



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104583231 B

(45) 授权公告日 2021. 02. 26

(21) 申请号 201380028044.9

C12N 15/867 (2006.01)

(22) 申请日 2013.03.29

C07K 14/16 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104583231 A

(56) 对比文件

WO 2011/011584 A1, 2011.01.27

(43) 申请公布日 2015.04.29

Kouki Morizono et al.Redirecting

(30) 优先权数据

Lentiviral Vectors Pseudotyped with

13/436,472 2012.03.30 US

Sindbis Virus-Derived Envelope Proteins

61/666,103 2012.06.29 US

to DC-SIGN by Modification of N-Linked

61/732,756 2012.12.03 US

Glycans of Envelope Proteins.《JOURNAL OF

61/789,575 2013.03.15 US

VIROLOGY》.2010,第84卷(第14期),6923-6934.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Nicole Sunseri et al.Human

2014.11.27

Immunodeficiency Virus Type 1 Modified To

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/034640 2013.03.29

Package Simian Immunodeficiency Virus Vpx

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/149167 EN 2013.10.03

Efficiently Infects Macrophages and

Dendritic Cells.《JOURNAL OF VIROLOGY》

.2011,第85卷(第13期),6263-6274.

(73) 专利权人 免疫设计公司

Nadine Laguette et al.Evolutionary

地址 美国华盛顿州

and Functional Analyses of the

Interaction between the Myeloid

Restriction Factor SAMHD1 and the

(72) 发明人 克里斯多福·詹姆士·尼可莱

山米·U.·塔林

Lentiviral Vpx Protein.《Cell Host &

Microbe》.2012,205-217.

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限

审查员 刘苗

公司 11243

代理人 许静 黄灿

(51) Int.Cl.

C07K 14/18 (2006.01)

权利要求书3页 说明书69页

序列表173页 附图37页

(54) 发明名称

具有对表达DC-SIGN的细胞改善的转导效率
的慢病毒载体粒子

(57) 摘要

本发明提供了可用于生成包含Vpx蛋白的高
度甘露糖化假型化慢病毒载体粒子的材料和方
法。

1. 一种生成假型化慢病毒载体粒子的方法,所述方法包括:
 - (a) 在包含kifunensine的培养基中培养病毒包装细胞,所述病毒包装细胞包含:
 - (1) 含有编码第一目标序列的外源性多核苷酸的慢病毒载体基因组,
 - (2) 编码辛德毕斯E2糖蛋白的多核苷酸,所述辛德毕斯E2糖蛋白优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞,以及
 - (3) 编码保持SAMHD1抑制活性的Vpx蛋白或Vpr蛋白的多核苷酸;以及
 - (b) 分离优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的假型化慢病毒载体粒子。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述编码辛德毕斯E2糖蛋白的多核苷酸编码SEQ ID NO:30所示的辛德毕斯E2糖蛋白,其具有以下三个特征(i) 所述E2糖蛋白的残基160不存在或为非谷氨酸的氨基酸,(ii) 所述E2糖蛋白的残基70、76或159中的一个或多个为非碱性残基,并且(iii) 所述E2糖蛋白不是与辛德毕斯病毒E3糖蛋白的融合蛋白的一部分。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述E2糖蛋白为SEQ ID NO:30。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述Vpx蛋白是选自SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46及SEQ ID NO:47,且所述Vpr蛋白是SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一目标序列为肿瘤特异性抗原或病毒特异性抗原。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一目标序列选自以下者所组成之群组: NY-ESO-1、MAGE、MART-1/黑色素-A、BAGE、RAGE、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白、肾细胞癌抗原、5T4、SM22- α 、碳酸酐酶I、碳酸酐酶IX(也称为G250)、HIF-1 α 、HIF-2 α 、VEGF、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸盐、前列腺六跨膜表皮抗原(STEAP)、NKX3.1、端粒酶、存活素、间皮素、突变ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突变p53、野生型p53、细胞色素P450 1B1、N-乙酰氨基葡萄糖转移酶-V、人乳头瘤病毒蛋白E6、人乳头瘤病毒蛋白E7、癌胚抗原和甲胎蛋白。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一目标序列为HIV抗原、SIV抗原、腺病毒抗原、肠病毒抗原、冠状病毒抗原、杯状病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、埃博拉病毒抗原、黄病毒抗原、肝炎病毒抗原、疱疹病毒抗原、感染性腹膜炎病毒抗原、流感病毒抗原、白血病毒抗原、马尔堡病毒抗原、正粘病毒抗原、乳头状瘤病毒抗原、副流感病毒抗原、副粘病毒抗原、细小病毒抗原、痘病毒抗原、微小核糖核酸病毒抗原、脊髓灰质炎病毒抗原、痘病毒抗原、狂犬病毒抗原、呼肠孤病毒抗原、逆转录病毒抗原或轮状病毒抗原。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述慢病毒载体基因组还包含编码第二目标序列的核苷酸序列。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述第一和第二目标序列作为融合蛋白而表达,所述融合蛋白在两种目标序列之间包含自裂解A2肽。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中自裂解A2肽由SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57的氨基酸序列组成。
11. 根据权利要求8所述的方法,其中所述第一目标序列为NY-ESO-1并且所述第二目标序列为MAGE-A3。
12. 根据权利要求8所述的方法,其中所述第一和第二目标序列由双向启动子表达。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述kifunensine以0.1 μ g/ml至10 μ g/ml的浓度存

在于培养基中。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述kifunensine以0.25 μ g/ml至2 μ g/ml的浓度存在于培养基中。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述病毒包装细胞还包含:

- (i) 包含gag和pol基因的多核苷酸;以及
- (ii) 编码rev蛋白的多核苷酸。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述gag和pol基因为人类密码子优化的并且包含SEQ ID NO:54的位置1228至1509处的非优化窗。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中包含gag和pol基因的所述多核苷酸不含功能性rev应答元件(RRE)。

18. 根据权利要求15所述的方法,其中所述pol基因编码无活性整合酶。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述整合酶具有对应于HIV-1的整合酶的D64V突变。

20. 根据权利要求1所述的方法,其中所述慢病毒载体基因组衍生自HIV-1。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中所述慢病毒载体基因组具有灭活的3' 长末端重复序列(LTR)或自灭活3' 长末端重复序列(LTR)。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述慢病毒载体基因组包含不含增强子序列、TATA盒、Sp1位点、NK- κ B位点或聚嘌呤区(PPT)中的至少一个的U3元件。

23. 根据权利要求1所述的方法,其中所述慢病毒载体基因组包含SEQ ID NO:21、22或23任一者的核苷酸序列。

24. 根据权利要求1所述的方法,其中所述慢病毒载体基因组还包含编码树突细胞成熟/刺激因子的核苷酸序列。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述树突细胞成熟/刺激因子选自由以下者所组成之群组:GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、TNF α 、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40配体和药物诱导型CD40。

26. 根据权利要求1所述的方法,其中所述编码第一目标序列的外源性多核苷酸序列可操作地连接到选自由以下者所组成之群组的启动子:人泛素-C启动子(UbiC)、巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)、劳氏肉瘤病毒启动子(RSV)和四环素反应性启动子。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述启动子为内含子缺陷型启动子。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述内含子缺陷型启动子为UbiC启动子。

29. 通过根据权利要求1所述的方法产生的慢病毒载体粒子。

30. 通过根据权利要求15所述的方法产生的慢病毒载体粒子。

31. 一种生成假型化慢病毒载体粒子的方法,所述方法包括:

(a) 在包含kifunensine的培养基中培养病毒包装细胞,所述病毒包装细胞包含:

(1) 含有编码MAGE-A3和NY-ESO-1的多核苷酸的慢病毒载体基因组,其中将编码自裂解TA2肽的多核苷酸设置在编码MAGE-A3与NY-ESO-1的所述多核苷酸之间,其中所述慢病毒基因组不含聚嘌呤区(PPT),并且其中MAGE-A3和NY-ESO-1的表达受不含内含子的UbiC启动子控制,

(2) 编码优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的辛德毕斯E2糖蛋白的多核苷酸,

(3) 包含人类密码子优化的gag和pol基因的多核苷酸,其中所述多核苷酸不含功能性rev应答元件(RRE)并且其中所述pol基因编码无活性整合酶,

(4) 编码保持SAMHD1抑制活性的Vpx蛋白或Vpr蛋白的多核苷酸,以及

(b) 分离优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的假型化慢病毒载体粒子。

具有对表达DC-SIGN的细胞改善的转导效率的慢病毒载体粒子

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年3月30日提交的美国专利申请号13/436,472(现为2012年12月4日公布的美国专利号8,323,662);以及2012年6月29日提交的美国临时专利申请号61/666,103、2012年12月3日提交的美国临时专利申请号61/732,756和2013年3月15日提交的美国临时专利申请号61/789,575的优先权,所有这些专利均以引用方式整体并入本文。

[0003] 以电子方式提交的材料的援引并入

[0004] 以引用方式整体并入的是与此同时提交并标识如下的计算机可读氨基酸/核苷酸序列列表:一份246,173字节的ASCII(文本)文件,名称为“46417A_SeqListing.txt”,创建日期为2013年3月29日。

技术领域

[0005] 本公开涉及可用于生成改良的假型化慢病毒载体粒子的材料和方法。

背景技术

[0006] 树突细胞(DC)是用于引发和控制免疫反应的基本抗原呈递细胞。DC可捕获和加工抗原,从外周迁移到淋巴器官,并以主要组织相容性复合体(MHC)限制性方式将抗原呈递至静息T细胞。这些细胞来源于骨髓(BM)并且显示出树枝状形态和高迁移率。DC作为特化的抗原呈递细胞(APC)这一发现已促进了在基于DC的免疫/接种策略方面的尝试,所述策略涉及靶向用于展示特异性抗原的DC。已开发了基于重组病毒的载体,作为将编码指定抗原的基因直接递送至宿主细胞的机理。通过诱导所需的适应性免疫反应,所表达的基因产物提供了治疗有益效果。

[0007] 实现安全且有效的系统所面临的挑战包括设计有效靶向所需宿主细胞组的载体、提供合适的递送系统、以及表达引起有效免疫反应的所需抗原以便其可广泛地用于指定的受试人群。

[0008] 本文所公开的辛德毕斯病毒(Sindbis virus)和其他甲病毒的包膜糖蛋白并入病毒粒子膜的脂质双层中。通常,病毒膜(包膜)包含由单一前体蛋白的裂解产生的两种糖蛋白异源二聚体E1和E2的三聚体的多个拷贝。从其N端至C端,前体蛋白包含E3、E2、6K和E1蛋白。小的E3糖蛋白充当E2蛋白易位到膜中的信号序列,并通过弗林蛋白酶或一些其他Ca²⁺依赖性丝氨酸蛋白酶从E2裂解。6K蛋白充当E1蛋白易位到膜中的信号序列,并且随后从前体蛋白裂解。WO 2008/011636和US 2011/0064763公开了慢病毒包装系统。

发明内容

[0009] 本发明人已发现,表现出以下两种特性的慢病毒载体粒子具有出人意料改善的对表达DC-SIGN的细胞的转导效率:(a)用高度甘露糖化的甲病毒糖蛋白假型化和(b)包含Vpx蛋白。这些粒子比只具有这两种特性之一的慢病毒载体粒子明显更有效地感染表达DC-

SIGN的细胞,尤其是树突细胞。在特定的情况下,提供了包含Vpx蛋白和含有目标序列(例如,编码抗原的多核苷酸)的慢病毒基因组的高度甘露糖化假型化慢病毒载体粒子。

[0010] 生成假型化慢病毒载体粒子的方法

[0011] 本公开的一个方面提供生成假型化慢病毒载体粒子的方法,该方法包括:(a)在包含甘露糖苷酶抑制剂(优选甘露糖苷酶I抑制剂)的培养基中培养病毒包装细胞,该病毒包装细胞包含:(1)含有编码外源性抗原的多核苷酸的慢病毒载体基因组,(2)编码优先地结合表达DC-SIGN的细胞的甲病毒糖蛋白的多核苷酸,以及(3)编码SAMHD1抑制剂的多核苷酸;以及(b)分离优先地结合表达DC-SIGN的细胞的假型化慢病毒载体粒子。

[0012] 本公开的另一个方面提供生成假型化慢病毒载体粒子的方法,该方法包括:(a)在包含kifunensine的培养基中培养病毒包装细胞,该病毒包装细胞包含:(1)含有编码外源性抗原的多核苷酸的慢病毒载体基因组,(2)编码优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的辛德毕斯E2糖蛋白的多核苷酸,以及(3)编码保持SAMHD1抑制活性的Vpx蛋白或Vpr蛋白的多核苷酸;以及(b)分离优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的假型化慢病毒载体粒子。在一些实施方案中,E2糖蛋白与SEQ ID NO:30[SIN-Var1]具有90%同一性。在一些实施方案中,(i)E2糖蛋白的残基160不存在或为非谷氨酸的氨基酸,(ii)E2糖蛋白变体的残基70、76或159中的一个或多个为非碱性残基,并且(iii)E2糖蛋白变体不是与辛德毕斯病毒E3糖蛋白的融合蛋白的一部分。在一些实施方案中,E2糖蛋白为SEQ ID NO:30[SIN-Var1]。

[0013] 在本文所述的一些或任何实施方案中,Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx(SEQ ID NO:44)具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0014] 在本文所述的一些或任何实施方案中,Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx(SEQ ID NO:44)、SIVsm Vpx(SEQ ID NO:45)、SIVrcm Vpx(SEQ ID NO:46)或HIV-2Vpx(SEQ ID NO:47)具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0015] 在本文所述的一些或任何实施方案中,Vpr蛋白包含与SIVdeb Vpr(SEQ ID NO:48)或SIVmus Vpr(SEQ ID NO:49)具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0016] 在本文所述的一些或任何实施方案中,抗原为肿瘤特异性抗原或病毒特异性抗原。在本文所述的一些或任何实施方案中,肿瘤特异性抗原选自NY-ESO-1、MAGE(例如,MAGE-A3和MAGE-A1)、MART-1/黑色素-A(Melan-A)、BAGE、RAGE、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白(例如,TRP2)、肾细胞癌抗原、5T4、SM22- α 、碳酸酐酶I、碳酸酐酶IX(也称为G250)、HIF-1 α 、HIF-2 α 、VEGF、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸盐、前列腺六跨膜表皮抗原(STEAP)、NKX3.1、端粒酶、存活素、间皮素、突变ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突变p53、野生型p53、细胞色素P4501B1、N-乙酰氨基葡萄糖转移酶-V、人乳头瘤病毒蛋白E6、人乳头瘤病毒蛋白E7、癌胚抗原、梅克尔细胞病毒T抗原癌蛋白和甲胎蛋白。在本文所述的一些或任何实施方案中,病毒特异性抗原为HIV抗原、SIV抗原、腺病毒抗原、肠病毒抗原、冠状病毒抗原、杯状病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、埃博拉病毒抗原、黄病毒抗原、肝炎病毒抗原、疱疹病毒抗原、感染性腹膜炎病毒抗原、流感病毒抗原、白血病毒抗原、马尔堡病毒(Marburg virus)抗原、正粘病毒抗原、乳头状瘤病毒抗原、副流感病毒抗原、副粘病毒抗原、细小病毒抗原、痘病毒抗原、微小核糖核酸病毒抗原、脊髓灰质炎病毒抗原、痘病毒抗原、多瘤病毒抗原、狂犬病毒抗原、呼肠孤病毒抗原、逆转录病毒抗原或轮状病毒抗原。

[0017] 在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组还包含编码第二抗原的核苷酸序列。在本文所述的一些或任何实施方案中,第一和第二抗原作为在这两种抗原之间包含自裂解A2肽的融合蛋白而表达。在本文所述的一些或任何实施方案中,自裂解A2肽包含SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在本文所述的一些或任何实施方案中,第一抗原为MAGE-A3并且第二抗原为NY-ESO-1。

[0018] 在本文所述的一些或任何实施方案中,kifunensine以约0.01 μ g/ml至约1mg/ml的浓度存在于培养基中。在本文所述的一些或任何实施方案中,kifunensine以约0.1 μ g/ml至约1 μ g/ml的浓度存在于培养基中。在本文所述的一些或任何实施方案中,kifunensine以约0.25 μ g/ml至约2 μ g/ml的浓度存在于培养基中。

[0019] 在本文所述的一些或任何实施方案中,病毒包装细胞还包含:(i)含有gag和pol基因的多核苷酸;以及(ii)编码rev蛋白的多核苷酸。在本文所述的一些或任何实施方案中,gag和pol基因为人类密码子优化的并且包含SEQ ID NO:54的位置1228至1509周围的非优化窗。在本文所述的一些或任何实施方案中,包含gag和pol基因的多核苷酸不含功能性rev应答元件(RRE)。在本文所述的一些或任何实施方案中,包含gag和pol基因的多核苷酸不含功能性RRE,因为RRE已缺失。在本文所述的一些或任何实施方案中,pol基因编码无活性整合酶。在本文所述的一些或任何实施方案中,整合酶具有D64V突变。

[0020] 在本文所述的一些或任何实施方案中,编码Vpx蛋白或Vpr蛋白的多核苷酸与编码rev蛋白的多核苷酸或者包含gag和pol基因的多核苷酸在相同或不同的质粒上。

[0021] 在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组衍生自HIV-1。

[0022] 在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组具有灭活的3'长末端重复序列(LTR)或自灭活3'长末端重复序列(LTR)。在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组包含不含增强子序列、TATA盒、Sp1位点、NK- κ B位点或聚嘌呤区(PPT)中的至少一个的U3元件。

[0023] 在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组包含SEQ ID NO:21[SIN载体]、22[703载体]或23[704载体]任一者的核苷酸序列。

[0024] 在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组还包含编码树突细胞成熟/刺激因子的核苷酸序列。在本文所述的一些或任何实施方案中,树突细胞成熟/刺激因子选自GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、TNF α 、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40配体和药物诱导型CD40。

[0025] 在本文所述的一些或任何实施方案中,编码抗原的核苷酸序列可操作地连接到选自人泛素-C启动子(UbiC)、巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)、劳氏肉瘤病毒启动子(RSV)和四环素反应性启动子的启动子。在本文所述的一些或任何实施方案中,启动子为内含子缺陷型启动子。在本文所述的一些或任何实施方案中,内含子缺陷型启动子为UbiC。

[0026] 本公开的相关方面提供通过上述任何方法所产生的慢病毒载体粒子。

[0027] 包含假型化慢病毒载体粒子的组合物

[0028] 本公开的另一个方面提供包含假型化慢病毒载体粒子的组合物,该假型化慢病毒载体粒子包含(a)SAMHD1抑制剂,(b)编码抗原的外源性多核苷酸,以及(c)优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的包膜糖蛋白,其中所述组合物中至少60%,或至少70%,或至少80%,优选至少90%的N连接聚糖包含Man₅至Man₉结构,优选Man₉。

[0029] 本公开的另一个方面提供包含假型化慢病毒载体粒子的组合物,该假型化慢病毒载体粒子包含 (a) Vpx蛋白, (b) 编码抗原的外源性多核苷酸,以及 (c) 优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的包膜糖蛋白,其中所述组合物中至少80%的N连接聚糖包含Man₉结构。

[0030] 在本文所述的一些或任何实施方案中,Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx蛋白 (SEQ ID NO:44) 具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0031] 在本文所述的一些或任何实施方案中,Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx (SEQ ID NO:44)、SIVsm Vpx (SEQ ID NO:45)、SIVrcm Vpx (SEQ ID NO:46) 或HIV-2Vpx (SEQ ID NO:47) 具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0032] 在本文所述的一些或任何实施方案中,Vpr蛋白包含与SIVdeb Vpr (SEQ ID NO:48) 或SIVmus Vpr (SEQ ID NO:49) 具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0033] 在本文所述的一些或任何实施方案中,假型化慢病毒载体粒子以至少1%,或至少5%,或至少10%,或至少20%的体外转导效率感染表达DC-SIGN的树突细胞。参见例如实施例8的程序。

[0034] 在本文所述的一些或任何实施方案中,糖蛋白为辛德毕斯病毒E2糖蛋白。在本文所述的一些或任何实施方案中,E2糖蛋白与SEQ ID NO:30[SIN-Var1]具有至少90%的同一性。在本文所述的一些或任何实施方案中, (i) E2糖蛋白的残基160不存在或为非谷氨酸的氨基酸, (ii) E2糖蛋白变体的残基70、76或159中的一个或多个为非碱性残基,并且 (iii) E2糖蛋白变体不是与辛德毕斯病毒E3糖蛋白的融合蛋白的一部分。

[0035] 在本文所述的一些或任何实施方案中,抗原为肿瘤特异性抗原或病毒特异性抗原。在本文所述的一些或任何实施方案中,肿瘤特异性抗原选自NY-ESO-1、MAGE (例如, MAGE-A3和MAGE-A1)、MART-1/黑色素-A、BAGE、RAGE、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白 (例如, TRP2)、肾细胞癌抗原、5T4、SM22- α 、碳酸酐酶I、碳酸酐酶IX (也称为G250)、HIF-1 α 、HIF-2 α 、VEGF、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、前列腺特异性抗原 (PSA)、前列腺酸性磷酸盐、前列腺六跨膜表皮抗原 (STEAP)、NKX3.1、端粒酶、存活素、间皮素、突变ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突变p53、野生型p53、细胞色素P4501B1、N-乙酰氨基葡萄糖转移酶-V、人乳头瘤病毒蛋白E6、人乳头瘤病毒蛋白E7、癌胚抗原、梅克尔细胞病毒T抗原癌蛋白和甲胎蛋白。在本文所述的一些或任何实施方案中,病毒特异性抗原为HIV抗原、SIV抗原、腺病毒抗原、肠病毒抗原、冠状病毒抗原、杯状病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、埃博拉病毒抗原、黄病毒抗原、肝炎病毒抗原、疱疹病毒抗原、感染性腹膜炎病毒抗原、流感病毒抗原、白血病病毒抗原、马尔堡病毒抗原、正粘病毒抗原、乳头状瘤病毒抗原、副流感病毒抗原、副粘病毒抗原、细小病毒抗原、痘病毒抗原、微小核糖核酸病毒抗原、脊髓灰质炎病毒抗原、痘病毒抗原、狂犬病毒抗原、呼肠孤病毒抗原、逆转录病毒抗原或轮状病毒抗原。

[0036] 在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组还包含编码第二抗原的核苷酸序列。在本文所述的一些或任何实施方案中,第一和第二抗原作为在这两种抗原之间包含自裂解A2肽的融合蛋白而表达。在本文所述的一些或任何实施方案中,自裂解A2肽包含SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在本文所述的一些或任何实施方案中,第一抗原为NY-ESO-1并且第二抗原为MAGE-A3。

[0037] 在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组衍生自HIV-1。

[0038] 在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组具有灭活的3' 长末端重

复序列 (LTR) 或自灭活3' 长末端重复序列 (LTR)。在一些方面,慢病毒载体基因组包含不含增强子序列、TATA盒、Sp1位点、NK-κB位点或聚嘌呤区 (PPT) 中的至少一个的U3元件。

[0039] 在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组包含SEQ ID NO:21[SIN载体]、22[703载体]或23[704载体]任一者的核苷酸序列。

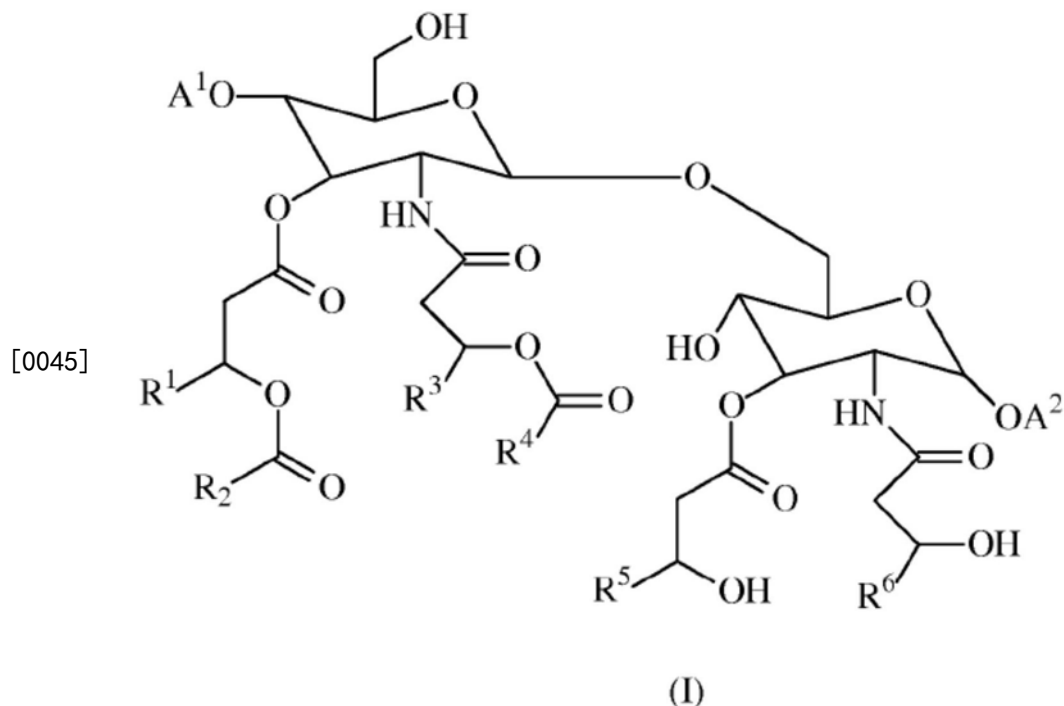
[0040] 在本文所述的一些或任何实施方案中,慢病毒载体基因组还包含编码树突细胞成熟/刺激因子的核苷酸序列。在本文所述的一些或任何实施方案中,树突细胞成熟/刺激因子选自GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、TNFα、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40配体和药物诱导型CD40。

[0041] 在本文所述的一些或任何实施方案中,编码抗原的核苷酸序列可操作地连接到选自人泛素-C启动子 (UbiC)、巨细胞病毒立即早期启动子 (CMV)、劳氏肉瘤病毒启动子 (RSV) 和四环素反应性启动子的启动子。在本文所述的一些或任何实施方案中,启动子为内含子缺陷型启动子。在本文所述的一些或任何实施方案中,内含子缺陷型启动子为人泛素-C (UbiC) 启动子。

[0042] 在本文所述的一些或任何实施方案中,假型化慢病毒载体粒子具有至少 10^5 /mL的IU。

[0043] 在本文所述的一些或任何实施方案中,组合物还包含免疫刺激剂。

[0044] 在本文所述的一些或任何实施方案中,组合物还包含佐剂。例如,如本文所公开,佐剂包括明矾或3De-O-酰化单磷酸脂A (MPL)。本文所公开的佐剂的类别包括:(a) 铝盐;(b) 水包油乳液制剂,任选地含有或不含其他特异性免疫刺激剂,诸如胞壁肽或其他细菌细胞壁组分;(c) 皂草苷佐剂,包括ISCOM(免疫刺激复合物)和ISCOMATRIX;(d) 完全弗氏佐剂 (CFA) 和不完全弗氏佐剂 (IFA);(e) 细胞因子;以及(f) 式 (I) 的佐剂。



[0046] 其中部分A1和A2独立地选自氢、磷酸酯和磷酸盐的组。钠和钾是用于磷酸盐的示例性反离子。部分R¹、R²、R³、R⁴、R⁵和R⁶独立地选自具有3至23个碳(由C₃-C₂₃表示)的烃基组。为增加明晰度,要说明的是,当部分是“独立地选自”具有多个成员的规定组时,应了解选择

用于第一部分的成员不以任何方式影响或限制对选择用于第二部分的成员的选择。与R¹、R³、R⁵和R⁶连接的碳原子都是不对称的,因此所述碳原子可以R或S立体化学形式存在。在一个实施方案中,所有的那些碳原子都是呈R立体化学形式,而在另一实施方案中,所有的那些碳原子都是呈S立体化学形式。

[0047] 在本公开的各个实施方案中,佐剂具有式(I)的化学结构,但部分A₁、A₂、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅和R₆选自先前针对这些部分所提供的选项的子集,其中这些子集下文通过E₁、E₂等来标示。

[0048] E₁:A₁是磷酸酯或磷酸盐并且A₂为氢。

[0049] E₂:R¹、R³、R⁵和R⁶是C₃-C₂₁烷基;并且R²和R⁴是C₅-C₂₃烃基。

[0050] E₃:R¹、R³、R⁵和R⁶是C₅-C₁₇烷基;并且R²和R⁴是C₇-C₁₉烃基。

[0051] E₄:R¹、R³、R⁵和R⁶是C₇-C₁₅烷基;并且R²和R⁴是C₉-C₁₇烃基。

[0052] E₅:R¹、R³、R⁵和R⁶是C₉-C₁₃烷基;并且R²和R⁴是C₁₁-C₁₅烃基。

[0053] E₆:R¹、R³、R⁵和R⁶是C₉-C₁₅烷基;并且R²和R⁴是C₁₁-C₁₇烃基。

[0054] E₇:R¹、R³、R⁵和R⁶是C₇-C₁₃烷基;并且R²和R⁴是C₉-C₁₅烃基。

[0055] E₈:R¹、R³、R⁵和R⁶是C₁₁-C₂₀烷基;并且R²和R⁴是C₁₂-C₂₀烃基。

[0056] E₉:R¹、R³、R⁵和R⁶是C₁₁烷基;并且R²和R⁴是C₁₃烃基。

[0057] E₁₀:R¹、R³、R⁵和R⁶是十一烷基并且R²和R⁴是十三烷基。

[0058] 在某些选项中,E₂至E₁₀中的每一个都与实施方案E₁组合,和/或E₂至E₉的烃基为烷基,优选直链烷基。优选的佐剂是E₁与E₁₀的组合,其中(i) A₁是磷酸酯或磷酸盐并且A₂是氢以及(ii) R¹、R³、R⁵和R⁶是十一烷基并且R²和R⁴是十三烷基。

[0059] 在本文所述的一些或任何实施方案中,包膜糖蛋白还结合表达小鼠SIGNR1的细胞。

[0060] 在本文所述的一些或任何实施方案中,假型化慢病毒载体粒子还与不表达小鼠SIGNR1的细胞相比更有效地转导表达小鼠SIGNR1的细胞。

[0061] 通过以下具体实施方式,本公开的其他特征和优点将变得显而易见。然而,应当理解,具体实施方式和具体实例虽然指出了本公开的具体实施方案,但仅以举例说明的方式给出,因为本公开精神和范围内的各种变化和修改通过以下具体实施方式对本领域的技术人员将变得显而易见。

附图说明

[0062] 图1A和1B示出了在存在各种甘露糖苷酶抑制剂(例如kifunensine、DMNJ和苦马豆素)的情况下产生的假型化慢病毒载体粒子感染稳定表达DC-SIGN受体(1A)或不含DC-SIGN(1B)的HT1080细胞的能力。通过测定慢病毒载体的GFP表达评估了感染效率。y轴是GFP阳性细胞的百分比。

[0063] 图2A和2B示出了在存在400μg/ml DMNJ或各种浓度的kifunensine的情况下产生的假型化慢病毒载体粒子感染稳定表达DC-SIGN受体(2A)或不含DC-SIGN(2B)的HT1080细胞的能力。如图1中评估了感染效率。

[0064] 图3A是示出了PNGaseF和EndoH的底物特异性的示意图。PNGaseF是将裂解所有N连接糖基化而不论糖基化模式的通用内切糖苷酶。EndoH是将仅裂解高甘露糖N连接糖基化的

专一内切糖苷酶。EndoH仅裂解高甘露糖N连接糖基化(即,EndoH将在不存在kifunensine的情况下靶向SINVar1上的4个位点中的2个,以及在存在kifunensine的情况下靶向SINVar1上的4个位点中的4个)。图3B示出了使用凝胶迁移通过以下方式测定在存在kifunensine或DMNJ的情况下所产生的假型化慢病毒载体粒子上糖蛋白的糖基化状态的实验的结果:在SDS-PAGE凝胶上运行并用抗辛德毕斯病毒包膜抗体进行免疫印迹检测。

[0065] 图4A示出了在存在400 μ g/ml DMNJ或各种浓度的kifunensine的情况下产生的假型化慢病毒载体粒子感染稳定表达DC-SIGN受体的HT1080细胞的能力。如图1中评估了感染效率。图4B示出了测定在图4A中所产生的假型化慢病毒载体粒子上E2糖蛋白的糖基化状态的实验的结果。

[0066] 图5A是在293T细胞中表达的HA标记的SIVmacVpx的Western印迹(抗HA)。将SIVmacVpx克隆进由CMV启动子驱动的哺乳动物表达载体(称为pENV-SIVmacVpx的构建体)。图5B是得自病毒粒子的病毒蛋白提取物的Western印迹(抗HA),该病毒粒子包含HA标记的SIVmacVpx。以每孔100ng将p24上样到凝胶上以用抗HA抗体进行免疫印迹检测。将抗p24抗体用作上样对照。

[0067] 图6是通过CD11c阳性树突细胞分类并评估GFP阳性细胞百分比(x轴;作为具有或不具有Vpx的VSV-G假型化、整合缺损型慢病毒感染的结果)而测定的转导事件的散点图,其中y轴上为DC-SIGN。

[0068] 图7是通过CD11c阳性树突细胞分类并评估GFP阳性细胞百分比(x轴;作为具有或不具有Vpx的VSV-G假型化、能够整合的慢病毒感染的结果)而测定的转导事件的散点图,其中y轴上为DC-SIGN。

[0069] 图8是通过CD11c阳性树突细胞分类并评估GFP阳性细胞百分比(x轴;作为具有或不具有Vpx的SINvar1假型化、整合缺损型慢病毒感染的并在存在或不存在kifunensine的情况下产生的树突细胞分类而测定的转导事件的散点图。y轴度量CD11c或DC-SIGN阳性细胞,而x轴度量GFP阳性细胞的百分比。

