋白[128]如 N19[129]、流感嗜血杆菌的蛋白 D[130,131]、肺炎球菌表面蛋白 PspA[132]、肺炎链球菌溶血素[133]、摄铁蛋白[134]、艰难梭菌(*C. difficile*)的毒素 A 或 B[135]、无乳链球菌(*S. agalactiae*)蛋白[136]等。

优选通过-NH₂ 基团，如载体蛋白的赖氨酸残基侧链中或精氨酸残基侧链中的-NH₂ 基团将糖连接于载体。也可能连接于-SH 基团(如半胱氨酸侧链中的-SH 基团)。

优选糖:蛋白质之比(w/w)为 1:5(即蛋白质过量)-5:1(即糖过量)的偶联物。

组合物可包含少量游离的载体。如果不考虑作为单独抗原包含的任何载体，在整个组合物中，未偶联载体优选不超过载体蛋白总量的 5%，更优选占 2 重量%以下。

组合物中可能包含一种以上类型的载体蛋白，(例如)以降低载体抑制的风险。

用于脑膜炎奈瑟球菌偶联物的载体蛋白可以是流感嗜血杆菌的蛋白 D。参考文献 137 和 138 中详细描述了此蛋白，参考文献 139 中描述了将其用作偶联物中的载体蛋白。术语"蛋白 D"包括如参考文献 139 所述的天然全长蛋白的片段，以及含有全长蛋白 D 或这些片段的融合蛋白(如流感病毒 NS1 蛋白的片段和蛋白 D 的片段的融合物)。与该片段偶联时仍然能够将 T-非依赖性糖抗原转变为 T-依赖性抗原。典型片段至少包含蛋白 D 的 N-末端 1/3。可在大肠杆菌中方便地表达该蛋白[138]，本发明优选采用此重组物质[139]。

概述

术语“含有”包括“包含”以及“由...组成”，例如“含有”X 的组合物可仅由 X 组成或可包含其它物质，例如 X+Y。

术语"基本上"不排除"完全"，如"基本上不含"Y 的组合物可能完全不含 Y。必要

时，可从本发明定义中删去术语"基本上"。

与数值 x 相关的术语“约”表示，例如 $x \pm 10\%$ 。

除非另有说明，包括混合两种或多种组分的步骤的方法不需要任何特定的混合顺序。因此，可以任何顺序混合这些组分。有三种组分时，两种组分可以相互混合，然后将混合的组分再与第三种组分混合等。

将抗原抗原描述为"吸附"于佐剂时，优选至少吸附了 50 重量%的该抗原，例如 50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或更多。优选的是，白喉类毒素和破伤风类毒素均完全吸附，即上清液中检测不到。也优选 HBsAg 完全吸附。

应理解，可离子化的基团可以本文式中所示的中性形式存在，或者可以带电形式存在，这取决于 pH。因此，磷酸基团可以是 $-P-O-(OH)_2$ ，此式仅代表中性磷酸基团，本发明也包括其它带电形式。相似地，糖环可以是开放或闭合形式，虽然本文结构式中显示的是闭合形式，但本发明也包括开放形式。

将动物(具体是牛)材料用于培养细胞时，它们应获自未患传染性海绵状脑病(TSE)，特别是未患牛海绵状脑病(BSE)的来源。

序列表详述

SEQ ID NO:	详述
1	优选的 GAPDH 启动子核苷酸序列
2	SEQ ID NO: 1, 后接启动子
3	优选的 HBsAg 氨基酸序列
4	优选的 HBsAg 核苷酸序列
5	已知的 1061-单体的启动子序列[41]
6	ARG3 终止密码子下游的已知核苷酸(GI: 171076)
7	SEQ ID NO: 6, 向编码序列中反向延伸 250 个核苷酸
8	HBsAg 编码序列下游所用的优选序列
9	SEQ ID NO: 8 和上游 ochre 终止密码子
10	已知的 HBsAg 氨基酸序列(CAA84792.1)
11	TLR 佐剂
12	TLR 佐剂
13	含有启动子、HBsAg 编码序列和终止子序列的组合序列

本发明的实施方式

质粒制备

构建含有以下顺序的各种元件的质粒：酵母 GAPDH 启动子；HBsAg 编码序列；

含有酵母 ARG3 转录终止子的区域；大肠杆菌载体 pBR327 的 DNA；含有 LEU2 标记物的酵母 DNA；大肠杆菌载体 pBR327 的 DNA；酵母 2 μ 质粒序列；大肠杆菌载体 pBR327 的 DNA。pBR327 序列包含在大肠杆菌中有功能的 *ori*。该质粒总长为 14600-14700 bp。

GAPDH 启动子序列包含以下 1060-个核苷酸 (SEQ ID NO: 1):

```
aagcttaccagttctcacacggaacaccactaatggacacacattcgaaatactttgaccctattttcgagga
ccttgtcaccttgagcccaagagagccaagatttaaattttcctatgacttgatgcaaattcccaaagcta
aacatgcaagacacgtacggccaagaagacatatttgacctctaacaggttcagacgcgactgcctcatcag
taagaccggttgaaaagaacttacctgaaaaaacgaatataactagcgttgaaatgtagcgtcaacaaca
gaagtttactgacgcggaggccaaggcaaaaagattccttgattacgtaagggagtagaatcattttgaata
aaaaacacgctttttcagttcgagtttatcattatcaatactgccatttcaagaatacgtaaataattaata
gtagtgttttcttaactttatattagtcaaaaaattagccttttaattctgctgtaaccgctacatgccaaa
atagggggcggttacacagaatataaacatcgtaggtgtctgggtgaacagtttattcctggcatccacta
aatataatggagcccgctttttaagctggcatccagaaaaaaaagaatccagcaccaaaatattgttttct
tcaccaaccatcagttcataggtccatttctcttagcgaactacagagaacaggggacaaaacaggcaaaaaa
cgggcacaacctcaatggagtgatgcaacctgctggagtaaatgatgacacaaggcaattgaccacgcgatg
tatctatctcattttcttacacctctattacctctctctctgatttgaaaaagctgaaaaaaaagggt
tgaaaccagttccctgaaattattccctacttgactaataagtatataaagacggtaggtattgattgta
tctgtaaattctatttcttaaacttcttaaattctacttttatagttagtcttttttttagttttaaaca
agaacttagtttcgaataaacacacataaacaacaaa
```

HBsAg 编码序列如下 (SEQ ID NO: 4)，后接赭石终止密码子：

```
atggagaacatcacatcaggattcctaggaccctgctcgtgttacaggcggggtttttcttgttgacaagaa
tcctcacaataaccgagagctctagactcgtgggtgacttctctcaattttctagggggatcacccgtgtgtct
tggccaaaatttcgagtcocccaacctccaatcactaccaacctcctgtcctccaatttgtcctgggttatcgc
tggatgtgtctgaggcgttttatcatattcctcttcatcctgctgctatgcctcatcttcttattggttcttc
tggattatcaaggatggttgccggtttgtcctctaattccaggatcaacaacaaccaatagcgggaccatgcaa
aacctgcacgactcctgctcaaggcaactctatgtttccctcatgttgctgtacaaaacctacggatggaaat
tgcacctgtattcccatcccatcgtcctgggcttctgcaaaaatacctatgggagtgggcctcagtcggttct
cttggctcagtttactagtgccatttgttcagtggttcgtagggcttccccactgtttggctttcagctat
atggatgatgtggtattgggggccaagctctgtacagcatcgtgagtcctttataccgctgttaccattttc
ttttgtctctgggtatacatt
```

