



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115843270 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 24

(21) 申请号 202180043193.7

(22) 申请日 2021.05.11

(30) 优先权数据

2020901506 2020.05.11 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2021/050437 2021.05.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/226664 EN 2021.11.18

(71) 申请人 麦克法兰布奈特医疗研究与公共健

康研究所有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

申请人 牛津大学的校长、教师和学者

(72) 发明人 海迪·德鲁默尔

埃莉诺·简·巴尔内斯

森蒂尔·库马尔·钦纳卡纳安

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

专利代理师 张珊珊 刘振佳

(51) Int.Cl.

A61P 31/14 (2006.01)

权利要求书2页 说明书28页

序列表2页 附图50页

(54) 发明名称

包括缺失可变结构域的E2多肽的丙型肝炎
核酸疫苗

(57) 摘要

一种药物组合物,其包括编码HCV的缺失可
变结构域的E2多肽(例如,E2Delta123)的核酸分
子。所述组合物适合用于用于治疗或预防HCV感
染或在使用时适合用于治疗或预防HCV感染。所
述核酸分子可以是DNA或RNA或经修饰或合成的
形式,或包含在质粒、用于疫苗接种的病毒或非
病毒载体、多核苷酸表达盒或用于载体传播的细
胞内。还提供了作为初免疫苗接种和加强疫苗接
种进行施用的方法。

1. 一种用于治疗或预防HCV感染或在使用时用于治疗或预防HCV感染的组合物,所述组合物包括编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子,其中所述用途包括向受试者施用所述核酸,并且其中在所述受试者中产生所述缺失可变结构域的E2蛋白,并且所述缺失可变结构域的E2蛋白在所述受试者中产生对HCV的免疫应答,包含对HCV的功能性B细胞应答。

2. 根据权利要求1所述的供使用的组合物,其中编码HCV的缺失可变结构域的E2的所述核酸分子包含在用于疫苗接种的病毒或非病毒载体内。

3. 根据权利要求1所述的供使用的组合物,其中编码HCV的缺失可变结构域的E2的核酸分子是RNA或DNA或其经修饰或合成的形式。

4. 根据权利要求2所述的供使用的组合物,其中所述病毒载体是腺病毒载体或痘病毒载体。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的供使用的组合物,其中所述核酸分子编码HCV的缺失可变结构域的E2,所述HCV的缺失可变结构域的E2缺失了两个或所有三个表面暴露的可变结构域(Delta23E2、Delta123E2)。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的供使用的组合物,其中所述核酸分子编码具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的HCV E2多肽。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的供使用的组合物,其中所述核酸分子包括SEQ ID NO:2中所示的序列。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的供使用的组合物,其中所述功能性B细胞应答包含的总抗体滴度低于对应地施用高分子量缺失可变结构域的E2多肽(例如,HMWDelta123)后产生的总抗体滴度。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的供使用的组合物,其中所述功能性B细胞应答与对应地施用高分子量缺失可变结构域的E2多肽(例如,HMWDelta123)后产生的功能性B细胞应答相当。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的供使用的组合物,其中所述功能性免疫应答包括与对应地施用高分子量缺失可变结构域的E2多肽(HMWDelta123)后产生的CD81抑制滴度相当或比其更高的CD81抑制滴度。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的供使用的组合物,其进一步包括另一种治疗性或预防性活性成分。

12. 一种编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子在治疗或预防HCV感染或在制造用于治疗或预防HCV感染的核酸药物或带有核酸的药物中的用途。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的所述核酸分子包含在用于疫苗接种的病毒或非病毒载体内。

14. 根据权利要求12或13所述的用途,其中编码HCV的缺失可变结构域的E2的所述核酸分子是RNA或DNA或其经修饰的形式。

15. 根据权利要求13所述的用途,其中所述病毒载体是腺病毒载体或痘病毒载体,如MVA。

16. 根据权利要求12至15中任一项所述的用途,其中所述核酸分子编码HCV的缺失可变结构域的E2,所述HCV的缺失可变结构域的E2缺失了两个或所有三个表面暴露的可变结构

域(例如,Delta123E2)。

17.根据权利要求12至16中任一项所述的用途,其中所述核酸分子编码具有SEQ IDNO:1中所示的氨基酸序列的HCV E2多肽。

18.根据权利要求12至17中任一项所述的用途,其中所述核酸分子其中所述核酸分子包括SEQ ID NO:2中所示的序列。

19.一种治疗或预防HCV感染的方法,所述方法包括在一定条件下向受试者施用根据权利要求1至10中任一项所述的组合物持续一定时间,所述时间和所述条件用于在所述受试者中产生对HCV的功能性B细胞应答。

20.根据权利要求19所述的方法,其中所述组合物作为初免疫苗接种进行施用,或作为初免疫苗接种和加强疫苗接种进行施用。

21.根据权利要求19所述的方法,其中所述组合物作为初免疫苗接种进行施用,随后进行两次加强疫苗接种。

22.根据权利要求19所述的方法,其中所述组合物作为初免疫苗接种进行施用,并且其中加强疫苗接种包括HCV的高分子量缺失可变结构域的E2多肽。

包括缺失可变结构域的E2多肽的丙型肝炎核酸疫苗

技术领域

[0001] 本公开涉及以编码经修饰的丙型肝炎病毒 (HCV) E2疫苗抗原的核酸分子的形式使用所述抗原治疗或预防HCV,所述抗原在受试者中表达并且刺激对HCV的功能性和交叉保护性免疫应答。

背景技术

[0002] 丙型肝炎病毒是属于黄病毒科 (flaviviridae) 内的独特丙型肝炎病毒属 (hepacivirus) 的小型包膜正义RNA病毒。HCV被分类为7种基因型 (GT1-7), 其中基因型1-3在全球分布。被感染的个体携带被称为准种的一群密切相关的病毒。这种序列变异程度超出了针对HIV和流感所观察到的序列变异程度,给疫苗开发带来了重大挑战。HCV编码通过信号肽酶从病毒多蛋白上裂解的两个结构性包膜糖蛋白E1和E2。E1E2作为异源二聚体起作用以介导病毒进入。E2经由其受体结合结构域 (RBD) 介导与细胞受体CD81和清除剂受体B类1型的连接。E1的功能目前未知。

[0003] HCV的基因组是大约9,600个核苷酸的单链正义RNA,仅有一个大的开放阅读框 (ORF) 编码3,010至3,033个氨基酸残基的单个多蛋白。HCV ORF侧接有病毒复制所需的高度保守的5'-未翻译区和3'-未翻译区 (5'-UTR和3'-UTR)。5'-UTR形成广泛的二级结构并且以取决于内部核糖体进入位点 (IRES) 的方式调节翻译起始。然而,与小核糖核酸病毒相比, HCV IRES可以在不存在任何其它典型翻译起始因子的情况下与40S核糖体亚基直接结合,从而将ORF的真实起始AUG密码子精准定位在核糖体的P位点。3'-UTR缺乏poly (A) 尾部并且由应该参与RNA复制的三个序列元件构成:非保守的可变区 (30至50个核苷酸)、poly (U • C) 区段 (20至200个核苷酸) 以及称为3'X区的保守的98-核苷酸序列,这三个序列元件形成了三茎环 (SL) 结构。

[0004] 丙型肝炎病毒每年影响超7000万人,并且造成超700,000人次死亡。据估计有3500万人的感染未被诊断,这为病毒持续传播提供途径。急性丙型肝炎的特点是在暴露1至2周内,血清中出现HCV RNA,然后血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 升高,并且然后出现黄疸的症状。针对HCV的抗体 (抗HCV) 通常出现较晚。在急性消退性肝炎中,HCV RNA被清除并且血清ALT水平降至正常。然而,55%至85%的患者没有清除病毒,并且发展成慢性丙型肝炎。慢性丙型肝炎通常无症状,但是通常与ALT水平的持续或波动升高相关联。丙型肝炎的慢性后遗症包含进行性肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。肝外表现包含自身免疫性疾病、干燥综合征 (sicca syndrome)、冷球蛋白血症 (cryoglobulinemia)、肾小球肾炎 (glomerulonephritis) 和迟发性皮肤卟啉病 (porphyria cutanea tarda)。直接作用的抗病毒药可以治愈大于90%病例的HCV感染,然而,单独的抗病毒药不大可能实现HCV清除,这是由于其高成本、再感染的风险以及大部分感染者未被诊断患有HCV。经论证,需要限制传播以实现HCV感染大幅降低的疫苗。

[0005] HCV疫苗有望成功的核心在于对七种循环HCV基因型提供广泛且有效的预防的能力。每种基因型在蛋白质水平下显示出约30%变化,并且包括大于67种亚型,这些亚型自身

在蛋白质水平下显示出约20%变化。最近的研究示出,在感染早期自发清除其感染的人产生广泛中和抗体(bNAb),并且用人bNAb对动物进行被动免疫可以保护其免受HCV攻击。

[0006] 中和抗体应答主要针对E2病毒包膜糖蛋白的受体结合结构域(RBD)(Drummer等人,《微生物学(Microbiol.)》5:329,2014)。然而,HCV E2显示出多种免疫逃避机制以限制bNAb的产生,包含例如,聚糖屏蔽;高变区(HVR)中的聚焦氨基酸序列进化,这别构地抑制了bNAb表位的呈递;以及优先产生驱动免疫逃逸的分离株特异性NAb和非中和抗体的表位的免疫优势(Drummer等人,同上)。

[0007] 如本发明人先前确定的,在天然HCV E2形式中,高变区协同作用以阻塞确定广泛中和抗体(bNAb)的保守表位,并且这阻止了bNAb的产生。相反,可变区中的分离株特异性表位和非中和表位主导抗体应答。如WO 2008/022401和WO 2012/0168637中所描述的,本发明人已经开发了HCV E2的经修饰形式,并且具体地,从RBD缺失三个表面暴露的HVR的经修饰形式(称为Delta123E2₆₆₁)。将这种E2的缺失HVR的形式与野生型E2进行比较,并且与包含单体、二聚、三聚和更高重复形式的分子的不同呈递进行比较。如《肝病学(Hepatology)》65(4),2017中所报道的,缺乏三个高变区的E2的高分子量、二硫化物连接的低聚物(D123HMW)引起能够在实验动物中中和HCV的所有七种基因型的高滴度bNAb。E2的HMW低聚形式比即使缺失HVR时刺激非中和抗体的E2的单体或二聚形式要更有效得多。在此著作之前,假定HCV E2的单体形式将提供最佳的疫苗构建体。例如在哺乳动物表达细胞培养物中鉴定的高分子量物种的性质表征不良,并且尚不清楚其对疫苗的意义。

[0008] 然而,以适合用作疫苗的形式生产D123HMW E2(缺乏高变区HVR1、HVR2和igVR的E2的高分子量低聚形式)存在问题,因为其在哺乳动物细胞表达期间以非常低的产量自发产生。事实上,本发明人已经确定E2在哺乳动物细胞表达期间以包含单体、二聚体、低聚物和其它构象的多种非均质形式产生。因此将需要复杂的分离程序以将D123HMW E2与E2的其它不期望的形式分开。另一种选择将是尝试简化用于人试验的均质HMW D123 HCV E2的体外蛋白质产生。本发明人描述了一种令人惊讶的有效方法(参见国际公开第2018/058177号,并基于国际公开第WO 2012/016290号中所描述的发明),并且已经用于生产HCV E2 D123多肽的经半胱氨酸修饰的形式,所述经修饰形式几乎完全作为单体E2 D123表达,并且然后在体外处理单体HCV E2以形成适合用于疫苗接种研究的均质HMW E2多肽。

[0009] 复制缺陷腺病毒载体先前已示出引发对非结构(NS)HCV蛋白的持续T细胞应答。对于人疫苗接种,采用罕见(低血清阳性率)腺病毒或黑猩猩腺病毒载体以避免可能干扰疫苗功效的预先存在的抗载体免疫应答。如果需要加强T细胞应答,则建议加强方案包括不同的载体,如经修饰的痘病毒载体。

[0010] 鉴于流行性HCV感染的全球性问题,特别是在发展中国家,迫切且未被满足地需要有效的HCV疫苗以及至少引起高水平的功能性中和抗体和低水平的非功能性抗体的疫苗。

发明内容

[0011] 贯穿本说明书,词语“包括(comprise)”或变化形式(如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”)将被理解为意指包括所陈述的要素、整体或步骤,或者多个要素、整体或步骤的群组,但不排除任何其它要素、整体或步骤,或者多个要素、整体或步骤的群组。

[0012] 如本文所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一个(a)”、“一种

(an)”、和“所述(the)”包含复数方面。因此,例如,提及“组合物”包含单一组合物,以及两种或更多种组合物;提及“药剂”包含一种药剂,以及两种或更多种药剂;提及“本公开”包含本公开的单个方面和多个方面,等等。

[0013] 术语“和/或”,例如“X和/或Y”应理解为意指“X和Y”或“X或Y”,并且应被视为对两种含义或任一含义提供明确的支持。

[0014] 如本文所使用的,除非相反地说明,否则术语“约”是指指定值的+/-10%、或+/-5%。

[0015] 术语“缺失可变区”包含经缺失或取代的HCV E2的1、2或3个可变区。尽管通过缺失可变结构域进行例示,但技术人员将理解取代区或突变可以达到与缺失相同的结果。

[0016] 需要高水平的人为干预来修饰天然HCV E2多肽,以产生高分子量(HMW或更高阶>3/4/5)缺失可变区(例如,Delta123)的HCV E2多肽,作为能够产生有效的功能性抗体和低水平的非功能性抗体的均质疫苗候选。本领域将不期望编码Delta123 E2单体的核酸分子在表达时将与HMW Delta123 E2表现类似,并且在施用到哺乳动物宿主时优先产生功能性抗体而不是非功能性抗体。已知由真核细胞系在体外表达的重组HCV E2糖蛋白通常作为单体、二聚体、三聚体和更高阶形式的混合物存在。抗原的单体形式的存在将通常预期引起高水平的非功能性抗体,而牺牲功能性抗体的产生。根据本公开,本发明人已经确定,与仅以蛋白质形式施用Delta123HMW E2多肽时相比,施用Delta123E2的编码核酸形式后的中和滴度令人惊讶地更高,并且中和抗体的交叉反应性更高。因此,建议施用呈核酸形式(如病毒或非病毒载体的形式)的HCV E2疫苗,这因此为单独施用蛋白质提供了可行、低成本但有效的替代方案。

[0017] 因此,一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包括编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽,如Delta123E2的病毒表达载体。在一个实施例中,所述病毒载体是腺病毒表达载体,包含其合成型式。在一个实施例中,所述病毒载体是基于痘病毒或牛痘的表达载体,如减毒牛痘基因组载体,包含其合成型式和前体。说明性表达载体和表达盒表示于附图,如图20和图27至35中,但许多型式或替代元件(穿梭质粒、前导序列、启动子、聚腺苷酸化序列、耐药操作子位点、BAC基因组和限制性位点)是本领域已知的。在合适的细胞系中的病毒拯救和传播也是本领域已知的。

[0018] 在一个实施例中,所述病毒载体是基于腺病毒基因组的病毒载体。

[0019] 在一个实施例中,所述病毒载体是基于痘病毒或牛痘基因组的病毒载体。

[0020] 在所述实施例中,本发明提供了表达编码如本文所述的缺失可变结构域的E2多肽的病毒载体的细胞系的细胞。因此,在一个实施例中,所述病毒载体可以是减毒腺病毒载体或减毒牛痘载体。

[0021] 在一个实施例中,本发明提供了一种如本文所述的载体,或表达编码如本文所述的缺失可变结构域的E2多肽的病毒载体的细胞在制造基于核酸/病毒载体的疫苗或包括其的免疫原性组合物或药物或生理组合物中的用途。

[0022] 一方面,本公开提供了一种治疗或预防受试者的HCV感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用编码缺失可变结构域的HCV E2蛋白质分子(如Delta123E2或其变体)的核酸分子。

[0023] 因此,一方面,本公开提供了根据已知的药物制造技术方便地制备的生理或药物

组合物。除了活性物质之一以外,这些组合物还可以包括药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域公知的其它材料。此类材料应该是无毒的并且不应该干扰活性成分的功效。所述载体可以采取多种形式,这取决于用于疗法使用或用于治疗或预防HCV感染的施用所需的制剂形式,例如但不限于,静脉内、鼻内、皮内、口服或肠胃外,其中向受试者施用所述核酸,并且其中产生所述缺失可变结构域的E2蛋白,并且所述蛋白在所述受试者中产生对HCV的免疫应答,包含对HCV的功能性B细胞应答。组合物包含生理学或药理学或药学上可接受的媒剂,这些媒剂并非是生物学上或在其它方面不期望的。此处描述的化合物的药理学上可接受的盐、酯、前药或衍生物并非是生物学上或在其它方面不期望的盐、酯、前药或衍生物。

[0024] 载体和表达盒适用于或适于内源性人细胞中的缺失可变结构域的E2的表达,即用于人类治疗或疫苗接受者。

[0025] 在一个实施例中,所述组合物作为疫苗用于疗法使用。

[0026] 在一个实施例中,本发明实现了一种用于治疗或预防HCV感染或在使用时用于治疗或预防HCV感染的组合物,所述组合物包含药物组合物,所述组合物包括编码HCV的可溶性缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子,其中所述用途包括向受试者施用所述核酸,并且其中在所述受试者中产生所述缺失可变结构域的E2蛋白,并且所述缺失可变结构域的E2蛋白在所述受试者中产生对HCV的免疫应答,包含对HCV的功能性B细胞应答。

[0027] 在此方面,所述用途可以用于增强中和B细胞应答,其中所述核酸分子在表达时在所述受试者中产生与使用HMW Delta123E2产生的应答相比增强的B细胞应答。

[0028] 在以Delta123进行例示时,预设Delta23也将比野生型E2产生更多的中和交叉反应性B细胞应答。

[0029] 在一个实施例中,所述核酸施用包括用编码缺失可变结构域的E2的病毒载体进行初免并且用编码缺失可变结构域的E2、或高分子量缺失可变结构域的E2多肽(例如HMWDelta123)的相同或异源载体或核酸进行加强。

[0030] 在一个实施例中,所述核酸分子通过病毒载体,如图20和图27至35列出的ChadOX1或MVA进行表达。

[0031] 在一个实施例中,所述核酸分子进一步产生对经编码的糖蛋白的T细胞应答。

[0032] 如本文所使用的,对HCV的“功能性”B细胞应答是指产生能够减少HCV病毒的宿主细胞侵袭的交叉反应性中和抗体,并且很少或没有产生非中和抗体。主要地非功能性B细胞应答是指产生不识别HCV的RBD或不具有交叉中和潜力的抗体。例如,单体野生E2型多肽在施用时引发低水平的识别核心结构域并且具有交叉中和潜力的抗体,并且引发高水平的不具有中和性并且与其它变体的交叉反应性差的抗体。

[0033] 术语“编码”和“能够表达”在本文中可互换使用。

[0034] 在一个实施例中,编码HCV的缺失可变结构域的E2的所述核酸分子包含在用于施用和/或细胞内递送的病毒或非病毒载体内或连接到所述病毒或非病毒载体。

[0035] 在一个实施例中,编码HCV的缺失可变结构域的E2的所述核酸分子是RNA或DNA或RNA:DNA杂合物或其经修饰或合成的形式。

[0036] 在一个实施例中,所述载体是病毒载体或非病毒载体。可用作载体的病毒包含但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒,以及其减毒形式,其中每一种

都有如本领域已知的其自身的优点和缺点。病毒载体具体地包含但不限于腺病毒载体和痘病毒载体。

[0037] 非病毒载体或附着物/缀合物包含脂质、碳水化合物、蛋白质、肽、纳米颗粒、脂质体、病毒样颗粒、病毒体、乳剂。如脂质等两亲性剂可以以聚集物,如胶束、不溶性单层、液晶或层状层的形式存在于水溶液中。

[0038] 在一个实施例中,所述核酸分子编码HCV的缺失可变结构域的E2,所述HCV的缺失可变结构域的E2缺失了所有三个表面暴露的可变结构域(例如,Delta123E2)。其它变体可以包含缺失1个或2个可变结构域。在一个实施例中,HVR1 (394-408) 未缺失。在一个实施例中,HVR2 (460-495) 和igVR (570-580) 区基本上或完全缺失。

[0039] 在一个实施例中,本文所述的核酸分子不编码未缺失可变结构域的HCV基因组或全长E2多肽。

[0040] 在一个非限制性实施例中,所述核酸分子编码具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列的HCV E2多肽,所述氨基酸序列是实例中所使用的Delta123 E2的蛋白质序列。

[0041] 在另一个实施例中,实现了如WO 2012/016290中的发明人所描述的受体结合结构域的经半胱氨酸修饰的型式。因此考虑了SEQ ID NO:1或2的型式,其中编码了选自C581至C620的至少四个突变或中断的半胱氨酸,并且经编码的多肽保留了CD81结合。如WO 2012/016290中所述的E2的经半胱氨酸修饰的型式作为单体重组表达,并且可以重新折叠成高分子量形式。

[0042] 在一个实施例中,所述核酸分子包括作为优化用于人类表达的Delta123E2密码子的核苷酸序列的SEQ ID NO:2中所示的基于HCV的序列。在一个实施例中,所述核酸分子不编码任何其它包膜蛋白质。在一个实施例中,所述核酸分子包括SEQ ID NO:2中所示的序列或来自HCV的任何基因型,如G2、G3、G4、G5、G6或G7的对应序列。考虑了具有至少80%序列同一性的SEQ ID NO:2的变体,包含81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0043] 提及变体包含部分、衍生物和化学类似物。所考虑的化学类似物包含侧链的修饰、在合成过程中掺入非天然氨基酸和/或其衍生物,以及使用连接子或交联剂或其它方法,以尤其地施加构象约束。

[0044] 提及较高水平或较低水平意指与适当的对照相比,高得多或低得多的水平,例如至少50%、75%、100%、3倍、4倍、5倍或更多或更少的抗体或同型。总抗体滴度、同型和中和抗体滴度通过本领域所公认的技术,如实例中描述的那些技术进行测量。

[0045] 在一个实施例中,所述功能性B细胞应答包含的总抗体滴度低于对应地施用高分子量缺失可变结构域的E2多肽(HMWDelta123)后产生的总抗体滴度。

[0046] 在一个实施例中,所述功能性B细胞应答与对应地施用高分子量缺失可变结构域的E2多肽(HMWDelta123)后产生的功能性B细胞应答相当。

[0047] 在一些实施例中,所述功能性免疫应答包括与对应地施用高分子量缺失可变结构域的E2多肽(HMWDelta123)后产生的CD81抑制滴度相当或比其更高的CD81抑制滴度。

[0048] 在一个实施例中,所述组合物包括另一种生理性、治疗性或预防性活性成分。

[0049] 因此,本公开实现了一种编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子在治疗或预防受试者的HCV感染或在制造用于治疗或预防受试者的HCV感染的NA或NA-载体药物中

的用途。

[0050] 在一个实施例中,由表达所述可变结构域delta E2的所述病毒载体引发的B细胞应答增强了对HCV的免疫应答。

[0051] 在一个实施例中,所述核酸施用的E2增强了对HCV的免疫应答,所述免疫应答高于由HMW Delta123E2提供的免疫应答。

[0052] 如本文所使用的,本描述中所考虑的“受试者”是包含实验室或本领域所接受的测试或媒介动物在内的人或动物。在实施例中,所述受试者是哺乳动物。优选地,所述受试者是人,然而本描述扩展到治疗和/或预防其它哺乳动物患者,包含灵长类动物和实验室测试动物(例如小鼠、兔子、大鼠、豚鼠)。

[0053] 在一些实施例中,编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的所述核酸分子包含在用于疫苗接种的病毒或非病毒载体内。

[0054] 在一个实施例中,编码HCV的缺失可变结构域的E2的所述核酸分子是RNA或DNA或其经修饰的形式。

[0055] 在一个实施例中,所述核酸序列经密码子优化以用于在人细胞中表达。

[0056] 在一个实施例中,所述病毒载体是腺病毒载体。在一个实施例中,所述病毒载体是痘病毒载体,如MVA。

[0057] 在一个实施例中,所述核酸分子编码HCV的缺失可变结构域的E2,所述HCV的缺失可变结构域的E2缺失了所有三个表面暴露的可变结构域(Delta123E2)。在一个实施例中,所述核酸分子编码具有SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或来自HCV基因型2至7的株的对应序列的HCV E2多肽。在说明性实施例中,所述核酸分子包括SEQ IDNO:2中所示的序列或与所述序列具有至少80%同一性的序列。

[0058] 本公开还实现了一种治疗或预防HCV感染的方法,所述方法包括在一定条件下向受试者施用包括编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子的组合物持续一定时间,所述时间和所述条件用于在所述受试者中产生对HCV的功能性B细胞应答。

[0059] 本公开还实现了一种在受试者中诱导对HCV的功能性B细胞应答的方法,所述方法包括在一定条件下向受试者施用包括编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子的组合物持续一定时间,所述时间和所述条件用于在所述受试者中产生对HCV的功能性B细胞应答。

[0060] 在一个实施例中,所述基于腺病毒基因组的病毒载体包括以下中的一种或多种:图27中所示的ChAdOx1的多核苷酸序列、图27中所示的ChAdOx1-TPA-E2D123的多核苷酸序列、如图28所布置的载体、图29中所示的多核苷酸序列、图30的免疫原盒布局、图31中所示的免疫原盒序列中的一个或两个或更多个免疫原盒序列、图32的多核苷酸序列。

[0061] 在一个实施例中,所述基于牛痘基因组的病毒载体包括以下中的一种或多种:图33中所示的MVA的多核苷酸序列、图33中所示的MVA-TPA-E2Delta123的多核苷酸序列、图34的载体布局,或图35中所示的序列的元件中的一个或两个或更多个元件。

[0062] 在一个实施例中,在第0天(d0)施用编码E2 D123序列的黑猩猩腺病毒载体,任选地随后在接下来的1至6个月内施用一次或多次所述黑猩猩腺病毒载体的加强。

[0063] 在一个实施例中,在第0天(d0)施用编码基因型1a E2 D123序列的黑猩猩腺病毒载体,任选地随后在接下来的1至6个月内施用一次或多次所述黑猩猩腺病毒载体的加强。

[0064] 在一个实施例中,在第0天(d0)施用编码E2 D123序列的黑猩猩腺病毒载体,任选地随后在接下来的1至6个月内施用一次或多次加强。

[0065] 在一个实施例中,在第0天(d0)施用编码基因型1a E2 D123序列的黑猩猩腺病毒载体,任选地随后在接下来的1至6个月内施用一次或多次加强。

[0066] 在一个实施例中,加强施用可以是施用包括可溶性纯化高分子量E2 D123蛋白的组合物。

[0067] 在一个实施例中,加强施用可以是施用包括编码E2 D123蛋白的异源(非腺病毒)病毒载体的组合物。

[0068] 在一个实施例中,所述异源病毒载体是基于脊索痘基因组的病毒载体,如基于牛痘基因组的病毒载体。

[0069] 在一个实施例中,加强是用可溶性纯化高分子量E2 D123蛋白进行的。

[0070] 在所述方法的一个实施例中,包括编码HCV E2 Delta 123的核酸分子的所述组合物作为初免疫苗接种进行施用,或作为初免疫苗接种和加强疫苗接种进行施用。

[0071] 在一个实施例中,所述组合物作为初免疫苗接种进行施用,随后进行两次加强疫苗接种。

[0072] 在一个实施例中,所述初免疫苗接种是用MVA进行的,并且所述加强疫苗接种是用MVA或用包括可溶性高分子量缺失可变结构域的E2蛋白的组合物进行的。

[0073] 在一个实施例中,所述初免疫苗接种是用MVA进行的,并且所述加强疫苗接种是用MVA和/或用包括可溶性高分子量缺失可变结构域的E2蛋白的组合物进行的。

[0074] 在一个实施例中,所述初免疫苗接种是用MVA进行的,并且所述加强疫苗接种是用MVA和/或用可溶性纯化高分子量缺失可变结构域的E2蛋白进行的。

[0075] 在一个实施例中,所述初免疫苗接种是用MVA进行的,并且所述加强疫苗接种是用MVA或用可溶性纯化高分子量缺失可变结构域的E2蛋白进行的。

[0076] 在一个实施例中,所述初免疫苗接种是用MVA进行的,并且所述加强疫苗接种是用MVA或用可溶性纯化高分子量E2 D123蛋白进行的。

[0077] 在一个实施例中,所述组合物作为初免疫苗接种进行施用,并且其中加强疫苗接种包括HCV的高分子量缺失可变结构域的E2多肽。

附图说明

[0078] 图1示出了在C57B16小鼠中进行的免疫实验的示意性表示,所述实验比较了在黑猩猩腺病毒1内编码的D123并且用D123进行加强的免疫原性(第1组),或作为高分子量可溶性蛋白并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强的免疫原性(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强的免疫原性(第3组)。

[0079] 图2示出了按实验组图表表示的在所有时间点动物中产生的倒数抗体滴度,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。* $p < 0.0332$,** $p < 0.0021$,*** $p < 0.002$,**** $p < 0.0001$ 。

[0080] 图3示出了按疫苗计划图表表示的在所有时间点动物中产生的倒数抗体滴度,

所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。* $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.002$, **** $p < 0.0001$ 。

[0081] 图4示出了按实验组图表表示的在第56天在动物中产生的抗体应答曲线,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。

[0082] 图5示出了按实验组图表表示的在第56天在动物中产生的抗体滴度,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。* $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.002$, **** $p < 0.0001$ 。

[0083] 图6示出了在第56天产生的免疫血清抑制HCV细胞受体CD81与E2受体结合结构域之间的相互作用的能力。由12点稀释曲线计算免疫血清抑制E2结合CD81的50% (A) 或80% (B) 的能力。* $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.002$, **** $p < 0.0001$ 。

[0084] 图7示出了在第56天在动物中产生的针对HCV E2的408-428区的抗体滴度,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。* $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.002$, **** $p < 0.0001$ 。

[0085] 图8示出了在第56天在动物中产生的针对HCV E2的430-451区的抗体滴度,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。* $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.002$, **** $p < 0.0001$ 。

[0086] 图9示出了在第56天在动物中产生的针对HCV E2的523-549区的抗体滴度,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。* $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.002$, **** $p < 0.0001$ 。

[0087] 图10示出了在第56天在动物中的同源中和滴度,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。* $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.002$, **** $p < 0.0001$ 。

[0088] 图11示出了在第56天在动物中的针对基因型3a HCV的异源中和滴度,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩

猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。

[0089] 图12示出了在第56天在动物中的针对基因型5a HCV的异源中和滴度,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。

[0090] 图13示出了在第56天在动物中产生的抗体的同型,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。使用小鼠分型试剂盒测量同型,并将其表示为占所观察到的总抗体同型的百分比。

[0091] 图14示出了在第56天在动物中产生的抗体的同型,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。使用小鼠分型试剂盒测量同型,并将其表示为在饼状图中占所观察到的总抗体同型的百分比。这是以饼状图呈现的与如图13中所示的数据相同的数据。

[0092] 图15比较了在第56天在动物中产生的抗体的同型,所述动物用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒1内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。使用小鼠分型试剂盒测量同型,并将其表示为占总抗体同型的百分比。 $*p<0.033$, $**p<0.002$, $***p<0.001$ 。

[0093] 图16示出了仅用于说明目的的本研究中使用的D123的蛋白质和DNA序列。

[0094] 图17示出了在第56天在动物中产生的针对HCV E2的基因型3a(S52分离株)408-428表位I区、430-451表位II区以及523-549CD81结合环区(表位III)的交叉反应性抗体滴度,所述动物用在黑猩猩腺病毒(ChAd或ChAdOx1)内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。 $*p<0.0332$, $**p<0.0021$, $***p<0.002$, $****p<0.0001$ 。

[0095] 图18示出了根据IgG1滴度计算并且显示为IgG1 log10滴度除以IgG2a log10滴度(IgG1/IgG2a)的免疫血清的IgG2a滴度。滴度越低, IgG2a与IgG1比率就越接近1:1,表明IgG1与IgG2a类别转换。针对来自接受C/P/P和P/P/P的动物的免疫血清的HCVpp ID50滴度绘制倒数滴度(1/IgG1:IgG2a),以确定任何相关性。所有条都是中位数,并显示四分位距。达戈斯蒂诺和皮尔森检验(D'Agostino and Pearson test)用于确定数据分布的正态性,并进行具有多重比较的克鲁斯卡尔-沃利斯检验(Kruskal-Wallis),以确定在95%置信区间下两组中位数之间的显著差异。P值在 $<0.05*$ 、 $<0.01**$ 、 $<0.001***$ 、 $<0.0001****$ 时表明组之间的显著差异。当IgG2a表示为IgG1滴度的函数(IgG1/IgG2a)时,与E2 Δ 123_{HMW}免疫血清相比,ChAd-E2 Δ 123免疫血清(第1组和第3组)的倒数滴度明显更低,这表明GC类别转换增加(对于第1组对第2组, $p<0.0001****$, 对于第2组对第3组, $p=0.0014**$)。对于E2 Δ 123_{HMW}免疫血清(第2组和第3组组合), IgG1:IgG2a倒数滴度与HCVpp中和滴度正相关($r=$

0.3974, $p=0.0492$)。

[0096] 图19示出了作为整体Ab滴度的函数的免疫血清的倒数ID50抑制滴度,其表示功能性抗体指数。针对示出为CD81阻断的两种E2-CD81抑制计算功能性抗体指数。针对示出为中和的同源假病毒的病毒进入抑制计算功能性抗体指数。当将倒数ID50滴度(CD81抑制和HCVpp)与整体Ab滴度(功能性抗体指数)相关进行阐述时,与E2 Δ 123_{HMW}免疫血清相比,ChAd-E2 Δ 123免疫血清(第1组和第3组)的功能性指数明显较高,这表明相对于总Ab滴度的疫苗诱导的Ab应答具有更大的中和能力。

[0097] 图20示出了用于驱动E2 D123表达的病毒载体的示意图。A.用于ChAd0x1中的D123的表达盒的示意图。B.用于ChAd0x1中的RBD的表达盒的示意图。C.用于MVA中的D123的表达盒的示意图。

[0098] 图21示出了接受ChAd-E2 Δ 123初免,随后在第4周进行MVA-E2 Δ 123加强的动物的免疫计划。在加强后两周对动物进行放血,并且测量抗体和T细胞反应性。动物在第0周接受ChAd-E2D123初免(40uL无菌PBS中的 10^8 个感染单位[IU]),然后在第4周接受MVA-E2D123(40uL无菌PBS中的 10^7 个空斑形成单位[PFU])。

[0099] 图22A示出了用如图21所示的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行免疫的免疫血清的反应性升高。在ELISA中针对E2 Δ 123单体评估免疫血清。将免疫血清的连续稀释液施加到E2 Δ 123单体包被板,并且用与辣根过氧化物酶和TMD底物缀合的抗小鼠免疫球蛋白检测结合抗体。计算实现10倍背景结合所需的倒数滴度。结果示出,ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123产生对E2具有反应性的高滴度抗体。图22B示出了在第56天产生的免疫血清抑制HCV细胞受体CD81与E2受体结合结构域之间的相互作用的能力。由连续稀释曲线计算免疫血清抑制E2结合CD81的50%的能力。结果示出,ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123产生能够抑制同源E2与CD81之间的结合的高滴度抗体。

[0100] 图23A示出了用如图21所示的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行免疫的免疫血清对AS412 (E2₄₀₈₋₄₂₈)、AS434 (E2₄₃₀₋₄₅₁)、CD81结合环 (E2₅₂₃₋₅₄₉) 的反应性升高。由连续稀释曲线计算实现10倍背景结合所需的倒数滴度。结果示出,所有动物都产生了能够与作为广泛中和抗体的靶标的三个不同表位结合的抗体。图23B示出了免疫血清升高的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123 (图21) 的同源 (G1a) 和异源 (G3a) 中和滴度。由连续稀释曲线计算抑制50%病毒进入所需的免疫血清的倒数滴度。结果示出,7/10的动物产生了能够阻止同源基因型1a丙型肝炎病毒进入Huh7细胞系的抗体,并且6/10的动物产生了能够阻止异源基因型3a病毒进入Huh7肝细胞系的抗体。检测的极限用虚线示出。

[0101] 图24示出了用如图21所示的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行免疫的小鼠中的T细胞应答。在第6周收获脾细胞,并针对gt-1a (H77)、gt-1b (J4) 或gt-3a (k3a650) 使用覆盖HCV蛋白质组的长度 (A和C) 并且用于以下肽池 (B和D) 的HCV肽 (由11aa重叠的15聚体) 进行离体刺激:核心-E1-E2、NS3-4和NS5。通过细胞内细胞因子染色和流式细胞术分别测定IFN γ ⁺CD4⁺ (A和B) 和IFN γ ⁺CD8⁺ (C和D) T细胞频率,其以占总CD4⁺或CD8⁺ T细胞频率的百分比的形式表示。所有数据都绘制为中位数和四分位距。结果示出,动物对同源肽产生CD4⁺和CD8⁺ T细胞,集中在核心E1E2区内的表位,如E2。虽然所测试的2/7的动物对基因型1b具有交叉反应性CD4⁺ T细胞应答,但没有观察到CD8⁺交叉反应性。

[0102] 图25示出了用如图21所示的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行免疫的小鼠中的E2

特异性T细胞应答。在第6周收获脾细胞,并使用来自覆盖E2区的长度的基因型1a(由11aa重叠的15聚体)的E2肽池进行离体刺激。数据示出,用ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行疫苗接种的小鼠产生E2特异性IFN γ T细胞。

[0103] 图26示出了用如图21所示的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行免疫的小鼠中的多功能T细胞应答的分析。在针对gt-1a (H77) 使用覆盖HCV蛋白质组的长度的HCV肽(由11aa重叠的15聚体) 离体刺激脾细胞以检测产生的细胞因子IFN γ 、TNF α 和IL-2之后,通过ICS和流式细胞术测定由疫苗诱导的T细胞多功能性。饼图基数是中位数,并且使用Pestle和SPICE软件进行计算。所有数据都绘制为中位数和四分位距。结果示出,用ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行疫苗接种产生了高度多功能CD4⁺和CD8⁺ T细胞应答。

[0104] 图27提供了用于ChAd0x1-TPA-E2D123的说明性核苷酸序列。

[0105] 图28提供了用于ChAd0x1-TPA-E2D123的布局图。

[0106] 图29提供了在TPA-E2D123免疫原盒的5'的ChAd0x1多核苷酸序列。

[0107] 图30提供了TPA-E2D123免疫原盒布局。

[0108] 图31提供了TPA-E2D123免疫原盒序列;具有Tet操作子序列的CMV启动子;额外的序列;Kozak序列;TPA序列;TPA氨基酸序列;E2D123序列;E2D123氨基酸序列;额外的序列;牛生长激素(BGH) polyA序列。

[0109] 图32提供了在TPA-E2D123免疫原盒的5'的ChAd0x1序列的多核苷酸序列。

[0110] 图33提供了用于MVA-TPA-E2D123的多核苷酸序列。

[0111] 图34提供了用于MVA-TPA-E2D123的布局。

[0112] 图35提供了用于MVA-TTPA-E2D123的序列信息;F11-L-侧接序列;mH5启动子序列;TPA序列;TPA氨基酸序列;E2D123序列;以及F11-R-侧接序列。

[0113] 序列表符号说明

[0114] SEQ ID NO:1包含胰蛋白酶前导序列的D123蛋白序列。

[0115] SEQ ID NO:2经密码子优化以用于人表达的D123 DNA序列。

[0116] SEQ ID NO:3来自图27至35的序列信息。

具体实施方式

[0117] 根据本发明已确定,能够引发对异源HCV基因型的功能性B细胞应答的缺失可变区的HCV E2抗原可以以编码HCV抗原的核酸的形式施用。令人惊讶的是,核酸分子能够在接受者中产生对多种HCV基因型的功能性B细胞应答。在说明性实施例中,在病毒载体中施用编码缺失可变区的HCV E2 RBD的核酸。小鼠疫苗接种研究已证实,与单独施用蛋白质或组合施用蛋白质和DNA相比,编码缺失可变区的HCV E2 RBD的DNA产生的抗体应答水平最低,但这些抗体应答显示出最高水平的能够预防感染,如通过阻止E2与其细胞受体CD81结合的功能性抗体。DNA疫苗也更高地刺激了有助于病毒清除的补体的有效激活剂IgG1和IgG2b。支持数据显示在实例1以及图1至16中。进一步的支持数据显示在其中所述的实例2和3以及图17至26中。说明书提供了关于以下的更多的证据:用ChAdD123进行疫苗接种然后进行两次蛋白质加强的动物产生了交叉反应性抗体特异性(图17),以及与单独使用蛋白质相比,接受用ChAdD123三次疫苗接种或用ChAdD123进行初免,随后使用HMW E2D123进行两次蛋白质加强的动物中功能性抗体的水平更高(图19)。类别转换的证据表明B细胞应答的成熟。

ChAd-D123似乎对于单独蛋白质疫苗接种诱导了不同的类别转换,并与中和相关(图18)。实例3描述了D123也可以在MVA病毒载体中递送的证据(图20-26)。通过对小鼠用ChAdD123初免并且然后用MVA-D123加强来进行实验。动物产生了针对E2的抗体(图22A),所述抗体抑制了E2与CD81 22b之间的相互作用,并被定向到所有三个主要的中和表位(图23A)。抗体对同源病毒(23B LHS)和异源G3a病毒(23B RHS)均具有中和作用。