[0070] 图9A是根据实例1制备的辛德毕斯病毒糖蛋白的Western印迹,其中分别为无处理(泳道1-3)、400 μ g/ml DMNJ(泳道4-6)或1 μ g/ml kifunensine(泳道7-9)。粒子不用内切糖苷酶(泳道1、4、7)处理,与EndoH孵育1小时(泳道2、5、8)或与PNGaseF孵育1小时(泳道3、6、9)。然后使用凝胶迁移测定并用抗辛德毕斯病毒包膜抗体进行免疫印迹检测而分析样品。图9B(无甘露糖苷酶抑制剂)是泳道1-3的各条带的强度曲线及其在泳道上的位置。图9C(DMNJ处理)是泳道4-6的各条带的强度曲线及其在泳道上的位置。图9D(kifunensine处理)是泳道7-9的各条带的强度曲线及其在泳道上的位置。

[0071] 对于图10A,将293T huDC-SIGN细胞用载体转导,该载体通过野生型(WT)或缺损型整合酶(D64V)以及含有延伸的3' PPT(703)或3' PPT缺失(704)的载体基因组包装。在转导后48小时,对从转导细胞提取的基因组DNA进行了巢式Alu-PCR分析。误差条表示得自一式三份进行的转导的平均值的标准误差。图10B和10C使用两种独立的方法展示了编码GFP-T2A-NeoR的WT/703和D64V/704载体的整合率。对于图10B,将HT1080huDC-SIGN细胞用系列稀释的指定载体转导。转导细胞在G418选择和新霉素抗性集落下生长,从而代表了单独的整合事件,对细胞进行了计数。整合事件如实施例10中进行计算。对于图10C,将HT1080huDC-SIGN细胞用指定的载体转导。在转导后的多个时间点进行流式细胞术,以测定GFP表达性细胞的百分比。误差条表示得自一式三份流式细胞术的平均值的标准误差。

[0072] 图11:将人PBMC用GM-CSF和IL-4处理3天,然后与20ng编码GFP的ID-VP02的p24孵育。在添加载体时,培养物主要由DC、B细胞和T细胞组成。转导后三天,对细胞分析表面标志物,并归类为DC (CD11c^{pos}) 6%、B细胞 (CD11c^{neg}, CD19^{pos}) 10%或T细胞 (CD11c^{neg}, CD3ε^{pos}) 80%。通过评估各细胞群中GFP阳性细胞的百分比而测定转导事件。图中的数是GFP⁺分类中细胞的百分比。

[0073] 图12:展示了在各端含有长末端重复序列 (LTR) 的载体基因组的一部分 (顶部)。剪接供体 (SD) 和拼接受体 (SA) 位点位于psi包装信号 (Ψ)、部分gag序列和Rev应答元件 (RRE) 的侧翼。抗原启动子 (启动子) 与3' LTR之间的组件未重点显示并因此使用正斜杠标记 (/)。展示了WT gag/pol的一部分 (中间), 显示出了gag (黑色框) 和pol (灰色框) 基因, 然后是RRE。在WT gag/pol与载体基因组之间同源的两个组件 (RRE和gag的前354bp) 以方括号表示 (未按比例绘制)。载体基因组与WT gag/pol之间假设的重组区以连接线示出。展示了RI gag/pol的一部分 (底部), 显示出了密码子优化的gag和pol基因 (白色框以有别于野生型)。在gag与pol基因之间非密码子优化的移码以其天然密码子序列 (重叠的黑色和灰色框) 示出。用于psi-gag重组测定的引物以其在构建体上的大致位置示出。第一轮PCR引物以封闭的箭头表示, 并为709和710对 (以检测psi-gag重组体) 或709和378对 (以检测整合的载体基因组)。使用引物对709和378的整合载体的预期扩增子为1697bp。巢式PCR引物以开放的箭头表示, 并为863和835对 (以检测具有WT gag/pol的psi-gag重组体) 或863和864对 (以检测具有RI gag/pol的psi-gag重组)。使用psi-gag重组体引物对任一个的预期扩增子为937bp。

[0074] 图13:将293T细胞用WT gag/pol或RI gag/pol质粒在存在Rev质粒 (+) 或空骨架质粒 (empty backbone plasmid) (-) 的情况下转染。二十四小时后, 将细胞裂解, 并使用抗p24抗体分析Gag蛋白的表达。未加工的Gag蛋白 (p55) 和p24以箭头表示。将得自未转染细胞的裂解物作为对照包括在内。用抗肌动蛋白抗体确认了相等的孔负荷。

[0075] 图14A:用两种质粒量 (6μg或3μg) 的WT gag/pol或RI gag/pol产生了编码GFP的载体。载体上清液中所获得的p24水平在表格中示出。图14B:将293T细胞用2倍稀释的在14A中所产生的载体转导, 并在2天后分析GFP表达。计算了GFU/mL并绘制在y轴上。将用于制备载体 (6μg或3μg) 的gag/pol质粒的μg量绘制在x轴上。WT gag/pol和RI gag/pol分别以黑色或白色柱示出。

[0076] 图15:将C57BL/6小鼠用指定剂量 (2×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 TU) 的编码全长OVA的LV或仅用HBSS媒介物免疫。LV为能够整合的 (INT+) 或整合缺陷型的 (INT-), 并通过WT-或RI gag/pol生成, 如图所示。在免疫后第12天, 在离体肽再刺激后通过IFN-γ 的ICS测定了OVA₂₅₇特异性脾CD8T细胞的百分比。

[0077] 图16:将C57BL/6小鼠 (每组5只) 用 5×10^8 TU的整合缺陷型 (INT-) LV (其通过编码多表位抗原 (LV1b) 的WT或RI gag/pol生成, 所述多表位抗原含有H-2^b限制性OVA₂₅₇CD8T细胞表位) 免疫, 然后在免疫后第28天用 1×10^7 TCID₅₀野生型WR株疫苗病毒 (VV-WT)、WR株重组OVA疫苗病毒 (rVV-OVA) 激发, 或不进行激发。在第33天 (激发后第5天), 通过TCID₅₀测定测量了各动物的卵巢中的病毒载量。

[0078] 图17A:将293T细胞用WT gag/pol或RI gag/pol载体转导。两天后, 分离了基因组DNA, 并使用在载体基因组内结合的引物对709和378通过PCR分析了整合的前病毒DNA, 如图

12中以图表示出。在1%琼脂糖凝胶上观察PCR产物。载体基因组的扩增子大小以箭头示出。未将模板对照包括在PCR和凝胶中。图17B:通过第一轮PCR然后是巢式PCR对得自图17A的基因组DNA分析了前病毒psi-gag重组体。第一轮PCR分别使用了在载体基因组中结合的引物对709和710以及在gag/pol内的移码。在巢式PCR中,将1 μ l第一轮PCR产物用作模板,分别为不稀释(1:1),或按1:100或1:1000稀释。用于巢式PCR的引物对为863和835,或863和864。前一个引物对(863,835)分别在载体基因组和WT gag/pol中结合。后一个引物对(863,864)分别在载体基因组和RI gag/pol中结合。所有引物及其结合位点均在图12中以图表示出。包括模板,仅作为对照。在1%琼脂糖凝胶上观察所得的巢式PCR产物。psi-gag重组体的扩增子大小以箭头示出。图17C:将得自WT gag/pol的巢式PCR的条带(低于1kb的亮条带)克隆进TOPO-TA载体并测序。示出了WT gag/pol psi-gag重组体条带的序列,其中标记出了与载体基因组、部分gag或WTgag/pol对齐的区域。双斜杠(//)和点表示为了简洁起见而未示出的序列。序列上的编号表示在扩增子上的核苷酸位置。psi-gag重组体的碱基对1-414与载体基因组对齐,而bp 120-937与WT gag/pol对齐。为了参考,部分gag序列为重组体的bp 76-439。图17D:将得自RI gag/pol的巢式PCR的条带(1kb与3kb之间的模糊条带)克隆进TOPO-TA载体并测序。示出了RI gag/pol重组体条带的序列,其中标记出了与载体基因组或RI gag/pol对齐的区域。点表示为了简洁起见而未示出的序列。序列上的编号表示在扩增子上的核苷酸位置。RI重组体的碱基对1-1253与载体基因组对齐,而bp 1254-1329与RI gag/pol对齐。为了参考,部分gag序列为重组体的bp 76-439。完整的序列和比对在(补充性图S1B)中示出。

[0079] 图18:将HT1080细胞和稳定表达(A)人DC-SIGN(HT1080huDC-SIGN)、(B)、小鼠SIGNR1(HT1080mSIGNR1)、(C)小鼠SIGNR3(HT1080mSIGNR3)或(D)小鼠SIGNR5(HT1080mSIGNR5)的HT1080细胞与浓缩的(1,000倍)在存在或不存在kifunensine(kifu)的情况下产生的编码GFP的整合缺陷型VSV-G假型化载体或编码GFP的ID-VP02假型化载体孵育。

[0080] 图19A:对活的、单细胞事件分析了SIGNR1和SIGNR5在脾和淋巴细胞上的表达。示出了不含SIGNR1或SIGNR5特异性抗体的对照染色模式。图19B:将得自脾和淋巴结的活的、单细胞事件再分成B细胞(B220+TCR β -,标记的R4)、T细胞(TCR β +,B220-,标记的R5)和DC(B220-TCR β -MHC-II⁺CD11c^{hi},标记的R7)并随后分析了SIGNR5和SIGNR1的表达。对于所有亚组,阳性事件的频率在不含SIGNR1或SIGNR5特异性抗体的阴性对照株中 ≤ 0.00 。

[0081] 图20:通过流式细胞术分析了在皮下注射编码GFP的ID-VP02后在引流淋巴结中表达GFP的细胞的表型。将雌性BALB/c小鼠(每组15只)在足垫中经皮下注射 3×10^{10} 个编码GFP的ID-VP02、编码非荧光蛋白的对照ID-VP02的基因组,或不进行处理。四天后,从5只小鼠单独地混合腭淋巴结和颈部淋巴结(每个处理组3个混合样),并分析表达GFP的细胞的存在。(A)对得自腭(引流)淋巴结或颈部(非引流)淋巴结的活的、单事件分析了GFP表达。得自初始或阴性对照ID-VP02的腭淋巴结细胞用作阴性对照。(B)在得自用编码GFP的ID-VP02注射的小鼠的腭淋巴结的GFP⁺事件上CD11c和MHC-II的频率以覆盖在总B220-TCR β -事件(以灰色显示)上的黑色点示出,以作为参考。(C)SIGNR1在GFP⁺CD11c⁺MHC-II⁺事件上的表达,以包括(左图)和不包括(右图)SIGNR1特异性抗体示出。分类统计学是三个生物学重复样的平均值。图(A)中的值是每 1×10^6 个细胞的阳性事件数,而所有其他分类值为百分比。

[0082] 图21: C57BL/6小鼠(每组3只)在尾巴根部接受了单次皮下注射 3×10^{10} 个ID-VP02基因组。通过在注射后1、4、8、21或42天的定量PCR评价了指定组织中ID-VP02的生物分布,如通过逆转录载体DNA的存在所测定。腹股沟和颈部淋巴结分别作为引流和非引流淋巴结示出。将输入DNA归一化到200ng。通过标准曲线上的最低拷贝数定义了每个反应10个拷贝的定量限(LOQ)。将未在40个qPCR循环中扩增的样品指定为未检出(ND)。

[0083] 图22: (A) 将C57BL/6小鼠用编码全长OVA的ID-VP02的指定剂量(载体基因组)或仅用HBSS媒介物免疫。在免疫后第12天,通过ICS测定了OVA₂₅₇特异性脾CD8T细胞的百分比。(B) 通过以下方式测定了对编码OVA的ID-VP02的原发和继发CD8T细胞反应的动力学:以35天的间隔在初免-加强方案中将小鼠(每组5只)用 1×10^{10} 个ID-VP02的基因组免疫,然后在指定的时间点分析脾CD8T细胞反应。将免疫错开,使得可在同一天通过ICS分析所有组。(C) 在肽再刺激后在活CD8T细胞上的代表性细胞内IFN- γ 、TNF- α 和IL-2以及表面CD107a染色。(D) 表达IFN- γ 、TNF- α 、IL-2和CD107a的组合的CD8T细胞在原发和继发反应的峰值附近和收缩后(post contraction)的频率。表达任何其他效应分子的IFN- γ 阴性CD8T细胞的数量可忽略不计。(E) 通过在指定的时间点用CD127和KLRG1染色评估了CD44^{hi} H-2K^b-OVA₂₅₇五聚体⁺CD8T细胞的效应子/记忆表型。

[0084] 图23: (A) 实验方案:将C57BL/6小鼠(每组5只)用 5×10^{10} 、 1×10^{10} 或 2×10^9 个编码多表位抗原(LV1b)的ID-VP02的载体基因组免疫,所述多表位抗原含有H-2^b限制性OVA₂₅₇和LCMV GP₃₃CD8T细胞表位,然后在免疫后第35天用 1×10^7 TCID₅₀野生型WR株疫苗病毒(VV-WT)、WR株重组OVA疫苗病毒(rVV-OVA)激发,或不进行激发。在第40天(激发后第5天),测定了脾CD8T细胞反应和卵巢中的病毒载量。(B) 在离体肽再刺激后通过细胞内IFN- γ 和TNF- α 染色测定了OVA₂₅₇和LCMV GP₃₃特异性CD8T细胞反应。示出了CD8T细胞因子谱的代表性点阵图。(C) 各动物的OVA₂₅₇特异性IFN- γ +CD8T细胞的频率。(D) 各动物卵巢内的病毒载量(通过TCID₅₀测定测得)。

[0085] 图24: (A) 将BALB/c小鼠(每组5只)用指定剂量的编码AH1A5的ID-VP02的载体基因组(连接到OVA(OVA-AH1A5))或仅用HBSS媒介物免疫,AH1A5是内源性CT26肿瘤排斥表位AH1的不规则突变体(heteroclitic mutant)。在免疫后第12天,通过ICS测定了AH1A5或AH1特异性脾CD8T细胞的百分比。(B) 在免疫后十二天,将用染料标记的靶细胞(各自用AH1、AH1A5或对照肽进行脉冲)的1:1:1混合物经静脉内转移到免疫和初始小鼠(每组3只)中。第二天,收获脾脏,在初始与免疫小鼠之间比较了各细胞群的相对回收率,以计算特异性杀灭。(C) 将BALB/c小鼠(每组10只)用 4×10^9 个编码OVA-AH1A5的ID-VP02的载体基因组免疫。四周后,在小鼠右侧腹皮下注射 8×10^4 个CT26肿瘤细胞,并且当肿瘤超过100mm²时对小鼠实施安乐死。(D) 治疗性免疫:将BALB/c小鼠(每组10只)皮下注射 8×10^4 个CT26肿瘤细胞。四天后,将小鼠用 4×10^9 个编码OVA-AH1A5的ID-VP02的载体基因组免疫或不进行处理,并且在肿瘤超过100mm²后对小鼠实施安乐死。

具体实施方式

[0086] 本公开涉及可用于产生有效结合并高效感染表达DC-SIGN的细胞(例如树突细胞)的假型化慢病毒载体粒子的方法和材料。本公开中的方法和材料涉及以下出人意料的发现:在慢病毒载体粒子包膜中Vpx蛋白与高度甘露糖化(例如,通过将病毒包装细胞在存在

kifunensine的情况下培养)甲病毒糖蛋白(例如,辛德毕斯病毒糖蛋白)的组合产生比在包膜中不含Vpx蛋白或高度甘露糖化糖蛋白的慢病毒载体粒子明显更有效地感染表达DC-SIGN的非分化细胞(例如,树突细胞)的慢病毒载体粒子。本公开的一个有利方面在于:用辛德毕斯病毒E2糖蛋白假型化的并在存在kifunensine的情况下产生的慢病毒载体粒子,如在该粒子还在病毒粒子中含有Vpx蛋白,则明显更有效地感染树突细胞,从而允许将目标序列(例如,编码抗原的多核苷酸)递送到树突细胞并进行表达。

[0087] 定义

[0088] 术语“功能性片段”在关于多肽使用时意指截短的(即,从N端或C端失去一个或多个氨基酸)并保持所需活性的多肽。当关于Vpx蛋白使用时,“功能性片段”意指保持抑制SAMHD1的活性的能力的片段。该术语可类似地应用于截短的多核苷酸。

[0089] 术语“变体”当关于多肽使用时意指相对于亲本多肽具有一个或多个取代、缺失或插入的多肽。在一些情况下,变体是保持所需活性的变体。当关于Vpx蛋白使用时,“功能性变体”意指保持抑制SAMHD1的活性的能力的变体。该术语可类似地应用于相对于亲本多核苷酸具有一个或多个取代、缺失或插入的多核苷酸。

[0090] 如本文所用,术语“保守氨基酸取代”是将一个氨基酸用另一个具有相似性质(例如大小、电荷、疏水性、亲水性和/或芳香性)的氨基酸替代,并包括如下所示的交换:

[0091] 原始 示例性

[0092] Ala (A) val、leu、ile

[0093] Arg (R) lys、gln、asn

[0094] Asn (N) gln、his、asp、lys、gln

[0095] Asp (D) glu、asn

[0096] Cys (C) ser、ala

[0097] Gln (Q) asn、glu

[0098] Glu (E) asp、gln

[0099] Gly (G) ala

[0100] His (H) asn、gln、lys、arg

[0101] Ile (I) leu、val、met、ala、

[0102] phe、正亮氨酸

[0103] Leu (L) 正亮氨酸、ile、val、

[0104] met、ala、phe

[0105] Lys (K) arg、gln、asn

[0106] Met (M) leu、phe、ile

[0107] Phe (F) leu、val、ile、ala、tyr

[0108] Pro (P) ala

[0109] Ser (S) thr

[0110] Thr (T) ser

[0111] Trp (W) tyr、phe

[0112] Tyr (Y) trp、phe、thr、ser

[0113] Val (V) ile、leu、met、phe、

[0114] ala、正亮氨酸

[0115] 共有共同侧链性质的氨基酸残基通常如下分组。

[0116] (1) 疏水性: 正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;

[0117] (2) 中性亲水: cys、ser、thr;

[0118] (3) 酸性: asp、glu;

[0119] (4) 碱性: asn、gln、his、lys、arg;

[0120] (5) 影响链取向的残基: gly、pro; 以及

[0121] (6) 芳族: trp、tyr、phe。

[0122] 如本文所用, 术语“整合缺陷型”和“整合缺损型”可互换使用。整合缺陷型病毒载体是整合效率比能够整合的病毒载体低至少10倍 (优选至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、至少150倍、至少200倍、至少250倍、至少300倍、至少350倍、至少400倍、至少450倍、至少500倍、至少550倍、至少600倍、至少650倍、至少700倍、至少750倍、至少800倍、至少850倍、至少900倍、至少950倍或至少1000倍) 的载体。例如, 整合缺陷型可意指整合效率比未修饰成整合缺损型的病毒载体低至少约20倍至约100倍的载体。整合可通过本领域已知的任何方法进行测定, 例如通过PCR检测在Alu元件附近的整合事件。

[0123] “假型化”慢病毒是具有由区别于慢病毒基因组的病毒编码的一种或多种包膜糖蛋白的慢病毒粒子。包膜糖蛋白可如本文所述进行修饰、突变或工程化改造。

[0124] 如本文所用, 术语“外源性抗原”是指经过基因工程改造以在本文所公开的慢病毒载体中表达的抗原。因此, 该术语明确地包括衍生自经过基因工程改造以在本文所公开的慢病毒载体中表达的HIV的抗原。

[0125] 如本文所用, “优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞”的辛德毕斯E2糖蛋白是比不表达DC-SIGN的细胞更有效地结合表达DC-SIGN的树突细胞的糖蛋白。

[0126] 辛德毕斯病毒包膜蛋白包含四个N连接聚糖—两个在E2蛋白上, 两个在E1蛋白上。在不存在甘露糖苷酶I抑制剂的情况下在哺乳动物细胞中产生的病毒的两个N-聚糖具有高甘露糖结构 (一个E2N连接的聚糖和一个E1N连接的聚糖), 而其余两个具有复杂结构。两个复杂结构的N-聚糖暴露在包膜蛋白的表面上, 而两个高甘露糖结构的N聚糖埋在包膜蛋白的三聚体的中心。参见以引用方式并入本文的Morizono等人, J Virol, 84:14, 6923-34 (2010)。因此, 在具有在哺乳动物细胞中产生的辛德毕斯病毒糖蛋白的病毒粒子上通常50%的N连接聚糖将具有高甘露糖结构。“高度甘露糖化”的病毒粒子是其中病毒包膜糖蛋白上至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%或100%的N连接聚糖包含至少Man₅结构、优选Man₉的粒子, 通过例如质谱法所测得 (参见Crispin等人, JBC 2009)。

[0127] SAMHD1抑制剂

[0128] Vpx和Vpr

[0129] 在一些或任何实施方案中, SAMHD1抑制剂为Vpx蛋白或Vpr蛋白。Vpx尤其是由HIV-2、SIV乌黑白眉猴 (SIVsm)、SIV红帽白眉猴 (SIVrcm) 和SIV恒河猴 (SIVmac) 的病毒编码。HIV-2和SIV的Vpx是一种112个氨基酸 (aa)、18kDa的蛋白质, 并通过其与p55^{gag}前体的p6区的相互作用而大量包装在病毒粒子中。最近已表明, Vpx可抑制在人树突细胞和髓细胞中表达的限制性因子SAMHD1的活性。Laguette等人, Nature, 474, 654-657 (2011)。SAMHD1被鉴定

为使得人树突细胞和髓细胞能够高度耐HIV-1感染的限制性因子。

[0130] 来自SIV和HIV-2的Vpx在氨基酸水平上具有83%同一性。参见Goujon等人, J Virol, 82:24, 12335-12345 (2008)。因此, 可以假定, 在SIV与HIV-2之间不同的残基对Vpx功能不重要。此外, 他人已进行了对得自SIV和HIV-2的Vpx的突变分析, 该分析可用作产生用于本公开的材料和方法的Vpx变体的指导。参见Goujon等人。Asn26Ala、Ser52Ala和Ser63Ala/Ser65Ala突变体不影响Vpx功能。富含脯氨酸的C端11个残基缺失、Ser13Ala、Lys84Ala/Lys85Ala、Thr17Ala、Thr28Ala、Gly86Ala/Cys87Ala、Ser13Ala/Thr17Ala/Thr28Ala、His39Ala和Tyr66Ala/Tyr68Ala/Tyr71Ala、Trp49Ala/Trp53Ala/Trp56Ala以及Lys68Ala/Lys77Ala突变消除了Vpx活性。

[0131] 在一些或任何实施方案中, 本文所述的慢病毒载体粒子包含Vpx蛋白或其变体。在一些或任何实施方案中, 变体保持抑制SAMHD1的能力。在一些或任何实施方案中, 变体包含与SEQ ID NO:45 (SIVsm Vpx) 具有至少75%、80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列。在一些或任何实施方案中, 变体包含与SEQ ID NO:46 (SIVrcm Vpx) 具有至少75%、80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列。在一些或任何实施方案中, 变体包含与SEQ ID NO:44 (SIVmac Vpx) 具有至少75%、80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列。在一些或任何实施方案中, 变体包含与SEQ ID NO:47 (HIV-2) 具有至少75%、80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列。

[0132] Vpx的抗SAMHD1活性已定位于Vpx的N端86个残基。Gramberg等人, J Virol, 84:3, 1387-1396。因此, 在一些或任何实施方案中, 功能性片段包含Vpx的SAMHD1抑制区, 即, SEQ ID NO:44的氨基酸残基1至86。

[0133] 虽然Vpx仅存在于某些慢病毒中, 但是所有灵长类动物慢病毒均编码称为Vpr的与Vpx密切相关的基因。已知Vpr会导致细胞周期阻滞。然而, 最近, 已表明从SIVdeb和SIVmus分离的Vpr蛋白可抑制人SAMHD1。Lim等人, Cell Host&Microbe, 11, 194-204 (2012)。因此, 在一些或任何实施方案中, 本文所述的慢病毒载体粒子包含SAMHD1抑制性Vpr蛋白或其保持抑制SAMHD1的能力的变体。在一些或任何实施方案中, 变体包含与SEQ ID NO:48 (SIVdeb Vpr) 具有至少75%、80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列。在一些或任何实施方案中, 变体包含与SEQ ID NO:49 (SIVmus Vpr) 具有至少75%、80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列。

[0134] 得自Vpx蛋白的序列比对的信息可用于产生如上文所定义的Vpx的功能性变体和功能性片段变体。使氨基酸缺失和突变的技术是本领域熟知的。参见Ausubel, F.M. 等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, (1998), 包括到2011年的所有补遗。一般来讲, 为了构建功能性变体, 可在编码Vpx蛋白的病毒之间不同的位置引入非保守或保守取代或缺失, 因为这些位置往往允许非保守取代同时保持功能。对于具有在病毒之间保守的氨基酸残基的位置而言, 保留该残基或引入保守取代。根据本文所公开的或本领域已知的方法测试了Vpx、Vpr及其变体抑制SAMHD1活性的能力。参见以引用方式整体并入本文的Lim等人, Cell Host&Microbe, 11, 194-204 (2012) 和Lahouassa等人, Nature Immunol, 13:3, 223-229 (2012)。

[0135] 尽管之前的报道表明将SIVmac Vpx包装到HIV-1病毒粒子中需要对Gag蛋白的p6区进行修饰以类似于SIVmac p6 (Sunseri等人, J Virol, 86:6 (2012)), 但是本发明人出人

意料地发现了无需修饰p6或将Vpx融合到HIV-1Vpr即可将SIVmac Vpx有效地包装到本文所公开的基于HIV-1的假型化慢病毒载体中。因此,在一些或任何实施方案中,Vpx蛋白不融合到Vpr蛋白。相似地,在一些或任何实施方案中,包装细胞中的gag蛋白不相对于其天然序列进行修饰。

[0136] 在一些或任何实施方案中,Vpx蛋白融合到HIV-1Vpr蛋白。

[0137] 通常,将Vpx蛋白包装在病毒粒子中。然而,在一些或任何实施方案中,编码Vpx蛋白的基因包含在慢病毒基因组上并在病毒粒子感染靶细胞时表达。

[0138] 病毒载体包膜

[0139] 节肢动物传播病毒(虫媒病毒)是由受感染的节肢动物载体(诸如蚊子)传给宿主(诸如人、马或禽类)的病毒。虫媒病毒进一步分为包括甲病毒和黄病毒的病毒亚科,这些病毒具有阳极性的单链RNA基因组和含有糖蛋白的包膜。例如,登革热病毒、黄热病毒和西尼罗河病毒属于黄病毒科,而辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)和委内瑞拉马脑炎病毒则是甲病毒科的成员(Wang等人J.Virol.66,4992(1992))。辛德毕斯病毒的包膜包含两种跨膜糖蛋白(Mukhopadhyay等人Nature Rev.Microbio.3,13(2005)):E1,认为其对融合起作用;和E2,认为其对细胞结合起作用。已知辛德毕斯病毒包膜糖蛋白使其他逆转录病毒(包括致癌逆转录病毒和慢病毒)假型化。

[0140] 辛德毕斯病毒和其他甲病毒的包膜并入病毒粒子膜的脂质双层中,并通常包括两种糖蛋白E1和E2的多个拷贝。各种糖蛋白都具有跨膜区;E2具有约33个残基的细胞质结构域,而E1的细胞质尾极短(约2个残基)。E1和E2在跨膜区内或附近连接有棕榈酸。E2最初以前体蛋白合成,所述前体蛋白通过弗林蛋白酶或其他Ca²⁺依赖性丝氨酸蛋白酶裂解成E2和称为E3的小糖蛋白。位于编码E2和E1的序列之间的是编码称为6K的蛋白质的序列。E3和6K是用来将E2和E1糖蛋白分别易位到膜中的信号序列。在辛德毕斯病毒基因组中,辛德毕斯包膜蛋白的编码区包含编码E3、E2、6K和E1的序列。如本文所用,虫媒病毒的“包膜”包含至少E2,并且也可以包含E1、6K和E3。辛德毕斯病毒(株HR)的包膜糖蛋白的示例性序列呈现为SEQ ID No.17(E3、E2、6K和E1多聚蛋白)。其他虫媒病毒的包膜糖蛋白的序列可见于例如GenBank。例如,编码登革热病毒糖蛋白的序列可见于登录号GQ252677(在GenBank中还包括其他)并见于NCBI的病毒变异数据库中(针对包膜糖蛋白序列,将GenBank登录号和病毒变异数据库以引用方式并入),并且编码委内瑞拉马脑炎病毒包膜糖蛋白的序列可见于登录号NP_040824(针对包膜糖蛋白的序列,将其以引用方式并入)。

[0141] 应当理解,提及“E2糖蛋白的残基号”(诸如残基160、70、76或159)通过提及SEQ ID NO:18的蛋白质的氨基酸序列来定义,该蛋白为质辛德毕斯株HR(即,“辛德毕斯HR参考株”)的E2糖蛋白。例如,如果已产生了其中残基70已从SEQ ID NO:18缺失的辛德毕斯E2糖蛋白的变体,则“残基160”将指代这种变体的实际残基159。其他甲病毒中的类似位置可通过使同源性最大化的比对而确定。

[0142] 术语“连接”、“结合”、“靶向”等可交换使用,并且无意表明辛德毕斯病毒包膜糖蛋白与细胞组分之间的相互作用机理。DC-SIGN(捕获树突细胞特异性ICAM-3(细胞内粘附分子3)的非整合蛋白;又称为CD209)是一种能够迅速结合并内吞物质的C型凝集素样受体(Geijtenbeek,T.B.等人Annu.Rev.Immunol.22:33-54,2004)。E2似乎是经由DC-SIGN来将病毒靶向树突细胞。如本文所示,表达DC-SIGN的细胞通过用辛德毕斯病毒E2假型化的病毒

载体粒子来转导,这比不表达DC-SIGN的同基因细胞要好(至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍或至少10倍)。E2糖蛋白如何促进病毒感染的机理似乎涉及DC-SIGN,可能是经由与DC-SIGN的直接结合,或引起构型上的变化或一些其他机理。不管真实机理如何,通过E2的靶向是表达DC-SIGN的细胞(即树突细胞)所首选的。

[0143] 辛德毕斯病毒也经由硫酸乙酰肝素与细胞结合(Klimstra等人,J Virol 72:7357,1998;Burmes和Griffin,J Virol 72:7349,1998)。因为硫酸乙酰肝素和其他细胞表面粘多糖见于大多数细胞类型的表面上,所以希望减小硫酸乙酰肝素与辛德毕斯包膜糖蛋白之间的相互作用。这可通过削弱辛德毕斯病毒包膜与硫酸乙酰肝素的结合或增加辛德毕斯病毒包膜与树突细胞的结合(例如,增加亲合力)或两者兼有来实现。因此,降低了与其他分子的非特异性结合,所述其他分子可通过其他细胞类型表达并即使在包膜对DC-SIGN特异的情况下也可能出现,并且所改善的特异性可用以避免不希望的作用,诸如可能降低所需免疫反应的副作用或与其他细胞类型的脱靶转导相关的副作用。作为另外一种选择或删除表达DC-SIGN的细胞的相对特异的转导的优点之外,用辛德毕斯病毒包膜E2糖蛋白假型化的病毒粒子可提供优于由糖蛋白(诸如VSVG)假型化的病毒粒子的其他优点。此类优点的实例包括降低的补体介导的溶解和/或降低的神经元细胞靶向,据信这两者都与VSV-G假型化病毒粒子的施用相关。

[0144] 在多种实施方案中,本文所公开的慢病毒载体粒子特异地与表达DC-SIGN的细胞结合,而与硫酸乙酰肝素的结合降低或消除。也就是说,相对于其他细胞类型,辛德毕斯病毒包膜E2糖蛋白可被修饰以将病毒优先引导至表达DC-SIGN的树突细胞。基于尤其从结构研究和分子建模研究中获得的信息,设计和产生了包膜蛋白(尤其是E2和E1糖蛋白)的变体序列以使得糖蛋白保持它们作为包膜蛋白的功能,但具有所需的结合特异性、亲合力或结合水平。可产生各种糖蛋白的候选变体序列并且使用下文所述的方法或本领域已知的其他方法来测定,以鉴别出具有最合需要的特征的包膜糖蛋白。

[0145] 辛德毕斯E2的某些变体序列与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:18(E2辛德毕斯HR参考序列)相比在残基160处具有至少一个氨基酸改变。残基160缺失或变为不同于谷氨酸的氨基酸。改变最通常是至少一个氨基酸的取代,但作为另外一种选择可以为一个或多个氨基酸的添加或缺失。优选地,任何额外的氨基酸的数目很少并且不包含可能损害安全性的抗原表位(例如,血球凝集素标签序列)。当存在两个或更多个改变时,它们可为相同的类型(例如,取代)或不同的类型(例如,取代和缺失)。多个改变可散布或连续定位在蛋白质序列中。

[0146] 在一些实施方案中,变体序列包含在辛德毕斯病毒E2(SEQ ID NO:18)的约残基50至约残基180的区域内的至少一个氨基酸改变。这个区域内的氨基酸涉及与硫酸乙酰肝素的结合。通过减少E2的净正电荷,可减小与硫酸乙酰肝素的静电相互作用,从而导致与硫酸乙酰肝素结合的降低。这个区域内的候选带正电氨基酸包括在SEQ ID NO:18的残基63、70、76、84、97、104、129、131、133、139、148、149、159处的赖氨酸和在残基65、92、128、137、157、170、172处的精氨酸(Bear等人,Virology 347:183-190,2006)。这些氨基酸中的至少若干个直接参与E2与硫酸乙酰肝素的结合。净正电荷可通过缺失赖氨酸或精氨酸或用中性或带负电的氨基酸取代赖氨酸或精氨酸来减少。例如,这些赖氨酸和精氨酸中的一个或多个可由谷氨酸或天冬氨酸来置换。某些实施方案具有对赖氨酸70、76或159中的至少一个取代。

