



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1440296 B

(45) 授权公告日 2012.04.11

---

(21) 申请号 01812070.9 *A61P 31/14* (2006.01)

(22) 申请日 2001.06.27 (56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日 CN 1238011 A, 1999.12.08, 全文。  
2002.12.30 审查员 吴永庆

(86) PCT申请的申请数据  
PCT/FR2001/002042 2001.06.27

(87) PCT申请的公布数据  
W002/00251 FR 2002.01.03

(73) 专利权人 梅瑞尔公司  
地址 法国里昂

(72) 发明人 A·金 A·布尔曼 J-C·奥多奈特  
M·鲁姆巴德

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038  
代理人 唐伟杰

(51) Int. Cl.  
*A61K 39/135* (2006.01)  
*C07K 14/09* (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 23 页  
序列表 18 页 附图 4 页

---

(54) 发明名称  
抗口蹄疫疫苗

(57) 摘要

本发明涉及抗口蹄疫疫苗,用有效量口蹄疫病毒空衣壳作为抗原,所述空衣壳通过在真核细胞中表达编码衣壳的口蹄疫病毒基因组 P1 区域 cDNA 及编码 3C 蛋白酶的口蹄疫病毒基因组区域的 cDNA 而获得,疫苗进一步包括兽医学中药学可接受的载体或赋形剂。本发明也涉及在序列 VP2 中突变插入(引入半胱氨酸),由此稳定了空衣壳和由此得到的病毒。

1. 抗口蹄疫疫苗,包含有效量的抗原或含有编码所述抗原的 cDNA 的表达载体和适于兽医用的载体或赋形剂,其中所述抗原是通过在真核细胞中表达编码口蹄疫病毒经修饰的 P1 区及 3C 蛋白酶的 cDNA 而获得的口蹄疫病毒空衣壳,其中所述经修饰的 P1 的氨基酸序列是 SEQ ID NO:38 第 2-737 位氨基酸的序列,但 SEQ ID NO:38 第 179 位氨基酸用半胱氨酸替代,这形成使所述空衣壳热稳定的非天然存在的 S-S 键,其中所述 3C 蛋白酶的氨基酸序列是 SEQ ID NO:38 第 913 至 1126 位氨基酸的序列。

2. 权利要求 1 的疫苗,其中编码 P1 的 cDNA 还编码口蹄疫病毒 A10 亚型 2A 的全部或部分。

3. 权利要求 1 的疫苗,其中编码 3C 的 cDNA 还编码口蹄疫病毒 A10 亚型蛋白质 3B 的全部或部分。

4. 权利要求 1 的疫苗,其中空衣壳在疫苗中以有效量作为亚单位存在。

5. 权利要求 4 的疫苗,其中在诱导型启动子或病毒来源的晚期启动子控制下,由表达载体在真核细胞中体外表达所述 cDNA 而获得亚单位形式的空衣壳。

6. 权利要求 5 的疫苗,其中该启动子选自 T7 噬菌体启动子,热休克启动子或病毒来源的晚期启动子。

7. 权利要求 6 的疫苗,其中该启动子是 T7 噬菌体启动子,而且在存在 T7 聚合酶表达的情况下,通过所述 cDNA 的表达获得所述亚单位形式的空衣壳。

8. 权利要求 5 的疫苗,其中表达载体选自病毒载体和质粒载体,或所述 cDNA 整合进真核细胞中。

9. 权利要求 8 的疫苗,其中病毒载体是痘病毒载体,而且病毒来源的晚期启动子选自痘苗病毒的 P11K,痘苗病毒的 P28K 及牛痘病毒的 P160K ATI。

10. 权利要求 1 的疫苗,其中真核细胞来自选自 BHK-21,CHO,COS,RK13,Vero,MDBK 和 PK15 细胞的细胞系。

11. 权利要求 1 的疫苗,其中它是用保存空衣壳的介质配制的。

12. 权利要求 1 的疫苗,其还含有佐剂。

13. 权利要求 12 的疫苗,其中佐剂选自氢氧化铝,皂苷,阿夫立定,DDA,丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物,顺丁烯二酸酐和链烯基衍生物的聚合物,GM-CSF,水包油乳剂、油包水乳剂和水包油包水乳剂。

14. 权利要求 1 的疫苗,其中:该疫苗包括含有 cDNA 的表达载体,以在体内产生衣壳。

15. 权利要求 14 的疫苗,其中:载体是病毒载体或质粒载体。

16. 权利要求 15 的疫苗,其中:载体是病毒载体。

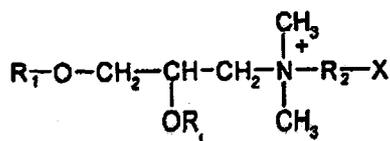
17. 权利要求 14 的疫苗,其中:所述 cDNA 在病毒来源的晚期启动子控制下由病毒载体表达。

18. 权利要求 17 的疫苗,其中:载体是痘病毒,病毒来源的晚期启动子选自痘苗病毒的 P11K,痘苗病毒的 P28K 及牛痘病毒的 P160KATI。

19. 权利要求 17 的疫苗,其中:所述 cDNA 在病毒来源或细胞来源的强早期启动子的控制下,由质粒载体表达。

20. 权利要求 19 的疫苗,其中:所述 cDNA 在选自 SV40 病毒早期启动子,劳斯肉瘤病毒 LTR 启动子,和细胞骨架基因启动子的启动子的控制下,由质粒载体表达。

21. 权利要求 1 的疫苗,其中 :用 9/1000NaCl 盐水溶液或磷酸缓冲液配制疫苗。
22. 权利要求 14 的疫苗,其还含有佐剂。
23. 权利要求 22 的疫苗,其中 :疫苗含有质粒载体,佐剂包含下式的含季铵盐的阳离子脂 :



其中,R1 是有 12 到 18 个碳原子的直链饱和或不饱和脂肪族基团,R2 是含有 2 或 3 个碳原子的另一脂肪族基团,X 表示羟基或氨基。

24. 权利要求 23 的疫苗,其中所述佐剂含有 DMRIE。
25. 权利要求 22 的疫苗,其中疫苗含有质粒载体,佐剂包含丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物,或者顺丁烯二酸酐和链烯基衍生物的聚合物。
26. 权利要求 22 的疫苗,其中佐剂含有 GM-CSF。
27. 权利要求 22 的疫苗,其中它含有可体内表达 GM-CSF 的载体。
28. 权利要求 8 的疫苗,其中病毒载体是痘苗病毒。
29. 权利要求 9 的疫苗,其中痘病毒载体是痘苗病毒载体。
30. 权利要求 16 的疫苗,其中 :病毒载体是选自痘苗病毒,禽痘,金丝雀痘,浣熊痘,猪痘和山羊痘的痘病毒。
31. 权利要求 30 的疫苗,其中 :痘病毒是禽痘。
32. 权利要求 30 的疫苗,其中 :痘病毒是金丝雀痘。
33. 权利要求 30 的疫苗,其中 :痘病毒是浣熊痘。
34. 权利要求 30 的疫苗,其中 :痘病毒是猪痘。
35. 权利要求 30 的疫苗,其中 :痘病毒是山羊痘。
36. 权利要求 16 的疫苗,其中 :病毒载体选自腺病毒和疱疹病毒。
37. 权利要求 19 的疫苗,其中所述序列的表达处在 CMV-IE 的早期启动子的控制之下。
38. 权利要求 20 的疫苗,其中所述细胞骨架基因启动子是肌纤维蛋白启动子或肌动蛋白启动子。
39. 权利要求 24 的疫苗,其中 DMRIE 与中性脂结合。
40. 权利要求 39 的疫苗,其中 DMRIE 与 DOPE 结合形成 DMRIE-DOPE。

## 抗口蹄疫疫苗

[0001] 发明领域

[0002] 本发明涉及抗口蹄疫疫苗,特别是改进它们的热稳定性。本发明也涉及制备这些疫苗的方法,抗原产生这些疫苗的用途,及用它们接种的方法。

[0003] 特别地,本发明也涉及同病毒天然序列比较,修饰的核苷酸序列(特别是cDNA)和氨基酸序列。本发明也涉及修饰的核苷酸序列的表达产物,及引入这些修饰的口蹄疫抗原和病毒。

### 背景技术

[0004] 口蹄疫是影响农畜最具毒性及传染性的疾病。在世界上许多国家,尤其是在非洲、亚洲和南美洲,这种疾病是地方性流行病。此外,不时出现流行性爆发。

[0005] 出现这种疾病的国家在感染牧群生产率损失,体重损失及奶产量损失方面可能有非常严重的经济后果,而且强加这些国家在贸易上禁运。

[0006] 抗这种疾病采取的措施在于严格实行进口限制、卫生控制及检疫,屠宰患病动物,及用灭活疫苗进行接种,该接种或是作为国家或地区范围内预防性措施,或是当流行性爆发出现时在发病区周围进行。

[0007] 这种疾病特征是短潜伏期、高传染特性及在口和蹄中形成溃疡,有时引起年幼动物死亡。口蹄疫影响大量动物物种,特别是牛、猪、绵羊及山羊。

[0008] 引起这种疾病的因子是核糖核酸(RNA)病毒,它属于口疮病毒属(Aphthovirus)和小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)(Cooper等, Intervirology, 1978, 10, 165-180)。口蹄疫病毒英文缩写是FMDV(口蹄疫病毒)。目前,已知7种类型口蹄疫病毒,欧洲型(A, O和C),非洲型(SAT1, SAT2和SAT3)及亚洲型(亚洲型1)。已鉴定出许多亚型(Kleid等, Science, 1981, 214, 1125-1129)。

[0009] 它是裸露二十面体病毒,直径25nm,含有由约8500核苷酸组成的正极性的单链RNA分子。这种RNA分子由编码单个多蛋白的单一开放阅读框架(ORF)组成,这个多蛋白尤其包括衣壳前体,也称作蛋白质P1或P88。蛋白质P1氨基末端被十四烷基化。

[0010] 在成熟过程中,蛋白质P1被蛋白酶3C剪切成称作VP0, VP1和VP3(或分别是1AB, 1D和1C)的三个蛋白质(Bel sham G. J., Progress in Biophysics and Molecular Biology, 1993, 60, 241-261)。随后在病毒粒体中,蛋白质VP0被剪切成两个蛋白质VP4和VP2(或分别是1A和1B)。蛋白质VP0转换成VP1和VP3的机理及成熟病毒粒体的形成是未知的。

[0011] 蛋白质VP1, VP2和VP3分子量约26000道尔顿,而蛋白质VP4分子量小一些,约8000道尔顿。

[0012] 衣壳蛋白的简单结合形成了原聚体或5S分子,它是口蹄疫病毒衣壳的基本组成成分。然后这个原聚体与五邻体复合形成12S分子。

[0013] 通过12个12S五邻体装配,基因组RNA分子衣壳化产生病毒粒体,由此构成146S颗粒。

[0014] 在 RNA 分子不出现在病毒衣壳内部时,也可以形成病毒衣壳。这样病毒衣壳是空的。空衣壳也被命名为颗粒 70S。空衣壳形成可以在病毒复制过程中天然出现,或通过化学处理人工产生。

[0015] 通常,抗口蹄疫疫苗若要起作用,它应该是多价的。只要在这个区域的主导类型改变,就应更新它的组成。而且,为了预防疾病在动物群中快速发展,提供具有早期免疫和高效保护的疫苗是可行的。

[0016] 已提出试图研制有效抗口蹄疫疫苗的大量假说,研究路线和建议。目前在市场上仅有的疫苗是灭活病毒。

[0017] 化学灭活处理可能涉及降低病毒免疫原性及中和抗体产生。所用剂量常常必须与佐剂一起使用以刺激免疫反应,但是取决于它们的组成,这些佐剂也可以引起炎症反应。灭活疫苗不能赋予长期免疫,这就是每年不得不进行加强注射的原因,或如果发生问题时,尤其当流行性爆发出现时,加强注射更频繁。

[0018] 此外,在灭活疫苗产生期间,存在与不完全灭活和 / 或病毒逃离相联系的风险(例如, King 等, 1981, *Nature*, 293, 479-480)。

[0019] 基因工程技术的发展使得设想亚单位疫苗和重组载体的产生成为可能。然而,尽管进行了大量尝试,到目前为止,在市场上没有一个这样疫苗出现。

[0020] 在本研究工作以前,对天然空衣壳已进行了大量研究。特别是, Rowlands 等 (Rowlands 等, *J. Gen. Virol.*, 1975, 26, 227-238) 已表明 A10 口蹄疫病毒粒体主要包括 VP1, VP2, VP3 和 VP4 四个蛋白质。比较而言,天然空衣壳(不是通过重组获得,而是从 A10 口蹄疫病毒培养物纯化获得)基本上包含未剪切蛋白质 VP0; Rweyemanu (Rweyemanu 等 *Archives of Virology*, 1979, 59, 69-79) 就 A-Pando 口蹄疫病毒描述了相同的结果。在 Tris-EDTA 存在情况下透析后,离心得到的人工空衣壳不包含蛋白质 VP4。根据 Rowlands 等,这些人工衣壳是轻微免疫原性的,而且天然空衣壳仅在用使其稳定的甲醛处理后是免疫原性的,然而,天然空衣壳在豚鼠中诱导的抗体反应是不持续的,如作者所注释。而且, Rowlands 等和 Rweyemanu 等对需要稳定天然空衣壳持不同意见。对于 Rweyemanu 等而言,缺乏甲醛处理对于天然空衣壳抗原性水平没有不利影响。在豚鼠中,仅通过中和抗体的诱导检测免疫原性。

[0021] 有些作者不同意关于空衣壳的想法,或甚至反对它。Doel T. R. 和 Chong W. K. T. (Doel 等, *Archives of Virology*, 1982, 73, 185-191) 就是如此,他们从他们的实验结果中得出结论,即空衣壳免疫原性较弱,因为它们比亚型 A24 口蹄疫病毒粒体更不稳定。

[0022] 在昆虫细胞中通过重组杆状病毒,编码衣壳蛋白前体 P1 的基因的表达与在大肠杆菌 (*E. coli*) 中编码 P1 的基因和蛋白酶 3C 一起表达比较 (Grubman 等, *Vaccine*, 1993, 11, 825-829; Lewis 等, *J. Virol.*, 1991, 65, 6572-6580)。P1 和 3C 在大肠杆菌 (*E. coli*) 中共表达引起空衣壳 70S 装配。这两个构建物的表达产物在豚鼠和猪中产生了中和抗体。用 P1/ 杆状病毒构建物获得的效价低。这些相同表达产物在猪中诱导部分保护。然而,有些被保护抗口蹄疫的猪没有被保护抗攻击病毒的复制。

[0023] 作者也发现大肠杆菌 (*E. coli*) 表达系统不能十四烷基化蛋白质且蛋白酶 3C 对细胞有毒。Lewis 等断定,关于在动物中获得最大保护所需要的病毒组成和衣壳结构的基本问题还没有被解答。而且, Grubman 等认为在形成疫苗前稳定空衣壳是必要的;在这点上,他们对从病毒培养物提取获得的空衣壳所遇到的问题(见上文)想法一致。

[0024] 已利用由痘苗病毒组成的表达系统获得空口蹄疫病毒衣壳 A10, A24 和 01K (Abrams 等, *J. Gen. Virol.*, 1995, 76, 3089-3098)。每个亚型产生两个主要构建物, 包含或在早期 / 晚期痘苗病毒 p7.5K 启动子, 或在细菌噬菌体 T7 启动子控制下编码前体 P1 和蛋白酶 3C 的核苷酸序列的片段。在人细胞培养物上仅进行重组和体外表达实验。用包含 p7.5K 启动子的构建物转化的细胞培养物不能分离重组痘苗病毒。原因未知。用包含 T7 启动子的构建物转化的细胞培养物已使获得重组痘苗病毒载体, 表达病毒蛋白质 VP0, VP1 和 VP3 及获得空衣壳成为可能。这些实验目的是研究口蹄疫病毒形态发生学, 不涉及疫苗产生和任何它们有效性的评估。

[0025] Chinsangaram 等 (Chinsangaram 等, *J. Virol.*, 1998, 72 (5) 4454-4457) 已实验了含有依赖 hCMV-IE 启动子, 编码 P1-2A 和 3C 的盒子的质粒。给猪注射这些质粒, 可诱导中和抗体, 取决于动物组, 2 次注射后无保护作用, 或 4 次注射后取得保护。作者推论通过细胞因子共表达改善诱导的免疫反应是可行的。