[0118] 此外,对G1a肽产生CD4⁺ T细胞应答,并且一些应答对G3a肽具有交叉反应性(图24A)。CD4⁺ T细胞应答指向核心E1E2区(图24B),并且一些应答对G3a具有交叉反应性(图24B)。对G1a肽产生CD8⁺ T细胞应答(图24A)。CD8⁺ T细胞应答指向核心E1E2区(图24B)。所有T细胞都指向E2肽(图25)。多功能CD4⁺ T细胞应答产生3种细胞因子,CD8⁺ T细胞应答主要产生TNF α (图26)。

[0119] 因此,本文所公开的是用于基于施用基于核酸的疫苗来对受试者进行疫苗接种以使受试者免于当前或未来的HCV感染的组合物和方法。

[0120] 一方面,本公开提供了一种预防或减少受试者的HCV感染的方法,所述方法包括向所述受试者施用编码缺失可变结构域的HCV E2蛋白质分子的核酸分子。

[0121] 一方面,本公开提供了一种用于疗法使用或用于治疗或预防HCV感染或用于引发免疫应答的组合物,所述组合物包括编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子,其中向受试者施用所述核酸,并且其中产生缺失可变结构域的E2蛋白,并且所述缺失可变结构域的E2蛋白在所述受试者中产生对HCV的免疫应答,包含对HCV的功能性B细胞应答。

[0122] 因此,在一个实施例中,所述组合物用作预防性或治疗性疫苗,所述疫苗产生有效的功能性B细胞应答,能够减少或阻止病毒在宿主中的以及因此在宿主之间的传播。

[0123] 因此,在一个实施例中,所述组合物用作疫苗以阻止病毒在宿主中的以及因此在宿主之间的传播。

[0124] “丙型肝炎病毒”或“HCV”是属于黄病毒属科内的丙型肝炎病毒属的小型包膜正义单链RNA病毒。如本文所使用的,所述术语是指任何基因型的HCV,例如但不限于以下株:HCV基因型1(G1)、HCV基因型2(G2)、HCV基因型3(G3)、HCV基因型4(G4)、HCV基因型5(G5)、HCV基因型6(G6)、HCV基因型7(G7)、HCV基因型8(G8),并且可以包含其任何亚型或准种,例如亚型a、b、c、d、e等。HCV编码病毒进入宿主细胞所需的两种糖蛋白E1和E2。术语“HCV E2糖蛋白”、“E2糖蛋白”、“E2二聚体”、“E2三聚体”或“E2”、“E2单体”、“HCV E2”等包含来自HCV的任何基因型或分离株的E2糖蛋白。所述术语进一步包含非天然存在的变体,所述变体包含全长E2糖蛋白的部分,所述部分包含例如介导受体结合,或介导由一种或多种识别构象和/或其它表位的抗体进行的中和抗体结合的那些部分,或介导E1E2二聚体形成的那些部分。

[0125] HCV E2糖蛋白含有约11个很大程度上保守的N-连接糖基化位点和形成不稳定二硫化物的18个保守的半胱氨酸。受体结合结构域(RBD)独立于其它E1E2序列进行折叠,并且含有大多数NAb结合位点。通过氨基酸残基384-661(G1)跨越RBD。RBD可以延伸超出残基661到E2的胞外域的C端边界。E2 RBD的异源表达导致保留结合CD81的能力的可溶性蛋白的分泌。位于RBD内的是三个高度可变区或HVR:HVR1(氨基酸384-410)、HVR2(氨基酸460-481)和igVR(基因型间可变区,570-580)(McCaffrey等人《病毒学杂志(J.Virol.)》81:9584-9590,2007)。可变区在免疫逃避中起着重要作用,因为其充当免疫诱饵,屏蔽了潜在的保守残基。“免疫球蛋白中和面”或“中和面”是指产生抑制E2与CD81的结合的免疫球蛋白的E2的面。这

三个可变区可以同时从RBD缺失而不中断其天然折叠,这表明这三个可变区在保守的核心结构域之外。RBD通过保守的C端茎天然连接到跨膜结构域。X射线晶体学和电子显微镜显示,RBD核心采用紧密的免疫球蛋白样折叠。用于对于所有HCV株的主要细胞受体CD81的结合位点包括四个与bNAb表位重叠的高度保守的表面暴露的片段(Drummer等人《病毒学杂志》76:11143-11147,2002)。晶体结构证实了HVR2和igVR形成二硫键合的表面暴露的环,如前所述。

[0126] HCV E2具有高度免疫原性,然而,针对HCV E2产生的抗体几乎不能有效预防感染。指向N末端HVR1的抗体具有免疫显性,然而具有分离株特异性,对于HCV的中和异源株和基因型的能力有限。因此,针对HVR1的抗体驱动免疫逃逸,并且HVR1被认为是免疫诱饵。表位与参与CD81结合的序列重叠的中和抗体通常因为此区的高度序列保守而广泛中和,但通常只在感染慢性阶段出现。阻断CD81结合的人NAb识别位于四个免疫原性结构域内的表位。HVR1特异性抗体可以屏蔽CD81结合位点以及其中的保守NAb表位,竞争结合活性并且降低NAb对结构域E的有效性。在天然免疫应答和疫苗所产生的免疫应答中都产生了非NAb的高滴度,并且映射到位于来自CD81结合位点的E2的相对面的结构域A。这些非NAb具有免疫显性,不能阻止E2-CD81结合,对于多个基因型具有交叉反应性,并且干扰NAb的活性。这些研究显示,对HCV的有效保护性抗体应答需要产生协同作用以预防感染的选择抗体特异性。

[0127] 如本文所使用的,“CD81”是指分化簇81,其是四次穿膜蛋白(tetraspanin)超家族的跨膜蛋白,并且是针对不同HCV株的主要宿主细胞受体。

[0128] 如本文所使用的,“ Δ 123E2”或“Delta123E2”是指E2多肽,其中HVR1、HVR2和igVR/VR3已被去除或缺失,并且任选地用连接子进行替换,如McCaffrey等人2012中大体描述的。在一个实施例中,本发明已经用其中已去除每个可变结构域编码区的编码E2Delta123的核酸进行说明。虽然此实施例可能是最有效的,然而,可以理解的是,编码可变区的多核苷酸的一些部分或大部分可以被保留,并且相对于包括可变区的完整的对照E2多肽,仍然引起增强的中和抗体应答和减弱的非中和抗体应答,并且涵盖这些实施例。因此,例如,设想在一个实施例中,总可变区多核苷酸序列的1%至50%可以被保留,并且仍然落入本发明的范围内。在一个实施例中,少于30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的E2可变结构域多核苷酸被保留。在一个实施例中,少于20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的E2可变结构域多核苷酸被保留。在一个实施例中,少于10%或少于5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的E2可变结构域多核苷酸被保留。 Δ 123多肽保留CD81结合能力,并且可以以单体、二聚、三聚和各种低聚形式存在。在一个实施例中,HMW形式可以是HMW1或HMW2。如本文所使用的,“HMW1”是指分子量为约2402kDa的 Δ 123的低聚形式。如本文所使用的,“HMW2”是指分子量为约239.3kDa的 Δ 123的低聚形式。

[0129] HCV E2糖蛋白的一种说明形式是E2糖蛋白的受体结合部分,所述受体结合部分包括基因型H77 1a(E2₆₆₁)的氨基酸384-661或来自另一种HCV基因型的对应部分。

[0130] 如本文所使用的,“基因型特异性抗体”是指与单个HCV基因型或两个非常类似的基因型结合的抗体。本领域技术人员将理解的是,HCV基因型可以是任何HCV基因型。在一个实施例中,HCV基因型选自以下中的一种或多种:G1、G2、G3、G4、G5、G6和G7。

[0131] 在一个实施例中，E2蛋白是 E2₆₆₁ Δ 123 (AHVR123，在本文中也称为 Δ 123、D123、AHVR1+2+3、D123 E2₆₆i-his、DI23 E2₆₆₁、Δ 123E2₆₆₁ 和 Δ 123E2₆₆₁-his)。在一些实施例中，E2₆₆₁ Δ 123E2包括HCV H77c的氨基酸384-661，其中可变区1和2以及igVR (3) 被短连接子基序 (AHVR123) 所替换。本发明的其它实施例包含具有HVR1、HVR2或igVR缺失或用短连接子替换的任意组合的HCV E2蛋白。这些可以缩写为 Δ 1；Δ 1,2 (Δ 12)；Δ 2；Δ 2,3 (Δ 23)；Δ 3；和 Δ 1,3 (Δ 13)。

[0132] 术语“分离”和“纯化”意指基本上或本质上不含通常以其天然状态伴随的组分材料。例如，“分离的核酸分子”是指从以天然存在的状态侧接的序列分离的核酸或多核苷酸，例如已经从通常与片段相邻的序列中移除的DNA片段。具体地，分离的HCV E2包含从其天然细胞环境，以及与细胞的其它组分的缔合中体外分离和/或纯化蛋白质。在不限制的情况下，分离的核酸、多核苷酸、肽或多肽可以是指通过纯化分离的天然序列，或者是指通过重组或合成手段产生的序列。

[0133] 如本文所使用的，“广泛中和抗体”是指针对免疫原/HCV的多种基因型或亚型提供交叉保护的抗体。在实施例中，广泛中和抗体识别HCV的多于两种基因型和/或亚型。在实施例中，广泛中和抗体识别至少3种、或至少4种、或至少5种、或至少6种、或至少7种或至少8种HCV基因型。在实施例中，HCV基因型选自：G1、G2、G3、G4、G5、G6、G7。在实施例中，广泛中和抗体结合3种HCV基因型。在实施例中，广泛中和抗体结合4种HCV基因型。在实施例中，广泛中和抗体结合5种HCV基因型。在实施例中，广泛中和抗体结合6种HCV基因型。在实施例中，广泛中和抗体结合7种HCV基因型。在实施例中，广泛中和抗体结合其它HCV基因型。本领域技术人员将理解，广泛中和抗体可能需要数周或数月以在受试者中产生。

[0134] 如本文所述的核酸分子可以呈任何形式，如DNA或RNA，包含体外转录的RNA或合成RNA、mRNA或PNA或其混合物。核酸包含基因组DNA、cDNA、mRNA、重组产生和化学合成的分子及其经修饰的形式。核酸分子可以是单链的或双链的，并且线性或共价闭合以形成环。RNA可以通过稳定序列、封端和聚腺苷酸化进行修饰。RNA或DNA，并且可以作为质粒递送以表达抗原并诱导免疫应答。通常优选基于RNA的方法，并且这些方法可以包含扩增或非自扩增构造。

[0135] 在一些实施例中，通过瞬时体内转染施用的多核苷酸是经化学修饰的RNA，其中对一定比例 (例如，10%、30%、50%或100%) 的至少一种类型的核苷酸 (例如胞嘧啶) 进行化学修饰以增加其体内稳定性。例如，在一些情况下，经修饰的胞嘧啶是5-甲基胞嘧啶。此类多核苷酸可具体地用于体内递送/转染到细胞，尤其当与转染/递送剂组合时。在一些情况下，经化学修饰的RNA是其中大部分 (例如，所有) 胞嘧啶为5-甲基胞嘧啶，并且其中大部分 (例如，所有) 尿嘧啶为假尿嘧啶的经化学修饰的RNA。例如，WO 2011/130624中描述了这种经修饰的RNA的合成和使用。DNA和RNA多核苷酸的体内转染方法在本领域是已知的，如在例如Liu等人 (2015) 和Youn等人 (2015) 中所概述的。

[0136] 术语“RNA”涉及包括核糖核苷酸残基并且优选地完全或基本上由核糖核苷酸残基构成的分子。“核糖核苷酸”涉及在β-D-呋喃核糖基的2'-位置具有羟基基团的核苷酸。所述术语包含双链RNA、单链RNA、分离的RNA，如部分纯化的RNA、基本上纯的RNA、合成的RNA、重组产生的RNA以及经修饰的RNA，所述RNA通过添加、缺失、取代和/或改变一个或多个核苷酸而与天然存在的RNA不同。此类改变可以包含添加非核苷酸材料，如添加到RNA的末端或内

部,例如在RNA的一个或多个核苷酸处。RNA分子中的核苷酸还可以包括非标准核苷酸,如非天然存在的核苷酸或化学合成的核苷酸或脱氧核苷酸。这些改变的RNA可以被称作类似物或天然存在的RNA的类似物。

[0137] 因此,在一个实施例中,与其特定野生型编码序列(即未修饰的mRNA)的编码区的G/C含量相比,修饰了,具体地增加了核酸编码区的编码区的G/C含量。与特定野生型mRNA的编码氨基酸序列相比,mRNA的编码氨基酸序列优选地未被修饰。

[0138] 基于经优化的mRNA的组合物可以包括5'和3'非翻译区(5'-UTR,3'-UTR),所述非翻译区优化如本领域所知的翻译效率和细胞内稳定性,以及编码缺失可变区的HCV E2的开放阅读框。在一个实施例中,可以通过用磷酸酶处理RNA来去除未封端的5'-三磷酸酯。RNA可以具有经修饰的核糖核苷酸以增加其稳定性和/或降低细胞毒性。例如,在一个实施例中,在RNA中,用5-甲基胞苷部分或完全取代胞苷。可替代地或另外地,用假尿苷部分或完全,优选地完全取代尿苷。这些修饰还可以减少可能阻碍RNA翻译的不加选择的免疫灭活。在一个实施例中,术语“修饰”涉及提供具有5'-封端或5'-封端类似物的RNA。术语“5'-封端”是指在mRNA分子的5'-末端上发现的封端结构,并且通常由通过不寻常的5'到5'三磷酸酯连接与mRNA连接的鸟苷核苷酸组成。在一个实施例中,此鸟苷在7-位置处被甲基化。术语“常规5'-封端”是指天然存在的RNA5'-封端,优选地7-甲基鸟苷封端。术语“5'-封端”包含类似于RNA封端结构的5'-封端类似物,并且被修饰成具有稳定RNA和/或增强RNA翻译的能力。提供具有5'-封端或5'-封端类似物的RNA可以通过在所述5'-封端或5'-封端类似物的存在下对DNA模板进行体外转录来实现,其中所述5'-封端共转录掺入产生的RNA链中,或者RNA可以例如通过体外转录产生,并且5'-封端可以使用封端酶,例如,牛痘病毒的封端酶,在转录后连接到RNA。

[0139] RNA的进一步修饰可以是天然存在的UTR,如X区尾部的延伸或截断,或5'或3'非翻译区(UTR)的改变,如引入与所述RNA的编码区无关的UTR,例如,将现有的3'-UTR与源自珠蛋白基因,如 $\alpha 2$ -珠蛋白、 $\alpha 1$ -珠蛋白、 β -珠蛋白的3'-UTR的一个或多个,优选地两个拷贝进行交换或插入所述拷贝。具有未经掩蔽的poly-A序列的RNA比具有经掩蔽的poly-A序列的RNA更有效地被翻译。

[0140] 术语“poly(A)尾”或“poly-A序列”涉及可能位于RNA分子的3'-末端的腺苷(A)残基的序列,并且“未经掩蔽的poly-A序列”是指位于RNA分子的3'末端的poly-A序列以poly-A序列的A结尾,并且其后没有位于poly-A序列的3'末端(即下游)的A以外的核苷酸。此外,约120个碱基对的长poly-A序列产生RNA的最佳转录稳定性和翻译效率。

[0141] 因此,为了增加RNA的稳定性和/或表达,其可以被修饰以与异源poly-A序列一起存在,所述序列优选地具有10个至500个,更优选地30个至300个,甚至更优选地65个至200个,并且尤其是100个至150个腺苷残基的长度。在特别优选的实施例中,poly-A序列具有大约120个腺苷残基的长度。为了进一步增加根据本发明使用的RNA的稳定性和/或表达,可以将poly-A序列去掩蔽。

[0142] 另外,将3'-非翻译区(UTR)掺入到RNA分子的3'-非翻译区可以使翻译效率提高。可以通过掺入两个或更多个这样的3'-非翻译区来实现协同效应。3'-非翻译区对于其被引入其中的RNA可以是自体的或异源的。在一个特定的实施例中,3'-非翻译区源自人 β -珠蛋白基因。

[0143] 上述修饰,即任选地掺入poly-A序列、poly-A序列的去遮蔽和掺入一个或多个3'-非翻译区的组合对于RNA的稳定性和增加翻译效率具有协同作用。

[0144] 为了增加RNA的表达,可以在编码区内对其进行修饰,以增加GC含量,以增加mRNA稳定性并进行密码子优化,并且因此增强细胞中的翻译。经修饰的mRNA可以酶促合成并包装到纳米颗粒,如脂质纳米颗粒中,并且可以例如肌肉内施用。自我复制RNA或鱼精蛋白复合RNA方法也已示出产生针对病毒感染的免疫应答。

[0145] 核酸分子可以包封在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中、胶体药物递送系统(例如脂质体、微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中。这些技术在本领域是已知的,并在《雷明顿:药学科学与实践(Remington,the Science and Practice of Pharmacy)》,第20版,Remington,J编辑(2000)中公开。

[0146] 全身施用呈纳米颗粒或胶体系统形式的核酸的各种方法是已知的。在非病毒方法中,阳离子脂质体用于诱导DNA/RNA冷凝并促进细胞摄取。阳离子脂质体通常由阳离子脂质(如DOTAP)和一种或多种辅助脂质(如DOPE)组成。所谓的“脂质复合物”可以由阳离子(带正电)脂质体和阴离子(带负电)核酸形成。在最简单的情况下,通过使用特定混合方案将核酸与脂质体混合而自发形成脂质复合物,但是可以应用各种其它方案。在一个实施例中,纳米颗粒RNA调配物,如RNA脂质复合物被生产为具有确定的粒度,其中颗粒的净电荷接近于零或为负电荷。例如,如W02013/143683中所公开的,来自RNA和脂质体的电中性或带负电荷的脂质复合物在全身施用后导致脾或免疫细胞中大量的RNA表达。在一个实施例中,纳米颗粒包括至少一种脂质。在一个实施例中,纳米颗粒包括至少一种阳离子脂质。阳离子脂质可以是单阳离子的或多阳离子的。任何阳离子两亲性分子,例如包括至少一个亲水性和亲脂性部分的分子是本发明的含义内的阳离子脂质。在一个实施例中,正电荷由至少一种阳离子脂质提供,并且负电荷由RNA提供。在一个实施例中,纳米颗粒包括至少一种辅助脂质。辅助脂质可以是中性或阴离子脂质。辅助脂质可以是天然脂质,如磷脂或天然脂质的类似物,或完全合成的脂质,或与天然脂质没有相似性的脂质样分子。在一个实施例中,阳离子脂质和/或辅助脂质是形成双层的脂质。

[0147] 在一个实施例中,至少一种阳离子脂质包括1,2-二-0-十八烷基-3-三甲基铵丙烷(DOTMA)或其类似物或衍生物和/或1,2-二油酰基-3-三甲基铵-丙烷(DOTAP)或其类似物或衍生物。

[0148] 在一个实施例中,至少一种辅助脂质包括1,2-二-(9Z-十八烷酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)或其类似物或衍生物、胆固醇(Choi)或其类似物或衍生物和/或1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)或其类似物或衍生物。

[0149] 在一个实施例中,至少一种阳离子脂质与至少一种辅助脂质的摩尔比为10:0至3:7,优选地9:1至3:7、4:1至1:2、4:1至2:3、7:3至1:1或2:1至1:1,优选地约1:1。在一个实施例中,在此比率下,阳离子脂质的摩尔量由阳离子脂质的摩尔量乘以阳离子脂质中的正电荷数得出。在本文所述的纳米颗粒中,脂质可以与RNA形成复合物和/或可以包裹RNA。在一个实施例中,纳米颗粒包括脂质复合物或脂质体。在一个实施例中,脂质被包括在封装所述RNA的囊泡中。囊泡可以是多层囊泡、单层囊泡或其混合物。囊泡可以是脂质体。

[0150] 可以将抗原编码序列插入任何合适的载体中。在一个实施例中,载体的目的至少是将编码核酸传输至宿主环境,以促进蛋白质表达和呈递给宿主免疫应答。载体可以是复

制的或非复制的。

[0151] 如本文所使用的,术语“载体”包含至少插入了抗原编码序列的任何传递部分,包含质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体(如 λ 噬菌体)、病毒样颗粒、病毒载体(如腺病毒、腺相关病毒(AAV)、甲病毒、黄病毒、单纯疱疹病毒(HSV)、麻疹病毒、CMV、弹状病毒、逆转录病毒、慢病毒、新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV)、痘病毒和小核糖核酸病毒或杆状病毒载体)或人工染色体载体(如细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)或PI人工染色体(PAC))。载体包含表达以及克隆载体。表达载体包括质粒以及病毒载体,并且通常含有在特定宿主生物体(例如,细菌、酵母、植物、昆虫或哺乳动物)中,或者在体外表达系统中表达可操作地连接的编码序列所必需的所需编码序列和适当的DNA序列。克隆载体通常用于工程化和扩增某个所需的DNA片段,并且可能缺少表达所需DNA片段所需的功能性序列。

[0152] 表达载体通常包含可操作地连接到编码E2多肽的核酸分子的转录和翻译调节核酸。本上下文中的“可操作地连接”是指以启动转录的方式,相对于E2多肽的编码序列定位转录和翻译调节DNA。通常,这意味着启动子和转录起始或开始序列位于蛋白质编码区的5'。转录和翻译调节核酸通常适用于用于表达外源蛋白的细胞;例如,来自哺乳动物细胞,并且具体地人的转录和翻译调节核酸序列优选地用于在哺乳动物和人中表达蛋白质。许多类型的适当的表达载体和合适的调节序列是本领域已知的。

[0153] 病毒载体可以包括改良的牛痘安卡拉(Modified Vaccinia Ankara,MVA)。当在初免加强方案中用作疫苗加强时,病毒载体可以包括MVA。病毒载体可以包括腺相关病毒(AAV)或慢病毒。病毒载体可以是减毒病毒载体。

[0154] 除非另外定义,否则本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的一般技术人员通常所理解相同的含义。与本文所描述的那些材料和方法类似或等效的任何材料和方法可以用于实践或测试本公开。对于本领域的定义和术语和本领域的技术人员已知的其它方法,从业者尤其关注Ausubel等人,《当代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》,增刊47,纽约的约翰威利父子出版公司(John Wiley&Sons,New York),1999;Colowick和Kaplan编辑,《酶学方法(Methods in Enzymology)》,学术出版社(Academic Press,Inc.);Weir和Blackwell编辑,《实验免疫学手册(Handbook of Experimental Immunology)》,第I-IV卷,布莱克威尔科学出版社(Blackwell Scientific Publications),1986;《雷明顿:药学科学与实践》,第20版,Remington,J.编辑(2000)。

[0155] 在另一个实施例中,所述组合物进一步包括药学或生理学上可接受的载体或稀释剂。

[0156] 药物组合物根据常规药物配制技术进行方便地制备。参见,例如,《雷明顿:药学科学与实践》,第20版,Remington,J.编辑(2000)较新的版本。除了活性物质之一以外,这些组合物还可以包括药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域公知的其它材料。此类材料应该是无毒的并且不应该干扰活性成分的功效。载体可以采取多种形式,这取决于施用(例如静脉内、口服或肠胃外)所需的制剂的形式。

[0157] 本说明书中描述的疫苗组合物可以与其它疫苗或治疗组合。现有的抗HCV药物治疗是高度有效的并且是本领域已知的。考虑了通过例如检查点抑制剂或通过包含其它佐剂型分子来改善免疫应答的药剂,以与受试者疫苗联合使用。

[0158] 在一个实施例中,核酸分子与佐剂组合施用。

[0159] 在一个实施例中,核酸分子在没有传统使用的疫苗佐剂的情况下施用。

[0160] 如果作为与一种或多种佐剂的混合物进行施用,可以增强对免疫原的免疫应答。免疫佐剂通常以以下中方式的一种或多种方式起作用:(1)免疫调节(2)增强呈递(3)CTL产生(4)靶向;和/或(5)贮库产生。

[0161] 可能或可能不包含的说明性佐剂包含:颗粒或非颗粒佐剂、完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)、铝盐、乳剂、ISCOMS、LPS衍生物,如MPL,及其衍生物,如3D-MPL以及GLA和AGP、源自分枝杆菌的蛋白质,如胞壁酰二肽或三肽,具体地来自皂皮树(*Quillaja saponaria*)的皂苷,如QS21、QS7和ISCOPREP™皂苷、ISCOMATRIX™佐剂,以及肽,如胸腺肽 $\alpha 1$ 。除了皂苷组分之外,佐剂还可以包括甾醇,如 β -谷甾醇、豆甾醇、麦角甾醇、麦角钙化醇和胆固醇。在一些实施例中,佐剂以水包油乳液的形式存在,例如包括角鲨烯、 α -生育酚和表面活性剂(参见例如W095/17210)或以脂质体的形式存在。本文使用的术语“脂质体”是指封闭水性内部的单层或多层脂质结构。脂质体和脂质体调配物是本领域公知的。脂质体呈递例如描述于W0 96/33739和W02007/068907中。能够形成脂质体的脂质包含所有具有脂肪或类脂肪特性的物质。动态激光散射是本领域技术人员公知的用于测量脂质体尺寸的方法。佐剂的广泛描述可以见于Cox和Coulter,“佐剂技术及应用进展(Advances in Adjuvant Technology and Application)”,《利用生物技术控制动物寄生虫(Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology)》,第4章,Young, W.K. 编辑, CRC出版社(CRC Press) 1992中,以及Cox和Coulter,《疫苗(Vaccine)》15(3):248-256, 1997中。

[0162] 根据这些实施例,通常在足以引发包括功能性E2特异性抗体的产生的免疫应答的时间和条件下施用组合物。本发明的组合物可以作为单一剂量或应用施用。可替代地,组合物可以涉及重复剂量或应用,例如组合物可以施用2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次或更多次。

[0163] 本申请所考虑的疫苗接种方案的实例如下:在初始疫苗接种后,受试者通常在2周至4周的间隔(例如3周的间隔)后接受加强,随后任选地重复加强。

[0164] 在一些实施例中,测试了核酸疫苗接种的受试者的IgG1和/或IgG3抗体的存在,这表明了通过补体介导的机制激活补体并且清除病毒的能力。在一个实施例中,测试了经疫苗接种的受试者的IgG2a、3和/或IgM的存在,这指示经疫苗接种的受试者产生功能性抗体应答而非非功能性抗体的能力。

[0165] 在一些实施例中,针对体内表达的E2多肽产生的抗体包含至少部分或基本上中和HCV生命周期的重要部分,如宿主细胞侵入或病毒出芽的那些抗体。功能性抗体可以通过促进吞噬作用或细胞毒性或补体介导的清除来展示其生命周期阻断作用。

[0166] 在一个实施例中,本描述提供了一种编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子在治疗或预防HCV感染或在制造用于治疗或预防HCV感染的基于核酸的药物中的用途。术语“制造”包含生产或筛选。

[0167] 在另一个实施例中,本公开提供了一种在受试者或患者中引发体液免疫应答的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的能够表达HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子。

[0168] 在一个实施例中,缺失可变的E2是Delta123。在一个实施例中,缺失可变的E2,如

E2 Delta 123具有至少四个选自C581至C620的突变或破坏的半胱氨酸。

[0169] 在相关方面,本公开提供了一种针对HCV对受试者群体进行疫苗接种的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的能够表达HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子,并且其中疫苗在群体内产生基本上均匀的抗体应答,所述应答可例如通过如图6所示的受试者之间功能性抗体滴度的差异或通过如图7或8或9所示的肽结合测量。

[0170] 在相关实施例中,本发明提供了一种用于治疗受试者的丙型肝炎感染或用于针对丙型肝炎感染对受试者进行免疫的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的组合物,所述组合物包括编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子。

[0171] 如本文所使用的,术语“有效量”包含“治疗有效量”和“预防有效量”,所述术语是指作为单剂量,或是作为在至少一些受试者中提供所需的治疗、预防或生理效果的系列或缓释系统的一部分的足够量的本发明的组合物。不期望的作用,例如副作用,有时可能会与期望治疗效果一起显现;因此,从业者在确定适当的“有效量”时权衡潜在利益与潜在风险。

[0172] 所需的组合物的确切量在受试者之间将是不同的,取决于受试者的物种、年龄和一般条件、施用模式等等。因此,不可能指定确切的‘有效量’。然而,本领域的普通技术人员可以使用常规技巧或实验确定任何个体情况下的适当‘有效量’。本领域的普通技术人员将能够基于如组合物或其它试剂的事先施用、受试者的尺寸、受试者的症状的严重程度、感染人群中症状的严重程度、病毒载量和特定的组合物或所选择的施用途径等此类因素确定所需量。

[0173] 术语“治疗”是指在至少一些受试者中,HCV的一种或多种症状或发生HCV晚期症状的风险或传播HCV的风险中的任何可测量的或统计学上显著的改善。

[0174] 术语“预防 (prevention)”和“预防 (prophylaxis)”等可互换使用,并且包含将本发明的组合物施用于未知感染HCV的受试者,以预防或减轻随后的感染或降低被感染的风险或减轻与HCV感染相关的病状的严重程度或发作或病状的体征。

[0175] 疫苗组合物的施用通常出于预防目的。组合物的预防性施用用于预防或减轻任何随后的感染。“药理学上可接受的”组合物是接受者患者耐受的组合物。经考虑施用有效量的疫苗。“有效量”是足以实现所需生物效果,如诱导足够的体液免疫以阻断生命周期的至少一个阶段的量。这可以取决于疫苗的类型、接受者的年龄、性别、健康状况和体重。所需生物学效果的实例包含但不限于:无症状产生、症状减轻、组织或鼻腔分泌物中病毒滴度的降低、针对丙型肝炎病毒感染的完全保护以及针对丙型肝炎病毒感染的部分保护、提高群体免疫力、针对如肝炎、肝细胞癌等慢性感染的后果进行保护。

[0176] 通常,对于病毒载体,施用约 5×10^7 至 5×10^{12} 个病毒颗粒,通常约 5×10^9 至 5×10^{10} 个病毒颗粒。

[0177] 编码Delta123HCV E2的活性剂mRNA的合适剂量的范围可以在但不限于每个患者约10ng至1g、100ng至100mg、1微克至10微克或30-300微克mRNA的范围内。在一个实施例中,组合物被相应地调配为包括一个剂量、两个剂量、三个剂量或甚至更多个剂量。

[0178] 用于静脉内施用编码HVC E2的核酸分子的合适剂量范围通常为约0.001微克至10微克核酸。用于鼻内施用的合适剂量范围通常为约0.01pg/kg体重至10mg/kg体重。有效剂量可以从来源于体外或动物模型测试系统的剂量应答曲线外推。栓剂通常含有范围为0.5重量%至10重量%的活性成分;口服组合物优选地含有10%至95%的活性成分。

[0179] 在一些方面,核酸疫苗的施用和/或加强施用可以重复并且此类施用可以间隔至少1天、2天、3天、4天、5天、10天、15天、30天、45天、2个月、75天,例如1至5天、1至10天、5至15天、10至20天、15至25天、20至30天、25至35天、30至50天、40至60天、50至70天、1至75天,或1个月、2个月、3个月、4个月、5个月,或至少6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、18个月、24个月、30个月、36个月、1年、2年、3年、5年、10年、15年、20年、30年、40年、50年、60年,甚至更长时间。在某些方面,本发明的疫苗可以每年一次作为单剂量施用于受试者。

[0180] 在特定方面,核酸疫苗可以在施用直接抗病毒药物治疗之前,例如在抗病毒药物治疗之前至少1天、2天、3天、4天、5天、10天、15天、30天、45天、2个月、75天,例如1至5天、1至10天、5至15天、10至20天、15至25天、20至30天、25至35天、30至50天、40至60天、50至70天、1至75天、或1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、或至少6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月向受感染的受试者施用至少一次,优选地两次或更多次。然后可以在治疗之前、治疗同时或治疗之后直接施用第二或另外的剂量。

[0181] 在一些实施例中,如果本发明的疫苗或组合物的存在导致接受者患者的生理学发生可检测的变化,所述变化增强了或表明增强了针对感染性丙型肝炎病毒的至少一种株的至少一种原发性或继发性体液应答,则本发明的疫苗或组合物在生理学上是显著的。施用疫苗组合物以免于病毒感染。“保护”不必是绝对的,即,如果与对照人群或一组患者相比有统计学上显著的改善,则无需完全预防或根除丙型肝炎感染。保护可能局限于降低丙型肝炎病毒感染的症状的发作的严重程度或速度。

[0182] 在一个实施例中,本发明的疫苗组合物在感染发作之前提供给受试者(以预防或减轻预期的感染),或在感染起始之后提供给受试者,并且从而免于病毒感染。在一些实施例中,在感染发作之前或之后向受试者提供本发明的疫苗组合物,以减少受试者之间的病毒传播。

[0183] 还应当理解,本发明的组合物可以作为单独的活性药剂施用,或与一种或多种药剂组合使用,以治疗或预防丙型肝炎感染或与HCV感染相关的症状。与本发明的组合物或组合物的组合联合施用的其它药剂包含用于由HCV感染引起的疾病或通过直接或间接机制抑制HCV病毒复制的疗法。这些药剂包含但不限于宿主免疫调节剂(例如,干扰素- α 、聚乙二醇干扰素- α 、复合干扰素、干扰素- β 、干扰素- γ 、CpG寡核苷酸等);抑制宿主细胞功能的抗病毒化合物,如肌苷一磷酸脱氢酶(例如利巴韦林(ribavirin)等);调节免疫功能的细胞因子(例如,白细胞介素2、白细胞介素6和白细胞介素12);增强1型辅助性T细胞应答的发育的化合物;干扰RNA;反义RNA;包括针对HCV的HCV抗原或抗原佐剂组合的疫苗;与宿主细胞组分相互作用以通过抑制内部核糖体进入位点(IRES)启动HCV病毒复制的翻译步骤来阻断病毒蛋白合成,或通过靶向膜蛋白,例如HCV P7等的病毒孔蛋白家族的药剂来阻断病毒颗粒成熟和释放的药剂;以及通过靶向参与病毒复制的病毒基因组的其它蛋白质来抑制HCV复制和/或干扰其它病毒靶标的功能的任何药物或药物组合,如NS3 NS4A蛋白酶、NS3解旋酶、NS5B聚合酶、NS4A蛋白和NS5A蛋白的抑制剂。

[0184] 根据又一个实施例,本发明的药物组合物可以进一步包括HCV生命周期中的靶标的其它抑制剂,包含但不限于解旋酶、聚合酶、金属Lon蛋白酶、NS4A蛋白、NS5A蛋白和内部核糖体进入位点(IRES)。

[0185] 通常在足以引发包括功能性E2特异性抗体的产生的免疫应答的时间和条件下进行施用。免疫原性组合物可以以方便的方式进行施用,如通过肺部、口服、静脉内(水溶性)、腹膜内、肌内、皮下、皮内、鞘内或栓剂途径或植入(例如使用缓释调配物)。施用可以是全身的或局部的,但是全身更为方便。其它考虑的施用途径是通过贴片、细胞转移、植入、舌下、眼内、局部、口服、直肠、阴道、鼻或经皮。施用可以是体内或离体、体外的。例如,利用电穿孔、基因枪、超声或高压注射的方法可以用于将核苷酸直接递送至细胞。

[0186] 如本文所使用的,“免疫应答”是指整个身体对本发明的组合物的存在的反应,包含产生抗体和对组合物产生免疫力。因此,对抗原的免疫应答还包含在受试者中对所关注的抗原产生体液和/或细胞免疫应答。“体液免疫应答”由浆细胞产生的抗体介导。“细胞免疫应答”是由T淋巴细胞和/或其它白细胞介导的一种应答。

[0187] 本发明的实施例还提供用于评估对组合物的功能性免疫应答的测定。测定可以包括体内测定,如测量抗体应答和迟发型超敏应答的测定。在实施例中,主要测量抗体应答的测定可以测量B细胞功能以及B细胞/T细胞相互作用。对于抗体应答测定,可以在抗原攻击后比较血液中的抗体滴度。这些水平可以根据抗体的类型,例如IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA或IgD进行定量。此外,免疫系统的发展可以通过在没有抗原刺激的情况下确定血液中抗体和淋巴细胞的水平来评估。

[0188] 此外,在实施例中,可以进行表型细胞测定以确定某些细胞类型的频率。可以进行外周血细胞计数以确定血液中淋巴细胞或巨噬细胞的数量。抗体可以用于筛选外周血淋巴细胞以确定表达某种抗原的细胞的百分比,如在确定CD4细胞计数和CD4/CD8比率的非限制性实例中。

[0189] 根据这些实施例,通常在足以引发免疫应答的时间和条件下施用组合物,所述免疫应答包括产生E2特异性抗体或功能性免疫应答、补体激活、吞噬作用和细胞毒性等。本发明的组合物可以作为单一剂量或应用进行施用。可替代地,组合物可以涉及重复剂量或应用,例如组合物可以施用2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次或更多次。可以以超过两个月的间隔或更频繁地进行多次施用。

[0190] “药学上可接受的载体和或稀释剂”是包含在其它方面并非不合需要,即其本身不太可能引起或不太可能引起与活性组合物的实质性不良反应的材料的药物媒介剂。载体可以包含所有溶剂、分散介质、涂料、抗菌剂和抗真菌剂、用于调节张力、增加或降低吸收或清除率的药剂、用于维持pH的缓冲剂、螯合剂、膜或屏障穿越剂。药学上可接受的盐是在其它方面并非不合需要的盐。药剂或包括药剂的组合物可以以药学上可接受的无毒盐的形式,如酸加成盐或金属络合物进行施用。

[0191] 对于口服施用,可以将组合物调配成固体或液体制剂,如胶囊、丸剂、片剂、锭剂、粉末、悬浮剂或乳剂。在制备口服剂型的组合物时,在口服液体制剂(例如悬浮剂、酏剂和溶液)的情况下,可以使用例如水、乙二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂、悬浮剂等;或在口服固体制剂(例如粉末、胶囊和片剂)的情况下,可以使用载体,如淀粉、糖、稀释剂、造粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等任何常用的药物介质。片剂和胶囊由于其施用简易性而代表了最有利的口服单位剂型,在所述情况下显然使用固体药物载体。片剂可能含有粘合剂,如黄芪胶、玉米淀粉或明胶;崩解剂,如海藻酸;以及润滑剂,如硬脂酸镁。如果需要,片剂可以通过标准技术进行包糖衣或包肠衣。可以将活性组合物包封以使其稳定地通过胃肠道。参见例

如,国际专利公开第WO 96/11698号。

[0192] 对于肠胃外施用,组合物可以溶解在载体中并作为溶液或悬浮液进行施用。对于经粘膜或经皮(包含贴片)递送,本领域已知的适当的渗透剂用于递送组合物。对于吸入,递送使用任何方便的系统,如干粉气雾剂、液体递送系统、空气喷射雾化器、推进剂系统。例如,调配物可以以气溶胶或雾的形式施用。组合物也可以以持续递送或缓释形式进行递送。例如,可生物降解的微球或胶囊或其它能够持续递送的聚合物配置可以包含在调配物中。可以修改调配物以改变药代动力学和生物分布。对于药代动力学的一般讨论,参见例如《雷明顿(Remington's)》(同上)。在一些实施例中,调配物可以掺入脂质单层或双层,如脂质体或胶团中。本领域已知的靶向疗法可以用于将药剂更特异性地递送至某些类型的细胞或组织。

[0193] 所施用的活性剂的实际量以及施用的速率和时程将取决于疾病的性质和严重程度。治疗处方,例如关于剂量、定时等的决定在全科医生或专科医生的责任内,并且通常考虑了个体患者的病状、递送位点、施用方法以及执业医师已知的其它因素。技术和方案的实例可以在《雷明顿》(同上)中发现。

[0194] 可以制备的缓释制剂特别便于诱导免疫应答。缓释制剂的实例包含含有多肽的固体疏水性聚合物的半渗透基质,所述基质呈成型制品,例如薄膜或微胶囊的形式。缓释基质的实例包含聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)、或聚(乙烯醇))、聚乳酸、L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子超过100天,但某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。可以使用小(约200-800埃)单层类型的脂质体,其中脂质含量大于约30%的胆固醇,所选择的比例根据最佳的疗法进行调整。

[0195] 另一方面,本发明提供了一种包括编码HCV的缺失可变结构域的E2多肽的核酸分子的试剂盒。考虑了本发明的试剂盒或底物用于诊断、预后、治疗或预防应用以及用于设计和/或筛选HCV E2结合分子或HCV受体结合分子。

[0196] 在一个实施例中,本申请提供了一种产生在病毒或非病毒载体内或附着于病毒或非病毒载体的受试者核酸分子的方法,所述方法包括将受试者核酸分子或其互补序列附着或掺入到合适的病毒或非病毒载体中。载体可以在使用前储存或冷冻,或与使用说明一起掺入试剂盒中。