此序列编码含有以下氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 的多肽：

```
MENITSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTIPOSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNSHSPTSCPPICPGYR
WMCLRRFIIIFLIFLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTNTGPKCTTTPAQGNSMFPSCCTKPTDGN
CTCIPSPSWAFAYLWWEVASVRFSWLSLLVPFVQWVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFIPLLPFI
FCLWVYI
```

ARG3 序列包含以下 689-个核苷酸序列 (SEQ ED NO: 8)，其中含有 ARG3 下游区域的其它序列：

```
cgaattccaagctgaaacaattcaaaggttttcaaatacaatcaagaacttgctctctgtggctgatccaaacta
caaatttatgcatgtctgccaagacatcaagaagaagttagtgatgatgtcttttatggagagcattccata
gtctttgagaagcagaaaaacagattatatagcagctatgtctgccattgatatctttgttaataataaaggta
atltcaaggacttgaaataatccttcttctcgtgttcttaataactaatataataacagatatagatgcatg
aataatgatatacattgattattttgaatgtcaattaaaaaaaaaaaaatgtagtaaaactatgttacattc
caagcaataaagcacttggttaaacgaaattaacgttttttaagacagccagaccggtctaaaaatttaaa
tatacactgccaacaaattccttcgagttgtccaatttaccacttttatattttcatcaacttcagcagatt
caaccttctcacatagaacattggaataaacagccttaacaccactttcaagtttgacagcgtaatatgagg
aattttgttttgacaacacaacctttaaatttctcattgttttcatcaattatgcatccatctttatcttta
gacagttccactacaatagcaatagttttttc
```

因此，该质粒的表达盒包含以下 2430-个核苷酸 (SEQ ID NO: 13)：

```

aagcttaccagttctcacacggaacaccactaatggacacacattcgaaatactttgaccctatcttcgagga
ccttgtcaccttgagcccaagagagccaagatftaaatcttctatgacttgatgcaaattcccaaagcta
aacatgcaagacacgtacgggtcaagaagacatatttgacctcttaacagggttcagacggcactgcctcatcag
taagaccggttgaaaagaacttacctgaaaaaaacgaatatatactagcgttgaatgttagcgtcaacaacaa
gaagtttactgacgcggaggccaaggcaaaaagattccttgattacgtaaggaggattagaatcattttgaata
aaaaacacgctttttcagttcgagtttatcattatcaatactgcccatttcaaagaatcagtaaaataattaata
gtagtgattttcctaactttatttagtcaaaaaattagccttttaattctgctgtaaccocgtacatgcccaaa
atagggggcggtttacacagaatatataacatcgtagggtgctctgggtgaacagtttattcctggcatccacta
aatataatggagcccgtttttaagetggcatccagaaaaaaaagaatcccagcaccaaaatattgttttct
tcaccaaccatcagttcataggtccatttctcttagcgcactacagagaacagggggcacaaacaggcaaaaaa
cgggcacaaacctcaatggagtgatgcaacctgcctggagtaaattgatgacacaaggcaattgaccacgcacgtg
tatctatctcattttcttacacctctattacctctgctctctctgatttgaaaaagctgaaaaaaagggt
tgaaaccagttccctgaaattatccctacttgactaataagtatataaagacggtaggtattgattgtaaat
tctgtaaattctatttcttaaactcttaaaattctacttttatagttagtccttttttttagttttaaaccacca
agaacttagtttgaataaaacacacataaaacaaacaaaATGgagaacatcacatcaggattcctaggaccctc
gctcgtgttacagggcggtttttcttgttgacaagaatcctcacaataccgcagagttctagactcgtgggtgg
acttctctcaattttctagggggatcaccocgtgtgtcttggccaaaattcgcagtcoccaaacctccaatcact
caccacacctcctgtcctccaatttgcctgggttatcgtcggatgtgtctgcccgtttttatcatattcctctt
catcctgctgctatgcctcatcttcttatbtgggttcttctggattatcaaggatgtttgcccgttttgctcctc
attccaggatcaacaacaaccaatcagggaccatgcaaaacctgcacgactcctgctcaaggcaactctatgt
ttccctcatgttgctgtacaaaacctacggatggaaaattgcaacctgtattcccatcccatcgtcctgggcttt
cgcaaaatacctatgggagtgggcctcagtcocgtttctcttggctcagtttactagtgccatttggttcagtg
ttcgtagggctttcccccactgttttggctttcagctatatggatgatgtgggtattggggggccaagtcctgtaca
gcatcgtgagtccttttataccgctgttaocaaattttcttttgtctctgggtatacattTAAcgaattccaag
ctgaaacaattcaaagggttttcaaatacaatcaagaacttgtctctgtggctgatccaaactacaaatttatgc
attgtctgccaagacatcaagaagaagttagtgatgatgtcttttatggagagcattccatagtcctttgaaga
agcagaaaacagatttatatgcagctatgtctgccattgatattcttggtaataataaaggtaatttcaaggac
ttgaaataatccttcttctcgtgttcttaataactaatatataaatacagatatagatgcatgaataatgatata
acattgattattttgcaatgtcaattaaaaaaaaaaaatggttagttaaactatgtttacattccaagcaataa
agcacttggttaaacgaaattaacgttttttaagacagccagaccgggtctaaaaatttaaataacactgcc
aacaattccttcgagttgtccaatttcaccacttttatattttcatcaacttcagcagattcaaccttctca
catagaacattggaataaacagccttaacaccactttcaagtttgcacagcgtaatatgaggaattttgtttt
gacaacacaaccctttaattttctcattgttttcatcaattatgcatccatctttatcttttagacagttccac
tacaatagcaatagttttttt