[0026] 与这些还不能引起疫苗产生的方法比较, 其它作者对口蹄疫病毒蛋白质 VP1 本身、联合或合成肽的用途感兴趣。

[0027] 用大肠杆菌 (*E. coli*) 色氨酸操纵子蛋白质 LE 与 A24 口蹄疫病毒蛋白质 VP1 片段 (氨基酸 131-157, 单体形式) 组成的融合蛋白在猪中进行研究工作 (Morgan 等, *Am. J. Vet. Res.*, 1990, 51, 40-45), 结果与用从 A12 蹄疫病毒 (氨基酸 137-168 串连) 构建类似融合蛋白质获得结果比较。Giavedoni 等 (Giavedoni 等, *J. Gen. Virol.*, 1991, 72, 967-971) 描述了具有口蹄疫病毒 01 蛋白质 VP1C 末端区域的片断的融合蛋白质 TrpE。Huang 等描述了包含  $\beta$ -半乳糖苷酶和口蹄疫病毒 0VP1 序列的两个串连重复的重组融合蛋白质 (Huang 等, *Viral Immunol.*, 1999, 12 (1), 1-8)。

[0028] 通过用病毒载体, 即疱疹病毒或痘苗病毒 (*Vaccinia virus*) 也已获得包含部分或全部蛋白质 VP1 的融合蛋白质。特别地, CA-A-2, 047, 585 用牛疱疹病毒产生含有口蹄疫病毒肽序列 (VP1 的第 141 至 158 位氨基酸与 VP1 的第 200-213 位氨基酸结合) 的融合蛋白质, 这个口蹄疫病毒肽序列与牛疱疹病毒糖蛋白 gpIII 融合。

[0029] 已研制和实验含有以蛋白质 VP1 免疫原性区域为基础 (关于这些区域, 参见 Strohmaier 等, *J. Gen. Virol.*, 1982, 59, 295-306) 的合成肽的疫苗。

[0030] Agteberg 等 (Vaccine, 1990, 8, 438-440) 在转化大肠杆菌 (*E. coli*) 中产生了含有口蹄疫病毒 A10 蛋白质 VP1 两个免疫原决定簇 (区域 141-153 和 200-207) 和大肠杆菌 (*E. coli*) K-12 膜蛋白 PhoE 的融合蛋白。随后, 通过肌肉途径给药豚鼠 100  $\mu$ g 这种融合蛋白, 随后证实了可检测水平的中和抗体及攻击后的同源保护。

[0031] WO-A-99/66954 描述了与 A, 0 或亚洲型口蹄疫病毒 VP1 抗原位点共有序列 (与口蹄疫病毒 A12VP1 区域 134-168 对应) 对应的合成肽。

[0032] WO-A-98/12333 描述了含有与口蹄疫病毒蛋白质部分序列对应的至少 8 个氨基酸的合成肽。

## 发明内容

[0033] 本发明目的是提供有效和安全的抗口蹄疫疫苗。

[0034] 本发明也试图提供稳定的抗口蹄疫疫苗。

[0035] 本发明也试图提供低剂量有效的这种抗口蹄疫疫苗。

[0036] 因此,本发明涉及抗口蹄疫疫苗,应用有效量口蹄疫病毒空衣壳作为抗原,这些空衣壳通过在真核细胞中表达编码衣壳的口蹄疫病毒基因组 P1 区域的互补 DNA (cDNA) 及编码蛋白酶 3C 的口蹄疫病毒基因组区域的 cDNA 获得,该疫苗进一步包括对兽医应用而言药学可接受的载体或赋形剂。通过定义,没有功能 L 蛋白质被表达,因而,该构建物不含有编码 L 的 cDNA,优选地,不含有任何编码部分或全部 L 的 cDNA。

[0037] 优选地,表达 P1 和至少部分 2A,优选全部 2A。表达也可包括 2A 以外区域,可包括,例如部分 2B,例如如实施例所示。

[0038] 优选表达 3C 和至少部分 3B 蛋白质,例如两个相邻的 3B 蛋白质和 3D 的非功能部分,例如如实施例所示。

[0039] 图 3(SEQ ID NO. 38) 给出了与口蹄疫病毒 A10 株的 P1(氨基酸 2 到 737),2A(氨基酸 738 到 753),3C(氨基酸 913 到 1126) 对应的核苷酸和氨基酸序列。可得到其它株的各种型和亚型序列,尤其是在实施例提到的 Genbank 中。

[0040] 根据本发明第一个实施方式,空衣壳以有效量作为亚单位在疫苗中存在。优选地,通过表达依赖启动子,优选相同启动子的区域 P1 和 3C 的 cDNA 获得这些亚单位。优选地,它是诱导型启动子或病毒来源的晚期启动子。

[0041] 尤其是,可用的表达载体包括例如病毒载体,优选痘病毒,尤其是痘苗病毒,或腺病毒,疱疹病毒和质粒载体。这些表达载体用于确保在原代真核细胞或细胞系中空衣壳的体外表达。一个替代实施方式在于用整合载体整合表达盒进入真核细胞。可用的真核细胞优选源于细胞系的细胞,例如细胞 BHK-21, CHO, COS, RK13, Vero, MDBK, PK15。

[0042] 特别地,诱导型启动子可以是噬菌体 T7 启动子,热休克启动子,金属硫蛋白启动子及能被蜕皮激素或类固醇诱导的启动子。当应用噬菌体 T7 启动子时,共表达噬菌体 T7 的聚合酶和空衣壳。

[0043] 特别地,当用痘病毒作为载体时,病毒起源的晚期启动子可以是痘苗病毒 P11K 启动子,痘苗病毒 P28K 启动子,牛痘病毒 P160K ATI。

[0044] 优选地,亚单位通过冷冻或冷冻干燥保存和保藏。

[0045] 尤其是,给药剂量的单位剂量可在 0.3 到 30  $\mu$ g,尤其是,在 0.5 到 20  $\mu$ g,优选地,1 到 10  $\mu$ g,更优选地,在 1 到 5  $\mu$ g。

[0046] 优选地,剂量体积可在 0.2 到 5ml,更优选地在 1 到 3ml。

[0047] 亚单位疫苗吸收介质(赋形剂,载体)优选允许空衣壳保存的介质,例如 DMEM 型的。

[0048] 尤其是,亚单位疫苗可通过肠胃外途径,优选通过皮下或肌肉途径,或通过真皮途径,尤其是用无针装置(压力喷射器)给药。

[0049] 本领域技术人员有精确定义用于每次接种计划的每个疫苗注射次数和剂量的必要能力。

[0050] 优选地,这些疫苗包含一种和多种佐剂。

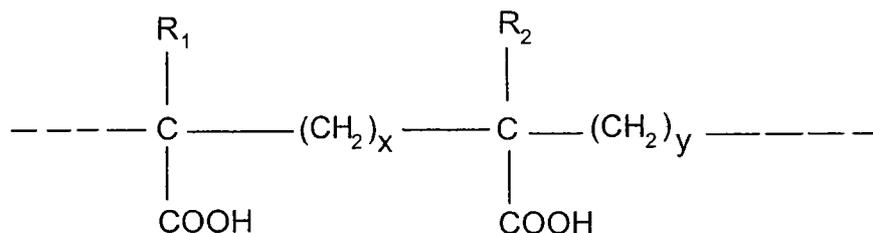
[0051] 特别地,用于本发明亚单位疫苗的佐剂可以是(1)氢氧化铝,皂苷(Saponine)(例如 QuilA),阿夫立定,DDA,(2)丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物,顺丁烯二酸酐和链烯基衍生物的聚合物,或(3)疫苗可以以水包油,油包水或水包油包水乳剂形式制成。

[0052] 尤其是,乳剂可以基于轻液体石蜡油(欧洲药典型)、类异戊二烯油,例如角鲨烷或角鲨烯;烯烃,特别是异丁烯或癸烯低聚化产生的油,带直链烷基的酸或醇形成的酯,更特别是植物油,油酸乙基酯,丙二醇二(辛酸酯/癸酸酯),甘油三(辛酸酯/癸酸酯),丙二醇二油酸酯;分支脂肪酸酯或醇的酯,特别是异硬脂酸酯。油与乳化剂一起使用形成乳剂。乳化剂优选非离子表面活性剂,特别是聚氧乙烯化脂肪酸(例如油酸),脱水山梨糖醇、甘露醇(例如脱水甘露醇油酸酯)、甘油、聚甘油、丙二醇和可选地乙氧基化的油酸、异硬脂酸、蓖麻油酸、羟基硬脂酸形成的酯,脂肪醇和多元醇(例如油醇)的醚,聚氧丙烯-聚氧乙烯嵌段共聚物,特别是**Pluronic®**,尤其是L121(参照Hunter等,1995,“The Theory and Practical Application of Adjuvants”(Steward-Tull,D.E.S主编)John Wiley and Sons, NY,51-94;Todd等,Vaccine,1997,15,564-570)。

[0053] 特别地,丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物通过糖或多元醇的聚链烯基醚交联。这些化合物被称作卡波姆(Carbomer)(Pharmeuropa8卷,2期,1996,6月)。本领域技术人员也可参考US-A-2 909 462(并入参考文献),这篇文献描述了通过至少有3个羟基,优选不多于8个羟基的多羟基化合物交联的这种丙烯酸聚合物,至少3个羟基的氢原子被至少有两个碳原子的不饱和脂肪族基团取代。优选含有2-4个碳原子的基团,例如乙烯基,烯丙基,及其它烯键式不饱和基团。不饱和基团本身可含有其它取代基,例如甲基。以名字**Carbopol®**(BFGoodrich,Ohio,USA)出售的产品特别适合。它们通过烯丙基蔗糖或通过烯丙基季戊四醇交联。其中可提到**Carbopol®** 974P,934P和971P。在顺丁烯二酸酐和链烯衍生物的共聚物中,优选是**EMA®**(Monsanto)共聚物,这种共聚物是顺丁烯二酸酐和乙烯的直链或交联共聚物,例如通过二乙基醚交联。可参看J.Fields等,Nature,186:778-780,1960年6月4日(引入作为参考)。

[0054] 在它们结构上,优选从下面通式的基本单位形成丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物及**EMA®**:

[0055]



[0056] 其中:

[0057] -R1和R2,可以相同和不同,代表H或CH<sub>3</sub>

[0058] -x=0或1,优选x=1

[0059] -y=1或2,同时x+y=2

[0060] 对于**EMA®**,x=0,y=2。对于卡波姆,x=y=1。

[0061] 在最终疫苗组合物中,聚合物浓度范围是从0.01%到1.5%P/V,更优选从0.05%到1%P/V,优选0.1%到0.4%P/V。

[0062] 根据本发明第二个实施方式,疫苗含有表达载体,此表达载体含有cDNA以便在体内产生空衣壳。优选地,通过插入质粒表达载体或病毒表达载体中依赖于启动子,优选相同启动子的P1和3C区域cDNA的表达,在体内获得这些空衣壳。优选启动子是强早期启动子

或病毒起源的晚期启动子。

[0063] 如果是病毒载体,优选使用病毒起源的晚期启动子。优选病毒载体是痘病毒,尤其是痘苗病毒,禽痘(例如,鸡痘(fowlpox),金丝雀痘)、浣熊痘、猪痘、山羊痘、或可复制腺病毒,特别是猪腺病毒,和疱疹病毒。对于痘病毒,病毒起源的晚期启动子尤其可以是痘苗病毒 P11K 启动子,痘苗病毒 P28K,牛痘病毒 P160K AT1。

[0064] 通过定义,质粒表达载体(或质粒)包括含多核苷酸序列的 DNA 转录单元,此多核苷酸序列含有被表达的 cDNA 和体内表达必需元件。优选环形,超螺旋或非螺旋(uncoiled)质粒形式。线性形式也包括在本发明范围内。

[0065] 如果是质粒,优选使用病毒来源或细胞来源的强早期启动子,特别是人或鼠来源的巨细胞病毒 CMV-IE 早期启动子,或可能是一些其它来源如鼠或豚鼠来源的早期启动子。也可用 SV40 病毒早期或晚期启动子或劳斯肉瘤病毒 LTR 启动子。细胞启动子可以是细胞骨架基因启动子,例如肌纤维蛋白(desmine)启动子或肌动蛋白启动子。

[0066] 优选通过冷冻或冷冻干燥或以液体形式保存和贮藏该重组疫苗。

[0067] 吸收介质(赋形剂,载体)优选 0.9% NaCl 盐水溶液或磷酸缓冲液。

[0068] 本发明疫苗中每个剂量所用病毒载体的量至少是均  $10^3$  pfu,优选约  $10^4$  pfu 到约  $10^{10}$  pfu,例如,约  $10^5$  pfu 到约  $10^9$  pfu,更优选地,约  $10^6$  pfu 到约  $10^8$  pfu。

[0069] 本发明疫苗单位剂量中所用质粒载体的量是约  $1 \mu\text{g}$  到约 2mg,优选是约  $50 \mu\text{g}$  到约 1mg。

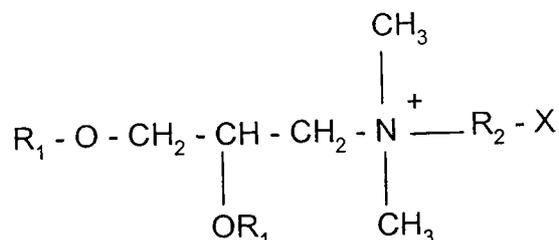
[0070] 优选地,剂量体积可在 0.2ml 到 5ml,优选 1ml 到 3ml。

[0071] 本发明重组疫苗可通过常规给药途径用已知方法给药。根据本发明优选实施方式,通过肌内或皮下途径或用无针注射器通过真皮内途径给药。特别是对于病毒载体,优选肌内或皮下途径。对于病毒或质粒载体,也可用粘膜途径(例如,口,鼻)。

[0072] 优选地,这些疫苗包含一个或多个佐剂。对于病毒载体,用丙烯酸或甲基丙烯酸聚合物,或顺丁烯二酸酐和链烯衍生物的聚合物,特别是卡波姆,尤其是 **Carbopol®** (这些佐剂在此前被描述过)是有益的。

[0073] 对于质粒载体,通过加入化学式为:

[0074]



[0075] 的含有季铵盐的阳离子脂作为佐剂形成它们是有益的。其中,R1 是有 12 到 18 个碳原子的直链饱和或不饱和脂肪族基团,R2 是有 2 或 3 个碳原子的脂肪族基团,X 是羟基或氨基。

[0076] 优选它是 DMRIE (N-(2-羟乙基)-N,N-二甲基-2,3-双(十四烷氧基)-1-丙铵); WO-A-9634109),优选与中性脂,尤其是 DOPE (二油酰-磷脂酰基-乙醇胺;Behr J. P. 1994, Bioconjugate Chemistry, 5, 382-389) 结合形成 DMRIE-DOPE。优选地,质粒提前与该佐剂混合,而且在给予动物前,这样形成的混合物需要时间复合,例如 10-60 分钟的时间,特别

是大约 30 分钟。

[0077] 当存在 DOPE 时,DMRIE :DOPE 摩尔比优选范围是 95 : 5 到 5 : 95,而且更优选是 1 : 1。

[0078] 质粒 :佐剂,尤其是 DMRIE 或 DMRIE-DOPE 的重量比范围尤其可以是 50 : 1 到 1 : 10,特别是 10 : 1 到 1 : 5,而且更优选是 1 : 1 到 1 : 2。

[0079] 如上所述本发明有或无佐剂的疫苗也可含有一种或多种细胞因子作为佐剂,这些细胞因子被加入或在体内表达。优选地,使用 GM-CSF(英语:Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Fator(粒细胞巨噬细胞集落刺激因子):Clark S. C 等, Science1987. 230. 1229 ;Grant S. M. 等, Drugs 1992. 53. 516),这可通过直接将 GM-CSF 蛋白质掺入疫苗组合物中,或优选地,在允许其在体内表达的情况下,在表达载体中常规插入编码 GM-CSF 的核苷酸序列而实现,所述表达载体例如包含编码 FMDV 抗原的核苷酸序列的载体或其它载体。优选用质粒作为表达载体。优选地,根据待接种的动物物种选择 GM-CSF ;因此,对于牛,用牛的 GM-CSF(参照,例如 Maliszewski 等, Molec. Immunol. 1988. 25. 843-850) ;对于猪,用猪的 GM-CSF(参照,例如 Inumaru S. 和 Takamatsu H. , Immunol. Cell. Biol. 1995. 75. 474-476)。

[0080] 对于表达 GM-CSF 载体的产生,在 Genbank 中可得到 GM-CSF 序列,猪是 D21074,牛是 U22385,绵羊是 X55991。

[0081] 本发明也涉及制备亚单位抗口蹄疫疫苗的方法,其中通过区域 P1 的 cDNA 的表达和区域 3C 的 cDNA 的表达产生这个病毒的空衣壳,而且它在对兽医应用适合的载体或赋形剂中,优选在至少一种佐剂存在情况下配制。