在E2表达为具有E3的多聚蛋白的情况下,与天然E3/E2裂解位点相邻的赖氨酸被保留—也就是说,识别序列和裂解位点并未改变。作为另外一种选择,天然内肽酶裂解位点序列由不同内肽酶的识别序列所置换。

[0147] 辛德毕斯病毒E2的某些变体也以积极影响与树突细胞结合的方式而被修饰。在参考HR序列(SEQ ID NO:18)中的残基160处所见的谷氨酸的改变可提高与树突细胞的结合(参见Gardner等人,J Virol 74,11849,2000,其整体并入本文)。在某些变体中,发现诸如缺失残基160或取代残基160的改变。在特定变体中,不带电荷的氨基酸由Glu取代,在其他变体中,非酸性氨基酸由Glu取代。通常,Glu160由小氨基酸或脂族氨基酸中的一个置换,所述小氨基酸或脂族氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸。

[0148] 其他变体包含两个或更多个(例如3、4或5个)氨基酸改变。通常,在这些变体中,改变之一是Glu160,而其余改变是横跨残基约50至约180的区域内的一个或多个赖氨酸和精氨酸的变化。某些变体包含Glu160到非酸性残基的改变或缺失,以及赖氨酸70、赖氨酸76或赖氨酸159由非碱性氨基酸的一个或多个改变。一些特定的变体包含Glu160到Gly、Lys 70到Glu和Lys 159到Glu;Glu 160到Gly、Lys 70、76和159到Glu;Glu 160和Lys 70和159到Glu的缺失;以及Glu 160和Lys 70、76和159到Glu的缺失。在一些实施方案中,E2变体与SEQ ID NO:30-43[SINvar1-14E2]的任一者具有介于80%和100%(例如,82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%或99%)之间的同一性。

[0149] 在某些情况下,E2蛋白首先表达为至少与E3融合的或与前导序列融合的多聚蛋白。不考虑前导序列是E3还是另一序列,病毒包膜中的E2应不具有E3或其他前导序列。换句话说,E2优选地不是E3/E2融合蛋白。在某些实施方案中,E2表达为E3-E2-6K-E1多聚蛋白的一部分。在这些实施方案中,多聚蛋白与SEQ ID NO:3-16[SINvar1-14多聚蛋白]的任一者具有介于80%和100%(例如82%、85%、87%、90%、92%、95%、97%或99%)之间的同一性。辛德毕斯病毒天然表达作为多聚蛋白的一部分的E2,并且E3/E2、E2/6K和6K/E1的接合区具有由内肽酶识别和裂解的序列。通常,在残基65与66之间,由弗林蛋白酶或弗林蛋白酶样丝氨酸内肽酶裂解E3/E2接合区。弗林蛋白酶对由两个氨基酸分隔的成对精氨酸残基具有特异性。为保持由弗林蛋白酶的E3/E2裂解,残基62-66(RSKRS;SEQ ID NO:26)应保持由两个氨基酸分隔的两个精氨酸残基和丝氨酸残基。作为另外一种选择,可使用不同的裂解序列来替换E3/E2弗林蛋白酶裂解序列或任何其他裂解序列。可将内肽酶的识别和裂解位点并入,所述内肽酶包括而限于:天冬氨酸内肽酶(例如,组织蛋白酶D、凝乳酶、HIV蛋白酶)、半胱氨酸内肽酶(菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、钙蛋白酶)、金属内肽酶(例如,胶原蛋白酶、嗜热菌蛋白酶)、丝氨酸内肽酶(例如,糜蛋白酶、因子IXa、因子X、凝血酶、胰蛋白酶)、链激酶。熟知这些酶的识别和裂解位点序列。

[0150] 也可改变不同于已经提及的那些氨基酸的辛德毕斯病毒E2中的氨基酸。通常,变体E2序列将与参考E2序列具有至少80%的序列氨基酸同一性,或其可具有至少82%、至少85%、至少87%、至少90%、至少92%、至少95%或至少98%的序列同一性。在一些实施方案中,变体E2序列与SEQ ID NO:30[SINvar1]具有至少80%的序列氨基酸同一性,或其可具有至少82%、至少85%、至少87%、至少90%、至少92%、至少95%或至少98%的序列同一性。在一些实施方案中,变体E2序列与SEQ ID NO:31[SINvar2]具有至少80%的序列氨基酸同一性,或其可具有至少82%、至少85%、至少87%、至少90%、至少92%、至少95%或至少

98%的序列同一性。在一些实施方案中,变体E2序列与SEQ ID NO:32[SINvar3]具有至少80%的序列氨基酸同一性,或其可具有至少82%、至少85%、至少87%、至少90%、至少92%、至少95%或至少98%的序列同一性。

[0151] 变体糖蛋白应显示出生物功能,诸如通过具有包含E2的包膜的病毒粒子促进感染树突细胞的能力。实验已经鉴别出似乎在病毒装配、连接至细胞表面和感染的各方面中起着重要作用的包膜糖蛋白的区域。在制备变体时,以下信息可用作指导原则。E2的细胞质尾-约残基408至415—对病毒装配具有重要意义(West等人J Virol 80:4458-4468,2006;其整体并入本文)。其他区域参与形成二级结构(约残基33-53);并参与转运和蛋白稳定性(约残基86-119)(Navaratmarajah等人,J Virol 363:124-147,2007;其整体并入本文)。变体可保留横跨膜的约残基370-380的区域的疏水特性。变体可保留N连接糖基化位点残基N1T(残基196-198)和N1T(残基318-320)之一或两者,并可保留棕榈酰基化的一个或多个位点(C-396、C416和C417)(Strauss和Strauss Microbiol Rev 58,491-562,1994;第499-509页,其并入本文)。在另一方面,可改变E2的许多区域而不出现有害事件。例如,在E2中的许多不同部位处插入转座子仍产生有活力的病毒(Navaratmarajah,同上)。

[0152] 在某些实施方案中,标签肽可并入E3、6K或E1蛋白中。为达一些目的,标签可并入E2中,但标签对用于施用给人患者的产品来说并不是理想的。为短序列(例如,5-30个氨基酸)的标签肽可用于促进对包膜表达和其在病毒粒子中的存在的检测。为达到检测目的,标签序列将通常可通过抗体或化学品检测。标签的另一用途是促进病毒粒子的纯化。含有标签的结合伴侣的底物可用于吸附病毒。病毒的洗脱可通过以下方式实现:用将标签从结合伴侣置换的部分处理,或当标签序列与可裂解序列形成键合时,用适当内肽酶的处理将便利地允许病毒的释放。(参见例如Qiagen目录,Factor Xa Protease System)。标签肽的除去通常是达到病毒粒子在动物受试者中使用的安全性目的所需的。如果没有去除标签,则可能发生对标签的免疫反应。

[0153] 合适的标签尤其包括但不限于FLAG(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:28)(美国专利4,703,004,其整体并入本文)(其抗体可商购获得)、几丁质结合蛋白、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶、多聚组氨酸(美国专利4,569,794,其整体并入本文)、硫氧还蛋白、HA(血球凝集素)-标签。多聚组氨酸可被吸附到含有结合的金属离子(例如,镍或钴)的亲介质上,并且可用低pH介质来洗脱。

[0154] 可评估病毒粒子以确定并入靶向树突细胞的病毒中的包膜糖蛋白的特异性。例如,混合的骨髓细胞群可从受试者获得并在体外培养。作为另外一种选择,可获得并使用表达或不表达DC-SIGN的同基因细胞系。可将重组病毒施用给混合的骨髓细胞群或同基因细胞系,并且可测定培养细胞中的并入病毒中的报告基因的表达。某些实施方案可采用有限稀释分析,其中将混合的细胞群分成单独的部分,然后与递减量的病毒(例如,各部分用低于2倍、5倍、10倍的病毒)来独立地孵育。在一些实施方案中,混合的细胞群中至少约50%,更优选至少约60%、70%、80%或90%,更加优选至少约95%的受感染细胞是表达DC-SIGN的树突细胞。在某些实施方案中,受感染树突细胞与受感染非树突细胞(或非DC-SIGN表达细胞)的比率为至少约2:1、至少约3:1、至少约4:1、至少约5:1、至少约6:1、至少约7:1、至少约8:1、至少约9:1、至少约10:1、至少约20:1、至少约30:1、至少约40:1、至少约50:1、至少约100:1、至少约200:1、至少约500:1、至少约1000:1、至少约5000:1、至少约10,000:1或更大。

对有限稀释来说,通常在较高稀释度(即,较低量)的输入病毒下观察到较大的选择性。

[0155] 假型化病毒粒子的活性可通过多种技术中的任何技术来测定。例如,测量感染效率(IU,感染单位)的优选方法是通过对细胞施用病毒粒子并测量在载体基因组中编码的产物的表达。可以使用可进行测定的任何产物。一种方便的产物类型是荧光蛋白,诸如绿色荧光蛋白(GFP)。可使用的其他产物包括在细胞表面上表达的蛋白质(例如,通过抗体结合来检测)、酶等。如果产物是抗原并且细胞是树突细胞,则可通过测定免疫反应来评估感染性/活性。此外,可能确定在哺乳动物中的副作用。如下文所述,也可直接(例如)在细胞培养物中测试特异性靶向树突细胞的能力。

[0156] 也可制备病毒粒子并测试它们的选择性和/或它们促进对靶细胞膜的穿透能力。具有带未修饰糖蛋白的包膜的病毒粒子可用作对照来进行比较。简而言之,使用标准感染测定,通过病毒来感染表达包膜糖蛋白的受体的细胞。在规定的時間之后,例如感染后48小时,可收集细胞并可通过(例如)流式细胞术来测定由病毒感染的细胞的百分比。可通过计算由病毒感染的细胞的百分比而对选择性进行评分。类似地,可通过将由包含变体包膜的病毒感染的细胞的百分比除以由包含对应野生型(未修饰)包膜糖蛋白的病毒感染的细胞的百分比来量化变体包膜糖蛋白对病毒滴度的作用。尤其合适的变体将具有选择性和感染滴度的最佳组合。一旦选定变体,就可进行病毒浓度测定来确认这些病毒可被浓缩而不损害活性。收集病毒上清液并通过超速离心进行浓缩。病毒滴度可通过以下方式测定:病毒储备溶液的有限稀释和表达包膜糖蛋白的受体的细胞的感染,并测量由如上所述的由病毒表达的产物的表达。

[0157] 慢病毒载体粒子进入靶细胞是另一种类型的活性评估。BlaM-Vpr(β -内酰胺酶Vpr)融合蛋白已用于评估HIV-1病毒穿透;BlaM和辛德毕斯病毒包膜糖蛋白的融合物(诸如E1或E2/E1融合蛋白)可用于评估包膜蛋白在促进融合和穿透进靶细胞的效力。病毒粒子可例如通过用一个或多个包含病毒元件、BlaM-Vpr和目标变体包膜(以及适当时的亲和力分子)的载体瞬时转染包装细胞来制备。所得的病毒可用于感染表达其中靶分子(或亲和力分子)在游离的结合抑制剂(诸如抗体)不存在或存在的情况下会特异结合的分子的细胞。然后,可用CO₂非依赖性培养基来洗涤细胞并上样CCF2染料(Aurora Bioscience)。在室温下孵育以使裂解反应完成之后,可通过多聚甲醛将细胞固定并通过流式细胞术和显微术来分析细胞。蓝色细胞的存在表明病毒穿透到了细胞质中;当添加阻断抗体时,将预计蓝色细胞较少(Cavrois等人Nat Biotechnol 20:1151-1154,2002;其整体并入本文)。

[0158] 为研究穿透是否取决于低pH值并鉴定具有所需pH值依赖性的包膜糖蛋白,可在感染步骤添加改变pH值的NH₄Cl或其他化合物(NH₄Cl将中和内涵体的酸性隔腔)。在NH₄Cl的情况下,蓝色细胞的消失将表明病毒的穿透是低pH值依赖性的。此外,为确认活性是pH值依赖性的,可将趋溶酶体剂添加到孵育缓冲液中,所述趋溶酶体剂诸如为氯化铵、氯喹、刀豆素(concanamycin)、巴弗洛霉素铝(bafilomycin A1)、莫能菌素(monensin)、尼日利亚菌素(nigericin)等。这些药剂提高内涵体隔腔内的pH值(例如,Drose和Altendorf, J.Exp.Biol.200,1-8,1997)。这些药剂的抑制作用将揭示pH值对病毒融合和进入的作用。可比较展示不同融合基因分子的病毒之间的不同进入动力学,并且对特定的应用选择最合适的病毒。

[0159] 基于PCR的进入测定可用于监测逆转录并测量作为病毒进入动力学指标的病毒

DNA合成的动力学。例如,将包含特定包膜蛋白分子的病毒粒子与靶细胞(诸如293T细胞、DC或已工程化改造而表达或天然地表达包膜蛋白分子的适当结合伴侣(受体)的任何其他细胞)一起孵育。立即或一段时间量之后(以使感染发生),去除未结合的病毒并分析细胞等分试样中的病毒核酸。从这些等分试样中提取DNA并进行扩增分析,所述扩增分析通常在半定量测定中以LTR特异性引物来引发。LTR特异性DNA产物的出现表明病毒成功进入。

[0160] 慢病毒载体基因组

[0161] 病毒载体粒子包含含有至少一个(例如1、2、3、4或5个)目标序列的基因组。可以包括其他序列,诸如允许将基因组包装到病毒粒子中的序列,以及促进目标序列在靶细胞转导后表达的序列。基因组可来源于很多合适、可用的基于慢病毒基因组的载体中的任何载体,包括已针对人类基因疗法应用所鉴定的那些载体,诸如由Pfeifer和Verma所述(Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.2:177-211,2001;其以引用方式整体并入本文)。为简化起见,基因组也称为“病毒载体基因组”或“载体基因组”。

[0162] 骨架

[0163] 合适的慢病毒载体基因组包括基于以下病毒的那些基因组:人类免疫缺陷病毒(HIV-1)、HIV-2、猫免疫缺陷病毒(FIV)、马传染性贫血病毒、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)和梅迪/维斯那病毒(maedi/visna virus)。慢病毒的合乎需要的特征在于它们能够感染分裂细胞和非分裂细胞,靶细胞不必为分裂的(或不必要刺激靶细胞分裂)。通常,基因组和包膜糖蛋白将基于不同的病毒以使得所得的病毒载体粒子是假型化的。合乎需要地将载体基因组的安全性特征并入。安全性特征包括自灭活LTR和非整合型基因组。

[0164] 在一些示例性实施方案中,病毒载体基因组包含来自慢病毒基因组(诸如HIV-1基因组或SIV基因组)的序列。病毒基因组构建体可包含来自慢病毒的5'和3'LTR的序列,并且具体地讲,可包含来自慢病毒的5'LTR的R和U5序列以及来自慢病毒的灭活的或自灭活3'LTR。LTR序列可以为来自任何物种的任何慢病毒的LTR序列。例如,它们可以为来自HIV、SIV、FIV或BIV的LTR序列。通常,LTR序列是HIV LTR序列。

[0165] 载体基因组可包含灭活或自灭活3'LTR(Zufferey等人J Virol 72:9873,1998; Miyoshi等人,J Virol 72:8150,1998;US2010/0323403,所有这些文献均整体并入本文)。自灭活载体通常具有增强子和启动子序列从3'长末端重复序列(LTR)的缺失,所述3'长末端重复序列(LTR)在载体整合期间被复制进5'LTR中。在一种情况下,3'LTR的U3元件含有其增强子序列、多嘌呤区(PPT)、TATA盒、Sp1和NF- κ B位点的缺失。作为自灭活3'LTR的结果,在进入和逆转录之后生成的前病毒将包含灭活的5'LTR。基本原理是通过降低载体基因组的活动风险和LTR对附近细胞启动子的影响来提高安全性。自灭活3'LTR可通过本领域中已知的任何方法来构建。在多种实施方案中,假型化慢病毒载体包含含有SEQ ID NO:23的序列的慢病毒载体基因组。该载体包含3' PPT和TATA盒的缺失。因此,载体为自灭活的,使得(a)防止全长载体基因组在感染的靶细胞中从逆转录的dsDNA载体转录,(b)使在3' LTR可用作启动子时在整合后插入活化的风险最小化,以及(c)扩展的U3缺失可通过另外的、冗余安全机制(例如,整合酶的突变)加以补充。

[0166] 任选地,来自慢病毒5'LTR的U3序列可用病毒构建体中的启动子序列(诸如异源启动子序列)来置换。这样可增加从包装细胞系回收的病毒的效价。也可包括增强子序列。可使用增加包装细胞系中的病毒RNA基因组的表达的任何增强子/启动子组合。在一个实例

中,使用CMV增强子/启动子序列(美国专利号5,385,839和美国专利号5,168,062,它们均整体并入本文)。

[0167] 在某些实施方案中,通过将慢病毒载体基因组构建为整合缺损型来使插入诱变发生的风险最小化。可寻求各种方法来产生非整合型载体基因组。这些方法需要将突变工程化改造为pol基因的整合酶组分,以使得其编码具有无活性整合酶的蛋白质。可通过(例如)突变或缺失连接位点之一或两者,或经由缺失或修饰使3'LTR近端多嘌呤区(PPT)不具功能性来修饰载体基因组本身以防止整合。此外,非基因方法是可用的;这些方法包括抑制整合酶的一种或多种功能的药剂。所述的方法并不互相排斥,也就是说,每次可使用这些方法中的不止一种。例如,整合酶和连接位点两者都可为非功能性的、或整合酶和PPT位点可为非功能性的、或连接位点和PPT位点可为非功能性的或它们全部可为非功能的。

[0168] 如上所述,一种方法是制备和使用非功能性整合酶。整合酶参与病毒双链平末端DNA的裂解和所述末端与染色体靶位点的两条链中5'磷酸的接合。整合酶具有三个功能结构域:N端结构域,其含有锌结合基序(HHCC);中心结构域核,其含有催化核和保守DD35E基序(HIV-1中的D64、D116、E152);和C端结构域,其具有DNA结合性质。引入整合酶中的点突变足以破坏正常功能。已构建并表征了许多整合酶突变(参见,Philpott和Thrasher,Human Gene Therapy 18:483,2007;Apolonia, Thesis submitted to University College London, 2009年4月,第82-97页;Engelman等人J Virol 69:2729,1995;Nightingale等人Mol Therapy, 13:1121,2006;它们均整体并入本文)。可缺失或突变编码整合酶蛋白的序列以使蛋白失活,优选不会使逆转录酶活性或核靶向显著受损,从而仅防止前病毒整合到靶细胞基因组中。可接受的突变可降低整合酶催化功能、链转移功能、与att位点的结合、与宿主染色体DNA的结合和其他功能。例如,HIV或SIV整合酶的残基35处的单个天冬氨酸至天门冬酰胺的取代完全消除了病毒DNA整合。整合酶的缺失将通常限于C端结构域。残基235-288的编码序列的缺失产生有用的非功能性整合酶(Engelman等人J Virol 69:2729,1995)。作为另外的实例,可产生突变,例如Asp64(对HIV-1进行残基编号,来自其他慢病毒或逆转录病毒的整合酶的对应该残基编号可由普通技术人员容易地确定)(例如,D64E、D64V)、Asp116(例如,D116N)、Asn120(例如,N120K)、Glu152、Gln148(例如,Q148A)、Lys156、Lys159、Trp235(例如,W235E)、Lys264(例如,K264R)、Lys266(例如,K266R)、Lys273(例如,K273R)。可构建其他突变并测试其整合、转基因表达和任何其他所需的参数。这些功能的测定是熟知的。可通过多种技术中的任何技术来产生突变,所述技术包括核酸序列的定点诱变和化学合成。可进行一种突变,或整合酶中可存在这些突变中的不止一种。例如,整合酶可在两个氨基酸、三个氨基酸、四个氨基酸等处具有突变。

[0169] 作为另外一种选择或与整合酶突变体的使用结合,也可突变U3和U5中的连接位点(att)。整合酶与这些位点结合,并且3'端二核苷酸在载体基因组的两个末端裂解。CA二核苷酸位于3'凹端;CA是加工必需的,核苷酸的突变阻断了向宿主染色体的整合。CA二核苷酸的A是用于整合的最关键核苷酸,并且基因组的两个末端处的突变将得到最佳结果(Brown等人J Virol 73:9011(1999)。在一个范例中,将各末端处的CA变为TG。在其他范例中,将各末端处的CA在一末端处变为TG而在另一末端处变为GT。在其他范例中,将各末端处的CA缺失;在其他范例中,将各末端处的CA的A缺失。

[0170] 整合也可通过突变或缺失定位于3'LTR近端的多嘌呤区(PPT)来抑制(WO 2009/

076524;其整体并入本文)。PPT是具有约15个核苷酸的多嘌呤序列,其可作用于正链DNA合成的引物结合位点。在这种情况下,PPT的突变或缺失靶向逆转录过程。在不希望限于某一机理的情况下,通过突变或缺失PPT,主要是减少了线性DNA的产生并且基本上仅产生1-LTR DNA环。整合需要线性双链DNA载体基因组,并且基本上消除了没有线性双链DNA载体基因组的整合。如上所述,可通过突变或通过缺失而使PPT为非功能性的。通常,缺失整个约15nt的PPT,但是在一些实施方案中,可进行14nt、13nt、12nt、11nt、10nt、9nt、8nt、7nt、6nt、5nt、4nt、3nt和2nt的较短缺失。当进行突变时,虽然前四个碱基中的单次和双重突变仍降低转录,但是通常进行多种突变,特别是在PPT的5'一半中进行(McWilliams等人,J Virol 77:11150,2003)。在PPT的3'末端处进行的突变通常具有更显著的效果(Powell和Levin J Virol70:5288,1996)。

[0171] 使载体基因组非整合的这些不同方法可单独使用或以组合来使用。使用一种以上的方法可用以经由冗余机理建构可靠载体(fail-safe vector)。因此,PPT突变或缺失可与att位点突变或缺失组合或与整合酶突变组合,或PPT突变或缺失可与att位点突变或缺失和整合酶突变两者组合。类似地,att位点突变或缺失和整合酶突变可彼此组合与PPT突变或缺失组合。

[0172] 增强假型化慢病毒粒子安全性的另外方法涉及对包含gag/pol基因的质粒进行修饰以移除与慢病毒载体潜在性重组的位点。该方法可单独地或与本文所述的任何方法组合使用。例如,gag和pol基因可以为哺乳动物或人“密码子优化的”,即,gag和/或pol基因至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的密码子被编码相同氨基酸但为哺乳动物细胞(例如人细胞)偏好的密码子替代,从而改善或优化在哺乳动物(例如人)细胞中的表达。为了对gag和pol基因进行密码子优化,生成了将“野生型”密码子改变成更常用于人类基因组的密码子的多核苷酸。然而,在HIV中,基因组的某些部分应当保持基本上原始密码子(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%或100%的原始密码子),以便允许从其mRNA的相同起始密码子开始合成Gag和Pol所需的移码。Gag-Pol的翻译需要在mRNA的密码子432周围的p7/p1接合部位阅读框在5'方向偏移(-1偏移)。Gag-Pol的翻译然后在该新的阅读框中开始进行,直到终止密码子在随后达到约3,000个核苷酸。核糖体-1移码是严格受控的事件,它需要特异性共有滑动序列和导致核糖体暂停的下游次级RNA结构。因此,根据本公开,编码gag和pol的核酸包含“非优化窗”:在SEQ ID NO:54(gag-pol开放阅读框)的位置1228开始(或在位置1218-1298、或1218-1238、或1228-1238、或1218-1228、或1228-1298、或1238-1248、或1248-1258、或1258-1268、或1268-1278、或1278-1288、或1288-1298周围开始)并在相对于其野生型gag-pol序列基本上无改变的SEQ ID NO:54的位置1509结束(或在位置1373-1558、或1373-1509、或1373-1500、或1373-1470、或1373-1440、或1373-1410、或1373-1401、或1373-1392、或1373-1383、或1401-1509、或1440-1509、或1499-1519、或1499-1509、或1509-1519周围结束)的区域。换句话讲,非优化窗保持基本上原始密码子(例如,至少90%、95%或100%的原始密码子)。应当理解,对应于SEQ ID NO:54的核苷酸1228-1509的非优化窗可在SEQ ID NO:54发生突变或为更大核苷酸序列的一部分时具有不同的实际核苷酸编号;例如,如果质粒包含SEQ ID NO:54的5'的100个核苷酸,则非优化窗将对应于质粒中的核苷酸1328-1609。在一些实施方案中,从核苷酸1229至1298的区域保持基本上原始密码子,和/或对从核苷酸1510-1558的区域进行密码子优化。在一些实施方案中,编码Gag

和Pol的密码子优化多核苷酸包含SEQ ID NO:54。在一些实施方案中,编码密码子优化的gag-pol多核苷酸的质粒包含SEQ ID NO:55的序列。

[0173] 在一些或任何实施方案中,编码人类密码子优化的gag和pol基因(并包含上述非优化窗)的质粒还不含Rev应答元件(RRE)。RRE的缺失移除了gag/pol质粒与慢病毒载体质粒之间又一个同源性区域和潜在的重组。以组合方式,这样的方法消除了或最大程度减少了gag/pol质粒与慢病毒载体之间的同源性区域,从而最大程度减小了可产生能够复制的病毒的这些质粒之间的重组机会。应当理解,RRE仍可存在于包装细胞和过程中,但存在于不同的质粒上。

[0174] 调控元件

[0175] 如本文所论述,病毒载体基因组包含希望在靶细胞中表达的目标序列。通常,目标序列位于5'LTR与3'LTR序列之间。另外,目标序列优选与其他遗传元件(例如,包括启动子或增强子的转录调控序列)成功能关系以便以特定方式来调控目标序列的表达。在某些情况下,有用的转录调控序列是就活性而言在时间和空间上受高度调控的那些序列。可用于调控组分的表达的表达控制元件是本领域中已知的并且包括但不限于诱导型启动子、组成型启动子、分泌信号序列、增强子和其他调控元件。

[0176] 目标序列和任何其他可表达序列通常与内部启动子/增强子调控序列成功能关系。“内部”启动子/增强子是定位在病毒载体构建体的5'LTR序列与3'LTR序列之间并且与目标序列可操作地连接的启动子/增强子。内部启动子/增强子可为已知增加与其成功能关系的基因的表的任何启动子、增强子或启动子/增强子组合。“功能关系”和“可操作地连接的”意指但不限于序列处在相对于启动子和/或增强子的在启动子和/或增强子与适当分子接触时目标序列将得以表达的正确位置和定位中。

[0177] 内部启动子/增强子的选择基于目标序列的所需表达模式和已知启动子/增强子的特定性质。因此,内部启动子可为组成性活性的。可使用的组成型启动子的非限制性实例包括以下物质的启动子:泛素(美国专利号5,510,474;WO 98/32869,它们均以引用方式整体并入本文)、CMV(Thomsen等人,PNAS81:659,1984;美国专利号5,168,062,它们均以引用方式整体并入本文)、 β -肌动蛋白(Gunning等人1989Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:4831-4835,其以引用方式整体并入本文)和pgk(参见例如Adra等人1987Gene 60:65-74;Singer-Sam等人1984Gene 32:409-417;和Dobson等人1982Nucleic Acids Res.10:2635-2637,前述各参考文献均以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,用于控制由假型化慢病毒载体基因组编码的抗原的表的启动子为内含子缺失型启动子。在一些实施方案中,将人泛素-C(UbiC)启动子用于控制由假型化慢病毒载体基因组编码的抗原的表。在多种实施方案中,已对UbiC启动子进行了修饰以移除内含子,即,启动子为内含子缺失的。全长UbiC启动子为1250个核苷酸。内含子始于412并一直到末端(412-1250)。该区域可缺失以最大程度减小异源性病毒基因组转录物。HIV病毒基因组在其内具有天然内含子。因此,包含UbiC启动子的慢病毒将在慢病毒基因组中总共具有2个内含子。UbiC内含子可以剪接和非剪接形式存在。UbiC内含子的缺失消除了异源性病毒转录物的可能性,并确保了在递送的假型化慢病毒粒子时的均质性。

[0178] 作为另外一种选择,启动子可以是组织特异性启动子。在一些优选实施方案中,启动子是靶细胞特异性启动子。例如,启动子可来自树突细胞表达的任何产物,包括CD11c、

CD103、TLR、DC-SIGN、BDCA-3、DEC-205、DCIR2、甘露糖受体、Dectin-1、Clec9A、MHC II类。此外,可选择启动子以允许目标序列的诱导型表达。用于诱导型表达的许多系统是本领域中已知的,包括四环素反应系统、lac操纵子-阻遏子系统以及对多种环境或生理变化起反应的启动子,所述环境或生理变化包括热休克、金属离子(诸如,金属硫蛋白启动子)、干扰素、低氧、类固醇(诸如黄体酮或糖皮质激素受体启动子)、辐射(诸如VEGF启动子)。也可使用启动子的组合来获得目标基因的所需表达。本领域的普通技术人员将能够基于目标有机体或靶细胞中的所需的基因表达模式来选择启动子。

[0179] 病毒基因组可包含至少一个RNA聚合酶II或III反应性启动子。这种启动子可与目标序列可操作地连接并且也可与终止序列连接。此外,可并入一个以上的RNA聚合酶II或III启动子。RNA聚合酶II和III启动子是本领域技术人员所熟知的。RNA聚合酶III启动子的合适范围可例如见于Paule和White, *Nucleic Acids Research*, 第28卷,第1283-1298页(2000),其以引用方式整体并入本文。RNA聚合酶II或III启动子也包括可引导RNA聚合酶II或III转录下游RNA编码序列的任何合成或工程化改造的DNA片段。另外,用作病毒载体基因组的部分的RNA聚合酶II或III(Pol II或III)启动子可为诱导型的。任何合适的诱导型Pol II或III启动子可与本发明的方法一起使用。尤其合适的Pol II或III启动子包括提供于Ohkawa和Taira, *Human Gene Therapy*, 第11卷,第577-585页(2000)以及Meissner等人 *Nucleic Acids Research*, 第29卷,第1672-1682页(2001)(它们均以引用方式整体并入本文)中的四环素反应性启动子。

[0180] 内部增强子也可存在于病毒构建体中以便增强目标基因的表达。例如,可使用CMV增强子(Boshart等人 *Cell*, 41:521, 1985;其以引用方式整体并入本文)。已鉴别并表征了病毒基因组(诸如HIV、CMV)和哺乳动物基因组中的许多增强子(参见GenBank)。增强子可与异源启动子组合使用。本领域的普通技术人员能够基于所需的表达模式来选择适当的增强子。

[0181] 病毒载体基因组将通常含有由靶细胞识别并与本文论述的目标序列、病毒组分和其他序列可操作地连接的启动子。启动子是由核酸序列形成的允许RNA聚合酶的结合和转录发生的表达控制元件。启动子可为诱导型、组成型、时间活性或组织特异性的。诱导型启动子的活性是由生物或非生物因子的存在或缺失来诱导。诱导型启动子可为基因工程中的有用工具,因为它们可操作地连接的基因的表达可在有机体的特定发育阶段、在其制造时或在特定组织中被开启或关闭。诱导型启动子可分为化学调控启动子和物理调控启动子。典型的化学调控启动子包括但不限于醇调控启动子(例如,醇脱氢酶I(alcA)基因启动子)、四环素调控启动子(例如,四环素反应性启动子)、类固醇调控启动子(例如,基于大鼠糖皮质激素受体(GR)的启动子、基于人雌激素受体(ER)的启动子、基于蛾蜕皮激素受体的启动子和基于类固醇/视黄酸/甲状腺受体超家族的启动子)、金属调控启动子(例如,基于金属硫蛋白基因的启动子),以及病原相关启动子(例如,基于拟南芥(*Arabidopsis*)和玉米病原体相关(PR)蛋白的启动子)。典型的物理调控启动子包括但不限于温度调控启动子(例如,热休克启动子)和光调控启动子(例如,大豆SSU启动子)。

[0182] 本领域中的技术人员将能够基于特定的环境来选择适当的启动子。本领域中熟知许多不同的启动子,以及用于将启动子与要表达的基因可操作地连接的方法。天然启动子序列和许多异源启动子两者都可用于指导在包装细胞和靶细胞中的表达。然而,优选异源

启动子,因为与天然启动子相比,它们通常允许所需蛋白质的更大转录和更高产率。

[0183] 启动子可(例如)从病毒基的基因组中获得,所述病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒、牛乳头状瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40(SV40)。启动子也可(例如)异源哺乳动物启动子,例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子、热休克启动子,或通常与天然序列相关的启动子,前提是此类启动子可与靶细胞相容。在一个实施方案中,启动子是病毒表达系统中的天然存在的病毒启动子。在某些实施方案中,启动子是树突细胞特异性启动子。树突细胞特异性启动子可为(例如)CD11c启动子。

[0184] 转录可通过将增强子序列插入载体中来增强。增强子通常是DNA的顺式作用元件,长度通常是约10至300个bp,并作用于启动子以增强其转录。现在已知许多来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)和来自真核细胞病毒的增强子序列。实例包括复制起点(bp 100-270)的后侧上的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点的后侧上的多瘤增强子和腺病毒增强子。增强子可在抗原特异性多核苷酸序列的5'或3'的某一位置上剪接到载体中,但优选位于启动子的5'的位点。

[0185] 表达载体也可含有终止转录和稳定mRNA所必需的序列。这些序列常常见于真核或病毒DNA或cDNA的5'和偶而3'未翻译区中,并且在本领域中是熟知的。

[0186] 病毒载体基因组也可含有额外的遗传元件。可包括在构建体中的元件类型不受任何方式限制并且可选择来达到特定结果。例如,可包括促进靶细胞中的病毒基因组的核进入的信号序列。此信号序列的一个实例是HIV-1flap信号序列。另外,可包括促进靶细胞中的前病毒整合位点的表征的元件。例如,tRNA琥珀抑制基因序列可包括在构建体中。来自(例如)鸡 β -球蛋白的绝缘子序列也可包括在病毒基因组构建体中。这种元件减小由于甲基化和异染色质化作用而使靶细胞中的整合型前病毒沉默的机会。此外,绝缘子可防护内部增强子、启动子和外源性基因避免来自染色体上的整合位点处的环绕DNA的正面或负面位置影响。此外,载体基因组可含有设计来增强目标基因的表达的一个或多个遗传元件。例如,早发肝炎病毒反应性元件(WRE)可置入构建体中(Zufferey等人1999.J.Virol.74:3668-3681;Deglon等人2000.Hum.Gene Ther.11:179-190,它们均以引用方式整体并入本文)。