```

质粒元件的序列分析

GAPDH 启动子序列(SEQ ID NO: 1)与参考文献 41 公开的 GAPDH 启动子序列 (SEQ ID NO: 5)在几个位置上不同:

```

0      [AAGCTTACCAGTTCTCACACGGAACACCACTAATGGACACA] a [ATTCGAAATACT
0      [AAGCTTACCAGTTCTCACACGGAACACCACTAATGGACACA] c [ATTCGAAATACT

54     TTGACCCTATTTTCGAGGACCTTGTACCTTGAGCCCAAGAGAGCCAAGATTTAAATTTT
54     TTGACCCTATTTTCGAGGACCTTGTACCTTGAGCCCAAGAGAGCCAAGATTTAAATTTT

114    CCTATGACTTGATGCAAATTCCTCAAAGCTAATAACATGCAAGACACGTACGGTCAAGAAG
114    CCTATGACTTGATGCAAATTCCTCAAAGCTAATAACATGCAAGACACGTACGGTCAAGAAG

174    ACATATTTGACCTCTTAAC] t [GGTTCAGACGCGACTGCCTCATCAGTAAGACCCGTT
174    ACATATTTGACCTCTTAAC] a [GGTTCAGACGCGACTGCCTCATCAGTAAGACCCGTT

230    GAAAAGAAGTTACCTGAAAAAACGAATATATACTAGCGTTGAATGTTAGCGTCAACAAC
230    GAAAAGAAGTTACCTGAAAAAACGAATATATACTAGCGTTGAATGTTAGCGTCAACAAC

290    AAGAAGTTTA] a [TGACGCGGAGGCCAAGGCCAAAAGATTCCCTTGATTACGTAAGGGA
290    AAGAAGTTTA] c [TGACGCGGAGGCCAAGGCCAAAAGATTCCCTTGATTACGTAAGGGA

346    GTTAGAATCATTTTGAATAAAAAACACGCTTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATAC
346    GTTAGAATCATTTTGAATAAAAAACACGCTTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATAC

406    TGCCATTTCAAAGAATACGTAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTTATTTAGTC
406    TGCCATTTCAAAGAATACGTAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTTATTTAGTC

466    ] . [AAAAATTAGCCTTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAATAGGGGGCGG
466    ] a [AAAAATTAGCCTTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAATAGGGGGCGG

521    GTTACACAGAATATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTAT] c [CCTGGCAT
522    GTTACACAGAATATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTAT] t [CCTGGCAT

577    CCACTAAATATAATGGAGC] tcgc. [TTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAGAATC
578    CCACTAAATATAATGGAGC] ccgc. [TTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAGAATC

632    CCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCG
634    CCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCG

692    CAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCCAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGAT
694    CAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCCAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGAT

752    GCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCA
754    GCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCA

812    TTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAGCTGAAAAAAAAG
814    TTTTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAGCTGAAAAAAAAG

872    GTTGAAACCAGTTCCTGAAATATTCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTA
874    GTTGAAACCAGTTCCTGAAATATTCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTA

932    GGTATTGATTGTAATCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGT
934    GGTATTGATTGTAATCTGTAAATCTATTTCTTAAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGT

992    TAGTCTTTTTTTTAGTTTTTAAACACCAAGAAGCTTAGTTTTCGAATAAACACACATAAACA
994    TAGTCTTTTTTTTAGTTTTTAAACACCAAGAAGCTTAGTTTTCGAATAAACACACATAAACA

1052   AACAA] gctt
1054   AACAA] a...

```

在 2005 年 4 月 7 日用 SEQ ID NO:1 去查询"所有 GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 序列(但不含 EST, STS, GSS, 环境样品或 0、1 或 2 期 HTGS 序列)", 没有过滤。

此搜索中的最高命中条目与 SEQ ID NO: 1 的比对如下:

>gi|1323342|emb|Z72978.1|SCYGR193C 酿酒酵母染色体 VII 阅读框 ORF YGR193c
 长度=2262
 评分=2085 位(1052), 预计值=0.0
 相同性=1058/1060(99%)
 链=+/-

```

查询: 1      aagccttaccagttctcacacggaacaccactaatggacacacatttcgaaatactttgacc 60
            |||
主题: 1060   aagccttaccagttctcacacggaacaccactaatggacacacatttcgaaatactttgacc 1001
            |||

查询: 61      ctatcttcgaggaccttggtcaccttgagcccaagagagccaagatttaaattttcctatg 120
            |||
主题: 1000   ctatcttcgaggaccttggtcaccttgagcccaagagagccaagatttaaattttcctatg 941
            |||

查询: 121     acttgatgcaaattcccaaagctaataacatgcaagacacgtacggtaagaagacatat 180
            |||
主题: 940    acttgatgcaaattcccaaagctaataacatgcaagacacgtacggtaagaagacatat 881
            |||

查询: 181     ttgacctcttaacaggttcagacgcgactgcctcatcagtaagaccggttgaaaagaact 240
            |||
主题: 880    ttgacctcttaacaggttcagacgcgactgcctcatcagtaagaccggttgaaaagaact 821
            |||

查询: 241     tacctgaaaaaaacgaatatatactagcgttgaaatgtagcgtcaacaacaagaagtta 300
            |||
主题: 820    tacctgaaaaaaacgaatatatactagcgttgaaatgtagcgtcaacaacaagaagtta 761
            |||

查询: 301     ctgacgcggaggccaaggcaaaaagattccttgattacgtaagggagttagaatcatttt 360
            |||
主题: 760     ctgacgcggaggccaaggcaaaaagattccttgattacgtaagggagttagaatcatttt 701
            |||

查询: 361     gaataaaaaaacacgcctttttcagttcgagtttatcattatcaatactgccatttcaaaga 420
            |||
主题: 700     gaataaaaaaacacgcctttttcagttcgagtttatcattatcaatactgccatttcaaaga 641
            |||

查询: 421     atacgtaataattaatagtagtgattttcctaactttatttagtcaaaaaattagcctt 480
            |||
主题: 640     atacgtaataattaatagtagtgattttcctaactttatttagtcaaaaaattagcctt 581
            |||

查询: 481     ttaattctgctgtaaccggtacatgcccataatagggggcgggttacacagaatatataa 540
            |||
主题: 580     ttaattctgctgtaaccggtacatgcccataatagggggcgggttacacagaatatataa 521
            |||

查询: 541     catcgtaggtgtctgggtgaacagtttatctctggcatccactaaatataatggagcccg 600
  
```

```

主题: 520 |||catcgtaggtgtctctgggtgaacagtttattcctggcatccactaaatataatggagcccg 461
查询: 601 ctttttaagctggcatccagaaaaaaaaagaatcccagcaccaaaatattgtttttcttca 660
主题: 460 |||ctttttaagctggcatccagaaaaaaaaagaatcccagcaccaaaatattgtttttcttca 401
查询: 661 ccaaccatcagttcataggtccattctcttagcgcaactacagagaacaggggcacaaac 720
主题: 400 |||ccaaccatcagttcataggtccattctcttagcgcaactacagagaacaggggcacaaac 341
查询: 721 aggcaaaaaacgggcacaaacctcaatggagtgatgcaaacctgcctggagtaaattgatgac 780
主题: 340 |||aggcaaaaaacgggcacaaacctcaatggagtgatgcaaacctgcctggagtaaattgatgac 281
查询: 781 acaaggcaattgaccacgcatgtatctatctcattttcttacaccttctattaccttct 840
主题: 280 |||acaaggcaattgaccacgcatgtatctatctcattttcttacaccttctattaccttct 221
查询: 841 gctctctctgatttggaaaaagctgaaaaaaaaaggttgaaccagttccctgaaattatt 900
主题: 220 |||gctctctctgatttggaaaaagctgaaaaaaaaaggttgaaccagttccctgaaattatt 161
查询: 901 cccctacttgactaataagtatataaagacggtaggtattgattgtaattctgtaaattct 960
主题: 160 |||cccctacttgactaataagtatataaagacggtaggtattgattgtaattctgtaaattct 101
查询: 961 atttcttaaacctcttaaacctctacttttatagtttagtcttttttttagtttttaaacac 1020
主题: 100 |||atttcttaaacctcttaaacctctacttttatagtttagtcttttttttagtttttaaacac 41
查询: 1021 caagaacttagtttcgaataaacacacataaacacaaa 1060
主题: 40 |||caagaacttagtttcgaataaacacacataaacacaaa 1