[0082] 本发明也涉及本发明体外产生的空衣壳用于亚单位抗口蹄疫疫苗的制备,该疫苗进一步包括对兽医应用适合的载体或赋形剂,优选至少一种佐剂存在。

[0083] 本发明也涉及抗口蹄疫的接种方法,包括施用本发明亚单位疫苗给动物,特别是农畜,特别是牛、绵羊、猪、山羊物种。上文定义了给药方法和剂量。

[0084] 关于本发明亚单位疫苗的上述各种特征应用于这些不同对象。

[0085] 本发明也涉及制备重组抗口蹄疫疫苗的方法,其中在导致空衣壳形成的条件下,产生在体内表达蛋白质 P1 和蛋白质 3C 的病毒或质粒载体,这些载体在对兽医应用适合的载体或赋形剂中,优选在至少一种佐剂存在情况下配制。

[0086] 本发明也涉及本发明病毒或质粒载体在重组抗口蹄疫疫苗的制备中的用途,所述疫苗进一步包含对兽医应用适合的载体或赋形剂,优选至少一种佐剂存在。

[0087] 本发明也涉及抗口蹄疫的接种方法,包括施用本发明重组疫苗给动物,特别是农畜,特别是牛、绵羊、猪、山羊物种。上文定义了给药方法和剂量。

[0088] 关于使用病毒或质粒载体的本发明疫苗的上述各种特征也应用于这些不同对象。

[0089] 本发明也涉及多价疫苗或疫苗的联合(Combination),其在兽医应用适合的载体或赋形剂中含有本发明疫苗及至少一种抗其它型(例如 O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, 亚洲型)、其它亚型(例如, A10, A12, A24, 01)或其它变种口蹄疫病毒的其它疫苗,优选根据本发明的,而且优选有佐剂,尤其是上述那些佐剂。

[0090] 本发明也涉及在兽医应用适合的载体或赋形剂中含有本发明疫苗及至少一种抗其它病原体,尤其是狂犬病病毒的疫苗的多价疫苗或疫苗联合,而且优选有佐剂,尤其是

上述那些佐剂。

[0091] 本发明也涉及改进空口蹄疫病毒衣壳及所得疫苗的温度稳定性。

[0092] 通过形成二硫桥,有利地确保了空衣壳的温度稳定性。

[0093] 特别是,通过在衣壳的结构蛋白蛋白质 VP2 多肽序列中用半胱氨酸置换原始序列氨基酸获得这种改进,这个氨基酸位于氨基酶序列 SEQID NO 38 的第 179 位(图 3)。通常,这个氨基酸位置在其它口蹄疫病毒中是相同的(特别是实施例所述株系就是这种情况)。在其它病毒的序列中,该位置可能有极细微的不同,例如,可以是 178 或 180。含有这个氨基酸的区域与  $\alpha$  螺旋对应。为了识别或确认要突变的氨基酸,考虑到这个区域序列在不同口蹄疫病毒中结构非常保守的事实,将这个区域的氨基酸序列与序列 SEQ ID NO 38 中对应区域(例如,大约 10 个,或略微多一些,如 10-20 个氨基酸)排列对比。特别是通过比较株系 01, A10, A24, A22, C1, C3, SAT2 的序列,发现这个区域可写成如下所示:

[0094] X1 Gly X3 X4 Gly X6 Leu X8 X9 Ser X11 X12 Tyr Met

[0095] 其中,

[0096] X4 和 X11 是 Tyr, His 或 Phe(疏水氨基酸)

[0097] X3, X8 和 X12 是 Val, Met, Ile, Thr 或 Ala

[0098] X6 是 His, Gln, Arg, Lys, Ser 或 Gly;这是要突变成 Cys 的氨基酸

[0099] X1 是 His 或 Lys(碱性氨基酸)

[0100] X9 是 Asp, Glu 或 Lys(酸性和碱性氨基酸)。

[0101] 待突变的氨基酸是位于口蹄疫病毒 A10 P1 前体位置 179 的组氨酸。

[0102] 这是口蹄疫病毒 01 P1 前体位置 179 的丝氨酸。

[0103] 这是口蹄疫病毒 C1 P1 前体位置 179 的甘氨酸。

[0104] 这是口蹄疫病毒 A24 P1 前体位置 179 的组氨酸。

[0105] 通过转换,对应于起始密码子(它不出现在天然序列中,因此是被加上的)的甲硫氨酸序号是 1。

[0106] 在核苷酸水平上,这相当于用编码半胱氨酸的密码子置换原来的密码子,半胱氨酸密码子对 cDNA 是 TGT 或 TGC 密码子,或对 RNA 是 UGU 或 UGC 密码子。

[0107] 因此,本发明也涉及引入这种修饰的核苷酸序列,尤其是 cDNA。特别是,本发明涉及序列 cDNA 及含有它们的载体,该 cDNA 包含带有这种修饰的编码 VP2(或 VP0),更特别是 P1 的序列,例如编码 P1-2A 或 P1-2A- 部分 2B 的 cDNA 序列及含有它们的序列,例如含有它们及有允许它们表达的序列(启动子,ATG 密码子)的序列。

[0108] 本发明也涉及从这些核苷酸序列获得的氨基酸序列,及空衣壳和热稳定口蹄疫病毒(即有改进的热稳定性)。优选地,它们包含在天然衣壳和病毒中不存在的二硫桥。特别地,它们包含含有半胱氨酸而不是天然氨基酸的 VP2 蛋白质,如上所述。

[0109] 根据本发明优选实施方式,上述疫苗是以这种修饰的应用为基础的,因此 cDNA 序列被修饰,结果,在体外或体内获得的空衣壳有二硫桥。

[0110] 相似地,上述本发明所有的其它对象(方法,用途,过程)可以且优选有这些特征。

[0111] 现在通过实施方式作为非限制实例并参考附图将更加详细地描述本发明。

[0112] 附图及序列列表说明

[0113] 图 1:牛中测定的抗口蹄疫 A24 中和抗体的效价图(表示为 log)。

[0114] 图 2 :得到的凝胶照片。

[0115] 图 3 :与口蹄疫病毒 A10 株系 P1(氨基酸 2 到 737), 2A(氨基酸 738 到 753), 3C(氨基酸 913 到 1126) 对应的核苷酸序列与氨基酸序列。

[0116] 本发明构建的序列序列标识列表 :

- [0117] SEQ ID NO 1 :寡核苷酸 JCA305
- [0118] SEQ ID NO 2 :寡核苷酸 JCA306
- [0119] SEQ ID NO 3 :寡核苷酸 JCA307
- [0120] SEQ ID NO 4 :寡核苷酸 JCA308
- [0121] SEQ ID NO 5 :寡核苷酸 JCA309
- [0122] SEQ ID NO 6 :寡核苷酸 JCA310
- [0123] SEQ ID NO 7 :寡核苷酸 JCA311
- [0124] SEQ ID NO 8 :寡核苷酸 JCA312
- [0125] SEQ ID NO 9 :寡核苷酸 JCA313
- [0126] SEQ ID NO 10 :寡核苷酸 JCA314
- [0127] SEQ ID NO 11 :寡核苷酸 JCA315
- [0128] SEQ ID NO 12 :寡核苷酸 JCA316
- [0129] SEQ ID NO 13 :寡核苷酸 JCA317
- [0130] SEQ ID NO 14 :寡核苷酸 JCA318
- [0131] SEQ ID NO 15 :寡核苷酸 JCA319
- [0132] SEQ ID NO 16 :寡核苷酸 JCA320
- [0133] SEQ ID NO 17 :寡核苷酸 JCA321
- [0134] SEQ ID NO 18 :寡核苷酸 JCA322
- [0135] SEQ ID NO 19 :寡核苷酸 JCA323
- [0136] SEQ ID NO 20 :寡核苷酸 JCA324
- [0137] SEQ ID NO 21 :寡核苷酸 JCA325
- [0138] SEQ ID NO 22 :寡核苷酸 JCA326
- [0139] SEQ ID NO 23 :寡核苷酸 JCA327
- [0140] SEQ ID NO 24 :寡核苷酸 JCA328
- [0141] SEQ ID NO 25 :寡核苷酸 JCA329
- [0142] SEQ ID NO 26 :寡核苷酸 JCA330
- [0143] SEQ ID NO 27 :寡核苷酸 JCA331
- [0144] SEQ ID NO 28 :寡核苷酸 JCA332
- [0145] SEQ ID NO 29 :寡核苷酸 JCA333
- [0146] SEQ ID NO 30 :寡核苷酸 JCA334
- [0147] SEQ ID NO 31 :寡核苷酸 JCA335
- [0148] SEQ ID NO 32 :寡核苷酸 JCA336
- [0149] SEQ ID NO 33 :寡核苷酸 JCA337
- [0150] SEQ ID NO 34 :寡核苷酸 JCA338
- [0151] SEQ ID NO 35 :寡核苷酸 JCA339

[0152] SEQ ID NO 36 :寡核苷酸 JCA340

[0153] SEQ ID NO 37 :寡核苷酸 JCA341

[0154] SEQ ID NO 38 :与口蹄疫病毒 A10P1(氨基酸 2 到 737), 2A(氨基酸 738 到 753), 3C(氨基酸 913 到 1126) 对应的氨基酸序列。

[0155] SEQ ID NO 39 :与口蹄疫病毒 A10P1, 2A, 3C 对应的核苷酸序列。

[0156] SEQ ID NO 40 :寡核苷酸 JCA342

[0157] SEQ ID NO 41 :寡核苷酸 JCA343

[0158] 实施例

[0159] 用 Sambrook J. 等 (Molecular Cloning :A Laboratory Manual. 第 2 版 .Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York. 1989) 所述标准分子生物学技术 (克隆, 用限制性酶消化, 单链互补 DNA 合成, 聚合酶链式反应, 用 DNA 聚合酶进行寡核苷酸延伸.....) 产生所有构建物。用“**Geneclean®**”试剂盒 (BI0101 Inc. La Jolla, CA) 分离和纯化用于本发明的所有限制性片段及聚合酶链式反应 (PCR) 的各种片段。

[0160] 可从 GenBank 数据库获得口蹄疫病毒的核苷酸与多肽序列, 尤其是序号 X00429(对于 A10), X00871(对于 01K), AJ251476(对于 A24), AJ133357(对于 C Spain 01ot)。

[0161] 实施例 1 :口蹄疫病毒株系培养

[0162] 为了扩增它们, 将名为 01K(Forss 等, 1984, Nucleic Acids Res., 12(16), 6587-6601), A24(Weddell 等, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 2618-2622), A10(Carroll 等, 1984, Nucleic Acids Res., 12(5), 2461-2472), C Spain 01ot(Toja 等, 1999, Virus Res., 64(2), 161-171) 的口蹄疫病毒株系在 BHK-21 细胞 (幼仓鼠肾, 可从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 保藏号为 CCL-10 得到) 上培养。

[0163] 细胞 BHK-21 培养在含补加了 1% 酵母提取物和 5% 小牛血清的 MEM 伊格尔培养基 (Eagle Medium) 的 Falcon 25cm<sup>2</sup> 上, 每 ml 中含有大约 100,000 细胞。细胞在 37°C 下培养。

[0164] 3 天后, 细胞层达到铺满, 然后用无血清但是补加 0.4% 乳清蛋白水解产物和 0.3% 蛋白胍 (pH7.4) 的 MEM 伊格尔培养基 (Eagle Medium) 置换培养基, 以 1pfu 对约 20 个细胞的量加口蹄疫病毒。

[0165] 当完成致细胞病变效应 (CPE) 时 (通常培养开始后 24 小时), 收集病毒悬浮液, 然后通过离心澄清病毒悬浮液, -70°C 冷冻。为了产生一批病毒, 通常需要 3 到 4 次连续过程。这批病毒贮藏在 -70°C。

[0166] 对于每株系口蹄疫病毒重复这些操作。

[0167] 实施例 2 :从口蹄疫病毒株系提取病毒 RNA

[0168] 冷冻后, 用“High Pure™ Viral RNA Kit”(Cat#1858 882, Roche Molecular Biochemicals) 溶液, 按照制造商提取步骤说明提取包含在 100ml 实施例 1 得到的口蹄疫病毒株系 A24 病毒悬浮液中的病毒 RNA。用 10ml 无 RNase 的无菌蒸馏水重悬浮提取最后得到的 RNA 残渣。

[0169] 在同样条件下, 提取每个口蹄疫病毒株系的病毒 RNA。

[0170] 实施例 3 :口蹄疫病毒 A10 空衣壳表达质粒的构建

[0171] 用“Gene Amp RNA PCR Kit”(Cat# N 8080017, PerkinElmer, Norwalk, CT 06859,

USA) 在供应商说明的条件下,合成口蹄疫病毒 A10 的互补 DNA (cDNA)。对于第一个片断,用 50  $\mu$  l 口蹄疫病毒 A10 病毒 RNA 悬浮液 (实施例 2) 及下面寡核苷酸

[0172] JCA305 (37mer) (SEQ ID NO 1)

[0173] 5' TTTTGATATCATGGGTGCTGGGCAGTCCAGCCCAGCA 3'

[0174] 和 JCA306 (21mer) (SEQ ID NO 2)

[0175] 5' TTCACGACGAAAGTACTATCC 3'

[0176] 进行反转录 - 扩增链式反应 (“TI-ACP” 或 “RT-PCR” 反应)。

[0177] 这对寡核苷酸能使 EcoRV 限制性位点及 ATG 起始密码子被引入编码 P1 的核苷酸序列中。

[0178] 在寡核苷酸 JCA306 与 RNA 模板杂交后,通过延伸寡核苷酸 JCA306 合成 cDNA 第一链。

[0179] 第一链 cDNA 合成条件是:42°C, 15 分钟,然后 99°C, 5 分钟,最后 4°C, 5 分钟。在寡核苷酸对 JCA305 和 JCA306 存在条件下,PCR 反应条件是 95°C, 2 分钟,然后 35 个循环 (95°C, 1 分钟,然后 62°C, 1 分钟,72°C, 2 分钟),最后 72°C, 7 分钟以产生 2583bp 片段。

[0180] 用 EcoRV, 然后用 XhoI 消化这个片段,琼脂糖凝胶电泳后分离约 2550bp 片段 EcoRV-XhoI。这个片段命名为片段 A。

[0181] 对于第二个片段,用 50  $\mu$  l 口蹄疫病毒 A10 病毒 RNA 悬浮液 (实施例 2) 及下面寡核苷酸

[0182] JCA307 (21mer) (SEQ ID NO 3)

[0183] 5' CTGAAGGACCCTACTCCGGGC 3'

[0184] and JCA308 (37mer) (SEQ ID NO 4)

[0185] 5' TTTTAGATCTTCAAAGCTTTGTTTTGCGCATCACGTG 3'

[0186] 进行 PCR 反应。

[0187] 这对寡核苷酸允许 BglIII 限制性位点及终止密码子被引入编码蛋白酶 3C 的核苷酸序列中。

[0188] 在寡核苷酸 JCA308 与 RNA 模板杂交后,通过延伸寡核苷酸 JCA308 合成 cDNA 第一链。

[0189] 第一链 cDNA 合成条件是:42°C, 15 分钟,然后 99°C, 5 分钟,最后 4°C, 5 分钟。在寡核苷酸对 JCA307 和 JCA308 存在条件下,PCR 反应条件是 95°C, 2 分钟,然后 35 个循环 (95°C, 1 分钟,然后 62°C, 1 分钟,72°C, 2 分钟),最后 72°C, 7 分钟以产生 936bp 片段。

[0190] 用 BglIII, 然后用 XhoI 消化这个片段,琼脂糖凝胶电泳后,分离约 900bp 片段 BglIII-XhoI。这个片段命名为片段 B。

[0191] 用预先用 BglIII 和 EcoRV 消化过的表达质粒 pVR1012 (Hartikka J. 等, 1997, Human Gene Therapy, 7. 1205-1217) 连接片段 A 和片段 B 得到质粒 pJCA161 (8327bp)。这个质粒包含在人巨细胞病毒或 hCMV-IE (即早期人巨细胞病毒) 早期启动子控制下的编码部分多蛋白的插入片段,这个部分多蛋白足以产生具有自我装配能力的衣壳蛋白。

[0192] 实施例 4:口蹄疫病毒亚型 01K, C Spain 01ot 及 A24 空衣壳表达质粒的构建

[0193] 如实施例 3 所述合成口蹄疫病毒亚型 01K, C Spain 01ot 及 A24 的 cDNA。

[0194] 对于 01K, 寡核苷酸对:

- [0195] JCA309 (37mer) (SEQ ID NO 5)
- [0196] 5' TTTTGATATCATGGGGGCTGGACAATCCAGTCCAGCG 3'
- [0197] 和 JCA310 (21mer) (SEQ ID NO 6)
- [0198] 5' TTCACGACGAAGGTGCTGTCC 3'
- [0199] 被用于第一个 PCR 反应,产生 2583bp 片段,在消化和分离后,产生约 2550bp 的 EcoRV-XhoI 片段。这个片段称为片段 C。
- [0200] 在第二个 PCR 反应中,寡核苷酸对:
- [0201] JCA311 (18mer) (SEQ ID NO 7)
- [0202] 5' AAGGACCCTACGCCGAC 3'
- [0203] 和 JCA312 (34mer) (SEQ ID NO 8)
- [0204] 5' TTTTAGATCTTCAAAGCTTGGTTTTGCGCATCAC 3'
- [0205] 被用于产生 930bp 片段,在消化和分离后,产生约 900bp 的 BglIII-XhoI 片段。这个片段称为片段 D。
- [0206] 用预先用 BglIII 和 EcoRV 消化过的表达质粒 pVR1012 连接片段 C 和片段 D 得到质粒 pJCA162 (8327bp)。
- [0207] 对于 C Spain 0lot,寡核苷酸对:
- [0208] JCA313 (37mer) (SEQ ID NO 9)
- [0209] 5' TTTTGATATCATGGGAGCTGGGCAATCCAGCCCAGCG 3'
- [0210] 和 JCA314 (23mer) (SEQ ID NO 10)
- [0211] 5' TTCACGACAAACGTGCTGTCCAG 3' ,
- [0212] 被用于第一个 PCR 反应,产生 2568bp 片段,在消化和分离后,产生约 2540bp 的 EcoRV-XhoI 片段。这个片段称为片段 E。
- [0213] 在第二个 PCR 反应中,寡核苷酸对:
- [0214] JCA315 (21mer) (SEQ ID NO 11)
- [0215] 5' AGAGCAACCGCAAGCTGAAGG 3'
- [0216] 和 JCA316 (34mer) (SEQ ID NO 12)
- [0217] 5' TTTTAGATCTTCAAAGCTTGGTTTTGCGCATTAC 3' ,
- [0218] 被用于产生 947bp 片段,在消化和分离后,产生约 900bp 的 BglIII-XhoI 片段。这个片段称为片段 F。
- [0219] 用预先用 BglIII 和 EcoRV 消化过的表达质粒 pVR1012 连接片段 E 和片段 F 得到质粒 pJCA163 (8312bp)。
- [0220] 对于 A24,寡核苷酸对:
- [0221] JCA317 (37mer) (SEQ ID NO 13)
- [0222] 5' TTTTGATATCATGGGGGCCGGGCAATCCAGTCCGGCG 3'
- [0223] 和 JCA318 (31mer) (SEQ ID NO 14)
- [0224] 5' TTTTCTCGAGGGGGGCCGGCACGTGAAAGAG 3' ,
- [0225] 被用于第一个 PCR 反应,产生约 2630bp 片段,在消化和分离后,产生约 2580bp 的 EcoRV-XhoI 片段。这个片段称为片段 G。
- [0226] 在第二个 PCR 反应中,寡核苷酸对:

- [0227] JCA319(31mer)(SEQ ID NO 15)
- [0228] 5' TTTTCTCGAGGGACCGGTGAAGAAGCCTGTC 3'
- [0229] 和 JCA320(37mer)(SEQ ID NO 16)
- [0230] 5' TTTTAGATCTTCAGCGGCGGAACAGCGCTTGTCTC 3'
- [0231] 被用于产生约 950bp 片段,在消化和分离后,产生约 940bp 的 BglIII-XhoI 片段。这个片段称为片段 H。
- [0232] 用预先用 BglIII 和 EcoRV 消化过的表达质粒 pVR1012 连接片段 G 和片段 H 得到质粒 pJCA164(大小约 8400bp)。
- [0233] 实施例 5 :A24/A10 的表达质粒的构建
- [0234] 如实施例 3 所述合成口蹄疫病毒 A24 的 cDNA。
- [0235] 用 50 μ l 口蹄疫病毒 A24RNA 悬浮液(实施例 2)及下面寡核苷酸:
- [0236] JCA317(37mer)(SEQ ID NO 13)
- [0237] 和 JCA321(24mer)(SEQ ID NO 17)
- [0238] 5' TTTGACCTAACGTCGGAGAAGAAG 3'
- [0239] 进行 PCR 反应。
- [0240] 产生约 2300bp 的片段。
- [0241] 然后,用 EcoRV 消化,然后用 HindIII 消化这个片段,琼脂糖凝胶电泳后,分离约 1710bp 的 EcoRV-HindIII 片段。这个片段称为片段 I。
- [0242] 用 HindIII 消化,然后用 ApaI 消化 2300bp 片段,琼脂糖凝胶电泳后,分离约 550bp 的 HindIII-ApaI 片段。这个片段称为片段 J。
- [0243] 用 ApaI 消化质粒 pJCA161(实施例 3),然后用 EcoRV 消化,琼脂糖凝胶电泳后,分离约 5960bp 的 ApaI-EcoRV 片段。这个片段称为片段 K。
- [0244] 片段 I, J 和 K 被连接在一起产生质粒 pJCA165(8333bp)。该质粒含有编码多蛋白 A24 的结构部分和 A10 的酶性部分的插入片段,这些部分足以产生具有自我装配能力的衣壳蛋白。
- [0245] 实施例 6 :重组痘苗病毒 vV100(A10) 的构建
- [0246] 用质粒 pJCA161(实施例 3)作为模板和下面寡核苷酸:
- [0247] JCA322(37mer)(SEQ ID NO 18):
- [0248] 5' TTTTGAATTCATGCAGTCCAGCCCAGCAACCGGCTCG 3'
- [0249] 和 JCA323(44mer)(SEQ ID NO 19):
- [0250] 5' TTTTGAATTCATAAAAAATCAAAGCTTGTGTTTGGCGCATCACGTG 3'
- [0251] 进行 PCR 反应扩增约 3462b 的片段。
- [0252] 这对寡核苷酸能在扩增片段每个末端引入限制性位点 EcoRI。
- [0253] 在这对寡核苷酸存在的条件下,PCR 反应条件是 95℃,2 分钟,然后 35 个循环(95℃,1 分钟,然后 62℃,1 分钟,72℃,2 分钟),最后 72℃,7 分钟。
- [0254] 用 EcoRI 消化这个片段,琼脂糖凝胶电泳后,分离约 3448bp 片段 EcoRI-EcoRI。
- [0255] 用下面寡核苷酸对在痘苗病毒(株系 WR)基因组上进行 PCR 反应:
- [0256] JCA342(28mer)SEQ ID NO 40
- [0257] 5' TTTTATCGATTCATTGATAGTACCAAAT 3'

[0258] JCA343(20mer)SEQ ID NO 41

[0259] 5' ATTCTACAGTTCTAACATCG 3' .

[0260] PCR 反应条件同前面一样。产生 488bp 片段。用 ClaI 和 EcoRI 消化这个片段,琼脂糖凝胶电泳后,分离 367bp 片段。然后将这个最后片段插入预先用 ClaI 和 EcoRI 消化过的质粒 pGS20(Mackett 等, J;Virology,1984,49,857-864) 中。用 EcoRI 使由此获得的质粒线性化,在此插入 3448bp 片段 EcoRI-EcoRI,得到载体 pJCA166。

[0261] 有利地,本领域技术人员也能用含有痘苗病毒 P11K 启动子及痘苗病毒 TK 基因的两个分支(一个位于这个启动子上游,另一个位于 EcoRI 位点下游)的质粒 pvFOHC(Newton 等,在:Vaccines 87,1987,Chanock 等编辑,Cold Spring Harbor Laboratory,12-21)。

[0262] 除了 TK 基因外,也可用痘苗病毒中其它的插入位点,例如,尤其是基因 HA, M2L。

[0263] 将质粒 pJCA166 转染进入用痘苗病毒(株系 WR, ATCC 号 VR-119)感染的 COS 细胞(源于非洲绿猴的肾细胞,保藏在美国典型培养物中心(ATCC),保藏号:ATCC CRL-1651)。

[0264] 在含用 10%胎牛血清,2mM 谷氨酰胺,500U/ml 青霉素 / 链霉素,12.5  $\mu$ g/ml 两性霉素(所有都是最终浓度)补料的 DMEM 培养基(Dulbecco's 修改的伊格尔培养基(Eagles Medium))的培养皿中培养 COS 细胞,每 ml 约含有 100,000 细胞,+37°C,含有 5% CO<sub>2</sub> 的空气中,16 小时。当细胞达到 75%铺满时,除去培养基。然后,以 3DICC50/细胞的感染复数(moi),用痘苗病毒(株系 WR)感染 COS 细胞,然后温育培养皿 1 小时。随后,用无血清的 DMEM 培养基洗培养物。然后每个培养皿中加入 400  $\mu$ l 质粒 / 脂质转染试剂 / Optimen 混合物(8  $\mu$ l 脂质转染试剂,192  $\mu$ l Optimen 及 200  $\mu$ l 蒸馏水,含有 8  $\mu$ g 质粒),质粒是 pJCA166。培养皿在 +37°C,含有 5% CO<sub>2</sub> 的空气中温育 4 到 6 小时,每 30 分钟搅拌。然后每个培养皿中加入补加 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,培养皿在 +37°C,含有 5% CO<sub>2</sub> 的空气中温育 16 小时。

[0265] 然后收集细胞,冷冻,贮藏在 -20°C。

[0266] 在含有 5ml DMEM 培养基的 6cm 培养皿中在 143TK- 人细胞培养物(可从美国典型培养物保藏中心,保藏号 CRL-8303 获得)上进行重组痘苗病毒的筛选,在 +37°C,含有 5% CO<sub>2</sub> 的空气中温育 16 小时。

[0267] 加入先前获得的转染悬浮液。在 +37°C 温育 1 小时后,每 ml 加 25  $\mu$ g 5- 溴脱氧尿苷(BUDR)以筛选重组痘苗病毒 TK-。延长温育 48 小时以允许重组细胞发育。进行 3 次重组痘苗病毒筛选 / 纯化的连续循环。

[0268] 用 143TK- 细胞接种有 DMEM 培养基的 24 孔板,每 ml DMEM 培养基含有 25  $\mu$ g 5- 溴脱氧尿苷(BUDR)。+37°C 温育 2 小时后,每个吸取到 2  $\mu$ l PBS 缓冲液中的约 10 个斑点被转移进 10 个孔中。然后温育斑点 48-72 小时。

[0269] 温育后,用“Gene Releaser”方法(Cambio),利用寡核苷酸 JCA305 和 JCA308 在每个孔的培养上清液上进行 PCR 反应。

[0270] 对于发现是阳性的孔,重组病毒进行新一轮纯化。扩增称作 vV100 的重组病毒,贮藏在 -70°C 或 -20°C。

[0271] 实施例 7:O, C 和 A 型疫苗重组病毒的构建

[0272] 如实施例 6 所述进行 O, C, A 型口蹄疫病毒重组痘苗病毒的构建。

[0273] 对于 O 型:

- [0274] 用质粒 pJCA162( 实施例 4) 作为模板和下面寡核苷酸 :
- [0275] JCA324(37mer)(SEQ ID NO 20) :
- [0276] 5' TTTTGAATTCATGGGGGCTGGACAATCCAGTCCAGCG 3'
- [0277] 和 JCA325(41mer)(SEQ ID NO 21) :
- [0278] 5' TTTTGAATTCATAAAAAATCAAAGCTTGGTTTTGCGCATCAC 3'
- [0279] 进行 PCR 反应,以扩增约 3470bp 片段。
- [0280] 消化和分离后,3448bp 的片段 EcoRI-EcoRI 插入预先用 EcoRI 消化过的质粒 pvFOHC,产生供体质粒 pJCA167。
- [0281] 根据实施例 6 所述技术完成重组。用寡核苷酸 JCA309 和 JCA312 通过 PCR 反应筛选阳性区域。扩增一个区域,获得的重组病毒株被命名为 vV101。
- [0282] 对于 C 型 :
- [0283] 用质粒 pJCA163( 实施例 4) 作为模板和下面寡核苷酸 :
- [0284] JCA326(37mer)(SEQ ID NO 22) :
- [0285] 5' TTTTGAATTCATGGGAGCTGGGCAATCCAGCCCAGCG 3'
- [0286] 和 JCA327(41mer)(SEQ ID NO 23) :
- [0287] 5' TTTTGAATTCATAAAAAATCAAAGCTTGGTTTTGCGCATTAC 3'
- [0288] 进行 PCR 反应,以扩增约 3460bp 片段。
- [0289] 消化和分离后,3439bp 的片段 EcoRI-EcoRI 插入预先用 EcoRI 消化过的质粒 pvFOHC,产生供体质粒 pJCA168。
- [0290] 根据实施例 6 所述技术进行重组。用寡核苷酸 JCA313 和 JCA316 通过 PCR 反应筛选阳性斑。扩增斑,获得的重组病毒株被命名为 vV102。
- [0291] 对于 A 型 :
- [0292] 用质粒 pJCA164( 实施例 4) 作为模板和下面寡核苷酸 :
- [0293] JCA328(37mer)(SEQ ID NO 24) :
- [0294] 5' TTTTGAATTCATGGGGGCCGGGCAATCCAGTCCGGCG 3'
- [0295] 和 JCA329(44mer)(SEQ ID NO 25) :
- [0296] 5' TTTTGAATTCATAAAAAATCAGCGGCGGAACAGCGCTTTGTCCTC 3'
- [0297] 进行 PCR 反应,以扩增约 3550bp 片段。
- [0298] 消化和分离后,约 3530bp 的片段 EcoRI-EcoRI 插入预先用 EcoRI 消化过的质粒 pvFOHC,产生供体质粒 pJCA169。
- [0299] 根据实施例 6 所述技术进行重组。用寡核苷酸 JCA317 和 JCA320 通过 PCR 反应筛选阳性斑。扩增斑,获得的重组病毒株被命名为 vV103。
- [0300] A 型变种 :
- [0301] 用质粒 pJCA165( 实施例 5) 作为基质和下面寡核苷酸 :
- [0302] JCA328(SEQ ID NO 24)(37mer)
- [0303] 和 JCA325(SEQ ID NO 21)(37mer)
- [0304] 进行 PCR 反应,以扩增约 3480bp 片段。
- [0305] 消化和分离后,约 3463bp 的片段 EcoRI-EcoRI 插入预先用 EcoRI 消化过的质粒 pvFOHC,产生供体质粒 pJCA170。

[0306] 根据实施例 6 所述技术进行重组。用寡核苷酸 JCA317 和 JCA312 通过 PCR 反应筛选阳性斑。扩增斑,获得的重组病毒原种被命名为 vV104。

[0307] 实施例 8 :用于体外表达的疫苗重组病毒的构建 (A10)

[0308] 用限制性酶 EcoRV 和 BglIII 消化质粒 pJCA161( 实施例 3)。琼脂糖凝胶电泳后,分离约 3450bp 大小的片段 EcoRV-BglIII。这个片段通过用 Klenow 聚合酶处理制成“平末端”,然后连接到质粒 pBG200 (Abrams, 等 1995, J. Gen. Virol. , 76, 3089-3098) 中(这个质粒预先用 BamHI 消化,而且通过用 Klenow 聚合酶处理制成平末端)产生供体质粒 pJCA171。

[0309] 质粒 pBG200 含有 T7 噬菌体启动子, T7 转录终止子和痘苗病毒 TK 基因的两个分支,一个位于这个启动子上游,另一个位于终止子的下游(本领域技术人员可以参考 Fuerst 等, Molecular and Cellular Biology, 1987, 7, 2538-2544 来构建 pBG200)。在质粒 pBG200 上 BamHI 插入位点位于 T7 启动子和终止子之间。

[0310] 用实施例 6 所述技术进行重组。用寡核苷酸 JCA305 和 JCA308 通过 PCR 反应筛选阳性斑。扩增斑,获得的重组病毒原种被命名为 vV105。

[0311] 在 -20°C 或 -70°C 保藏重组病毒原种。

[0312] 实施例 9 :体外表达 O, C, 和 A 型的重组痘苗病毒的构建

[0313] 如实施例 8 所述进行 O, C, A 型口蹄疫病毒用于体外表达的重组痘苗病毒的构建。

[0314] 对于 O 型:

[0315] 用限制性酶 EcoRV 和 BglIII 消化质粒 pJCA162( 实施例 4)。分离后,通过用 Klenow 聚合酶处理,把约 3450bp 大小的 EcoRV-BglIII 片段制成平末端,然后连接到质粒 pBG200 上(质粒 pBG200 预先用 BamHI 消化,而且通过用 Klenow 聚合酶处理制成平末端)产生供体质粒 pJCA172。