[0187] 病毒载体基因组通常是以可转染到包装或产生者细胞系的质粒形式来构建。质粒通常包含用于在细菌中复制质粒的序列。此类质粒在本领域中是熟知的。此外,包含原核复制起点的载体也可包含其表达赋予可检测或可选择标记(诸如药物抗性)的基因。典型的细菌药物抗性产物是赋予氨苄青霉素或四环素抗性的那些产物。

[0188] 含有一个或多个本文所述的组分的质粒容易使用本领域中熟知的标准技术来构建。为进行确认所构建质粒中的正确序列的分析,可在大肠杆菌中复制质粒、将其纯化并通过限制性内切核酸酶消化来分析或通过常规方法来测定其DNA序列。

[0189] 也可使用构建用于在哺乳动物细胞中瞬时表达的载体。瞬时表达涉及表达载体的使用,所述表达载体能够在宿主细胞中有效复制,以使得宿主细胞累积表达载体的许多拷贝并接着合成高水平的由表达载体中的抗原特异多核苷酸编码的多肽。参见Sambrook等人,同上,第16.17-16.22页。适用于适应多肽表达的其他载体和方法是本领域中熟知的,并且容易适应特定的环境。

[0190] 用本文提供的教导内容,本领域中的技术人员将认识到,特定表达系统的效力可

通过用包含编码报告蛋白的基因的载体转染包装细胞,并使用合适的技术(例如,测量绿色荧光蛋白偶联物中的荧光)测量表达来进行测试。合适的报告基因在本领域中是熟知的。

[0191] 目标序列的类型

[0192] 目标序列不受任何方式限制并且包括普通技术人员希望在靶细胞中整合、转录和表达的任何核酸。产物可为蛋白质或核酸。目标序列可编码蛋白质或核酸分子,包括siRNA、微小RNA、其中互补区长度大于约20个核糖核苷酸的自补双链RNA或与信使RNA互补的RNA,其中所述互补(反义)RNA与信使RNA的结合阻断其被翻译成蛋白质的能力。在某些情况下,目标序列可编码需要针对其的免疫反应的抗原。具体来说,来自病毒(诸如HIV、HSV、HCV、HPV、疟疾或结核病)的肿瘤抗原和感染性疾病抗原是理想的。此外,多个目标序列可包含在单个载体中。

[0193] 在某些情况下,目标序列可为编码下调分子表达的目标小抑制RNA(siRNA)或微小RNA(miRNA)的基因。例如,编码siRNA或微小RNA的基因可用于下调细胞中的负调节子表达,所述负调节子包括抑制树突细胞的活化或成熟的那些。siRNA和微小RNA在本领域中是熟知的(Fire等人,Nature391:806,1998;另见“The RNA Interference Resource”of Applied Biosystems,Trang等人,Oncogene增刊2:S52,2008;Taganov,K.等人2007.Immunity26:133-137;Dahlberg,J.E.和E.Lund.2007.Sci.STKE 387:pe25;Tiemann和Rossi,EMBO Mol Med 1:142,2009)。作为另外一种选择,目标序列可编码其中互补区长度大于约20个核糖核苷酸的自补双链RNA或长度大于约20个核糖核苷酸的反义RNA。本领域普通技术人员应了解,siRNA、miRNA、dsRNA和反义RNA分子可由RNA聚合酶III启动子来表达,或者作为另外一种选择,可为由RNA聚合酶II启动子转录的非编码RNA的组分。

[0194] 此外,目标序列可编码一种以上的产物。在一些构型中,要递送的序列可包含编码至少一种蛋白质、至少一种siRNA、至少一种微小RNA、至少一种dsRNA或至少一种反义RNA分子或其任何组合的多个基因。例如,要递送的序列可包括编码一个或多个需要针对其的免疫反应的抗原的一个或多个基因。一个或多个抗原可与单一疾病或病症相关,或它们可与多种疾病和/或病症相关。在一些情况下,编码免疫调控蛋白的基因可连同编码需要针对其的免疫反应的抗原一起被包括,并且这样的组合可引起免疫反应并将免疫反应调控到所要的方向和幅度上。在其他情况下,编码siRNA、微小RNA、dsRNA或反义RNA分子的序列可用编码需要针对其的免疫反应的抗原的基因来构建,并且这样的组合可调控免疫反应的范围。产物可作为初始融合产物来产生,融合产物中的编码序列与一个启动子成功能关系。作为另外一种选择,产物可被独立地编码并且各编码序列与启动子成功能关系。启动子可以是相同的或不同的。

[0195] 在某些构型中,载体含有编码树突细胞成熟/刺激因子的多核苷酸序列。示例性刺激分子包括GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、TNF α 、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40配体(CD40L)、药物诱导型CD40(iCD40)等。这些多核苷酸通常受一个或多个调控元件的控制,所述调控元件指导树突细胞中的编码序列的表达。树突细胞的成熟有助于成功接种(Banchereau,J和Palucka,A.K.Nat.Rev.Immunol.5:296-306(2005);Schuler,G.等人Curr.Opin.Immunol.15:138-147(2003);Figdor,C.G.等人Nat.Med.10:475-480(2004))。成熟可转化来自细胞的DC,所述细胞在活性上参与将抗原捕获于被特化用于T细胞引发的细胞中。例如,CD40通过CD40L结合于CD4-辅助T细胞上是DC成熟的关键信号,产生CD8T细胞

的有效活化。此类刺激分子也称为成熟因子或成熟刺激因子。免疫检查点表示癌症中功能性细胞免疫性活化的重要屏障,并且对T细胞上的抑制配体特异的拮抗性抗体(包括CTLA4和程序性死亡-1(PD-1))是临床上评估的靶向剂的实例。慢性感染和癌症中的重要耐受性机理是表达高水平PD-1的Ag特异T细胞的功能性耗尽。因为已显示出治疗性免疫的效力通过与免疫检查点控制(作为非限制性实例)的组合而显著增强,所以本领域普通技术人员应了解,抑制免疫检查点的替代方法是抑制程序性死亡(PD)配体1和2(PD-L1/L2)的表达。实现抑制的一种方式诸如本文所述的那些分子的RNA分子的表达,这抑制由编码一个或多个RNA分子的慢病毒载体转导的DC中的PD-L1/L2的表达。DC的成熟或诸如免疫检查点(例如PD-1配体)的特定元件的表达可通过对诸如MHC II的表面标记的上调进行流式细胞术分析以及所表达的趋化因子和细胞因子的概况来表征。

[0196] 编码可检测产物(通常为蛋白质)的序列可被包括以允许鉴别表达所需产物的细胞。例如,将诸如绿色荧光蛋白(GFP)的荧光标记蛋白连同目标序列(例如,编码抗原的序列)一起并入构建体中。在其他情况下,蛋白质可通过抗体来检测,或蛋白质可为作用于底物的酶,以便产生可检测产物或允许选择转染或转导靶细胞(例如赋予药物抗性,诸如潮霉素抗性)的产物。典型的选择基因所编码的蛋白质赋予对适用于真核细胞的抗生素或其他毒素(例如,尤其本领域中已知的新霉素、甲氨蝶呤、灭瘟素(blasticidine))的抗性的蛋白,或补充营养缺陷型缺陷,或供给从培养基中保留的关键养分。可选择标记可任选地存在于单独的质粒上并通过共同转染来引入。

[0197] 可使用一个或多个多顺反子表达单位,其包括在包装细胞中产生所需病毒所必需的元件(例如,目标序列、包膜分子、DC成熟因子)中的两个或两个以上。多顺反子载体的使用降低所需的核酸分子的总数并因此避免与由多个载体基因组协同表达相关的可能的困难。在多顺反子载体中,要表达的各种元件与一个或多个启动子(和根据需要的其他表达控制元件)可操作地连接。在某些构型中,多顺反子载体包含目标序列、编码报告产物的序列和病毒元件。目标序列通常编码抗原并任选地编码DC成熟因子。有时,多顺反子载体包含编码抗原的基因、编码DC成熟因子的基因和病毒元件。

[0198] 本发明所公开的假型化慢病毒载体可经工程改造以一次表达不止一种(例如两种、三种或四种)抗原。本领域已知多种方法可由单种载体同时表达不止一种基因。例如,载体可包含融合到基因的开放阅读框(ORF)的多个启动子、在基因之间的剪接信号插入、其表达受单个启动子驱动的基因的融合、在基因之间的蛋白水解裂解位点插入、在基因之间的内部核糖体进入位点(IRES)插入、在基因之间的双向启动子插入和/或“自裂解”2A肽。在多顺反子表达载体中的要表达的各组分可(例如)由内部核糖体进入位点(IRES)元件或病毒2A元件分隔,以便允许各种蛋白质由同一启动子的独立表达。IRES元件和2A元件是本领域中已知的(美国专利号4,937,190;de Felipe等人2004.Traffic 5:616-626,它们均以引用方式整体并入本文)。在一个实施方案中,与来自口蹄疫病毒(FMDV;F2A)、猪捷申病毒-1(P2A)、马鼻炎A病毒(ERAV;E2A)和明脉扁刺蛾β四体病毒(thosea asigna virus)(TaV;T2A)(Szymczak等人2004.Nat.Biotechnol.22:589-594,其以引用方式整体并入本文)的2A样序列连接的编码弗林蛋白酶裂解位点序列(RAKR)的寡核苷酸(Fang等人2005.Nat.Biotech23:584-590,其以引用方式整体并入本文)用来分隔多顺反子载体中的遗传元件。2A肽共有序列为D(V/I)EXNPGP(SEQ ID NO:56)。在一些实施方案中,慢病毒载体

包含编码T2A (SEQ ID NO:57)的多核苷酸。在一些实施方案中,2A肽由SEQ ID NO:52的多核苷酸编码。特定多顺反子载体的效率可通过使用标准方案检测各基因的表达而容易地测试。

[0199] 还可以使用内部核糖体进入位点(IRES)实现两种或更多种抗原的表达。IRES使得真核核糖体能够在非5' m⁷G帽结构的位置进入并扫描mRNA。如果位于内部,例如第一密码子区域(或顺反子)的3',则IRES将使得第二密码子区域能够在相同的转录物内翻译。第二密码子区域通过在IRES之后遇到的第一个ATG标识。示例性IRES元件包括病毒IRES,诸如微小核糖核酸病毒IRES和心病毒IRES(参见例如美国专利号4,937,190),以及存在于5'UTR中的非病毒IRES元件(例如,编码免疫球蛋白重链结合蛋白(BiP)的那些元件(Macejak等人, *Nature*, 353:90-4, 1991);果蝇触角足(Oh等人, *Genes Dev.* 6:1643-53, 1992)和超双胸(Ye等人, *Mol. Cell Biol.*, 17:1714-21, 1997);成纤维细胞生长因子2(Vagner等人, *Mol. Cell Biol.*, 15:35-44, 1995);起始因子eIF4G(Gan等人, *J. Biol. Chem.* 273:5006-12, 1998);原癌基因c-myc(Nanbru等人, *J. Biol. Chem.*, 272:32061-6, 1995;Stoneley, *Oncogene*, 16:423-8, 1998)以及血管内皮生长因子(VEGF)(Stein等人, *Mol. Cell Biol.*, 18:3112-9, 1998)。

[0200] 还可以使用双向启动子(即,其阅读方向彼此远离并且从其转录位于启动子区域侧翼的两个开放阅读框的启动子区域或两个背对背克隆启动子)实现两种或更多种抗原的表达。此类启动子的实例包括PDGF-A、嗜神经JC病毒、BRCA1、钴胺传递蛋白II和二肽酰肽酶IV启动子。

[0201] 在特定范例中,病毒载体基因组包含:巨细胞病毒(CMV)增强子/启动子序列;来自HIV 5'LTR的R和U5序列;包装序列(Ψ);HIV-1flap信号序列;内部增强子;内部启动子;目标基因;早獭肝炎病毒反应性元件;tRNA琥珀抑制基因序列;缺失增强子序列的U3元件;鸡 β -球蛋白绝缘子;和3'HIV LTR的R和U5序列。在一些范例中,载体基因组包含完整的慢病毒5'LTR和自灭活3'LTR(Iwakuma等人 *Virology* 15:120, 1999, 其以引用方式整体并入本文)。

[0202] 载体基因组的构建可使用本领域中已知的任何合适的基因工程技术来实现,所述技术包括但不限于限制性内切核酸酶消化、连接、转化、质粒纯化和DNA测序的标准技术,例如,如Sambrook等人(1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.)、Coffin等人(*Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997))和"RNA Viruses: A Practical Approach"(Alan J. Cann编辑, Oxford University Press, (2000)中所述,前述各参考文献均以引用方式整体并入本文。

[0203] 在一些实施方案中,目标序列编码至少一种抗原。可使用如本文所述的病毒粒子将与疾病或病症相关的任何抗原递送至树突细胞。鉴别与疾病或病症相关的抗原用于制备靶向树突细胞的病毒粒子。与许多疾病和病症相关的抗原在本领域中是熟知的。抗原可能先前已知为与疾病或病症相关,或可通过本领域中已知的任何方法来鉴别。例如,患者所患有的癌症类型的抗原(诸如,肿瘤相关抗原)可为已知的,或可通过本领域中已知的多种方法中的任何方法从肿瘤自身鉴别出来。

[0204] 已知包括(例如)肾细胞癌、前列腺癌、黑素瘤和乳腺癌的多种癌症的肿瘤相关抗原。在一些乳腺癌中,例如,Her-2受体在癌性细胞表面上过表达。示例性肿瘤抗原包括但不限于MAGE(例如MAGE-A3和MAGE-A1)、BAGE、RAGE和NY-ESO-1,它们是在睾丸的免疫特权区

(immune-privileged area)和多种肿瘤细胞中表达的未突变抗原;谱系特异性肿瘤抗原,诸如黑素细胞-黑素瘤谱系抗原MART-1/黑色素-A、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶和酪氨酸酶相关蛋白,例如TRP2;肾细胞癌-5T4、SM22- α 、碳酸酐酶I和IX(又称为G250)、低氧诱导型因子(例如,HIF-1 α 和HIF-2 α)、VEGF或前列腺特异膜抗原(PSMA)、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸盐和前列腺六跨膜表皮抗原(STEAP)、NKX3.1,它们是在来源于相同组织的正常细胞和赘生性细胞中表达的抗原;来源于在肿瘤细胞中突变的基因或与正常细胞相比在肿瘤中以不同水平转录的基因的表位蛋白/肽,诸如端粒酶、存活素、间皮素、突变ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突变或野生型的p53、细胞色素P4501B1,和异常表达的内含子序列,诸如N-乙酰氨基葡萄糖转移酶-V;在骨髓瘤和B细胞淋巴瘤中产生独特个体基因型的免疫球蛋白基因的克隆性重排;来源于肿瘤病毒过程的表位蛋白/肽,诸如人乳头瘤病毒蛋白E6和E7;具有肿瘤选择性表达的非突变癌胚胎蛋白,诸如癌胚抗原和甲胎蛋白。已综述了许多肿瘤相关抗原(参见例如,"Tumor-Antigens Recognized By T-Lymphocytes,"Boon T, Cerottini J C, Vandeneynde B, Vanderbruggen P, Vanpel A, Annual Review Of Immunology 12:337-365, 1994; "A listing of human tumor antigens recognized by T cells,"Renkvist N, Castelli C, Robbins P F, Parmiani G. Cancer Immunology Immunotherapy 50: (1) 3-15 MAR 2001, 它们均以引用方式整体并入本文。)

[0205] 在本文所述的一些或任何实施方案中,假型化慢病毒载体包含编码MAGE-A3 (SEQ ID NO:58)的多核苷酸。在一些实施方案中,MAGE-A3由SEQ ID NO:50的多核苷酸编码。在一些实施方案中,MAGE-A3由与SEQ ID NO:50具有至少40、50、60、70、80、90、95、99%同一性的多核苷酸编码。在一些实施方案中,假型化慢病毒载体包含编码SEQ ID NO:58的至少40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300或310个氨基酸的MAGE-A3的片段的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸编码与SEQ ID NO:58具有至少40、50、60、70、80、90、95、99%同一性的MAGE-A3的变体。在一些实施方案中,假型化慢病毒载体包含编码NY-ESO-1 (SEQ ID NO:59)的多核苷酸。在一些实施方案中,NY-ESO-1由SEQ ID NO:51的多核苷酸编码。在一些实施方案中,MAGE-A3由与SEQ ID NO:51具有至少40、50、60、70、80、90、95、99%同一性的多核苷酸编码。在一些实施方案中,假型化慢病毒载体包含编码SEQ ID NO:59的至少40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160或170个氨基酸的NY-ESO-1的片段的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸编码与SEQ ID NO:59具有至少40、50、60、70、80、90、95、99%同一性的NY-ESO-1的变体。在一些实施方案中,假型化慢病毒载体包含编码MAGE-A3 (SEQ ID NO:58)的多核苷酸和编码NY-ESO-1 (SEQ ID NO:59)的多核苷酸。在一些或任何实施方案中,NY-ESO-1和MAGE-A3由相同的转录物作为融合蛋白而表达,所述融合蛋白包含NY-ESO-1和MAGE-A3以及在这两种抗原之间的自裂解A2肽,例如SEQ ID NO:56或57。抗原可以为任何顺序(例如NY-ESO-1第一而MAGE-A3第二,或MAGE-A3第一而NY-ESO-1第二)。

[0206] 抗原还可以是与传染病(诸如HIV/AIDS)相关的抗原。抗原可以为例如gp120 (Klimstra, W.B.等人2003. J Virol 77:12022-12032; Bernard, K.A.等人2000. Virology 276:93-103; Byrnes, A.P.等人1998. J Virol 72:7349-7356, 它们均以引用方式整体并入本文)。其他示例性抗原包括但不限于:gag、pol、env、tat、nef和rev (Lieberman, J.等人1997. AIDS Res Hum Retroviruses 13 (5):383-392; Menendez-Arias, L.等人1998. Viral

Immunol 11 (4) :167-181,它们均以引用方式整体并入本文)。

[0207] 病毒抗原的实例包括但不限于腺病毒多肽、甲病毒多肽、杯状病毒多肽(例如,杯状病毒衣壳抗原)、冠状病毒多肽、犬瘟热病毒多肽、埃博拉病毒多肽、肠道病毒多肽、黄病毒多肽、肝炎病毒(AE)多肽(例如,乙型肝炎核或表面抗原,或丙型肝炎病毒E1或E2糖蛋白、核或非结构蛋白)、疱疹病毒多肽(例如,单纯疱疹病毒或水痘带状疱疹病毒糖蛋白)、免疫缺陷病毒多肽(例如,人类免疫缺陷病毒包膜或蛋白酶)、感染性腹膜炎病毒多肽、流感病毒多肽(例如,流感A血球凝集素、神经氨酸酶或核蛋白)、白血病毒多肽、马尔堡病毒多肽、正粘病毒多肽、乳头状瘤病毒多肽、副流感病毒多肽(例如,血球凝集素/神经氨酸酶)、副粘病毒多肽、细小病毒多肽、瘟病毒多肽、微小核糖核酸病毒多肽(例如,脊髓灰质炎病毒衣壳多肽)、痘病毒多肽(例如,痘苗病毒多肽)、狂犬病毒多肽(例如,狂犬病毒糖蛋白G)、呼肠孤病毒多肽、逆转录病毒多肽和轮状病毒多肽。

[0208] 细菌抗原的实例包括但不限于放线菌属(*Actinomyces*)多肽、杆状菌属(*Bacillus*)多肽、拟杆菌属(*Bacteroides*)多肽、包特菌属(*Bordetella*)多肽、巴尔通氏体属(*Bartonella*)多肽、伯氏体属(*Borrelia*)多肽(例如,伯氏疏螺旋体OspA(*B. burgdorferi* OspA))、布氏菌属(*Brucella*)多肽、弯曲菌属(*Campylobacter*)多肽、二氧化碳噬纤维菌属(*Capnocytophaga*)多肽、披衣菌(*Chlamydia*)多肽、梭菌属(*Clostridium*)多肽、棒杆菌属(*Corynebacterium*)多肽、考克斯氏体属(*Coxiella*)多肽、嗜皮菌属(*Dermatophilus*)多肽、肠球菌属(*Enterococcus*)多肽、埃里希氏体属(*Ehrlichia*)多肽、埃希氏菌属(*Escherichia*)多肽、弗朗西丝氏菌属(*Francisella*)多肽、梭杆菌属(*Fusobacterium*)多肽、巴尔通氏体(*Haemobartonella*)多肽、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)多肽(例如,b型嗜血流感菌(*H. influenzae*)外部膜蛋白)、螺杆菌属(*Helicobacter*)多肽、克氏杆菌属(*Klebsiella*)多肽、L形细菌多肽、钩端螺旋体属(*Leptospira*)多肽、李斯特菌属(*Listeria*)多肽、分支杆菌属(*Mycobacteria*)多肽、枝原体属(*Mycoplasma*)多肽、奈瑟菌属(*Neisseria*)多肽、新立克次氏体属(*Neorickettsia*)多肽、诺卡氏菌属(*Nocardia*)多肽、巴氏杆菌属(*Pasteurella*)多肽、消化球菌属(*Peptococcus*)多肽、消化链球菌属(*Peptostreptococcus*)多肽、肺炎球菌属(*Pneumococcus*)多肽、变形杆菌属(*Proteus*)多肽、假单胞菌属(*Pseudomonas*)多肽、立克次氏体属(*Rickettsia*)多肽、罗卡利马氏体属(*Rochalimaea*)多肽、沙门氏菌属(*Salmonella*)多肽、志贺氏菌属(*Shigella*)多肽、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)多肽、链球菌属(*Streptococcus*)多肽(例如,化脓链球菌(*S. pyogenes*)M蛋白)、密螺旋体属(*Treponema*)多肽和耶尔森氏菌属(*Yersinia*)多肽(例如,鼠疫耶尔森氏菌(*Y. pestis*)F1和V抗原)。

[0209] 真菌抗原的实例包括但不限于犁头霉菌属(*Absidia*)多肽、枝顶孢属(*Acremonium*)多肽、链格孢属(*Alternaria*)多肽、曲霉属(*Aspergillus*)多肽、蛙粪霉属(*Basidiobolus*)多肽、蠕形菌属(*Bipolaris*)多肽、芽生菌属(*Blastomyces*)多肽、念珠菌属(*Candida*)多肽、球孢子菌属(*Coccidioides*)多肽、耳霉属(*Conidiobolus*)多肽、隐球菌属(*Cryptococcus*)多肽、弯孢菌属(*Curvalaria*)多肽、表皮癣菌属(*Epidermophyton*)多肽、外瓶霉属(*Exophiala*)多肽、地霉属(*Geotrichum*)多肽、组织胞浆菌属(*Histoplasma*)多肽、马杜拉分支菌属(*Madurella*)多肽、马拉色菌属(*Malassezia*)多肽、小孢子菌属(*Microsporum*)多肽、丛梗孢酵母属(*Moniliella*)多肽、接合菌属(*Mortierella*)多肽、毛霉

属(Mucor)多肽、拟青霉属(Paecilomyces)多肽、青霉属(Penicillium)多肽、单孢瓶霉属(Phialemonium)多肽、瓶霉属(Phialophora)多肽、原壁菌属(Prototheca)多肽、波氏足肿菌属(Pseudallescheria)多肽、假小托菌属(Pseudomicrodochium)多肽、腐霉属(Pythium)多肽、鼻孢子虫属(Iihinosporidium)多肽、根霉属(Iihizopus)多肽、齿梗孢属(Scoleobasidium)多肽、分支孢菌属(Sporothrix)多肽、葡柄霉属(Stemphylium)多肽、毛癣菌属(Trichophyton)多肽、毛孢子菌属(Trichosporon)多肽和木丝霉属(Xylohypha)多肽。

[0210] 原生动物寄生虫抗原的实例包括但不限于巴倍虫属(Babesia)多肽、肠袋虫属(Balantidium)多肽、贝诺虫属(Besnoitia)多肽、隐孢子虫属(Cryptosporidium)多肽、艾美虫属(Eimeria)多肽、脑炎微孢子虫属(Encephalitozoon)多肽、内变形虫属(Entamoeba)多肽、贾第虫属(Giardia)多肽、哈蒙德虫属(Hammondia)多肽、肝簇虫属(Hepatozoon)多肽、等孢球虫属(Isospora)多肽、利什曼虫属(Leishmania)多肽、微孢子虫属(Microsporidia)多肽、新孢子虫属(Neospora)多肽、龙船草属(Nosema)多肽、五鞭毛虫属(Pentatrichomonas)多肽、疟原虫属(Plasmodium)多肽(例如,恶性疟原虫(P.falciparum)环子孢子(PfCSP)蛋白、子孢子表面蛋白2(PfSSP2)、肝态抗原1的羧基末端(PfLSA1c端)和输出蛋白1(PfExp-1))、肺囊虫属(Pneumocystis)多肽、肉孢子虫属(Sarcocystis)多肽、血吸虫属(Schistosoma)多肽、泰勒虫属(Theileria)多肽、弓形虫属(Toxoplasma)多肽和锥虫属(Trypanosoma)多肽。

[0211] 蠕虫寄生虫抗原的实例包括但不限于棘唇线虫属(Acanthocheilonema)多肽、猫圆线虫属(Aelurostrongylus)多肽、钩口线虫属(Ancylostoma)多肽、管圆线虫属(Angiostrongylus)多肽、蛔虫属(Ascaris)多肽、布鲁格丝虫属(Brugia)多肽、仰口线虫属(Bunostomum)多肽、毛细线虫属(Capillaria)多肽、夏柏线虫属(Chabertia)多肽、古柏线虫属(Cooperia)多肽、环体线虫属(Crenosoma)多肽、网尾线虫属(Dictyocaulus)多肽、肾膨结线虫属(Dioctophyme)多肽、双板线虫属(Dipetalonema)多肽、裂头绦虫属(Diphyllobothrium)多肽、复孔绦虫属(Diplydium)多肽、恶丝虫属(Dirofilaria)多肽、龙线虫属(Dracunculus)多肽、蛲虫属(Enterobius)多肽、类丝虫属(Filaroides)多肽、血矛线虫属(Haemonchus)多肽、兔唇蛔虫属(Lagochilascaris)多肽、罗阿丝虫属(Loa)多肽、曼森线虫属(Mansonella)多肽、缪勒线虫属(Muellerius)多肽、侏体吸虫属(Nanophyetus)多肽、板口线虫属(Necator)多肽、细颈线虫属(Nematodirus)多肽、结节线虫属(Oesophagostomum)多肽、盘尾丝虫属(Onchocerca)多肽、后睾吸虫属(Opisthorchis)多肽、奥斯特线虫属(Ostertagia)多肽、副丝虫属(Parafilaria)多肽、并殖吸虫属(Paragonimus)多肽、副蛔虫属(Parascaris)多肽、泡翼线虫属(Physaloptera)多肽、原圆线虫属(Protostrongylus)多肽、腹腔丝虫属(Setaria)多肽、旋尾线虫属(Spirocerca)多肽、迭宫绦虫属(Spirometra)多肽、冠丝虫属(Stephanofilaria)多肽、圆线虫属(Mrongyloides)多肽、圆线虫属(Strongylus)多肽、吸吮线虫属(Thelazia)多肽、弓蛔线虫属(Toxascaris)多肽、弓形虫属(Toxocara)多肽、毛线虫属(Trichinella)多肽、毛圆线虫属(Trichostrongylus)多肽、鞭虫属(Trichuris)多肽、钩虫属(Uncinaria)多肽和吴策线虫属(Wuchereria)多肽。

[0212] 外寄生虫抗原的实例包括但不限于来自以下物种的多肽(包括保护性抗原以及过

敏原):跳蚤;壁虱,包括硬壁虱和软壁虱;蝇类,诸如摇蚊、蚊子、沙蝇、黑蝇、马蝇、角蝇、斑虻、采采蝇、厩蝇、引起蝇蛆病的蝇类和咬蚊;蚁类;蜘蛛类;虱子类;螨类;和蠕类昆虫,诸如床虫和接吻虫。

[0213] 一旦已鉴别并选择抗原,鉴别编码所需抗原的序列。优选地,序列包含cDNA。病毒感染之后,通过靶树突细胞来表达目标序列(例如,编码抗原的序列)。如果离体接触,那么随后(例如)通过注射将靶树突细胞转移回患者,在患者体内,靶树突细胞与能够对所需抗原产生免疫反应的免疫细胞相互作用。在优选的实施方案中,将重组病毒注射到患者体内,所述重组病毒将在患者体内原位转导靶树突细胞。然后,树突细胞表达与要治疗的疾病或病症相关的特定抗原,并且患者能够产生对所述疾病或病症的有效免疫反应。

[0214] 病毒载体基因组可含有编码一种以上抗原的多核苷酸序列,并且在靶树突细胞的转导后,产生对众多递送至细胞的抗原的免疫反应。在一些实施方案中,抗原与单一疾病或病症相关。在其他实施方案中,抗原与多种疾病或病症相关。在一些实施方案中,病毒载体基因组包含编码MART-1/黑色素-A、NY-ESO-1和MAGE的多核苷酸序列。

[0215] 病毒粒子的制备

[0216] 本领域中已知的多种方法中的任何方法都可用以制备基因组包含病毒载体基因组的RNA拷贝的感染性病毒例如慢病毒粒子。在一种方法中,将病毒载体基因组引入含有包装病毒基因组RNA所必需的所有组分的包装细胞系中,将其由病毒载体基因组转录成病毒粒子。作为另外一种选择,病毒载体基因组可包含编码除一个或多个目标序列之外的病毒组分的一个或多个基因。然而,为防止靶细胞中的基因组复制,通常要将复制所需的内源性病毒基因除去并独立地提供于包装细胞系中。

[0217] 一般来说,通过用含有产生粒子所必需的组分的一个或多个质粒载体转染的细胞系来制备慢病毒载体粒子。这些慢病毒载体粒子通常不具复制能力,也就是说,它们仅能够进行单轮感染。最通常,使用多个质粒载体来分隔产生慢病毒载体粒子的各种遗传组分,以主要减小可能另外产生具有复制能力的病毒的重组事件的机会。然而,在需要时,可使用具有所有慢病毒组分的单个质粒载体。作为使用多个质粒载体的系统的一个实例,将细胞系用以下转染:含有病毒载体基因组的至少一个质粒(即,载体基因组质粒),包含LTR、顺式作用包装序列和常常与异源启动子可操作地连接的目标序列;编码病毒酶促和结构组分的至少一个质粒(即,编码诸如Gag和Pol的组分的包装质粒);和编码虫媒病毒包膜糖蛋白的至少一个包膜质粒。如本文所述和本领域中已知的另外的质粒(例如,Rev表达质粒)可用于增强逆转录病毒粒子制备。病毒粒子穿过细胞膜出芽并包含含有基因组的核,所述基因组含有目标序列和靶向树突细胞的虫媒病毒包膜糖蛋白。当虫媒病毒糖蛋白是辛德毕斯病毒E2糖蛋白时,将糖蛋白工程化改造为与参考株HR E2糖蛋白(SEQ ID NO:18)相比降低与硫酸乙酰肝素的结合。

[0218] 用本公开的质粒载体转染包装细胞可通过熟知的方法来实现,并且使用的方法不受任何方式限制。许多非病毒递送系统是本领域中已知的,包括(例如)电穿孔、包括脂质体的基于脂质的递送系统、“裸”DNA的递送和使用诸如Schatzlein AG. (2001. Non-Viral Vectors in Cancer Gene Therapy: Principles and Progresses. Anticancer Drugs, 其以引用方式整体并入本文)中所述的那些化合物的聚环糊精化合物的递送。通常使用阳离子脂质或盐处理方法,参见,例如Graham等人(1973. Virol. 52:456); Wigler等人

(1979.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:1373-76), 前述各参考文献均以引用方式整体并入本文。最常用磷酸钙沉淀法。然而, 也可使用将载体引入细胞中的其他方法, 包括核微注射和细菌原生质体融合。

[0219] 包装细胞系提供包括病毒调控蛋白和结构蛋白的组分, 需要将所述蛋白反向用于将病毒基因组RNA包装到慢病毒载体粒子中。包装细胞系可为能够表达慢病毒蛋白和制备功能性慢病毒载体粒子的任何细胞系。一些合适的包装细胞系包括293 (ATCC CCL X)、293T、HeLa (ATCC CCL 2)、D17 (ATCC CCL 183)、MDCK (ATCC CCL 34)、BHK (ATCC CCL-10) 和Cf2Th (ATCC CRL 1430) 细胞。包装细胞系可稳定表达必需的病毒蛋白。此类包装细胞系(例如) 描述于美国专利号6,218,181, 其以引用方式整体并入本文。作为另外一种选择, 可由编码一种或多种必需的病毒蛋白的核酸分子连同病毒载体基因组一起来瞬时转染包装细胞系。收集所得的病毒粒子并将其用于感染靶细胞。通常将编码包膜糖蛋白的基因克隆到表达载体中, 诸如pcDNA3 (Invitrogen, CA USA)。真核细胞表达载体在本领域中是熟知的并且可从许多商业来源获得。然后, 用编码目标序列(通常为编码抗原) 的病毒载体基因组、编码病毒包装组分的至少一个质粒和用于表达靶分子的载体对包装细胞(诸如293T细胞) 进行共同转染。使包膜表达于包装细胞的膜上, 并将其并入病毒载体中。