[0197] 多肽的“变体”可以含有与参考序列相比,氨基酸取代,优选地保守取代(例如,1-50个,如1-25个,具体地1-10个,并且特别是1个氨基酸残基可以被改变)。适当地,此类取代不发生在表位区,并且因此不会对抗原的免疫原性特性产生显著影响。术语“保守的氨基酸取代”是指用来自同一组的不同氨基酸取代(概念上或以其它方式)来自一个此类组的氨基酸。用于定义单独的氨基酸之间的共同性质的功能性方法是分析同源生物的对应该蛋白质之间氨基酸变化的归一化频率(Schulz, G.E. 和 R.H. Schinner., 《蛋白质结构原理(Principles of Protein Structure)》,施普林格出版社(Springer-Verlag))。根据此类分析,可以定义氨基酸的组,其中组内的氨基酸优先地彼此交换,并且因此在其对整体蛋白质结构的影响方面彼此最相似。以这种方式定义的一组氨基酸组的一个实例包含:(i) 带电组,由Glu和Asp、Lys、Arg和His组成,(ii) 带正电组,由Lys、Arg和His组成,(iii) 带负电组,由Glu和Asp组成,(iv) 芳香族组,由Phe、Tyr和Trp组成,(v) 氮环组,由His和Trp组成,(vi)

大的脂肪族非极性组,由Val、Leu和He组成,(vii)弱极性组,由Met和Cys组成,(viii)小残基组,由Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln和Pro组成,(ix)脂肪族组,由Val、Leu、He、Met和Cys组成,以及(x)小羟基组,由Ser和Thr组成。蛋白质变体还可以包含其中与参考序列相比,插入另外的氨基酸的那些蛋白质变体,例如,此类插入可以发生在1-10个位置(如1-5个位置,适当地1个或2个位置,具体地1个位置),并且例如,可以涉及在每个位置处添加50个或更少的氨基酸(如20个或更少,具体地10个或更少,特别地5个或更少)。适当地,此类插入不发生在表位区,并且因此不会对抗原的免疫原性特性产生显著影响。变体还包含其中与参考序列相比,氨基酸已缺失的那些变体,例如,此类缺失可能发生在1-10个位置(如1-5个位置,适当地1个或2个位置,具体地1个位置),并且例如,可以涉及在每个位置缺失50个或更少的氨基酸(如20个或更少,具体地10个或更少,特别地5个或更少)。适当地,此类缺失不发生在表位区,并且因此不会对抗原的免疫原性特性产生显著影响。技术人员将认识到特定的蛋白质变体可以包括取代、缺失和添加(或其任何组合)-变体优选地表现出与相关参考序列至少约70%的同一性,更优选地至少约80%的同一性,并且最优选地至少约90%的同一性(如至少约95%、至少约98%或至少约99%)。适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的实例是BLAST和BLAST 2.0算法,所述算法描述于:Altschul等人,《核酸研究(Nuc. Acids Res.)》25:3389-3402(1977)和Altschul等人,《分子生物杂志(J. Mol. Biol.)》。

[0198] 本描述通过结合附图和图例来阅读的以下信息进行进一步说明。

[0199] 实例1

[0200] 图1提供了本研究中使用的免疫和动物组的图示。将12只为一组的八周大的雌性C57B16小鼠用(第1组) 10^8 I.U. 进行免疫。在第0天(d0)给予编码基因型1a E2 D123序列的基因的黑猩猩腺病毒1(还参见图16),然后在第26天和第46天用所述黑猩猩腺病毒1进行加强;或(第2组)在第0天、第26天和第46天给予20ug可溶性纯化高分子量E2 D123蛋白;或(第3组)初免-加强方案,其中给予动物108 I.U. 的初免。在第0天给予编码基因型1a E2 D123序列的基因的黑猩猩腺病毒1,随后在第26天和第46天用20ug可溶性纯化高分子量E2 D123蛋白进行加强。在第56天处死所有动物,并收集血液和脾。

[0201] 图2中示出了在第3周(wk)(初免后)、第6周(初免和一次加强后)和第8周(初免和两次加强后)对单体D123蛋白的倒数抗体滴度。倒数稀释度计算为从12点稀释曲线给出10倍背景所需的血清稀释度。使用多重比较的单向克鲁斯卡尔-沃利斯检验分析数据。在此图中,数据按组布置,以比较每个方案随时间产生的相对抗体滴度。数据示出抗体滴度在第8周达到峰值,并且明显高于第3周(第2组和第3组)或第6周(第1组)的抗体滴度。

[0202] 图3示出了第3周(wk)(初免后)、第6周(初免和一次加强后)和第8周(初免和两次加强后)对单体D123蛋白的倒数抗体滴度。倒数稀释度计算为从12点稀释曲线给出10倍背景所需的血清稀释度。使用多重比较的单向克鲁斯卡尔-沃利斯检验分析数据。在此图中,数据按周布置,以比较每个疫苗接种方案在给定时间产生的相对抗体滴度。数据示出,在第3周,与第1组和第3组相比,仅接受蛋白质的动物(第2组)的抗体滴度明显较低。在第6周和第8周,与单独接受蛋白质(第2组)或接受病毒初免、蛋白质加强(x2)(第3组)的动物相比,单独接受ChAd-D123的动物(第1组)的抗体滴度明显较低。接受用ChAd-E2D123三次疫苗接种的动物在第6周和第8周时的抗体滴度最低。

[0203] 图4示出了在第56天获得的血清对单体E2 D123蛋白的稀释曲线。数据示出,与三种蛋白质疫苗接种(第2组)相比,ChAd-E2D123初免(第1组和第3组)产生不同的滴定曲线。然而,ChAd-E2D123初免/加强(第1组)和ChAd-E2D123初免,随后进行蛋白质加强(第3组)在动物中产生了更均匀的抗体应答。

[0204] 图5示出了第56天血清对单体D123蛋白的倒数抗体滴度。数据示出,接受用ChAd-E2D123三次疫苗接种的动物产生的抗体滴度明显低于分别仅接受蛋白质或接受ChAd-E2D123初免以及两次蛋白质加强的第2组和第3组的动物中产生的抗体滴度。

[0205] 图6示出了将重组CD81蛋白与完整E2受体结合结构域的结合抑制(A) 50%或(B) 80%所需的抗体的倒数稀释度。数据示出,尽管接受三次ChAd-E2D123病毒疫苗接种的第1组引发了对E2 D123具有反应性的总抗体的最低滴度,但能够阻止E2与其细胞受体CD81结合的功能性抗体的总量与接受三次蛋白质疫苗接种并且产生几乎多100倍的抗体的第2组相当。产生能够阻止E2与其细胞受体CD81结合的功能性抗体的最高滴度的组是接受了一次ChAd-E2D123病毒初免,随后接受了两次蛋白质加强的第3组。这方面的方法描述于以下中:例如Vietheer, P.T.; Boo, I.; Gu, J.; McCaffrey, K.; Edwards, S.; Owczarek, C.; Hardy, M.P.; Fabri, L.; Center, R.J.; Pountourios, P.; Drummer, H.E., 丙型肝炎病毒糖蛋白E2的核心结构域在豚鼠中产生有效的交叉中和抗体(The core domain of hepatitis C virus glycoprotein E2 generates potent cross-neutralizing antibodies in guinea pigs).《肝病学》2017, 65, (4), 1117-1131。

[0206] 另外,与接受三次蛋白质疫苗接种(第2组)的动物相比,ChAd-E2D123病毒初免,其次进行两次蛋白质加强的免疫应答的变化较小(范围分别是75-470c.w.0.15-111)。

[0207] 图7示出了指向包括氨基酸408-428的合成肽的抗体的倒数滴度。此合成肽跨越了非常重要的被HCV1、MAb24识别的广泛中和抗体(bNAb)以及其它bNAb。结果示出,所有疫苗接种计划都产生了对此肽具有反应性的抗体,在接受三次蛋白质疫苗接种(第2组)或接受ChAd-E2D123病毒初免,随后接受两次蛋白质加强(第3组)的动物中观察到的滴度最高,并且这些滴度彼此没有明显不同。

[0208] 图8示出了指向包括氨基酸430-451的合成肽的抗体的倒数滴度。此合成肽跨越了非常重要的被HCV84.1和HCV84.27识别的bNAb表位以及其它bNAb。结果示出,所有疫苗接种计划都产生了对此肽具有反应性的抗体,在接受三次蛋白质疫苗接种(第2组)或接受ChAd-E2D123病毒初免,随后接受两次蛋白质加强(第3组)的动物中观察到的滴度最高,并且这些滴度彼此没有明显不同。

[0209] 图9示出了指向包括氨基酸523-549的合成肽的抗体的倒数滴度。此合成肽跨越了非常重要的被MAb44识别的中和抗体(NAb)表位以及其它NAb,并构成了CD81结合环。结果示出,所有疫苗接种计划都产生了对此肽具有反应性的抗体,在接受三次蛋白质疫苗接种(第2组)或接受ChAd-E2D123病毒初免,随后接受两次蛋白质加强(第3组)的动物中观察到的滴度最高,并且这些滴度彼此没有明显不同。

[0210] 图10示出了第56天免疫血清的同源中和滴度。数据示出,在接受ChAd-E2D123病毒初免,随后进行两次蛋白质加强的第3组中产生的中和抗体最多,并且这明显高于第1组和第2组中观察到的应答。

[0211] 图11示出了第56天免疫血清针对基因型3a病毒的异源中和滴度。数据示出产生了

中和抗体,并且在所有三组中都相似。这是令人惊讶的,因为第1组产生了较低的抗体滴度,但其似乎产生了与仅蛋白质或病毒初免-蛋白质加强计划相同数量的功能性抗体。

[0212] 图12示出了第56天免疫血清针对基因型5a病毒的异源中和滴度。数据示出产生了中和抗体,并且在所有三组中都相似。这是令人惊讶的,因为第1组产生了较低的抗体滴度,但其似乎产生了与仅蛋白质或病毒初免-蛋白质加强计划相同数量的功能性抗体。

[0213] 图13示出了在每个疫苗接种计划中产生的抗体的同型。IgG1是所有疫苗所产生的主要同型,随后是IgG2b。IgG2a、IgG3和IgM是次要同型。比较产生的每种同型的百分比,数据示出在所有三次疫苗接种(第1组)或仅在初免(第3组)中用ChAd病毒进行疫苗接种比单独用蛋白质进行疫苗接种(第2组)产生更高比例的IgG2a、IgG3和IgGM。IgG1和IgG3抗体是更有效的补体激活剂,并且这可能有助于病毒清除。IgG3的百分比非常小。这超过了第2组。

[0214] 图14为了清楚起见以饼状图示出了与如图13中呈现的数据相同的数据。

[0215] 图15比较了利用每种疫苗接种方案产生的每种同型的百分比。数据示出,与接受ChAd疫苗中的D123作为初免,随后接受两次蛋白质加强的动物(第3组)或接受用ChAd进行的所有三次疫苗接种的动物(第1组)相比,在所有三次疫苗接种中用可溶性HMWD123进行疫苗接种的动物(第2组)产生的IgG1明显更多。接受用可溶性HMW D123蛋白进行的三次疫苗接种的动物(第2组)中产生的IgG2a和IgG2b明显少于接受用ChAd进行的所有三次疫苗接种(第1组)或用ChAd-D123初免,随后进行两次蛋白质加强(第3组)的动物。接受用可溶性HMW D123进行的三次疫苗接种的动物(第2组)的IgG3明显低于接受三次ChAd-D123疫苗接种的动物(第1组)。

[0216] 图16示出了仅用于说明目的的本研究中使用的HCV D123 E2的蛋白质和DNA序列。

[0217] 实例2

[0218] 所产生的数据提供了关于以下的更多的证据:用ChAdD123进行疫苗接种然后进行两次蛋白质加强的动物产生了交叉反应性抗体特异性(图17),以及与接受用ChAdD123三次疫苗接种的动物中的功能性抗体的水平更高(图19)。此外,数据提供了类别转换的证据,表明B细胞应答的成熟。ChAd-D123似乎对于单独蛋白质疫苗接种诱导了不同的类别转换,并与这中和相关(图18)。

[0219] 图17示出了在第56天在动物中产生的针对HCV E2的基因型3a(S52分离株)408-428表位I区、430-451表位II区以及523-549CD81结合环区(表位III)的交叉反应性抗体滴度,所述动物用在黑猩猩腺病毒(ChAd或ChAd0x1)内编码的D123进行疫苗接种并且用D123进行加强(第1组),或用高分子量可溶性蛋白进行疫苗接种并且用所述高分子量可溶性蛋白进行加强(第2组),或用在黑猩猩腺病毒内编码的D123初免并且用高分子量可溶性蛋白进行加强(第3组)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ 。数据示出,与三次ChAd-E2D123疫苗接种相比,用ChAd-E2D123初免,随后用HMW E2D123进行两次蛋白质加强,产生了交叉反应性抗体对表位I和III的更高滴度。制备病毒载体的方法是本领域已知的并且例如提供于以下中: von Delft, A.; Donnison, T. A.; Lourenco, J.; Hutchings, C.; Mullarkey, C. E.; Brown, A.; Pybus, O. G.; Klenerman, P.; Chinnakannan, S.; Barnes, E., 编码遗传保守基因片段以靶向多种HCV基因型的以猿猴腺病毒为载体的HCV疫苗的产生(The generation of a simian adenoviral vectored HCV vaccine encoding genetically conserved gene segments to target multiple HCV genotypes).《疫苗》2018,36,(2),313-321。

[0220] 图18示出了根据IgG1滴度计算并且显示为IgG1 log10滴度除以IgG2a log10滴度 (IgG1/IgG2a) 的免疫血清的IgG2a滴度。滴度越低, IgG2a与IgG1比率就越接近1:1, 表明IgG1与IgG2a类别转换。针对来自接受C/P/P和P/P/P的动物的免疫血清的HCVpp ID50滴度绘制倒数滴度 (1/IgG1:IgG2a), 以确定任何相关性。所有条都是中位数, 并显示四分位距。达戈斯蒂诺和皮尔森检验用于确定数据分布的正态性, 并进行具有多重比较的克鲁斯卡尔-沃利斯检验, 以确定在95%置信区间下两组中位数之间的显著差异。P值在 $<0.05^*$ 、 $<0.01^{**}$ 、 $<0.001^{***}$ 、 $<0.0001^{****}$ 时表明组之间的显著差异。当IgG2a表示为IgG1滴度的函数 (IgG1/IgG2a) 时, 与E2 Δ 123_{HMW}免疫血清相比, ChAd-E2 Δ 123免疫血清 (第1组和第3组) 的倒数滴度明显更低, 这表明GC类别转换增加 (对于第1组对第2组, $p<0.0001^{****}$, 对于第2组对第3组, $p=0.0014^{**}$)。对于E2 Δ 123_{HMW}免疫血清 (第2组和第3组组合), IgG1:IgG2a倒数滴度与HCVpp中和滴度正相关 ($r=0.3974$, $p=0.0492$)。

[0221] 图19示出了作为整体Ab滴度的函数的免疫血清的倒数ID50抑制滴度, 其表示功能性抗体指数。针对示出为CD81阻断的两种E2-CD81抑制计算功能性抗体指数。针对示出为中和的同源假病毒的病毒进入抑制计算功能性抗体指数。当将倒数ID50滴度 (CD81抑制和HCVpp) 与整体Ab滴度 (功能性抗体指数) 相关进行阐述时, 与E2 Δ 123_{HMW}免疫血清相比, ChAd-E2 Δ 123免疫血清 (第1组和第3组) 的功能性指数明显较高, 这表明相对于总Ab滴度的疫苗诱导的Ab应答具有更大的中和能力。

[0222] 实例3-HCV D123 E2也可以成功递送到MVA病毒载体中进行免疫接种。

[0223] 图20示出了用于驱动E2 D123表达的病毒载体的示意图。A. 用于ChAdOx1中的D123的表达盒的示意图。B. 用于ChAdOx1中的RBD的表达盒的示意图。C. 用于MVA中的D123的表达盒的示意图。这些表达系统是说明性的并且变化是本领域已知的。也可以采用如本领域中已知的诱导型表达系统。本领域提供了说明性方法, 包含von Delft, A.; Donnison, T.A.; Lourenco, J.; Hutchings, C.; Mullarkey, C.E.; Brown, A.; Pybus, O.G.; Klennerman, P.; Chinnakannan, S.; Barnes, E., 编码遗传保守基因片段以靶向多种HCV基因型的以猿猴腺病毒为载体的HCV疫苗的产生.《疫苗》2018, 36, (2), 313-321; 和Swadling, L.; Capone, S.; Antrobus, R.D.; Brown, A.; Richardson, R.; Newell, E.W.; Halliday, J.; Kelly, C.; Bowen, D.; Fergusson, J.; Kurioka, A.; Ammendola, V.; Del Sorbo, M.; Grazioli, F.; Esposito, M.L.; Siani, L.; Traboni, C.; Hill, A.; Colloca, S.; Davis, M.; Nicosia, A.; Cortese, R.; Folgori, A.; Klennerman, P.; Barnes, E., 基于黑猩猩腺病毒和MVA载体的初免、加强和维持功能性HCV特异性T细胞记忆的人类疫苗策略 (A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory).《科学转化医学 (Sci Transl Med)》2014, 6, (261), 261ra153。

[0224] 图21示出了接受ChAd-E2 Δ 123初免, 随后在第4周进行MVA-E2 Δ 123加强的动物的免疫计划。在加强后两周对动物进行放血, 并且测量抗体和T细胞反应性。动物在第0周接受ChAd-E2D123初免 (40uL无菌PBS中的 10^8 个感染单位 [IU]), 然后在第4周接受MVA-E2D123 (40uL无菌PBS中的 10^7 个空斑形成单位 [PFU])。

[0225] 图22A示出了用如图21所示的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行免疫的免疫血清的反应性升高。为避免疑义, Delta符号“ Δ ”或词语Delta可互换使用以指代“缺失”。在ELISA

中针对E2 Δ 123单体评估免疫血清。将免疫血清的连续稀释液施加到E2 Δ 123单体包被板,并且用与辣根过氧化物酶和TMD底物缀合的抗小鼠免疫球蛋白检测结合抗体。计算实现10倍背景结合所需的倒数滴度。结果示出,ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123产生对E2具有反应性的高滴度抗体。图22B示出了在第56天产生的免疫血清抑制HCV细胞受体CD81与E2受体结合结构域之间的相互作用的能力。由连续稀释曲线计算免疫血清抑制E2结合CD81的50%的能力。结果示出,ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123产生能够抑制同源E2与CD81之间的结合的高滴度抗体。

[0226] 图23A示出了用如图21所示的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行免疫的免疫血清对AS412 (E2₄₀₈₋₄₂₈)、AS434 (E2₄₃₀₋₄₅₁)、CD81结合环 (E2₅₂₃₋₅₄₉) 的反应性升高。由连续稀释曲线计算实现10倍背景结合所需的倒数滴度。结果示出,所有动物都产生了能够与作为广泛中和抗体的靶标的三个不同表位结合的抗体。图23B示出了免疫血清升高的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123 (图21) 的同源 (G1a) 和异源 (G3a) 中和滴度。由连续稀释曲线计算抑制50%病毒进入所需的免疫血清的倒数滴度。结果示出,7/10的动物产生了能够阻止同源基因型1a丙型肝炎病毒进入Huh7细胞系的抗体,并且6/10的动物产生了能够阻止异源基因型3a病毒进入Huh7肝细胞系的抗体。检测的极限用虚线示出。对基因型3a的交叉中和抗体应答与以下观察结果一致:对AS412 (E2₄₀₈₋₄₂₈)、AS434 (E2₄₃₀₋₄₅₁)、CD81结合环 (E2₅₂₃₋₅₄₉) 的交叉反应性抗体是通过用ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123对动物进行疫苗接种产生的。

[0227] 图24示出了用如图21所示的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行免疫的小鼠中的T细胞应答。在第6周收获脾细胞,并针对gt-1a (H77)、gt-1b (J4) 或gt-3a (k3a650) 使用覆盖HCV蛋白质组的长度 (A和C) 并且用于以下肽池 (B和D) 的HCV肽 (由11aa重叠的15聚体) 进行离体刺激:核心-E1-E2、NS3-4和NS5。通过细胞内细胞因子染色和流式细胞术分别测定IFN γ ⁺CD4⁺ (A和B) 和IFN γ ⁺CD8⁺ (C和D) T细胞频率,其以占总CD4⁺或CD8⁺ T细胞频率的百分比的形式表示。所有数据都绘制为中位数和四分位距。结果示出,动物对同源肽产生CD4⁺和CD8⁺ T细胞,集中在核心E1E2区内的表位,如E2。虽然所测试的2/7的动物对基因型1b具有交叉反应性CD4⁺ T细胞应答,但没有观察到CD8⁺交叉反应性。

[0228] 图25示出了用如图21所示的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行免疫的小鼠中的E2特异性T细胞应答。在第6周收获脾细胞,并使用来自覆盖E2区的长度的基因型1a (由11aa重叠的15聚体) 的E2肽池进行离体刺激。数据示出,用ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行疫苗接种的小鼠产生E2特异性IFN γ ⁺ T细胞。

[0229] 图26示出了用如图21所示的ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行免疫的小鼠中的多功能T细胞应答的分析。在针对gt-1a (H77) 使用覆盖HCV蛋白质组的长度的HCV肽 (由11aa重叠的15聚体) 离体刺激脾细胞以检测产生的细胞因子IFN γ 、TNF α 和IL-2之后,通过ICS和流式细胞术测定由疫苗诱导的T细胞多功能性。饼图基数是中位数,并且使用Pestle和SPICE软件进行计算。所有数据都绘制为中位数和四分位距。结果示出,用ChAd-E2 Δ 123/MVA-E2 Δ 123进行疫苗接种产生了高度多功能CD4⁺和CD8⁺ T细胞应答。CD4应答的特征在于产生所有3种细胞因子,而CD8⁺应答主要针对TNF α 。

[0230] 本文引用或参考的所有文件,以及本文提及的所有文件或本文提及的文件中参考的所有文件,连同本文提及的任何产品的任何制造商说明书、描述、产品规范和产品表,或通过引用并入本文的任何文件都特此通过全文引用的方式并入本文。

[0231] 本领域技术人员将理解的是,鉴于本公开,在不脱离本发明的范围的情况下,可以对例示的具体实施例进行多种修改和改变。所有这种修改和改变旨在包含在所附权利要求书的范围内。因此,本发明的实施例应被视为在所有方面都是说明性而非限制性的。

[0232] 参考文献

[0233] Drummer等人,《微生物学》5:329,2014。

[0234] McCaffrey等人《病毒学杂志(J.Virol.)》81:9584-9590,2007。

[0235] Drummer等人,《病毒学杂志》76:11143-11147,2002。

[0236] McCaffrey等人2012。

[0237] Liu等人(2015),《当前药物代谢(Current Drug Metabolism)》,16(2):152-165。

[0238] Youn等人(2015),《生物疗法的专家意见(Expert Opinion on Biological Therapy)》,15(9):1337-134

[0239] Viethier P.T.等人,《肝病学》65(4),2017 von Delft,A.等人,《疫苗》2018,36,(2),313-321

[0240] Swadling,L.;《科学转化医学》2014,6,(261),261ra153。

序列表

<110> Macfarlane Burnet Institute for Medical Research and Public
 Health Limited
 Chancellor, Masters and Scholars of the University of
 Oxford
 <120> 组合物及其预防或治疗用途
 <130> 528825PCT
 <150> AU 2020901506
 <151> 2020-05-11
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus
 <400> 1
 Gly Thr Ala Ser Ala Thr Met Asn Pro Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Leu Ala Glu Thr His Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr
 20 25 30
 Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Glu Ser
 35 40 45
 Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn
 50 55 60
 Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Leu Ala Ser Cys Gly Ser Ser Gly Cys
 65 70 75 80
 Trp His Tyr Pro Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val
 85 90 95
 Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr
 100 105 110
 Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Ala Asn Asp Thr
 115 120 125
 Asp Val Phe Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe
 130 135 140
 Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala
 145 150 155 160
 Pro Pro Cys Gly Ser Ser Gly Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His
 165 170 175

Pro Glu Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Ile Thr Pro
 180 185 190
 Arg Cys Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr
 195 200 205
 Ile Asn Tyr Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu
 210 215 220
 His Arg Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp
 225 230 235 240
 Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu
 245

<210> 2

<211> 744

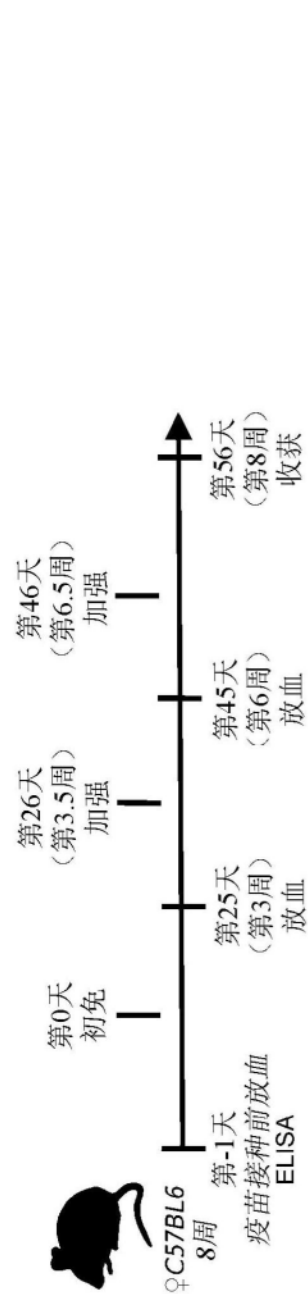
<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 2

```

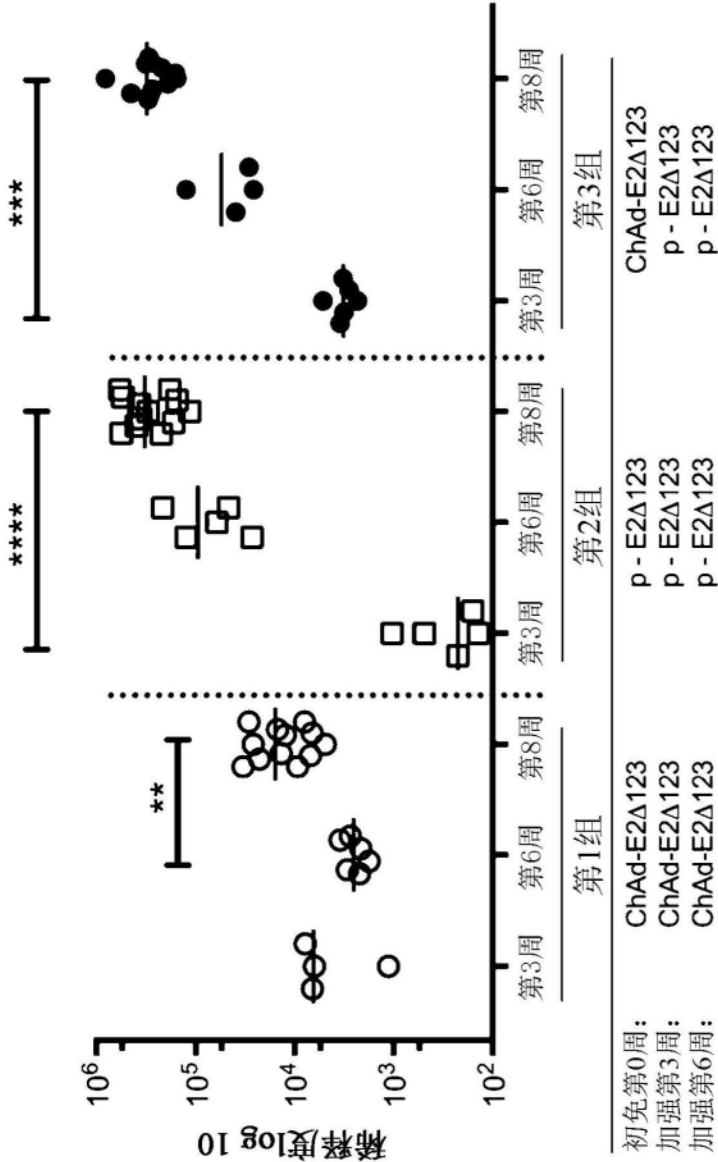
ggtaccgcta gcgccacccat gaacccccctg ctgatacctga ccttcgtggc tgcagccctg      60
gccgagaccc accagaacat ccagctgatac aacaccaacg gcagctggca catcaacagc      120
accgccctga actgcaacga gagcctgaac accggctggc tggccggcct gttctaccag      180
cacaagttca acagcagcgg ctgccccgag aggtctgcct cctgcggcag cagcggctgc      240
tggcactacc cccccagacc ctgcggcatc gtgcccccca agagcgtgtg cggccctgtg      300
tactgcttca cccccagccc cgtggtggtg ggcaccaccg acagaagcgg agccccacc      360
tacagctggg gcgccaacga caccgacgtg ttcgtgtgta acaacaccag accccccctg      420
ggcaactggt tcggctgcac ctggatgaac agcaccggct tcaccaaagt gtgtggcgcc      480
cctccctgcg gcagcagcgg ctgccccacc gactgcttta ggaaacaccc cgaggccacc      540
tactccagat gcggcagcgg cccctggatc accccccggt gcatggtgga ctaccctac      600
cggctgtggc actatccctg caccatcaac tacaccatct tcaaagtgcg gatgtacgtg      660
ggaggcgtcg agcataggct ggaagcagct tgcaattgga caaggggcga gcggtgcgac      720
ctggaagatc gggaccgcag cgag                                     744
  
```



组	初免 (第0天)	初免中的 免疫原的量	途径/体积 (最大)	加强	加强中的 免疫原的量	途径/体积	收获	动物数 (BL6)
1	ChAd-E2D123	10 ⁵ I.U.	I.M./40ul	ChAd-E2D123	10 ⁵ I.U.	I.M./40ul	第56天	12
2	HMW E2D123	20ug	S.C./100ul	HMW E2D123	20ug	S.C./100ul	第56天	12
3	ChAd-E2D123	10 ⁵ I.U.	I.M./40ul	HMW E2D123	20ug	S.C./100ul	第56天	12

第1组	初免 (第0天) +第2天	加强 (第26/27天)	加强 (第46天)
1	ChAd-E2D123	ChAd-E2D123	ChAd-E2D123
2	HMW E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123
3	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123

图1



疫苗接种组

组	1	2	3
初免第0天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	ChAd-E2D123
加强第26天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123
加强第46天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123

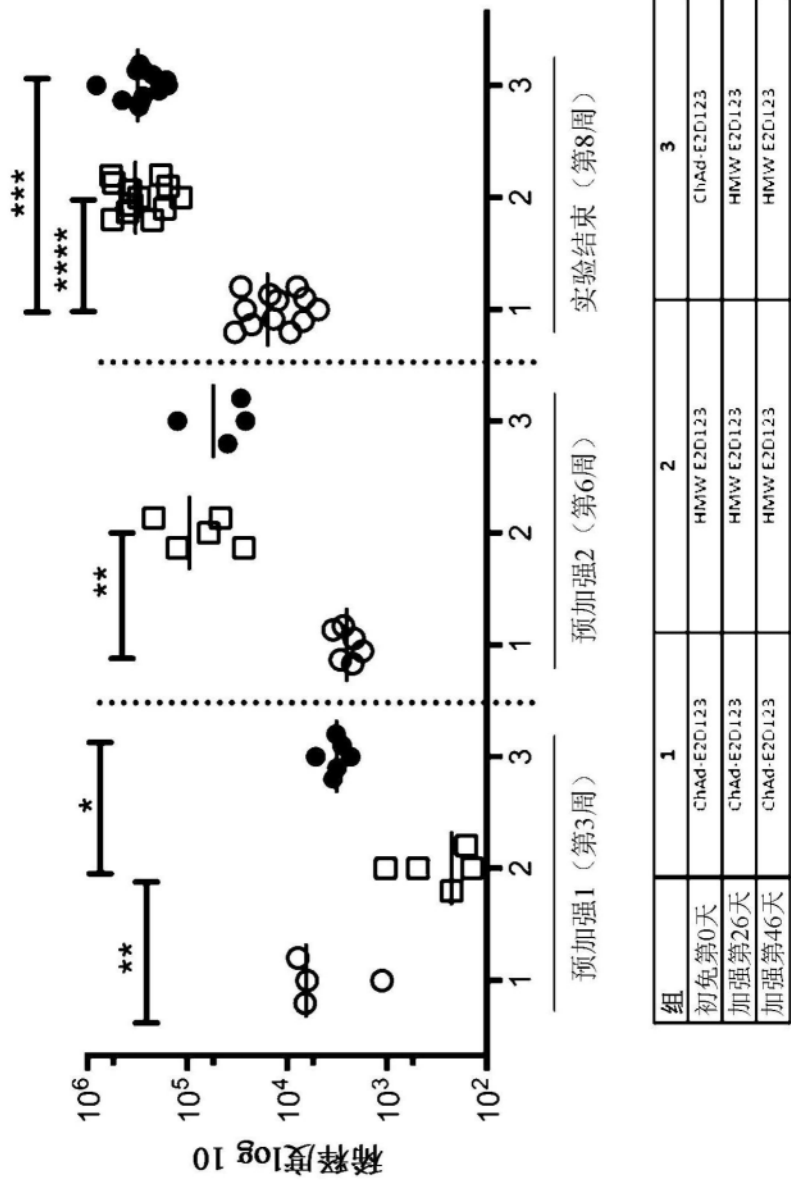
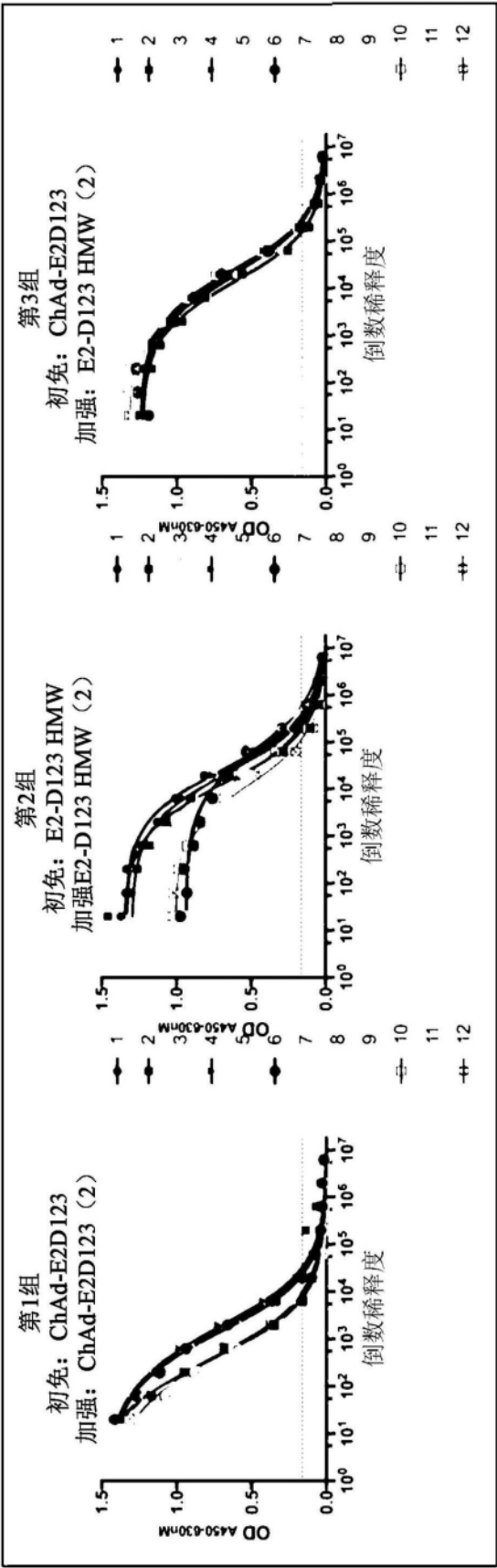


图3



组	1	2	3
初免第0天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	ChAd-E2D123
加强第26天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123
加强第46天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123

图4

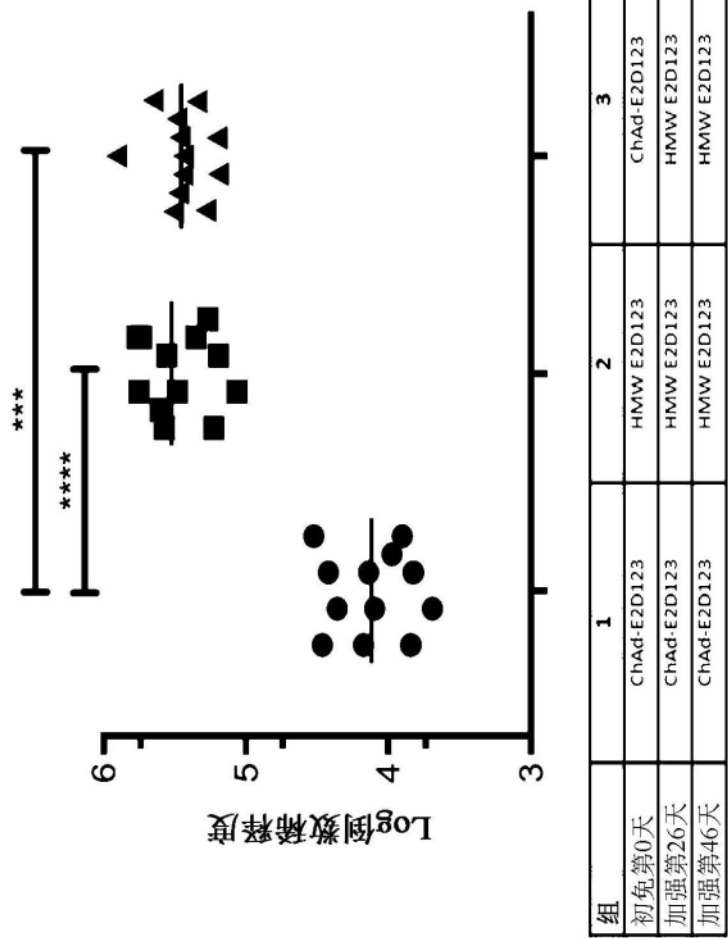


图5

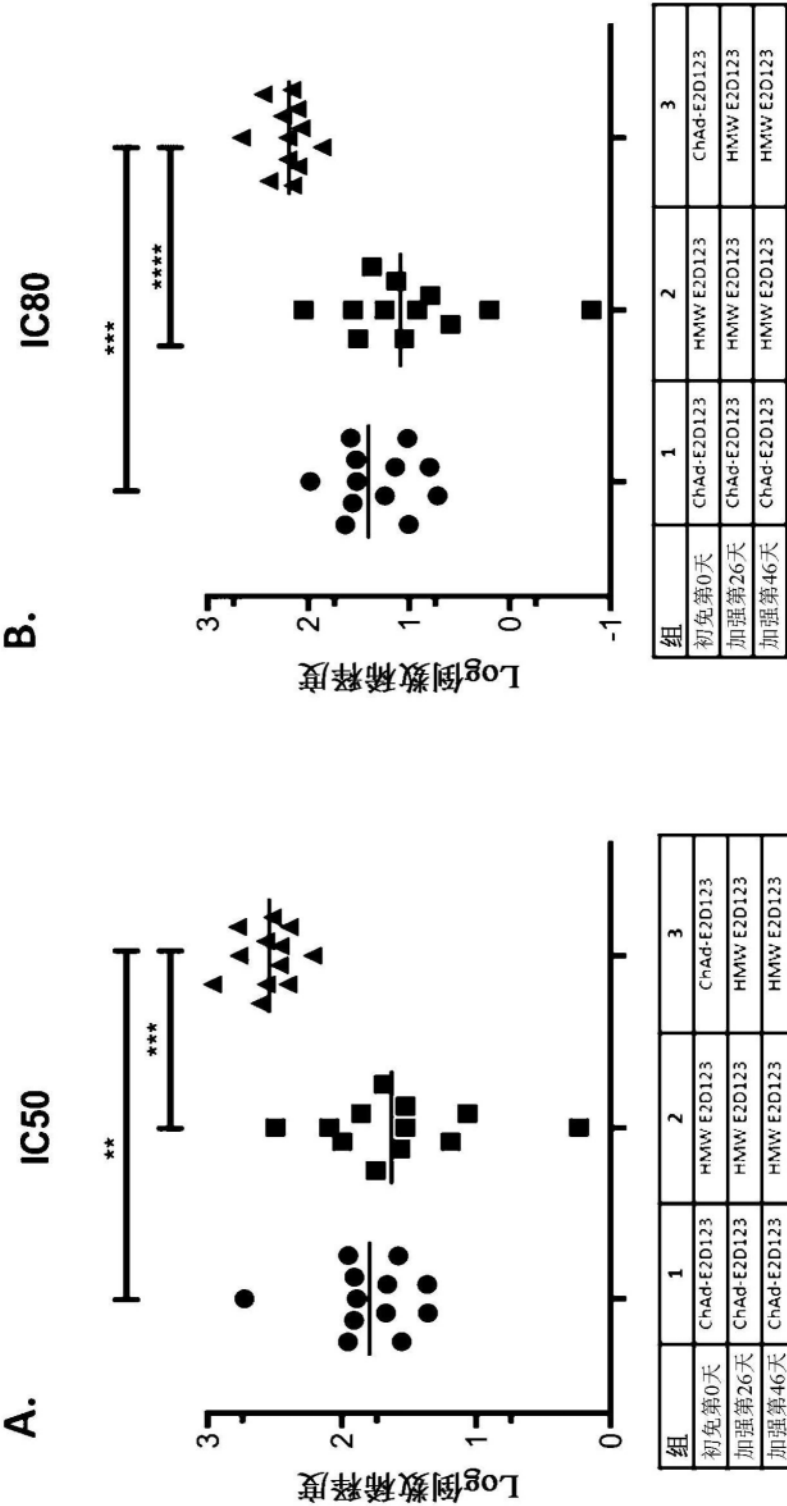
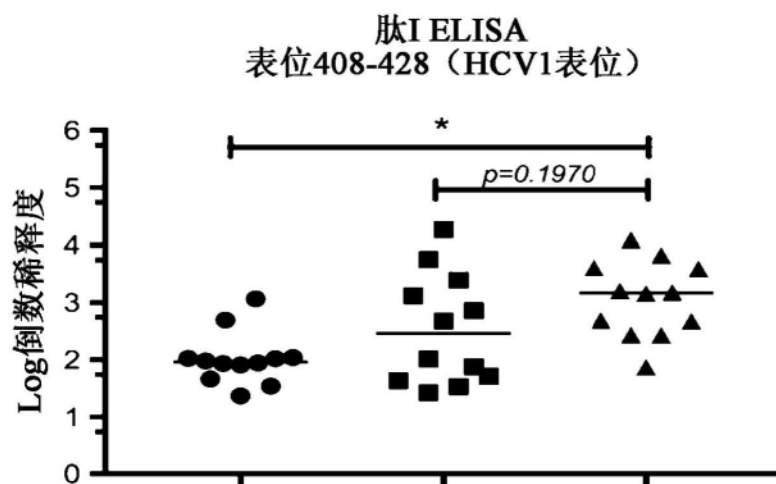
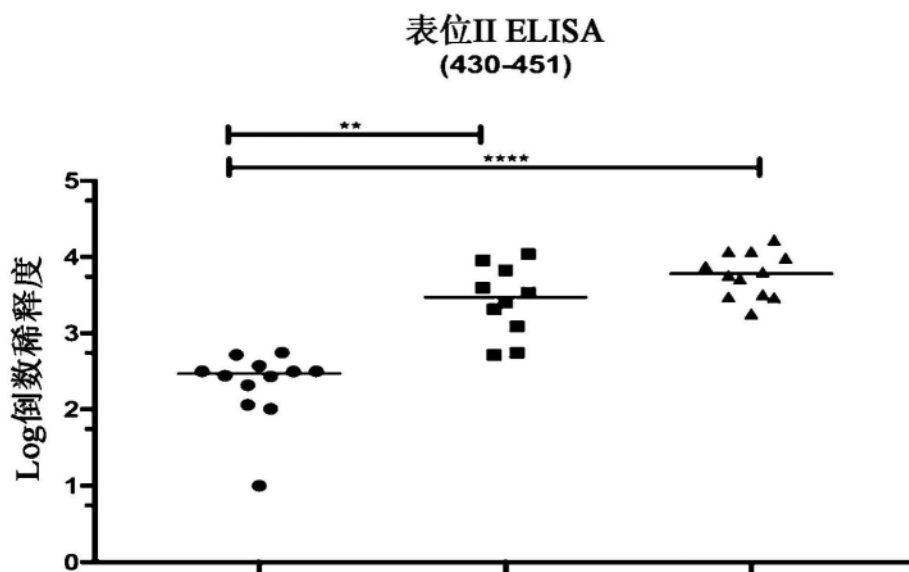