[0316] 用寡核苷酸 JCA309 和 JCA312 通过 PCR 反应筛选斑,扩增斑,获得的重组病毒原种被命名为 vV106。

[0317] 对于 C 型:

[0318] 用限制性酶 EcoRV 和 BglIII 消化质粒 pJCA163( 实施例 4)。分离后,通过用 Klenow 聚合酶处理,把约 3440bp 大小的 EcoRV-BglIII 片段制成平末端,然后连接到质粒 pBG200 上(质粒 pBG200 预先用 BamHI 消化,而且通过用 Klenow 聚合酶处理制成平末端),产生供体质粒 pJCA173。

[0319] 用寡核苷酸 JCA313 和 JCA316 通过 PCR 反应筛选斑,扩增斑,获得的重组病毒原种被命名为 vV107。

[0320] 对于 A 型:

[0321] 用限制性酶 EcoRV 和 BglIII 消化质粒 pJCA164( 实施例 4)。分离后,通过用 Klenow 聚合酶处理,把约 3520bp 大小的 EcoRV-BglIII 片段制成平末端,然后连接到质粒 pBG200 上(质粒 pBG200 预先用 BamHI 消化,而且通过用 Klenow 聚合酶处理制成平末端),产生供体质粒 pJCA174。

[0322] 用寡核苷酸 JCA317 和 JCA320 通过 PCR 反应筛选斑,扩增斑,获得的重组病毒株被命名为 vV108。

[0323] A 型变种:

[0324] 用限制性酶 EcoRV 和 BglIII 消化质粒 pJCA165( 实施例 5)。分离后,通过用 Klenow

聚合酶处理,把约 3450bp 大小的 EcoRV-BglIII 片段制成平末端,然后连接到质粒 pBG200 上(质粒 pBG200 预先用 BamHI 消化,而且通过用 Klenow 聚合酶处理制成平末端),产生供体质粒 pJCA175。

[0325] 用寡核苷酸 JCA317 和 JCA312 通过 PCR 反应筛选斑,扩增斑,获得的重组病毒原种被命名为 vV109。

[0326] 实施例 10:空病毒衣壳的产生和纯化

[0327] 在 37°C,在有 10% 胎牛血清,2mM 谷氨酰胺,500UI/ $\mu$ g/ml 青霉素/链霉素,12.5 $\mu$ g/ml 两性霉素补料的 20ml DMEM 培养基的 12 个 175cm<sup>2</sup>Falcons 中培养兔肾细胞 RK13(可从美国典型培养物保藏中心(ATCC),保藏号 CCL-37 得到)。在铺满时,每个 Falcon 含有约  $2 \times 10^7$  个细胞。

[0328] 然后,在每个 Falcon 中以 10DICC50/细胞的感染复数(moi)加入每个重组痘苗病毒 vTF7-3 和 vV108(实施例 9)。

[0329] 在 37°C 维持病毒培养物约 24 小时,直到获得 100% 致细胞病变效应。

[0330] 重组痘苗病毒 vTF7-3(可从美国典型培养物保藏中心(ATCC),保藏号 VR-2153 得到)含有痘苗病毒(Fuerst 等,1986,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8122-8126)p7.5K 启动子控制下的噬菌体 T7RNA 聚合酶。

[0331] T7RNA 聚合酶的产生诱导 T7 启动子控制下插入物的表达。因此,产生口蹄疫病毒 P1 前体和 3C 蛋白酶,同时空衣壳自我装配。

[0332] 然后,收集病毒悬浮液,通过离心澄清(每分钟 4,000 转(rpm),4°C 下,30 分钟)。

[0333] 在 0°C,30ml 含有 0.5% 乙基苯基聚乙二醇(NP40)(Roche, Cat. No. 1754599)的磷酸缓冲液(40mM 磷酸钠,100mM 氯化钠, pH7.6)中重悬浮残渣。在 0°C,在冰上进行细胞溶解 20 分钟。

[0334] 在 4°C,10000rpm 离心 20 分钟后,收集细胞碎屑。在 0°C,冰上保存上清液。在 6ml 磷酸缓冲液中重悬浮细胞碎屑。用氯仿(等体积)进行提取。从这个提取获得的水相与先前获得上清液混合,堆放在 15% 蔗糖垫(2ml)上,用 Beckman SW28 转子(28000rpm,5 小时,4°C)离心。吸取残渣在 1ml 磷酸缓冲液中,贮藏在 4°C。

[0335] 重悬浮得到的残渣,然后用 20 $\mu$ l RNase(10mg/ml)在冰上处理 10 分钟。然后加 10 $\mu$ l 10% 乙基苯基聚乙二醇(NP40),该混合物在冰上放置 10 分钟。然后,用等体积氯仿提取悬浮液。回收水相(1ml),放在 15-45% 蔗糖梯度(约 12ml)上,用 Beckman SW40 转子(40000rpm,5 小时,12°C 或 18000rpm,16 小时,12°C)离心。

[0336] 然后,分级梯度成 14 个 0.8ml 级分。在波长 220nm 下,测量吸收值。收集与吸收峰对应的级分。这些级分含有空病毒衣壳 A24。通过蛋白质印迹(Western Blot)检验收集的蛋白特异性。

[0337] 通过这个实施例所述完全相同方法,通过分别用 vV106(实施例 9),vV105(实施例 8),vV107(实施例 9)和 vV109(实施例 9)替代重组痘苗病毒 vV108 得到亚型 01K, A10, C Spain 0lot 及 A24/A10 的空病毒衣壳。

[0338] 应用在疫苗中之前,在 4°C 保藏由此获得的蛋白质级分。

[0339] 实施例 11:亚单位疫苗的产生

[0340] 用 14.01ml DMEM 配制实施例 10 获得的 13.2ml 含有总计 165g 空口蹄疫病毒衣壳

的蔗糖梯度级分,所述 DMEM 还含有 27.5ml 1.5% 氢氧化铝 ( $Al(OH)_3$ ) 和 0.29ml 皂苷。

[0341] 由此得到 55ml 在两个烧瓶间分配,第一个烧瓶 30ml,第二个烧瓶 25ml。5ml 剂量含有  $15 \mu g$  空病毒衣壳,同时含有 360 溶血单位的皂苷。

[0342] 用牛血清白蛋白溶液 (BSA) 做对照,通过分光光度测定法测定 220nm 吸收测定空颗粒量。

[0343] 实施例 12 :重组疫苗的产生

[0344] 为了制备疫苗,重组痘苗病毒 vV100 到 vV105 (实施例 6 和 7) 可与卡波姆溶液混合。优选卡波姆是 BF Goodrich, Ohio, USA 的 Carbopol™ 974P (分子量约为 3000000)。

[0345] 首先,在含有 1g/L 氯化钠的蒸馏水中制备 1.5% Carbopol™ 974P 母液。然后用这个母液在生理盐水中制备 4mg/ml 的 Carbopol™ 974P 溶液。用适量生理盐水一步或连续多步混合该母液,每步用 1N (或更浓的) 氢氧化钠溶液调 pH 以获得最终 pH7.3-7.4。

[0346] 由此获得的备用 Carbopol™ 974P 溶液可用于吸收冻干重组病毒或稀释重组病毒浓缩母液。例如,为了获得每 1ml 剂量含有  $10^8$  pfu 病毒悬浮液,稀释病毒母液获得  $10^8$  pfu/ml 效价,然后用等份所述备用 4mg/ml Carbopol™ 974P 溶液稀释它。

[0347] 实施例 13 :DNA 疫苗的产生

[0348] 如 Sambrook 等 (1989) 所述,通过乙醇沉淀浓缩含有一个或多个质粒 pJCA161 到 pJCA165 (实施例 3 到 4) 的 DNA 溶液。溶解 DNA 残渣到 0.9% NaCl 溶液中以获得 1mg/ml 浓度。通过溶解 DMRIE-DOPE 冻干物在适量无菌水 (DMRIE 或 N-(2-羟乙基)-N,N-二甲基-2,3-双(十四烷氧基)-1-丙铵) (WO-A-9634109); DOPE 或二油酰-磷脂酰基-乙醇胺 (Behr J. P., 1994, Bioconjugate Chemistry, 5, 382-389) 中制备 0.75mM DMRIE-DOPE 溶液。

[0349] 通过用 0.9% NaCl 中的 1mg/ml DNA 溶液稀释等部分 0.75mM DMRIE-DOPE 溶液形成质粒 DNA-脂质复合物。用弯形 26G 针沿含阳离子脂溶液的烧瓶壁逐步加 DNA 溶液,防止起泡沫。两种溶液一混合就轻轻摇动烧瓶。最后,获得含有 0.375mM DMRIE-DOPE 和  $500 \mu g/ml$  质粒的组合物。

[0350] 对此前所述所有程序,所用所有溶液应该处于周围环境温度中。在免疫动物前, DNA/DMRIE-DOPE 复合在环境温度下进行 30 分钟。

[0351] 实施例 14 :对牛的实验

[0352] 给一组 6 头牛施用抗口蹄疫病毒 A24 疫苗,所述疫苗是在实施例 11 中从由 vV109 表达的空病毒衣壳获得的。

[0353] 通过皮下途径,在颈部每一侧,对着肩部进行注射。前 5 头动物给 5ml 剂量 ( $2 \times 2.5ml$ ),第 6 头牲畜给 4ml ( $2 \times 2.0ml$ )。在第 6 头动物耳上刺标记“UC10”。

[0354] 在第一次接种后 31 天,通过皮下途径,在每头动物颈部每一侧进行二次注射。(前 5 头牲畜 4ml ( $2 \times 2.0ml$ ),第 6 头牲畜 0.5ml ( $2 \times 0.25ml$ ))。

[0355] 在第 0 (第一次接种当天),6,13,20,31,38,42,52 天及临屠宰前,从接种牲畜采集血样。

[0356] 用 A24 口蹄疫病毒以  $10^{4.4}$  感染剂量 /ml 的效价 (在牛甲状腺细胞上的效价),通过舌皮内途径 (intradermolingual route) (每个舌头  $10 \times 0.10ml$ ) 攻击所有接种动物和 2 头非接种对照动物。

[0357] 每天检查每头动物温度 (表 2) 及舌,口和蹄上的口蹄疫症状 (表 1)。检验抗口蹄

疫病毒 A24 中和抗体的水平。

[0358] 表 1 :病毒攻击后,牛中口蹄疫临床症状的检验

[0359]

动物 / 攻击后的天数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
接种的 UC6	T0	T1	T1	T1	T1	T1	ND	T1	T0	ND	T0
	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0		4F0	4F0		4F0
接种的 UC7	T0	T1	T1	T1	T1	T1	ND	T1	T0	ND	T0
	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0		4F0	4F0		4F0
接种的 UC8	T0	T1	T1	T1	T1	T1	ND	T1	T0	ND	T0
	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0		4F0	4F0		4F0
接种的 UC9	T0	T1	T1	T1	T1	T1	ND	T1	T0	ND	T0
	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0		4F0	4F0		4F0
接种的 UC10	T0	T1	T1	T1	T1	T1	ND	T1	T0	ND	T0
	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0		4F0	4F0		4F0
接种的 UC11	T0	T1	T1	T1	T1	T1	ND	T1	T0	ND	T0
	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0		4F0	4F0		4F0
对照 UC79	T0	T1	T2								
	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0	4F+	4F+	4F+	4F+	4F+	4F+
对照 UC80	T0	T1	T2								
	4F0	4F0	4F0	4F0	4F0	4F+	4F+	4F+	4F+	4F+	4F+

[0360] 代码说明：

[0361] T0 :健康舌头,无病毒复制症状,在注射位点无痕迹。

[0362] T1 :健康舌头,无病毒复制症状,在注射位点仅有外伤。

[0363] T2 :在舌头上出现原发损害。

[0364] T3 :在舌头上或口其它部分出现原发和继发性损害。

[0365] 4F0 :在所有四个蹄上无口蹄疫症状。

[0366] 4F+ :在所有四个蹄上出现水疱。

[0367] ND :没进行临床试验。

[0368] 这些结果表明接种的动物都被保护抗口蹄疫病毒 A24 感染,即使在注射位点局部。给较弱加强注射的动物 UC10 与其它动物相比也是被保护的。相反,对照动物易受病毒感染,在攻击后第 2 天在口部及攻击后第 5 天在蹄部产生可见口蹄疫。

[0369] 表 2 :病毒攻击后,检测牛的温度 (°C )

[0370]

动物 / 攻击后 天数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
接种的 UC6	38,6	38,6	38,2	37,9	38,2	38,6	38,5	38,7	38,5	39,1	39,1
接种的 UC7	38,7	38,5	38,4	38,2	38,3	38,2	38,3	38,5	38,6	38,4	38,0
接种的 UC8	38,3	39,0	38,3	38,5	38,6	38,6	38,5	38,3	38,2	38,0	38,6
接种的 UC9	38,8	38,7	39,0	38,6	38,4	38,5	38,3	38,4	38,6	38,8	39,0
接种的 UC10	39,3	38,8	38,9	38,6	38,6	38,7	38,8	39,0	38,7	39,2	39,1
接种的 UC11	38,6	38,8	38,4	38,3	38,3	38,0	38,2	38,0	38,3	38,7	38,8
对照 UC79	39,0	40,7	41,0	39,5	39,6	38,8	38,4	38,6	38,4	38,6	38,8
对照 UC80	39,1	39,8	40,6	39,9	39,4	38,9	38,6	38,5	38,9	38,8	38,6

[0371] 这些结果表明接种的牛不存在任何高热,即使给予比其它动物较弱加强注射的动物 UC10 也不存在任何高热。相反,对照牛有高热,攻击后两天达到高峰,接着返回正常体温。

[0372] 图 1 表示接种的牛产生中和性抗口蹄疫病毒 A24 抗体的强应答,初次接种后大约 13 天出现第一个高峰。加强注射后,观察到中和抗体的强应答。在给予与其它动物相比较弱的加强注射的动物 UC10 中也观察到这种应答。攻击后,抗体水平不增加,表明 FDMV A24 病毒没有进行足以刺激抗体应答的复制。

[0373] 总之,从重组痘苗病毒表达载体获得的空病毒衣壳产生的抗口蹄疫 A24 疫苗在牛中诱导初次免疫应答和二次免疫应答。攻击后,这些牛完全被保护抗口蹄疫和病毒复制。

[0374] 实施例 15 :A10 构建物的诱变

[0375] 用寡核苷酸和 PCR 反应进行针对 A10 构建物的诱变,目的是用编码半胱氨酸的密码子置换编码组氨酸 179(质粒 pJCA161 编码的多蛋白中的位置,实施例 3;甲硫氨酸起始密码子序号是 1) 的密码子。

[0376] 用质粒 pJCA161 作为模板和下面寡核苷酸:

[0377] JCA309(37mer)(SEQ ID NO 5)

[0378] 和 JCA330(27mer)(SEQ ID NO 26):

[0379] 5' TGAGTCCACCAGGCACCCGAAGACACC 3'

[0380] 进行 PCR 反应,扩增 559bp 片段,这个片段称为片段 L。

[0381] PCR 反应第一循环条件是:95°C,2 分钟,然后 62°C,2 分钟,然后 72°C,3 分钟。

[0382] 后面 35 个循环 PCR 反应条件与实施例 6 所述是同样的。

[0383] 用质粒 pJCA161 作为模板和下面寡核苷酸:

[0384] JCA331(27mer)(SEQ ID NO 27):

[0385] 5' GGTGTCTTCGGTGCCTGGTGGACTCA 3'