[0220] 病毒的产生是如本文所述来测量并表示为每个体积的IU。IU是感染单位, 或者转导单位(TU); IU和TU可互换用作病毒载体粒子制剂的效价的定量量度。如本文所述, 所制备的病毒中的基因组可表达可容易测量的产物。优选荧光蛋白, 即绿色荧光蛋白。通常慢病毒载体是非整合型载体。然后, 将病毒施用于靶细胞, 并且诸如通过流式细胞术来测定表达GFP的靶细胞的数目。然后, 计算效价。优选地, 效价尽可能高, 但至少为 1×10^5 IU/mL、至少 3×10^5 IU/mL、至少 1×10^6 IU/mL、至少 3×10^6 IU/mL或至少 1×10^7 IU/mL细胞上清液(任何浓缩之前)。作为另外一种选择, 效价是在相同细胞中用VSV-G包膜假型化的相同慢病毒载体的效价的至少80%、至少90%、至少95%、至少100%。

[0221] 高度甘露糖化的病毒粒子的制备

[0222] 辛德毕斯病毒包膜蛋白包含四个N连接聚糖—两个在E2蛋白上, 两个在E1蛋白上。在不存在甘露糖苷酶I抑制剂的情况下在哺乳动物细胞中产生的病毒的两个N-聚糖具有高甘露糖结构(一个E2N连接的聚糖和一个E1N连接的聚糖), 而其余两个具有复杂结构。两个复杂结构的N-聚糖暴露在包膜蛋白的表面上, 而两个高甘露糖结构的N聚糖埋在包膜蛋白的三聚体的中心。具有复杂N连接聚糖的辛德毕斯病毒粒子结合DC-SIGN的效率不如具有不太复杂的高度甘露糖化糖蛋白的粒子有效。

[0223] 在本公开中, 发明人证实了在存在甘露糖苷酶I抑制剂kifunensine的情况下在哺乳动物细胞中产生的病毒粒子出人意料地表现出与在存在DMNJ的情况下产生的粒子相比明显增加的DC-SIGN结合。

[0224] 在一些或任何实施方案中, 将病毒包装细胞在存在甘露糖苷酶I抑制剂的情况下培养。在一些或任何实施方案中, 甘露糖苷酶I抑制剂为kifunensine。在一些实施方案中, kifunensine以约0.01 μ g/ml至约1mg/ml、约0.1 μ g/ml至约10 μ g/ml、约0.1 μ g/ml至约9 μ g/ml、约0.1 μ g/ml至约8 μ g/ml、约0.1 μ g/ml至约7 μ g/ml、约0.1 μ g/ml至约6 μ g/ml、约0.1 μ g/ml至约5 μ g/ml、约0.1 μ g/ml至约4 μ g/ml、约0.1 μ g/ml至约3 μ g/ml、约0.1 μ g/ml至约2 μ g/ml、约0.1 μ g/ml至约1 μ g/ml、约0.25 μ g/ml至约10 μ g/ml、约0.25 μ g/ml至约9 μ g/ml、约0.25 μ g/ml至

约8 μ g/ml、约0.25 μ g/ml至约7 μ g/ml、约0.25 μ g/ml至约6 μ g/ml、约0.25 μ g/ml至约5 μ g/ml、约0.25 μ g/ml至约4 μ g/ml、约0.25 μ g/ml至约3 μ g/ml、约0.25 μ g/ml至约2 μ g/ml或约0.25 μ g/ml至约1 μ g/ml的浓度存在于培养基中。

[0225] 在其中假型化慢病毒载体粒子包含辛德毕斯病毒E2糖蛋白和Vpx蛋白的一些或任何实施方案中,在存在甘露糖苷酶I抑制剂的情况下产生慢病毒粒子。在一些实施方案中,甘露糖苷酶抑制剂为去氧麦诺吉利霉素(DMNJ)。在优选的实施方案中,甘露糖苷酶抑制剂为kifunensine。在一些实施方案中,DMNJ以约1.0 μ g/ml至约1.0mg/ml、约1.0 μ g/ml至约900 μ g/ml、约1.0 μ g/ml至约800 μ g/ml、约1.0 μ g/ml至约700 μ g/ml、约1.0 μ g/ml至约600 μ g/ml、约1.0 μ g/ml至约500 μ g/ml、约1.0 μ g/ml至约400 μ g/ml、约1.0 μ g/ml至约300 μ g/ml、约1.0 μ g/ml至约200 μ g/ml、约1.0 μ g/ml至约100 μ g/ml、约50 μ g/ml至约500 μ g/ml、约50 μ g/ml至约400 μ g/ml、约50 μ g/ml至约300 μ g/ml、约50 μ g/ml至约200 μ g/ml、约100 μ g/ml至约400 μ g/ml、约100 μ g/ml至约300 μ g/ml、约100 μ g/ml至约200 μ g/ml、约200 μ g/ml至约500 μ g/ml或约200 μ g/ml至约400 μ g/ml的浓度存在于培养基中。

[0226] 在一些或任何实施方案中,在存在甘露糖苷酶I抑制剂(例如kifunensine)的情况下产生的假型化慢病毒载体粒子包含包膜糖蛋白(例如,辛德毕斯病毒E2),其中至少60%的N连接聚糖包含甘露糖₅(Man₅)、Man₆、Man₇、Man₈和/或Man₉结构。在一些实施方案中,至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的N连接聚糖包含Man₅、Man₆、Man₇、Man₈和/或Man₉结构。

[0227] 在一种情形下,将一种或多种载体用于将多核苷酸序列引入包装细胞系,以制备用诸如E2的辛德毕斯病毒包膜糖蛋白假型化的慢病毒载体粒子,如本文所述。在一些实施方案中,慢病毒载体粒子为高度甘露糖化的。在一些实施方案中,慢病毒载体粒子还包含Vpx蛋白或其变体。在另外其他实施方案中,慢病毒载体粒子为高度甘露糖化的并包含Vpx蛋白或其变体。载体可包含编码病毒的各种组分的多核苷酸序列,这些组分包括辛德毕斯病毒包膜、目标序列(通常编码抗原)以及产生不是由包装细胞提供的病毒所必需的任何组分。

[0228] 病毒包膜蛋白的糖基化模式可通过本领域已知的任何方法确定。例如,可以对用糖苷酶(例如,EndoH或PNGaseF)处理的或不进行处理的病毒糖蛋白的凝胶迁移测定进行比较。其他方法包括从病毒糖蛋白裂解聚糖并通过HPLC和质谱法分离和鉴定组分。

[0229] 病毒的递送

[0230] 可以将病毒以允许病毒与其中需要目标多核苷酸的递送的靶细胞例如树突细胞(DC)接触的任何方式递送至靶细胞。有时,(例如)经由注射入体内将合适量的病毒直接(体内)引入人或动物。合适的动物包括但不限于马、犬、猫、牛、猪、羊、兔、鸡或其他禽类。病毒粒子可通过许多途径来注射,所述途径诸如静脉内、真皮内、皮下、结内、腹膜内或粘膜。可使用真皮下注射装置来递送病毒,此类装置公开于美国专利号7,241,275、7,115,108、7,108,679、7,083,599、7,083,592、7,047,070、6,971,999、6,808,506、6,780,171、6,776,776、6,689,118、6,670,349、6,569,143、6,494,865、5,997,501、5,848,991、5,328,483、5,279,552、4,886,499,它们均以引用方式整体并入本文。其他注射位置也是合适的,诸如直接注射入包含靶细胞的器官中。例如,淋巴结内注射、脾脏内注射或骨髓内注射可用以将病毒分别递送至淋巴结、脾脏和骨髓。取决于特定环境和靶细胞的性质,可经由其他方

式来进行引入,所述方式包括(例如)吸入或直接与上皮组织(例如眼睛、口或皮肤中的那些)接触。

[0231] 作为另外一种选择,提供靶细胞并使其与病毒体外接触,诸如在培养板中接触。靶细胞通常是包含从健康受试者或需要治疗或需要刺激对抗原的免疫反应的受试者获得的树突细胞的细胞群。从受试者获得细胞的方法在本领域中是熟知的并且包括静脉切开术、外科切除术和活检。也可如其他地方所述,通过获得CD34 α +人造血祖细胞和使用体外培养方法来产生人DC(例如,Banchereau等人Cell 106,271-274(2001),其以引用方式整体并入本文)。

[0232] 可将病毒悬浮于培养基中并加入培养板的孔、管或其他容器中。可在接种细胞之前或已接种细胞之后添加含有病毒的培养基。细胞通常是在适当量的培养基中孵育以提供活力,并且允许培养基中合适浓度的病毒以使得宿主细胞的转导发生。优选使细胞与病毒一起孵育足够量的时间以允许病毒感染细胞。优选使细胞与病毒孵育至少1小时、至少5小时或至少10小时。

[0233] 体内和体外递送中,可使用含有感染所需靶细胞的足够数量的病毒粒子的等分试样。当要培养靶细胞时,病毒粒子的浓度通常是至少1IU/ μ L、更优选至少10IU/ μ L、甚至更优选至少300IU/ μ L、甚至更优选至少 1×10^4 IU/ μ L、甚至更优选至少 1×10^5 IU/ μ L、甚至更优选至少 1×10^6 IU/ μ L或甚至更优选至少 1×10^7 IU/ μ L。

[0234] 用病毒体外感染之后,可将靶细胞引入(或重新引入)人或其他动物中。可将细胞引入真皮中,引入真皮下或引入周围血流中。引入动物中的细胞优选来源于该动物的细胞以避免不利的免疫反应。也可使用来源于具有类似免疫背景的供体的细胞。也可使用的其他细胞包括设计来避免不利免疫反应的那些。

[0235] 例如,可分析靶细胞的目标序列或基因的整合、转录和/或表达,整合的基因的拷贝数目以及整合的位置。此类分析可在任何时间进行并可通过本领域中已知的任何方法进行。

[0236] 可分析其中施用了病毒或病毒感染的树突细胞的受试者的受感染细胞的位置、目标病毒递送的多核苷酸或基因的表达、免疫反应的刺激,并通过本领域中已知的任何方法监测与疾病或病症相关的症状。

[0237] 以上公开的感染细胞的方法并不取决于细胞的个体特异性特征。因此,这些方法容易沿用到多个动物物种。在某些情况下,将病毒粒子递送至人或人树突细胞,并且在其他情况下将它们递送至动物,诸如小鼠、马、狗、猫或小鼠或递送至禽类。如本文论述,使病毒载体基因组假型化以赋予其广泛的宿主范围以及靶细胞特异性。本领域中的技术人员也应明白在特定动物物种中实现目标序列的所需表达的适当内部启动子和其他元件。因此,本领域中的技术人员能够修改感染来自任何物种的树突细胞的方法。

[0238] 治疗性和预防性免疫

[0239] 可用如本文所述的慢病毒载体粒子感染树突细胞以预防或治疗疾病或病症,尤其是患者体内的免疫反应活化有益的那些疾病或病症。许多此类疾病是熟知的。例如,可通过本公开的方法治疗或预防的疾病或病症包括但不限于癌症、自身免疫疾病和感染,包括病毒感染、细菌感染、真菌感染和寄生虫感染。在一种方法中,疾病通过本文所述的病毒粒子(例如,包含Vpx蛋白的高度甘露糖化的病毒粒子)来治疗以便将目标序列递送至树突细胞,

其中目标序列的表达产生疾病特异抗原并引起对抗原特异细胞免疫反应和体液免疫反应的刺激。通常,目标序列编码需要针对其的免疫反应的抗原,但通常不在树突细胞中表达。抗原是通过树突细胞来表达和呈递。病毒载体基因组可进一步编码DC成熟因子。

[0240] 在典型用法中,病毒粒子将编码需要针对其的免疫反应的抗原的序列递送至树突细胞。递送可通过使树突细胞与病毒体外接触来实现,于是,将受感染树突细胞提供给患者。在其他时间,递送可通过将病毒递送至受试者以便体内感染树突细胞来实现。然后,树突细胞刺激患者体内的抗原特异性T细胞或B细胞以诱导对所表达抗原的细胞免疫反应和体液免疫反应。以此种方式,通过产生具有所需特异性的免疫细胞来治疗患有疾病或病症的患者。

[0241] 在一些病毒中,活化和/或刺激DC成熟的DC成熟因子连同目标序列一起递送。在替代方案中,在递送病毒之前,递送病毒同时或递送病毒之后,通过递送DC成熟因子来活化DC。DC成熟因子可独立地由病毒的施用提供。

[0242] 如本文所述,一个或多个免疫调节或DC成熟因子可由包含在病毒基因组中并在病毒感染树突细胞之后表达的一个或多个序列来编码。编码免疫调节因子的序列也可提供于独立的载体中,所述载体与编码包装细胞系中的一个或多个抗原的病毒载体一起共同转染。

[0243] 本文所述的方法可用于患者体内的过继性免疫疗法。如上所述,鉴别出需要针对其的免疫反应的抗原。获得编码所需抗原的多核苷酸并将其包装在重组病毒中。从患者获得靶树突细胞并用含有编码所需抗原的多核苷酸的重组病毒来转导。然后,将树突细胞转移回患者体内。

[0244] 可体内注射病毒粒子,在体内,病毒粒子感染DC并递送通常编码抗原的目标序列。病毒粒子的量是至少 3×10^6 IU,并可以是至少 1×10^7 IU、至少 3×10^7 IU、至少 1×10^8 IU、至少 3×10^8 IU、至少 1×10^9 IU或至少 3×10^9 IU。以选定的时间间隔,来自受体淋巴器官的DC可用以来测量表达,(例如)通过观测标记(诸如GFP或荧光素酶)表达来测量。核酸监测技术和逆转录酶(RT)活性的测量方法也可用来分析病毒粒子的生物分布。可测量来自慢病毒载体粒子治疗的受体的周围血液单核细胞、淋巴结、脾脏或恶性或靶病原体感染的组织的T细胞对抗原刺激的反应幅度和反应持久性。可分析诸如上皮细胞和淋巴样细胞的不同于DC的组织细胞的体内基因递送的特异性。

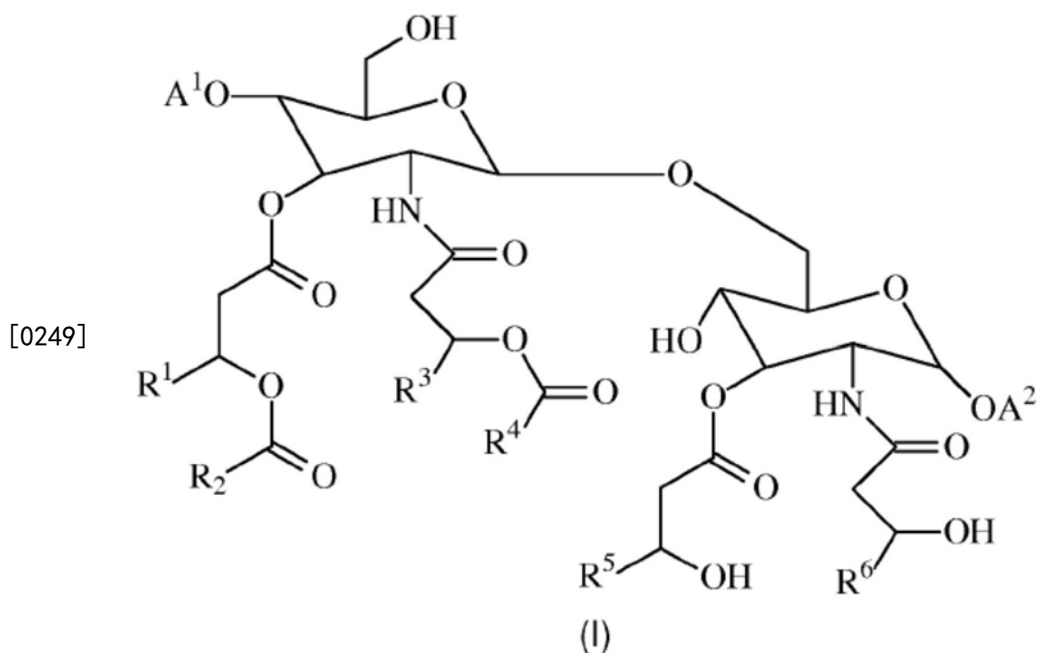
[0245] 疫苗常常包括佐剂。本文所述的慢病毒载体粒子也可连同佐剂一起施用。佐剂可与重组病毒粒子一起施用,在重组病毒粒子之前施用或在重组病毒粒子之后施用。如果与病毒粒子一起施用,那么理想的佐剂不会显著地破坏病毒粒子的完整性,诸如不会破坏含有包膜糖蛋白的病毒膜。

[0246] 多种佐剂可与病毒组合使用以便引起对病毒载体基因组中编码的抗原的免疫反应。优选的佐剂增大对抗原的固有反应而不引起抗原的构型变化,所述构型变化影响反应的定性形式。优选的佐剂包括明矾、3De-O-酰化单磷酸脂A (MPL) (参见GB 2220211)。QS21是一种从南美洲发现的肥皂草皂树(*Quillaja Saponaria Molina tree*)的树皮中分离出的三萜葡萄糖苷或皂角苷(参见Kensil等人,Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach(编辑:Powell和Newman,Plenum Press,NY,1995);美国专利号5,057,540)。其他佐剂是水包油乳液(诸如角鲨烯或花生油),其任选地与诸如单磷酸脂质A的免疫刺激剂组

合(参见Stoute等人,N.Engl.J.Med.336,86-91(1997))。另一种佐剂是CpG(Bioworld Today,1998年11月15日)。佐剂可作为具有活性剂的治疗组合物的组分来施用,或可独立地施用,在施用治疗剂之前施用,与施用治疗剂同时施用或在施用治疗剂之后施用。

[0247] 一类佐剂是铝盐(明矾),诸如氢氧化铝、磷酸铝、硫酸铝。此类佐剂可与或不与其他特定的免疫刺激剂一起使用,所述免疫刺激剂诸如MPL或3-DMP、QS21、聚合或单体氨基酸(诸如,聚谷氨酸或聚赖氨酸)。另一类佐剂是水包油乳液制剂。此类佐剂可与或不与其他特定的免疫刺激剂一起使用,所述免疫刺激剂诸如胞壁酰肽(例如,N-乙酰基胞壁酰基-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-降胞壁酰基-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸-D-异亮氨酸-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油酸-3-羟基磷酰基氧基)-乙胺(MTP-PE)、N-乙酰基谷氨酰胺酰基-N-乙酰基胞壁酰基-L-Ala-D-异谷氨酸-L-Ala-二棕榈酰氧基丙酰胺(DTP-DPP) theramide.TM.)或其他细菌细胞壁组分。水包油乳液包括(a)MF59(W090/14837),其含有5%角鲨烯、0.5%吐温80和0.5%Span 85(任选地含有各种量的MTP-PE),其是使用诸如110Y型微射流机的微射流机(Microfluidics,Newton Mass.)而配制成亚微米粒子,(b)SAF,其含有10%角鲨烯、0.4%吐温80、5%普朗尼克(pluronic)嵌段共聚物L121和thr-MDP,其被微射流成亚微米乳液或涡旋以产生粒径较大的乳液,和(c)Ribi佐剂系统(RAS)(Ribi Immunochem,Hamilton, Mont.),其含有2%角鲨烯、0.2%吐温80和来自单磷酰脂质A(MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)(优选MPL+CWS(Detox™))组成的组的一种或多种细菌细胞壁组分。另一类优选佐剂是皂苷佐剂,诸如Stimulon.TM.(QS21,Aquila,Worcester,Mass.),或由其产生的粒子,诸如ISCOM(免疫刺激复合物)和ISCOMATRIX。其他佐剂包括弗氏完全佐剂(CFA)和弗氏不完全佐剂(IFA)。其他佐剂包括细胞因子,诸如白细胞介素(IL-1、IL-2和IL-12)、巨噬细胞菌落刺激因子(M-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)。

[0248] 可与本文的组合物一起使用的另一佐剂由化学式(I)来标识:



[0250] 其中部分A1和A2独立地选自氢、磷酸酯和磷酸盐的组。钠和钾是用于磷酸盐的示例性反离子。部分R¹、R²、R³、R⁴、R⁵和R⁶独立地选自具有3至23个碳(由C₃-C₂₃表示)的烃基组。

为增加明晰度,要说明的是,当部分是“独立地选自”具有多个成员的规定组时,应了解选择用于第一部分的成员不以任何方式影响或限制对选择用于第二部分的成员的选择。与 R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 连接的碳原子都是不对称的,因此所述碳原子可以R或S立体化学形式存在。在一个实施方案中,所有的那些碳原子都是呈R立体化学形式,而在另一个实施方案中,所有的那些碳原子都是呈S立体化学形式。

[0251] “烃基”指的是完全由氢和碳形成的化学部分,这种情况下,碳原子的排列可以是直链或支链、非环状或环状,并且相邻碳原子之间的键合可以全部是单键,即,提供饱和烃基,或可以在任何两个相邻碳原子之间存在双键或三键,即,提供不饱和烃基,并且烃基中的碳原子数目介于3与24个碳原子之间。烃基可为烷基,其中代表性直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基等,包括十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基等;而支链烷基包括异丙基、仲丁基、异丁基、叔丁基、异戊基等。代表性饱和环状烃基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基等;而不饱和环状烃基包括环戊烯基和环己烯基等。不饱和烃基在相邻碳原子之间含有至少一个双键或三键(如果烃基分别是非环状烃基,那么分别称为“烯基”或“炔基”,并且如果烃基是至少部分环状的烃基,那么分别称为环烯基和环炔基)。代表性直链和支链烯基包括乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-甲基-1-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、2,3-二甲基-2-丁烯基等;而代表性直链和支链炔基包括乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-甲基-1-丁炔基等。

[0252] 式(I)的佐剂可通过本领域中已知的合成方法来获得,例如,通过PCT国际公布第WO 2009/035528号(其以引用方式并入本文)以及WO 2009/035528中标示的公布(那些公布中的每一个公布也以引用方式并入本文)中公开的合成方法来获得。某些佐剂也可从商业上获得。优选的佐剂是Alabaster AL的Avanti Polar Lipids目录中所标示的产品第699800号,参见下文E1与E10的组合。

[0253] 在本发明的多种实施方案中,佐剂具有式(I)的化学结构,但部分 A_1 、 A_2 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 选自先前针对这些部分所提供的选项的子集,其中这些子集下文通过E1、E2等来标示。

[0254] E1: A_1 是磷酸酯或磷酸盐并且 A_2 为氢。

[0255] E2: R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 C_3 - C_{21} 烷基;并且 R^2 和 R^4 是 C_5 - C_{23} 烃基。

[0256] E3: R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 C_5 - C_{17} 烷基;并且 R^2 和 R^4 是 C_7 - C_{19} 烃基。

[0257] E4: R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 C_7 - C_{15} 烷基;并且 R^2 和 R^4 是 C_9 - C_{17} 烃基。

[0258] E5: R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 C_9 - C_{13} 烷基;并且 R^2 和 R^4 是 C_{11} - C_{15} 烃基。

[0259] E6: R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 C_9 - C_{15} 烷基;并且 R^2 和 R^4 是 C_{11} - C_{17} 烃基。

[0260] E7: R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 C_7 - C_{13} 烷基;并且 R^2 和 R^4 是 C_9 - C_{15} 烃基。

[0261] E8: R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 C_{11} - C_{20} 烷基;并且 R^2 和 R^4 是 C_{12} - C_{20} 烃基。

[0262] E9: R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是 C_{11} 烷基;并且 R^2 和 R^4 是 C_{13} 烃基。

[0263] E10: R^1 、 R^3 、 R^5 和 R^6 是十一烷基并且 R^2 和 R^4 是十三烷基。

[0264] 在某些选项中,E2至E10中的每一个都与实施方案E1组合,和/或E2至E9的烃基为烷基,优选直链烷基。

[0265] 式(I)的佐剂可任选与辅助佐剂一起配制成药物组合物,各辅助佐剂如下文论述。

关于这方面,要参考美国专利公布第2008/0131466号,该公布提供了(例如)GLA佐剂的水溶液制剂(AF)和稳定乳液制剂(SE),其中这些制剂可用于任何式(I)的佐剂。

[0266] 佐剂可与本公开的病毒一起作为单一组合物来施用,或可在本公开的重组病毒施用之前、施用同时或施用之后施用。免疫原和佐剂可包装和供应在同一小瓶中,或可包装在独立的小瓶中并在使用之前混合。免疫原和佐剂通常是用标明预定治疗应用的标签来包装。如果免疫原和佐剂是独立包装,那么包装通常包括在使用之前混合的说明书。佐剂和/或载体的选择取决于包含佐剂的疫苗的稳定性、施用途径、给药计划、佐剂对要接种的物种的效力,并且在人中,可药用的佐剂是已获相关监管机构批准或适用于人施用的佐剂。例如,弗氏完全佐剂不适于人施用。优选明矾、MPL和QS21。任选地,可将两种或更多种不同的佐剂同时使用,诸如将明矾与MPL、明矾与QS21、MPL与QS21以及明矾、QS21和MPL一起使用。另外,可使用弗氏不完全佐剂(Chang等人,Advanced Drug Delivery Reviews 32,173-186 (1998)),任选地与明矾、QS21和MPL中任何一个以及其所有组合进行组合。

[0267] 药物组合物和试剂盒

[0268] 本文也涵盖含有本文提供的病毒和一种或多种组分的药物组合物和试剂盒。药物组合物可包括如本文提供的病毒载体粒子和药物载体。试剂盒可包括本文提供的药物组合物和/或组合,以及一种或多种组件,诸如使用说明书、用于将化合物施用于受试者的装置和用于将化合物施用于受试者的装置。

[0269] 本文提供的是含有如本文提供的病毒粒子和合适的药物载体的药物组合物。本文提供的药物组合物可呈各种形式,例如,可呈固体、液体、粉末、水溶液或冻干形式。合适的药物载体的实例是本领域中已知的。此类载体和/或添加剂可通过常规方法配制并可以合适的剂量施用于受试者。诸如脂质、核酸酶抑制剂、聚合物和螯合剂的稳定剂可保护组合物避免在体内的降解。

[0270] 本文提供的病毒载体粒子可包装为试剂盒。试剂盒可任选包括一种或多种组件,诸如使用说明书、装置和另外试剂,以及用于实践本发明方法的组件,诸如管、容器和注射器。示例性试剂盒可包括本文提供的病毒,并且可任选地包括使用说明书、用于检测受试者中的病毒的装置、用于将病毒施用于受试者的装置和用于将化合物施用于受试者的装置。

[0271] 本文也涵盖包含编码目标基因(通常为抗原)的多核苷酸的试剂盒。试剂盒可包括编码病毒包装组分的至少一个质粒和编码辛德毕斯病毒E2糖蛋白变体的载体。一些试剂盒将含有编码病毒包装组分的至少一个质粒、编码辛德毕斯病毒E2糖蛋白变体的载体和编码至少一种DC成熟因子的载体。

[0272] 本文也涵盖包含编码目标序列(通常为抗原)的病毒载体和任选编码DC成熟因子的多核苷酸序列的试剂盒。在一些试剂盒中,试剂盒包括编码病毒包装组分的至少一个质粒和编码辛德毕斯病毒E2糖蛋白变体的载体。

[0273] 试剂盒也可含有说明书。说明书通常包括描述以下的有形表述:试剂盒中包含的病毒和任选其他组分以及施用方法,包括用于确定受试者的适当状态、适当给药量、和对施用病毒来说的适当施用方法的方法。说明书也可包括用于在治疗期的持续时间范围内监测受试者的指导。

[0274] 本文提供的试剂盒也可包括用于将病毒施用于受试者的装置。本领域中已知用于施用药物或疫苗的多种装置中的任何装置可包括在本文提供的试剂盒中。示例性的装置包

括但不限于皮下注射针、静脉内注射针、导管、无针注射装置、吸入器和液体分配器,诸如眼药水滴管。通常,用于施用试剂盒的病毒的装置应与试剂盒的病毒相容;例如,无针注射装置(诸如高压注射装置)可包括在病毒不会由高压注射损坏的试剂盒中,但通常不会包括在病毒会由高压注射损坏的试剂盒中。

[0275] 本文提供的试剂盒也可包括用于将化合物(诸如DC活化剂或刺激剂)施用于受试者的装置。本领域中已知用于将药物施用于受试者的多种装置中的任何装置可包括在本文提供的试剂盒中。示例性的装置包括皮下注射针、静脉内注射针、导管、无针注射装置,但不限于皮下注射针、静脉内注射针、导管、无针注射装置、吸入器和液体分配器,诸如眼药水滴管。通常,用于施用试剂盒的化合物的装置应与施用化合物的所需方法相容。

[0276] 示例性实施方案

[0277] 生成假型化慢病毒载体粒子的方法

[0278] 在本公开的一些实施方案中,生成假型化慢病毒载体粒子的方法包括:

[0279] (a) 在包含甘露糖苷酶I抑制剂的培养基中培养病毒包装细胞,该病毒包装细胞包含:

[0280] (1) 含有编码外源性抗原的多核苷酸的慢病毒载体基因组,

[0281] (2) 编码优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的甲病毒糖蛋白的多核苷酸,以及

[0282] (3) 编码SAMHD1抑制剂的多核苷酸;以及

[0283] (b) 分离优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的假型化慢病毒载体粒子。

[0284] 在特定的方面,甘露糖苷酶抑制剂为kifunensine或DMNJ。

[0285] 在特定的方面,甲病毒糖蛋白为辛德毕斯病毒E2糖蛋白。

[0286] 在特定的方面,SAMHD1抑制剂为Vpx蛋白,例如SIVmac Vpx蛋白、SIVsm蛋白、SIVrcm或HIV-2Vpx蛋白。在特定的方面,SAMHD1抑制剂为抗体或其片段。在特定的方面,SAMHD1抑制剂为具有SAMHD1抑制能力的Vpr蛋白,例如SIVdeb Vpr蛋白或SIVmus Vpr蛋白。

[0287] 在本公开的一些实施方案中,生成假型化慢病毒载体粒子的方法包括:

[0288] (a) 在包含kifunensine的培养基中培养病毒包装细胞,该病毒包装细胞包含:

[0289] (1) 含有编码外源性抗原的多核苷酸的慢病毒载体基因组,

[0290] (2) 编码优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的辛德毕斯E2糖蛋白的多核苷酸,以及

[0291] (3) 编码保持SAMHD1抑制活性的Vpx蛋白或Vpr蛋白的多核苷酸;以及

[0292] (b) 分离优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的假型化慢病毒载体粒子。

[0293] 在特定的方面,E2糖蛋白与SEQ ID NO:30[SIN-Var1]具有90%同一性。在一些方面,(i) E2糖蛋白的残基160不存在或为非谷氨酸的氨基酸,(ii) E2糖蛋白变体的残基70、76或159中的一个或多个为非碱性残基,并且(iii) E2糖蛋白变体不是与辛德毕斯病毒E3糖蛋白的融合蛋白的一部分。在一些方面,E2糖蛋白为SEQ ID NO:30[SIN-Var1]。

[0294] 在特定的方面,Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx (SEQ ID NO:44) 具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0295] 在特定的方面,Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx (SEQ ID NO:44)、SIVsm Vpx (SEQ ID NO:45)、SIVrcm Vpx (SEQ ID NO:46) 或HIV-2Vpx (SEQ ID NO:47) 具有至少80%同一性的氨基酸序列。在特定的方面,Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx (SEQ ID NO:44)、SIVsm Vpx (SEQ ID

N0:45)、SIVrcm Vpx (SEQ ID N0:46) 或HIV-2Vpx (SEQ ID N0:47) 具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0296] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或慢病毒载体包装系统的Vpr蛋白包含与SIVdeb Vpr (SEQ ID N0:48) 或SIVmus Vpr (SEQ ID N0:49) 具有至少80%同一性的氨基酸序列。在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或慢病毒载体包装系统的Vpr蛋白包含与SIVdeb Vpr (SEQ ID N0:48) 或SIVmus Vpr (SEQ ID N0:49) 具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0297] 在特定的方面,抗原为肿瘤特异性抗原或病毒特异性抗原。在一些方面,肿瘤特异性抗原选自NY-ESO-1、MAGE (例如,MAGE-A3和MAGE-A1)、MART-1/黑色素-A、BAGE、RAGE、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白 (例如,TRP2)、肾细胞癌抗原、5T4、SM22- α 、碳酸酐酶I、碳酸酐酶IX (也称为G250)、HIF-1 α 、HIF-2 α 、VEGF、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、前列腺特异性抗原 (PSA)、前列腺酸性磷酸盐、前列腺六跨膜表皮抗原 (STEAP)、NKX3.1、端粒酶、存活素、间皮素、突变ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突变p53、野生型p53、细胞色素P4501B1、N-乙酰氨基葡萄糖转移酶-V、人乳头瘤病毒蛋白E6、人乳头瘤病毒蛋白E7、癌胚抗原、梅克尔细胞病毒T抗原癌蛋白和甲胎蛋白。在一些方面,病毒特异性抗原为HIV抗原、SIV抗原、腺病毒抗原、肠病毒抗原、冠状病毒抗原、杯状病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、埃博拉病毒抗原、黄病毒抗原、肝炎病毒抗原、疱疹病毒抗原、感染性腹膜炎病毒抗原、流感病毒抗原、白血病毒抗原、马尔堡病毒抗原、正粘病毒抗原、乳头状瘤病毒抗原、副流感病毒抗原、副粘病毒抗原、细小病毒抗原、痘病毒抗原、微小核糖核酸病毒抗原、脊髓灰质炎病毒抗原、痘病毒抗原、狂犬病毒抗原、呼肠孤病毒抗原、逆转录病毒抗原或轮状病毒抗原。

[0298] 在特定的方面,慢病毒载体基因组还包含编码第二抗原的核苷酸序列。在特定的方面,第一和第二抗原作为在这两种抗原之间包含自裂解A2肽的融合蛋白而表达。在一些方面,自裂解A2肽包含SEQ ID N0:56或SEQ ID N0:57的氨基酸序列。在一些方面,第一抗原NY-ESO-1和第二抗原为MAGE-A3。