图6



组	1	2	3
初免第0天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	ChAd-E2D123
加强第26天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123
加强第46天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123

图7



组	1	2	3
初免第0天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	ChAd-E2D123
加强第26天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123
加强第46天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123

图8

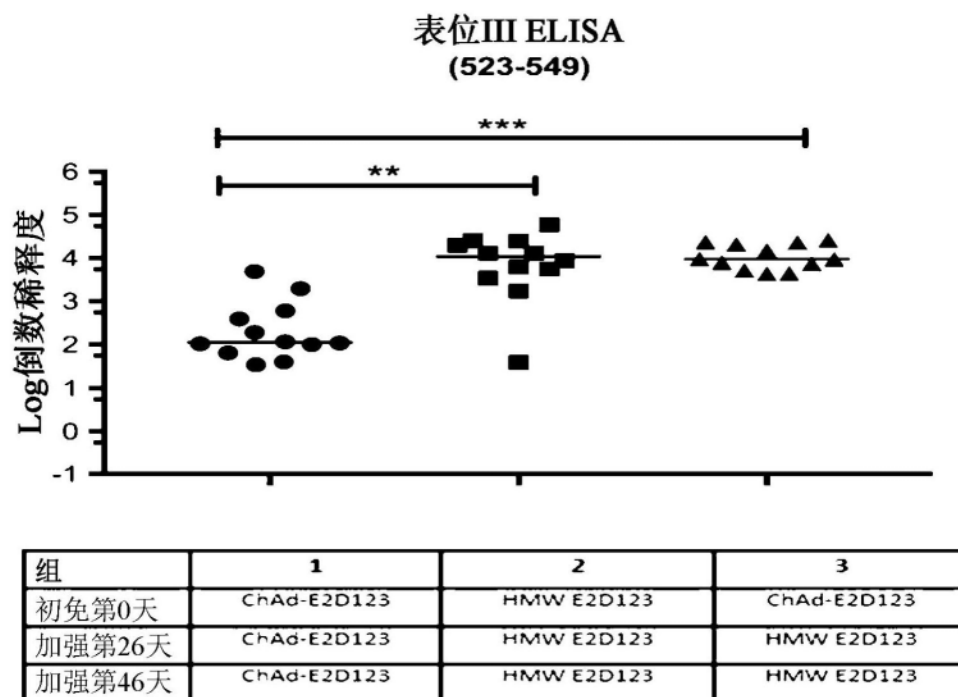


图9

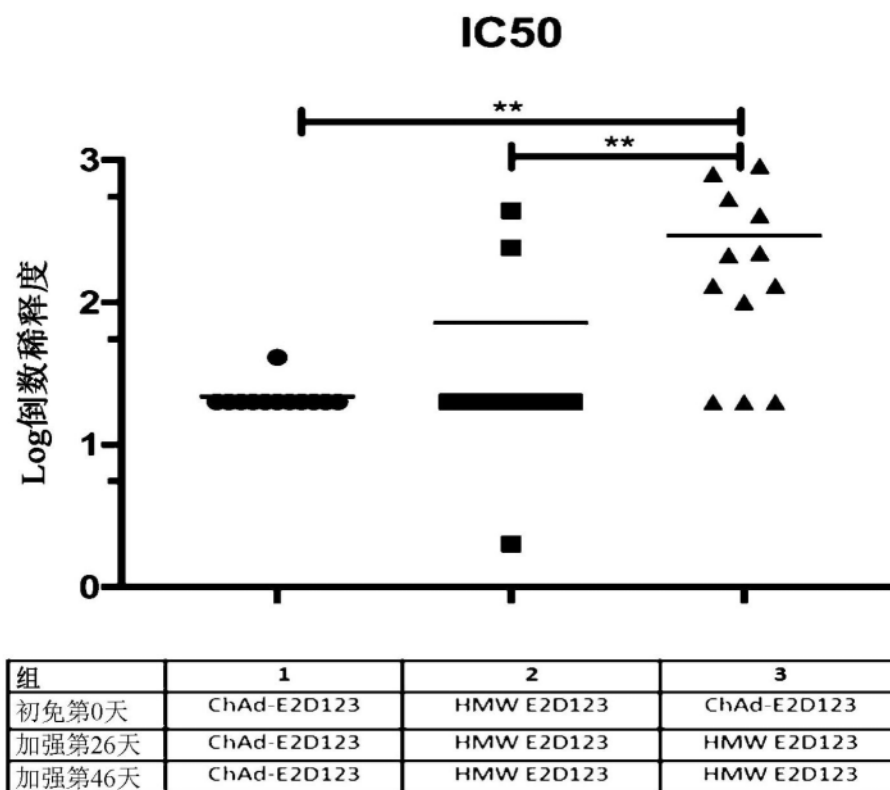


图10

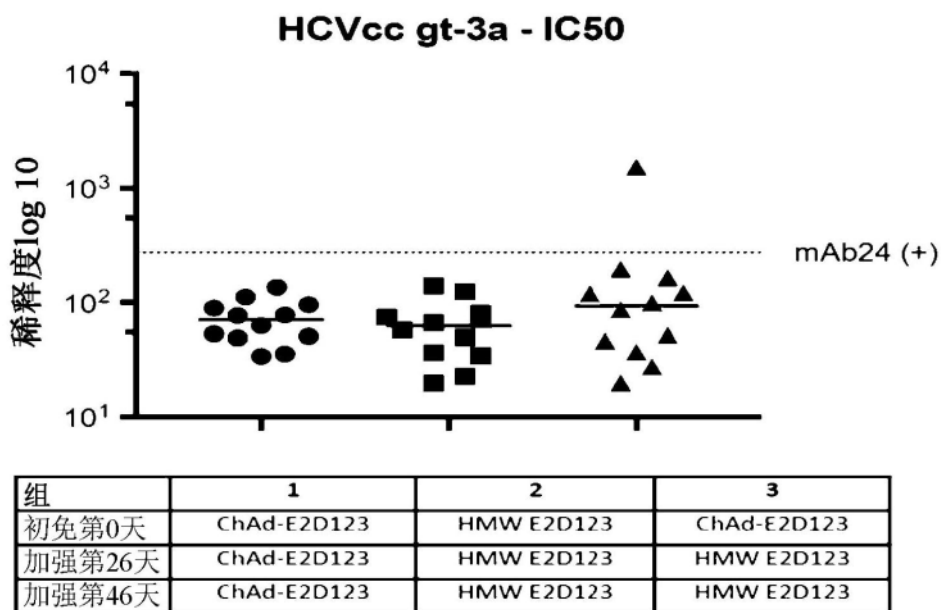


图11

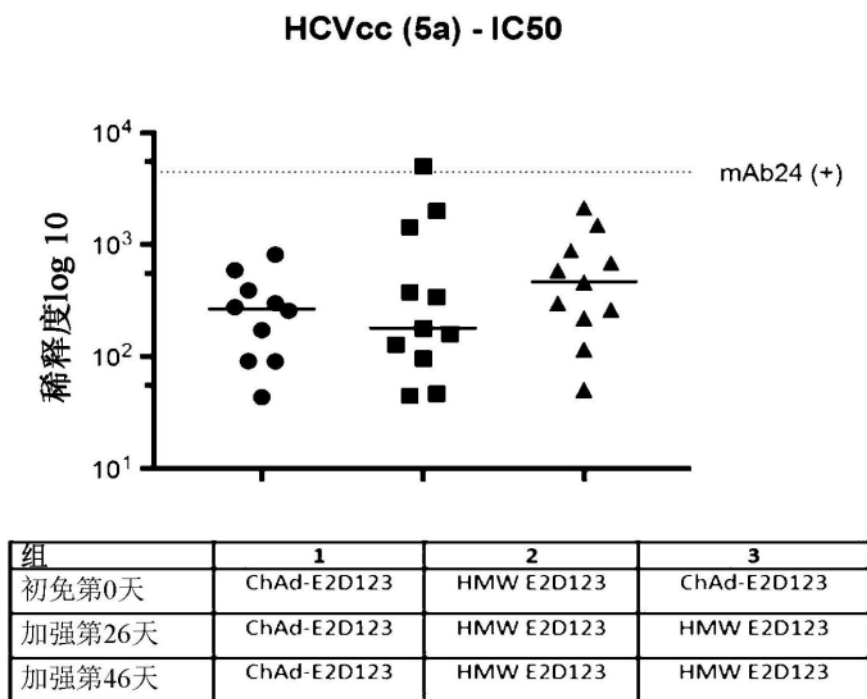
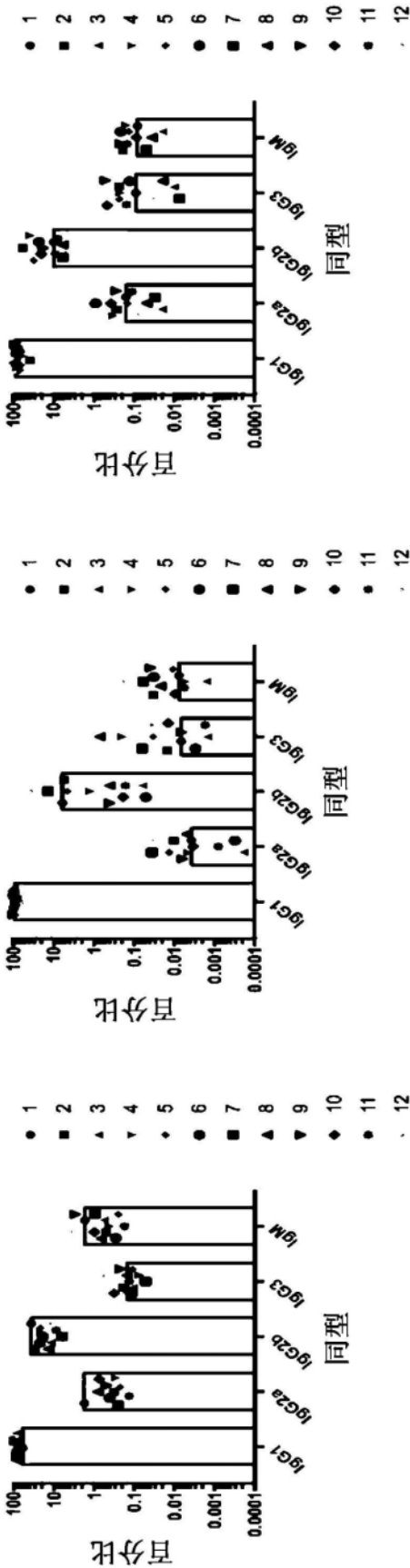


图12



组	1	2	3
初免第0天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	ChAd-E2D123
加强第26天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123
加强第46天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123

图13

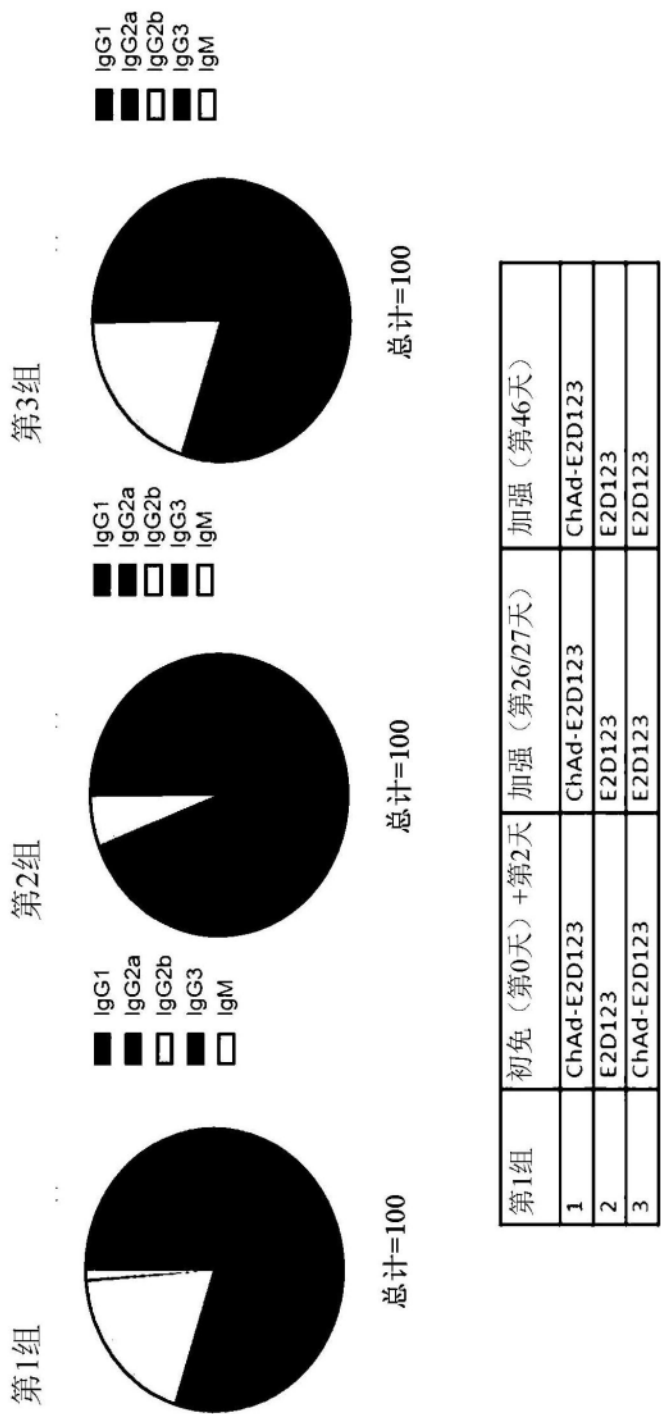


图14

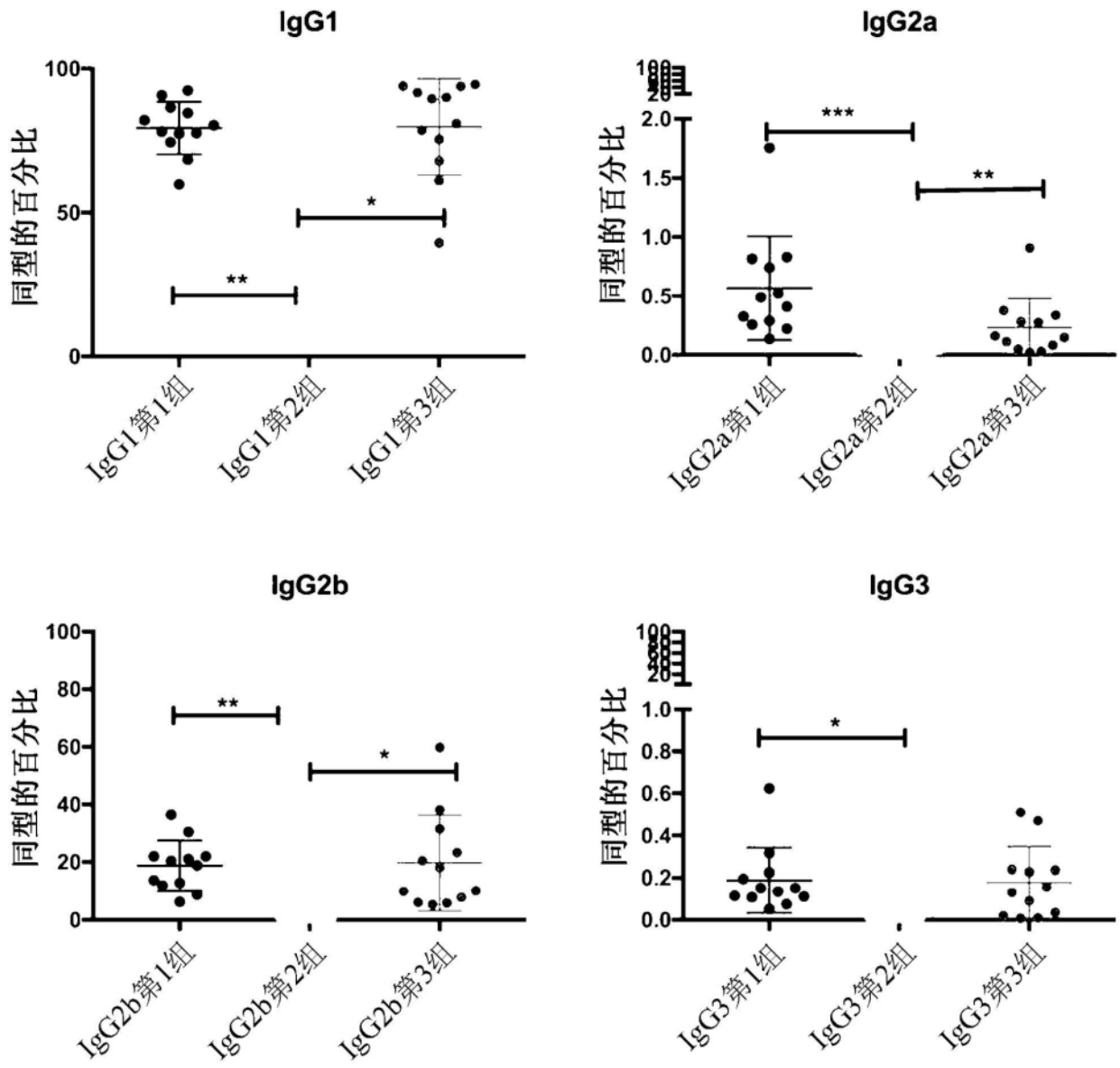


图15

包含胰蛋白酶前导序列的Delta3蛋白序列。
成熟序列加下划线。

>Delta3

GTASATMNPLLILTFVAAALAETHQNIQLINTNGSWHINSTALNCNES
LNTGWLGLFYQHKFNSSGCPERLASCGSSGCWHYPPRPCGIVPAK
SVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPL
GNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCGSSGCPTDCFRKHPEATYSRCG
SGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCTINYTIFKVRMYVGGVEHRLEAAC
NWTRGERCDLEDNRSE

以上经密码子优化以用于人表达的Delta3 DNA序列

>Delta3

GGTACCGCTAGCGCCACCATGAACCCCCTGCTGATCCTGACCTTCG
TGGCTGCAGCCCTGGCCGAGACCCACCAGAACATCCAGCTGATCA
ACACCAACGGCAGCTGGCACATCAACAGCACCGCCCTGAACTGCA
ACGAGAGCCTGAACACCGGCTGGCTGGCCGGCCTGTTCTACCAGC
ACAAGTTCAACAGCAGCGGCTGCCCCGAGAGGCTCGCCTCCTGC
GGCAGCAGCGGCTGCTGGCACTACCCCCCAGACCCTGCGGCATC
GTGCCCGCCAAGAGCGTGTGCGGCCCTGTGTACTGCTTCACCCCC
AGCCCCGTGGTGGTGGGCACCAACGACAGAAAGCGGAGCCCCAC
CTACAGCTGGGGCGCCAACGACACCGACGTGTTCTGTGCTGAACAA
CACCAGACCCCCCTGGGCAACTGGTTCGGCTGCACCTGGATGAA
CAGCACCGGCTTCACCAAAGTGTGTGGCGCCCCTCCCTGCGGCAG
CAGCGGCTGCCCCACCGACTGCTTTAGGAAACACCCCGAGGCCAC
CTACTCCAGATGCGGCAGCGGCCCTGGATCACCCCCCGGTGCAT
GGTGGACTACCCCTACCGGCTGTGGCACTATCCCTGCACCATCAAC
TACACCATCTTCAAAGTGC GGATGTACGTGGGAGGCGTCGAGCAT
AGGCTGGAAGCAGCTTGCAATTGGACAAGGGGCGAGCGGTGCG
ACCTGGAAGATCGGGACCGCAGCGAG

图16

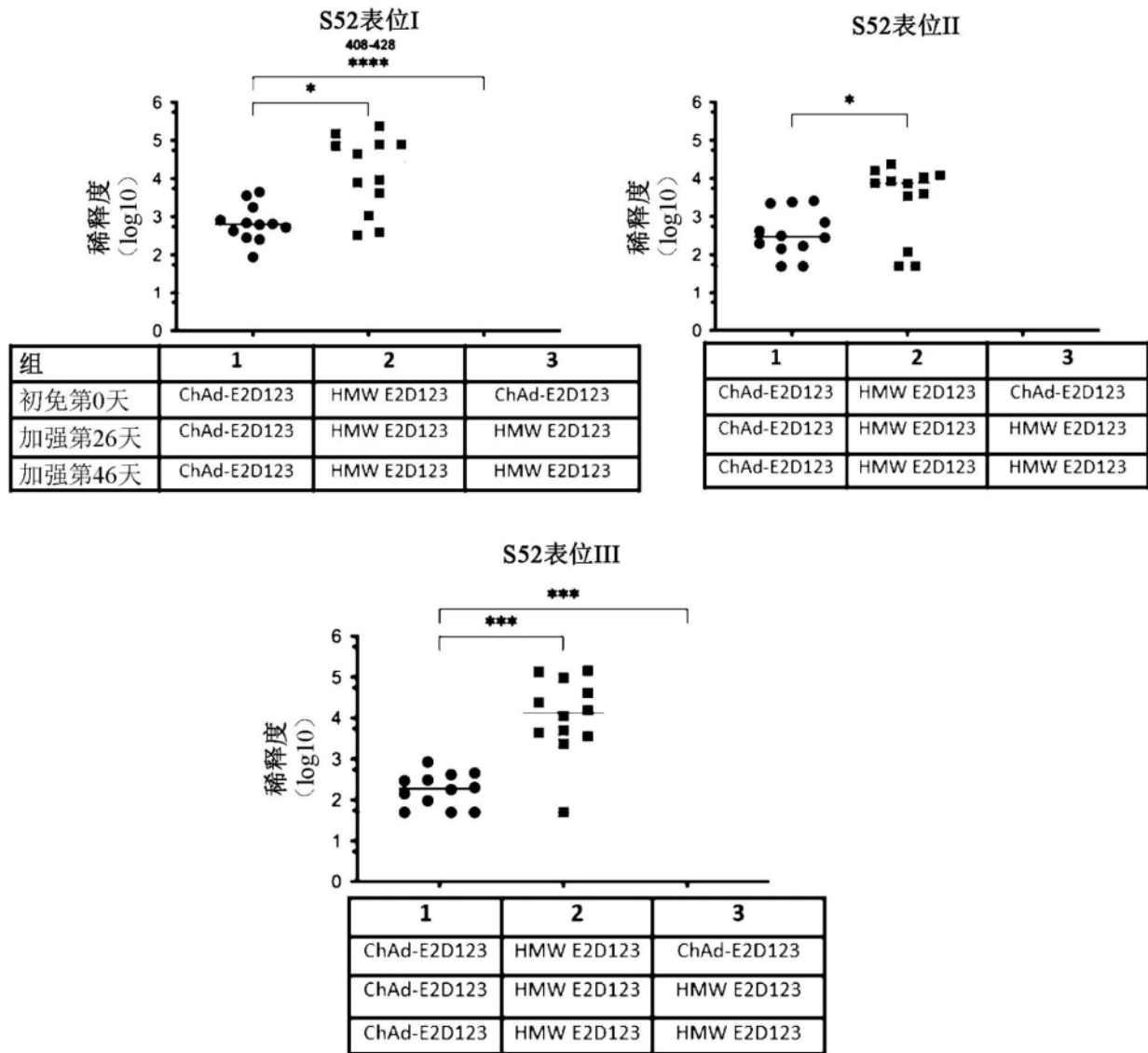
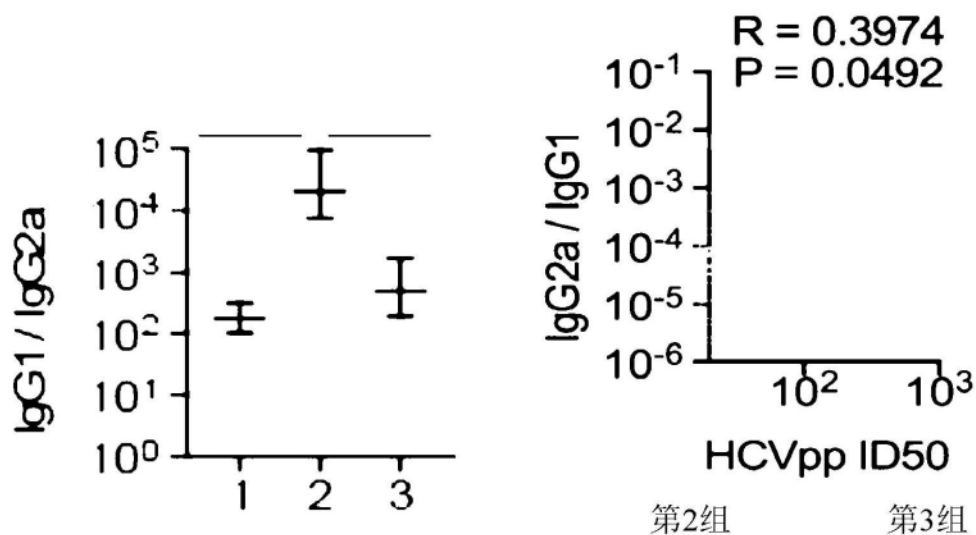


图17



组	1	2	3
初免第0天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	ChAd-E2D123
加强第26天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123
加强第46天	ChAd-E2D123	HMW E2D123	HMW E2D123

图18

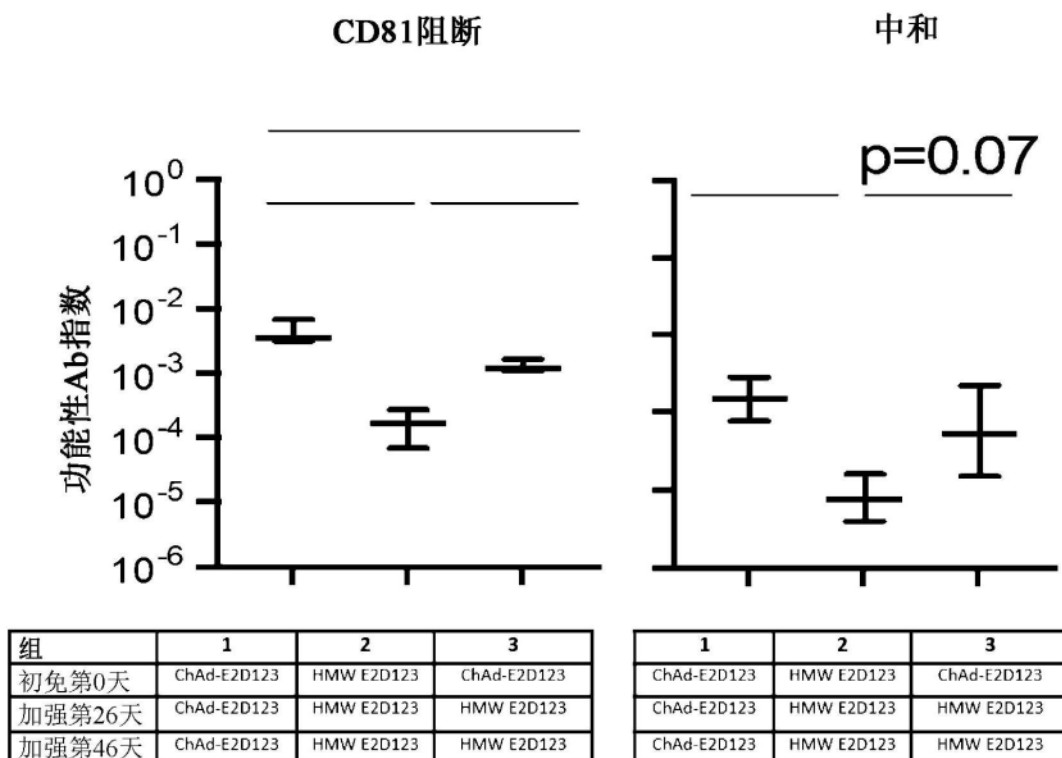


图19

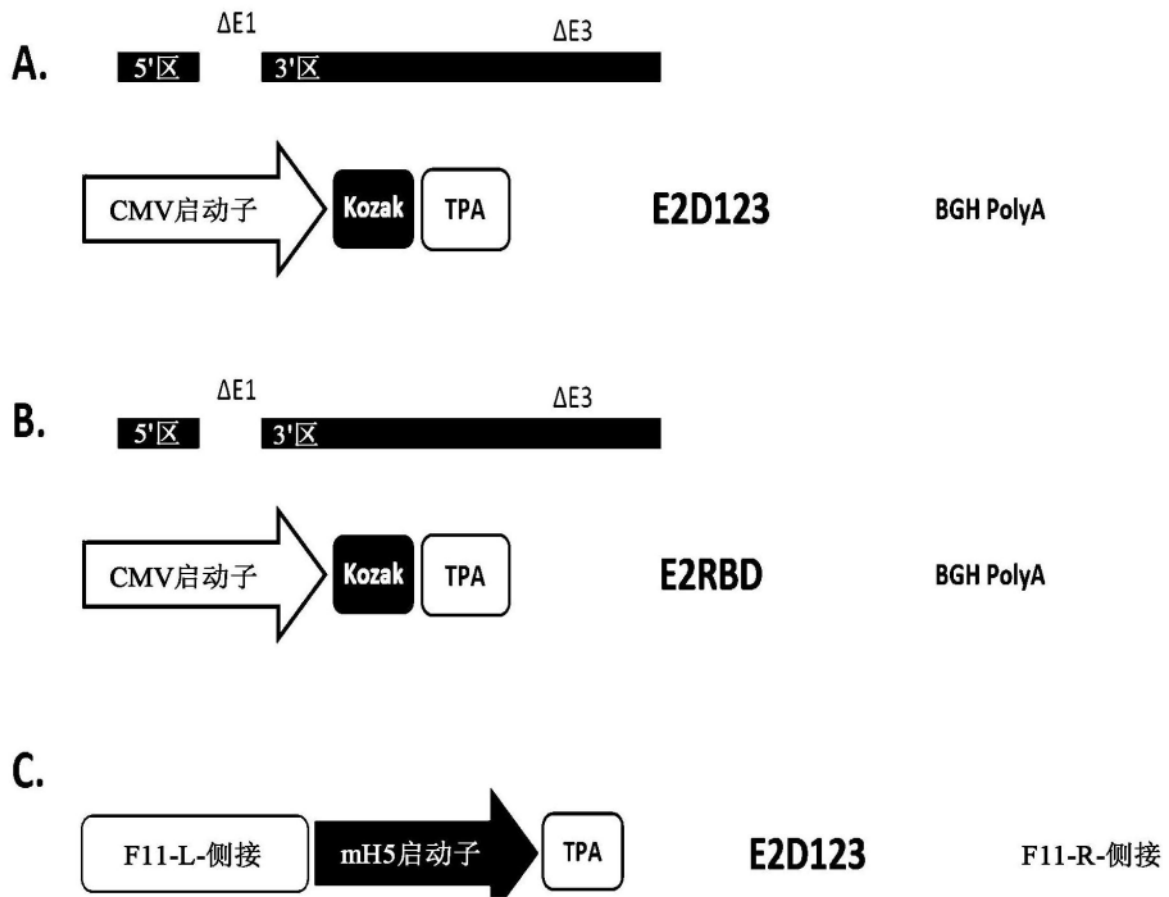


图20

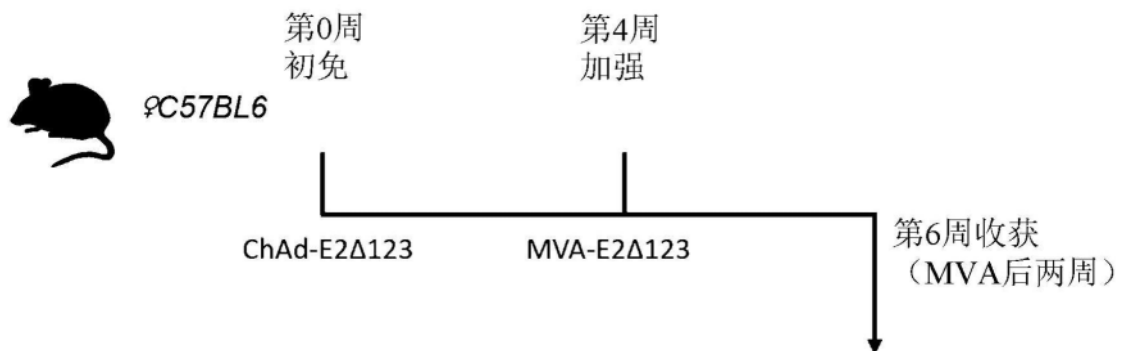


图21

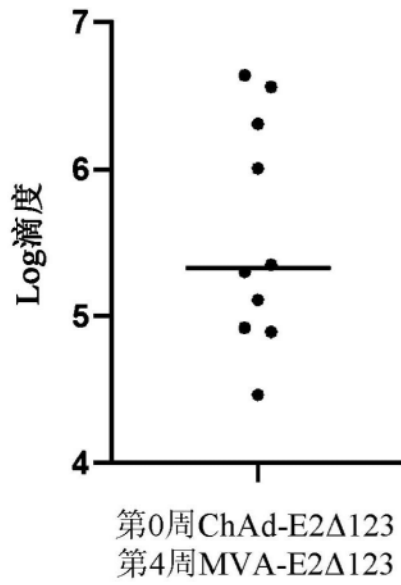
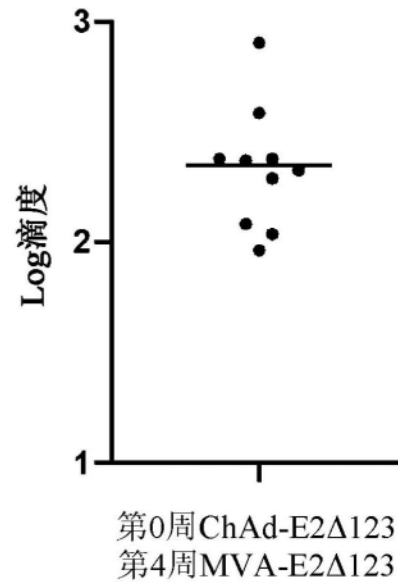
A.**B.**

图22

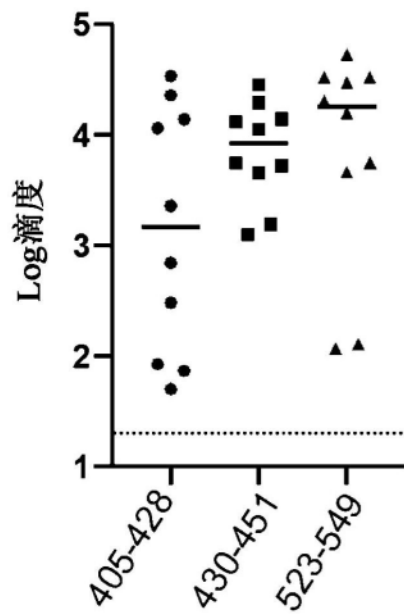
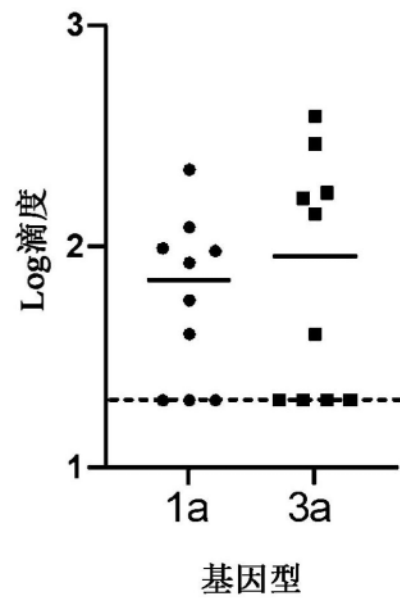
A.**B.**