- [0386] 和 JCA332 (36mer) (SEQ ID NO 28) :
- [0387] 5' AAAGTCTTTGCCGGCGCTAGCCGACACTAACAAGGT 3'
- [0388] 进行二次 PCR 反应, 扩增 1020bp 片段, 这个片段称为片段 M。
- [0389] PCR 反应条件同实施例 6 所述。
- [0390] 用片段 L 和 M 作为模板, 与寡核苷酸 JCA309 (SEQ ID NO 5) 和 JCA332 (SEQ ID NO 28) 进行第三次 PCR 反应, 扩增 1552bp 片段。PCR 反应条件同实施例 6 所述。
- [0391] 然后, 用 EcoRV 和 NheI 消化这个片段, 琼脂糖凝胶电泳后, 分离 1527bp 片段 EcoRV-NheI。这个片段称为片段 N。
- [0392] 用 NheI, 然后是 EcoRV 消化质粒 pJCA161, 琼脂糖凝胶电泳后, 分离约 6800bp 片段 NheI-EcoRV。将这个片段和片段 N 连接在一起产生质粒 pJCA176 (8327bp)。这个质粒含有编码部分多蛋白 A10 的插入物, 该部分多蛋白足以产生具有自我装配能力的热稳定突变衣壳蛋白。
- [0393] 根据实施例 8, 用质粒 pJCA176 构建重组痘苗病毒, 在这种情况下, 从质粒 pJCA176, 而不是从质粒 pJCA161 获得片段 EcoRV-BglIII。由此获得的重组病毒称为 vV110。
- [0394] 实施例 16 : 01K 构建物的诱变
- [0395] 如实施例 15 所述, 用寡核苷酸和 PCR 反应进行针对 01K 构建物的诱变, 目的是用编码半胱氨酸的密码子置换编码丝氨酸 179 (质粒 pJCA162 编码的多蛋白中的位置, 实施例 4 ; 甲硫氨酸起始密码子序号是 1) 的密码子。
- [0396] 用质粒 pJCA162 作为模板和下面寡核苷酸 :
- [0397] JCA305 (37mer) (SEQ ID NO 1)
- [0398] 和 JCA333 (27mer) (SEQ ID NO 29) :
- [0399] 5' CGAGTCAGTCAGGCAGCCGTAGACACC 3'
- [0400] 进行 PCR 反应, 扩增 559bp 片段, 这个片段称为片段 O。
- [0401] 用质粒 pJCA162 作为模板和下面寡核苷酸 :
- [0402] JCA334 (27mer) (SEQ ID NO 30) :
- [0403] 5' GGTGTCTACGGCTGCCTGACTGACTCG 3'
- [0404] 和 JCA335 (36mer) (SEQ ID NO 31) :
- [0405] 5' AGACGTCCGTGTGTTGGCGCCTCTGGATCTGTGTTT 3'
- [0406] 进行二次 PCR 反应, 扩增 1147bp 片段, 这个片段称为片段 P。
- [0407] 用片段 O 和 P 作为模板, 与寡核苷酸 JCA305 (SEQ ID NO 1) 和 JCA335 (SEQ ID NO 31) 进行第三次 PCR 反应, 扩增 1679bp 片段。
- [0408] 然后, 用 EcoRV 和 NarI 消化这个片段, 琼脂糖凝胶电泳后, 分离 1654bp 片段 EcoRV-NarI。这个片段称为片段 Q。
- [0409] 用 NarI, 然后是 EcoRV 消化质粒 pJCA162, 琼脂糖凝胶电泳后, 分离约 6670bp 片段 NarI-EcoRV。将这个片段和片段 Q 连接在一起产生质粒 pJCA177 (8327bp)。这个质粒含有编码部分多蛋白 01K 的插入物, 该部分多蛋白足以产生具有自我装配能力的热稳定突变衣壳蛋白。
- [0410] 根据实施例 9, 用质粒 pJCA177 构建重组痘苗病毒, 在这种情况下, 从质粒 pJCA177, 而不是从质粒 pJCA162 获得的片段 EcoRV-BglIII。因此获得的重组病毒称为

vV111。

[0411] 实施例 17 :C Spain 0lot 构建物的诱变

[0412] 如实施例 15 所述,用寡核苷酸和 PCR 反应进行针对 C Spain 0lot 构建物的诱变,目的是用编码半胱氨酸的密码子置换编码甘氨酸 179(质粒 pJCA163 编码的多蛋白中的位置,实施例 4;甲硫氨酸起始密码子序号是 1) 的密码子。

[0413] 用质粒 pJCA163 作为模板和下面寡核苷酸:

[0414] JCA313(37mer)(SEQ ID NO 9)

[0415] 和 JCA336(27mer)(SEQ ID NO 32):

[0416] 5' TGACTTGACGAGGCACCCGTAAACACC 3'

[0417] 进行 PCR 反应,扩增 559bp 片段,这个片段称为片段 R。

[0418] 用质粒 pJCA163 作为模板和下面寡核苷酸:

[0419] JCA337(27mer)(SEQ ID NO 33):

[0420] 5' GGTGTTTACGGGTGCCTCGTCAAGTCA 3'

[0421] 和 JCA338(36mer)(SEQ ID NO 34):

[0422] 5' GTAGTACTGGGCCAAGCCGGCCAAGTAGGTGTTTGA 3'

[0423] 进行二次 PCR 反应,扩增 681bp 片段,这个片段称为片段 S。

[0424] 用片段 R 和 S 作为模板,与寡核苷酸 JCA313(SEQ ID NO 9) 和 JCA338(SEQ ID NO 34) 进行第三次 PCR 反应,扩增 1213bp 片段。

[0425] 然后,用 EcoRV 和 NaeI 消化这个片段,琼脂糖凝胶电泳后,分离约 1190bp 片段 EcoRV-NaeI。这个片段称为片段 T。

[0426] 用 NaeI,然后是 EcoRV 消化质粒 pJCA163,琼脂糖凝胶电泳后,分离约 7120bp 片段 NaeI-EcoRV。将这个片段和片段 T 连接在一起产生质粒 pJCA178(8312bp)。质粒 pJCA178 含有编码多蛋白 C Spain 0lot 一部分的插入物,这个多蛋白质部分足以产生具有自我装配能力的热稳定突变衣壳蛋白。

[0427] 根据实施例 9,用质粒 pJCA178 构建重组痘苗病毒,在这种情况下,从质粒 pJCA178,而不是从质粒 pJCA163 获得片段 EcoRV-BglIII。因此获得的重组病毒称为 vV112。

[0428] 实施例 18 :A24 构建物的诱变

[0429] 如实施例 15 所述,用寡核苷酸和 PCR 反应进行针对 A24 构建物的诱变,目的是用编码半胱氨酸的密码子置换编码组氨酸 179(质粒 pJCA164 编码的多蛋白中的位置,实施例 4;甲硫氨酸起始密码子序号是 1) 的密码子。

[0430] 用质粒 pJCA164 作为模板和下面寡核苷酸:

[0431] JCA317(37mer)(SEQ ID NO 13)

[0432] 和 JCA339(27mer)(SEQ ID NO 35):

[0433] 5' CGAGTCCACCAAGCATCCAAAGACACC 3'

[0434] 进行 PCR 反应,扩增 559bp 片段,这个片段称为片段 U。

[0435] 用质粒 pJCA164 作为模板和下面寡核苷酸:

[0436] JCA340(27mer)(SEQ ID NO 36):

[0437] 5' GGTGTCTTTGGATGCTTGGTGGACTCG 3'

[0438] 和 JCA341(36mer)(SEQ ID NO 37):

[0439] 5' CCCAGGGTAGTTAGTCCTAGGCGGGTTGTACACCTT 3'

[0440] 进行二次 PCR 反应, 扩增 507bp 片段, 这个片段称为片段 V。

[0441] 用片段 U 和 V 作为基质, 与寡核苷酸 JCA317 (SEQ ID NO 13) 和 JCA341 (SEQ ID NO 37) 进行第三次 PCR 反应, 扩增 1039bp 片段。

[0442] 然后, 用 EcoRV 和 BlnI 消化这个片段, 琼脂糖凝胶电泳后, 分离约 1014bp 片段 EcoRV-BlnI。这个片段称为片段 W。

[0443] 用 BlnI, 然后是 EcoRV 消化质粒 pJCA164, 琼脂糖凝胶电泳后, 分离约 7360bp 片段 BlnI-EcoRV。将这个片段和片段 W 连接在一起产生质粒 pJCA179 (大小约 8400bp)。这个质粒含有编码多蛋白 A24 一部分的插入物, 这个多蛋白部分足以产生具有自我装配能力的热稳定突变衣壳蛋白。

[0444] 根据实施例 9, 用质粒 pJCA179 构建重组痘苗病毒, 在这种情况下, 从质粒 pJCA179, 而不是从质粒 pJCA164 获得片段 EcoRV-BglIII。因此获得的重组病毒称为 vV113。

[0445] 实施例 19 : 热稳定空病毒衣壳的产生和纯化

[0446] 通过实施例 10 所述完全相同的方法, 通过分别用 vV110 (实施例 15), vV111 (实施例 16), vV112 (实施例 17) 和 vV113 (实施例 18) 替代重组痘苗病毒 Vv108 得到亚型 A10, 01K, C Spain 01ot 及 A24 的修饰空病毒衣壳。

[0447] 实施例 20 : 检验热稳定性

[0448] 制备和定量 10 个含有口蹄疫病毒 A10 的修饰空病毒衣壳 (实施例 19) 的试管。每管含有 0.5ml 磷酸缓冲液, pH7.6 中的 0.8 μg 衣壳。

[0449] 放置这 10 支试管在 50°C 水浴中 1 小时。然后冷却它们。放每个衣壳样品在蔗糖梯度上 (15-35%), 12°C 离心 2.5 小时 (Beckman SW40 转头, 40000rpm)。得到的每个梯度分级为 1ml 的 12 个级分。0.5ml 每个级分在 1ml 纯乙醇中 -20°C 沉淀 16 小时。

[0450] 收集沉淀, 干燥, 在加样缓冲液 (Maniatis 等, 1982, 《Molecular cloning : a Laboratory manual》, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA) 中重悬浮, 在 SDS-PAGE 10% 丙烯酰胺凝胶电泳上电泳。转移后, 用本质上与蛋白质 VP1 反应的抗 -140S A10 多克隆豚鼠抗体显示蛋白质带。

[0451] 空衣壳迁移在梯度中级分 7 和 8 内, 而降解的空衣壳靠近梯度水平上部位于级分 11 内。

[0452] 蛋白质印迹 (Western) (图 2) 表明与突变体对应的空衣壳总是在 50°C 1 小时后 (凝胶 A) 被装配, 而非突变空衣壳如期望一样被降解, 不能抵抗热处理 (凝胶 B)。

[0453] 实施例 21 : 生产含有口蹄疫病毒热稳定空衣壳的亚单位疫苗

[0454] 通过进行与实施例 11 类似的方法, 用修饰的空病毒衣壳 (实施例 19) 替代未修饰空病毒衣壳, 获得含有口蹄疫病毒亚型 01K, A10, C Spain 01ot 和 A24 的修饰空病毒衣壳的疫苗。

[0455] 应当认识到, 如所附权利要求所限定的本发明不限于前述说明书所述特定实施方式, 而包括本发明范围和本质中的所有变形。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; MERIAL

&lt;120&gt; 抗口蹄疫疫苗

&lt;130&gt; FMDV pseudoparticules

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 41

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列说明: 寡核苷酸

&lt;400&gt; 1

ttttgatatc atgggtgctg ggcagtccag cccagca  
37

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列说明: 寡核苷酸

&lt;400&gt; 2

ttcacgacga aagtactatc c  
21

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列说明: 寡核苷酸

[0002]

<400> 3  
ctgaaggacc ctactccggg c  
21

<210> 4  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 4  
ttttgatct tcaaagcttt gttttgcgca tcacgtg  
37

<210> 5  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 5  
ttttgatatc atgggggctg gacaatccag tccagcg  
37

<210> 6  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 6  
ttcacgacga aggtgctgtc c  
21

<210> 7  
<211> 18  
<212> DNA

[0003]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 7

aaggacccta cgccggac

18

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 8

ttttagatct tcaaagcttg gttttgcgca tcac

34

<210> 9

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 9

ttttgatatc atgggagctg ggcaatccag cccagcg

37

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 10

ttcagacaa acgtgctgtc cag

23

[0004]

- <210> 11  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸
- <400> 11  
agagcaaccg caagctgaag g  
21
- <210> 12  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸
- <400> 12  
ttttagatct tcaaagcttg gttttgcgca ttac  
34
- <210> 13  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸
- <400> 13  
ttttgatatc atgggggccc ggcaatccag tccggcg  
37
- <210> 14  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

[0005]

<400> 14  
ttttctcgag gggggccggc acgtgaaaga g  
31

<210> 15  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 15  
ttttctcgag ggaccggtga agaagcctgt c  
31

<210> 16  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 16  
ttttgatct tcagcggcgg aacagcgctt tgcctc  
37

<210> 17  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 17  
tttgacctaa cgtcggagaa gaag  
24

<210> 18  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 18

ttttgaattc atgcagtcca gccagcaac cggctcg  
37

<210> 19

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 19

ttttgaattc ataaaaatca aagctttggt ttgcgcatca cgtg  
44

<210> 20

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 20

ttttgaattc atgggggctg gacaatccag tccagcg  
37

<210> 21

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 21

ttttgaattc ataaaaatca aagcttggt ttgcgcatca c  
41

<210> 22

[0007]

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 22

ttttgaattc atgggagctg ggcaatccag cccagcg  
37

<210> 23

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 23

ttttgaattc ataaaaatca aagcttggtt ttgcgcatta c  
41

<210> 24

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 24

ttttgaattc atgggggccc ggcaatccag tccggcg  
37

<210> 25

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 25

ttttgaattc ataaaaatca gcggcggaac agcgcttgt cctc

[0008]

44

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列说明: 寡核苷酸

&lt;400&gt; 26

tgagtccacc aggcacccga agacacc  
27

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列说明: 寡核苷酸

&lt;400&gt; 27

ggtgtcttcg ggtgcctggt ggactca  
27

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列说明: 寡核苷酸

&lt;400&gt; 28

aaagtctttg ccggcgctag ccgacactaa caaggt  
36

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列说明: 寡核苷酸

[0009]

<400> 29  
cgagtcagtc aggcagccgt agacacc  
27

<210> 30  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 30  
ggtgtctacg gctgcctgac tgactcg  
27

<210> 31  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 31  
agacgtccgt gtggtggcgc ctctggatct gtgttt  
36

<210> 32  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 32  
tgacttgacg aggcacccgt aaacacc  
27

<210> 33  
<211> 27  
<212> DNA

[0010]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 33

ggtgtttacg ggtgcctcgt caagtca  
27

<210> 34

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 34

gtagtactgg gccaaagccgg ccaagtaggt gtttga  
36

<210> 35

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 35

cgagtccacc aagcatccaa agacacc  
27

<210> 36

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 36

ggtgtctttg gatgcttggt ggactcg  
27

[0011]

<210> 37  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 37  
 cccagggtag ttagtcctag'gcgggttgta cacctt  
 36

<210> 38  
 <211> 1148  
 <212> PRT  
 <213> 口蹄疫病毒

<400> 38  
 Met Gly Ala Gly Gln Ser Ser Pro Ala Thr Gly Ser Gln Asn Gln Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Asn Thr Gly Ser Ile Ile Asn Asn Tyr Tyr Met Gln Gln Tyr Gln  
 20 25 30  
 Asn Ser Met Ser Thr Gln Leu Gly Asp Asn Thr Ile Ser Gly Gly Ser  
 35 40 45  
 Asn Glu Gly Ser Thr Asp Thr Thr Ser Thr His Thr Thr Asn Thr Gln  
 50 55 60  
 Asn Asn Asp Trp Phe Ser Lys Leu Ala Ser Ser Ala Phe Thr Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Phe Gly Ala Leu Leu Ala Asp Lys Lys Thr Glu Glu Thr Thr Leu Leu  
 85 90 95  
 Glu Asp Arg Ile Leu Thr Thr Arg Asn Gly His Thr Thr Ser Thr Thr  
 100 105 110  
 Gln Ser Ser Val Gly Val Thr Tyr Gly Tyr Ser Thr Glu Glu Asp His  
 115 120 125  
 Val Ala Gly Pro Asn Thr Ser Gly Leu Glu Thr Arg Val Val Gln Ala  
 130 135 140  
 Glu Arg Phe Phe Lys Lys Phe Leu Phe Asp Trp Thr Thr Asp Lys Pro  
 145 150 155 160  
 Phe Gly Tyr Leu Thr Lys Leu Glu Leu Pro Thr Asp His His Gly Val

[0012]

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

[0013]

His Ala Glu Trp Asp Thr Gly Leu Asn Ser Lys Phe Thr Phe Ser Ile  
 450 455 460

Pro Tyr Val Ser Ala Ala Asp Tyr Ala Tyr Thr Ala Ser Asp Thr Ala  
 465 470 475 480

Glu Thr Thr Asn Val Gln Gly Trp Val Cys Val Tyr Gln Ile Thr His  
 485 490 495

Gly Lys Ala Glu Asn Asp Thr Leu Leu Val Ser Ala Ser Ala Gly Lys  
 500 505 510

Asp Phe Glu Leu Arg Leu Pro Ile Asp Pro Arg Thr Gln Thr Thr Thr  
 515 520 525

Thr Gly Glu Ser Ala Asp Pro Val Thr Thr Thr Val Glu Asn Tyr Gly  
 530 535 540

Gly Asp Thr Gln Val Gln Arg Arg His His Thr Asp Val Gly Phe Ile  
 545 550 555 560