```

因此, SEQ ID NO: 1 与最接近匹配的反向互补物相比在两个核苷酸上不同。

通过相同方式用 GenBank 序列分析 HBsAg 编码序列(SEQ ID NO: 4)。SEQ ID NO: 4 与最接近数据库匹配(AY576426.1)相比仅在核苷酸 350 上不同(A/G)。此差异导致密码子由 Ser 改变为 Asn。

在 2005 年 4 月 4 日用"非冗余 GenBank CDS 翻译+PDB+SwissProt+PIR+PRF, 不含环境样品"数据库通过 BLASTP 分析编码序列(SEQ ID NO: 3), 没有过滤。SEQ ID NO: 3 与最接近数据库匹配在氨基酸 117 上不同, SEQ ID NO: 3 含有 Asn 残基而非 Ser。最高命中是 CAA84792.1(SEQ ID NO: 10)

```

>gi|527444|emb|CAA84792.1|表面蛋白 S[乙型肝炎病毒]
gi|7429123|pir|JQ1575 主要表面抗原-乙型肝炎病毒
长度=400
评分=494 位(1271), 预计值=e-139
相同性=225/226(99%), 阳性=226/226 (100%)

```

查询: 1 MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPOSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTS NH 60
 MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPOSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTS NH
 主题: 175 MENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPOSLDSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTS NH 234

查询: 61 SPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFI LLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTT TGP 120
 SPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFI LLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTT +TGP
 主题: 235 SPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFLFI LLLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTT S TGP 294

查询: 121 CKTCTTPAQNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAF AKYLWEWASVRFSWLSLLVPFV 180
 CKTCTTPAQNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAF AKYLWEWASVRFSWLSLLVPFV
 主题: 295 CKTCTTPAQNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAF AKYLWEWASVRFSWLSLLVPFV 354

查询: 181 QWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFIPLLP IFFCLWVYI 226 SEQ ID NO: 3
 QWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFIPLLP IFFCLWVYI
 主题: 355 QWFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPFIPLLP IFFCLWVYI 400 SEQ ID NO: 10

ARG3 下游序列(SEQ ID NO: 8)的 BLASTN 分析揭示出与数据库条目 M28301.1 100%匹配, 然而是从 SEQ ID NO: 8 的核苷酸 7 开始的 683 个核苷酸的重叠。这两个序列(包括 SEQ ID NO: 8 的 5'端的 7 个核苷酸)的 CLUSTALW 比对见下:

```

      10      20      30      40      50      60      70
      |      |      |      |      |      |      |
SEQID7  AGAATTTGCGAAACAGGCCAAGCTGAAACAATTCAAAGGTTTTCAAATCAATCAAGAACTTGTCTCTGTG
SEQID8  CGAATT-----CCAAGCTGAAACAATTCAAAGGTTTTCAAATCAATCAAGAACTTGTCTCTGTG
      *****
      80      90      100     110     120     130     140
      |      |      |      |      |      |      |
SEQID7  GCTGATCCAAACTACAAATTTATGCATTGTCTGCCAAGACATCAAGAAGAAGTTAGTGATGATGTCCTTTT
SEQID8  GCTGATCCAAACTACAAATTTATGCATTGTCTGCCAAGACATCAAGAAGAAGTTAGTGATGATGTCCTTTT
      *****
      150     160     170     180     190     200     210
      |      |      |      |      |      |      |
SEQID7  ATGGAGAGCATTCCATAGTCTTTGAAGAAGCAGAAAACAGATTATATGCAGCTATGTCTGCCATTGATAT
SEQID8  ATGGAGAGCATTCCATAGTCTTTGAAGAAGCAGAAAACAGATTATATGCAGCTATGTCTGCCATTGATAT
      *****
      220     230     240     250     260     270     280
      |      |      |      |      |      |      |
SEQID7  CTTTGTTAATAATAAAGGTAATTTCAAGGACTTGAAATAATCCTTCTTTCGTGTTCTTAATAACTAATAT
SEQID8  CTTTGTTAATAATAAAGGTAATTTCAAGGACTTGAAATAATCCTTCTTTCGTGTTCTTAATAACTAATAT
      *****
      290     300     310     320     330     340     350
      |      |      |      |      |      |      |
SEQID7  ATAAATACAGATATAGATGCATGAATAATGATATACATTGATTATTTTGCAATGTC AATTA AAAAAAAAAA
SEQID8  ATAAATACAGATATAGATGCATGAATAATGATATACATTGATTATTTTGCAATGTC AATTA AAAAAAAAAA
      *****
      360     370     380     390     400     410     420
      |      |      |      |      |      |      |
SEQID7  AATGTTAGTAAAACATGTTTACATCCAAGCAAATAAAGCACTTGGTTAAACGAAATTAACGTTTTTAAG
SEQID8  AATGTTAGTAAAACATGTTTACATCCAAGCAAATAAAGCACTTGGTTAAACGAAATTAACGTTTTTAAG
      *****
      430     440     450     460     470     480     490
      |      |      |      |      |      |      |
SEQID7  ACAGCCAGACCGCGTCTAAAAATTTAAATATACACTGCCAACAAATTCCTTCGAGTTGTCCAATTTTAC
SEQID8  ACAGCCAGACCGCGTCTAAAAATTTAAATATACACTGCCAACAAATTCCTTCGAGTTGTCCAATTTTAC
      *****
      500     510     520     530     540     550     560
      |      |      |      |      |      |      |
SEQID7  CACTTTTATATTTTCATCAACTTCAGCAGATTCAACCTTCTCACATAGAACATTGGAATAAACAGCCTTA
SEQID8  CACTTTTATATTTTCATCAACTTCAGCAGATTCAACCTTCTCACATAGAACATTGGAATAAACAGCCTTA
      *****
      570     580     590     600     610     620     630
      |      |      |      |      |      |      |
SEQID7  ACACCACTTTCAAGTTGCACAGCGTAATATGAGGAATTTTGTTTGACAACACAACCCTTAATTTTCT
SEQID8  ACACCACTTTCAAGTTGCACAGCGTAATATGAGGAATTTTGTTTGACAACACAACCCTTAATTTTCT
      *****
      640     650     660     670     680     690     700
      |      |      |      |      |      |      |
SEQID7  CATTTGTTTCATCAATTATGCATCCATCTTTATCTTTAGACAGTTCCACTACAATAGCAATAGTTTTTTC
SEQID8  CATTTGTTTCATCAATTATGCATCCATCTTTATCTTTAGACAGTTCCACTACAATAGCAATAGTTTTTTC
      *****

```

HBsAg 表达和吸附

用该质粒转化酿酒酵母 *leu2-3 leu2-112 his3 can1-11* 菌株(DC5)。用含有纯化氨基酸(但不含亮氨酸)、维生素和合适盐的合成培养基培养该酵母。通过包括细胞回收、沉淀、超滤、凝胶渗透、离子交换、超速离心和脱盐的方法纯化表达的 HBsAg。

纯化抗原是非-糖基化抗原,可以观察到是基本呈球形的颗粒(平均直径~20nm)。

将磷酸铝在等渗盐水中的悬液与纯化的 HBsAg 浓缩物混合。将 pH 调整到 5.2-6.0 后,使该混合物在室温下搅拌 1 天。在这段时间抗原吸附于佐剂。

单价疫苗

为了制备单价疫苗,将 3D-MPL 加入吸附的 HBsAg 中,用注射用水和无菌盐水稀释,使 HBsAg 终浓度为 20 µg/ml。然后,将大量产生的疫苗包装到药品或一次性注射器中,形成单个剂量。