图23

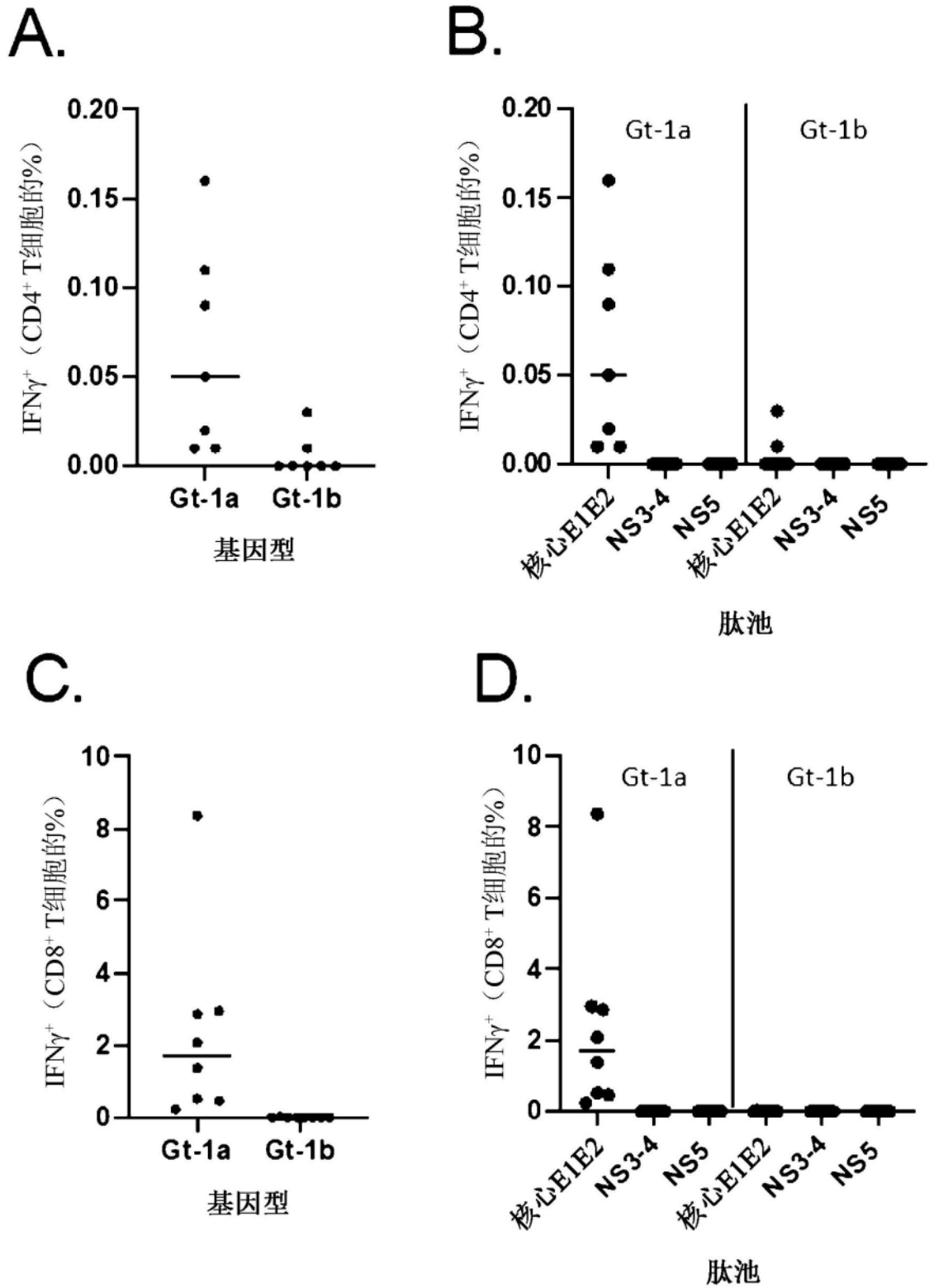


图24

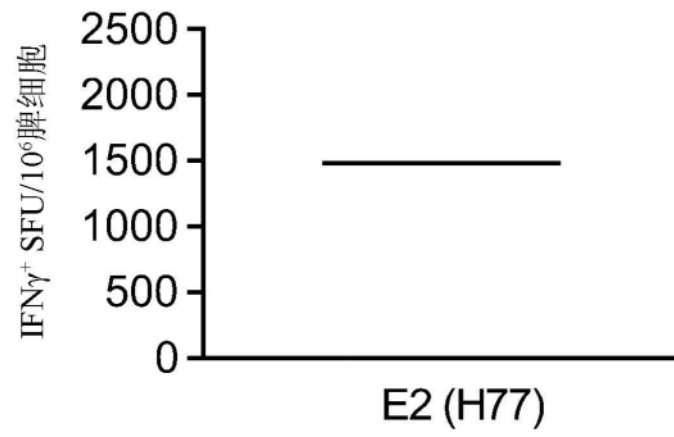


图25

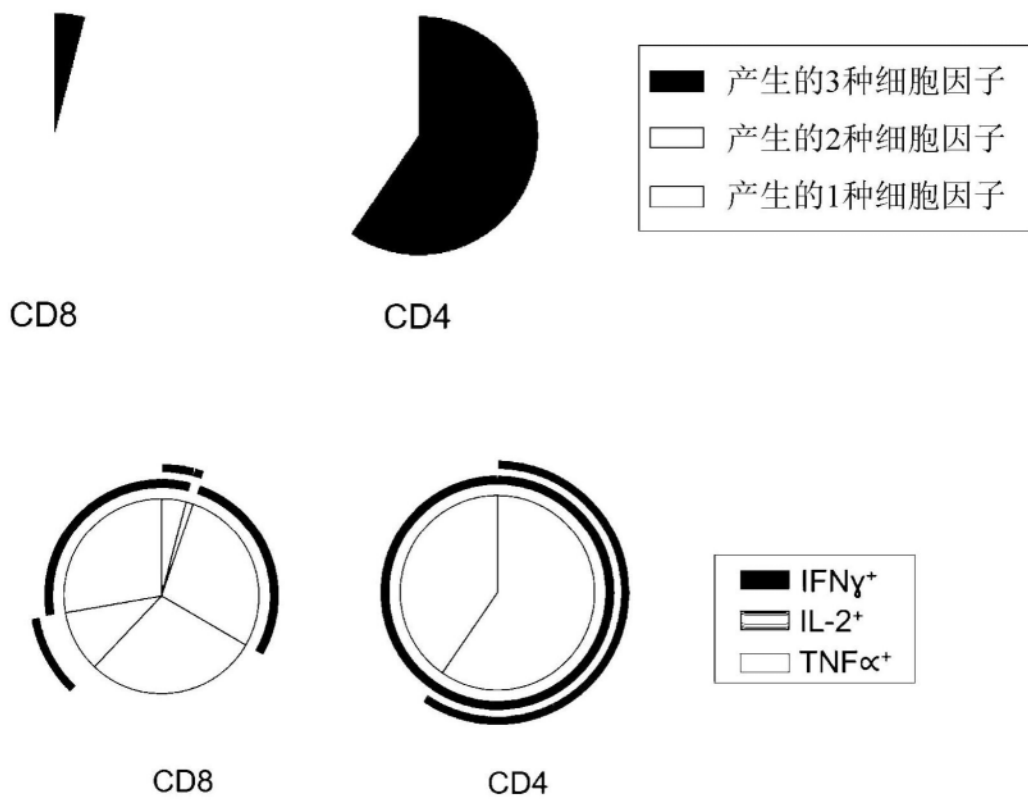


图26

ChAdOx1-TPA-E2D123序列:

CCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATCTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCC
ACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAAACCTTCGGTAAAAAATGTAATTACTCCCTCCTGCACAGGCAGCAA
AGCCCCCGCTCCCTCCAGAAACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCACGGCAGGCGCAAGA
GTCAGAGAAAAGGCTGAGCTCTAACCTGACTGCCCGCTCCTGTGCTCAATATATaAGCCCTAACCTACACTGA
CGTaAAAgGGcCCaAAAGTCTaaAAAAATAACCCGcCCAAAATGACACACACGcCCAGCACACGCCAGAAAC
CGGTGACACACTCaAAAAAATACGTGCGCTTCTCAAACGCCAAACCGGCGTCATTTCCGGGTTCCACGCT
ACGTACCCGCTCAGCGACTTTCAAATTCGTCGACCGTTAAAAACGTCACTCGCCCCGCCCTAACGGTCGCC
CTTCTCTCGGCCAATCACCTTCTCCTTCCCAAATTCAAACGCCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGT
TTGAGGTATATATTGAATGATGGTTTAAACGCGGCCGCCAGGCCTACCCACTAGTCAATTCGGGAGGATCG
AAACGGCAGATCGAAAAAACAGTACATACAGAAGGAGACATGAACATGAACATCAAAAAAATTGTAAAC
AAGCCACAGTTCTGACTTTTACGACTGCACTTCTGGCAGGAGGAGCGACTCAAGCCTTCGCGAAAGAAAATA
ACCAAAAAGCATACAAAGAAACGTACGGCGTCTCTCATATTACACGCCATGATATGCTGCAGATCCCTAAAC
AGCAGCAAAACGaAAAAATACCAAGTGCCTCAATTCGATCAATCAACGATTAATAAATATTGAGTCTGCAAAAG
GACTTGATGTGTGGGACAGCTGGCCGCTGCAAAACGCTGACGGAACAGTAGCTGAATACAACGGCTATCAC
GTTGTGTTTGCTCTTGCGGAAGCCCGAAAGACGCTGATGACACATCAATCTACATGTTTTATCAAAGGTCTG
GCGACAACCTCAATCGACAGCTGGAAAAACGCGGGCCGTGTCTTTAAAGACAGCGATAAGTTCGACGCCAAC
GATCCGATCCTGAAAGATCAGACGCAAGAATGGTCCGGTTCTGCAACCTTTACATCTGACGGAAAAATCCGT
TTATTCTACACTGACTATTCCGGTAAACATTACGGCAAACAAAGCCTGACAACAGCGCAGGTAAATGTGTCA
AAATCTGATGACACACTCAAATCAACGGAGTGGAAGATCACAAAACGATTTTTGACGGAGACGGAAAAAC
ATATCAGAACGTTTCAGCAGTTTATCGATGAAGGCAATTATACATCCGGCGACAACCATACGCTGAGAGACCC
TCACTACGTTGAAGACAAAGGCCATAAATACCTTGATTTCGAAGCCAACACGGGAACAGAAAACGGATACCA
AGGCGAAGAATCTTTATTTAAACAAGCGTACTACGGCGGCGGCACGAACCTTCTCCGTAAAGAAAGCCAGAA
GCTTCAGCAGAGCGCTAAAAAACGCGATGCTGAGTTAGCGAACGGCGCCCTCGGTATCATAGAGTTAAATA
ATGATTACACATTGAAAAAAGTAATGAAGCCGCTGATCACTTCAAACACGGTAACTGATGAAATCGAGCGCG
CGAATGTTTTCAAATGAACGGCAAATGGTACTTGTTCACTGATTCACGCGGTTCAAAAATGACGATCGATG
GTATTAACCTCAAACGATATTTACATGCTTGGTTATGTATCAAACCTTTAACC GGCCCTTACAAGCCGCTGAAC
AAAACAGGGCTTGCTGCAAATGGGTCTTGATCCAAACGATGTGACATTCACTTACTCTCACTTCGCAGTGC
CGCAAGCCAAAGGCAACAATGTGGTTATCACAAGCTACATGACAAACAGAGGCTTCTTCGAGGATAAAAAAG
GCAACATTTGCGCCAAGCTTCTTAATGAACATCAAAGGCAATAAAACATCCGTTGTCAAAAACAGCATCTCGG
AGCAAGGACAGCTGACAGTCAACTAATAACAGCAAAAAGaAAATGCCGATACTTCATTGGCATTCTTtTAT
TTCTCAACAAGATGGTGAATTGACTAGTGGGTAGATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAGTC
GATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCGGTTCGGACAGTGCTCCGAGA
ACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAGCGCTAGCAGCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTC
GGAATGGACGATATCCCGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGG
TGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTATACACGGTGCTGACTGCGTTAGCAATTTA
ACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTGATCCGGAACCCCTTA
ATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGACTATAGGGTCAACGTCGACAGCGAC
ACACTTGATCGGATGCAGCCCGGTTAACGTGCCGGCACGGCCTGGGTAACCAGGTATTTTGTCCACATAAC
CGTGCGCAAAATGTTGTGGATAAGCAGGACACAGCAGCAATCCACAGCAGGCATACAACCGCACACCGAGG
TTACTCCGTTCTACAGGTTACGACGACATGTCAATACTTGCCCTTGACAGGCATTGATGGAATCGTAGTCTCA
CGCTGATAGTCTGATCGACAATAAAGTGGGACCGTGGTCCCAGACCGATAATCAGACCGACRAYACGAGT
GGGAYCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAG
ACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTYCCAGWCTRATWATCAGACCGACGATACRAGTGGRACMGTGGKC
CCAGASAKAATAWTCAGRCCgAGWTAYGcWKTCKGGCCTGTAACAAAGGACATTAAGTAAAGACAGATAM
RMGTgRGActaaaaCGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTA
ATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGAC
CGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACAAGTGGAACAGTGGGCCAGAGAGAATATTCAGGCCA

图27

GTTATGCTTTCTGGCCTGTAACAAAGGACATTAAGTAAAGACAGATAAACGTAGACTAAAACGTGGTCGCAT
CAGGGTGCTGGCTTTTCAAGTTCCTTAAGAATGGCCTCAATTTTCTCTATACACTCAGTTGGAACACGAGACC
TGTCAGGTTAAGCACCATTATCGCCCTTATACAATACTGTCGCTCCAGGAGCAAACCTGATGTCGTGAGCT
TAACTAGTTCTTGATGCAGATGACGTTTTAAGCACAGAAGTTAAAAGAGTGATAACTTCTTCAGCTTCAAAT
ATCACCCCAGCTTTTTTCTGCTCATGAAGGTTAGATGCCTGCTGCTTAAGTAATTCTCTTTATCTGTAAAGGC
TTTTGAAGTGCATCACCTGACCGGGCAGATAGTTACCGGGGTGAGAAAAAGAGCAACAACCTGATTTAG
GCAATTTGGCGGTGTTGATACAGCGGGTAATAATCTTACGTGAAATATTTCCGCATCAGCCAGCGCAGAAA
TATTTCCAGCAAATTCATTCTGCAATCGGCTTGCATAACGCTGACCACGTTTATAAGCACTTGTTGGGCGATA
ATCGTTACCCAATCTGGATAATGCAGCCATCTGCTCATCATCCAGCTCGCCAACCAGAACACGATAATCACTT
TCGGTAAGTGCAGCAGCTTTACGACGGCGACTCCCATCGGCAATTTCTATGACACCAGATACTCTTCGACCGA
ACGCCGGTGTCTGTTGACCAGTCAGTAGAAAAGAAGGGATGAGATCATCCAGTGCGTCCTCAGTAAGCAGC
TCCTGGTCACGTTTATTACCTGACCATACCCGAGAGGTCTTCTCAACACTATCACCCGGAGCACTTCAAGAG
TAACTTCACATCCCGACCACATACAGGCAAAGTAATGGCATTACCGCGAGCCATTACTCTACGCGCGCAAT
TAACGAATCCACCATCGGGGCAGCTGGTGTGATAACGAAGTATCTTCAACCGTTGAGTATTGAGCGTATG
TTTTGGAATAACAGGCGCACGCTTATTATCTAATCTCCAGCGTGTTTAATCAGACGATCGAAAATTTTATT
GCAGACAGGTTCCCAAATAGAAAGAGCATTCTCCAGGCACCAAGTTGAAGAGCGTTGATCAATGGCCTGTTT
AAAAACAGTTCTCATCCGGATCTGACCTTTACCAACTTCATCCGTTTACGTACAACATTTTTTAGAACCATGC
TCCCCAGGCATCCGAATTTGCTCCTCCATCCACGGGGACTGAGAGCCATTACTATTGCTGTATTTGGTAAG
CAAATACGTACATCAGGCTCGAACCCTTTAAGATCAACGTTCTTGAGCAGATCACGAAGCATATCGAAAA
CTGCAGTGCAGGAGGTGTAGTCAAACAACCTCAGCAGGCGTGGGAACAATCAGCACATCAGCAGCACATACGA
CATTAACTCGTGCCGATACCCAGGTTAGGCGCGCTGTCAATAACTATGACATCATAGTCATGAGCAACAGTTTC
AATGGCCAGTCGGAGCATCAGGTGTGGATCGGTGGGCGAGTTTACCTTCATCAAATTTGCCATTAACCTCAGTT
TCAATACGGTGCAGAGCCAGACAGGAAGGAATAATGTCAAGCCCCGGCCAGCAAGTGGGCTTTATTGCATA
AGTGACATCGTCCTTTCCCAAGATAGAAAGGCAGGAGAGTGTCTTGCATGAATATGAAGATCTGGTAC
CCATCCGTGATACATTGAGGCTGTTCCCTGGGGTCTGTTACCTTCACGAGCAAAACACGTAGCCCTTCAGA
GCCAGATCCTGAGCAAGATGAACAGAACTGAGGTTTTGTAAACGCCACCTTTATGGGCGCAACCCCGATC
ACCGGTGGAAATACGTCTTCAGCACGTGCAATCGCGTACCAACACATCACGCATATGATTAATTTGTTCAA
TTGTATAACCAACACGTTGCTCAACCCGTCTCGAATTTCCATATCCGGGTGCGGTAGTCGCCCTGCTTCTCG
GCATCTCTGATAGCCTGAGAAGAAACCCCACTAAATCCGCTGCTTCACCTATTCTCCAGCGCCGGGTTATTT
TCCTCGTTCCGGGCTGTCACTAACTGTGCAATGGCGATAGCCTTCGTCATTTTCATGACCAGCGTTTATG
CACTGGTTAAGTGTTTCCATGAGTTTCACTTGAACATCCTTAATCATTGCTTTGCGTTTTTTTATTAAATCTT
GCAATTTACTGCAAAGCAACAACAAATCGCAAAGTCATCAAAAAACCGCAAAGTTGTTTAAAATAAGAGCA
AACTACAAAAGGAGATAAGAAGAGCACATACCTCAGTCACCTTATTATCACTAGCGCTCGCCGAGCCGTGT
AACCGAGCATAGCGAGCGAACTGGCGAGGAAGCAAAGAAGAACTGTTCTGTCAGATAGCTTACGCTCAG
CGAAGAAGAAATATCCACCGTGGGAAAACTCCAGGTAGAGGTACACACGCGGATAGCCAATTCAGAGTA
ATAAACTGTGATAATCAACCCTCATCAATGATGACGAACTAACCCCGATATCAGGTCACATGACGAAGGGA
AAGAGAAGGAAATCAACTGTGACAACTGCCCTCAAATTTGGCTTCCTTAAAAATTACAGTTCAAAAAGTAT
GAGAAAATCCATGCAGGCTGAAGGAAACAGCAAACTGTGACAAATTACCCTCAGTAGGTGAGAACAAATG
TGACGAACCACTCAATCTGTGACAGATAACCTCAGACTATCCTGTCGTATGGAAGTGATATCGCGGA
AGGAAAATACGATATGAGTCGTCTGGCGGCCTTTCTTTTCTCAATGTATGAGAGGCGCATTGGAGTTCTGCT
GTTGATCTCATTAAACAGACCTGCAGGAAGCGGCGGCGGAAGTCAGGCATACGCTGGTAACTTTGAGGCA
GCTGGTAACGCTCTATGATCCAGTCGATTTTCAGAGAGACGATGCCTGAGCCATCCGGCTTACGATACTGAC
ACAGGGATTCTGATAAACGCATGGCATAACGATTGGTGATTTCTTTGTTTCACTAAGCCGAACTGCGTAAA
CCGGTTCTGTAACCCGATAAAGAAGGGAATGAGATATGGGTTGATATGTACACTGTAAAGCCCTCTGGATGG
ACTGTGCGCACGTTTGATAAACCAAGGAAAAGATTATAGCCTTTTTCATCGCCGGCATCCTCTTCAGGGCGA
TaAAAAACCACTTCTTCCCCGCGAACTCTTCAATGCCTGCCGTATATCCTTACTGGCTTCCGCGAGAGGTCAA
TCCGAATATTTAGCATATTTAGCAACATGGATCTCGCAGATACCGTCATGTTCTGTAGGGTGCCATCAGAT

图27(续)

TTTCTGATCTGGTCAACGAACAGATACAGCATACGTTTTTATGATCCCGGAGAGACTATATGCCGCCTCAGTGA
GGTCGTTTGACTGGACGATTTCGCGGGCTATTTTACGTTTCTTGATTGATAACCGCTGTTTCCGCCATGAC
AGATCCATGTGAAGTGTGACAAGTTTTAGATTGTCACACTAAATAAAAAAGAGTCAATAAGCAGGGATAAC
TTTGTGAAAAACAGCTTCTTCTGAGGGCAATTTGTCACAGGGTTAAGGGCAATTTGTCACAGACAGGACTG
TCATTTGAGGGTGATTTGTCACACTGAAAGGGCAATTTGTCACAACACCTTCTCTAGAACCAGCATGGATAAA
GGCCTACAAGGCGCTCTAAAAAGAAGATCTAAAACTATaAAAAAAATAATTATAAAAAATATCCCCGTGGA
TAAGTGGATAACCCCAAGGGAAGTTTTtCAGGCATCGTGTGTAAGCAGAATATATAAGTGTCTGTTCCCTGGT
GCTTCTCGCTCACTCGAGGGCTTCGCCCTGTCGCTCAACTGCGGCGAGCACTACTGGCTGTAAAAGGACAG
ACCACATCATGGTTCTGTGTTCTATTAGTTGTTCTGTCCATTGCTGACATAATCCGCTCCACTTCAACGTAAAC
CCGCACGAAGATTTCTATTGTTCTGAAGGCATATTCAAATCGTTTTCGTTACCGCTTGACGGCATCATGACA
GAACACTACTTCTATAAACGCTACACAGGCTCCTGAGATTAATAATGCGGATCTCTACGATAATGGGAGATT
TTCCCGACTGTTTCGTTCTCTCAGTGGATAACAGCCAGCTTCTCTGTTAACAGACAAAAACAGCATATCC
ACTCAGTTCCACATTTCCATATAAAGGCCAAGGCATTTATTCTCAGGATAATTGTTTCAGCATCGCAACCGCAT
CAGACTCCGGCATCGAACTGCACCCGGTGCCGGGCAGCCACATCCAGCGCAAAAACCTTCGTGTAGACTT
CCGTTGAACTGATGGACTTATGTCCCATCAGGCTTTCAGAACTTTCAGCGGTATACCGGCATACAGCATGTG
CATCGCATAGGAATGGCGGAACGTATGTGGTGTGACCGGAACAGAGAACGTCACACCGTCAGCAGCAGCG
GCGGCAACCGCCTCCCAATCCAGGTCCTGACCGTTCTGTCCGTCACTTCCAGATCCGCGCTTCTCTGTCTT
TCCTGTGCGACGGTTACGCCGCTCCATGAGCTTATCGCGAATAAATACCTGTGACGGAAGATCACTTCGCAG
AATAAATAAATCCTGGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAACTTTTGGCGAAAATGAGACGTTG
ATCGGCACGTAAGAGGTTCCAATTTACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATC
GAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCA
ATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTCACTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTG
GATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGC
CCGCTGATGAATGCTCATCCGGAGTTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTATATGGGATAGTG
TTCACCTTGTACACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAAACGTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGAT
TTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAG
GGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACAGTTTTGATTTAAACGTGGCC
AATATGGACAATCTTCGCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGC
CGCTGGCGATTAGGTTTCATCATGCCGTTTGATGGCTTCCATGTGCGGAGAAATGCTTAATGAATTACAACA
GTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTTG
CTACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATT
GGTCGACGGCGCGCCAAAGCTTGCATGCCTGCAGCCGCGTAACCTGGCAAATCGGTTACGGTTGAGTAAT
AAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGGCACATTTATTACCTCTTCTCCGCACCCGACATAGATAATAACTTCG
TATAGTATACATTATACGAAGTTATCTAGTAGACTTAATCGCGTTTAAACCCATCATCAATAATATACCTCAA
CTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGAAGGGAGGAAGGTGATTGGCCGAGAGA
AGGGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGACCGCGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAG
TTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTTGAACACGGAAATACTCAATTTCCGCGCTCTCT
GACAGGAAATGAGGTGTTTCTAGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCATTTTCGCGCGAAAACCTGAATGAGG
AAGTGAAAATCTGAGTAATTTTCGCGTTTATGACAGGGAGGAGTATTTGCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACC
GATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTACCTAAATTTCCGCGTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTT
ACGTAGGTGTCAGCTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCCAGTCAAGAGGGCCACTCTTGAGTGCCA
GCGAGAAGAGTTTTCTCTCCGCGCGCGAGTCAGATCTACACTTTGAAAGGCGATCGCTAGCGACATCGATC
ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCACCATGGGAACCAATTCagTCGAGCCTTCACTCATTAGATGCATG
TCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAAT
GACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAAC
TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGG
CCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT
CGCTATTACCATGGTGATGCGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATT

图27 (续)

TCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGAACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGT
CGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
TCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAG
ATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGTTA
AGCTTGGTACCCCCGCCGCCACCATGGACGCTATGAAGCGAGGACTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGTGTGGC
GCTGTGTTTGTGTCCCCTAGCCAAGAGATCCACGCCAGATTGAGAAGAGAGACACACCAGAACATCCAGCTG
ATCAACACCAACGGCAGCTGGCACATCAACAGCACAGCCCTGAACTGCAACGAGAGCCTGAATACCGGATG
GCTGGCCGGCCTGTTCTACCAGCACAAGTTCAATAGCAGCGGCTGCCCCGAGAGACTGGCCAGCTGTGGATC
TTCTGGCTGCTGGCACTACCCTCCAAGACCTTGTTGAATCGTGCCCGCCAAGTCTGTGTGTGGCCCCGTGTAC
TGCTTACCCCATCTCCAGTGGTCTGTTGGGCACCACCGATAGATCTGGCGCCCCAACATATAGCTGGGGAGCC
AACGACACCGACGTGTTCTGTGCTGAACAATACCAGACCTCCTCTCGGCAATTGGTTCGGCTGCACCTGGATG
AACAGCACCGGCTTACAAAAGTGTGCGGAGCCCCCTCATGTGGCAGCTCTGGATGTCCTACCGACTGCTTC
AGAAAGCACCCCGAGGCCACCTACAGCAGATGTGGATCTGGCCCTTGATCACCCCTCGGTGCATGGTGGGA
CTACCCCTACAGACTGTGGCACTATCCCTGCACCATCAACTACACCATCTTCAAAGTGGGATGTACGTCGGC
GGCGTGGAACACAGACTGGAAGCCGCCTGTAATTGGACCAGAGGCGAGAGATGCGACCTCGAGGACAGAG
ACAGATCCGAATGAGCggccgctcgagcatgcatctagagggccctattctatagtgtcacctaaatgctagagctcgctgatcagcctc
gactgtgccttctagttgccagccatctgtgtttgccccctccccgtgccttcttgaccctggaagggtgccactcccactgtcctttcctaataaa
atgaggaaattgcatcgcatgtctgtagtgtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagaca
atagcaggcatgctggggatcggtgggctctatggcttctgaggcggaagaaccagctggggctcgaggggggatcgatccgtcGAGAT
ATCTAGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATCGATTGACAGATCGCGATCGCAGTGAGTAGTGTCTG
GGCGGGGGGAGGACCTGCATGAGGGGCCAGAATGACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCATCATG
AGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGGGTATTACGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCTCCTGGGCGGG
AGTGCGTCAGAATGTGATGGGATCCACGGTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCAACTCTTCAACCCTGA
CCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGGTGGACGCAGCTGCCGCCGAGCTGCTGCATCCGCCGCCAGCGCCG
TGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTACTACGGCACTCTGGTGGCCAACCTCGAGTTCACCAATAATCCCG
CCAGCCTGAACGAGGAGAAAGCTGCTGCTGCTGATGCCCCAGCTTGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAG
CTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGGAGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAA
AATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGTTGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCG
CGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCGATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTTCCAGGACCCGGTAGAGGT
GGGCTTGATGTTGAGGTACATGGGCATGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCG
TGCTCGGGGGTGGTGTGTAAATCACCCAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCGTGGTGTGACAATATCTTT
GAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCAGCCCTTTGGTGTAGGTGTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGAT
GCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATCTTGGCCTGGATCTTGAATTGGCGATGTTACCGCCCAGATCCCGC
CTGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACAGCACGGTGTATCCGGTGCACTTGGGAATTTATCATGCAACTTG
GAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGCGACGCCCTTGTCGCCGCCAGGTTTTCCATGCACTCATCCATGATG
ATGGCAATGGGCCCCGTGGGCGGCGGCCTGGGCAAAGACGTTTCGGGGGTGCGACACATCATAGTTGTGGT
CCTGGGTGAGGTCATCATAGGCCATTTAATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTA
CCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCTCTCACAGATCTGCATCTCCAGGCTTTGAGCTCAGAGGGGGGGATC
ATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAACACGGTTTCCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGT
TCCGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGCCGGTGGGGCCGTAAATGACCCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTA
GTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCTCCCGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCA
TGTTCGCGCACCAAGTTCCGCCAGGAGGCGCTCTCCCCCAGAGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAG
TTTTTACGCGGCTTGAGTCCGTGCGCCATGGGCATTTTGAGAGGGGTCTGTTGCAAGAGTTCCAAGCGGTCC
CAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCATCTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTTGGGACGACTGC
GGGAGTAGGGCACACAGATGGGCGTCCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCTTCCAGGGCCGCAGCGTCCG
CGTCAGGGTGGTCTCCGTACGGTGAAGGGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCCTTCAGG
CTCATCCGGCTGGTCAAAACCGCTCCCGATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGT
TCGTAGTTGAGCGCTCGGCCGCGTGGCCTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCGCAGGCGGG

图27 (续)

ACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAGCTTGGGGGCGAGGAAGACGGAATCGGGGGCGTAGGCGTCCGC
GCCGCAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCACTCCACGAGCCAGGTGAGGTCGGGCTGGTCGGGGTCAAAAACC
AGTTTCCC GCCGTTCTTTTGATGCGTTTCTTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCCCGCTGGGTGACAAA
GAGGCTGTCCGTGTCCCCGTAGACCGACTTTATGGGCCGGTCTCGAGCGGTGTGCCGCGGTCTCTCTGTA
GAGGAACCCCGCCACTCCGAGACGAAAGCCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGG
TAGCGGTCTGTTGTCCACCAGCGGGTCCACTTTTTCCAGGGTATGCAAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCA
GGAAGGTGATTGGCTTGTAAGTGTAGGCCACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGTATAAAAGGGGGC
GGGCCCTGCTCGTCTCACTGTCTTCCGGATCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCCTC
TCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCAGGTTGTCAAGTTCTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGT
GCCAGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCCCTCGTCCATCTGGTCAGAAAAGACGAATTTTTTGTGTCGAGCTTG
GTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGGAAAGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTtCCTt
GTCGGCGCGCTCCTTGGCCGCGATGTTGAGCTGCACGTA CTGCGCGCCACGCACTTCCATTGCGGGAAGAC
GGTGGTCATCTCGTCGGGCACGATTCTGACCTGCCAACCTCGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGT
GGCCACCTCGCCGCGCAGGGGCTCGTTGGTCCAGCAGAGGCGGCCGCCCTTGC GCGAGCAGAAGGGGGGC
AGAGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGGGTCCGGCATCGATGGTGAAGATGCCGGGCAGGAGATCGGGGT
CGAAGTAGCTGATGGAAGTGGCCAGATCGTCCAGGGAAGCTTGCCATTGCGCACGGCCAGCGCGCGCTCG
TAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCATGGGGTGGGTGAGCGCGGAGGCGTACATGCCGCAGATGTGCT
AGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCGATGTAGGTGGGGTAGCAGCGCCCCCGCGGATGCTGGCGCG
CACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGCGCGAGGAGCCCCGGGCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGG
CGCGGTAGACGATCTGGCGAAAGATGGCATGCGAGTTGGAGGAGATGGTGGGCCCTTTGGAAGATGTTGAA
GTGGGCGTGGGGGAGGCCGACCGAGTCGCGGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGACGTTTGGCGACGAG
CTCGGCGGTGACGAGGACGTCCAGAGCGCAGTAGTCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCATACTGAGCTGGC
CCTTTTGTTCACAGCTCGCGTTGAGAAGGAAGTCTTCGCGGTCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCC
GTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCATGTAGAACTGGTTGACGGCCTTG TAGGCGCAGCAGCCCTTCTC
CACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCTTGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAGGTGTCCCTGAC
CATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAAATCGATATCGTCGCAGcCCCCCTGCTCCAGAGCTGGAAGTCCGT
GCGCTTCTTG TAGGCGGGGTTGGGCAAAGCGAAAGTAACATCGTTGAAAAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCA
TAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGCTGGGGCACCTCGGCCCGGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCAC
GATCTCGTCGAAACCGTTGATGTTGTGGCCACGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGGCGGCCCTTGACGTG
GGGCAGCTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCTCGTCGGGGTCGCTGAGACCGTGCTGCTCGAGCGCCAGTC
GGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGAAGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGACAGCGGTC
CCGCTACTGACGGAAGTCTGCCGACGGCCATTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCC
CGTGCCAGCGGTCCATTTGAGCTGGAGGGCGAGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGGCGGTGCTCCCTGA
GAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCTGCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATC
GTAGGTGAGGAAGAGCCTTCGGTGCGAGGATGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAAT
TGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTAGAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTGTTTA
TACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCACGGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTTG
ACGAGGAATTTCA GTGGGAAGTGGAGTCGTGGCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTGCTGGTGGTCGGC
CTGGCCCTCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCTGACGAGCCCGCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGC
GAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCGCAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCTGAGACGCTGCGGAG
TCAGGTCA GTGGGCAGCGGCGGCGCGGTTGACTTGACGAGATTTTTCCAGGGCGCGGGGAGGTCCAG
ATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCGTTGGTGGCGACGTCGATGGCTTGACGGTCCCCTGCCCCTGGGGTGT
GACCACCGTCCCCGTTTCTTGGGCGGCTGGGGCGACGGGGCGGTGCCTCTTCATGGTTAGAAGCG
GCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGAGGCGGCTCGGGGCCCGAGGCAGGGGCGGCAGGGGCACGT
CGGCGCCGCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGCGCCCCGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTT
GACGTCCTGGATCTGACGCCTCTGGGTGAAGGCCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGA
CAGAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCTGCCGAGGATCTTGCACGTGCCCCGAGTTGTCCTGGT
AGGCGATCTCGGT CATGAACTGCTCGATCTCCTCCTGAAGGTCTCCGCGACCGGCGCGCTCCACGGTGG

图27 (续)

CCGCGAGGTCGTTGGAGATGCGGCCCATGAGCTGCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGG
CTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCGGGCGCGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCG
CGTGAAGACCGCGTAGTTGCAGAGGCGCTGGTAGAGGTAGTTGAGCGTGGTGGCGATGTGCTCGGTGACG
AAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATCTCGCTGACGTCGCCCAGCGCCTCCAAGCGTTCATGGCC
TCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAACTGGGAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAG
ACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTCGCGCTCGAAGCCCCCGGAGTTCCTCCACTTCCTCCTC
TTCTTCTCCTCCACTAACATCTCTTACTTCTCCTCAGGCGGTGGTGGTGGCGGGGGAGGGGGCCTGCGT
CGCCGCGGCGCACGGGCGAGCGGTCGATGAAGCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGATGGTCTC
GGTGACGGCGCGCCCGTCTCGCGGGGCCGACGCTGAAGACGCCGCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGG
GGGTCCCCGTTGGGCGAGGAGAGGGCGCTGACGATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAA
GGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCTGAAAACCGTTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGC
AAGGTAGGCTGAGCACGGTTTCTTCTGCCGGGTATGTTGGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGAT
GAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGATGGTGGCGAGGAGCACCAGGTCTTTGGGCCCGGCTTGC
TGGATGCGCAGACGGTCGGCCATGCCCCAGGCGTGGTCTGACACCTGGCCAGGTCTTGATAGTAGTCTCTGC
ATGAGCCGCTCCACGGGCACCTCCTCCTCGCCGCGCGGCCGTGCATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGCTG
GGGCTGGACGAGCGCCAGGTGCGCGACGACGCGCTCGGCGAGGATGGCCTGCTGGATCTGGGTGAGGGT
GGTCTGGAAGTCGTCAAAGTCGACGAAGCGGTGGTAGGCTCCGGTGTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCA
TGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCGACGCACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCG
CGTGTCGAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAGGTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGCGGCGGCGGC
TGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGCGCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGCGGTGGT
AGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCGGCGGCGGTGGTGGAGGCGCGCGGGAACCTCGCGGAC
GCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGTTCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCG
CAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGCGGTGAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAG
CGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTCAATCTCAATCAGGCTGGAGCCGCGAGCTAACGTGGTA
CTGGCACTCCCGTCTCGACCAAGCCTGCACCAACCTCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTT
TtGGAGGCCGGAATGAACTAGTAAGCGCGGAAAGCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGA
GAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCGGTTCGAGGCCGGCCGATTCCGCGGCTAACGAGGG
CGTGGCTGCCCGTCTTTCCAAGACCCCATAGCCAGCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCCTTTTG
TTTTGTTTGTGTTTGGCAGATGCATCCCGTACTGCGGCAGATGCGCCCCACCACCTCCACCGCAACAACAG
CCCCCTCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCGCCCCAGCAGCAGCAACTTCAGCCACGACCGCCGCG
GCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGACTTCTCAGTATGATCACCTGGCCTTGAAGAGGGCGAGGGGCTGG
CGCGCTGGGGGCGTCGTCGCCGGAGCGGCACCCGCGCGTGAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTA
CGTGCCCAAGCAGAACCTGTTAGAGACAGGAGCGGCGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTT
CACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGCCTGGACCGAAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTCGAGGCG
GACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCACGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGC
AGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCAAAAAATCCTTCAACAACCACGTGCGCACCTGATCGCGCGGAG
GAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTGCTGGAGGCCATCGTGAGAACCCACCAGCAAGCC
GCTGACGGCGCAGCTGTTCTGGTGGTGCAGCATAGTCGGGACAACGAGGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTG
AATATACCGAGCCCAGGGCCGCTGGCTCCTGGACCTGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGA
GCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATCAACTTCTCGGTGCTGAGTCTGGGCAAGTACTACG
CTAGGAAGATCTACAAGACCCGTACGTGCCCATAGACAAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGC
ATGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGGGGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGCGCGGT
GAGCGCCAGCAGGCGGCGGAGCTGAGCGACCAGGAGCTGATGCACAGCCTGCAGCGGGCCCTGACCGGG
GCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGCGCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCCGGGCT
TGGAGGCGGCAGGCGGTCCCCCTACATAGAAGAGGTGGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCT
GGAAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTGTAGATGCAACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCG
GCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGGACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGC
GCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTAGACAGCAGCCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCTGGAGGC

图27 (续)

CGTGGTGCCCTCGCGCTCCAACCCACGCACGAGAAGGTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGAGAAACA
AGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGCTGGTGTACAACGCGCTGCTGGAGCGCTGGCCCGCTACAACAGC
ACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCGACGTGCGCGAGGCCGTGGCCAGCGCGAGCGGTT
CCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTGAACGCCTTCCTCAGCACCCAGCCCGCCAACGTGCC
CCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCCCTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCG
AGGTGTACAGTCCGGGCGGACTACTTCTCCAGACAGTCGCCAGGGCTTGACAGACCGTGAACCTGAGCC
AGGCGTTCAAGAACTTGAGGGCCTGTGGGGCGTGAGGCCCGGTGCGGGACCGCGCGACGGTGTGAG
CCTGCTGACGCCGAACCTCGCGCTGCTGCTGCTGGTGGCCCCCTTCACGGACAGCGGCAGCATCAACCG
CAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCGAGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGA
CCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGGCCAGGACGACCCGGGCAATCTGGAAGCCACCCTG
AACTTTTGTGACCAACCGGTGCGAGAAGATCCCGCCCCAGTACACGCTCAGCGCCGAGGAGGAGCGCATC
CTGCGATACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCTGATGCAGGAGGGGGCCACCCCGAGCGCCGCGCTCGA
CATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCCAGCAACCGCCGTTTCATCAATAAACTGATGGACTA
CTTGATCGGGCGGCCCATGAACTCTGACTATTTACCAACGCCATCCTGAATCCCCACTGGCTCCCGCCG
CCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCCCCACCCCAATGACGGGTTCTGTGGGACGATGTGGACAG
CAGCGTGTCTCCCCCGACCGGGTGCTAACGAGCGCCCTTGTTGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCC
CGTCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGCTGCCGCGCGGTGCCGAGGCCGCCAGTCCTTCCCGAGC
TTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATTCGAGCAGCGAGCTGGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGA
GGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGACCCGAGCGGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAGA
GCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGACGTATGCGCAGGAGCACAGGGACGATCCGTGCGAGGGGGC
CACGAGCCGGGGCAGCGCCCGCCGTAAACGCCGTTGGCACGACAGGCAGCGGGGACTGATGTGGGACGAT
GAGGATCCGCCGACGACAGCAGCGTGTGGACTTGGGTGGGAGTGTAACCCGTTCTGCTCACCTGCGCCC
CCGCATCGGGCGCATGATGTAAGAGAAACCGAAAATAAATGATACTACCAAGGCCATGGCGACCGAGCGTG
CGTTCGTTTCTTCTGTTGTGTATCTAGTATGATGAGGCGTGCGTACCCGAGGGTCTCCTCCCTCGTACG
AGAGCGTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGCGGCGGCGATGCAGCCCCGCTGGAGGGTCTTACGTGCC
CCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAACAGCATTCTTACTCGGAGCTGGCACCTTGACGATA
CCACCCGTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGGACATCGCTCGTGAACCTACCAGAACGACCACAGCA
ACTTCTGACCACCGTGGTGCAGAACAACTGACTTACCCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTG
ACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGTGAGCTGAAAACCATCATGCACACCAACATGCCAACGTGAACGAGTTC
ATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGGGGTGATGGTCTCCCGCAAGACCCCAACGGGGTGACAGTGACAGA
TGGTAGTCAGGATATCTTGAGTATGAATGGGTGGAGTTTGAGCTGCCCCAAGGCAACTTCTCGGTGACCAT
GACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAATTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTCTGG
AGAGCGATATCGGCGTGAAGTTCGACACTAGGAACTTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTC
ATGCCCCGGGTGTACCAACGAGGCCTTCCACCCGATATTGTCTTGCTGCCCGGTGCGGGGTGGACTTC
ACCGAGAGCCGCTCAGCAACCTGCTGGGCATTGCAAGAGGCAGCCCTTCCAGGAGGGCTTCCAGATCAT
GTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCTCCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAG
GAGAGCGCCGCGCGGCGACTGCAGCTGTAGCCACCGCCTTACCGAGGTGAGGGGCGATAATTTTGCCAG
CCCTGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGTGAAACCGAAAGTAAGATAGTCATTACCGCGGTGGAGAAG
GATAGCAAGGACAGGAGCTACAACGTGCTGCCGACAAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTGGC
CTACAACCTATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTCCTGGACGCTGCTACACCTCGGACGTACCTGCGG
CGTGGAGCAAGTCTACTGGTCTGCTGCCGACATGATGCAAGACCCGGTACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGT
TAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCCGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGT
CTACTCGCAGCAGTGCAGCGCCTTACCTCGCTCACGCACGTCTTCAACCGCTCCCCGAGAACCAGATCCTC
GTCCGCCCCGCGCGCCACCATTACCACCGTCAGTGAAAACGTTCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCGTG
CGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGACCGTACTGACGCCAGACGCCGCACCTGCCCTAC
GTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCTCCTCTGAGCCGCACCTTCTAAAAAATGTCCATTCTCA
TCTCGCCAGTAATAACACCGTTGGGGCCTGCGCGCGCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGC
TCCACGCAACACCCCGTGCGCGTGCGCGGGCACTTCCGCGCTCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCCGCGTGCG

图27 (续)

GTCCGCGACCAACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTGGTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCGCCGCCG
CGCCCGTCTCCACCGTGACGCCGTATCGACAGCGTGGTGGCCGACGCGCGCCGGTACGCCCCGCGCCAAG
AGCCGCGGCGGCGCATCGCCCGCGGCACCGGAGCACCCCGCCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGCTGC
GCAGGGCCAGGCGCACGGGACGCAGGGCCATGCTCAGGGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGC
CGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGCAGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGA
GGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTGTGCGCGTGCCCGTGCACCCGcCCCCCTCGCACT
TGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCAGCGGCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAA
GAGATGCTCCAGGTCATCGCGCTGAGATCTACGGCCCCGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCA
AAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAAGGAAGAAGATGACGATCTGGTGGAGTTTGTGCGCGAGTTCGC
CCCCcGGCGGCGCGTGCACTGGCGCGGGCGGAAAGTGACCCGGTGCTGAGACCCGGCACCACTGGTCT
TCACGCCCCGCGAGCGCTCCGGCAGCGCTTCCAAGCGCTCCTACGACGAGGTGTACGGGGACGAGGACATC
CTCGAGCAGGCGGCCGAGCGCTGGGCGAGTTTGCTTACGGCAAGCGCAGCCGCCCGCCCTGAAGGAAG
AGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCACGCCGAGCCTCAAGCCCGTGACCCTGCAGCAGGTG
CTGCCGAGCGCAGCGCCGCGCCGGGGTTCAAGCGCGAGGGCGAGGATCTGTACCCACCATGCAGCTGAT
GGTGCCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGACCATGAAGGTGGACCCGGACGTGCAGCCCCGAG
GTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCTGGGCGTGACAGCCGTGGACATCAAGATCCCCAC
GGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCCAGCACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATC
CCTGGATGCCATCGGCTCCTAGCCGAAGACCCCGGCGCAAGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCAACT
ACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGCTACCGCGGCACGCGCTTCTACCGCGGTATACAACAG
CCGCCCGCGCAAGACCACCAACCCGCCGCCGCGTGCCTGCACAGCCGCTGCATCTACCCCTGCCGCCCTGGT
GCGGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCGCTCTGACCCTACCGCGCGCGCTACCAACCGAGCATCGCCA
TTTAAACTTTGCGCTGCTTTCAGATGGCCCTCACATGCCGCTCCGCGTTCCTATTACGGGCTACCGAGGAA
GAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGATGCGTCGCCACCACCATCGGCGGCGGCGCGCCAT
CAGCAAGCGGTTGGGGGgAGGCTTCTGCCGCGCTGATCCCCATCATCGCCGCGGCGATCGGGGCGATCC
CCGGCATTGCTTCCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCCACTGAGACACTTGAAAACATCTTGTAATAAAC
CAATGGACTCTGACGCTCCTGGTCTGTGATGTGTTTTCTAGACAGATGGAAGACATCAATTTTTCTGCCCT
GGTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTTATGGGCACCTGGAGCGACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGG
GGCGCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGAATTTGGGTCCACGCTTAAACCTATGGCAGC
AAGGCGTGGAACAGCACCAAGGGCAGGCGCTGAGGGATAAGCTGAAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGG
TGGTCGATGGGCTCGCTCGGCATCAACGGGGTGGTGGACCTGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATC
AACAGCCGCTGGACCCGGTGCCGCCCGCGGCTCCGTGGAGATGCCGAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCC
CCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGACGCGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAG
CCGCCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAAACTGGGTCTGCCACCACGCGGCCCATCGCGCCCCCTGGCCACCGG
GGTGCTGAAACCCGAAAGTAATAAGCCCGCGACCCTGGACTTGCTCCTCCCGCTTCCCGCCCCCTTACAGTG
GCTAAGCCCCTGCCGCCGTGGCCGTGGCCCGCGCGGACCCGGGGGCTCCGCCGCCCTCATGCGAACTG
GCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGACAGTGTGAAGCGCCGCGCTGCTATTAAACCT
ACCGTAGCGCTTAACCTTGCTTGCTGTGTGTGTATGTATTATGTGCGCGCTGTCCGCCAGAAGGAGGAGTGA
AGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCATCGATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGC
CGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGTCTGGTGCAGTTCGCCGCGCCACAGACACCTACTTCAG
TCTGGGGAACAAGTTTAGGAACCCACGGTGCGGCCACGCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGC
TGACGCTGCGCTTCTGCCCCGTGGACCGCGAGGACAACACCTACTCGTACAAAGTGCGCTACACGCTGGCCG
TGGGCGACAACCGCGTGCTGGACATGGCCAGCACCTACTTTGACATCCGCGGCGTGCTGGATCGGGGCCCT
AGCTTCAAACCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGCCTGGCTCCCAAGGGAGCGCCAATTCCAGCCAGTGG
GAGCaAAAAAAGGCAGGCAATGGTGACACTATGGAAACACACATTTGGTGTGGCCCCAATGGGCGGTGA
GAATATTACAATCGACGGATTACAAATTGGAAGTACGCTACAGCTGATCAGGATAAACCAATTTATGCTGA
CAAAACATTCCAGCCTGAACCTCAAGTAGGAGAAGAAAATTGGCAAGAACTGAAAGCTTTTATGGCGGTA
GGGCTCTTAAAAAAGACACAAGCATGAAACCTTGCTATGGCTCCTATGCTAGACCCACCAATGTAAAGGGAG
GTCAAGCTAAACTTAAAGTTGGAGCTGATGGAGTTCCTACCAAGAATTTGACATAGACCTGGCTTTCTTTGA

图27 (续)

TACTCCCGGTGGCACAGTGAATGGACAAGATGAGTATAAAGCAGACATTGTCATGTATACCGAAAACACGTA
TCTGGAAACTCCAGACACGCATGTGGTATACAAACCAGGCAAGGATGATGCAAGTTCTGAAATTAACCTGGT
TCAGCAGTCCATGCCCAATAGACCAACTATATTGGGTTCAGAGACAACTTTATTGGGCTCATGTATTACAAC
AGTACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCTGGTCAGGCCCTCACAGCTGAATGCTGTGGTCGACTTGCAAGACAG
AAACACCGAGCTGTCATACCAGCTCTTGCTTGACTCTTTGGGTGACAGAACCCGGTATTTTCAGTATGTGGAAT
CAGGCGGTGGACAGTTATGATCCTGATGTGCGCATTATTGAAAACCATGGTGTGGAAGACGAACTTCCCAAC
TATTGCTTCCCCCTGGATGGGTCTGGCACTAATGCCGCTTACCAAGGTGTGAAAGTAAAAAATGGTAACGAT
GGTGATGTTGAGAGCGAATGGGAAAATGATGATACTGTGCGAGCTCGAAATCAATTATGCAAGGGCAACAT
TTTTGCCATGGAAATTAACCTCCAAGCCAACCTGTGGAGAAGTTTCCTCTACTCGAACGTGGCCCTGTACCTG
CCCGACTCTTACAAGTACACGCCAGCCAACATCACCTGCCACCAACACCAACACTTATGATTACATGAACG
GGAGAGTGGTGCTCCCTCGCTGGTGGACGCCTACATCAACATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGACCCCATG
GACAACGTCAATCCCTTCAACCACCACCGCAACGCGGGCCTGCGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGG
CGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTTCGCCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGT
CCTACACCTACGAGTGGAACCTCCGCAAGGACGTCAACATGATCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGC
GCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTACCAGCATCAACCTTACGCCACCTTCTCCCCATGGCGCACAACAC
GGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAACGACCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGC
CAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCCATCTCCATCCCCCTCGCGCAACTGGGCCGCC
TTCCGCGGCTGGTCCTTACGCGCCTCAAGACCAAGGAGACGCCCTCGCTGGGCTCCGGGTTGACCCCTAC
TTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCTACCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCAT
CACCTTCGACTCCTCCGTGAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTCCTGACGCCAACGAGTTCGAAATCAAGCG
CACCGTCGACGGCGAGGGATACAACGTGGCCAGTGCAACATGACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGC
TGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGCTTCTACGTGCCGAGGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTT
CCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGTCAACTACAAGGACTACCAGGCCGTACCCCT
GGCCTACCAGCACAACAACTCGGGCTTCGTGCGCTACCTCGCGCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCC
CGCCAACTACCCGTACCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTACCCAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGA
CAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCCATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAA
CATGCTCTATGCCAACTCCGCCACGCGCTAGACATGAATTTGGAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTT
CTCTATGTTGTCTTGAAGTCTTCGACGTGCTCCGAGTGACACAGCCCCACCGCGGCGTCATCGAGGCCGTCT
ACCTGCGCACCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAATTGCTACTTGTCATGATGGCTGAGCCACAGG
CTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGGGCTGCGGGCCCTACTTCTGGGCACCTTCGA
TAAGCGTTCCTCGGGATTTCATGGCCCCGACAAGCTGGCCTGCGCCATCGTCAACACGGCCGGCGCGAGAC
CGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCTGGAACCCGCGCTCGAACACCTGCTACCTCTTCGACCCCTTCGG
GTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTTCGAGTACGAGGGCCTGCTGCGCCGTAGCGCCCTGGC
CACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGAAAAGTCCACCCAGACCGTGCAAGGTCCGCGCTCGGCCGCTGCG
GGCTCTTCTGCTGCATGTTCTGTCACGCCTTCGTGCACTGGCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCACCAT
GAACTTGCTGACGGGGGTGCCAACGGCATGCTCCAGTCGCCCCAGGTGGAACCCACCCTGCGCCGCAACC
AGGAGGCGCTCTACCGCTTCTCAACTCCCACTCCGCCTACTTTCGCTCCCACCGCGCGCATCGAGAAGGC
CACCGCCTTCGACCGCATGAACAATCAAGACATGTAAACCGTGTGTGTATGTTTAAATATCTTTTAATAAAC
AGCACTTTAATGTTACACATGCATCTGAGATGATTTTATTTAGAAATCGAAAGGGTTCGCCGGGTCTCGGC
ATGGCCCGCGGGCAGGGACACGTTGCGGAACTGGTACTTGGCCAGCCACTTGAATCGGGGATCAGCAGTT
TGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGCTTCCGCGTCAGCTGCAGGGCGCCAGCAGGTC
GGGCGCGGAGATCTTGAATCGCAGTTGGGACCCGCTTCTGCGCGCGAGAGTTGCGGTACACGGGGTTGC
AGCACTGGAACACCATCAGGGCCGGGTGCTTACGCTCGCCAGCACCGCCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGT
CGAGGTCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTGCAAGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACC
CGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGACGGGGGATCAGCATCATCTGGGCCTGGTCGGCGTTATCCCCGGG
TACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCTGGGCCTTGGCTCCCTCGGTGAAGAAGACC
CCGCAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCACAGCCGGCATCGTGACGCGAGCAGCGCGCGTCTGTTGTT
GGCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCAGCGTTCTGGGTGATCTTGGCCCGTTCGGGGTTCTCCTTCAGCGC

图27 (续)

GCGCTGCCCCGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCTCCTTCTGGATCATGGTGGTCCCCTGCAGG
CACCGCAGTTTGCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACAGCGCGCACCCGGTGCCTCCAGTTCTTGT
GGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAACCTTGAGGAAGCGGCCCATCATGGTCGTAGGGTCTTGTG
CTAGTGAAGGTCAACGGGATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATGTACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTC
GCCCTGCTCGGGCATCAGTTGGAAGTTGGCTTTCAGGTCGGTCTCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGT
CATGATTTCCATGCCCTTCTCCAGGCCGAGACGATGGGCGAGGCTCATAGGGTCTTACCATCATCTTAGCA
CTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCTCTCATCCAGGGTCTCAAAGCTCCGCTTGCCGTCTTCTCGGTGATC
CGCACCGGGGGTAGCTGAAGCCACGCGCCAGCTCCTCCTCGGCCTGTCTTCTGCTCCTCGCTGTCTGG
CTGACGTCCTGCATGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTCTTGGGCGGCAGTGGCGGCGGAGATGCT
TGTGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTACCACTACTATCTTCTTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGG
CGGTAGGTATGTCTCTTCGGGGGCGAGGGCGGAGGCGACGGGCTCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGC
TGGCAGAGCCCCCTTCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGCGGCGCTCTGACTGACTTCTCCGCGGCCGCCA
TTGTGTTCTCCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCATCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCACCG
CCGCGCAGCAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGCCCCGCCGCCAGCCCCGCTCCGACGCA
GCCGCGGTCCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGATTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGCGGA
GCATGAGGAGGAGCTGGCAGTGCCTTTCAATCGTCAAGCCAGGAAGATAAAGAACAGCCAGAGCAGGAA
GCAGAGAACGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGGCGACTACCTCCACCTGAGCGGGGAGGAGGACG
CGCTCATCAAGCATCTGGCCCGGCGAGGCCACCATCGTCAAGGACGCGCTGCTCGACCGCACCAGGTGCCCC
TCAGCGTGGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGCTCAACCTCTTCTCGCCGCGCGTGcCCCCAAGCGCCAGC
CCAACGGCACCTGCGAGCCCAACCCCCGCTCAACTTCTACCCGGTCTTCGCGGTGCCCGAGGCCCTGGCCA
CCTACCACATCTTTTtCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCCGCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTC
TTCAACCTGGGTCCCGGCGCCCGCTACCTGATATCGCCTCCTTGGAAGAGGTTCCAAGATCTTCGAGGGTC
TGGGCGAGCAGCAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGAGAAGGAGGAGGAGAGCATGAGCACCACA
GCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCGGTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCAT
TTCGCTACCCGGCTCTGAACCTGcCCCCGAAAGTCATGAGCGCGGTCTGAGCCAGGTGCTCATCAAGCGC
GCGTCGCCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGAGGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGC
AGCTGGCCCGGTGGCTGGGTCTTAATGCTACCCCTCAAAGTTTGGAAGAGCGGCGCAAGCTCATGATGGCC
GTGGTCTGGTGACCGTGGAGCTGGAGTGCCTGCGCCGCTTCTTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGT
CGAGGAGAACCTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCGTGCGCCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCT
GACCAACCTGGTCTCCTACATGGGCATCTTGACGAGAACCGCCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCT
GCGCGGGGAGGCCCCGCCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCTACCTCTACCTTGCCACACCTGGCAGACGGG
CATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTGAAAGAGCTCTGCAAGCTCCTGCAAAAGAACC
TCAAGGTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGGACCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATCTCCCCGAGC
GCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCGACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAACTTTCGCTCTTT
CATCCTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCCCACCTGCTCCGCGCTGCCCTCGGACTTCGTGCCGCTGACCTTC
CGCGAGTGCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCTGCGCCTGGCCAACTACCTGGCCTACCACTCG
GACGTGATCGAGGACGTGACGCGCGAGGGCCTGCTCGAGTGCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGCA
CCGCTCCCTGGCCTGCAACCCCCAGCTGCTGAGCGAGACCCAGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCC
CAGCGAGGGCGAGGGAGCCAAGGGGGGTCTGAAACTACCCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGC
AAGTTCGTGCCCCGAGGATTACCATCCCTTCGAGATCAGTTCTACGAGGACCAATCCCAGCCGCCAAGGCC
GAGCTGTGCGCCTGCGTCATCACCCAGGGGGCGATCCTGGCCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCCGCCAA
GAATTCCTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACCCCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTC
CCCCAGGATGCCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGAGCTGCCGCCGTGGAGGATTGGAGGAAGAC
TGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGATGGAGGAAGACTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAGGACAGC
CTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGAGGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCGCCAGA
CCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCAGGATAACCATCTCCGCTCCGGGTGGGGTCCCCTCG
GCCCCACAGTAGATGGGACGAGACCGGGCGATTCCCGAACCCCAACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGG
CAGGGATACAAGTCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCATCGTCTCCTGCTTGAGGCCTGCGGGGGCAACAT

图27 (续)

CTCCTTCACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACCGCGGGGTGAACCTCCCCGCAACATCTTGCACTACTACCGTC
ACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAGCAGCAGaAAAAGACCAGAAAACCAGCTAGAAA
ATCCACAGCGGCGGCAGCGGCAGGTGGACTGAGGATCGCGGCGAACGAGCCGGCGCAGACCCGGGAGCT
GAGGAACCGGATCTTTCCACCTCTATGCCATCTTCCAGCAGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAAGTAAAG
TCAAGAACCGTTCTCTGCGCTCGCTCACCCGAGTTGTCTGTATCACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCAC
TCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCGCTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCGCCCA
GTCGCAGAAAAAGGCGGGAATTACGTCACTGTGCCCTTGCCTTAGCCGCTCCACCCAGCACCGCCATGA
GCAAAGAGATTCCACGCTTACATGTGGAGCTACCAGCCCAGATGGGCCTGGCCGCCGGCGCCGCCAG
GACTACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGCGCGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCC
CACCGAAACCAGATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCGCCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATT
GGCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAATCCCCAGCCCACGACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCAGGCCG
AAGTCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCCAGCTGGCGGGCGGCGCCACCCTGTGTCTCACCGCCCCGCTCAGG
GTATAAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAGCTCAACGACGAGGTGGTGAGCTCTTCGCTGGGT
CTGCGACCTGACGGAGTCTTCAACTCGCCGGATCGGGGAGATCTTCTTCACGCCTCGTCAGGCGGTCTCTG
ACTTTGGAGAGTTCGTCTCGCAGCCCCGCTCGGGCGGCATCGGCACTCTCAGTTCGTGGAGGAGTTCCT
CCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCCCCGGCCACTACCCGGACGAGTTCATCCCGAACTTTGACGC
CATCAGCGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGATTAATTAATCAACTAACCCCTTACCCCTTACCCCTCCAGTAA
AAATAAAGATTAAAAATGATTGAATTGATCAATAAAGAATCACTTACTTGAATCTGAAACCAGGTCTCTGTC
CATGTTTTCTGTGAGCAGCACTTCACTCCCCTCTTCCAACTCTGGTACTGCAGGCCCCGGCGGGCTGCAAAC
TTCCTCCACACTCTGAAGGGGATGTCAAATTCCTCCTGTCCCTCAATCTTCATTTTTATCTTCTATCAGATGTCC
AAAAAGCGCGCGCGGGTGGATGATGGCTTCGACCCCGTGTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACTGT
GCCCTTCATCAACCCCTCCCTTCGTCTCTTCAAGATGGATTCCAAGAAAAGCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGA
CTGGCCGACCCCGTCACCACCAAGAATGGGGCTGTACCCTCAAGCTGGGGGAGGGGGTGGACCTCGACGA
CTCGGGAAACTCATCTCCAAAATGCCACCAAGGCCACTGCCCTCTCAGTATTTCAACGGCACCATTTC
CTTAACATGGCTGCCCTTTTTACAACAACATGGAACGTTAAGTCTCAATGTTTCTACACCATTAGCAGTATT
TCCCACTTTTAACACTTTAGGTATCAGTCTTGGAACGGTCTTCAAACCTCTAATAAGTTGCTGACTGTACAGT
TAACTCATCTCTTACATTAGCTCAAATAGCATCACAGTAAAAACAGACAAAGGACTCTATATTAATTCTAGT
GGAAACAGAGGGCTTGAGGCTAACATAAGCCTAAAAAGAGGACTGATTTTTGATGGTAATGCTATTGCAAC
ATACCTTGAAGTGGTTAGACTATGGATCCTATGATAGCGATGGGAAAAACAAGACCCATCATCACCAAAAT
TGGAGCAGGTTTGAATTTTATGCTAATAATGCCATGGCTGTGAAGCTAGGCACAGGTTTAAAGTTTGAAGTCT
GCCGGTGCCTTAACAGCTGGAAACAAAGAGGATGACAAGCTAACACTTTGGACTACACCTGACCCAAGCCCT
AATTGTCAATTACTTTAGACAGAGATGCCAAATTTACCCTATGTCTTACAAAATGCGGTAGTCAAATACTAG
GCACTGTTGAGTAGCTGCTGTTACTGTAGGTTGAGCACTAAATCCAATTAATGACACAGTAAAAAGCGCCAT
AGTATTCCTTAGATTTGACTCTGACGGTGTGCTCATGTCAAACCTCATCAATGGTAGGTGATTACTGGAACCTT
AGGGAAGGACAGACCACCAAAGTGTGGCCTATACAAATGCTGTGGGATTATGCCCCAATCTAGGTGCATAT
CCTAAAACCCAAAGCAAAACACCAAAAAATAGTATAGTAAGTCAGGTATATTTAAATGGAGAACTACTATG
CCAATGACACTGACAATAACTTTCAATGGCACTGATGAAAAAGACACAACACCTGTGAGCACTTACTCCATGA
CTTTTACATGGCAGTGGACTGGAGACTATAAGGACAAGAATATTACCTTTGCTACCAACTCCTTTACTTTCTCC
TACATGGCCCAAGAATAAACCCCTGCATGCCAACCCCATTTGTTCCCACTATGGAAAACCTCTGAAGCAGaAA
AAAATAAAGTTCAAGTGTGTTTATTGATTCAACAGTTTTTctacagaaccctagtattcaacctgccacctccctccaacacac
agagtacacagtcctttctcccgctggccttaaaaagcatcatatcatgggtaacagacatattcttaggtgttatattccacacggttctg
tcgagccaaacgctcatcagtgatattaataaactccccgggcagctcacttaagttcatgtcgctgtccagctgctgagccacaggtgctgtc
caacttgcggttgcttaacgggcggaaggagaagtcacgcctacatggggtagagtcataatcgtgcatcaggatagggcggtggtgct
gcagcagcgcggaataaactgctgccgccgctccgtcctgcaggaataacaacatggcagtggtctcctcagcagtgattcgaccgccc
gcagcataaggcgctgtcctccgggcacagcagcgacacctgatctcactaaatcagcacagtaactgcagcacagcaccacaatattgtt
caaaatcccacagtgcaaggcgctgtatcaaagctcatggcggggaccacagaacccacgtggccatcataccacaagcgaggttagatta
agtggcgacctcataaacagctggacataaacattacctcttttgcatgttgtaattcaccacctccgggtaccatataaacctctgattaa
acatggcgccatccaccacctcctaaaccagctggccaaaacctgcccgcggctatactgcaggaacccgggactggaacaatgacag

图27 (续)

tggagagcccaggactcgtaacatggatcatcatgctcgtcatgatataaatgttgacacacaggcacacgtgcatacacttctcagga
ttacaagctcctcccggttagaaccatatcccagggaacaacccattcctgaatcagcgtaaatcccacactgcagggaagacctgcacgt
aactcacgttgtgattgtcaaagtgttacattcgggcagcagcgatgatcctccagtatggttagcgcgggtttctgtctcaaaaggaggtag
acgatccctactgtacggagtgcgccgagacaaccgagatcgtgttggtcgtagtgtcatgccaaatggaacgccggacgtagtcatatttct
gaagcaaaaccagggtgcgggctgacaaacagatctgcgtctcgggtctcgccgcttagatcgtctgtgtagtagttgtagtatatccactctc
tcaaagcatccaggcgccccctggcttcgggttctatgtaaactccttcatgcgccgtgcccgtgataacatccaccaccgcagaataagccac
accagccaacctacacattcgttctgcgagtcacacacgggaggagcggaagagctggaagaacctGATTAACCTTTATTCCAAA
CGGTCTCGGAGCACTTCAAATGCAGGTCCCGGAGGTGGCACCTCTCGCCCCACTGTGTTGGTGGAAAATA
ACAGCCAGGTCAAAGGTGACACGTTCTCGAGATGTTCCACGGTGGCTTCCAGCAAAGCCTCCACGCGCACA
TCCAGAAACAAGAGGACAGCGAAAGCGGGAGCGTTTTCTAATTCCTCAATCATATTACACTCCTGCACCA
TCCCCAGATAATTTTCATTTTCCAGCCTTGAATGATTCGTATTAGTTCCTGAGGTAAATCCAAGCCAGCCATG
ATAAAAAGCTCGCGCAGAGCGCCCTCCACCGGCATTCTTAAGCACACCCTCATAATTCGAAGAGATTCTGCTC
CTGGTTCACCTGCAGCAGATTAACAATGGGAATATCAAATCTCTGCCGCGATCCCTAAGCTCCTCCCTCAAC
AATAACTGTATGTAATCTTTCATATCATCTCCGAAATTTTAGCCATAGGGCCGCCAGGAATAAGAGCAGGGC
AAGCCACATTACAGATAAAGCGAAGTCCTCCCCAGTGWGCATTGCCAATGTAAGATTGAAATAAGCATGC
TGGCTAGACCCTGTGATATCTTCCAGATAACTGGACAGAAAATCAGGCAAGCAATTTTAAAGAAAATCAACA
AAAGAAAAGTCGTCCAGGTGCAGGTTTAGAGCCTCAGGAACAACGATGGAATAAGTGCAAGGAGTGCGTTC
CAGCATGGTTAGTGtTTTTTGGTGATCTGTAGAACAAAAAATAAACATGCAATATTAAACCATGCTAGCCTG
GCGAACAGGTGGGTAAATCACTCTTTCAGCACCAGGCAGGCTACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAGA
AGCTGTCGCCATGATTGAAAAGCATCACCGAGAGACCTTCCCGGTGGCCGCGCATGGATGATTGAGAAGAA
GCATACACTCCGGGAACATTGGCATCCGTGAGTGAAAAAaGCGACCTATAAAGCCTCGGGGCACTACAATG
CTCAATCTCAATTCCAGCAAAGCCACCCCATGCGGATGGAGCACAAAATTGGCAGGTGCGTAAAAAATGTAA
TACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGCTCCCTCCAGAAACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAG
CTTACCGAGCACGGCAGGCGCAAGAGTCAGAGAAAAGGCTGAGCTCTAACCTGACTGCCCCGCTCCTGTGCTC
AATATATAGCCCTAACCTACACTGACGTAAAGGCCAAAGTCTAAAAATACCCGCCAAAATGACACACACGCC
CAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAAAATACGTGCGCTTCTCAAACGCCCAAACCGGCGTC
ATTCCGGGTTCCACGCTACGTACCGCTCAGCGACTTTCAAATTCCGTGACCGTTAAAAACGTCACTCGC
CCGCCCCCTAACGGTCGCCCTTCTCTCGGCCAATCACCTTCTCCCTTCCCAAATTCAAACGCCTCATTTGCATA
TTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATATTTGAATGATGGTTTAAACGCGGCCGCCAGGCCTACCCACTA
GTCAATTCGGGAGGATCGAAACGGCAGATCGCAAAAAACAGTACATACAGAAGGAGACATGAACATGAAC
ATCAAAAAAATTGTAAACAAGCCACAGTTCTGACTTTTACGACTGCACTTCTGGCAGGAGGAGCGACTCAA
GCCTTCGCGAAAGAAAATAACCAAAAAGCATACAAAGAAACGTACGGCGTCTCTCATATTACACGCCATGAT
ATGCTGCAGATCCCTAAACAGCAGCAAAACGAAAAATACCAAGTGCCTCAATTCGATCAATCAACGATTaAA
AATAATTGAGTCTGACAAAAGGACTTGATGTG

图27 (续)

ChAdOx1-TPA-E2D123序列的描述:

ChAdOx1-TPA-E2D123布局:



图28

在TPA-E2D123免疫原盒的5'的ChAdOx1序列

CCACCGCCTCGGACCTGGCCGACCTCATCTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCCC
ACTTTATGAGCCAAAGCATGTTGCAAAAACCTTCGGTAAAAAATGTAATTACTCCCTCCTGCACAGGCAGCAA
AGCCCCCGCTCCCTCCAGAAACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCACGGCAGGCGCAAGA
GTCAGAGAAAAGGCTGAGCTCTAACCTGACTGCCCGCTCCTGTGCTCAATATATaAGCCCTAACCTACACTGA
CGTaAAAgGGcCCaAAAGTCTaaAAAAATAACCCGcCCAAAATGACACACACGcCCAGCACACGCCCAGAAAC
CGGTGACACACTCaAAAAAATACGTGCGTTCCTCAAACGCCCAAACCGGCGTCATTTCCGGGTTCCACGCT
ACGTCACCGCTCAGCGACTTTCAAATTCGTCGACCGTTAAAAACGTCACTCGCCCCGCCCTAACGGTCGCC
CTTCTCTCGGCCAATCACCTTCTCCTTCCCAAATTCAAACGCCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGT
TTGAGGTATATATTGAATGATGGTTTAAACGCGGCCGCCAGGCCTACCCACTAGTCAATTCGGGAGGATCG
AAACGGCAGATCGAAAAAACAGTACATACAGAAGGAGACATGAACATGAACATCAAAAAAATTGTAAAC
AAGCCACAGTTCTGACTTTTACGACTGCACTTCTGGCAGGAGGAGCGACTCAAGCCTTCGCGAAAGAAAATA
ACCAAAAAGCATACAAAGAAACGTACGGCGTCTCTCATATTACACGCCATGATATGCTGCAGATCCCTAAAC
AGCAGCAAAACGaAAAAATACCAAGTGCCTCAATTCGATCAATCAACGATTAATAAATATTGAGTCTGCAAAAG
GACTTGATGTGTGGGACAGCTGGCCGCTGCAAAACGCTGACGGAACAGTAGCTGAATACAACGGCTATCAC
GTTGTGTTTGCTCTTGCGGGAAGCCCGAAAGACGCTGATGACACATCAATCTACATGTTTTATCAAAAGGTCTG
GCGACAACCTCAATCGACAGCTGGAAAAACGCGGGCCGTGTCTTTAAAGACAGCGATAAGTTCGACGCCAAC
GATCCGATCCTGAAAGATCAGACGCAAGAATGGTCCGGTTCTGCAACCTTTACATCTGACGGAAAAATCCGT
TTATTCTACACTGACTATTCCGGTAAACATTACGGCAAACAAAGCCTGACAACAGCGCAGGTAAATGTGTCA
AAATCTGATGACACACTCAAATCAACGGAGTGGAAGATCACAAAACGATTTTTGACGGAGACGGAAAAAC
ATATCAGAACGTTTCAGCAGTTTATCGATGAAGGCAATTATACATCCGGCGACAACCATACGCTGAGAGACCC
TCACTACGTTGAAGACAAAGGCCATAAATACCTTGATTTCGAAGCCAACACGGGAACAGAAAACGGATACCA
AGGCGAAGAATCTTTATTTAAACAAGCGTACTACGGCGGGCGCACGAACCTTCTCCGTAAAGAAAGCCAGAA
GCTTCAGCAGAGCGCTAAAAAACGCGATGCTGAGTTAGCGAACGGCGCCCTCGGTATCATAGAGTTAAATA
ATGATTACACATTGAAAAAAGTAATGAAGCCGCTGATCACTTCAAACACGGTAACCTGATGAAATCGAGCGCG
CGAATGTTTTCAAATGAACGGCAAATGGTACTTGTTCACTGATTCACGCGGTTCAAAAATGACGATCGATG
GTATTAACCTAAACGATATTTACATGCTTGGTTATGTATCAAACCTTTAACC GGCCCTTACAAGCCGCTGAAC
AAAACAGGGCTTGCTGCTGCAAATGGGTCTTGATCCAAACGATGTGACATTCACTTACTCTCACTTCGCAGTGC
CGCAAGCCAAAGGCAACAATGTGGTTATCACAAGCTACATGACAAACAGAGGCTTCTTCGAGGATAAAAAAG
GCAACATTTGCGCCAAGCTTCTTAATGAACATCAAAGGCAATAAAACATCCGTTGTCAAAAACAGCATCCTGG
AGCAAGGACAGCTGACAGTCAACTAATAACAGCAAAAAGaAAATGCCGATACTTCATTGGCATTCTTCTtTAT
TTCTCAACAAGATGGTGAATTGACTAGTGGGTAGATCCACAGGACGGGTGTGGTGCCTATGATCGCGTAGTC
GATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCGGTGCGACAGTGCTCCGAGA
ACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAGCGCTAGCAGCACGCCATAGTACTGGCGATGCTGTC
GGAATGGACGATATCCCGCAAGAGGCCCGGCGAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGG
TGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTATACACGGTGCTGACTGCGTTAGCAATTTA
ACTGTGATAAACTACCGCATTAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTGATCCGGAACCCCTTA
ATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGTCCCTCGACTATAGGGTCAACGTCGACAGCGAC
ACACTTGCATCGGATGCAGCCCGGTTAACGTGCCGGCACGGCCTGGGTAACCAGGTATTTTGTCCACATAAC
CGTGCGCAAAATGTTGTGGATAAGCAGGACACAGCAGCAATCCACAGCAGGCATACAACCGCACACCGAGG
TTACTCCGTTCTACAGGTTACGACGACATGTCAATACTTGCCCTTGACAGGCATTGATGGAATCGTAGTCTCA
CGCTGATAGTCTGATCGACAATACAAGTGGGACCGTGGTCCCAGACCGATAATCAGACCGACRAYACGAGT
GGGAYCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAG
ACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTYCCAGWCTRATWATCAGACCGACGATACRAGTGGRACMGTTGGKC
CCAGASAKAATAWTCAGRCCgAGWTAYGcWKTCKGGCCTGTAACAAAGGACATTAAGTAAAGACAGATAM
RMGTgRGACtaaaaCGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTA
ATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAATAATCAGACCGACGATACGAGTGGGAC
CGTGGTCCCAGTCTGATTATCAGACCGACGATACAAGTGGAACAGTGGGCCAGAGAGAATATTCAGGCCA

图29

GTTATGCTTTCTGGCCTGTAACAAAGGACATTAAGTAAAGACAGATAAACGTAGACTAAAACGTGGTCGCAT
CAGGGTGCTGGCTTTTCAAGTTCCTTAAGAATGGCCTCAATTTTCTCTATACACTCAGTTGGAACACGAGACC
TGTCCAGGTAAAGCACCATTTTATCGCCCTTATAACAATACTGTCGCTCCAGGAGCAAACCTGATGTCGTGAGCT
TAAACTAGTTCTTGATGCAGATGACGTTTTAAGCACAGAAGTTAAAAGAGTGATAACTTCTTCAGCTTCAAAT
ATCACCCCAGCTTTTTTCTGCTCATGAAGGTTAGATGCCTGCTGCTTAAGTAATTCCTCTTTATCTGTAAAGGC
TTTTTGAAGTGCATCACCTGACCGGGCAGATAGTTCACCGGGGTGAGAAAAAAGAGCAACAACCTGATTTAG
GCAATTTGGCGGTGTTGATACAGCGGGTAATAATCTTACGTGAAATATTTTCCGCATCAGCCAGCGCAGAAA
TATTTCCAGCAAATTCATTCTGCAATCGGCTTGCAACGCTGACCACGTTTATAAGCACTTGTTGGGCGATA
ATCGTTACCCAATCTGGATAATGCAGCCATCTGCTCATCATCCAGCTCGCCAACCAGAACACGATAATCACTT
TCGGTAAGTGCAGCAGCTTTACGACGGCGACTCCCATCGGCAATTTCTATGACACCAGATACTCTTCGACCGA
ACGCCGGTGTCTGTTGACCACTCAGTAGAAAAGAAGGGATGAGATCATCCAGTGCGTCTCAGTAAGCAGC
TCCTGGTCACGTTTATTACCTGACCATAACCGAGAGGTCTTCTCAACACTATCACCCGGAGCACTTCAAGAG
TAAACTTCACATCCCGACCACATACAGGCAAAGTAATGGCATTACCGCGAGCCATTACTCCTACGCGCGCAAT
TAACGAATCCACCATCGGGGCAGCTGGTGTGATAACGAAGTATCTTCAACCGGTTGAGTATTGAGCGTATG
TTTTGGAATAACAGGCGCACGCTTATTATCTAATCTCCAGCGTGGTTAATCAGACGATCGAAAATTTTATT
GCAGACAGGTTCCCAAATAGAAAAGAGCATTTCTCCAGGCACCAGTTGAAGAGCGTTGATCAATGGCCTGTTT
AAAAACAGTTCTCATCCGGATCTGACCTTTACCAACTTCATCCGTTTACGTACAACATTTTTTAGAACCATGC
TTCCCAGGCATCCCGAATTTGCTCCTCCATCCACGGGGACTGAGAGCCATTACTATTGCTGTATTTGGTAAG
CAAAATACGTACATCAGGCTCGAACCTTTAAGATCAACGTTCTTGAGCAGATCACGAAGCATATCGAAAAA
CTGCAGTGCGGAGGTGTAGTCAAACAACCTCAGCAGGCGTGGGAACAATCAGCACATCAGCAGCACATACGA
CATTAACTCGTGCCGATACCCAGGTTAGGCGCGCTGTCAATAACTATGACATCATAGTCATGAGCAACAGTTTC
AATGGCCAGTCGGAGCATCAGGTGTGGATCGGTGGGCGAGTTTACCTTCATCAAATTTGCCATTAACCTCAGTT
TCAATACGGTGCAGAGCCAGACAGGAAGGAATAATGTCAAGCCCCGGCCAGCAAGTGGGCTTTATTGCATA
AGTGACATCGTCTTTTCCCAAGATAGAAAGGCAGGAGAGTGTCTTCTGCATGAATATGAAGATCTGGTAC
CCATCCGTGATACATTGAGGCTGTTCCCTGGGGGTGTTACCTTCCACGAGCAAAACACGTAGCCCCCTTCAGA
GCCAGATCCTGAGCAAGATGAACAGAACTGAGGTTTTGTAAACGCCACCTTTATGGGCAGCAACCCCGATC
ACCGGTGGAAATACGTCTTCAGCACGTCGCAATCGCGTACCAAACACATCACGCATATGATTAATTTGTTCAA
TTGTATAACCAACACGTTGCTCAACCCGTCTCGAATTTCCATATCCGGGTGCGGTAGTCGCCCTGCTTTCTCG
GCATCTCTGATAGCCTGAGAAGAAACCCCAACTAAATCCGCTGCTTCACCTATTCTCCAGCGCCGGGTTATTT
TCCTCGCTTCCGGGCTGTATCATTAACTGTGCAATGGCGATAGCCTTCGTCATTTTCATGACCAGCGTTTATG
CACTGGTTAAGTGTTCATGAGTTTCACTTGAACATCCTTAATCATTGCTTTGCGTTTTTTTATTAAATCTT
GCAATTTACTGCAAAGCAACAACAAAATCGCAAAGTCATCAAAAAACCGCAAAGTTGTTTAAAATAAGAGCA
ACACTACAAAAGGAGATAAGAAGAGCACATACCTCAGTCACCTTATTATCACTAGCGCTCGCCGAGCCGTGT
AACCGAGCATAGCGAGCGAACTGGCGAGGAAGCAAAGAAGAACTGTTCTGTGATAGCTCTTACGCTCAG
CGCAAGAAGAAATATCCACCGTGGGAAAACTCCAGGTAGAGGTACACACGCGGATAGCCAATTCAGAGTA
ATAAACTGTGATAATCAACCTCATCAATGATGACGAACTAACCCCGATATCAGGTACATGACGAAGGGA
AAGAGAAGGAAATCAACTGTGACAACTGCCCTCAAATTTGGCTTCCTTAAAAATTACAGTTCAAAAAGTAT
GAGAAAATCCATGCAGGCTGAAGGAAACAGCAAACTGTGACAAATTACCCTCAGTAGGTGAGAACAATG
TGACGAACCACCTCAAATCTGTGACAGATAACCTCAGACTATCCTGTCGTATGGAAGTGATATCGCGGA
AGGAAAATACGATATGAGTCGTCTGGCGGCCTTTCTTTTCTCAATGTATGAGAGGCGCATTGGAGTTCTGCT
GTTGATCTCATTAAACACAGACCTGCAGGAAGCGGCGGCGGAAGTCAGGCATACGCTGGTAACTTTGAGGCA
GCTGGTAACGCTCTATGATCCAGTCGATTTTCAGAGAGACGATGCCTGAGCCATCCGGCTTACGATACTGAC
ACAGGGATTTCGTATAAACGCATGGCATAACGATTGGTGATTTCTTTGTTTCACTAAGCCGAACTGCGTAAA
CCGGTTCTGTAACCCGATAAAGAAGGGAATGAGATATGGGTTGATATGTACACTGTAAAGCCCTCTGGATGG
ACTGTGCGCACGTTTGATAAACCAAGGAAAAGATTATAGCCTTTTTATCGCCGGCATCCTCTTCAGGGCGA
TaAAAAACCACTTCCTTCCCCGCGAACTCTTCAATGCCTGCCGTATATCCTTACTGGCTTCCGCAGAGGTCAA
TCCGAATATTTAGCATATTTAGCAACATGGATCTCGCAGATACCGTCATGTTCTGTAGGGTGCCATCAGAT
TTTCTGATCTGGTCAACGAACAGATACAGCATACGTTTTTGATCCCGGAGAGACTATATGCCGCCTCAGTGA