Met Asp Arg Phe Val Lys Ile Asn Ser Leu Ser Pro Thr His Val Ile  
 565 570 575

Asp Leu Met Gln Thr His Lys His Gly Ile Val Gly Ala Leu Leu Arg  
 580 585 590

Ala Ala Thr Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Glu Ile Val Val Arg His Asp  
 595 600 605

Gly Asn Leu Thr Trp Val Pro Asn Gly Ala Pro Glu Ala Ala Leu Ser  
 610 615 620

Asn Thr Ser Asn Pro Thr Ala Tyr Asn Lys Ala Pro Phe Thr Arg Leu  
 625 630 635 640

Ala Leu Pro Tyr Thr Ala Pro His Arg Val Leu Ala Thr Val Tyr Asp  
 645 650 655

Gly Thr Asn Lys Tyr Ser Ala Ser Asp Ser Arg Ser Gly Asp Leu Gly  
 660 665 670

Ser Ile Ala Ala Arg Val Ala Thr Gln Leu Pro Ala Ser Phe Asn Tyr  
 675 680 685

Gly Ala Ile Gln Ala Gln Ala Ile His Glu Leu Leu Val Arg Met Lys  
 690 695 700

Arg Ala Glu Leu Tyr Cys Pro Arg Pro Leu Leu Ala Ile Lys Val Thr  
 705 710 715 720

[0014]

Ser Gln Asp Arg Tyr Lys Gln Lys Ile Ile Ala Pro Ala Lys Gln Leu  
 725 730 735  
 Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Leu  
 740 745 750  
 Gly Pro Phe Phe Phe Ala Asp Val Arg Ser Asn Phe Ser Lys Leu Val  
 755 760 765  
 Asp Thr Ile Asn Gln Met Gln Glu Asp Met Ser Thr Lys His Gly Pro  
 770 775 780  
 Asp Phe Asn Arg Leu Val Ser Ala Phe Glu Glu Leu Ala Thr Gly Val  
 785 790 795 800  
 Lys Ala Ile Arg Thr Gly Leu Asp Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Lys Leu  
 805 810 815  
 Ile Lys Leu Leu Ser Arg Leu Ser Cys Met Ala Ala Val Ala Ala Arg  
 820 825 830  
 Ser Lys Asp Pro Val Leu Val Ala Ile Met Leu Ala Asp Thr Gly Leu  
 835 840 845  
 Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Arg Ala Lys Leu Pro Gln Gln Glu  
 850 855 860  
 Gly Pro Tyr Ala Gly Pro Met Glu Arg Gln Lys Pro Leu Lys Val Lys  
 865 870 875 880  
 Val Lys Ala Pro Val Val Lys Glu Gly Pro Tyr Glu Gly Pro Val Lys  
 885 890 895  
 Lys Pro Val Ala Leu Lys Val Lys Ala Arg Asn Leu Ile Val Thr Glu  
 900 905 910  
 Ser Gly Ala Pro Pro Thr Asp Leu Gln Lys Met Val Met Gly Asn Thr  
 915 920 925  
 Lys Pro Val Glu Leu Asn Leu Asp Gly Lys Thr Val Ala Ile Cys Cys  
 930 935 940  
 Ala Thr Gly Val Phe Gly Thr Ala Tyr Leu Val Pro Arg His Leu Phe  
 945 950 955 960  
 Ala Glu Lys Tyr Asp Lys Ile Met Leu Asp Gly Arg Ala Met Thr Asp  
 965 970 975  
 Ser Asp Tyr Arg Val Phe Glu Phe Glu Ile Lys Val Lys Arg Thr Gly  
 980 985 990  
 His Ala Leu Arg Arg Gly Thr His Trp Leu Leu His Arg Gly Asn Cys

[0015]

995	1000	1005
Val Arg Asp Ile Thr Lys His Phe Arg Asp Thr Ala Arg Met Lys Lys 1010	1015	1020
Gly Thr Pro Val Val Gly Val Val Asn Asn Ala Asp Val Gly Arg Leu 1025	1030	1035 1040
Ile Phe Ser Gly Glu Ala Leu Thr Tyr Lys Asp Ile Val Val Cys Met 1045	1050	1055
Asp Gly Asp Thr Met Pro Gly Leu Phe Ala Tyr Lys Ala Ala Thr Arg 1060	1065	1070
Ala Gly Tyr Cys Gly Gly Ala Val Leu Ala Lys Asp Gly Ala Asp Thr 1075	1080	1085
Phe Ile Val Gly Thr His Ser Ala Gly Gly Asn Gly Val Gly Tyr Cys 1090	1095	1100
Ser Cys Val Ser Arg Ser Met Leu Gln Lys Met Lys Ala His Val Asp 1105	1110	1115 1120
Pro Glu Pro His His Glu Gly Leu Ile Val Asp Thr Arg Asp Val Glu 1125	1130	1135
Glu Arg Val His Val Met Arg Lys Thr Lys Leu *	1140	1145

<210> 39  
 <211> 3444  
 <212> DNA  
 <213> 口蹄疫病毒

<400> 39  
 atgggtgctg ggcagtccag cccagcaacc ggctcgcaga accagtctgg caacactggc  
 60  
 agcataatta acaactacta catgcagcaa taccagaact ctatgagcac acagcttggt  
 120  
 gacaatacca tcagtggagg ctccaacgag ggctccacgg acacaacttc aacacacaca  
 180  
 accaacaccc aaaacaacga ctggttttca aaacttgcca gttcggcttt taccggctctg  
 240  
 ttcgggtgcac ttctcgccga caagaagacg gaagagacta cgcttctgga agaccgcatc  
 300  
 ctactaccc gcaacgggca caccacttcg accaccagc cgagtgtggg agtcacgtat  
 360  
 gggactcca ctgaggaaga tcacgttgct gggcccaaca catcgggctt agagacgcgg  
 420  
 gtggtgcagg cagagagatt tttcaagaag tttctgtttg actggacaac ggacaaacct

[0016]

480  
 tttggatact tgacaaaact ggagcttccc accgatcacc acggtgtcct cgggcacctg  
 540  
 gtggactcat atgcatatat gaggaacggc tgggatgttg aggtatctgc cgtcggcaac  
 600  
 cagttcaacg gcgggtgcct tctggtggcc atggtgccag agtggaaaggc atttgacaca  
 660  
 cgtgaaaaat accagcttac ccttttccca caccagttta ttagccccag aactaacatg  
 720  
 actgcccaca tcacgggtacc gtatcttggg gtgaacaggc acgatcagta caagaaacac  
 780  
 aaaccttggg cactgggttg catggtacta tcacccctca cggtcagcaa cactgccgcc  
 840  
 ccacaaatca aggtctacgc caacattgcc ccaacctacg ttcacgtggc tggagagctt  
 900  
 ccctcgaaag aggggatttt ccagttgca tgcgcagacg gttacggagg actggtgaca  
 960  
 acagacccga aaacagctga ccctgtttac ggtaagggtg ataaccgcc caagaccaac  
 1020  
 taccocgggc gctttacaaa cctattggac gtggcogaag catgtcccac ctttcttcgt  
 1080  
 ttcgacgatg ggaaaccgta cgtcgttacg cgggcagacg acaccctct tttggccaag  
 1140  
 tttgatgtct cccttgccgc aaaacacatg tccaacacat acctatcagg gattgcacag  
 1200  
 tactacacac agtactctgg tactatcaac ctgcacttca tgttcacagg ctccactgac  
 1260  
 tcaaaagccc gctacatggt ggcttacatc ccgcctgggg tggagacgcc gccggacaca  
 1320  
 cctgaagaag ctgctcactg cattcacgct gagtgggaca caggactgaa ctccaaattc  
 1380  
 accttttcaa tcccttacgt gtctgccgcg gattacgcgt ataccgcatc tgatacggca  
 1440  
 gagacaacca atgtacaggg atgggtctgt gtttaccaa ttacacacgg gaaggctgaa  
 1500  
 aatgacacct tgttagtgtc ggctagcgc ccgcaaagact ttgagttgcg cctcccaatt  
 1560  
 gacccccgga cacaaccac tactactggg gagtccgcag accctgtcac caccaccgtg  
 1620  
 gagaactacg gcggtgatac acaagtccag agacgtcacc acacggacgt cggcttcatt  
 1680  
 atggaccgat ttgtgaagat aaacagcctg agccccacac atgtcattga cctcatgcaa  
 1740  
 accacaaaac acgggatcgt ggggtgcgta ctgcgtgcag ccacgtacta cttctccgac  
 1800  
 ttggagattg ttgtgcccga cgatggtaat ctgacctggg tgcccaacgg tgccccgag  
 1860  
 gcagccctgt caaacaccag caaccctact gcctacaaca aggcaccgtt cacgagactt  
 1920  
 gctctccctt aactgcgcc acaccgcgtg ttggcaactg tgtacgacgg gacaaacaag  
 1980  
 tactccgcaa gcgattcgag atcaggcgac ctgggggtcca tcgcggcgcg agtcgcgaca

[0017]

2040  
 caacttcctg cttcctttaa ctacggtgca atccaggcac aggccatcca cgagcttctc  
 2100  
 gtgcgcatga aacgggccga gctctactgt cccaggccac ttctagcaat aaaggtgact  
 2160  
 tcgcaagaca ggtacaagca aaagattatt ggcgccgcaa aacagctggt gaactttgac  
 2220  
 ctacttaagt tggcgggtga cgttgagtcc aaccttgggc ccttcttctt cgctgacggt  
 2280  
 aggtcaaact tttcgaagct ggtagacacc atcaatcaga tgcaggagga catgtccaca  
 2340  
 aaacacggac ccgactttaa ccggttggtg tccgcttttg aggaattggc cactgggggtt  
 2400  
 aaagctatca gaaccggtct cgatgaggcc aaaccctggt acaagctcat caagctccta  
 2460  
 agccgtctgt cgtgcatggc cgctgtggca gcacgggtcca aggaccagct ccttgtggcc  
 2520  
 atcatgctgg ccgacaccgg tctcgagcgt cagaaacctc taaaagtgag agccaagctc  
 2580  
 ccacagcagg agggacccta cgctggcccg atggagagac agaaaccgct gaaagtaaaa  
 2640  
 gtaaaagccc cggtcgttaa ggaaggacct tacgagggac cgggtgaagaa gcctgtcgct  
 2700  
 ttgaaagtga aagctaggaa cttgattgtc actgagagtg gtgccccacc gaccgacttg  
 2760  
 cagaagatgg tcatgggcaa cacaagcct gttgagctta acctcgacgg gaagacagta  
 2820  
 gccatctgct gtgctactgg agtggtcggc actgcttacc tcgtgcctcg tcaccttttc  
 2880  
 gcagagaagt atgacaagat tatgttggac ggcagagcca tgacagacag tgattacaga  
 2940  
 gtgtttgagt tcgagattaa agttaaagg acaggacatg ctctcagacg cggcactcat  
 3000  
 tggttgcttc accgtgggaa ctgcgtgaga gacatcacga aacactttcg tgatacagca  
 3060  
 agaatgaaga aaggcacccc cgtcgttggc gttgtcaaca acgccgatgt tgggagactg  
 3120  
 attttctctg gtgaggccct tacctacaag gacattgtag tgtgcatgga tggagacacc  
 3180  
 atgcccggcc tctttgccta caaagccgcc accagggtcg gctactgtgg aggagccggt  
 3240  
 cttgccaagg acggggctga cacattcatc gtcggcactc actctgcagg tggcaatgga  
 3300  
 gttggatact gctcatgcgt ttccaggctc atgcttcaaa agatgaaggc tcacgtcgac  
 3360  
 cctgaaccgc accacgaggg gttgattggt gataccagag atgtggaaga ggcggtccac  
 3420  
 gtgatgcgca aaacaaagct ttga  
 3444

<210> 40

[0018]