多价疫苗

为了制备组合疫苗,从德国马尔堡的 Chiron Behring 获得 DTPw 抗原混合物。将此混合物与吸附的 HBsAg 混合,得到四价疫苗产物。此四价产物本身即可使用,或者可用于重建(a)吸附于磷酸铝佐剂的冻干 Hib-T 偶联物,或(b)Hib、MenA 和 MenC 的冻干偶联物的三价混合物。

应理解,仅以举例的方式描述了本发明,可在本发明的范围和构思内进行修改。

参考文献(将其内容纳入本文作参考)

- [1] Vaccines(疫苗)(Plotkin 和 Orenstein 编),第 4 版,2004,ISBN: 0-7216-9688-0。
- [2] Desombere 等(2002) *Vaccine* 20:2597-602。
- [3] Cooper 等(2004) *J Clin Immunol* 24:693-701。
- [4] Pasek 等(1979) *Nature* 282:575-9。
- [5] MacKay 等(1981) *PNAS USA* 78:4510-4。
- [6] Fujisawa 等(1983) *Nucleic Acids Res* 11:4645-54。
- [7] Dubois 等(1980) *PNAS USA* 77:4549-53。
- [8] Hirschman 等(1980) *PNAS USA* 77:5507-11。
- [9] Liu 等(1982) *DNA* 1:213-21。

- [10] Valenzuela 等(1982) *Nature* 298:347-50。
- [11] Harford 等(1983) *Dev Biol Stand* 54: 125-30。
- [12] McAleer 等(1984) *Nature* 307:178-80。
- [13] Smith 等(2002) *Biotechnol Prog* 18:538-50。
- [14] Shulga 等(2004) *Biochemistry (Mosc)* 69:1158-64。
- [15] Valdes 等(2004) *BBRC* 310:742-7。
- [16] Smith 等(2003) *Vaccine* 21:4011-21。
- [17] Sojikul 等(2003) *PNAS USA* 100:2209-14。
- [18] Smith 等(2002) *Biotechnol Bioeng* 80:812-22。
- [19] Kong 等(2001) *PNAS USA* 98:11539-44。
- [20] Richter 等(2000) *Nature Biotechnol* 18:1167-71。
- [21] Kapusta 等(1999) *FASEB J* 13:1796-9。
- [22] Mason 等(1992) *PNAS USA* 89: 11745-9。
- [23] Huang 等(2005) *Vaccine* 23:1851-8。
- [24] Thanvala 等(2005) *PNAS USA* 102:3378-82。
- [25] Valdes 等(2003) *BBRC* 310:742-7。
- [26] Hardy 等(2000) *J Biotechnol* 17:157-67。
- [27] Lepetec 等(2003) *Vaccine* 21:4481-5。
- [28] Heijtkink 等(2002) *Vaccine* 20:2191-6。
- [29] Vanlandschoot 等(2003) *J Med Virol* 70:513-9。
- [30] Desombere 等(1998) *Tissue Antigens* 51:593-604。
- [31] McDermott 等(1997) *Tissue Antigens* 50:8-14。
- [32] Blitz 等(1998) *J Clin Microbiol* 36:648-51。
- [33] Teles 等(2002) *J Med Virol* 68:41-9。
- [34] *MMWR* April 12, 1996 / 45(14);285-9。
- [35] Teles 等(1999) *Artif Organs* 23): 1074-8。
- [36] Lewis-Ximeneza 等(2001) *Nephron* 87:19-26。
- [37] Holland 和 Holland (1979) *J. Biol. Chem.* 254:5466-74。
- [38] Holland 和 Holland (1979) *J. Biol. Chem.* 254:9839-45。
- [39] Holland 和 Holland (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2596-605。
- [40] Holland 等(1983) *J. Biol. Chem.* 258:5291-9。

- [41] 欧洲专利 0460716; 美国专利 5,349,059。
- [42] Crabeel 等(1983) Proc Natl Acad Sci USA 78:5026-30。
- [43] Cabezón 等(1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:6594-8。
- [44] van der Straten 等(1986) DNA 5:129-36。
- [45] Harford 等(1987) Postgraduate Medical Journal 63(增刊 2):65-70。
- [46] Ludwig 和 Bruschi (1991) Plasmid 25:81-95。
- [47] 美国专利 4,683,294。
- [48] WO03/066094。
- [49] Kandimalla 等(2003) Nucleic Acids Research 31:2393-2400。
- [50] WO02/26757。
- [51] WO99/62923。
- [52] Krieg (2003) Nature Medicine 9:831-835。
- [53] McCluskie 等 (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32:179-185。
- [54] WO98/40100。
- [55] 美国专利 6,207,646。
- [56] 美国专利 6,239,116。
- [57] 美国专利 6,429,199。
- [58] Kandimalla 等(2003) Biochemical Society Transactions 31(第3部分): 654-658。
- [59] Blackwell 等(2003) J Immunol 170:4061-4068。
- [60] Krieg (2002) Trends Immunol 23:64-65。
- [61] WO01/95935。
- [62] Kandimalla 等(2003) BBRC 306:948-953。
- [63] Bhagat 等(2003) BBRC 300:853-861。
- [64] WO03/035836。
- [65] Johnson 等(1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278。
- [66] Evans 等(2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229。
- [67] Baldrige 等(2002) J Endotoxin Res 8:453-8。
- [68] Persing 等(2002) Trends Immunol 10:S32-S37。
- [69] Boland 等(2004) Vaccine 23:316-20。
- [70] 美国专利 6,013,264。

- [71] 英国专利申请 2220211。
- [72] Myers 等(1990) Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions(内毒素反应的细胞和分子机理), 第 145-156 页。
- [73] Ulrich (2000) Vaccine Adjuvants : Preparation Methods and Research Protocols(疫苗佐剂: 制备方法和研究方法)(Methods in Molecular Medicine series(分子药物方法系列), 第 42 卷)的第 16 章(第 273-282 页)。ISBN: 1-59259-083-7, O'Hagan 编。
- [74] Johnson 等(1999) J Med Chem 42:4640-9。
- [75] Baldrick 等(2002) Regulatory Toxicol Pharmacol 35:398-413。
- [76] WO 94/21292。
- [77] Sesardic 等(2001) Biologicals 29:107-22。
- [78] NJJBSC 码: 98/560。
- [79] WHO 的 The immunological basis for immunization series(免疫的免疫学基础系列)的模块 1(Galazka)。
- [80] NJESC 码: 69/017。
- [81] NBBSC 码: DJPT。
- [82] Sesardic 等(2002) Biologicals 30:49-68。
- [83] NJJBSC 码: 98/552。
- [84] NJJBSC 码: TEFT。
- [85] NJJBSC 码: 66/303。
- [86] Rappuoli 等(1991) TIBTECH 9:232-238。
- [87] WO96/40242。
- [88] WHO 的 The immunological basis for immunization series(免疫的免疫学基础系列)的模块 6(Robertson)
- [89] Jones (2001) Curr Opin Investig Drugs 2:47-49。
- [90] Costantino 等(1992) Vaccine 10:691-8。
- [91] Lieberman 等(1996) JAMA 275:1499-503。
- [92] WO02/058737。
- [93] WO03/007985。
- [94] Rennels 等(2002) Pediatr Infect Dis J 21:978-979。
- [95] Campbell 等(2002) J Infect Dis 186: 1848-1851。