图29 (续)

GGTCGTTTGACTGGACGATTTCGCGGGCTATTTTACGTTTCTTGATTGATAACCGCTGTTCCGCCATGAC
AGATCCATGTGAAGTGTGACAAGTTTTAGATTGTCACACTAAATAAAAAAGAGTCAATAAGCAGGGATAAC
TTTGTGAAAAACAGCTTCTTCTGAGGGCAATTTGTCACAGGGTTAAGGGCAATTTGTCACAGACAGGACTG
TCATTTGAGGGTGATTTGTCACACTGAAAGGGCAATTTGTCACAACACCTTCTCTAGAACCAGCATGGATAAA
GGCCTACAAGGCGCTCTAAAAAGAAGATCTAAAACTATaAAAAAATAATTATAAAAAATATCCCCGTGGA
TAAGTGATAACCCCAAGGGAAGTTTTtCAGGCATCGTGTGTAAGCAGAATATATAAGTGCTGTTCCCTGGT
GCTTCCTCGCTCACTCGAGGGCTTCGCCCTGTCGCTCAACTGCGGCGAGCACTACTGGCTGTAAAAGGACAG
ACCACATCATGGTTCTGTGTTTATTAGGTTGTTCTGTCCATTGCTGACATAATCCGCTCCACTTCAACGTAACA
CCGCACGAAGATTTCTATTGTTCTGAAGGCATATTCAAATCGTTTTCGTTACCGCTTGCAAGGCATCATGACA
GAACACTACTTCTATAAACGCTACACAGGCTCCTGAGATTAATAATGCGGATCTCTACGATAATGGGAGATT
TTCCCGACTGTTTCGTTGCTTCTCAGTGGATAACAGCCAGCTTCTCTGTTAACAGACAAAAACAGCATATCC
ACTCAGTTCCACATTTCCATATAAAGGCCAAGGCATTTATTCTCAGGATAATTGTTTCAGCATCGCAACCGCAT
CAGACTCCGGCATCGAACTGCACCCGGTGCCGGGCAGCCACATCCAGCGCAAAAACCTTCGTGTAGACTT
CCGTTGAACTGATGGACTTATGTCCCATCAGGCTTTCGAGAATTTTCAGCGGTATACCGGCATACAGCATGTG
CATCGCATAGGAATGGCGGAACGTATGTGGTGTGACCGGAACAGAGAACGTCACACCGTCAGCAGCAGCG
GCGGCAACCGCTCCCAATCCAGGTCCTGACCGTTCTGTCCGTCACCTCCAGATCCGCGCTTCTCTGTCT
TCCTGTGCGACGGTTACGCCGCTCCATGAGCTTATCGGAATAAATACCTGTGACGGAAGATCACTTCGCAG
AATAAATAAATCCTGGTGTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAACTTTTGCGGAAAATGAGACGTTG
ATCGGCACGTAAGAGGTTCCAATTTACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTGAGTTATC
GAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCA
ATGGCATCGTAAAGAACATTTGAGGCATTTCACTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTG
GATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGC
CCGCTGATGAATGCTCATCCGGAGTTCGATGGAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTG
TTCACCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAAACGTTTTATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGAT
TTCCGGCAGTTTCTACACATATATTGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAG
GGTTTATTGAGAATATGTTTTCTGCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCC
AATATGGACAACCTCTCGCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGC
CGCTGGCGATTCAAGTTCATGCGCTTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACA
GTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAAtTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTTG
CTACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATTCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATT
GGTCGACGGCGCGCCAAAGCTTGCATGCCTGCAGCCGCTAACCTGGCAAAATCGGTTACGGTTGAGTAAT
AAATGGATGCCCTGCGTAAGCGGGGCACATTTATTACCTCTTCTCCGCACCCGACATAGATAATAACTTCG
TATAGTATACATTATACGAAGTTATCTAGTAGACTTAATCGCGTTTAAACCCATCATCAATAATATACCTCAA
CTTTTTGTGCGCGTTAATATGCAAATGAGGCGTTTGAATTTGGGAAGGGAGGAAGGTGATTGGCCGAGAGA
AGGGCGACCGTTAGGGGCGGGGCGAGTGACGTTTTGATGACGTGACCGCGAGGAGGAGCCAGTTTGCAAG
TTCTCGTGGGAAAAGTGACGTCAAACGAGGTGTGGTTGAACACGGAAATACTCAATTTCCCGCGCTCTCT
GACAGGAAATGAGGTGTTTCTAGGCGGATGCAAGTGAAAACGGGCCATTTTCGCGCGAAAATGAATGAGG
AAGTGAAAATCTGAGTAATTCGCGTTTATGACAGGGAGGAGTATTGCCGAGGGCCGAGTAGACTTTGACC
GATTACGTGGGGGTTTCGATTACCGTGTTTTTACCTAAATTTCCGCGTACGGTGTCAAAGTCCGGTGTTTTT
ACGTAGGTGTCAGTGATCGCCAGGGTATTTAAACCTGCGCTCTCCAGTCAAGAGGCCACTCTTGAGTGCCA
GCGAGAAGAGTTTTCTCCTCCGCGCGCGAGTCAGATCTACACTTTGAAAGGCGATCGCTAGCGACATCGATC
ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCACCATGGGAACCAATTCaGTCGAG

图29 (续)

TPA-E2D123免疫原盒布局:



图30

TPA-E2D123免疫原盒序列:**具有Tet操作子序列的CMV启动子:**

```
CCTTTCACTCATTAGATGCATGTCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC
GCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAG
GGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACAT
CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCT
GGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA
GTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGT
TTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGAAAC
CAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCG
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCT
CCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGA
CGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGT
```

额外的序列:

TAAGCTTGGTACC

Kozak序列:

CCCGCCGCCACC

TPA序列:

```
ATGGACGCTATGAAGCGAGGACTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGTGTGGCGCTGTGTTTGTGT
CCCCTAGCCAAGAGATCCACGCCAGATTCAGAAGA
```

TPA氨基酸序列:

MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPSQEIHFRR

E2D123序列:

```
GAGACACACCAGAACATCCAGCTGATCAACACCAACGGCAGCTGGCACATCAACAGCACAG
CCCTGAACTGCAACGAGAGCCTGAATACCGGATGGCTGGCCGGCCTGTTCTACCAGCACAA
GTTCAATAGCAGCGGCTGCCCCGAGAGACTGGCCAGCTGTGGATCTTCTGGCTGCTGGCAC
TACCCTCCAAGACCTTGTGGAATCGTGCCCGCCAAGTCTGTGTGTGGCCCCGTGTACTGCTT
CACCCCATCTCCAGTGGTCGTGGGCACCAACGATAGATCTGGCGCCCCAACATATAGCTGG
GGAGCCAACGACACCGACGTGTTCTGTGCTGAACAATACCAGACCTCCTCTCGGCAATTGGT
TCGGCTGCACCTGGATGAACAGCACCGGCTTCACAAAAGTGTGCGGAGCCCCTCCATGTGG
CAGCTCTGGATGTCCTACCGACTGCTTCAGAAAGCACCCCGAGGCCACCTACAGCAGATGT
```

图31

GGATCTGGCCCTTGGATCACCCCTCGGTGCATGGTGGACTACCCCTACAGACTGTGGCACT
ATCCCTGCACCATCAACTACACCATCTTCAAAGTGCGGATGTACGTCGGCGGCGTGGAACA
CAGACTGGAAGCCGCCTGTAATTGGACCAGAGGCGAGAGATGCGACCTCGAGGACAGAGA
CAGATCCGAATGA

E2D123氨基酸序列:

ETHQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKNSSGCPERLASGSSGCWHYP
PRPCGIVPAKSVCGPVYCFTPSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLGNWFGC
TWMNSTGFTKVCGAPPCGSSGCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCT
INYTIFKVRMYVGGVEHRLEAACNWSTRGERCDLED RDRSE

额外的序列:

Gcggccgctcgagcatgcatctagagggccctattctatagtgacacctaataatgctagagctcgctgatcagcctcga

BGH polyA序列:

ctgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctccccgtgccttccttgaccctggaagggtgccactcccactg
tcctttcctaataaaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtggggca
ggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatgg

图31 (续)

在TPA-E2D123免疫原盒的5'的ChAdOx1序列:

cttctgaggcgaaagaaccagctggggctcgaggggggatcgatccgtcGAGATATCTAGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGT
GGTGATCGATTTCGACAGATCGCGATCGCAGTGAGTAGTGTCTGGGGCGGGGGAGGACCTGCATGAGGGC
CAGAATGACTGAAATCTGTGCTTTTCTGTGTGTTGCAGCATCATGAGCGGAAGCGGCTCCTTTGAGGGAGGG
GTATTACGCCCTTATCTGACGGGGCGTCTCCCTCCTGGGCGGGAGTGCCTCAGAATGTGATGGGATCCACG
GTGGACGGCCGGCCCGTGCAGCCCGCGAACTCTTCAACCCTGACCTATGCAACCCTGAGCTCTTCGTCGGTG
GACGCAGCTGCCGCCGAGCTGCTGCATCCGCCGCGAGCGCCGTGCGCGGAATGGCCATGGGCGCCGGCTA
CTACGGCACTCTGGTGGCCAACTCGAGTTCACCAATAATCCCGCCAGCCTGAACGAGGAGAAGCTGCTGCT
GCTGATGGCCAGCTTGAGGCCTTGACCCAGCGCCTGGGCGAGCTGACCCAGCAGGTGGCTCAGCTGCAGG
AGCAGACGCGGGCCGCGGTTGCCACGGTGAAATCCAAATAAAAAATGAATCAATAAATAAACGGAGACGGT
TGTTGATTTTAACACAGAGTCTGAATCTTTATTTGATTTTTCGCGCGCGGTAGGCCCTGGACCACCGGTCTCG
ATCATTGAGCACCCGGTGGATCTTTCCAGGACCCGGTAGAGGTGGGCTTGGATGTTGAGGTACATGGGCA
TGAGCCCGTCCCGGGGGTGGAGGTAGCTCCATTGCAGGGCCTCGTGCTCGGGGGTGGTGTGTAAATCACC
CAGTCATAGCAGGGGCGCAGGGCGTGGTGTGCACAATATCTTTGAGGAGGAGACTGATGGCCACGGGCA
GCCCTTTGGTGTAGGTGTTTACAAATCTGTTGAGCTGGGAGGGATGCATGCGGGGGGAGATGAGGTGCATC
TTGGCCTGGATCTTGAGATTGGCGATGTTACCGCCAGATCCCGCCTGGGGTTCATGTTGTGCAGGACCACC
AGCACGGTGTATCCGGTGCACCTGGGGAATTTATCATGCAACTTGGAAGGGAAGGCGTGAAAGAATTTGGC
GACGCCCTTGTCGCCCGAGTTTTCCATGCACTCATCCATGATGATGGCAATGGGCCCGTGGGCGGCGGC
CTGGGCAAAGACGTTTCGGGGTTCGGACACATCATAGTTGTGGTCTGGGTGAGGTATCATAGGCCATTTT
AATGAATTTGGGGCGGAGGGTGCCGGACTGGGGGACAAAGGTACCCTCGATCCCGGGGGCGTAGTTCCTCC
CACAGATCTGCATCTCCAGGCTTTGAGCTCAGAGGGGGGGATCATGTCCACCTGCGGGGCGATAAAGAAC
ACGGTTTCGGGGCGGGGGAGATGAGCTGGGCCGAAAGCAAGTTCGGGAGCAGCTGGGACTTGCCGCAGC
CGGTGGGGCCGTAAATGACCCGATGACCGGCTGCAGGTGGTAGTTGAGGGAGAGACAGCTGCCGTCTCC
CGGAGGAGGGGGGCCACCTCGTTCATCATCTCGCGCACGTGCATGTTCTCGCGCACCACTTCGCCAGGAG
GCGCTCTCCCCCAGAGATAGGAGCTCCTGGAGCGAGGCGAAGTTTTTCAGCGGCTTGAGTCCGTGCGCCAT
GGGCATTTTGAGAGGGTCTGTTGCAAGAGTTCAAGCGGTCCAGAGCTCGGTGATGTGCTCTACGGCAT
CTCGATCCAGCAGACCTCCTCGTTTCGCGGGTGGGACGACTGCGGGAGTAGGGCACCAAGACGATGGGCGT
CCAGCGCAGCCAGGGTCCGGTCTTCCAGGGCCGAGCGTCCGCGTCAGGGTGGTCTCCGTACGGTGAAG
GGGTGCGCGCCGGGCTGGGCGCTTGCGAGGGTGCCTTCAGGCTCATCCGGCTGGTCGAAAACCGTCCCG
ATCGGCGCCCTGCGCGTCGGCCAGGTAGCAATTGACCATGAGTTCGTAGTTGAGCGCCTCGGCCGCGTGGC
CTTTGGCGCGGAGCTTACCTTTGGAAGTCTGCCCCGAGGCGGGACAGAGGAGGGACTTGAGGGCGTAGAG
CTTGGGGGCGAGGAAGACGGAATCGGGGGCGTAGGCGTCCGCGCCGAGTGGGCGCAGACGGTCTCGCAC
TCCACGAGCCAGGTGAGGTGCGGCTGGTGGGGTCAAAAACAGTTTCCCGCCGTTCTTTTATGCGTTTT
TTACCTTTGGTCTCCATGAGCTCGTGTCCTCGGCTGGGTGACAAAGAGGCTGTCCGTGTCCCGTAGACCGACT
TTATGGGCGGTCTCTGAGCGGTGTGCCGCGTCTCCTCGTAGAGGAACCCCGCCCACTCCGAGACGAAA
GCCCGGGTCCAGGCCAGCACGAAGGAGGCCACGTGGGACGGGTAGCGGTGCTTGTCCACCAGCGGGTCCA
CTTTTCCAGGGTATGCAACACATGTCCCCCTCGTCCACATCCAGGAAGGTGATTGGCTGTAAAGTGTAGGC
CACGTGACCGGGGGTCCCGGCCGGGGGGGTATAAAGGGGGCGGGCCCTGCTCGTCTCACTGTCTTCCG
GATCGCTGTCCAGGAGCGCCAGCTGTTGGGGTAGGTATTCCTCTCGAAGGCGGGCATGACCTCGGCACTCA
GGTTGTGAGTTTCTAGAAACGAGGAGGATTTGATATTGACGGTGCCAGCGGAGATGCCTTTCAAGAGCCCT
CGTCCATCTGGTCAGAAAAGACGATTTTTTTGTTGTGAGCTTGGTGGCGAAGGAGCCGTAGAGGGCGTTGG
AAAGGAGCTTGGCGATGGAGCGCATGGTCTGGTTTTTtCCTtGTCGGCGCGCTCCTTGCCGCGATGTTGAG
CTGCACGTACTCGCGCGCCACGCACTTCCATTGGGGAAAGACGGTGGTCATCTCGTCGGGCACGATTCTGAC
CTGCCAACCTCGATTATGCAGGGTGATGAGGTCCACACTGGTGGCCACCTCGCCGCGCAGGGGGCTCGTTGGT
CCAGCAGAGGCGGGCCGCCCTTGCGCGAGCAGAAGGGGGGCGAGGGTCCAGCATGACCTCGTCGGGGGG
GTCGGCATCGATGGTGAAGATGCCGGGCGAGAGATCGGGGTCAAGTAGCTGATGGAAGTGCCAGATCG
TCCAGGGAAGCTTGCCATTCGCGCACGGCCAGCGCGCTCGTAGGGACTGAGGGGCGTGCCCCAGGGCAT

图32

GGGGTGGGTGAGCGGGAGGCGTACATGCCGAGATGTCGTAGACGTAGAGGGGCTCCTCGAGGATGCCG
ATGTAGGTGGGGTAGCAGCGCCCCCGGGATGCTGGCGCGCACGTAGTCATACAGCTCGTGCGAGGGCGC
GAGGAGCCCCGGGCCAGGTTGGTGCGACTGGGCTTTTCGGCGCGGTAGACGATCTGGCGAAAGATGGCA
TGCGAGTTGGAGGAGATGGTGGGCCTTTGGAAGATGTTGAAGTGGGCGTGGGGGAGGCCGACCGAGTCGC
GGATGAAGTGGGCGTAGGAGTCTTGACGTTTGGCGACGAGCTCGGCGGTGACGAGGACGTCCAGAGCGCA
GTAGTCGAGGGTCTCCTGGATGATGTCATACTTGAGCTGGCCCTTTGTTTCCACAGCTCGCGGTTGAGAAG
GAACTCTTCGCGGTCTTCCAGTACTCTTCGAGGGGGAACCCGTCCTGATCTGCACGGTAAGAGCCTAGCAT
GTAGAACTGGTTGACGGCCTTGAGGCGCAGCAGCCCTTCCACGGGGAGGGCGTAGGCCTGGGCGGCCT
TGCGCAGGGAGGTGTGCGTGAGGGCGAAGGTGTCCCTGACCATGACCTTGAGGAACTGGTGCTTGAATCG
ATATCGTCGCAGcCCCCCTGCTCCAGAGCTGGAAGTCCGTGCGCTTCTTGAGGCGGGGTTGGGCAAAGCG
AAAGTAACATCGTTGAAAAGGATCTTGCCCGCGCGGGGCATAAAGTTGCGAGTGATGCGGAAAGGCTGGG
GCACCTCGGCCCCGTTGTTGATGACCTGGGCGGCGAGCACGATCTCGTCGAAACCGTTGATGTTGTGGCCCA
CGATGTAGAGTTCCACGAATCGCGGGCGGCCCTTGACGTGGGGCAGCTTCTTGAGCTCCTCGTAGGTGAGCT
CGTCGGGGTCGCTGAGACCGTGCTGCTCGAGCGCCAGTCGGCGAGATGGGGGTTGGCGCGGAGGAAGGA
AGTCCAGAGATCCACGGCCAGGGCGGTTTGACAGCGGTCCCGGTACTGACGGAAGTCTGCCCCGACGGCCA
TTTTTTCGGGGGTGACGCAGTAGAAGGTGCGGGGGTCCCCGTGCCAGCGGTCCCATTTGAGCTGGAGGGCG
AGATCGAGGGCGAGCTCGACGAGGCGGTGCTCCCTGAGAGTTTCATGACCAGCATGAAGGGGACGAGCT
GCTTGCCGAAGGACCCCATCCAGGTGTAGGTTTCCACATCGTAGGTGAGGAAGAGCCTTTCGGTGCGAGGA
TGCGAGCCGATGGGGAAGAACTGGATCTCCTGCCACCAATTGGAGGAATGGCTGTTGATGTGATGGAAGTA
GAAATGCCGACGGCGCGCCGAACACTCGTGCTTGTTTATACAAGCGGCCACAGTGCTCGCAACGCTGCAC
GGGATGCACGTGCTGCACGAGCTGTACCTGAGTTCCTTGACGAGGAATTCAGTGGGAAGTGGAGTCGTG
GCGCCTGCATCTCGTGCTGTACTACGTGCTGGTGTCGGCCTGGCCCTTCTGCCTCGATGGTGGTCATGCT
GACGAGCCCCGCGGGAGGCAGGTCCAGACCTCGGCGCGAGCGGGTCGGAGAGCGAGGACGAGGGCGCG
CAGGCCGGAGCTGTCCAGGGTCTGAGACGCTGCGGAGTCAGGTGAGTGGGACGCGCGCGCGCGGTTG
ACTTGACGAGGATTTTTCCAGGGCGCGGGGAGGTCCAGATGGTACTTGATCTCCACCGCGCCGTTGGTGCG
GACGTGATGGCTTGACGGTCCCGTGCCCCTGGGGTGACCACCGTCCCCGTTTCTTCTGGGCGGCTG
GGGCGACGGGGCGGTGCCTCTTCCATGGTTAGAAGCGGCGGCGAGGACGCGCGCCGGGCGGCAGAGGC
GGCTCGGGGCCCCGAGGACGGGGCGGCAGGGGCACGTGCGCGCCGCGCGGGTAGGTTCTGGTACTGC
GCCCCGAGAAGACTGGCGTGAGCGACGACGCGACGGTTGACGTCTTGATCTGACGCTCTGGGTGAAGG
CCACGGGACCCGTGAGTTTGAACCTGAAAGAGAGTTCGACAGAATCAATCTCGGTATCGTTGACGGCGGCCT
GCCGACGATCTCTTGACGTGCCCCGAGTTGTCTGGTAGGCGATCTCGGTGATGAACTGCTCGATCTCCTC
CTCCTGAAGGTCTCCGCGACCGGCGCGCTCCACGGTGGCCGCGAGGTGCTTGAGATGCGGCCCATGAGCT
GCGAGAAGGCGTTCATGCCCGCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGACGCCCTCGGGATCGCGGGCG
CGCATGACCACCTGGGCGAGGTTGAGCTCCACGTGGCGCGTGAAGACCGCGTAGTTGACAGAGGCGCTGGTA
GAGGTAGTTGAGCGTGTTGGCGATGTGCTCGGTGACGAAGAAATACATGATCCAGCGGCGGAGCGGCATC
TCGCTGACGTGCCCCAGCGCCTCCAAGCGTTCCATGGCCTCGTAAAAGTCCACGGCGAAGTTGAAAACTGG
GAGTTGCGCGCCGAGACGGTCAACTCCTCCTCCAGAAGACGGATGAGCTCGGCGATGGTGGCGCGCACCTC
GCGCTCGAAGGCCCCCGGAGTTCTCCTCACTCCTCCTCTTCTCCTCCTCACTAACATCTCTTCTACTTCTC
CTCAGGCGGTGGTGGTGGCGGGGAGGGGGCCTGCGTCGCCGGCGGCGCACGGGACAGGTCGATGAA
GCGCTCGATGGTCTCGCCGCGCCGGCGTCGATGGTCTCGGTGACGGCGCGCCGTCCTCGCGGGGCCGCA
GCGTGAAGACGCCGCCGCGCATCTCCAGGTGGCCGGGGGGTCCCCGTTGGGCAGGGAGAGGGCGCTGAC
GATGCATCTTATCAATTGCCCCGTAGGGACTCCGCGCAAGGACCTGAGCGTCTCGAGATCCACGGGATCTGA
AAACCGTTGAACGAAGGCTTCGAGCCAGTCGCAGTCGAAGGTAGGCTGAGCACGTTTCTTCTGCCGGGT
CATGTTGGGGAGCGGGGCGGGCGATGCTGCTGGTGATGAAGTTGAAATAGGCGGTTCTGAGACGGCGGAT
GGTGGCGAGGAGCACAGGTCTTGGGCCCGGCTTGTGGATGCGCAGACGGTGGCCATGCCCCAGGCGT
GGTCTGACACCTGGCCAGGTCTTGTAGTAGTCTGTCATGAGCCGCTCCACGGGACCTCCTCCTCGCCCGC
GCGGCCGTGATGCGCGTGAGCCCGAAGCCGCGTGGGGCTGGACGAGCGCCAGGTGCGCGACGACGCGC
TCGGCGAGGATGGCCTGCTGGATCTGGGTGAGGGTGGTCTGGAAGTCGTCAAAGTCGACGAAGCGGTGGT

图32(续)

AGGCTCCGGTGTGATGGTGTAGGAGCAGTTGGCCATGACGGACCAGTTGACGGTCTGGTGGCCCGGACGC
ACGAGCTCGTGGTACTTGAGGCGCGAGTAGGCGCGCGTGTCAAGATGTAGTCGTTGCAGGTGCGCACCAG
GTACTGGTAGCCGATGAGGAAGTGC GGCGGGCTGGCGGTAGAGCGGCCATCGCTCGGTGGCGGGGGC
GCCGGGCGCGAGGTCCTCGAGCATGGTGC GGTTAGCCGTAGATGTACCTGGACATCCAGGTGATGCCG
GCGGCGGTGGTGGAGGCGCGGGAACTCGCGGACGCGGTTCCAGATGTTGCGCAGCGGCAGGAAGTAGT
TCATGGTGGGCACGGTCTGGCCCGTGAGGCGCGCGAGTCGTGGATGCTCTATACGGGCAAAAACGAAAGC
GGTCAGCGGCTCGACTCCGTGGCCTGGAGGCTAAGCGAACGGGTTGGGCTGCGCGTGTACCCCGGTTGAA
TCTCGAATCAGGCTGGAGCCGACGTAACGTGGTACTGGCACTCCCGTCTCGACCCAAGCCTGCACCAACCC
TCCAGGATACGGAGGCGGGTCGTTTTGCAACTTTTTtGGAGGCCGGAATGAACTAGTAAGCGCGGAAA
GCGGCCGACCGCGATGGCTCGCTGCCGTAGTCTGGAGAAGAATCGCCAGGGTTGCGTTGCGGTGTGCCCCG
GTTTCGAGGCCGCGCGGATTCCGCGGCTAACGAGGGCGTGGCTGCCCCGTCGTTTCCAAGACCCCATAGCCA
GCCGACTTCTCCAGTTACGGAGCGAGCCCCCTCTTTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGCCAGATGCATCCCGTACTGCGG
CAGATGCGCCCCCACCACCCTCCACCGCAACAACAGCCCCCTCTCCACAGCCGGCGCTTCTGCCCCCGCCCC
AGCAGCAGCAGCAACTTCCAGCCACGACCGCCGCGGCCCGCCGTGAGCGGGGCTGGACAGACTTCTCAGTAT
GATCACCTGGCCTTGAAGAGGGCGAGGGGCTGGCGCGCCTGGGGGCGTCTGCGCCGAGCGGCACCCGC
GCGTGACAGATGAAAAGGGACGCTCGCGAGGCCTACGTGCCAAGCAGAACCTGTTTCAGAGACAGGAGCGG
CGAGGAGCCCGAGGAGATGCGCGCGGCCCGGTTCCACGCGGGGCGGGAGCTGCGGCGCGCCTGGACCG
AAAGAGGGTGCTGAGGGACGAGGATTCGAGGCGGACGAGCTGACGGGGATCAGCCCCGCGCGCGCA
CGTGGCCGCGGCCAACCTGGTCACGGCGTACGAGCAGACCGTGAAGGAGGAGAGCAACTTCAAAAATCCT
TCAACAACCACGTGCGCACCTGATCGCGCGGAGGAGGTGACCCTGGGCCTGATGCACCTGTGGGACCTG
CTGGAGGCCATCGTGAGAACCCACCAGCAAGCCGCTGACGGCGCAGCTGTTCTGGTGGTGCAGCATAG
TCGGGACAACGAGGCGTTCAGGGAGGCGCTGCTGAATATCACCGAGCCCGAGGGCCGCTGGCTCCTGGACC
TGGTGAACATTCTGCAGAGCATCGTGGTGCAGGAGCGCGGGCTGCCGCTGTCCGAGAAGCTGGCGGCCATC
AACTTCTCGGTGCTGAGTCTGGGCAAGTACTACGCTAGGAAGATCTACAAGACCCCGTACGTGCCCATAGAC
AAGGAGGTGAAGATCGACGGGTTTTACATGCGCATGACCCTGAAAGTGCTGACCCTGAGCGACGATCTGGG
GGTGTACCGCAACGACAGGATGCACCGCGCGGTGAGCGCCAGCAGGCGGCGGAGCTGAGCGACCAGGA
GCTGATGCACAGCCTGCAGCGGGCCCTGACCGGGGCCGGGACCGAGGGGGAGAGCTACTTTGACATGGGC
GCGGACCTGCACTGGCAGCCCAGCCGCGGGCCTTGAGGGCGGCAGGCGGTCCCCCTACATAGAAGAGGT
GGACGATGAGGTGGACGAGGAGGGCGAGTACCTGGAAGACTGATGGCGCGACCGTATTTTTGCTAGATGC
AACAACAGCCACCTCCTGATCCCGCGATGCGGGCGGCGCTGCAGAGCCAGCCGTCCGGCATTAACTCCTCGG
ACGATTGGACCCAGGCCATGCAACGCATCATGGCGCTGACGACCCGCAACCCCGAAGCCTTTAGACAGCAG
CCCCAGGCCAACCGGCTCTCGGCCATCCTGGAGGCGGTGGTGCCCTCGCGCTCAACCCACGCACGAGAAG
GTCCTGGCCATCGTGAACGCGCTGGTGGAGAACAAGGCCATCCGCGGCGACGAGGCCGGCCTGGTGTACAA
CGCGCTGTGGAGCGCGTGGCCCGCTACAACAGCACCAACGTGCAGACCAACCTGGACCGCATGGTGACCG
ACGTGCGCGAGGCGGTGGCCAGCGCGAGCGGTTCCACCGCGAGTCCAACCTGGGATCCATGGTGGCGCTG
AACGCCCTTCTCAGCACCCAGCCGCGAACGTGCCCCGGGGCCAGGAGGACTACACCAACTTCATCAGCGCC
CTGCGCCTGATGGTGACCGAGGTGCCCCAGAGCGAGGTGTACAGTCCGGGCCGGACTACTTCTCCAGACC
AGTCGCCAGGGCTTGACAGCCGTGAACCTGAGCCAGGCGTTCAAGAACTTGAGGGCCTGTGGGGCGTGCA
GGCCCCGTCGGGGACCGCGCGACGGTGTGAGCCTGCTGACGCCGAACCTCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGG
TGGCCCCCTTACGGACAGCGGCAGCATCAACCGCAACTCGTACCTGGGCTACCTGATTAACCTGTACCGCG
AGGCCATCGGCCAGGCGCACGTGGACGAGCAGACCTACCAGGAGATCACCCACGTGAGCCGCGCCCTGGG
CCAGGACGACCCGGGCAATCTGGAAGCCACCCTGAACTTTTTGCTGACCAACCGGTGCGAGAAGATCCCGCC
CCAGTACACGCTCAGCGCCGAGGAGGAGCGCATCTGCGATACGTGCAGCAGAGCGTGGGCCTGTTCTGA
TGCAGGAGGGGGCCACCCAGCGCCGCGCTCGACATGACCGCGCGCAACATGGAGCCCAGCATGTACGCC
AGCAACCGCCCGTTTCATCAATAAACTGATGGACTACTTGATCGGGCGGCCCGCATGAACTCTGACTATTCA
CCAACGCCATCTGAATCCCACTGGCTCCCGCCGCGGGGTTCTACACGGGCGAGTACGACATGCCCGACC
CCAATGACGGGTTCTGTGGGACGATGTGGACAGCAGCGTGTCTCCCCCGACCGGGTGCTAACGAGCGC
CCCTGTGGAAGAAGGAAGGCAGCGACCGACGCGCGTCTCGGCGCTGTCCGGCCGCGAGGGTGCTGCCGC

图32(续)

GGCGGTGCCCCGAGGCCGCCAGTCTTTCCCGAGCTTGCCCTTCTCGCTGAACAGTATTCGACGACGCGAGCT
GGGCAGGATCACGCGCCCGCGCTTGCTGGGCGAGGAGGAGTACTTGAATGACTCGCTGTTGAGACCCGAGC
GGGAGAAGAACTTCCCCAATAACGGGATAGAGAGCCTGGTGGACAAGATGAGCCGCTGGAAGACGTATGC
GCAGGAGCACAGGGACGATCCGTGCGAGGGGGCCACGAGCCGGGGCAGCGCCGCCGTAAACGCCCGGTG
GCACGACAGGCAGCGGGGACTGATGTGGGACGATGAGGATTCCGCCGACGACAGCAGCGTGTGGACTTG
GGTGGGAGTGGTAACCCGTTGCTCACCTGCGCCCCCGCATCGGCGCATGATGTAAGAGAAACCGAAAAT
AAATGATACTACCAAGGCCATGGCGACCAGCGTGCGTTTCGTTTCTTCTCTGTTGTTGTATCTAGTATGATGA
GGCGTGCGTACCCGAGGGTCTCTCCCTCGTACGAGAGCGTGATGCAGCAGGCGATGGCGGCGGCGGC
GGCGATGCAGCCCCCGCTGGAGGCTCCTTACGTGCCCCCGCGGTACCTGGCGCCTACGGAGGGGCGGAACA
GCATTGTTACTCGGAGCTGGCACCCCTGTACGATACACCCGTTGTACCTGGTGGACAACAAGTCGGCGG
ACATCGCTCGCTGAACCTACCAGAACGACCACAGCAACTTCTGACCACCGTGGTGCAGAACAATGACTTCA
CCCCACGGAGGCCAGCACCCAGACCATCAACTTTGACGAGCGCTCGCGGTGGGGCGGTGAGCTGAAAACC
ATCATGCACACCAACATGCCAACGTGAACGAGTTCATGTACAGCAACAAGTTCAAGGCGCGGGTGATGGTC
TCCCGCAAGACCCCCAACGGGGTGACAGTGACAGATGGTAGTCAGGATATCTTGGAGTATGAATGGGTGGA
GTTTGAGCTGCCCCGAAGGCAACTTCTCGGTGACCATGACCATCGACCTGATGAACAACGCCATCATCGACAA
TTACTTGGCGGTGGGGCGGCAGAACGGGGTCTGGAGAGCGATATCGGCGTGAAGTTTCGACACTAGGAAC
TTCAGGCTGGGCTGGGACCCCGTGACCGAGCTGGTCATGCCCGGGGTGTACACCAACGAGGCCTTCCACCCC
GATATTGTCTTGCTGCCCCGCTGCGGGGTGGACTTCACCGAGAGCCGCCTCAGCAACCTGCTGGGCATTGCG
AAGAGGCAGCCCTTCCAGGAGGGCTTCCAGATCATGTACGAGGATCTGGAGGGGGGCAACATCCCCGCGCT
CCTGGATGTCGACGCCTATGAGAAAAGCAAGGAGGAGAGCGCCCGCGGCGGCGACTGCAGCTGTAGCCACC
GCCTCTACCGAGGTCAGGGGCGATAATTTTGCAGCCCTGCAGCAGTGGCAGCGGCCGAGGCGGCTGAAAC
CGAAAGTAAGATAGTCATTAGCCGGTGGAGAAGGATAGCAAGGACAGGAGCTACAACGTGCTGCCGGAC
AAGATAAACACCGCCTACCGCAGCTGGTACCTGGCCTACAACATATGGCGACCCCGAGAAGGGCGTGCGCTC
CTGGACGCTGCTACACCTCGGACGTCACTGCGGCGTGAGCAAGTCTACTGGTCTGCTGCCGACATGAT
GCAAGACCCGGTCACCTTCCGCTCCACGCGTCAAGTTAGCAACTACCCGGTGGTGGGCGCCGAGCTCCTGCC
CGTCTACTCCAAGAGCTTCTTCAACGAGCAGGCCGTCTACTCGCAGCAGCTGCGCGCCTTACCTCGCTCACG
CACGTCTTCAACCGCTTCCCCGAGAACCAGATCCTCGTCCGCCCGCCGCGCCACCATTACCACCGTCAGTG
AAAACGTTCTGCTCTCACAGATCACGGGACCCTGCCGCTGCGCAGCAGTATCCGGGGAGTCCAGCGCGTGA
CCGTTACTGACGCCAGACGCCGACCTGCCCTACGTCTACAAGGCCCTGGGCATAGTCGCGCCGCGCGTCC
TCTCGAGCCGCACCTTCTAAAAAATGTCCATTCTCATCTCGCCAGTAATAACACCGGTTGGGGCCTGCGCGC
GCCAGCAAGATGTACGGAGGCGCTCGCCAACGCTCCACGCAACACCCCGTGCAGCTGCGCGGGCACTTCC
GCGCTCCCTGGGGCGCCCTCAAGGGCGCGTGCGGTGCGCACCAACCGTCGACGACGTGATCGACCAGGTG
GTGGCCGACGCGCGCAACTACACCCCCGCCCGCGCCCGTCTCCACCGTGACGCGCGTCATCGACAGCGTG
GTGGCCGACGCGCGCCGTACGCCCCGCCAAGAGCCGGCGGCGCATCGCCGGCGGCACCGGAGCA
CCCCCGCATGCGCGCGGCGCGAGCCTTGTGCGCAGGGCCAGGCGCACGGGACGACGGGCCATGCTCAG
GGCGGCCAGACGCGCGGCTTCAGGCGCCAGCGCCGGCAGGACCCGGAGACGCGCGGCCACGGCGGCGGC
AGCGGCCATCGCCAGCATGTCCCGCCCGCGGCGAGGGAACGTGTACTGGGTGCGCGACGCCGCCACCGGTG
TGCGCGTGCCCGTGCGCACCCCGcCCCCCTCGCACTTGAAGATGTTCACTTCGCGATGTTGATGTGTCCAGCG
GCGAGGAGGATGTCCAAGCGCAAATTCAAGGAAGAGATGCTCCAGGTCATCGCGCTGAGATCTACGGCCC
CGCGGTGGTGAAGGAGGAAAGAAAGCCCCGCAAAATCAAGCGGGTCAAAAAGGACAAAAGGAAGA
TGACGATCTGGTGGAGTTTGTGCGGAGTTCGCCCCCGCGGCGCGTGCAGTGGCGCGGGCGGAAAGTGC
ACCCGGTGCTGAGACCCGGCACCACTGGTCTTACGCCCCGCGAGCGCTCCGGCAGCGCTTCCAAGCGCT
CCTACGACGAGGTGTACGGGACGAGGACATCCTCGAGCAGGCGGCCGAGCGCTGGGCGAGTTTGCTTAC
GGCAAGCGCAGCCGCCCGCCCTGAAGGAAGAGGCGGTGTCCATCCCGCTGGACCACGGCAACCCACGCC
GAGCCTCAAGCCCGTGACCCTGCAGCAGGTGCTGCCGAGCGCAGCGCCGCGCCGGGGGTTCAAGCGCGAG
GGCGAGGATCTGTACCCACCATGCAGCTGATGGTGCCAAGCGCCAGAAGCTGGAAGACGTGCTGGAGAC
CATGAAGGTGACCCGGACGTGCAGCCCGAGGTCAAGGTGCGGCCCATCAAGCAGGTGGCCCCGGGCGCTG
GGCGTGACACCGTGGACATCAAGATCCCCACGGAGCCCATGGAAACGCAGACCGAGCCCATGATCAAGCC

图32 (续)