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 40

ttttatcgat tcattgatag taccaaat  
28

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

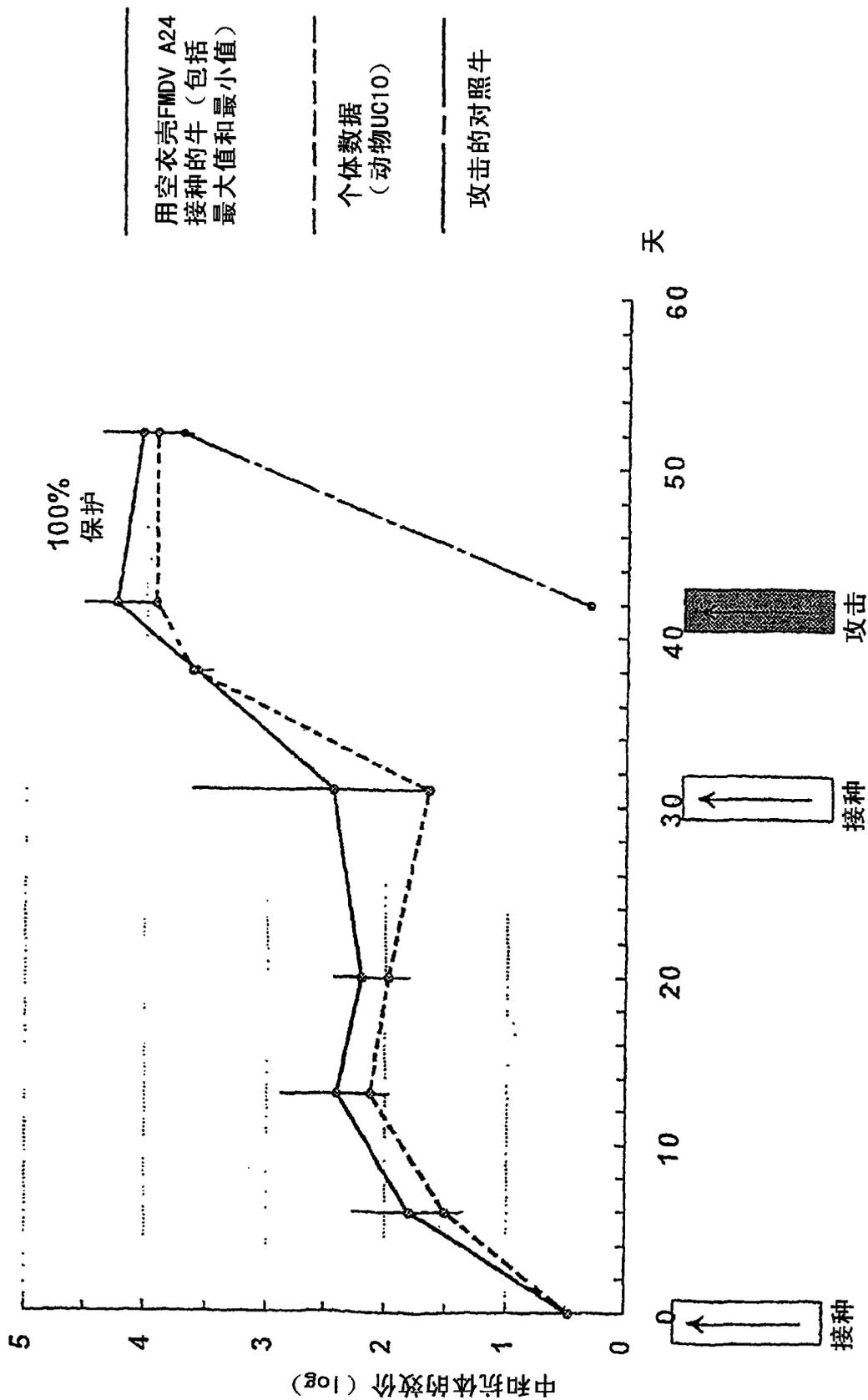
<220>

<223> 人工序列说明: 寡核苷酸

<400> 41

attctacagt tctaacatcc  
20

图1



修饰和未修饰空衣壳的热处理

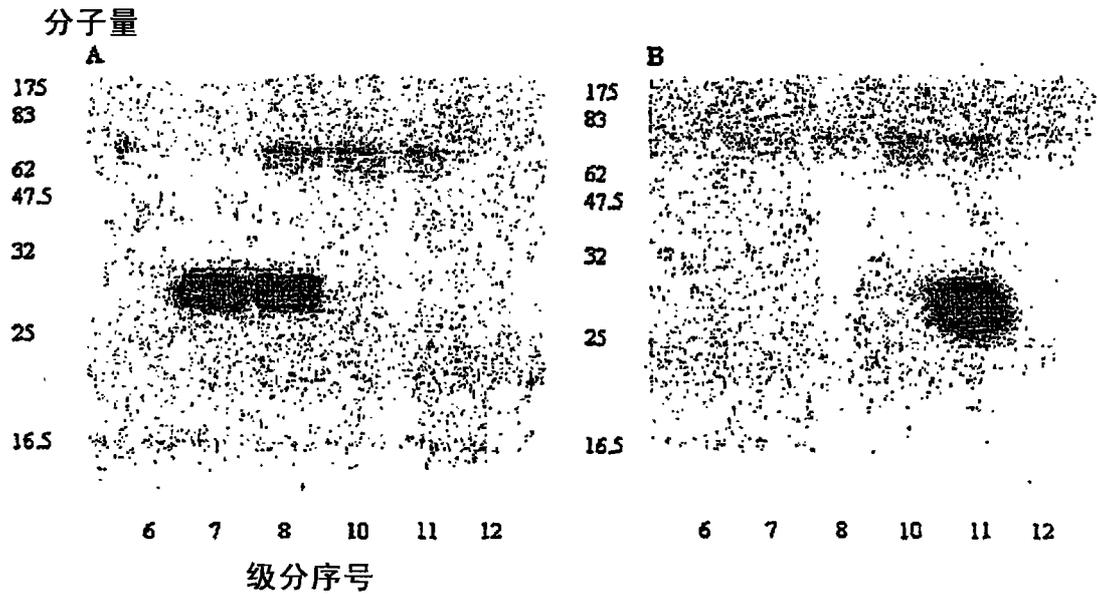


图 2

A. A10 口蹄疫病毒的修饰过的空衣壳

B. A10 口蹄疫病毒的未修饰的空衣壳

1 ATGGGTGCTGGGCAGTCCAGCCCAGCAACCGGCTCGCAGAACCAGTCTGGCAACACTGGCAGCA  
 1 MetGlyAlaGlyGlnSerSerProAlaIleThrGlySerGlnAsnGlnSerGlyAsnIleThrGlySerI  
 65 TAATTAACAACACTACTACATGCAGCAATACCAGAACTCTATGAGCACAACAGCTTGGTGACAAATAC  
 22 IleIleAsnAsnTyrTyrMetGlnGlnTyrGlnAsnSerMetSerIleThrGlnLeuGlyAspAsnIle  
 129 CATCAGTGGAGGCTCCAACGAGGGCTCCACGGACACAACCTTCAACACACACAACCAACACCCAA  
 43 rIleSerGlyGlySerAsnGluGlySerThrAspThrThrSerThrHisIleThrIleAsnIleThrGln  
 193 AACACGACTGGTTTTCAAACCTTGCCAGTTCGGCTTTTACCGGTCIGTTCGGTGCACCTTCTCG  
 65 AsnAsnAspTrpPheSerLysLeuAlaSerSerAlaPheThrGlyLeuPheGlyAlaLeuLeuA  
 257 CCGACAAGAAGACGGAAGAGACTACGCTTCGGAAGACCGCATCCTCACTACCCGCAACGGSCA  
 86 laAspLysLysIleThrGluGluIleThrLeuLeuGluAspArgIleLeuIleThrIleArgAsnGlyHi  
 321 CACCCTTCGACACCCAGTCCGAGTGTGGGAGTCACGTATGGGTACTCCACTGAGGAAGATCAC  
 107 sIleThrSerThrThrGlnSerSerValGlyValThrTyrGlyTyrSerThrGluGluAspHis  
 385 GTTCTGGGCCCCAACACATCGGGCTTAGAGACGGGGTGGTGCAGGCAGAGAGATTTTTCAAGA  
 129 ValAlaGlyProAsnIleThrSerGlyLeuGluIleThrArgValValGlnAlaGluArgPhePheLysL  
 449 AGTTTCTGTTTACTGGACACCGGACAAACCTTTTGATACTTGACAAAACCTGGAGCTTCCCAC  
 150 ysPheLeuPheAspTrpThrThrAspLysProPheGlyTyrLeuIleThrLysLeuGluLeuProIle  
 513 CGATCACCACGGTGTCTTCGGGCACCTGGTGGACTCATATGCATATATGAGGAACGGCTGGGAT  
 171 rAspHisHisGlyValPheGlyHisLeuValAspSerTyrAlaTyrMetArgAsnGlyTrpAsp  
 577 GTTGGAGTATCTGCCGTCGGCAACCGTTCACGGCGGGTGCCTTCTGGTGGCCATGGTGCACG  
 193 ValGluValSerAlaValGlyAsnGlnPheAsnGlyGlyCysLeuLeuValAlaMetValProG  
 641 AGTGGGAAGGCATTTGACACACGTTGAAAATACCAGCTTACCCTTTTCCCACACCAGTTTATTAG  
 214 luIleTrpLysAlaPheAspIleThrArgGluIleLysTyrGlnLeuIleThrLeuPheProHisGlnPheIleSe  
 705 CCCAGAACTAACATGACTGCCACATCACGGTACCGTATCTTGGTGTGAACAGGTACCGATCAG  
 235 rProArgThrAsnMetIleAlaHisIleIleThrValProTyrLeuGlyValAsnArgTyrAspGln  
 769 TACAAGAAACACAAACCTTGGACACTGGTTGTCATGGTACTATCACCCCTCACGGTCAGCAACA  
 257 TyrLysLysHisLysProTrpIleLeuValValMetValLeuSerProLeuIleThrValSerAsnI  
 833 CTGCCGCCCCACAAATCAAGGCTCAGCCCAACATTGCCCCAAACCTACGTTACCGTGGCTGGAGA  
 278 hrAlaAlaProGlnIleIleLysValTyrAlaAsnIleAlaProIleThrTyrValHisValAlaGlyGl  
 897 GCTTCCCTCGAAAGAGGGGATTTTCCAGTTCATGCGCAGACCGTTACGGAGGACTGGTGACA  
 299 uLeuProSerLysGluGlyIlePheProValAlaCysAlaAspGlyTyrGlyGlyLeuValThr  
 961 ACAGACCCGAAAACAGCTGACCCCTGTTTACGGTAAAGGTGTATAACCCGCCAAAGACCAACTACC  
 321 ThrAspProLysThrAlaAspProValTyrGlyLysValTyrAsnProProLysIleAsnIleP  
 1025 CCGGGCGCTTTACAAACCTATTGGACGTGGCCGAGCAGCATGTCCCACCTTTCTTCTGTTCCGACGA  
 342 roGlyArgPheThrAsnLeuLeuAspValAlaGluAlaCysProIleThrPheLeuArgPheAspAs  
 1089 TGGGAAACCGTACGTCGTTACGGCGGCAGACGACACCCGCTCTTTTGGCCAAGTTTGTATGTCCTCC  
 363 pGlyLysProTyrValValIleThrArgAlaAspAspThrArgLeuLeuAlaLysPheAspValSer  
 1153 CTGCGCCGAAAACACATGTCCAACACATACTATCAGGGATTGCACAGTACTACACACAGTACT  
 385 LeuAlaAlaLysHisMetSerAsnIleThrTyrLeuSerGlyIleAlaGlnIleTyrTyrIleGlnTyrS  
 1217 CTGGTACTATCAACCTGCACCTTCATGTTACAGGCTCCACTGACTCAAAGCCCGCTACATGGT  
 406 erGlyThrIleAsnLeuHisPheMetPheThrGlySerThrAspSerLysAlaArgTyrMetVa  
 1281 GGCTTACATCCCGCTGGGGTGGAGACCGCCCGGACACACCTGAAGAAGCTGCTCACTGCATT  
 427 lAlaTyrIleProProGlyValGluIleProProAspThrProGluGluAlaAlaHisCysIle  
 1345 CAOGCTGAGTGGGACACAGGACTGAACCTCAAATTCACCTTTTCAATCCCTTACGTGCTGCGG  
 449 HisAlaGluTrpAspThrGlyLeuAsnSerLysPheIlePheSerIleProTyrValSerAlaA  
 1409 CGGATTACCGGTATACCGCATCTGATACGGCAGAGACAACCAATGTACAGGGATGGGTCTGTGT  
 470 laAspTyrAlaTyrThrAlaSerAspIleAlaGluIleThrAsnValGlnGlyTrpValCysVa  
 1473 TTACCAAATTACACACGGGAAGGCTGAATAATGACACCTTGTTAGTGTGGCTAGCGCCCGCAA  
 491 lTyrGlnIleThrHisGlyLysAlaGluAsnAspThrLeuLeuValSerAlaSerAlaGlyLys  
 1537 GACTTTGAGTTGGCCTCCCAATTGACCCCGGACACAAACCACTACTACTGGGGAGTCCGCAG  
 513 AspPheGluLeuArgLeuProIleAspProArgThrGlnIleThrThrThrThrGlyGluSerAlaA  
 1601 ACCCTGTCAACACCACCGTGGAGAACTACGGCGGTGATACACAAGTCCAGAGACGTCACCACAC  
 534 spProValIleThrThrThrValGluAsnTyrGlyGlyAspThrGlnValGlnArgArgHisHisTh  
 1665 GGACGTGGGCTTCATTTATGGACCGATTTGTGAAGATAAACAGCCTGAGCCCCACACATGTCAAT  
 555 rAspValGlyPheIleMetAspArgPheValLysIleAsnSerLeuSerProIleHisValIle

图 3

1729 GACCTCATGCAAAACCCACAACACGGGATCGTGGGTCGGTACTGCGTGCAGCCACGCTACTACT  
 577▶ AspLeuMetGlnThrHisLysHisGlyIleValGlyAlaLeuLeuArgAlaAlaThrTyrTyrP  
 1793 TCTCCGACTTGGAGATTGTTGTGCGGCACGATGGTAATCTGACCTGGGTGCCCAACGGTGGCCC  
 598▶ heSerAspLeuGluIleValValArgHisAspGlyAsnLeuThrTrpValProAsnGlyAlaPr  
 1857 CGAGGCAGCCCTGTCAAACACCAGCAACCCACTGCCTACAACAAGGCACCGTTCACGAGACTT  
 619▶ oGluAlaAlaLeuSerAsnThrSerAsnProThrAlaTyrAsnLysAlaProPheThrArgLeu  
 1921 GCTCTCCCTTACACTGCGCCACACCGCGTGTGGCAACTGTGTACGACGGGACAAACAAGTACT  
 641▶ AlaLeuProTyrThrAlaProHisArgValLeuAlaThrValTyrAspGlyThrAsnLysTyrS  
 1985 CCGCAAGCGATTTCGAGATCAGGCGACCTGGGFTCCATCGCGCGGAGTCCGGACACAACCTTCC  
 662▶ erAlaSerAspSerArgSerGlyAspLeuGlySerIleAlaAlaArgValAlaThrGlnLeuPr  
 2049 TGCTTCCTTTAACTACGGTGCATCCAGGCACAGGCCATCCACGAGCTTCTCGTGGCATGAAA  
 683▶ oAlaSerPheAsnTyrGlyAlaIleGlnAlaGlnAlaIleHisGluLeuLeuValArgMetLys  
 2113 CGGGCCGAGCTCTACTGTCCAGGCCACTTCTAGCAATAAAGGTGACTTCGCAAGACAGGTACA  
 705▶ ArgAlaGluLeuTyrCysProArgProLeuLeuAlaIleLysValThrSerGlnAspArgTyrL  
 2177 AGCAAAAGATTATTGCGCCCGCAAACAGCTGTGAACCTTTGACCTACTTAAGTTGGCGGGTGA  
 726▶ ysGlnLysIleIleAlaProAlaLysGlnLeuLeuAsnPheAspLeuLeuLysLeuAlaGlyAs  
 2241 CGTTGAGTCCAACCTTGGGCCCTTCTTCTTCGCTGACGTTAGGTCAAACCTTTTCGAGCTGGTA  
 747▶ pValGluSerAsnLeuGlyProPhePhePheAlaAspValArgSerAsnPheSerLysLeuVal  
 2305 GACACCATCAATCAGATGCAGGAGGACATGCCACAAAACACGGACCCGACTTTAACCGGTTGG  
 769▶ AspThrIleAsnGlnMetGlnGluAspMetSerThrLysHisGlyProAspPheAsnArgLeuV  
 2369 TGTCGGCTTTTGAGGAATTGGCCACTGGGGTAAAGCTATCAGAACCGGTCTCGATGAGCCAA  
 790▶ alSerAlaPheGluGluLeuAlaThrGlyValLysAlaIleArgThrGlyLeuAspGluAlaLy  
 2433 ACCCTGGTACAGCTCATCAAGCTCCTAAGCCGTCGTGTCATGGCCGCTGTGGCAGCACGG  
 811▶ sProThrTyrLysLeuIleLysLeuLeuSerArgLeuSerCysMetAlaAlaValAlaAlaArg  
 2497 TCCAAGGACCCAGTCCCTGTGGCCATCATGCTGGCCGACACCGGTCTCGAGCGTCAGAAACCTC  
 833▶ SerLysAspProValLeuValAlaIleMetLeuAlaAspThrGlyLeuGluArgGlnLysProL  
 2561 TAAAAGTGAGAGCCAAGCTCCACAGCAGGAGGGACCCTACGCTGGCCCGATGGAGAGACAGAA  
 854▶ euLysValArgAlaLysLeuProGlnGlnGluGlyProTyrAlaGlyProMetGluArgGlnLy  
 2625 ACOGCTGAAAGTAAAAGTAAAAGCCCGGTGCTAAGGAAGGACCTTACGAGGACCGGTGAAG  
 875▶ sProLeuLysValLysValLysAlaArgAsnLeuValValLysGluGlyProTyrGluGlyProValLys  
 2689 AAGCCTGTGCTTTTGAAGTGAAGCTAGGAACCTGATGTCACTGAGAGTGGTGGCCACCCGA  
 897▶ LysProValAlaLeuLysValLysAlaArgAsnLeuIleValThrGluSerGlyAlaProP  
 2753 CCGACTTGCAGAAGATGGTCATGGGCAACAAAGCCTGTTGAGCTTACCTCGACGGGAAGAC  
 918▶ hrAspLeuGlnLysMetValMetGlyAsnThrLysProValGluLeuAsnLeuAspGlyLysTh  
 2817 AGTAGCCATCTGCTGTGCTACTGGAGTGTTCGGCACTGCTTACCTCGTGCCTCGTCACCTTTC  
 939▶ rValAlaIleCysCysAlaThrGlyValPheGlyThrAlaTyrLeuValProArgHisLeuPhe  
 2881 GCAGAGAAGTATGACAAGATTATGTTGGACGGCAGCCATGACAGACAGTATTACAGAGTGT  
 961▶ AlaGluLysTyrAspLysIleMetLeuAspGlyArgAlaMetThrAspSerAspTyrArgValP  
 2945 TTGAGTTCGAGATTAAAGTTAAAAGGACAGGACATGCTCTCAGACGGGCACTCATTTGGTTGCT  
 982▶ heGluPheGluIleLysValLysArgThrGlyHisAlaLeuArgArgGlyThrHisTrpLeuLe  
 3009 TCACCGTGGGAACCTGCGTGAGAGACATCAAGAAACACTTTCGTGATACAGCAAGAATGAAGAAA  
 1003▶ uHisArgGlyAsnCysValArgAspIleThrLysHisPheArgAspThrAlaArgMetLysLys  
 3073 GGCACCCCGCTCGTTGGTGTGTCAACAACGCCGATGTTGGGAGACTGATTTCTCTGGTGAGG  
 1025▶ GlyThrProValValGlyValValAsnAsnAlaAspValGlyArgLeuIlePheSerGlyGluA  
 3137 CCCTTACCTACAAGGACATTGTAGTGTGATGGATGGAGACACCATGCCCGGCTCTTTGCCTA  
 1046▶ laLeuThrTyrLysAspIleValValCysMetAspGlyAspThrMetProGlyLeuPheAlaTy  
 3201 CAAAGCCGCCACCAGGGCTGGCTACTGTGGAGGAGCCGTTCTTGCCAAGGACGGGCTGACACA  
 1067▶ rLysAlaAlaThrArgAlaGlyTyrCysGlyGlyAlaValLeuAlaLysAspGlyAlaAspThr  
 3265 TTCATCGTGGCACTCACTCTGCAGTGGCAATGGAGTTGGATACTGCTCATCGCTTCCAGGT  
 1089▶ PheIleValGlyThrHisSerAlaGlyGlyAsnGlyValGlyTyrCysSerCysValSerArgS  
 3329 CCATGCTTCAAAGATGAAGGCTCACGTCGACCCCTGAACCGCACCCAGGGGTTGATTTGTTGA  
 1110▶ erMetLeuGlnLysMetLysAlaHisValAspProGluProHisHisGluGlyLeuIleValAs  
 3393 TACCAGAGATGTGGAAGAGCCGTCACGTCGACCCCTGAACCGCACCCAGGGGTTGATTTGTTGA  
 1131▶ pThrArgAspValGluGluArgValHisValMetArgLysThrLysLeu...

图 3(续)