[0299] 在特定的方面,kifunensine以约0.1 μ g/ml至约10 μ g/ml的浓度存在于培养基中。在一些方面,kifunensine以约0.25 μ g/ml至约2 μ g/ml的浓度存在于培养基中。在一些方面,kifunensine以约0.01 μ g/ml至约1mg/ml的浓度存在于培养基中。

[0300] 在特定的方面,病毒包装细胞还包含:

[0301] (i) 包含gag和pol基因的多核苷酸;以及

[0302] (ii) 编码rev蛋白的多核苷酸。在一些方面,编码Vpx蛋白的多核苷酸与编码rev蛋白的多核苷酸或者包含gag和pol基因的多核苷酸在相同或不同的质粒上。在一些方面,gag和pol基因为人类密码子优化的并且包含SEQ ID N0:54的位置1228至1509周围的非优化窗。在一些方面,包含gag和pol基因的多核苷酸不含功能性rev应答元件 (RRE)。在一些方面,pol基因编码无活性整合酶。在一些方面,整合酶具有D64V突变。

[0303] 在特定的方面,慢病毒载体基因组衍生自HIV-1。

[0304] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的慢病毒载体基因组能够整合。

[0305] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的慢病毒载体基因组为整合缺损型或整合缺陷型的。例如,该慢病毒载体的整合效率可以是能够整

合的病毒载体的至少1/10 (优选至少1/20、至少1/30、至少1/40、至少1/50、至少1/60、至少1/70、至少1/80、至少1/90、至少1/100、至少1/150、至少1/200、至少1/250、至少1/300、至少1/350、至少1/400、至少1/450、至少1/500、至少1/550、至少1/600、至少1/650、至少1/700、至少1/750、至少1/800、至少1/850、至少1/900、至少1/950或至少1/1000)。在示例性实施方案中,该慢病毒载体的整合效率可以是至少约1/20至约1/100。

[0306] 在特定的方面,慢病毒载体基因组具有灭活的3' 长末端重复序列 (LTR) 或自灭活3' 长末端重复序列 (LTR)。在一些方面,慢病毒载体基因组包含不含增强子序列、TATA盒、Sp1位点、NK-κB位点或多嘌呤区 (PPT) 中的至少一个的U3元件。在一些方面,pol基因编码无活性整合酶并且慢病毒载体基因组不含功能性聚嘌呤区 (PPT)。

[0307] 在特定的方面,慢病毒载体基因组包含SEQ ID NO:21[SIN载体]、22[703载体]或23[704载体]任一者的核苷酸序列。

[0308] 在特定的方面,慢病毒载体基因组还包含编码树突细胞成熟/刺激因子的核苷酸序列。在一些方面,树突细胞成熟/刺激因子选自GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、TNFα、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40配体和药物诱导型CD40。

[0309] 在特定的方面,编码抗原的核苷酸序列可操作地连接到选自人泛素-C启动子 (UbiC)、巨细胞病毒立即早期启动子 (CMV)、劳氏肉瘤病毒启动子 (RSV) 和四环素反应性启动子的启动子。在一些方面,启动子为内含子缺陷型启动子。在一些方面,内含子缺陷型启动子为UbiC。

[0310] 在特定的方面,提供了通过第[0206]、[0210]或[0218]段的方法产生的慢病毒载体粒子。

[0311] 在特定的方面,提供了通过第[0216]段的方法产生的慢病毒载体粒子。

[0312] 包含假型化慢病毒载体粒子的组合物

[0313] 在本公开的一些或任何实施方案中,提供了一种包含假型化慢病毒载体粒子的组合物,该假型化慢病毒载体粒子包含(a) 保持SAMHD1抑制活性的Vpx蛋白或Vpr蛋白,(b) 编码抗原的外源性多核苷酸,以及(c) 优先地结合表达DC-SIGN的细胞的多种包膜糖蛋白,其中该组合物与在不存在甘露糖苷酶抑制剂的情况下制备的相同假型化慢病毒载体粒子的对照组合物相比更加高度甘露糖化。例如,这种高度甘露糖化的组合物特征在于含有包膜糖蛋白,该包膜糖蛋白比在不存在甘露糖苷酶抑制剂的情况下制备的对照组合物的包膜糖蛋白对EndoH更加敏感。又如,这种高度甘露糖化的组合物特征在于含有包膜糖蛋白,该包膜糖蛋白表现出比在不存在甘露糖苷酶抑制剂的情况下制备的对照组合物的包膜糖蛋白增加量的EndoH敏感性聚糖。应当理解,对照组合物将含有大约相同数量的包含具有相同氨基酸序列的包膜糖蛋白的假型化慢病毒载体粒子。还应当理解,虽然本公开主要关注于负责识别和结合树突细胞的甲病毒E2糖蛋白,及其高度甘露糖化形式,但是甲病毒包膜还含有易受高度甘露糖化影响的E1糖蛋白。因此,提及包膜糖蛋白和高度甘露糖化的包膜糖蛋白包括提及高度甘露糖化的甲病毒E2和/或E1糖蛋白,具体为高度甘露糖化的辛德毕斯E2和/或E1糖蛋白。其他类型的病毒包膜(具体为逆转录病毒包膜)的高度甘露糖化也改善树突细胞的识别。

[0314] 在本公开的一些实施方案中,提供了一种包含假型化慢病毒载体粒子的组合物,该假型化慢病毒载体粒子包含(a) 保持SAMHD1抑制活性的Vpx蛋白或Vpr蛋白,(b) 编码抗原

的外源性多核苷酸,以及(c)优先地结合表达DC-SIGN的细胞的多种辛德毕斯E2糖蛋白,其中该组合物与在不存在甘露糖苷酶抑制剂的情况下制备的假型化慢病毒载体粒子的对照组合物相比更加高度甘露糖化。此类组合物中大量的E2糖蛋白比在不存在甘露糖苷酶抑制剂的情况下制备的对照组合物中的E2糖蛋白更加高度甘露糖化,例如,更加EndoH敏感。

[0315] EndoH是一种特化的内切糖苷酶,它将只裂解高甘露糖N连接糖基化(参见图3A),例如Man5-9聚糖;Man3-4聚糖是耐EndoH的。相比之下,N-糖酰胺酶F(PNGase F)将裂解所有类型的糖基化,包括<Man5的低甘露糖聚糖。当病毒粒子在存在甘露糖苷酶I抑制剂(诸如 kifunensine)的情况下产生时,病毒包膜中的糖蛋白将含有更高甘露糖的聚糖,该聚糖易受EndoH裂解的影响(即,将更加“EndoH敏感”)。检测高甘露糖聚糖在病毒粒子组合物中的存在的一种方法是在EndoH处理后通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定包膜糖蛋白的分子量。该“凝胶迁移”测定法在实施例3中示出。可将病毒粒子以及在不存在甘露糖苷酶抑制剂的情况下制备的相同病毒粒子的对照组合物的样品在10%SDS-PAGE凝胶上运行,并用抗辛德毕斯糖蛋白抗体进行免疫印迹检测。在存在甘露糖苷酶I抑制剂的情况下产生的病毒包膜更加EndoH敏感,并因此与对照病毒相比在EndoH处理后在凝胶上跑得更快(更远的距离)。因此,可在EndoH处理后使用凝胶迁移测定法测定高甘露糖糖蛋白的存在。

[0316] 对照病毒可因在辛德毕斯糖蛋白中存在糖基化位点而对EndoH处理部分敏感,这些位点通常为高甘露糖的,因为它们处于内部并且在产生过程中未暴露于甘露糖苷酶I。因此,当在10%SDS-PAGE上运行时,对照病毒可在EndoH处理后表现出一定的分子量迁移,原因是此类内部高甘露糖聚糖的EndoH裂解。然而,该迁移可以只是在将对照病毒用N-糖酰胺酶F(其裂解所有聚糖)处理时所见的迁移的约35%。

[0317] 因此,在特定的方面,EndoH敏感性聚糖的量通过在EndoH处理后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来测定辛德毕斯糖蛋白的分子量而加以检测。当EndoH处理导致10%SDS-PAGE凝胶上对应于包膜(E2和/或E1)糖蛋白的条带与对照包膜糖蛋白相比迁移到较低的分子量时(如通过视觉检查所确定),检测到组合物中增加量的endoH敏感性聚糖,其表明病毒粒子的组合物为高度甘露糖化的。

[0318] 在一些示例性实施方案中,在EndoH处理后所述包膜糖蛋白的分子量完全迁移,并基本上与PNGaseF处理后所述包膜糖蛋白的分子量相同。在其他示例性实施方案中,在用EndoH处理后所述包膜糖蛋白的分子量在(a)未用内切糖苷酶处理的包膜糖蛋白与(b)用N-糖酰胺酶F处理的包膜糖蛋白之间迁移了约90%或更多的距离。在其他示例性实施方案中,在用EndoH处理后所述包膜糖蛋白的分子量在(a)未用内切糖苷酶处理的包膜糖蛋白与(b)用N-糖酰胺酶F处理的包膜糖蛋白之间迁移了约90%或更多的距离。在另外其他实施方案中,所述包膜糖蛋白的分子量在(a)未用内切糖苷酶处理的包膜糖蛋白与(b)用N-糖酰胺酶F处理的包膜糖蛋白之间迁移了约40%或更多、或优选约45%或更多、或约50%或更多、或约55%或更多、或约60%或更多、或约65%或更多、或约70%或更多、或约75%或更多、或约80%或更多、或约85%或更多的距离。如上所述,提及包膜糖蛋白具体包括提及辛德毕斯E2和/或E1糖蛋白。

[0319] 在特定的方面,所述组合物中至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%

或至少95%的包膜糖蛋白(例如所述组合物中的辛德毕斯E2和/或E1糖蛋白)与在不存在甘露糖苷酶抑制剂的情况下制备的假型化慢病毒载体粒子的对照组合中具有相同氨基酸序列的对照包膜蛋白相比具有增加量的EndoH敏感性聚糖。

[0320] 在本公开的一些实施方案中,组合物包含假型化慢病毒载体粒子,所述假型化慢病毒载体粒子含有(a) SAMHD1抑制剂,(b) 包含目标序列的慢病毒基因组,以及(c) 优先结合表达DC-SIGN的细胞的包膜糖蛋白,其中所述组合物中至少80%的N连接聚糖包含Man₉结构。

[0321] 在特定的方面,SAMHD1抑制剂为Vpx蛋白,例如SIVmac Vpx蛋白、SIVsm Vpx蛋白、SIVrcm Vpx或HIV-2Vpx蛋白。在特定的方面,SAMHD1抑制剂为抗体或其片段。在特定的方面,SAMHD1抑制剂为具有SAMHD1抑制能力的Vpr蛋白,例如SIVdeb Vpr蛋白或SIVmus Vpr蛋白。

[0322] 在特定的方面,目标序列编码蛋白质或核酸分子,诸如siRNA、微小RNA、互补区长度大于约20个核糖核苷酸的自补双链RNA或与信使RNA互补的RNA,其中所述互补(反义)RNA与信使RNA的结合阻断其被翻译成蛋白质的能力。在某些情况下,目标序列编码需要针对其的免疫反应的抗原。在特定的方面,目标序列编码肿瘤抗原或传染病抗原(例如,来自诸如HIV、HSV、HCV、HPV、疟疾或肺结核的抗原)。在特定的方面,多个目标序列包含在单个载体中。

[0323] 在一些实施方案中,组合物包含假型化慢病毒载体粒子,该假型化慢病毒载体粒子包含(a) Vpx蛋白,(b) 编码抗原的外源性多核苷酸,以及(c) 优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的包膜糖蛋白,其中所述组合物中至少80%的N连接聚糖包含Man₉结构。

[0324] 在特定的方面,Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx蛋白(SEQ ID NO:44)具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0325] 在特定的方面,Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx(SEQ ID NO:44)、SIVsm Vpx(SEQ ID NO:45)、SIVrcm Vpx(SEQ ID NO:46)或HIV-2Vpx(SEQ ID NO:47)具有至少80%同一性的氨基酸序列。在特定的方面,Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx(SEQ ID NO:44)、SIVsm Vpx(SEQ ID NO:45)、SIVrcm Vpx(SEQ ID NO:46)或HIV-2Vpx(SEQ ID NO:47)具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0326] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或慢病毒载体包装系统的Vpr蛋白包含与SIVdeb Vpr(SEQ ID NO:48)或SIVmus Vpr(SEQ ID NO:49)具有至少80%同一性的氨基酸序列。在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或慢病毒载体包装系统的Vpr蛋白包含与SIVdeb Vpr(SEQ ID NO:48)或SIVmus Vpr(SEQ ID NO:49)具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0327] 在特定的方面,假型化慢病毒载体粒子以至少1%或至少5%或至少10%或至少20%的体外转导效率感染表达DC-SIGN的树突细胞。

[0328] 在特定的方面,糖蛋白为辛德毕斯病毒E2糖蛋白。在一些方面,E2糖蛋白与SEQ ID NO:30[SIN-Var1]具有至少90%的同一性。在一些方面,(i) E2糖蛋白的残基160不存在或为非谷氨酸的氨基酸,(ii) E2糖蛋白变体的残基70、76或159中的一个或多个为非碱性残基,并且(iii) E2糖蛋白变体不是与辛德毕斯病毒E3糖蛋白的融合蛋白的一部分。

[0329] 在特定的方面,抗原为肿瘤特异性抗原或病毒特异性抗原。在一些方面,肿瘤特异

性抗原选自NY-ESO-1、MAGE、MAGE-A3和MAGE-A1、MART-1/黑色素-A、BAGE、RAGE、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白(例如TRP2)、肾细胞癌抗原、5T4、SM22- α 、碳酸酐酶I、碳酸酐酶IX(也称为G250)、HIF-1 α 、HIF-2 α 、VEGF、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸盐、前列腺六跨膜表皮抗原(STEAP)、NKX3.1、端粒酶、存活素、间皮素、突变ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突变p53、野生型p53、细胞色素P4501B1、N-乙酰氨基葡萄糖转移酶-V、人乳头瘤病毒蛋白E6、人乳头瘤病毒蛋白E7、癌胚抗原、梅克尔细胞病毒T抗原癌蛋白和甲胎蛋白。在一些方面,病毒特异性抗原为HIV抗原、SIV抗原、腺病毒抗原、肠病毒抗原、冠状病毒抗原、杯状病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、埃博拉病毒抗原、黄病毒抗原、肝炎病毒抗原、疱疹病毒抗原、感染性腹膜炎病毒抗原、流感病毒抗原、白血病毒抗原、马尔堡病毒抗原、正粘病毒抗原、乳头状瘤病毒抗原、副流感病毒抗原、副粘病毒抗原、细小病毒抗原、瘟病毒抗原、微小核糖核酸病毒抗原、脊髓灰质炎病毒抗原、痘病毒抗原、狂犬病毒抗原、呼肠孤病毒抗原、逆转录病毒抗原或轮状病毒抗原。

[0330] 在特定的方面,慢病毒载体基因组还包含编码第二抗原的核苷酸序列。在特定的方面,第一和第二抗原作为在这两种抗原之间包含自裂解A2肽的融合蛋白而表达。在一些方面,自裂解A2肽包含SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57的氨基酸序列。在一些方面,第一抗原为MAGE-A3并且第二抗原为NY-ESO-1。

[0331] 在特定的方面,慢病毒载体基因组衍生自HIV-1。

[0332] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的慢病毒载体基因组能够整合。

[0333] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的慢病毒载体基因组为整合缺陷型或整合缺损型的。

[0334] 在特定的方面,慢病毒载体基因组具有灭活的3'长末端重复序列(LTR)或自灭活3'长末端重复序列(LTR)。在一些方面,慢病毒载体基因组包含不含增强子序列、TATA盒、Sp1位点、NK- κ B位点或聚嘌呤区(PPT)中的至少一个的U3元件。

[0335] 在特定的方面,慢病毒载体基因组包含SEQ ID NO:21[SIN载体]、22[703载体]或23[704载体]任一者的核苷酸序列。

[0336] 在特定的方面,慢病毒载体基因组还包含编码树突细胞成熟/刺激因子的核苷酸序列。在一些方面,树突细胞成熟/刺激因子选自GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、TNF α 、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40配体和药物诱导型CD40。

[0337] 在特定的方面,编码抗原的核苷酸序列可操作地连接到选自人泛素-C启动子(UbiC)、巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)、劳氏肉瘤病毒启动子(RSV)和四环素反应性启动子的启动子。在一些方面,启动子经过修饰以成为内含子缺陷型的。

[0338] 在一些方面,假型化慢病毒载体粒子包含Rev蛋白。

[0339] 在特定的方面,假型化慢病毒载体粒子具有至少 10^5 /mL的IU。

[0340] 在特定的方面,组合物还包含免疫刺激剂。

[0341] 在特定的方面,组合物还包含佐剂。例如,如上所述,佐剂包括明矾或3De-O-酰化单磷酸脂A(MPL)。本文所公开的佐剂的类别包括:(a)铝盐;(b)水包油乳液制剂,任选地含有或不含其他特异性免疫刺激剂,诸如胞壁肽或其他细菌细胞壁组分;(c)皂草苷佐剂,包括ISCOM(免疫刺激复合物)和ISCOMATRIX;(d)完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂

(IFA); (e) 细胞因子; 以及 (f) 式 (I) 的佐剂。在式 (I) 中, 优选的佐剂是 Alabaster, AL 的 Avanti Polar Lipids 目录中所标示的产品第 699800 号, 参见 E1 与 E10 的组合, 其中 (i) A₁ 是磷酸酯或磷酸盐并且 A₂ 是氢, 以及 (ii) R¹、R³、R⁵ 和 R⁶ 是十一烷基并且 R² 和 R⁴ 是十三烷基。在特定的方面, 包膜糖蛋白还结合表达小鼠 SIGNR1 的细胞。

[0342] 在特定的方面, 假型化慢病毒载体粒子还比不表达小鼠 SIGNR1 的细胞更有效地转导表达小鼠 SIGNR1 的细胞。

[0343] 在本公开的一些实施方案中, 上述假型化慢病毒载体粒子用于治疗或预防患者疾病或病症的方法。在特定的方面, 疾病或病症为癌症、自身免疫疾病或感染, 例如病毒感染、细菌感染、真菌感染或寄生虫感染。

[0344] 包含 Vpx 蛋白的病毒载体粒子

[0345] 在本公开的一些实施方案中, 提供了能够靶向表达的细胞的假型化慢病毒载体粒子, 其包含:

[0346] (a) 非天然包膜糖蛋白;

[0347] (b) 包含目标外源性多核苷酸的慢病毒载体基因组; 以及

[0348] (c) Vpx 蛋白或其他 SAMHD1 抑制剂。

[0349] 在一些方面, 假型化慢病毒载体粒子还包含 Rev 蛋白。

[0350] 在本公开的一些实施方案中, 提供了用于产生假型化慢病毒载体粒子的慢病毒载体包装系统, 其包含:

[0351] (i) 编码非天然包膜糖蛋白的第一多核苷酸;

[0352] (ii) 包含 gag 和 pol 基因的第二多核苷酸;

[0353] (iii) 编码 rev 蛋白的第三多核苷酸;

[0354] (iv) 编码 Vpx 蛋白或其他 SAMHD1 抑制剂的第四多核苷酸; 以及

[0355] (v) 包含目标外源性多核苷酸的慢病毒载体基因组;

[0356] 其中两种或更多种多核苷酸在相同的质粒上或在不同的质粒上。在特定的方面, (iv) 的多核苷酸在与 (i)、(ii)、(iii) 或 (v) 的多核苷酸中的任一者或多者相同的质粒上。

[0357] 在特定的方面, 包装细胞选自 293、293T、HeLa、D17、MDCK、BHK 和 Cf2Th 细胞。

[0358] 在特定的方面, 任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或慢病毒载体包装系统的 Vpx 蛋白包含与 SEQ ID NO:44 (SIVmac) 具有至少 80% 同一性的氨基酸序列, 任选 SIVmac Vpx 蛋白 (SEQ ID NO:44)、SIVsm Vpx 蛋白 (SEQ ID NO:45)、SIVrcm Vpx 蛋白 (SEQ ID NO:46) 或 HIV-2VPX 蛋白 (SEQ ID NO:47)。在特定的方面, 任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或慢病毒载体包装系统的 Vpx 蛋白包含与 SEQ ID NO:44 (SIVmac) 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列, 任选 SIVmac Vpx 蛋白 (SEQ ID NO:44)、SIVsm Vpx 蛋白 (SEQ ID NO:45)、SIVrcm Vpx 蛋白 (SEQ ID NO:46) 或 HIV-2VPX 蛋白 (SEQ ID NO:47)。

[0359] 在特定的方面, 任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或慢病毒载体包装系统的 Vpr 蛋白包含与 SIVdeb Vpr (SEQ ID NO:48) 或 SIVmus Vpr (SEQ ID NO:49) 具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。在特定的方面, 任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或慢病毒载体包装系统的 Vpr 蛋白包含与 SIVdeb Vpr (SEQ ID NO:48) 或 SIVmus Vpr (SEQ ID NO:49) 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0360] 在特定的方面, 任何上述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或慢病毒载体包装系

统的慢病毒载体基因组衍生自HIV-1或MLV。

[0361] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的慢病毒载体基因组能够整合。

[0362] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的慢病毒载体基因组不能整合。

[0363] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的非天然包膜糖蛋白选自甲病毒糖蛋白(包括辛德毕斯E2糖蛋白)、VEE E2糖蛋白、弹状病毒或水泡病毒糖蛋白(包括VSV-G糖蛋白)、沙粒病毒糖蛋白、冠状病毒糖蛋白、副粘病毒糖蛋白、黄病毒糖蛋白、正粘病毒糖蛋白和杆状病毒糖蛋白,优选甲病毒,诸如辛德毕斯病毒。

[0364] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的非天然包膜糖蛋白为包含与SEQ ID NO:30[SINVar1]具有至少80%同一性的氨基酸序列的辛德毕斯病毒E2糖蛋白。

[0365] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的非天然包膜糖蛋白优先地结合表达SAMHD1的细胞。在一些方面,表达SAMHD1的细胞为髓细胞,任选树突细胞、单核细胞或巨噬细胞。

[0366] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的非天然包膜糖蛋白优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞。

[0367] 在特定的方面,目标多核苷酸编码(i)抗原,(ii)治疗性多肽或(iii)抑制性寡核苷酸。在一些方面,目标多核苷酸编码siRNA。

[0368] 在特定的方面,目标多核苷酸编码病毒、细菌、真菌、原虫或癌抗原。

[0369] 在特定的方面,包膜糖蛋白还结合表达小鼠SIGNR1的细胞。

[0370] 在特定的方面,假型化慢病毒载体粒子还比不表达小鼠SIGNR1的细胞更有效地转导表达小鼠SIGNR1的细胞。

[0371] 在本公开的一些实施方案中,提供了产生任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子的方法,其包括将任何前述实施方案的包装系统在培养基中进行培养。在一些方面,培养基包含甘露糖苷酶I抑制剂,任选kifunensine或DMNJ。

[0372] 在本公开的一些实施方案中,提供了包含任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子的组合物,其中载体粒子为高度甘露糖化的。

[0373] 在本公开的一些实施方案中,提供了包含任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子的组合物,其中所述组合物中至少80%的N连接聚糖包含Man₉结构。

[0374] 在本公开的一些实施方案中,提供了在体外或体内将慢病毒载体基因组递送到表达SAMHD1的细胞的方法,其包括将细胞与任何上述实施方案的载体粒子接触。在一些方面,表达SAMHD1的细胞为树突细胞、单核细胞或巨噬细胞。

[0375] 在本公开的一些实施方案中,提供了引起免疫反应或对个体进行免疫的方法,其包括向个体施用任何上述实施方案的载体粒子,优选优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的载体粒子。

[0376] 在本公开的一些实施方案中,上述假型化慢病毒载体粒子用于治疗或预防患者的疾病或病症的方法。在特定的方面,疾病或病症为癌症、自身免疫疾病或感染,例如病毒感染、细菌感染、真菌感染或寄生虫感染。

[0377] 生成具有高度甘露糖化包膜糖蛋白的病毒载体粒子的方法

[0378] 在本公开的一些实施方案中,提供了生成优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的病毒载体粒子的方法,其包括:在培养基中培养包含病毒粒子组分的病毒包装细胞,所述组分包含编码优先地结合到表达DC-SIGN的树突细胞的包膜糖蛋白的多核苷酸,并且其中培养基包含浓度为约0.01 μ g/ml至约1mg/ml、优选约0.1 μ g/ml至约10 μ g/ml的kifunensine。

[0379] 在特定的方面,kifunensine以约0.25 μ g/ml至约2 μ g/ml的浓度存在于培养基中。

[0380] 在特定的方面,kifunensine以约0.1 μ g/ml至约10 μ g/ml或约0.25 μ g/ml至约2 μ g/ml或约0.5 μ g/ml至约5 μ g/ml的浓度存在于培养基中。

[0381] 在特定的方面,病毒粒子组分包含慢病毒载体基因组。

[0382] 在特定的方面,病毒粒子以在不含kifunensine的培养基中产生的病毒粒子至少5倍的转导效率感染表达DC-SIGN的细胞。

[0383] 在特定的方面,病毒包装细胞包含:

[0384] (i) 编码包膜糖蛋白的第一多核苷酸;

[0385] (ii) 包含gag和pol基因的第二多核苷酸;

[0386] (iii) 编码rev蛋白的第三多核苷酸;以及

[0387] (iv) 含有编码抗原的第四多核苷酸的慢病毒载体基因组。

[0388] 在特定的方面,包膜糖蛋白为辛德毕斯病毒E2糖蛋白。在一些方面,E2糖蛋白包含[SINVar1]或与之具有至少80%的氨基酸序列同一性的变体。在一些方面,E2糖蛋白与SEQ ID NO:30[SIN-Var1]具有90%同一性。在一些方面,(i) E2糖蛋白的残基160不存在或为非谷氨酸的氨基酸,(ii) E2糖蛋白变体的残基70、76或159中的一个或多个为非碱性残基,并且(iii) E2糖蛋白变体不是与辛德毕斯病毒E3糖蛋白的融合蛋白的一部分。在一些方面,E2糖蛋白为SEQ ID NO:30[SIN-Var1]。

[0389] 在特定的方面,慢病毒载体基因组衍生自HIV-1。

[0390] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的慢病毒载体基因组能够整合。

[0391] 在特定的方面,任何前述实施方案的假型化慢病毒载体粒子或包装系统的慢病毒载体基因组为整合缺陷型或整合缺损型的。在一些方面,pol基因编码无活性整合酶并且慢病毒载体基因组不含功能性聚嘌呤区(PPT)。

[0392] 在特定的方面,病毒包装细胞还包含编码Vpx蛋白的多核苷酸,该Vpx蛋白保持SAMHD1抑制活性,任选地包含与SIVmac Vpx(SEQ ID NO:44)具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0393] 在本公开的一些实施方案中,提供了包含展示甲病毒E2糖蛋白的病毒粒子的组合物,其中所述组合物中至少80%的N连接聚糖包含Man₉结构。

[0394] 在特定的方面,甲病毒E2糖蛋白为优先地结合到表达DC-SIGN的树突细胞的辛德毕斯E2糖蛋白。

[0395] 在本公开的一些实施方案中,提供了将病毒载体基因组递送到表达DC-SIGN的细胞的方法,所述方法包括施用任何前述实施方案的病毒粒子或组合物。

[0396] 附加实施方案

[0397] 1.一种生成假型化慢病毒载体粒子的方法,该方法包括:

- [0398] (a) 在包含kifunensine的培养基中培养病毒包装细胞,该病毒包装细胞包含:
- [0399] (1) 含有编码外源性抗原的多核苷酸的慢病毒载体基因组,
- [0400] (2) 编码优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的辛德毕斯E2糖蛋白的多核苷酸,以及
- [0401] (3) 编码保持SAMHD1抑制活性的Vpx蛋白或Vpr蛋白的多核苷酸;以及
- [0402] (b) 分离优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的假型化慢病毒载体粒子。
- [0403] 2.实施方案1的方法,其中E2糖蛋白与SEQ ID NO:30[SIN-Var1]具有90%同一性。
- [0404] 3.实施方案1或2的方法,其中(i) E2糖蛋白的残基160不存在或为非谷氨酸的氨基酸,(ii) E2糖蛋白变体的残基70、76或159中的一个或多个为非碱性残基,并且(iii) E2糖蛋白变体不是与辛德毕斯病毒E3糖蛋白的融合蛋白的一部分。
- [0405] 4.实施方案2的方法,其中E2糖蛋白为SEQ ID NO:30[SIN-Var1]。
- [0406] 5.上述实施方案任一个的方法,其中Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx[SEQ ID NO:44]具有至少80%同一性的氨基酸序列。
- [0407] 6.实施方案1至4任一个的方法,其中Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx(SEQ ID NO:44)、SIVsm Vpx(SEQ ID NO:45)、SIVrcm Vpx(SEQ ID NO:46)或HIV-2Vpx(SEQ ID NO:47)具有至少90%同一性的氨基酸序列。
- [0408] 7.实施方案1至4任一个的方法,其中Vpx蛋白包含与SIVdeb Vpr(SEQ ID NO:48)或SIVmus Vpr(SEQ ID NO:49)具有至少90%同一性的氨基酸序列。
- [0409] 8.上述实施方案任一个的方法,其中抗原为肿瘤特异性抗原或病毒特异性抗原。
- [0410] 9.实施方案8的方法,其中肿瘤特异性抗原选自NY-ESO-1、MAGE、MART-1/黑色素-A、BAGE、RAGE、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白、肾细胞癌抗原、5T4、SM22- α 、碳酸酐酶I、碳酸酐酶IX(也称为G250)、HIF-1 α 、HIF-2 α 、VEGF、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸盐、前列腺六跨膜表皮抗原(STEAP)、NKX3.1、端粒酶、存活素、间皮素、突变ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突变p53、野生型p53、细胞色素P4501B1、N-乙酰氨基葡萄糖转移酶-V、人乳头瘤病毒蛋白E6、人乳头瘤病毒蛋白E7、癌胚抗原和甲胎蛋白。
- [0411] 10.实施方案8的方法,其中病毒特异性抗原为HIV抗原、SIV抗原、腺病毒抗原、肠病毒抗原、冠状病毒抗原、杯状病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、埃博拉病毒抗原、黄病毒抗原、肝炎病毒抗原、疱疹病毒抗原、感染性腹膜炎病毒抗原、流感病毒抗原、白血病病毒抗原、马尔堡病毒抗原、正粘病毒抗原、乳头状瘤病毒抗原、副流感病毒抗原、副粘病毒抗原、细小病毒抗原、瘟病毒抗原、微小核糖核酸病毒抗原、脊髓灰质炎病毒抗原、痘病毒抗原、狂犬病毒抗原、呼肠孤病毒抗原、逆转录病毒抗原或轮状病毒抗原。
- [0412] 11.上述实施方案任一个的方法,其中慢病毒载体基因组还包含编码第二抗原的核苷酸序列。
- [0413] 12.实施方案11的方法,其中第一和第二抗原作为在这两种抗原之间包含自裂解A2肽的融合蛋白而表达。
- [0414] 13.实施方案12的方法,其中自裂解A2肽包含SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57的氨基酸序列。
- [0415] 14.实施方案11至13任一个的方法,其中第一抗原为NY-ESO-1并且第二抗原为

MAGE-A3。

[0416] 15.实施方案11的方法,其中第一和第二抗原由双向启动子表达。

[0417] 16.上述实施方案任一个的方法,其中kifunensine以约0.1 μ g/ml至约10 μ g/ml的浓度存在于培养基中。

[0418] 17.实施方案16的方法,其中kifunensine以约0.25 μ g/ml至约2 μ g/ml的浓度存在于培养基中。

[0419] 18.上述实施方案任一个的方法,其中病毒包装细胞还包含:

[0420] (i) 包含gag和pol基因的多核苷酸;以及

[0421] (ii) 编码rev蛋白的多核苷酸。

[0422] 19.实施方案18的方法,其中gag和pol基因为人类密码子优化的并且包含SEQ ID NO:54的位置1228至1509周围的非优化窗。

[0423] 20.实施方案18或19的方法,其中包含gag和pol基因的多核苷酸不含功能性rev应答元件(RRE)。

[0424] 21.实施方案18至20任一个的方法,其中pol基因编码无活性整合酶。

[0425] 22.实施方案21的方法,其中整合酶具有D64V突变。

[0426] 23.实施方案18至22任一个的方法,其中编码Vpx蛋白的多核苷酸与编码rev蛋白的多核苷酸或者包含gag和pol基因的多核苷酸在相同或不同的质粒上。

[0427] 24.上述实施方案任一个的方法,其中慢病毒载体基因组衍生自HIV-1。

[0428] 25.上述实施方案任一个的方法,其中慢病毒载体基因组具有灭活的3'长末端重复序列(LTR)或自灭活3'长末端重复序列(LTR)。

[0429] 26.实施方案25的方法,其中慢病毒载体基因组包含不含增强子序列、TATA盒、Sp1位点、NK- κ B位点或聚嘌呤区(PPT)中的至少一个的U3元件。

[0430] 27.上述实施方案任一个的方法,其中慢病毒载体基因组包含SEQ ID NO:21、22或23任一者的核苷酸序列。

[0431] 28.上述实施方案任一个的方法,其中慢病毒载体基因组还包含编码树突细胞成熟/刺激因子的核苷酸序列。

[0432] 29.实施方案28的方法,其中树突细胞成熟/刺激因子选自GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-15、IL-21、IL-23、TNF α 、B7.1、B7.2、4-1BB、CD40配体和药物诱导型CD40。

[0433] 30.上述实施方案任一个的方法,其中编码抗原的核苷酸序列可操作地连接到选自人泛素-C启动子(UbiC)、巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)、劳氏肉瘤病毒启动子(RSV)和四环素反应性启动子的启动子。

[0434] 31.实施方案30的方法,其中启动子为内含子缺陷型启动子。

[0435] 32.实施方案31的方法,其中内含子缺陷型启动子为UbiC启动子。

[0436] 33.通过权利要求1的实施方案产生的慢病毒载体粒子。

[0437] 34.通过权利要求18的实施方案产生的慢病毒载体粒子。

[0438] 35.一种生成假型化慢病毒载体粒子的方法,该方法包括:

[0439] (a) 在包含kifunensine的培养基中培养病毒包装细胞,该病毒包装细胞包含:

[0440] (1) 含有编码MAGE-A3和NY-ESO-1的多核苷酸的慢病毒载体基因组,其中将编码自裂解TA2肽的多核苷酸设置在编码MAGE-A3与NY-ESO-1的多核苷酸之间,其中慢病毒基因组

不含聚嘌呤区 (PPT), 并且其中MAGE-A3和NY-ESO-1的表达受不含内含子的UbiC启动子控制,

[0441] (2) 编码优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的辛德毕斯E2糖蛋白的多核苷酸,

[0442] (3) 包含人类密码子优化的gag和pol基因的多核苷酸, 其中多核苷酸不含功能性rev应答元件 (RRE) 并且其中pol基因编码无活性整合酶,

[0443] (4) 编码保持SAMHD1抑制活性的Vpx蛋白或Vpr蛋白的多核苷酸, 以及

[0444] (b) 分离优先地结合表达DC-SIGN的树突细胞的假型化慢病毒载体粒子。

[0445] 36. 一种包含假型化慢病毒载体粒子的组合物, 该假型化慢病毒载体粒子包含 (a) 保持SAMHD1抑制活性的Vpx蛋白或Vpr蛋白, (b) 编码抗原的外源性多核苷酸, 以及 (c) 优先地结合表达DC-SIGN的细胞的多种包膜糖蛋白, 其中所述组合物与在不存在甘露糖苷酶抑制剂的情况下制备的相同假型化慢病毒载体粒子的对照组合物相比更加高度甘露糖化。

[0446] 37. 实施方案36的组合物, 其中包膜糖蛋白为甲病毒糖蛋白。

[0447] 38. 实施方案37的组合物, 其中包膜糖蛋白为辛德毕斯糖蛋白。

[0448] 39. 实施方案36至38任一个的组合物, 其中高度甘露糖化的特征在于比在不存在甘露糖苷酶抑制剂的情况下制备的对照组合物对EndoH更敏感。

[0449] 40. 实施方案36至38任一个的组合物, 其中EndoH敏感性通过在EndoH处理后由十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 评估包膜糖蛋白的分子量而确定。

[0450] 41. 实施方案36至38任一个的组合物, 其中在用EndoH处理后包膜糖蛋白的分子量迁移了 (a) 未用内切糖苷酶处理的包膜糖蛋白与 (b) 用N-糖酰胺酶F处理的包膜糖蛋白之间的距离的约45%或更多。

[0451] 42. 实施方案41的组合物, 其中在用EndoH处理后包膜糖蛋白的分子量迁移了 (a) 未用内切糖苷酶处理的包膜糖蛋白与 (b) 用N-糖酰胺酶F处理的包膜糖蛋白之间的距离的约70%或更多。

[0452] 43. 实施方案41的组合物, 其中在用EndoH处理后包膜糖蛋白的分子量迁移了 (a) 未用内切糖苷酶处理的包膜糖蛋白与 (b) 用N-糖酰胺酶F处理的包膜糖蛋白之间的距离的约90%或更多。

[0453] 44. 实施方案36至43任一个的组合物, 其中组合物中包膜糖蛋白的至少30%与在不存在甘露糖苷酶抑制剂的情况下制备的假型化慢病毒载体粒子的对照组合物中具有相同氨基酸序列的对照糖蛋白相比具有增加量的EndoH敏感性聚糖。

[0454] 45. 实施方案36至44任一个的组合物, 其中包膜糖蛋白的大部分为高度甘露糖化的。

[0455] 46. 实施方案36至45任一个的组合物, 其中假型化慢病毒载体粒子为整合缺陷型的。

[0456] 47. 实施方案36至46任一个的组合物, 其中组合物包含辛德毕斯E2糖蛋白。

[0457] 48. 实施方案47的组合物, 其中E2糖蛋白与SEQ ID NO:30[SIN-Var1]具有90%同一性。

[0458] 49. 实施方案47或48的组合物, 其中 (i) E2糖蛋白的残基160不存在或为非谷氨酸的氨基酸, (ii) E2糖蛋白变体的残基70、76或159中的一个或多个为非碱性残基, 并且 (iii) E2糖蛋白变体不是与辛德毕斯病毒E3糖蛋白的融合蛋白的一部分。

[0459] 50. 实施方案49的组合物,其中E2糖蛋白为SEQ ID NO:30[SIN-Var1]。

[0460] 51. 实施方案36至50任一个的组合物,其中Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx[SEQ ID NO:44]具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0461] 52. 实施方案36至50任一个的组合物,其中Vpx蛋白包含与SIVmac Vpx(SEQ ID NO:44)、SIVsm Vpx(SEQ ID NO:45)、SIVrcm Vpx(SEQ ID NO:46)或HIV-2Vpx(SEQ ID NO:47)具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0462] 53. 实施方案36至49任一个的组合物,其中Vpx蛋白包含与SIVdeb Vpr(SEQ ID NO:48)或SIVmus Vpr(SEQ ID NO:49)具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0463] 54. 实施方案36至53任一个的组合物,其中抗原为肿瘤特异性抗原或病毒特异性抗原。

[0464] 55. 实施方案54的组合物,其中肿瘤特异性抗原选自NY-ESO-1、MAGE、MART-1/黑色素-A、BAGE、RAGE、gp100、gp75、mda-7、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白、肾细胞癌抗原、5T4、SM22- α 、碳酸酐酶I、碳酸酐酶IX(也称为G250)、HIF-1 α 、HIF-2 α 、VEGF、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺酸性磷酸盐、前列腺六跨膜表皮抗原(STEAP)、NKX3.1、端粒酶、存活素、间皮素、突变ras、bcr/abl重排、Her2/neu、突变p53、野生型p53、细胞色素P4501B1、N-乙酰氨基葡萄糖转移酶-V、人乳头瘤病毒蛋白E6、人乳头瘤病毒蛋白E7、癌胚抗原和甲胎蛋白。

[0465] 56. 实施方案54的组合物,其中病毒特异性抗原为HIV抗原、SIV抗原、腺病毒抗原、肠病毒抗原、冠状病毒抗原、杯状病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、埃博拉病毒抗原、黄病毒抗原、肝炎病毒抗原、疱疹病毒抗原、感染性腹膜炎病毒抗原、流感病毒抗原、白血病毒抗原、马尔堡病毒抗原、正粘病毒抗原、乳头状瘤病毒抗原、副流感病毒抗原、副粘病毒抗原、细小病毒抗原、痘病毒抗原、微小核糖核酸病毒抗原、脊髓灰质炎病毒抗原、痘病毒抗原、狂犬病毒抗原、呼肠孤病毒抗原、逆转录病毒抗原或轮状病毒抗原。

[0466] 57. 实施方案36至56任一个的组合物,其中慢病毒载体基因组还包含编码第二抗原的核苷酸序列。

[0467] 58. 实施方案57的组合物,其中第一和第二抗原作为在这两种抗原之间包含自裂解A2肽的融合蛋白而表达。

[0468] 59. 实施方案58的组合物,其中自裂解A2肽包含SEQ ID NO:56或SEQ ID NO:57的氨基酸序列。

[0469] 60. 实施方案57至59任一个的组合物,其中第一抗原为NY-ESO-1并且第二抗原为MAGE-A3。

[0470] 61. 实施方案57的组合物,其中第一和第二抗原由双向启动子表达。

[0471] 实施例

[0472] 提供以下实施例以进行举例说明,而无意限制本公开的范围。

[0473] 实施例1

[0474] 在存在kifunensine的情况下产生的用辛德毕斯病毒糖蛋白假型化的慢病毒载体粒子有效地感染表达DC-SIGN的细胞

[0475] 以下实验的目标是尝试产生并表征用高度甘露糖化的包膜糖蛋白假型化的慢病毒载体。为此,本发明人出人意料地发现,kifunensine在产生能够使用明显更低的浓度有

效感染表达DC-SIGN的细胞(例如,树突细胞)的假型化慢病毒载体方面远比其他甘露糖苷酶I抑制剂(包括DMNJ)有效。

[0476] 使用聚乙烯亚胺(PEI)将293T细胞用四种单独的质粒转染,这些质粒分别编码慢病毒基因组、Gag/Pol、Rev和包膜。转染后五小时,移除混合培养基(mix+media)。将培养基与指定量的甘露糖苷酶抑制剂(即DMNJ、kifunensine和苦马豆素)一起加回容器。48小时后,收集上清液(包含载体),并用0.45 μ m过滤器过滤。然后将稳定表达人DC-SIGN受体的HT1080细胞用指定体积的载体转导。将亲本HT1080细胞(不含DC-SIGN)用作对照,并不通过任何所述载体转导。转导后48小时,分析细胞的GFP表达(gfp%)。结果在图1A(表达DC-SIGN的HT1080)和1B(亲本HT1080)中示出。

[0477] 用辛德毕斯病毒糖蛋白假型化的并在存在低浓度kifunensine(1 μ g/ml)的情况下产生的慢病毒载体粒子出人意料地比在存在更高浓度的DMNJ(400 μ g/ml)或苦马豆素(10 μ g/ml)的情况下产生的那些病毒粒子明显更好地转染表达DC-SIGN的细胞。因此,在存在甘露糖苷酶I抑制剂kifunensine的情况下用辛德毕斯病毒糖蛋白假型化而产生的慢病毒载体粒子与在存在其他甘露糖苷酶I抑制剂的情况下产生的粒子相比导致了明显增强的对表达DC-SIGN的细胞的感染。

[0478] 实施例2

[0479] 需要较低量的kifunensine即可生成高效感染表达DC-SIGN的细胞的假型化慢病毒载体粒子

[0480] 本实验的目标是确定最有效产生能够感染表达DC-SIGN的细胞的假型化慢病毒载体粒子的kifunensine的浓度。

[0481] 使用PEI将293T细胞用实施例1所述的质粒转染。转染后五小时,移除混合培养基。将培养基与指定量的Kifunensine(μ g/ml)或与400 μ g/ml的DMNJ一起加回容器。48小时后,收集上清液(包含慢病毒载体粒子),并用0.45 μ m过滤器过滤。然后将稳定表达人DC-SIGN受体的HT1080细胞用指定体积的含载体的上清液转导。将未用载体转导的亲本HT1080细胞用作对照。转导后48小时,分析细胞的gfp表达(gfp+%)。结果在图2A(表达DC-SIGN的HT1080细胞)和2B(亲本HT1080细胞)中示出。

[0482] 在存在0.125 μ g/ml kifunensine的情况下产生的粒子与在存在400 μ g/ml DMNJ的情况下产生的粒子在感染表达DC-SIGN的细胞的能力方面相匹配(图2A)。在所有浓度超过0.125 μ g/ml的kifunensine存在下产生的粒子均远比在存在400 μ g/ml DMNJ的情况下产生的粒子更有效地感染表达DC-SIGN的细胞。kifunensine的滴定揭露了用辛德毕斯病毒糖蛋白假型化的慢病毒载体粒子感染表达DC-SIGN的细胞的能力在存在0.25 μ g/ml的情况下所产生的粒子中达到峰值。

[0483] 实施例3

[0484] 本实验的目标是表征在存在DMNJ或kifunensine的情况下产生的假型化慢病毒粒子的糖基化模式。

[0485] 在存在1 μ g/ml kifunensine、DMNJ或不存在甘露糖苷酶I抑制剂的情况下,根据实施例1制备了用辛德毕斯病毒糖蛋白假型化的慢病毒载体粒子。将粒子与PNGaseF或EndoH孵育1小时。PNGaseF是将裂解所有N连接糖基化而不论糖基化模式的通用内切糖苷酶(参见图3A)。EndoH是将只裂解高甘露糖N连接糖基化的特化内切糖苷酶(参见图3A)。当病毒粒子

在存在甘露糖苷酶I抑制剂的情况下产生时,预计病毒包膜将具有Man₉含量较高且易受EndoH的裂解影响的糖蛋白。使用凝胶迁移测定法通过在SDS-PAGE凝胶上运行并用抗辛德毕斯病毒包膜的抗体进行免疫印迹检测而对样品进行分析。结果在图3B中示出。

[0486] 在存在或不存在kifunensine或DMNJ的情况下并结合PNGaseF或Endo处理而产生的病毒的病毒包膜(SIN-Var1)的运动度指示Var1的糖基化程度。对照病毒(泳道1)被糖基化(随后在凝胶上的运动较慢),并且该糖基化可通PNGaseF完全移除(如在泳道2中所见的更快运动性所证实)。由于PNGaseF裂解任何N连接糖基化的能力所预期的是,在存在DMNJ或Kifunensine的情况下产生的病毒对PNGaseF处理敏感(泳道5和8)。然而,只有在存在甘露糖苷酶I抑制剂(Var1+DMNJ或+kifunensine)的情况下产生的病毒对EndoH处理(泳道6和9)敏感,而对照病毒(Var1)仅对EndoH部分敏感。该部分敏感性可能源于在产生过程中通常不暴露于甘露糖苷酶I并且不会有助于结合到树突细胞的E2-Var1中的位点。这些结果表明:甘露糖苷酶I抑制剂kifunensine在产生具有高甘露糖糖蛋白的病毒粒子中的效率可在EndoH处理后使用凝胶迁移测定法并将其效率与在存在DMNJ的情况下产生的粒子进行比较而测定。

[0487] 实施例4

[0488] 包膜糖蛋白中的甘露糖含量与用于制备病毒粒子的培养基中的kifunensine浓度相关

[0489] 本实验的目标是表征在存在不同浓度的kifunensine的情况下产生的假型化慢病毒粒子的糖基化模式。

[0490] 用不同浓度的kifunensine或400μg/ml的DMNJ根据实施例1制备了用辛德毕斯病毒糖蛋白假型化的慢病毒载体粒子。将粒子与EndoH孵育1小时。然后使用凝胶迁移测定法并用抗辛德毕斯病毒包膜的抗体进行免疫印迹检测而分析样品。平行地,将稳定表达类DC-SIGN受体的HT1080细胞用指定体积的在存在或不存在kifunensine或DMNJ情况下制得的假型化慢病毒载体粒子转导。转导后48小时,分析细胞的GFP表达(作为GFP阳性细胞的百分比在y轴上示出)以绘制成曲线。结果在图4中示出。

[0491] 甘露糖含量与HT1080DC-SIGN细胞的转导程度相关,如通过在用EndoH处理过的样品在凝胶上的迁移度(图4A)以及百分比GFP转导曲线(图4B)所指示。即,逐渐增加用于制备病毒粒子的培养基中的kifunensine浓度产生了更高甘露糖含量的包膜糖蛋白,如通过EndoH处理下更大的迁移以及在表达DC-SIGN的HT1080细胞中更高的GFP表达(即,感染)所证实。这些结果表明,kifunensine直接影响甘露糖在病毒包膜上的含量,并且这与转导表达人DC-SIGN受体的HT1080细胞的能力直接相关。

[0492] 实施例5

[0493] 确认假型化慢病毒载体粒子中的Vpx表达

[0494] 本实验的目标是确定SIVmac Vpx是否能在假型化慢病毒载体粒子中表达并被检测出。

[0495] 将具有N端HA标签的SIVmac Vpx克隆进通过CMV启动子驱动的哺乳动物表达载体(称为pENV-SIVmacVpx的构建体)。为了确认表达了Vpx蛋白,将293T细胞用该构建体转染,并在转染后24小时进行裂解。通过使用抗HA抗体进行免疫印迹检测而分析裂解物(图5A)。为了确认Vpx被包装到了慢病毒粒子中,使用转染进293T包装细胞的四种质粒制备慢病毒。

这四种质粒编码慢病毒基因组、Gag/Po1 (能够整合[Int+])或整合缺陷[Int-])、Rev和包膜。将Vpx的第五种质粒包括在内或不包括第五种质粒。在转染后两天收集病毒,并使用离心进行浓缩。以每孔100ng将p24上样到凝胶上以用抗HA抗体进行免疫印迹检测(图5B)。作为上样对照,使用了抗p24抗体。

[0496] 在用编码Vpx基因的质粒转染的293T细胞中,有效表达了Vpx蛋白(图5A)。相似地,Vpx被包装到了能够整合(Int+)和整合缺陷(Int-)的慢病毒粒子中(图5B)。

[0497] 实施例6

[0498] Vpx是VSV-G假型化整合缺陷型慢病毒载体粒子有效转导人树突细胞所必需的

[0499] 本实验的目标是确定Vpx是否是VSV-G假型化整合缺陷型慢病毒载体粒子高效感染树突细胞所必需的。

[0500] 富集了人外周血单核细胞(PBMC)中的CD14+单核细胞,然后使用GMCSF和IL-4富集了树突细胞。将这些PBMC源人树突细胞用渐增量的含有或不含Vpx的VSV-G假型化整合缺陷型慢病毒载体粒子(0.2ng、2ng、20ng或200ng p24)构建体转导。感染后五天,通过对CD11c阳性细胞分类并评估GFP阳性细胞的百分比(x轴)(而y轴上为DC-SIGN)测定了转导事件。将AZT(逆转录酶抑制剂)用在最高剂量的慢病毒载体粒子(200ng)上。

[0501] 结果在图6中示出。Vpx是整合缺陷型VSV-G-假型化慢病毒粒子转导源自PBMC的人树突细胞所必需的。有效的转导取决于逆转录,原因是其受AZT抑制。

[0502] 实施例7

[0503] Vpx改善VSV-G假型化的能够整合的慢病毒载体粒子对人树突细胞的转导

[0504] 本实验的目标是确定Vpx是否是VSV-G假型化的能够整合的慢病毒载体粒子高效感染树突细胞所必需的。

[0505] 富集了人PBMC中的CD14+单核细胞,然后使用GMCSF和IL-4富集了树突细胞。将这些PBMC源人树突细胞用渐增量的含有或不含Vpx的VSV-G假型化的能够整合的慢病毒载体粒子(0.2ng、2ng或20ng p24)构建体转导。感染后五天,通过对CD11c阳性细胞分类并评估GFP阳性细胞的百分比(x轴)(而y轴上为CD11c)测定了转导事件。将奈伟拉平(Nev,逆转录酶抑制剂)用在最高剂量的慢病毒载体粒子(20ng)上。

[0506] 结果在图7中示出。Vpx增强了能够整合的慢病毒载体粒子转导源自PBMC的人树突细胞的能力。该改善的转导取决于逆转录,原因是其受奈伟拉平抑制。

[0507] 实施例8

[0508] Vpx和高度甘露糖化的包膜糖蛋白是用辛德毕斯病毒包膜糖蛋白假型化的慢病毒载体粒子有效转导人树突细胞所必需的

[0509] 本实验的目标是测试包含Vpx蛋白并在存在kifunensine的情况下产生的辛德毕斯病毒E2糖蛋白假型化慢病毒载体粒子高效感染树突细胞的能力。

[0510] 富集了人PBMC中的CD14+单核细胞,然后使用GMCSF和IL-4富集了树突细胞。将这些PBMC源人树突细胞用不同量的含有或不含Vpx的或在存在或不存在甘露糖苷酶I抑制剂kifunensine的情况下产生的SINvar1假型化整合缺陷型慢病毒载体粒子(0.2ng、2ng或20ng p24)转导。感染后五天,通过对CD11c阳性细胞分类并评估GFP阳性细胞的百分比(x轴)(而y轴上为DC-SIGN或CD11c)测定了转导事件。将奈伟拉平(Nev,逆转录酶抑制剂)用在最高剂量的慢病毒载体粒子(20ng)上。

[0511] 如图8所示,出人意料的是,Vpx以及在存在kifunensine的情况下产生病毒粒子均是使用辛德毕斯病毒糖蛋白假型化的慢病毒有效转导人树突细胞所必需的。因此,这些结果表明,包含高度甘露糖化的糖蛋白(在存在kifunensine的情况下形成粒子的结果)和Vpx的组合的粒子协同作用而有效感染并表达慢病毒基因组编码的蛋白质。即,如果Vpx或高度甘露糖化的糖蛋白之一从辛德毕斯包膜糖蛋白假型化的整合缺损型慢病毒粒子中缺失,则不能有效转导树突细胞。

[0512] 实施例9

[0513] 对慢病毒载体粒子包膜的甘露糖化进行定量

[0514] 在不进行处理(图9A,泳道1-3)、用400 μ g/ml DMNJ(图9A,泳道4-6)或1 μ g/ml kifunensine(图9A,泳道7-9)处理的情况下,根据实施例1制备了用辛德毕斯病毒糖蛋白假型化的慢病毒载体粒子。粒子不进行处理(泳道1、4、7),与EndoH孵育1小时(泳道2、5、8)或与PNGaseF孵育1小时(泳道3、6、9)。然后使用凝胶迁移测定法并用抗辛德毕斯病毒包膜抗体进行免疫印迹检测而分析样品。

[0515] 使用得自Biorad的Quantity One软件进行了凝胶迁移数据的分析。简而言之,使用“Lane”(泳道)功能,穿过图9A所示的9条泳道的每一条画垂线。这指定程序将分析的区域。接下来,使用“Band attribute”(条带属性)功能,测定了各条带的峰强度。这些值还在图9A中示出。这通过之前所指出的“泳道”为我们提供了凝胶上各条带的强度峰值。

[0516] 接下来,通过各条带的强度模式及其在泳道上的位置绘制曲线。结果在图9B(无甘露糖苷酶处理)、图9C(DMNJ处理)和图9D(kifunensine处理)中示出。

[0517] 各曲线示出了无酶消化的、用Endo H或PNGaseF消化的每种包膜类型,如图所示。Y轴是条带的强度,而X轴是条带沿着所述泳道的位置(即,“比移”(rf)值;rf值是条带与凝胶顶部的距离除以泳道的总长度)。

[0518] 为了对迁移进行定量,将未用消化酶切割的条带的峰强度(即,完全糖基化)与用PNGaseF酶切割的条带(即,移除了所有糖基化位点)进行比较。因此,等于未用任何酶消化的条带的峰强度将为0%迁移,并且等于用PNGaseF进行了消化的条带的峰强度将被视为100%迁移。不添加kifunensine时(泳道2),EndoH凝胶迁移为PNGaseF迁移的36%。明显的是,用EndoH消化(即,高甘露糖特异性消化)的经kifunensine处理的样品迁移了PNGaseF迁移距离的90%。因此,病毒载体包膜上几乎所有的糖基化位点在用1 μ g/ml的kifunensine处理后均为高度甘露糖状态。

[0519] 所有的定量分析均在表1中示出。

[0520] 表1

[0521]

包膜	消化酶	强度峰值	光谱强度值	迁移%
var1	无	0.387	0	0
var1	cndoH	0.5	0.113	36.10224
var1	N-糖酰胺酶F	0.7	0.313	100
var1+DMNJ	无	0.338		
var1+DMNJ	endoH	.412, .6, .712		
var1+DMNJ	N-糖酰胺酶F	0.65		
var1+kif	无	0.425	0	0

var1+kif	endoH	0.663	0.238	90.4943
var1+kif	N-糖酰胺酶F	0.688	0.263	100

[0522] 光谱强度值是强度峰值减去未用酶消化的包膜的强度峰值。这样做是为了将从0%迁移到100%迁移的光谱中的值归一化,如上文所阐释。迁移%是光谱强度值除以PNGaseF处理样品的光谱强度值再乘以100。这将产生一个百分比,它对用EndoH切割的条带相对于未用酶处理或用PNGaseF处理的条带的迁移进行定量。将用DMNJ处理的包膜排除在该分析之外,因为它们为异源性N连接糖基化模式。

[0523] 实施例10

[0524] 具有整合缺陷型设计的元件的病毒载体

[0525] 对于需要直接施用病毒载体但不需要载体所递送的基因持续表达的临床应用,诸如对于疫苗和抗原针对免疫疗法,整合缺陷型慢病毒载体代表了能够完全整合的慢病毒载体的适当且可行的替代方案以递送其基因有效载荷。单独地或与其对病毒载体整合率的影响组合测试了gag/pol基因中的D64V整合酶突变和载体基因组中的cPPT缺失。

[0526] 材料和方法

[0527] 通过Alu-PCR对整合进行定量。

[0528] 将以5E5个细胞/孔接种在6孔板中的293T huDC-SIGN细胞用每个孔2E9个载体基因组一式三份地进行转导。转导后48小时,收获细胞,并使用DNeasy试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)提取基因组DNA。使用基于Alu-LTR的巢式PCR测定法对基因组DNA进行分析,该PCR只扩增已整合到宿主基因组DNA中的前病毒序列。对之前Brussel等人,Methods Mol. Biol. 304, 139 (2005)所公布的方法进行了以下修改。在25μl的最终反应体积中,将Platinum Taq (Life Technologies, Grand Island, NY)用于第一轮扩增。第一轮PCR循环条件如下:95℃下2分钟的变性步骤,然后为20个扩增循环(95℃30秒,55℃30秒,72℃90秒)。在25μl的最终反应体积中,使用EXPRESS qPCR Supermix Universal (Life Technologies)和100nM探针MH60310进行了巢式PCR。巢式PCR方案始于50℃下保持2分钟,然后是95℃下10分钟的变性步骤,再是40个扩增循环(95℃15秒,60℃30秒)。所有扩增反应均使用Bio-Rad CFX(-96或-384型, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)进行。通过参考标准曲线计算了整合的前病毒的拷贝数,整合曲线通过参考293T细胞系的平行巢式Alu-PCR而生成,所述参考293T细胞系含有已知拷贝数的整合前病毒,在5个对数值范围稀释。通过与得自非转导细胞的基因组DNA混合而将标准曲线中的总基因组DNA归一化;各标准和未知样品含有100ng的总基因组DNA。该测定法检出了100ng基因组DNA中的58个前病毒(实验1)或4个前病毒(实验2)。

[0529] 通过新霉素抗性对整合进行定量。

[0530] 通过新霉素抗性集落形成独立地分析了编码GFP-T2A-NeoR抗原的载体的整合率。将HT1080huDC-SIGN细胞在6孔板中用0.5ml序列稀释的载体(通过基因组归一化)转导2小时,之后,将2ml完整培养基加入。转导后24小时,用含有800μg/ml G418 (Life Technologies, Grand Island, NY)的培养基饲养细胞。然后使细胞在G418选择下不传代生长11-13天,之后通过用结晶紫(BD Biosciences, Rockville, MD)染色而观察集落。如下计算总整合事件:(集落数)×(稀释因子)=整合事件。

[0531] 通过GFP表达对整合进行定量。

[0532] 对于编码GFP-T2A-NeoR抗原的载体,通过在大量培养中随时间而变化的GFP表达测定了相对整合率。将HT1080huDC-SIGN细胞在6孔板中用0.5ml中等量的WT/703或D64V/704载体(通过基因组归一化)转导2小时,然后添加2ml完全培养基。将转导的细胞在无药物选择的情况下维持在培养基中最长30天,以定期的间隔传代。在此期间,通过流式细胞术(Guava EasyCyte Plus, Millipore, Billerica, MA)定期分析细胞的GFP表达。

[0533] 结果

[0534] 将293T huDC-SIGN细胞用包装WT(“703”)或cPPT缺失基因组(“704”)的WT或D64V整合酶VSV-G假型化载体转导。转导后48小时,通过巢式Alu-PCR分析,对细胞中整合前病毒的存在进行了分析。如图10A所示,WT/704和D64V/703载体各自具有与WT/703载体相比降低了约2个对数值的整合率。相比之下,D64V/704载体的整合率降低超过了2个对数。这些结果证实了, ID-VP02(具有SIVmac Vpx和高度甘露糖化的包膜糖蛋白并使用包含实施例12中所述的非rev依赖性gag/pol系统的包装细胞所制备的辛德毕斯病毒E2糖蛋白假型化慢病毒载体粒子)基因组具有明显降低的整合潜力,并且D64V和704元件独立地有助于这种表型。

[0535] 为了对巢式Alu-PCR分析进行补充,采用了两种另外的方法以研究病毒载体基因组的整合率。在两种方法中,将HT1080huDC-SIGN细胞用WT/703或编码由自裂解T2A接头隔开的GFP和新霉素抗性(NeoR)的D64V/704载体(GFP-T2A-NeoR)转导。用这些载体任一者的转导均导致了GFP和NeoR表达。通过在G418选择后新霉素抗性集落的长出或通过大量培养中随时间而变化的GFP表达,根据抗原表达测量了整合率。

[0536] 在第一种测量整合率的方法(即,新霉素抗性)中,将HT1080huDC-SIGN细胞用序列稀释的载体转导,并在存在G418选择的情况下不传代生长。将输入载体通过基因组拷贝数归一化。假定表达NeoR并在长期暴露于G418下存活从而形成集落的细胞具有整合的前病毒。对这些集落计数,并计算了总整合事件。使用该实验性方法,D64V/704载体的整合率在两项独立的实验中相对于WT/703的整合率降低了3个对数值(图10B)。

[0537] 在第二种方法(即,GFP表达)中,将转导的细胞在不存在选择的情况下连续传代,并通过流式细胞术在转导后的不同时间进行分析。在转导后第2天,大约40%的用WT/703载体转导的细胞为GFP阳性(图10C)。该细胞群在整个实验过程中保持一致,从而表明GFP表达主要来自整合的前病毒。相比之下,用D64V/704载体转导的GFP阳性细胞的百分比在转导后第6天降低了大约100倍,并在剩余的实验中保持较低,尽管高于模拟物转导的对照。这些结果表明大部分D64V/704转导事件产生了非整合的载体DNA,其在转导后的早期表达了GFP,但在后续细胞分裂过程中丧失。在转导后第9天留下的低百分比的GFP表达性细胞可能代表了产生整合前病毒的少数转导事件。在完成实验时(第30天),据计算,D64V/704载体与WT/703载体相比在其发生整合的能力方面降低了386倍。这些发现与得自巢式Alu-PCR分析的结果相当。

[0538] 合在一起,得自测定整合率的所有三种方法(巢式Alu-PCR、NeoR集落长出和%GFP表达)的结果证实了病毒载体基因组的整合率相对于标准、能够整合的第3代慢病毒载体(WT/703)降低了2至3个对数值。

[0539] 实施例11

[0540] 假型化慢病毒载体粒子特异性转导同源细胞群中的树突细胞

[0541] 在潜在性靶细胞的异质群的背景下评估了树突细胞的病毒载体特异性。将人PBMC

在存在GM-CSF和IL-4的情况下培养三天,以生成包含足量的表达DC-SIGN的单核细胞源DC的原代细胞群。在第三天,将20ng在存在kifunensine的情况下产生的并包含Vpx的编码GFP的假型化慢病毒载体的p24加入培养物中。在将载体引入培养物后三天,分析细胞的GFP表达作为在分析时存在的主要细胞群中的转导的度量:DC (CD11c^{pos}) 6%、B细胞 (CD11c^{neg}, CD19^{pos}) 10%和T细胞 (CD11c^{neg}, CD3ε^{pos}) 80%。如图11所示,CD11c^{hi}, DC-SIGN⁺群内42%的细胞被转导,相比之下,培养物中存在的B和T细胞群均为0.1%。当将逆转录酶抑制剂奈伟拉平(RT抑制剂)包含在培养物中时,在所有细胞群中转导均被完全消除。这些结果证实了,在其中DC占少数的人细胞异质群中,假型化慢病毒载体特异性转导表达DC-SIGN的DC。

[0542] 实施例12

[0543] 非Rev依赖性gag/pol质粒的设计

[0544] 在假型化第三代LV典型的四种质粒系统中,两种质粒在其转录物内含有可能重组的序列。即,转移载体(称为LV基因组)和gag/pol质粒。在LV基因组与gag/pol的转录物之间存在两个序列同源性区域(图12)。第一, LV基因组在psi包装信号之后具有部分gag序列, psi包装信号由354个碱基对(bp)组成,这些碱基对与gag/pol质粒中的gag序列的5'末端相同。由此序列重叠发生的重组事件称为psi-gag重组事件。第二, LV基因组和gag/pol均含有Rev应答元件(RRE),该应答元件由形成二级RNA结构的234bp组成,从而允许含有PRE的转录物以Rev依赖性方式核输出到细胞质中。除了gag与pol之间为pol蛋白产物的翻译所必需的移码区外,这两种同源序列通过使RRE从gag/pol质粒中缺失并通过密码子优化gag/pol开放阅读框(ORF)而移除(图12)。移码区在gag和pol接合处形成二级RNA结构,此在翻译过程中导致对翻译pol基因产物必不可少的核糖体-1进位(register shift)。Watts等人, Nature, 460:711-716 (2009)。对于这些实验,未对gag/pol ORF的碱基对1228与1509之间的282bp区域进行密码子优化。该区域始于野生型HIV-1的pNL4-3序列的bp 1563,所述序列编码Gag蛋白的赖氨酸409并延伸以包含Gag的终止密码子。对其余的区域(gag/pol的bp 1-1228和bp 1510-4307)基于人类密码子表进行了密码子优化。Nakamura等人, Nucleic Acids Res, 28:292 (2000)。在Genscript合成了RI gag/pol的完整ORF,并进行克隆以取代由WT gag/pol和RRE组成的ORF。

[0545] 已知RRE的缺失会消除gag/pol转录物以Rev依赖性方式从核输出,因为gag/pol的RNA二级结构将转录物保持在核中。Banchereau和Steinman, Nature, 392 (6673), 245 (1998)。因此,密码子优化起到消除这些保持性二级结构的作用,还起到使与LV基因组中的部分gag的序列同源性最小化的作用。由于这些改变假设会使gag/pol转录物不再需要Rev这一事实,因此该方案被称为非Rev依赖性gag/pol (RI gag/pol),即使在载体的产生过程中仍然需要Rev。

[0546] 实施例13

[0547] RI gag/pol的核输出不需要Rev

[0548] 为了证实RI gag/pol转录物确实为非Rev依赖性的,将293T细胞用野生型(WT gag/pol)或RI gag/pol质粒在存在或不存在Rev编码质粒的情况下转染。