CAGCACCAGCACCATGGAGGTGCAGACGGATCCCTGGATGCCATCGGCTCCTAGCCGAAGACCCCGGCGCA
AGTACGGCGCGGCCAGCCTGCTGATGCCCACTACGCGCTGCATCCTTCCATCATCCCCACGCCGGGTACC
GCGGCACGCGCTTCTACCGCGGTCATACAACCAGCCGCCGCCGAAGACCACCACCCGCCGCCCGCTCGCC
GCACAGCCGCTGCATCTACCCCTGCCGCCCTGGTGC GGAGAGTGTACCGCCGCGGCCGCGCGCCTCTGACCC
TACCGCGCGCGCTACCACCCGAGCATCGCCATTTAACTTTTCGCTGCTTTGCAGATGGCCCTCACATGCC
GCCTCCGCGTTCCTTACGGGCTACCGAGGAAGAAAACCGCGCCGTAGAAGGCTGGCGGGGAACGGGAT
GCGTCGCCACCACCATCGGCGGCGGCGGCCATCAGCAAGCGGTTGGGGGgAGGCTTCTGCCGCGCTGA
TCCCCATCATCGCCGCGCGATCGGGGCGATCCCCGGCATTGCTTCGTGGCGGTGCAGGCCTCTCAGCGCC
ACTGAGACACTTGAAAAACATCTTGTAAATAAACCAATGGACTCTGACGCTCCTGGTCTGTGATGTGTTTTCG
TAGACAGATGGAAGACATCAATTTTTCGTCCCTGGCTCCGCGACACGGCACGCGGCCGTTTCATGGGCACCTG
GAGCGACATCGGCACCAGCCAACTGAACGGGGGCGCCTTCAATTGGAGCAGTCTCTGGAGCGGGCTTAAGA
ATTTGCGGTCCACGCTTAAACCTATGGCAGCAAGGCGTGAACAGCACCACAGGGCAGGCGCTGAGGGAT
AAGCTGAAAGAGCAGAACTTCCAGCAGAAGGTGGTCGATGGGCTCGCCTCGGGCATCAACGGGGTGGTGG
ACCTGGCCAACCAGGCCGTGCAGCGGCAGATCAACAGCCGCTGGACCCGGTGCCGCCCGCCGGCTCCGTG
GAGATGCCGAGGTGGAGGAGGAGCTGCCTCCCCTGGACAAGCGGGGCGAGAAGCGACCCCGCCCCGACG
CGGAGGAGACGCTGCTGACGCACACGGACGAGCCGCCCCGTACGAGGAGGCGGTGAACTGGGTCTGCC
CACCACGCGGCCCATCGCGCCCTGGCCACCGGGGTGCTGAAACCCGAAAGTAATAAGCCCGCGACCCTGG
ACTTGCTCTCTCCGCTTCCCGCCCCCTACAGTGGCTAAGCCCCTGCCGCCGGTGGCCGTGGCCCGCGCGCG
ACCCGGGGGCTCCGCCCGCCCTCATGCGAACTGGCAGAGCACTCTGAACAGCATCGTGGGTCTGGGAGTGC
AGAGTGTGAAGCGCCCGCTGCTATTAAACCTACCGTAGCGCTTAACTTGCTTGTCTGTGTGTATGTATT
ATGTCGCCGCTGTCCGCCAGAAGGAGGAGTGAAGAGGCGCGTCGCCGAGTTGCAAGATGGCCACCCCATCG
ATGCTGCCCCAGTGGGCGTACATGCACATCGCCGGACAGGACGCTTCGGAGTACCTGAGTCCGGGTCTGGT
GCAGTTCGCCCGCGCCACAGACACCTACTTCAGTCTGGGGAACAAGTTAGGAACCCACGGTGGCGCCAC
GCACGATGTGACCACCGACCGCAGCCAGCGGCTGACGCTGCGCTTCGTGCCCGTGGACCGCGAGGACAACA
CCTACTCGTACAAAGTGCCTACACGCTGGCCGTGGGCGACAACCGCGTGTGGACATGGCCAGCACCTACT
TTGACATCCGCGGCGTGTGGATCGGGGCCCTAGCTTCAAACCCTACTCCGGCACCGCCTACAACAGCCTGG
CTCCAAGGGAGCGCCCAATTCCAGCCAGTGGGAGCaAAAAAAGGCAGGCAATGGTGACACTATGGAACA
CACACATTTGGTGTGGCCCCAATGGGCGGTGAGAATATTACAATCGACGGATTACAAATTGGAAGTACGCT
ACAGCTGATCAGGATAAACCAATTTATGCTGACAAAACATTCCAGCCTGAACCTCAAGTAGGAGAAGAAAAAT
TGGCAAGAACTGAAAGCTTTTATGGCGGTAGGGCTCTTAAAAAAGACACAAGCATGAAACCTTGCTATGGC
TCCTATGCTAGACCCACCAATGTAAAGGGAGGTCAAGCTAACTTAAAGTTGGAGCTGATGGAGTTCTACC
AAAGAATTTGACATAGACCTGGCTTTCTTTGATACTCCCGGTGGCACAGTGAATGGACAAGATGAGTATAAA
GCAGACATTGTCATGTATACCGAAAAACAGTATCTGGAACTCCAGACACGCATGTGGTATACAAACCAGGC
AAGGATGATGCAAGTTCTGAAATTAACCTGGTTCAGCAGTCCATGCCAATAGACCCAACTATATTGGTTCA
GAGACAACTTTATTGGGCTCATGTATTACAACAGTACTGGCAATATGGGGGTGCTGGCTGGTCAGGCCTCAC
AGCTGAATGCTGTGGTCGACTTGCAAGACAGAAACACCGAGCTGTCATACCAGCTCTTGCTTGACTCTTTGG
GTGACAGAACCCGGTATTTAGTATGTGGAATCAGGCGGTGGACAGTTATGATCCTGATGTGCGCATTATTG
AAAACCATGGTGTGGAAGACGAACTTCCCACTATTGCTTCCCCCTGGATGGGTCTGGCACTAATGCCGCTTA
CCAAGGTGTGAAAGTAAAAAATGGTAACGATGGTGTGTTGAGAGCGAATGGGAAAATGATGATACTGTCG
CAGCTCGAAATCAATTATGCAAGGGCAACATTTTTGCCATGGAAATTAACCTCCAAGCCAACCTGTGGAGAA
GTTTCTCTACTCGAACGTGGCCCTGTACCTGCCGACTCTTACAAGTACACGCCAGCCAACATCACCTGCCC
ACCAACACCAACACTTATGATTACATGAACGGGAGAGTGGTGCCTCCCTCGCTGGTGGACGCCTACATCAAC
ATCGGGGCGCGCTGGTCGCTGGACCCCATGGACAACGTCAATCCCTTCAACCACCACCGCAACGCGGGCCTG
CGCTACCGCTCCATGCTCCTGGGCAACGGGCGCTACGTGCCCTTCCACATCCAGGTGCCCCAGAAATTTTCG
CCATCAAGAGCCTCCTGCTCCTGCCCGGTCTACACCTACGAGTGGAACCTCCGCAAGGACGTCAACATGA
TCCTGCAGAGCTCCCTCGGCAACGACCTGCGCACGGACGGGGCCTCCATCTCCTTACCAGCATCAACCTCTA
CGCCACCTTCTTCCCATGGCGCACAAACACGGCCTCCACGCTCGAGGCCATGCTGCGCAACGACACCAACGA
CCAGTCCTTCAACGACTACCTCTCGGCGGCCAACATGCTCTACCCCATCCCGGCCAACGCCACCAACGTGCC

图32(续)

ATCTCCATCCCCTCGCGCAACTGGGCGCCTTCCGCGGCTGGTCTTCACGCGCCTCAAGACCAAGGAGACG
CCCTCGCTGGGCTCCGGGTTGACCCCTACTTCGTCTACTCGGGCTCCATCCCCTACCTCGACGGCACCTTCTA
CCTCAACCACACCTTCAAGAAGGTCTCCATCACCTTCGACTCCTCCGTGAGCTGGCCCGGCAACGACCGGCTC
CTGACGCCCAACGAGTTCGAAATCAAGCGCACCGTCGACGGCGAGGGATACAACGTGGCCAGTGCAACAT
GACCAAGGACTGGTTCCTGGTCCAGATGCTGGCCCACTACAACATCGGCTACCAGGGGCTTCTACGTGCCCGA
GGGCTACAAGGACCGCATGTACTCCTTCTTCCGCAACTTCCAGCCCATGAGCCGCCAGGTGGTGGACGAGGT
CAACTACAAGGACTACCAGGCCGTACCCTGGCCTACCAGCACAACAACCTCGGGCTTCGTGGGCTACCTCGC
GCCCACCATGCGCCAGGGCCAGCCCTACCCGCGCAACTACCCGTACCCGCTCATCGGCAAGAGCGCCGTAC
CAGCGTCACCCAGAAAAAGTTCCTCTGCGACAGGGTCATGTGGCGCATCCCCTTCTCCAGCAACTTCATGTCC
ATGGGCGCGCTCACCGACCTCGGCCAGAACATGCTCTATGCCAACTCCGCCACGCGCTAGACATGAATTC
GAAGTCGACCCCATGGATGAGTCCACCCTTCTATGTTGTCTTGAAGTCTTCGACGTCGTCCGAGTGCACC
AGCCCCACCGCGGCGTTCATCGAGGCCGTCTACCTGCGCACCCCTTCTCGGCCGGTAACGCCACCACCTAAAT
TGCTACTTGCATGATGGCTGAGCCACAGGCTCCGGCGAGCAGGAGCTCAGGGCCATCATCCGCGACCTGG
GCTGCGGGCCCTACTTCTGGGCACCTTCGATAAGCGCTTCCCGGGATTTCATGGCCCCGCACAAGCTGGCCT
GCGCCATCGTCAACACGGCCGCGCGAGACCGGGGGCGAGCACTGGCTGGCCTTCGCCTGGAACCCGCGC
TCGAACACCTGCTACCTTTCGACCCCTTCGGGTTCTCGGACGAGCGCCTCAAGCAGATCTACCAGTTCGAGT
ACGAGGGCCTGCTGCGCCGTAGCGCCCTGGCCACCGAGGACCGCTGCGTCACCCTGGAAAAGTCCACCCAG
ACCGTGCAGGGTCCGCGCTCGGCCGCTGCGGGCTTCTGCTGCATGTTCTGACGCGCTTCGTGCACTGG
CCCGACCGCCCCATGGACAAGAACCCACCATGAACCTGCTGACGGGGTGCCCAACGGCATGCTCCAGTCG
CCCCAGGTGGAACCCACCTGCGCCGAACCAGGAGGCGCTTACCGCTTCTCAACTCCCACTCCGCCTACT
TTCGCTCCACCGCGCGCGCATCGAGAAGGCCACCGCCTTCGACCGCATGAACAATCAAGACATGTAAACCG
TGTGTGTATGTTAAAAATATCTTTAATAAACAGCACTTAATGTTACACATGCATCTGAGATGATTTTATTTTA
GAAATCGAAAGGGTCTGCCGGTCTCGGCATGGCCGCGGGCAGGGACACGTTGCGGAACTGGTACTTGG
CCAGCCACTTGAACCTCGGGGATCAGCAGTTTGGGCAGCGGGGTGTCGGGGAAGGAGTCGGTCCACAGCTTC
CGGTGAGCTGCAGGGCGCCAGCAGGTCGGGCGCGGAGATCTTGAAATCGCAGTTGGGACCCGCGTTCTG
CGCGGAGAGTTGCGGTACACGGGGTTGAGCACTGGAACACCATCAGGGCCGGGTGCTTCACGCTCGCCA
GCACCGCCGCGTCGGTGATGCTCTCCACGTCGAGGTCTCGGCGTTGGCCATCCCGAAGGGGGTCATCTTG
AGGTCTGCCTTCCCATGGTGGGCACGCACCCGGGCTTGTGGTTGCAATCGCAGTGCAGGGGGATCAGCATC
ATCTGGGCCTGGTCGGCGTTCATCCCCGGGTACATGGCCTTCATGAAAGCCTCCAATTGCCTGAACGCCTGCT
GGGCCTTGGTCCCTCGGTGAAGAAGACCCCGCAGGACTTGCTAGAGAACTGGTTGGTGGCACAGCCGGCA
TCGTGCACGCAGCAGCGCGCGTCGTTGTTGGCCAGCTGCACCACGCTGCGCCCCAGCGTTCTGGGTGATC
TTGGCCCGGTGCGGGTCTCCTTCAGCGCGCGTGCCTGTTCTCGCTCGCCACATCCATCTCGATCATGTGCT
CCTTCTGGATCATGGTGGTCCCGTGCAGGCACCGCAGTTTGCCCTCGGCCTCGGTGCACCCGTGCAGCCACA
GCGCGCACCCGGTGCACCTCCAGTTCCTTGTGGGCGATCTGGGAATGCGCGTGCACGAACCCCTGCAGGAAG
CGGCCATCATGGTCGTGAGGTCTTGTGCTAGTGAAGGTCAACGGGATGCCGCGGTGCTCCTCGTTGATG
TACAGGTGGCAGATGCGGCGGTACACCTCGCCCTGCTCGGGCATCAGTTGGAAGTTGGCTTTCAGGTGCGTC
TCCACGCGGTAGCGGTCCATCAGCATAGTCATGATTTCCATGCCCTTCTCCAGGCCGAGACGATGGGCAGG
CTCATAGGGTTCTTACCATCATCTTAGCACTAGCAGCCGCGGCCAGGGGGTCGCTCTCATCCAGGGTCTCAA
AGCTCCGCTTGCCGTCTTCTCGGTGATCCGCACCGGGGGGTAGCTGAAGCCCACGGCCGCCAGCTCCTCT
CGGCCTGTCTTTCGTCTCGCTGCTCTGGCTGACGTCTGTCATGACCACATGCTTGGTCTTGCGGGGTTTCTTC
TTGGGCGGAGTGCGGCGGAGATGCTTGTGGCGAGGGGGAGCGCGAGTTCTCGCTCACCCTACTATCTC
TTCCTCTTCTTGGTCCGAGGCCACGCGGCGGTAGGTATGTCTTTCGGGGGAGAGGCGGAGGCGACGGGC
TCTCGCCGCCGCGACTTGGCGGATGGCTGGCAGAGCCCCTTCGCGTTCGGGGGTGCGCTCCCGCGCGCGC
TCTGACTGACTTCTCCGCGGCCGGCCATTGTGTTCTCTAGGGAGGAACAACAAGCATGGAGACTCAGCCA
TCGCCAACCTCGCCATCTGCCCCACCGCCGCGCAGGAGAAGCAGCAGCAGCAGAATGAAAGCTTAACCGC
CCCGCCGCCAGCCCCGCTCCGACGCAGCCGCGGTCCAGACATGCAAGAGATGGAGGAATCCATCGAGA
TTGACCTGGGCTATGTGACGCCCGCGGAGCATGAGGAGGAGCTGGCAGTGCCTTCAATCGTCAAGCCAG
GAAGATAAAGAACAGCCAGAGCAGGAAGCAGAGAACGAGCAGAGTCAGGCTGGGCTCGAGCATGGCGAC

图32(续)

TACCTCCACCTGAGCGGGGAGGAGGACGCGCTCATCAAGCATCTGGCCCCGGCAGGCCACCATCGTCAAGGA
CGCGCTGCTCGACCGCACCGAGGTGCCCCCTAGCGTGAGGAGCTCAGCCGCGCCTACGAGCTCAACCTCTT
CTCGCCGCGCGTGcCCCCAAGCGCCAGCCCAACGGCACCTGCGAGCCCAACCCCGCCTCAACTTCTACCCG
GTCTTCGCGGTGCCCCGAGGCCCTGGCCACCTACCACATCTTTtCAAGAACCAAAAGATCCCCGTCTCCTGCC
GCGCCAACCGCACCCGCGCCGACGCCCTCTCAACCTGGGTCCCCGGCGCCCGCTACCTGATATCGCCTCCTT
GGAAGAGGTTCCCAAGATCTTCGAGGGTCTGGGCAGCGACGAGACTCGGGCCGCGAACGCTCTGCAAGGA
GAAGGAGGAGGAGAGCATGAGCACCACAGCGCCCTGGTCGAGTTGGAAGGCGACAACGCGCGGCTGGCG
GTGCTCAAACGCACGGTCGAGCTGACCCATTCGCCTACCCGGCTCTGAACCTGcCCCCGAAAGTCATGAGC
GCGGTCTGGAACAGGTGCTCATCAAGCGCGCGTCGCCATCTCCGAGGACGAGGGCATGCAAGACTCCGA
GGAGGGCAAGCCCGTGGTCAGCGACGAGCAGCTGGCCCGTGGCTGGGTCTAATGCTACCCCTCAAAGTT
TGGAAGAGCGGCGCAAGCTCATGATGGCCGTGGTCTGGTGACCGTGAGCTGGAGTGCTGCGCCGCTT
TTCGCCGACGCGGAGACCCTGCGCAAGGTGAGGAGAACCTGCACTACCTCTTCAGGCACGGGTTCTGTCG
CCAGGCCTGCAAGATCTCCAACGTGGAGCTGACCAACCTGGTCTCTACATGGGCATCTTGACGAGAACCG
CCTGGGGCAGAACGTGCTGCACACCACCCTGCGCGGGGAGGCCCGCCGCGACTACATCCGCGACTGCGTCT
ACCTCTACCTCTGCCACACCTGGCAGACGGGCATGGGCGTGTGGCAGCAGTGTCTGGAGGAGCAGAACCTG
AAAGAGCTCTGCAAGCTCTGCAAAAAGAACCTCAAGGGTCTGTGGACCGGGTTCGACGAGCGGACCACCGC
CTCGGACCTGGCCGACCTCATCTTCCCCGAGCGCCTCAGGCTGACGCTGCGCAACGGCCTGCCGACTTTATG
AGCCAAAGCATGTTGCAAACTTTGCTCTTTTCATCTCGAACGCTCCGGAATCCTGCCCGCCACCTGCTCCG
CGCTGCCCTCGACTTCGTGCCGTGACCTTCGCGAGTGCCCCCGCCGCTGTGGAGCCACTGCTACCTGCT
GCGCCTGGCCAACCTACCTGGCCTACCACTCGGACGTGATCGAGGACGTGAGCGGCGAGGGCCTGCTCGAGT
GCCACTGCCGCTGCAACCTCTGCACGCCGACCGCTCCCTGGCCTGCAACCCCACTGCTGAGCGAGACCC
AGATCATCGGCACCTTCGAGTTGCAAGGGCCAGCGAGGGCGAGGGAGCCAAGGGGGGTCTGAAACTCAC
CCCGGGGCTGTGGACCTCGGCCTACTTGCGCAAGTTCTGTGCCGAGGATTACCATCCCTTCGAGATCAGGTT
CTACGAGGACCAATCCCAGCCGCCCAAGGCCGAGCTGTGCGCCTGCGTCATACCCAGGGGGCGATCCTGG
CCCAATTGCAAGCCATCCAGAAATCCCGCCAAGAATTCTTGCTGAAAAAGGGCCGCGGGGTCTACCTCGACC
CCCAGACCGGTGAGGAGCTCAACCCCGGCTTCCCCAGGATGCCCGAGGAAACAAGAAGCTGAAAGTGGA
GCTGCCCGCCGTGGAGGATTTGGAGGAAGACTGGGAGAACAGCAGTCAGGCAGAGGAGATGGAGGAAGA
CTGGGACAGCACTCAGGCAGAGGAGGACAGCCTGCAAGACAGTCTGGAGGAAGACGAGGAGGAGGCAGA
GGAGGAGGTGGAAGAAGCAGCCGCCGCCAGACCGTCGTCCTCGGCGGGGGAGAAAGCAAGCAGCACGGA
TACCATCTCCGCTCCGGGTGCGGGTCCCGCTCGGCCCCACAGTAGATGGGACGAGACCGGGCGATTCCCGA
ACCCACACCCAGACCGGTAAGAAGGAGCGGCAGGGATAACAAGTCTGGCGGGGGCACAAAAACGCCAT
CGTCTCCTGCTTGACGGCCTGCGGGGGCAACATCTCCTTACCCGGCGCTACCTGCTCTTCCACGCGGGGTG
AACTTCCCCCGCAACATCTTGCACTACTACCGTCACCTCCACAGCCCCTACTACTTCCAAGAAGAGGCAGCAG
CAGCAGaAAAAGACCAGAAAACCAGCTAGAAAATCCACAGCGGCGGCAGCGGCAGGTGGACTGAGGATCG
CGGCGAACGAGCCGCGCAGACCCGGGAGCTGAGGAACCGGATCTTCCACCCTCTATGCCATCTTCCAGC
AGAGTCGGGGGCAGGAGCAGGAAGTAAAGTCAAGAACCGTTCTGCGCTCGCTACCCGCAAGTTGTCTG
TATACAAGAGCGAAGACCAACTTCAGCGCACTCTCGAGGACGCCGAGGCTCTCTTCAACAAGTACTGCGCG
CTCACTCTTAAAGAGTAGCCCGCGCCCCGCCCAGTCGAGAAAAGGCGGGGAATTACGTACCTGTGCCCTTC
GCCCTAGCCGCTCCACCCAGCACCGCCATGAGCAAAGAGATTCCACGCCTTACATGTGGAGCTACCAGCC
CCAGATGGGCCTGGCCGCCGCGCCGCCAGGACTACTCCACCCGCATGAATTGGCTCAGCGCCGGGGCCCG
CGATGATCTCACGGGTGAATGACATCCGCGCCACCGAAACCAGATACTCCTAGAACAGTCAGCGCTCACCG
CCACGCCCCGCAATCACCTCAATCCGCGTAATTGGCCCGCCGCCCTGGTGTACCAGGAAATTCCCCAGCCCAC
GACCGTACTACTTCCGCGAGACGCCAGGCCGAAGTCCAGCTGACTAACTCAGGTGTCCAGCTGGCGGGCG
GCGCCACCCTGTGTGTCACCGCCCCGCTCAGGGTATAAAGCGGCTGGTGATCCGGGGCAGAGGCACACAG
CTAACGACGAGGTGGTGAGCTTTCGCTGGGTCTGCGACCTGACGGAGTCTTCAACTCGCCGATCGGG
GAGATCTTCTTACGCCTCGTCAGGCGGTCTGACTTTGGAGAGTTCTGCTCTCGAGCCCCGCTCGGGCGG
CATCGGCACTCTCCAGTTCGTGGAGGAGTCACTCCCTCGGTCTACTTCAACCCCTTCTCCGGCTCCCCGGCC
ACTACCCGGACGAGTTCATCCGAACCTTGACGCCATCAGCGAGTCGGTGGACGGCTACGATTGATTAATTA

图32(续)

ATCAACTAACCCCTTACCCCTTTACCCTCCAGTAAAAATAAAGATTAAAAATGATTGAATTGATCAATAAAGA
ATCACTTACTTGAAATCTGAAACCAGGTCTCTGTCCATGTTTTCTGTCAGCAGCACTTCACTCCCCTCTCCCAA
CTCTGGTACTGCAGGCCCGGCGGGCTGCAAATCTCTCCACACTCTGAAGGGGATGTCAAATCTCTCTGTCT
CCTCAATCTTCATTTTTATCTTCTATCAGATGTCCAAAAAGCGCGCGGGTGGATGATGGCTTCGACCCCGT
GTACCCCTACGATGCAGACAACGCACCGACTGTGCCCTTCATCAACCCTCCCTTCGTCTCTTCAGATGGATTCC
AAGAAAAGCCCCTGGGGGTGTTGTCCCTGCGACTGGCCGACCCCGTACCACCAAGAATGGGGCTGTCACC
CTCAAGCTGGGGGAGGGGGTGGACCTCGACGACTCGGGAAAACTCATCTCCAAAAATGCCACCAAGGCCAC
TGCCCTCTCAGTATTTCCAACGGCACCATTTCCCTTAACATGGCTGCCCTTTTTACAACAACAATGGAACGT
TAAGTCTCAATGTTTCTACACCATTAGCAGTATTTCCCACTTTTAACACTTTAGGTATCAGTCTTGAAACGGT
CTTCAAATCTTAATAAGTTGCTGACTGTACAGTTAACTCATCTCTTACATTGAGCTCAAATAGCATCACAGT
AAAAACAGACAAAGGACTCTATATTAATTCTAGTGAAACAGAGGGCTTGAGGCTAACATAAGCCTAAAAA
GAGGACTGATTTTTGATGGTAATGCTATTGCAACATACCTTGGAAGTGGTTTAGACTATGGATCCTATGATAG
CGATGGGAAAAACAAGACCCATCATCACAAAATTGGAGCAGGTTTGAATTTGATGCTAATAATGCCATGGC
TGTGAAGCTAGGCACAGGTTTAAGTTTACTCTGCCGGTGCCTAACAGCTGGAAACAAAGAGGATGACAA
GCTAACACTTTGGACTACACCTGACCCAAGCCCTAATTGTCAATTACTTTAGACAGAGATGCCAAATTTACC
CTATGTCTTACAAAATGCGGTAGTCAAATACTAGGCACTGTTGCAGTAGCTGCTGTTACTGTAGGTTTCAGCAC
TAAATCCAATTAATGACACAGTAAAAAGCGCCATAGTATTCCTTAGATTGACTCTGACGGTGTGCTCATGTC
AAACTCATCAATGGTAGGTGATTACTGGAACTTAGGGAAGGACAGACCACCCAAAGTGTGGCCTATACAAA
TGCTGTGGGATTATGCCCAATCTAGGTGCATATCCTAAACCCAAAGCAAACACCAAAAAATAGTATAGT
AAGTCAGGTATATTTAAATGGAGAACTACTATGCCAATGACACTGACAATAACTTTCAATGGCACTGATGA
AAAAGACACAACACCTGTGAGCACTTACTCCATGACTTTTACATGGCAGTGGACTGGAGACTATAAGGACAA
GAATATTACCTTTGCTACCAACTCCTTTACTTTCTCCTACATGGCCCAAGAATAAACCTGCATGCCAACCCCA
TTGTTCCCACCACTATGGAAAACCTCTGAAGCAGAAAAATAAAGTTCAAGTGTTTTATTGATTCAACAGTTTT
Ctcacagaacctagatttcaacctgccacctccctcccaacacacagagtacacagtcctttctccccggctggccttaaaaagcatcatatca
tgggtaacagacatattcttaggtgttatattccacacggtttcctgtcagccaaacgctcatcagtgatattaataaactccccgggcagctca
cttaagttcatgtcgtgtccagctgtcgtgagccacaggtcgtgtccaacttgcggttgcttaacggcgcggaaggagaagtccacgcctaca
tgggggtagagtataatcgtgcatcaggatagggcggtggtgtcgtcagcagcgcggaataaactgctgccgcccgcctcgtcgtcagga
aatacaacatggcagtggtctcctcagcgatgattcgaccgcccgcagcataaggcgctgtcctccgggcacagcagcgccacctgatctc
actaaatcagcacagtaactgcagcacagcaccacaatattgttcaaaatcccacagtgcaaggcgctgtatccaaagctcatggcggggac
cacagaaccacgtggccatcataccacaagcgaggttagttaagtggcgacctcataaacacgctggacataaacattaccttttgg
catgttgaattcaccacctcccggtaccatataaacctctgattaaacatggcgccatccaccaccatcctaaaccagctggccaaaactgcc
cgccggctatacactgcagggaaaccgggactggaacaatgacagtgagagcccaggactcgtaacatggatcatcatgctcgtcatgat
caatgttggcacaacacaggcacacgtgcatacacttctcaggattacaagctcctcccgcttagaaccatattccagggaacaacccattc
ctgaatcagcgtaaatccacactgcagggaaagacctgcacgtaactcacgttgctcattgtcaaagtggtacattcgggcagcagcggtg
atcctccagtatggttagcggggtttctgtcctcaaaaggaggttagacgatcctactgtacggagtgcgagagacaaccgagatcgtgttgg
cgtagtgtcatgccaatggaacgcccgcagtgatgtatcttctgaagcaaaaccaggtgcggcggtgacaacagatctgctgtcctccggtc
cgccgcttagatcgctctgtgttagttagtttagtatatccactctcctcaagcatccaggcgccccctggcttgggttctatgtaaactcctcat
gcgcccgtgccttgataacatccaccaccgcagaataagccacaccagccaacctacacattcgttctgcgagtcacacacgggaggagcg
ggaagagctggaagaacctGATTAACCTTTATTCCAAACGGTCTCGGAGCACTTCAAATGCAGGTCCCGGAGGTG
GCACCTCTCGCCCCCACTGTGTTGGTGAAAAATAACAGCCAGGTCAAAGGTGACACGTTCTCGAGATGTTT
CACGGTGGCTTCCAGCAAAGCCTCCACGCGCACATCCAGAAACAAGAGGACAGCGAAAGCGGGAGCGTTTT
CTAATTCCTCAATCATCATATTACACTCCTGCACCATCCCCAGATAATTTTCATTTTCCAGCCTTGAATGATTC
GTATTAGTTCCTGAGGTAAATCCAAGCCAGCCATGATAAAAAGCTCGCGCAGAGCGCCCTCCACCGGCATTC
TTAAGCACACCCCTCATAATTCCAAGAGATTCTGCTCCTGGTTACCTGCAGCAGATTAACAATGGGAATATCA
AAATCTCTGCCGCGATCCCTAAGCTCCTCCCTCAACAATAACTGTATGTAATCTTTCATATCATCTCCGAAATTT
TTAGCCATAGGGCCGCCAGGAATAAGAGCAGGGCAAGCCACATTACAGATAAAGCGAAGTCTCCCCAGTG
WGCATTGCCAAATGTAAGATTGAAATAAGCATGCTGGCTAGACCCTGTGATATCTTCAGATAACTGGACAG
AAAATCAGGCAAGCAATTTTAAAGAAAATCAACAAAAGAAAAGTCGTCCAGGTGCAGGTTTAGAGCCTCAG

图32(续)

GAACAACGATGGAATAAGTGCAAGGAGTGCGTTCAGCATGGTTAGTGtTTTTTTGGTGATCTGTAGAACAA
AAAATAAACATGCAATATTAAACCATGCTAGCCTGGCGAACAGGTGGGTAAATCACTCTTTCCAGCACCAGG
CAGGCTACGGGGTCTCCGGCGCGACCCTCGTAGAAGCTGTCGCCATGATTGAAAAGCATCACCGAGAGACC
TTCCCGGTGGCCGGCATGGATGATTCGAGAAGAAGCATACACTCCGGGAACATTGGCATCCGTGAGTGAAA
AAAaGCGACCTATAAAGCCTCGGGGCACTACAATGCTCAATCTCAATTCCAGCAAAGCCACCCCATGCGGAT
GGAGCACAAAATTGGCAGGTGCGTAAAAAATGTAATTACTCCCCTCCTGCACAGGCAGCAAAGCCCCCGCTC
CCTCCAGAAACACATACAAAGCCTCAGCGTCCATAGCTTACCGAGCACGGCAGGCGCAAGAGTCAGAGAAA
AGGCTGAGCTCTAACCTGACTGCCCCGCTCCTGTGCTCAATATATAGCCCTAACCTACACTGACGTAAAGGCCA
AAGTCTAAAAATACCCGCCAAAATGACACACACGCCCAGCACACGCCCAGAAACCGGTGACACACTCAAAAA
AATACGTGCGCTTCCTCAAACGCCCAAACCGGCGTCATTTCCGGGTTCCACGCTACGTCACCGCTCAGCGAC
TTTCAAATTCCGTGACCGTTAAAAACGTCACTCGCCCCGCCCTAACGGTCGCCCTTCTCTCGGCCAATCACC
TTCCTCCCTTCCCAAATTCAAACGCCTCATTTGCATATTAACGCGCACAAAAAGTTTGAGGTATATATTTGAAT
GATGGTTTAAACGCGGCCGCCAGGCCTACCCACTAGTCAATTCGGGAGGATCGAAACGGCAGATCGCAAAA
AACAGTACATACAGAAGGAGACATGAACATGAACATCAAAAAAATTGTAACAAGCCACAGTTCTGACTTT
TACGACTGCACTTCTGGCAGGAGGAGCGACTCAAGCCTTCGCGAAAGAAAAATAACCAAAAAGCATACAAAG
AAACGTACGGCGTCTCTCATATTACAGCCATGATATGCTGCAGATCCCTAAACAGCAGCAAAACGAAAAAT
ACCAAGTGCCTCAATTCGATCAATCAACGATTaAAAATAATTGAGTCTGACAAAAGGACTTGATGTG

图32 (续)

MVA-TPA-E2D123序列:

gtaatctattcgatataccgttgctaacagtatactggcccaataactgtggatggaaaatctataataacattaatatcatccgatggtgcta
gggttatttgatggatgctataaattttctgcggtttatctttacaagactattgtatcattgggtagcaaaccagagagccgaccattcg
atttaataaaaaaatcagatgctaaacgaattctaaatcgttggtcaaagaatctatggcatccttgaaatcctgtacgaggcattcgagac
acaatcaggagcgttagaagtttaatgagtcctatgtaggatgttttcgtttctagaatagaagacatgttcttaactagtgtcattaatagagt
atccgagaatactggaatggggatgtattatcctaccaacgatataccttctctatttatcgaatcatctatctgtctagattatattatagtaa
aatcaggaatccaacaaatatcgatcaaatctgttctcgatatcatttctcaaaacaataacctgcaggacgtcccaactacgttaaaaatgg
tacaaaaggaaagtatatatcgcggttgtaaaagttaccgtacactaactacgaccatattccagtagtttatcacgatgatgacaatactacca
cctttattacagattgacgtccgtcgatattgaaactgctatcagagcaggatattcgatagtcgaattaggggctttacaatgggataaat
attccagaacttaaaaacggtttactggatagtatcaagatgatttatgactgaacgcagttacaacaaataattttattggaacagctcataga
aaatattaactttaacaactctagtataatttcgtgtttttatacatttgccattagtatttgccgagcattcatttactcaattatggaaacatag
atccgggtgtatatactcagttcagttataaagaattatacgttagtagctcttataaagatattaatgaatccatgagtcagatggtaaaattat
aaaaagtgaaaaacaatattattttatcgttggtgtgtacactTCGACATTAATAAATTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGA
GGGTTGTGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATATGATTCAGGTGACGGATCCATGGACGCCATGA
AGCGGGGACTGTGTTGTGTGTTGCTGCTGTGCGGAGCCGTGTTCTGTCTCCCAGCCAAGAGATCCACGCCA
GGTTCAGAAGAGAGACACATCAGAACATCCAGCTGATCAACACCAACGGCTCTTGGCACATTAACAGCACCG
CTCTGAATTGCAATGAGTCCCTGAATACCGGATGGCTGGCCGGACTGTTTTACCAGCACAAAGTTCAACAGCA
GCGGCTGCCCTGAGAGACTGGCCAGCTGTGGATCTAGCGGATGCTGGCACTATCCACCTAGACCTTGCGGA
ATCGTGCCCGCCAAAAGCGTGTGTGGACCCGTCTATTGCTTTACCCCTAGTCCTGTGGTTGTGCGGCACAACCG
ACAGAAGCGGCGCTCCAACATATTCTGGGGCGCCAACGACACCGATGTGTTCTGTGCTGAACAACACCCGGC
CTCCACTCGGCAATTGGTTGCGCTGCACCTGGATGAACTCCACAGGCTTACCAAAGTGTGCGGCGCACCTC
CTTGTGGCTCCTCTGGATGTCTACCGACTGTTTTCGGAAGCACCCCGAAGCCACATACTCCAGATGCGGATC
TGCCCCCTGGATCACCCCAAGATGTATGGTGGATTATCCTTATCGGCTGTGGCATTATCCGTGCACGATCAAC
TACACCATCTTCAAAGTTCGGATGTACGTCGGCGGCGTGGAACACAGACTGGAAGCCGCTGTAAATTGGAC
CAGAGGCGAGAGATGTGATCTCGAGGACCGGGACAGATCCGAGTGATTaaccgagtttctgcattattgttaattcgat
gctggcaccatcaaagaatcacttctaaaagatatcaatatcacacatacaaatattactaccctattgaatgagacagccaaggttatcaagt
tagtaaaatctctgtagataaagaagatactgatattgtgaataatttcattaccaaaagaaataaaaacagagacaaaatagttaatagttt
gtctctataaaactggactttcgtttgtaaatggggctTttgtacaataaatgggtgttgccaatgattcatcccctgaatatcaatggatgtc
tcccatagattatcagatactgttatattaggagactgtttgtattttaacaatataatgtcccaattagatttacacaaaattgggctccatca
gttagattgttaaatattttaagaattttaataaggaaacactactaaagatagaagagaatgattacattaattcatcctttttccaacaaaag
gataaacgattttatcctataaacgacgattttatcacatatctacaggaggatattggtatagctttaagatagataactatgtagtaaaattt
gtattcgaggccacaaaattatatagtcccatggaaactacggcggagttcacagtagccaaatttctataacaatctaaaggagatgaa
aaaaaattaatcgtgtgtgcgtgggcatgggattaaactataaattaacattttacatactctgtataaacgtgttcttcatatgttgctattat
tgatacaaaactatggatggtcaggaactatcattgagatattcttctaaagttttttaaaggcgtttaacgagagaaaggacagtatcaaattc
gtgaaattactatcccacttttatccggcagttattaacagtaataatgtttataaactattttaaccgcatgtttcactttttcgaacatgaaaa
gagaactaactacgaatacgaagaggaaatattataattttccctagcactgtatttcggcagataaagtagataccgagctagctatcaa
attaggatttaaatctttggtacaatacataaagtttatcttttacagatggctctgttatacattaaaatttacgaactaccatgctgcgacaac
tttttacacgcagatcttaaacccgataatatcttactttttgattccaatgaaccaataataattcatctaaaggataaaaagtgtttttaatg
aacgtattaaatcggcattaaacgactttgacttttccaag

图33

对MVA-TPA-E2D123序列的描述：
MVA-TPA-E2D123布局：



图34

F11-L-侧接序列：

```
gtaatctattcgatataccgttgctaacagtatactggcccaataactgtggatggaaaatctataataacattaa
tatcatccgatgggtgctagggttatttggatggatgcgtataaattttcttgcggttatctttacaagactattgttgc
attggggtagcaaaccagagagccgaccattcgatttaataaaaaaatcagatgctaacgcaattctaaatcggtg
gtcaaagaatctatggcatccttgaaatccttgtaggagcattcgagacacaatcaggagcgtagaagtttaag
agtccatgtaggatgttttctgtttctagaatagaagacatgttcttaactagtgtcattaatagagtatccgagaata
ctggaatggggatgtattatcctaccaacgatataccttctctatttatcgaatcatctatctgtctagattatattata
gtaaataatcaggaatccaacaaatatcgtatcaaactctgttctcgatatcatttctcaaaacaataccctgcagga
cgtcccaactacgttaaaaaatggtacaaaaggaaagtatatatcgcggttgtaaagttaccgtacctactaacga
ccatattccagtagtttatcacgatgatgacaatactaccacctttattacagtattgacgtccgtcgatattgaaact
gctatcagagcaggatattcgatagtcgaattaggggctttacaatgggataataatattccagaacttaaaaacgg
tttactggatagatcaagatgatttatgacttgaacgcagttacaacaaataatttattggaacagctcatagaaaa
tattaactttaacaactctagtataatttctgtttttatacatttgccattagttattgccgagcattcatttactcaatt
atggaaaccatagatccggtgtatatatctcagttcagttataaagaattatacgttagtagctcttataaagatatta
atgaatccatgagtcagatggtaaaattataaaaaagtgaaaaacaatattttttatcgttggtgtttacact
```

mH5启动子序列：

```
TCGACATTAAAAATTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTTAAATTGAAAGCG
AGAAATAATCATAAATATGATTTCAGGTGACGGATCC
```

TPA序列：

```
ATGGACGCCATGAAGCGGGGACTGTGTTGTGTGTTGCTGCTGTGCGGAGCCGTGTTTCGTG
TCTCCAGCCAAGAGATCCACGCCAGGTTTCAGAAGA
```

TPA氨基酸序列：

```
MDAMKRGGLCCVLLCGAVFVSPSQEIHFRR
```

E2D123序列：

```
GAGACACATCAGAACATCCAGCTGATCAACACCAACGGCTCTTGGCACATTAACAGCACCG
CTCTGAATTGCAATGAGTCCCTGAATACCGGATGGCTGGCCGGACTGTTTTACCAGCACAA
GTTCAACAGCAGCGGCTGCCCTGAGAGACTGGCCAGCTGTGGATCTAGCGGATGCTGGCA
CTATCCACCTAGACCTTGCGGAATCGTGCCCGCCAAAAGCGTGTGTGGACCCGTCTATTGC
TTTACCCCTAGTCCTGTGGTTGTCGGCACAACCGACAGAAGCGGCGCTCCAACATATTCTT
GGGGCGCCAACGACACCGATGTGTTCTGTGCTGAACAACACCCGGCCTCCACTCGGCAATT
GGTTCCGGCTGCACCTGGATGAACTCCACAGGCTTCACCAAAGTGTGCGGCGCACCTCCTTG
TGGCTCCTCTGGATGTCCTACCGACTGTTTTCGGAAGCACCCCGAAGCCACATACTCCAGA
```

图35

TGCGGATCTGGCCCCTGGATCACCCCAAGATGTATGGTGGATTATCCTTATCGGCTGTGGC
ATTATCCGTGCACGATCAACTACACCATCTTCAAAGTGCGGATGTACGTCGGCGGCGTGGA
ACACAGACTGGAAGCCGCTGTAATTGGACCAGAGGCGAGAGATGTGATCTCGAGGACC
GGGACAGATCCGAGTGA

E2D123氨基酸序列:

ETHQNIQLINTNGSWHINSTALNCNESLNTGWLGLFYQHKNSSGCPERLASCGSSGCWHYP
PRPCGIVPAKSVCGPVYCFPTSPVVVGTTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNNTRPPLGNWFGC
TWMNSTGFTKVCGAPPCGSSGCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVDYPYRLWHYPCT
INYTIFKVRMYVGGVEHRLEAACNWSTRGERCDLEDNRDRSE

F11-R-侧接序列:

TTaaccgagtttctgcattattgtaattcgtatgctggcaccatcaaagaatcacttctaaaagatatcaatatcacacatacaaat
attactaccctattgaatgagacagccaagggttatcaagttagtaaaatctctggtagataaagaagatactgatattgtgaataat
ttcattaccaagaataaaaaacagagacaaaatagttaatagtttgtctctatcaaacctggactttcgttgtaaattggggctT
ttgtacaataaatgggtgttgccaatgattcatccctgaatatcaatggatgtctcccatagattatcagatactgttatattagg
agactgtttgtattttaacaatataatgtcccaattagatttacacaaaattgggctccatcagttagattgttaattattttaaga
attttaataaggaaacactactaaagatagaagagaatgattacattaattcatccttttccaacaaaaggataaacgattttatc
ctataaacgacgatttttatcacatatctacaggaggataggtatagttcttaagatagataactatgtagtaaaattgtattcga
ggccacaaaattatagttcccatggaaactacggcggagttcacagtacccaaatttctataacaactctaaagggagatgaa
aaaaaattaatcgtgtgtgcgtgggcatgggattaaactataaattaacatttttacatactctgtataaacgtgttcttcatatgtt
gctattattgatacaaaactatggatggtcaggaactatcattgagatattcttctaaagttttttaaggcggttaacgagagaaag
gacagtatcaaattcgtgaaattactatcccacttttatccggcagttattaacagtaataattaatgttataaactattttaaccgcat
gtttcactttttcgaacatgaaaagagaactaactacgaatacgaagaggaaatattataattttccctagcactgtattcggc
agataaagtagataccgagctagctatcaaattaggatttaaatctttggtacaatacataaagtttatcttttacagatggctctg
ttatacattaaaatttacgaactaccatgctgcgacaacttttacacgcagatcttaacccgataatatcttacttttgattccaat
gaaccaataataattcatctaaaggataaaaagttgttttaataaacgtattaaatcggcattaaacgactttgacttttccaag

图35 (续)