- [96] W.H.O. *Tech. Rep. Ser.* 594:51, 1976。
- [97] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332。
- [98] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v。
- [99] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207。
- [100] Zielen 等(2000) *Infect. Immun.* 68:1435-1440。
- [101] Darkes 和 Plosker (2002) *Paediatr Drugs* 4:609-630。
- [102] Berkower 等(2004) *Virology* 321(1):75-86。
- [103] Eckhart 等(1996) *J Gen Virol* 77:2001-8。
- [104] von Brunn 等(1991) *Vaccine* 9(7):477-84。
- [105] Vreden 等(1991) *Am J Trop Med Hyg* 45(5):533-8。
- [106] Moelans 等(1995) *Mol Biochem Parasitol* 72(1-2): 179-92。
- [107] Stoute 等(1997) *N Engl J Med* 336(2):86-91。
- [108] Wunderlich 和 del Portillo (2000) *Mol Med* 6(3):238-45。
- [109] 美国专利 5,928,902
- [110] WO93/10152。
- [111] *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*(疫苗设计: 亚基和佐剂方法)(Powell 和 Newman 编) Plenum Press 1995(ISBN 0-306-44867-X)。
- [112] EP-A-0833662。
- [113] 美国专利 6,756,040。
- [114] WO02/00249。
- [115] Nony 等(2001) *Vaccine* 27:3645-51。
- [116] *Conjugate Vaccine*(偶联疫苗)(Cruse 等) ISBN 3805549326, 具体是第 10 卷: 48-114。
- [117] Anonymous (Jan 2002) *Research Disclosure*, 453077。
- [118] Anderson (1983) *Infect Immun* 39(1):233-238。
- [119] Anderson 等(1985) *J Clin Invest* 76(1):52-59。
- [120] EP-A-0372501。
- [121] EP-A-0378881。
- [122] EP-A-0427347。
- [123] WO93/17712
- [124] WO94/03208。

-
- [125] WO98/58668。
[126] EP-A-0471177。
[127] WO91/01146
[128] Falugi 等(2001) Eur J Immunol 31:3816-24。
[129] Baraldo 等(2004) Infect Immun 72:4884-87。
[130] EP-A-0594610。
[131] WO00/56360。
[132] WO02/091998。
[133] Kuo 等(1995) Infect Immun 63:2706-13。
[134] WO01/72337
[135] WO00/61761。
[136] WO2004/041157。
[137] WO91/18926 和美国专利 5858677、5888517、5989828、6025484 和 6139846
[138] Janson 等(1991) Infect Immun 59: 119-25。
[139] WO00/56360。

- <110> 启龙公司(CHIRON CORPORATION)
 <120> 表达用于制备疫苗的乙型肝炎病毒表面抗原
 <130> PP028084.0002
 <140> PCT/US2006/014240
 <141> 2006-04-14
 <150> US 60/672838
 <151> 2005-04-18
 <160> 15
 <170> SeqWin99, version 1.02
 <210> 1
 <211> 1060
 <212> DNA
 <213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)

<400> 1
 aagcttaccac gttctcacac ggaacaccac taatggacac acattcgaaa tactttgacc 60
 ctatnttcga ggacctgtgc accttgagcc caagagagcc aagatttaaa tttcctatg 120
 acttgatgca aattcccaaa gctaataaca tgcaagacac gtacggtaa gaagacatat 180
 ttgacctctt aacaggttca gacgcgact cctcatcagt aagaccggt gaaaagaact 240
 tacctgaaaa aaacgaatat atactagcgt tgaatgtag cgtcaacaac aagaagtta 300
 ctgacgcgga ggccaaggca aaaagattcc ttgattacgt aaggaggta gaatcatttt 360
 gaataaaaaa cacgcttttt cagttcgagt ttatcattat caaactgcc atttcaaga 420
 atacgtaaat aattaatagt agtgattttc ctaactttat ttagtcaaaa aattagcctt 480
 ttaattctgc tgaaccggt acatgcccaa aatagggggc gggttacaca gaatatata 540
 catcgtaggt gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc actaaatata atggagcccg 600
 ctttttaagc tggcatccag aaaaaaaaaag aatcccagca ccaaaatatt gttttcttca 660
 ccaaccatca gttcataggt ccattctctt agcgcaacta cagagaacag gggcacaac 720
 aggcaaaaaa cgggcacaac ctcaatggag tgatgcaacc tgcctggagt aatgatgac 780
 acaaggcaat tgaccacgc atgtatctat ctcatcttct tacaccttct attaccttct 840
 gctctctctg atttggaaaa agctgaaaaa aaagggtgaa accagttccc tgaattatt 900
 cccctacttg actaataagt atataagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaatct 960
 atttcttaaa cttcttaaat tctactttta tagttagct ttttttagt tttaaaacac 1020
 caagaactta gtttcgaata aacacacata aacaaacaaa 1060

- <210> 2
 <211> 1063
 <212> DNA
 <213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)

<400> 2
 aagcttaccac gttctcacac ggaacaccac taatggacac acattcgaaa tactttgacc 60
 ctatnttcga ggacctgtgc accttgagcc caagagagcc aagatttaaa tttcctatg 120
 acttgatgca aattcccaaa gctaataaca tgcaagacac gtacggtaa gaagacatat 180
 ttgacctctt aacaggttca gacgcgact cctcatcagt aagaccggt gaaaagaact 240
 tacctgaaaa aaacgaatat atactagcgt tgaatgtag cgtcaacaac aagaagtta 300
 ctgacgcgga ggccaaggca aaaagattcc ttgattacgt aaggaggta gaatcatttt 360
 gaataaaaaa cacgcttttt cagttcgagt ttatcattat caaactgcc atttcaaga 420
 atacgtaaat aattaatagt agtgattttc ctaactttat ttagtcaaaa aattagcctt 480
 ttaattctgc tgaaccggt acatgcccaa aatagggggc gggttacaca gaatatata 540
 catcgtaggt gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc actaaatata atggagcccg 600
 ctttttaagc tggcatccag aaaaaaaaaag aatcccagca ccaaaatatt gttttcttca 660
 ccaaccatca gttcataggt ccattctctt agcgcaacta cagagaacag gggcacaac 720
 aggcaaaaaa cgggcacaac ctcaatggag tgatgcaacc tgcctggagt aatgatgac 780
 acaaggcaat tgaccacgc atgtatctat ctcatcttct tacaccttct attaccttct 840
 gctctctctg atttggaaaa agctgaaaaa aaagggtgaa accagttccc tgaattatt 900
 cccctacttg actaataagt atataagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaatct 960
 atttcttaaa cttcttaaat tctactttta tagttagct ttttttagt tttaaaacac 1020
 caagaactta gtttcgaata aacacacata aacaaacaaa atg 1063

- <210> 3
 <211> 226

<212> PRT
 <213> 乙型肝炎病毒

 <400> 3
 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 Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro 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 Ile 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 Thr Thr Thr Asn Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala
 115 120 125
 Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp
 130 135 140
 Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys
 145 150 155 160
 Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val 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 Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
 195 200 205
 Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
 210 215 220

 Tyr Ile
 225

<210> 4
 <211> 678
 <212> DNA
 <213> 乙型肝炎病毒

 <400> 4
 atggagaaca tcacatcagg attcctagga ccctgctcg tgttacaggc ggggttttc 60
 ttgttgacaa gaatcctcac aataccgac agtctagact cgtgggtggac ttctctcaat 120
 ttcttagggg gatcaccctg gtgtcttggc caaaattcgc agtccccaac ctccaatcac 180
 tcaccaacct cctgtectcc aatttgtcct ggttatcgct ggatgtgtct gcggcgtttt 240
 atcatatttc tcttcatect gctgctatgc ctcacttctt tattggttct tctggattat 300
 caaggtatgt tgcccgtttg tcctetaatt ccaggatcaa caacaacaa tacgggacca 360
 tgcaaaacct gcacgactcc tgctcaaggc aactctatgt ttcctcatg ttgctgtaca 420
 aaacctacgg atggaaattg cacctgtatt cccatcccat cgtcctgggc tttcgcaaaa 480
 tacctatggg agtgggcctc agtccgtttc tcttgctca gttactagt gccatttgtt 540
 cagtggttcg tagggctttc ccccactgtt tggctttcag ctatatggat gatgtggat 600
 tgggggcaa gtctgtacag catcgtgagt cctttatac cgctgttacc aattttcttt 660
 tgtctctggg tatacatt 678

 <210> 5
 <211> 1061

<212>	DNA					
<213>	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)					
<400>	5					
	aagcttacca	gttctcacac	ggaacaccac	taatggacac	aaattcgaaa	tactttgacc 60
	ctatitttga	ggaccttgtc	accttgagcc	caagagagcc	aagatttaaa	tttcctatg 120
	acttgatgca	aattcccaaa	gctaataaca	tgcaagacac	gtacggtcaa	gaagacatat 180
	ttgacctctt	aactgggttca	gacgcgactg	cctcatcagt	aagaccggtt	gaaaagaact 240
	tacctgaaaa	aaacgaatat	atactagcgt	tgaatgttag	cgtaacaac	aagaagttaa 300
	atgacgcgga	ggccaaggca	aaaagattcc	ttgattacgt	aaggagttta	gaatcatttt 360
	gaataaaaaa	cacgcttttt	cagttcagtg	ttatcattat	caatactgcc	attcaaaga 420
	atacgtaaat	aattaatagt	agtgattttc	ctaactttat	ttagtcaaaa	attagccttt 480
	taattctgct	gtaaccgta	catgccc aaa	atagggggcg	ggttacacag	aatatataac 540
	atcgtaggtg	tctgggtgaa	cagtttatcc	ctggcatcca	ctaaatataa	tggagctcgc 600
	ttttaagctg	gcatccagaa	aaaaaaagaa	tcccagcacc	aaaatattgt	ttctttcacc 660
	aaccatcagt	tcataggtcc	attctcttag	cgcaactaca	gagaacaggg	gcacaaacag 720
	gcaaaaaaacg	ggcacaacct	caatggagtg	atgcaacctg	cctggagtaa	atgatgacac 780
	aaggcaattg	accacgcat	gtatctatct	cattttctta	caccttctat	taccttctgc 840
	tctctctgat	ttggaaaaag	ctgaaaaaaa	aggttgaaac	cagttccctg	aaattattcc 900
	cctacttgac	taataagtat	ataaagacgg	taggtattga	ttgtaattct	gtaaatctat 960
	ttcttaaaact	tcttaaatc	tacttttata	gtttagcttt	tttttagttt	taaaacacca 1020
	agaacttagt	ttcgaataaa	cacacataaa	caaacaagct	t	1061
<210>	6					
<211>	450					
<212>	DNA					
<213>	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)					
<400>	6					
	tccttctttc	gtgttcttaa	taactaatat	ataaatacag	atatagatgc	atgaataatg 60
	atatacattg	attatitttg	aatgtcaatt	aaaaaaaaa	aatgttagta	aaactatggt 120
	acattccaag	caataaaagc	acttgggtta	acgaaattaa	cgtttttaag	acagccagac 180
	cgcggtctaa	aaatttaaat	atacactgcc	aacaaattcc	ttcgagttgt	ccaatttcac 240
	cacttttata	ttttcatcaa	cttcagcaga	ttcaaccttc	tcacatagaa	catttgaata 300
	aacagcctta	acaccacttt	caagtttgca	cagcgttaata	tgaggaatth	tgttttgaca 360
	acacaacctt	ttaattttct	cattgttttc	atcaattatg	catccatctt	tatctttaga 420
	cagttccact	acaatagcaa	tagttttttc			450
<210>	7					
<211>	700					
<212>	DNA					
<213>	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)					
<400>	7					
	agaatttgcg	aaacaggcca	agctgaaaca	attcaaaggt	tttcaaatca	atcaagaact 60
	tgctctctgtg	gctgatccaa	actacaaatt	tatgcattgt	ctgccaagac	atcaagaaga 120
	agttagtgat	gatgtctttt	atggagagca	ttccatagtc	tttgaagaag	cagaaaacag 180
	attatattgca	gctatgtctg	ccattgatat	cattgttaat	aataaaaggta	atttcaagga 240
	cttgaataaa	tccttctttc	gtgttcttaa	taactaatat	ataaatacag	atatagatgc 300
	atgaataatg	atatacattg	attatitttg	aatgtcaatt	aaaaaaaaa	aatgttagta 360
	aaactatggt	acattccaag	caataaaagc	acttgggtta	acgaaattaa	cgtttttaag 420
	acagccagac	cgcggtctaa	aaatttaaat	atacactgcc	aacaaattcc	ttcgagttgt 480
	ccaatttcac	cacttttata	ttttcatcaa	cttcagcaga	ttcaaccttc	tcacatagaa 540
	catttgaata	aacagcctta	acaccacttt	caagtttgca	cagcgttaata	tgaggaatth 600
	tgttttgaca	acacaacctt	ttaattttct	cattgttttc	atcaattatg	catccatctt 660
	tatctttaga	cagttccact	acaatagcaa	tagttttttc		700
<210>	8					
<211>	689					
<212>	DNA					
<213>	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)					
<400>	8					
	cgaattccaa	gctgaaacaa	ttcaaaggtt	ttcaaatcaa	tcaagaactt	gtctctgtgg 60
	ctgatccaaa	ctacaaatth	atgcattgtc	tgccaagaca	tcaagaagaa	gttagtgatg 120
	atgtctttta	tggagagcat	tccatagctc	ttgaagaagc	agaaaacaga	ttatatgcag 180
	ctatgtctgc	cattgatatac	tttgtaata	ataaaggtaa	tttcaaggac	ttgaaataat 240
	ccttctttcg	tgttcttaat	aactaatata	taaatacaga	tatagatgca	tgaaataatga 300
	tatacattga	ttatitttgca	atgtcaatta	aaaaaaaaa	atgttagtaa	aactatgta 360
	cattccaagc	aaataaagca	cttgggttaa	cgaaattaac	gtttttaaga	cagccagacc 420

gcggtctaaa aatttaata tacactgcca acaaattcct tcgagttgtc caatttcacc 480
 acttttatat ttcatcaac ttcagcagat tcaaccttct cacatagaac attggaataa 540
 acagccitaa caccactttc aagtttgac agcgtaatat gaggaatfff gttttgacaa 600
 cacaaccctt taattttctc attgttttca tcaattatgc atccatcttt atcttttagac 660
 agttccacta caatagaat agttttttc 689

<210> 9
 <211> 692
 <212> DNA
 <213> 酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)

<400> 9
 taacgaattc caagctgaaa caattcaaag gttttcaaat caatcaagaa cttgtctctg 60
 tggctgatcc aactacaaa tttatgcatt gtctgccaag acatcaagaa gaagttagtg 120
 atgatgtctt ttatggagag cattccatag tctttgaaga agcagaaaac agatttatatg 180
 cagctatgtc tgccattgat atctttgtta ataataaagg taatttcaag gacttgaat 240
 aatccttctt tcgtgttctt aataactaat atataaatat agatatagat gcatgaataa 300
 tgatatacat tgattatttt gcaatgtcaa ttaaaaaaaa aaaatgttag taaaactatg 360
 ttacattcca agcaataaaa gcacttggtt aaacgaaatt aacgttttta agacagccag 420
 accgcggtct aaaaatttaa atataactg ccaacaaatt ccttcgagtt gtccaatttc 480
 accactttta tattttcatc aacttcagca gattcaacct tctcacatag aacattggaa 540
 taaacagcct taacaccact ttcaagtttg cacagcgtaa tatgaggaa tttgttttga 600
 caacacaacc cttaattttt ctcatgtttt tcatcaatta tgcattccatc tttatcttta 660
 gacagttcca ctacaatagc aatagttttt tc 689

<210> 10
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> 乙型肝炎病毒

<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 Asn Phe Leu Gly Gly Ser Pro 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 Ile 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 Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala
 115 120 125
 Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp
 130 135 140
 Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys
 145 150 155 160
 Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val 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 Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
 195 200 205

Val	Ser	Pro	Phe	Ile	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Cys	Leu	Trp	Val
	210					215					220				
Tyr	Ile														
225															
<210>	11														
<211>	6														
<212>	DNA														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	CpG 佐剂序列														
<400>	11														
gtcgtt															6
<210>	12														
<211>	6														
<212>	DNA														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	CpG 佐剂序列														
<400>	12														
ttcgtt															6
<210>	13														
<211>	2430														
<212>	DNA														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	CpG 佐剂序列														
<400>	13														
aagcttacca	gttctcacac	ggaacaccac	taatggacac	acattcgaaa	tactttgacc										60
ctattttcga	ggaccttgtc	accttgagcc	caagagagcc	aagatthaaa	ttttcctatg										120
acttgatgca	aattcccaaa	gctaataaca	tgcaagacac	gtacgggtcaa	gaagacatat										180
ttgacctctt	aacagggtca	gacgcgactg	cctcatcagt	aagaccggtt	gaaaagaact										240
tacctgaaaa	aaacgaatat	atactagcgt	tgaatgtag	cgtaacaac	aagaagtta										300
ctgacgcgga	ggccaaggca	aaaagattcc	ttgattacgt	aagggagtta	gaatcatttt										360
gaataaaaaa	cacgcttttt	cagttcgagt	ttatcattat	caatactgcc	atttcaaaga										420
atacgtaaat	aattaatagt	agtgatthtc	ctaactttat	ttagtcaaaa	aattagcctt										480
ttaattctgc	tgtaaccctg	acatgcccaa	aatagggggc	gggttacaca	gaatatataa										540
catcgtaggt	gtctgggtga	acagtttatt	cctggcatcc	actaaatata	atggagcccg										600
ctttttaagc	tggcatccag	aaaaaaaaag	aatcccagca	ccaaaatatt	gttttcttca										660
ccaaccatca	gttcataggt	ccattctctt	agcgcacta	cagagaacag	gggcacaaac										720
aggcaaaaaa	cgggcacaa	ctcaatggag	tgatgcaacc	tgcttgaggt	aaatgatgac										780
acaaggcaat	tgaccacgc	atgtatctat	ctcattttct	tacaccttct	attaccttct										840
gctctctctg	atthggaaaa	agctgaaaaa	aaaggttgaa	accagttccc	tgaattatt										900
cccctacttg	actaataagt	atataaagac	gtaggtatt	gattgtaatt	ctgtaaatct										960
atthcttaaa	cttcttaaat	tctactthta	tagttagtct	thththtagt	thththaac										1020
caagaactta	gtthcgaata	aacacacata	aacaaacaaa	atggagaaca	tcacatcagg										1080
atthcttagga	cccctgctcg	tgthtacaggc	gggtththtc	thgttgacaa	gaatctcac										1140
aataccgcag	agtctagact	cgtggtggac	thctctcaat	thcttagggg	gatcaccctg										1200
gtgtcttgcc	caaaattcgc	agthcccaac	ctccaatcac	thaccaacct	cctgtctctc										1260
aattthctcc	ggthtatcgt	ggatgtgtct	gcggcgthth	atcatatthc	ththctctct										1320
gctgctatgc	ctcatcttct	tattggttct	thctggattat	caaggtatgt	thcccgtttg										1380
thctcttaatt	ccaggatcaa	caacaaccaa	thcgggacca	thcaaaacct	gcacgactcc										1440
thctcaaggc	aactctatgt	thccctcatg	thctgtgaca	aaacctacgg	atggaaattg										1500
cacctgtatt	cccattccat	cgthctgggc	ththcgaaaa	thacctatggg	agthggcctc										1560
agthccgtthc	ththggctca	gththactagt	gcccattgth	cagthgthctg	thaggctthc										1620
cccactgtth	thggctthcag	ctatattggt	gathgtggtat	thggggccaa	gthctgtacag										1680
catcgtaggt	cccctttatac	cgctgttacc	aaththctth	thctctctggg	tatacattta										1740
acgaattcca	agctgaaaca	atthcaaaggt	ththcaaata	atcaagaact	thctctctgtg										1800
gctgatccaa	actacaaatt	tatgcatgtg	ctgccaagac	atcaagaaga	agthtagtgat										1860
gathgtctth	atggagagca	thccatagth	ththgaagaag	cagaaaacag	atthtatgca										1920
gctatgtctg	ccattgatat	ctthgttaatt	aataaaggta	atthcaagga	ctthgaaata										1980

tccttctttc gtgttcttaa taactaatat ataaatacag atatagatgc atgaataatg 2040
 atatacattg attattttgc aatgtcaatt aaaaaaaaaa aatgttagta aaactatgtt 2100
 acattccaag caaataaagc acttggttaa acgaaattaa cgtttttaag acagccagac 2160
 cgcgggtctaa aaattttaat atacactgcc aacaaattcc ttcgagttgt ccaatttcac 2220
 cacttttata ttttcatcaa cttcagcaga ttcaaccttc tcacatagaa cattggaata 2280
 aacagcctta acaccacttt caagtttgca cagcgaata tgaggaattt tgttttgaca 2340
 acacaacctt ttaattttct cattgttttc atcaattatg catccatctt tatctttaga 2400
 cagttccact acaatageaa tagttttttc 2430

<210> 14
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)

<400> 14
 Asn Ala Asn Pro
 1

<210> 15
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> RTS 抗原

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