[0549] 材料和方法

[0550] Gag蛋白的表达。

[0551] 将293T细胞以 1×10^6 个/细胞接种到6孔板中。二十四小时后,使用Lipofectamine

2000 (Invitrogen) 将细胞用 0.5 μ g WT gag/pol 或 RI gag/pol 质粒在存在 0.5 μ g Rev 质粒或 0.5 μ g 空骨架质粒的情况下转染。二十四小时后,将细胞用细胞提取缓冲液 (Invitrogen, 目录号 FNN0011) 裂解,并使用 4-12% NuPAGE Bis-Tris 预制凝胶 (Invitrogen, 目录号 NP0321PK2) 通过 SDS-PAGE 分析然后转移到硝酸纤维素膜上。然后将印迹用抗 p24 抗体 (Abcam, 目录号 ab9071) 或抗肌动蛋白抗体 (Santa Cruz Biotech, 目录号 sc-130656) 探查。

[0552] 结果

[0553] 使用 SDS-PAGE 和采用抗 p24 抗体的 Western 印迹,对细胞裂解物分析了 gag 蛋白产物的表达。无论 Rev 是否存在,RI gag/pol 质粒均能够表达 p24 及其前体,而 WT gag/pol 转录物需要 Rev 才能表达蛋白质 (图 13)。基于 p55:p24 蛋白的比率,p55Gag 蛋白的加工在 RI 与 WT gag/pol 转录物之间似乎不同,从而表明密码子优化对蛋白质表达和/或加工的作用。这些结果表明了转录物可在不存在 Rev 的情况下发生核输出,从而确认了向 RI gag/pol 构建体的设计转变降低了对 Rev 的需要。

[0554] 实施例 14

[0555] RI gag/pol 产生与 WT gag/pol 具有相当的效价的感染性载体

[0556] 之前的研究已经描述了在不存在 Rev 的情况下产生的载体的效价降低。参见 Gasmi 等人, J. Virol. 73:1828-1834 (1999); Lucke 等人, J. Virol. 79:9359-9362 (2005)。对通过“非 rev 依赖性” gag/pol 构建体制备的载体进行了测试,以确定其是否会生成效价与 WT gag/pol 相当的感染性粒子。

[0557] 材料和方法

[0558] 载体制备

[0559] 以大规模 (CF10) 或小规模 (10cm 平皿) 制备了载体。对于大规模制备,将 293T 细胞以 5E8 个细胞/1L 接种在 10 层细胞培养器 (Nunc, 目录号 140400) 中的 DMEM 培养基中,该培养基含有 5% 血清、L-谷氨酰胺和抗生素。三天后,将细胞用 PEI (储液 1mg/mL) 和总质粒 DNA 以 3:1 的比率 (mL PEI:mg DNA) 转染。每个 10 层细胞培养器,使用了 1mg 载体基因组质粒和 0.5mg 其余的质粒 (gag/pol、Rev 和 VSV-G)。五小时后,将培养基替换为 1L 无血清培养基 (Transfx-293 培养基, Hyclone 目录号 SH30860.LS)。转染后 2 和 3 天收获载体。使用前置过滤器和 0.45 μ m stericup 过滤器 (Millipore) 使收获物澄清。将载体通过在 1L 离心瓶中以 16,000g 旋转而离心 5 小时。将得自每升收获物的沉淀重悬在 1mL HBSS 中并等分以在 -80 $^{\circ}$ C 下储存,或重悬在 1mL 缓冲液中以进行 benzonase 处理 (50mM Tris-HCL (pH7.5)), 1mM MgCl₂, 5% v/v 蔗糖)。将 Benzonase 核酸酶以 250U/mL 的终浓度加入,并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜以便降解来自转染的任何留下的质粒。将 Benzonase 处理后的载体制备物使用蔗糖垫层 (顶部 30% 的蔗糖,底部 5% 的蔗糖) 重新浓缩,并以 116,000g 在超速离心机中在 4 $^{\circ}$ C 下离心 1.5 小时。将载体沉淀重悬在 1mL HBSS 中、等分并储存在 -80 $^{\circ}$ C 下。对于小规模载体制备,将 293T 细胞以 2.5E5 个细胞/板接种在 10cm 板中,并第二天用 PEI 与上文所述类似但使用 6 μ g 载体基因组质粒和 3 μ g 其余的质粒进行转染,不同之处在于在对载体制备进行比较时 gag/pol 质粒的量不同。为了准确,小规模转染一式三份地进行。五小时后,将培养基替换为 4mL 含有 5% 血清、L-谷氨酰胺和抗生素的 DMEM 培养基。在转染后 2 和 3 天收获载体,并用 0.45 μ m 过滤器澄清。将载体储存在 -80 $^{\circ}$ C 下。

[0560] 载体定量-p24 测定

[0561] 使用Advanced Bioscience Laboratories (Rockville, MD) 的HIV-1p24ELISA试剂盒根据制造商说明进行了p24的定量。

[0562] 载体定量-GFU测定

[0563] 将293T细胞以2E5个细胞/孔接种在12孔板的1mL DMEM培养基中,该培养基含有5%血清、L-谷氨酰胺和抗生素。二十四小时后,将各孔中的细胞用2倍稀释的编码GFP的载体转导。在DMEM完全培养基中以1mL最终体积制备了各种量的载体。以每个孔200μL载体开始制备了含有载体的五个2倍系列稀释的上清液。作为排除假转导的对照,在平行孔中将10 μM逆转录酶抑制剂奈伟拉平与最高体积的载体一起使用。转导后四十八小时,在Guava机(Guava technologies,现为Millipore)上分析了细胞的GFP表达。基于载体的体积和所得的百分比GFP值通过使用最佳拟合(最小二乘)线性回归模型计算了每mL的绿色荧光单位(GFU),以便使用EXCEL中的FORECAST函数预测每mL载体的GFP阳性细胞数。将导致低于1%的GFP阳性细胞的事件设为定量限(LOQ)。

[0564] 结果

[0565] 使用编码作为标记的绿色荧光蛋白(GFP)的载体基因组以及通过两种输入DNA量的WT gag/pol或RI gag/pol构建体生成了两个平行的用VSV-G假型化的载体制备物。测定了两个载体制备物的p24,并且它们显示出的物理粒子效价相当,而不论用于制备它们的gag/pol质粒如何(图14A)。然后测定了这些制备物转导靶细胞的能力。当通过体积归一化时,对于在载体产生过程中所用的两种量的输入gag/pol质粒(3μg或6μg),RI gag/pol载体均导致了与WT gag/pol相当的转导事件(图14B)。这些结果表明,为生成非rev依赖性gag/pol构建体而引入的设计元件未降低慢病毒载体的物理粒子产量或感染性。

[0566] 实施例15

[0567] RI和WT gag/pol载体产生等同的免疫反应

[0568] LV通常用于将编码蛋白的核酸在体外递送到各种类型的细胞以用于研究性应用和临床环境。然而,还开发了可直接注射的LV以用于基因疗法和抗原针对免疫疗法。为了测试RI gag/pol载体能否用作免疫疗法应用的适当LV,评价了针对由RI gag/pol载体编码的抗原转基因所生成的免疫反应。

[0569] 材料和方法

[0570] 载体定量-TU测定

[0571] 使用以下测定法测定了转导单位(TU),其中使用扩增逆转录的载体RNA序列的定量PCR测定法测量靶细胞系中的转导事件。将系列稀释的试样和参考材料一式二份在96孔组织培养板中在存在靶293T细胞的情况下孵育。在存在和不存在逆转录酶抑制剂奈伟拉平的情况下执行了转导步骤,作为评估可由残余质粒DNA贡献的背景信号的手段。在转导后一天,将模拟物或载体转导的细胞通过添加含有脱氧胆酸钠、吐温-20、十二烷基硫酸钠(SDS)和蛋白酶K的缓冲液裂解。然后将细胞裂解物依次在37℃、55℃和95℃孵育以确保蛋白水解和DNA变性。然后将变性的细胞裂解物使用引物/探针组通过qPCR进行分析,所述引物/探针组被设计为扩增位于抗原启动子(EXPRESS qPCR Supermix Universal, Life technologies)上游大约400-bp的载体基因组序列。参考标准曲线计算了感染性效价,标准曲线由在7个对数值范围(5.3个拷贝- 5.3×10^6 个拷贝)内稀释的含有靶序列的线性化质粒DNA构成。

[0572] 免疫

[0573] 在第0天对C57BL/6小鼠在尾巴根部经皮下用 2×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 TU的编码LV1b的LV、含有OVA257 (SIINFEKL) (SEQ ID NO:24) H-2Kb限制性表位的多肽构建体或HBSS媒介物免疫。将储存在 -80°C 下的LV的等分试样在室温下解冻,然后保持在冰上。将载体在冷的无菌HBSS中系列稀释,然后运输到动物房进行注射。将小鼠置于常规带狭缝的限位器中,其中可以触及尾巴根部。使用经皮下插在尾巴根部右侧上尾到肛门约1cm的位置的29号0.3mL胰岛素注射器(Becton Dickinson[BD]),将载体通过50 μL 注射而施用,导致尾巴根部周围的皮肤轻微但可见的膨胀。

[0574] 细胞内细胞因子染色(ICS)

[0575] 将脾脏通过经70 μm 尼龙过滤器压滤而匀化。将红血细胞通过短暂暴露于冰冷的超滤水然后立即用10x PBS恢复等渗性而以低渗休克方式裂解。对于细胞因子的分析,在 37°C 、5% CO_2 下,将细胞在96孔板中的完全RPMI (10%FCS、10mM HEPES、2mM β -巯基乙醇和L-谷氨酰胺) 中用肽刺激5小时,肽的浓度为每种肽1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。OVA257 (SIINFEKL) 肽由AnaSpec (Fremont, CA) 以95%的纯度制造。刺激后,在存在FcR封闭性抗体2.4G2和LIVE/DEAD® Fixable Near-IR (L/D NIR, Invitrogen) 的情况下在FACS缓冲液(PBS、1%FCS、2mM EDTA、0.01%叠氮化钠) 中进行了表面染色。用于表面染色体内实验的抗体包括抗小鼠CD4-PerCP-Cy5.5 (eBioscience) 或CD4-Alexa Fluor 700 (eBioscience)、CD8-Pacific Blue (eBioscience) 和B220-V500 (BD)。在表面染色后,将细胞用Cytotfix® (BD) 固定,并在 4°C 下储存在FACS缓冲液中过夜。然后将细胞用含有5%兔血清(Sigma Aldrich) 的Perm/Wash™缓冲液(BD) 透化。将用于细胞内染色的抗体用含有5%兔血清的Perm/Wash™缓冲液稀释,并加到透化的细胞中。抗体包括抗小鼠TNF- α -FITC (eBioscience)、IFN- γ -PE (eBioscience) 和IL-2-APC (eBioscience)。将细胞用Perm/Wash™缓冲液洗涤两次,并再重悬在FACS缓冲液中,并通过高通量采样器(High Throughput Sampler, BD) 在3激光LSRFortessa上分析。使用FlowJo软件(TreeStar, Ashland, OR) 分析数据。将活CD8T细胞如下分类:淋巴细胞(FSC^{int} , SSC^{lo})、单细胞($\text{SSC-A} = \text{SSC-H}$)、活(L/D NIR $^{\text{lo}}$)、B220 $^-$ CD4 $^-$ CD8 $^+$ 。细胞因子分类基于第99.9个百分位(在未刺激的细胞中0.1%的阳性事件)。

[0576] 结果

[0577] 将小鼠用一定剂量范围的WT或RI gag/pol载体免疫,所述载体含有野生型(INT(+)) 或D64V突变整合酶(INT(-)),后者编码称为LV1b的多表位构建体,其含有OVA₂₅₇ (SIINFEKL) (SEQ ID NO:24) H-2Kb限制性CD8T细胞表位。在免疫后12天,通过IFN- γ 的ICS测量了脾脏中的OVA₂₅₇特异性CD8T细胞反应(图15)。对于能够整合的和整合缺陷的载体,RI gag/pol和WT gag/pol载体生成的CD8T细胞反应相当,从而确认了gag/pol基因的密码子优化未对作为免疫疗法媒介物的LV功能产生负面影响。

[0578] 实施例16

[0579] RI和WT gag/pol载体均诱导保护性抗病毒免疫

[0580] 虽然据观察原发的LV诱导CD8T细胞反应与RI gag/pol载体等同,但是执行了以下实验以确定由这些载体诱导的功能性免疫是否也相似。为解决这个问题,将重组活疫苗病毒激发用作病毒感染模型。

[0581] 材料和方法

[0582] 牛痘病毒激发

[0583] 在第0天,将C57BL/6小鼠在尾巴根部经皮下用 5×10^8 TU编码LV1b的载体或HBSS媒介物免疫。四周后,将小鼠用 1×10^7 TCID₅₀表达OVA的重组牛痘病毒(rVV-OVA)、1E7TCID₅₀野生型牛痘病毒(VV-WT)或HBSS媒介物经腹膜内激发。激发后五天,收获卵巢以通过TCID₅₀测定法对病毒载量定量。

[0584] 结果

[0585] 将小鼠接种编码具有WT或RI gag/pol的OVA₂₅₇的整合缺陷型(INT(-))LV载体,然后在4周后,用编码OVA的重组牛痘病毒(rVV-OVA)或作为对照的野生型牛痘病毒(VV-WT)激发(图16)。接种了RI gag/pol和WT gag/pol载体的小鼠均表现出在用rVV-OVA挑战后病毒载量的显著降低。确认了保护为抗原特异性的,在VV-WT激发后的病毒载量在媒介物与LV处理组之间相似。这些数据表明RI gag/pol LV可诱导响应于病毒激发并提供功能性免疫的记忆性CD8T细胞。

[0586] 实施例17

[0587] RI gag/pol修饰消除psi-gag重组,但不消除载体基因组与gag/pol转录物之间的其他重组事件

[0588] 对RI gag/pol进行设计以尝试消除psi-gag重组,从而进一步最大程度降低第三代LV的RCL形成的机会。将基于巢式PCR的方法用于筛选用整合载体转导的细胞的基因组DNA以便检测psi-gag重组。

[0589] 方法和材料

[0590] 载体定量-基因组测定

[0591] 使用QIAamp病毒RNA小量提取试剂盒(QIAamp Viral RNA Mini kit)(Qiagen, Valencia, CA)从载体粒子分离了基因组RNA。为了消除污染性DNA,然后将提取的核酸用DNaseI(Invitrogen)根据制造商的说明进行消化。然后使用RNA Ultrasense一步法定量RT-PCR系统(RNA Ultrasense One-Step Quantitative RT-PCR System, Invitrogen)和之前所述的载体特异性引物与探针通过定量RT-PCR分析了各DNaseI处理的RNA样品的两个稀释样。参考标准曲线计算了RNA基因组拷贝数,标准曲线由在7个对数值范围(10个拷贝- 1.0×10^7 个拷贝)内稀释的含有靶序列的线性化质粒DNA构成。这里表示的基因组效价反映了基于基因组计算的物理载体粒子的数量,其中预测每个载体粒子含有基因组RNA的两个单链拷贝。

[0592] Psi-gag重组测定

[0593] 将293T细胞以2E6个细胞接种在10cm板中。第二天,将细胞用1E11个用WT gag/pol或RI gag/pol制备的浓缩VSV-G假型化的载体的基因组转导。这些载体的效价分别为 1.2×10^{13} 个基因组/mL和1.5个基因组/mL。转导后四十八小时,收获细胞,并使用血液和细胞培养DNA试剂盒(Qiagen, 目录号13323)分离基因组DNA。将100ng基因组DNA用作使用高保真platinum taq聚合酶(Invitrogen, 目录号11304-011)和以下循环参数的第一轮PCR的模板:94℃下2分钟1个循环;94℃下30秒、55℃下30秒、68℃下90秒40个循环;68℃下5分钟1个循环。将第一轮PCR的1μl(50μl中的)用作巢式PCR的模板,其中不进行稀释(1:1)或按1:100稀释或按1:1000稀释。巢式PCR循环参数与用于第一轮的参数相同。所有反应均未包括引物

对照。用于PCR的引物为378 (TAAGGCCGAGTCTTATGAGCAGC) (SEQ ID NO:60)、709 (AGGACTCGGCTTGCTGAAG) (SEQ ID NO:61)、710 (AGCCTGTCTCTCAGTACAATC) (SEQ ID NO:62)、835 (TGTCTTATGTCCAGAATGCT) (SEQ ID NO:63)、863 (GCACGGCAAGAGGCGAGG) (SEQ ID NO:64) 和864 (GCCGGATGTCCAGGATGCTG) (SEQ ID NO:65)。将巢式PCR的总共50 μ l中的25 μ l在用1xTAE缓冲液和溴化乙锭制备的1%琼脂糖凝胶上观察。提取条带,并使用凝胶提取试剂盒(Qiagen,目录号28704)纯化DNA,然后克隆进TOP0-TA载体(Invitrogen,目录号K4500-02)并使用M13正向和反向引物进行测序(Davis Sequencing,CA)。

[0594] 结果

[0595] 使用巢式PCR方法,采用结合psi包装信号5'的LV基因组的正向引物(709)以及结合在RI gag/pol和WT gag/pol的移码区内的反向引物(710)执行了第一轮PCR(图12)。然后稀释得自该第一轮的PCR产物,并用作第二轮PCR的模板,第二轮PCR使用结合LV基因组的巢式正向引物(863)以及分别结合到WT gag/pol或RI gag/pol内的gag区的巢式反向引物(835和864)。对这两种反向引物进行设计以结合两种构建体中的相同区域,而唯一的差异是由于密码子优化。当使用引物对863和835或引物对863和864时,得自假想psi-gag重组体的扩增子大小将为937bp。

[0596] 通过RI gag/pol或WT gag/pol质粒生成了编码LV1b多表位的载体制备物,并将它们用于转导293T细胞。转导后四十八小时,收获基因组DNA,并执行了PCR然后在琼脂糖凝胶上分析。首先,使用仅结合在LV基因组内的引物(引物709和378)执行了阳性对照PCR。经预测使用这些引物的预测LV基因组扩增子大小为1697bp。用WT gag/pol或RI gag/pol载体转导的细胞培养物均产生了预期的扩增子大小,从而确认了前病毒的转导和整合对于两种载体而言相当(图17A)。

[0597] 其次,如上所述执行了psi-gag重组的巢式PCR。得自用WT gag/pol载体转导的细胞的基因组DNA产生了具有937bp的预期大小的条带,与psi-gag重组一致(左半,图17B)。相比之下,得自用RI gag/pol转导的细胞的基因组DNA产生了更大的但更弱的1329bp处的条带(右半,图17B)。为了确定PCR条带的性质,提取了来自WT gag/pol的937bp条带以及来自RI gag/pol的1329bp条带,并克隆进TOP0-TA质粒。测序揭露了WT gag/pol条带与psi-gag重组体一致,因为序列的前半部分与载体基因组对齐,并且后半部分与延伸到部分gag序列之外的gag/pol转录物对齐(图17C)。得自RI gag/pol的较弱的1329bp条带编码由以下部分组成的序列:与LV基因组对齐的前1253bp,但最后77bp与RI gag/pol的区域对齐(图17D)。这些结果表明了,在用WT gag/pol载体转导的细胞中但非在用RI gag/pol载体转导的细胞中可以检测到psi-gag重组。此外,这些结果提供证据证明在用RI gag/pol载体转导的细胞中仍可检测到重组,虽然明显不依赖于psi-gag序列。

[0598] 实施例18

[0599] 作为小鼠SINvar1受体的DC-SIGN同源物SIGNR1的鉴定

[0600] 研究了ID-VP02载体粒子以确定它们是否利用内源性小鼠受体以结合和进入。虽然人类编码DC-SIGN和一种横向同源物DC-SIGNR,但小鼠可具有8种DC-SIGN同源物(称为SIGNR1至SIGNR8)。在这些之中,经预测六种为膜结合性的,即SIGNR1、-R3、-R4、-R5、-R7和-R8。基于功能研究,据报道,SIGNR1、SIGNR3和SIGNR5(也称为小鼠DC-SIGN)是人DC-SIGN最接近的功能直系同源物。因此测试了SINvar1经由这些受体介导结合和进入的能力。

[0601] 生成了稳定表达小鼠SIGNR1、SIGNR3或SIGNR5的HT1080细胞。将这些细胞与不同浓度的整合缺陷型GFP编码载体孵育,所述载体用SINvar1、kifunensine修饰的高甘露糖SINvar1或用泛嗜性VSV-G进行了假型化。在实施例8中,据确立,在存在甘露糖苷酶I抑制剂kifunensine的情况下产生的SINvar1包膜是DC-SIGN结合和人DC转导所必需的。因此,在该实验中,将过表达人DC-SIGN的HT1080细胞用作阳性对照。在所测试的三种小鼠DC-SIGN直系同源物中,SINvar1假型化的载体仅转导了表达小鼠SIGNR1的细胞并以kifunensine依赖性方式转导(图18A-D),与人受体所观察到的一样。kifunensine修饰的SINvar1载体对表达人DC-SIGN和小鼠SIGNR1的细胞的转导效率非常相似(图18A、B),从而表明了SIGNR1是小鼠中ID-VP02载体粒子的功能性直系同源受体。

[0602] 实施例19

[0603] SIGNR1在体外在小鼠DC上表达

[0604] 为了进一步研究小鼠模型对反映在人类中的预期作用机理的功能研究的实用性,开展了实验以确定SIGNR1是否在小鼠树突细胞上表达。

[0605] 材料和方法

[0606] SIGNR1和5体内表达

[0607] 将得自单独的脾脏或得自5只小鼠的10个淋巴结混合样的细胞在FACS缓冲液(PBS、1% FCS、2mM EDTA、0.01% 叠氮化钠)中在存在FcR封闭性抗体2.4G2和LIVE/DEAD®Fixable Near-IR (L/D NIR, Invitrogen) 的情况下染色。用于表面染色的抗体包括抗小鼠CD4-PerCP-Cy5.5 (eBioscience) 或CD4-Alexa Fluor 700 (eBioscience)、CD8-Pacific Blue (eBioscience) 和B220-V500 (BD)。在表面染色后,将细胞用Cytotfix® (BD) 固定,然后在LSRFortessa多参数流式细胞仪上分析。将活的、单细胞事件(L/D NIR⁻, SSH=SSA) 再分成B细胞(B220⁺TCRβ⁻)、T细胞(TCRβ⁺, B220⁻) 和DC (B220⁻TCRβ⁻MHC-II⁺CD11c^{hi})。使用不含SIGNR1和SIGNR5特异性抗体的阴性对照株设定这些亚组每一者的SIGNR5和SIGNR1表达的分类,使得阳性事件的频率≤0.00。

[0608] 结果

[0609] 对得自三个单独的脾脏或三个淋巴结混合样的单细胞悬液各自分析在T细胞、B细胞和DC上的SIGNR1和SIGNR5表达。SIGNR5稳态表达相对罕见,仅在较小的B细胞群上检出(图19)。相比之下,虽然SIGNR1表达限于淋巴细胞上,但大约10-12%的MHC-II⁺CD11c^{hi} DC表达了SIGNR1(图19)。由于SIGNR1也是ID-VP02载体粒子的功能受体,因此这些数据让我们评价了ID-VP02载体粒子是否能在体内特异性靶向小鼠DC。

[0610] 实施例20

[0611] ID-VP02载体粒子在体内靶向小鼠引流淋巴结DC

[0612] 为了确定辛德毕斯病毒E2糖蛋白假型化的慢病毒载体粒子编码的转基因的产物能否在直接施用后在DC中检出,将编码GFP或非荧光阴性对照蛋白的粒子注射进受体BALB/c小鼠的右足垫。

[0613] 材料和方法

[0614] ID-VP02-GFP体内转导。

[0615] 对BALB/c小鼠(n=15只/组)在足垫中经皮下注射 3×10^{10} 个编码GFP的ID-VP02载

体粒子、编码NY-ESO-1的对照粒子的基因组,或不作处理。四天后,混合得自5只小鼠的引流淋巴结或非引流颈部淋巴结(每个处理组3个混合样),并分析了活的(L/D)单事件(L/D NIR-, SSH=SSA)中GFP的存在。通过用抗小鼠CD11c-PE-Cy7(eBioscience)、MHC-II-Pacific Blue(eBioscience)、SIGNR5-PE(eBioscience)和SIGNR1-APC(eBioscience)共染色而测定了GFP⁺细胞的表型。

[0616] 结果

[0617] 注射编码GFP的ID-VP02载体粒子后四天,将得自5只小鼠的引流淋巴结或非引流颈部淋巴结混合(每个处理组3个混合样)并分析GFP表达。注射编码GFP但不是非荧光对照蛋白的ID-VP02载体粒子导致了在引流淋巴结中但非远侧淋巴结中检出了GFP⁺细胞(图20A)。在进一步的表面标记分析后,将约90%的转导细胞鉴定为DC,如通过CD11c和MHC-II表达所指示(图20B),并且超过三分之一的这些GFP⁺DC为SIGNR1⁺(图20C),从而支持该受体在小鼠体内DC转导中的可能作用。

[0618] 实施例21

[0619] ID-VP02载体粒子DNA具有有限的生物分布

[0620] 虽然淋巴结细胞的分析与小鼠体内DC的特异性靶向一致,但是执行了生物分布研究以确立转导事件是否能在其他、尤其是非淋巴组织中检出,并表征在阳性组织部位的清除动力学。

[0621] 材料和方法

[0622] 载体生物分布

[0623] C57BL/6小鼠(n=3只/组)在尾巴根部经皮下接受了 3×10^{10} 个编码多表位构建体LV1b的ID-VP02的基因组。在注射后第1、4、8、21或42天通过qPCR分析了以下组织中逆转录的载体DNA的存在:注射部位(尾巴根部)、脾脏、肝脏、心脏、卵巢、脑以及引流(腹股沟)和非引流(颈部)淋巴结。将组织在Fastprep Lysing Matrix D管中用Fastprep-24匀化器(MP Biomedicals, Santa Ana, CA)处理,并使用Qiagen DNeasy血液与组织试剂盒(Qiagen Inc., Valencia, CA)从匀浆中分离了基因组DNA。将洗脱的DNA(每个样品200ng)通过qPCR一式四份地进行分析,其中使用EXPRESS qPCR Supermix Universal(Life Technologies, Carlsbad, CA)和被设计为扩增LV1b盒内的85-bp靶序列的引物/探针组。所有反应均用Bio-Rad CFX384执行,并用Bio-Rad CFX Manager软件(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)分析。参考标准曲线计算了载体DNA拷贝数,标准曲线由在7个对数值范围(10^1 个拷贝- 10^7 个拷贝)内稀释的含有靶序列的质粒DNA构成。

[0624] 结果

[0625] 将编码命名为LV1b的多表位模型抗原构建体的ID-VP02载体粒子用于测定粒子的生物分布。在注射载体后,可使用一组对LV1b盒特异的引物和探针通过qPCR测定逆转录的载体基因组(载体DNA)的存在。在尾巴根部经单次皮下注射向小鼠施用 2.8×10^{10} 个假型化载体粒子-LV1b的基因组。在注射后1天与42天之间的时程中,在注射部位(尾巴根部)、引流(腹股沟)和非引流(颈部)淋巴结、脾脏、心脏、肝脏、脑和卵巢对载体DNA进行定量。在施用后的早期时间点,只在注射部位和引流淋巴结中检出了载体DNA。这些组织中的载体信号随时间而降低,其中在第8天在引流淋巴结中不存在可计量的信号,并且在第42天在注射部位信号仅仅高于定量限(LOQ; 10个拷贝)(图21)。这些结果表明了, ID-VP02载体粒子在注射部

位之外的扩散限于引流淋巴结,在其中将假设其存在生物活性,并且在三周内超过99%的载体DNA被清除。

[0626] 实施例22

[0627] ID-VP02载体粒子诱导多功能原发和继发CD8T细胞反应

[0628] 进行了以下实验以测定辛德毕斯病毒E2糖蛋白假型化慢病毒载体粒子在体内产生抗原特异性免疫反应的能力。

[0629] 材料和方法

[0630] 细胞内细胞因子染色 (ICS)

[0631] 将脾脏通过经70 μ M尼龙过滤器压滤而匀化。将红血细胞通过短暂暴露于冰冷的超滤水然后立即用10x PBS恢复等渗性而以低渗休克方式裂解。对于细胞因子的分析,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下,将细胞在96孔板中的完全RPMI (10%FCS、10mM HEPES、2mM β -巯基乙醇和L-谷氨酰胺) 中用肽刺激5小时,肽的浓度为每种肽1 μ g/mL。包括OVA₂₅₇ (SIINFEKL) (SEQ ID NO: 24)、LCMV GP₃₃ (KAVYNFATM) (SEQ ID NO:66)、AH1 (SPSYVYHQF) (SEQ ID NO:67) 和AH1A5 (SPSYAYHQF) (SEQ ID NO:25) 的肽由AnaSpec (Fremont, CA) 以95%的纯度制造。在一些实验中,如上所示,将抗小鼠CD107a-PerCP-eF710 (eBioscience) 包含在刺激混合物中,以捕获脱颗粒T细胞表面上的易位CD107a。刺激后,在存在FcR封闭性抗体2.4G2和LIVE/DEAD[®] Fixable Near-IR (L/D NIR, Invitrogen) 的情况下在FACS缓冲液 (PBS、1%FCS、2mM EDTA、0.01%叠氮化钠) 中进行了表面染色。在体内实验中用于表面染色的抗体包括抗小鼠CD4-PerCP-Cy5.5 (eBioscience) 或CD4-Alexa Fluor 700 (eBioscience)、CD8-Pacific Blue (eBioscience) 和B220-V500 (BD)。在表面染色后,将细胞用Cytotfix[®] (BD) 固定,并在4 $^{\circ}$ C下储存在FACS缓冲液中过夜。然后将细胞用含有5%兔血清 (Sigma Aldrich) 的Perm/Wash[™]缓冲液 (BD) 透化。将用于细胞内染色的抗体用含有5%兔血清的Perm/Wash[™]缓冲液稀释,再加入到透化的细胞中。抗体包括抗小鼠TNF- α -FITC (eBioscience)、IFN- γ -PE (eBioscience) 和IL-2-APC (eBioscience)。将细胞用Perm/Wash[™]缓冲液洗涤两次,再重悬在FACS缓冲液中,并通过高通量采样器 (High Throughput Sampler, BD) 在3激光LSRFortessa上分析。使用FlowJo软件 (TreeStar, Ashland, OR) 分析数据。将活CD8T细胞如下分类:淋巴细胞 (FSC^{int}, SSC^{lo})、单细胞 (SSC-A=SSC-H)、活 (L/D NIR^{lo})、B220⁻CD4⁻CD8⁺。细胞因子分类基于第99.9个百分位 (在未刺激的细胞中0.1%的阳性事件),而CD107a分类基于第99个百分位。

[0632] 结果

[0633] 为了评估ID-VP02载体粒子的体内免疫活性,将一定剂量范围的编码全长鸡卵清蛋白 (ID-VP02-OVA) 的载体经皮下施用给C57BL/6小鼠,并通过细胞内细胞因子染色 (ICS) 测定脾脏中的OVA₂₅₇特异性CD8T细胞反应 (图22A)。在脾CD8T细胞之中IFN- γ +效应细胞的频率在7.0 $\times 10^{10}$ 个基因组剂量下约15%的平均值到2.7 $\times 10^8$ 个基因组下约1%的范围内,从而表明ID-VP02在至少2个对数值剂量范围内以剂量依赖性方式诱导CD8T细胞反应。

[0634] 为了了解用ID-VP02载体粒子初免是否诱导了可通过施用作为同源性加强免疫的ID-VP02而唤醒的记忆性T细胞,将动物用中等剂量的1.0 $\times 10^{10}$ 个基因组初免,然后在初免后35天用等同剂量加强免疫。在初免和加强免疫后的各时间点,通过ICS测定了CD8T细胞反应。通过分析IFN- γ +CD8T细胞的频率,据发现,用ID-VP02-OVA加强免疫诱导了OVA₂₅₇特异

性唤醒反应,该反应比原发性反应更快,并且幅度也达原发性反应的两倍以上(图22B)。这些数据表明了,ID-VP02的应用不因载体特异性免疫而限于单次施用,对于其他病毒载体而言,诸如基于腺病毒的载体,已知载体特异性免疫是一个问题。

[0635] 除了IFN- γ 的染色外,通过同时染色两种另外的细胞因子TNF- α 和IL-2以及CD107a的表面易位(与细胞毒性活性相关)分析了原发和继发CD8T细胞反应的质量。在初免和加强免疫后,大部分应答CD8T细胞都具有多功能表型,如通过CD107a、TNF- α 和IL-2的阐释所证实(图22C、D)。要注意的是,在加强免疫后35天,基本上100%的IFN- γ ⁺细胞为CD107a⁺,大部分还表达了TNF- α ,并且这些“三阳性”细胞中的很大一部分还产生了IL-2,从而表明形成了具有高功能质量的记忆性T细胞。

[0636] 标志物KLRG1和CD127在病毒特异性CD8T细胞反应峰值附近测定时分别与短寿命效应细胞(SLEC)和记忆性前体细胞(MPEC)命运相关。如在用LCMW感染期间所观察到,当在免疫后第9天对抗原特异性H-2K^b-OVA₂₅₇多聚体结合性CD8T细胞的表型进行分析时,一部分细胞极化成KLRG1⁺CD127⁻SLEC或KLRG1⁻CD127⁺MPEC表型(图22E)。令人感兴趣的是,在初免和加强免疫后35天,虽然大部分细胞具有CD127⁺记忆性表型,但是它们在KLRG1⁺与KLRG1⁻亚组之间大致等分,据报道两个亚组均具有比SLEC高的唤醒潜力。

[0637] 实施例23

[0638] 辛德毕斯病毒E2糖蛋白假型化慢病毒载体粒子诱导的记忆性CD8T细胞扩增并表现出抗病毒功能

[0639] 为了直接评价通过SINVar1免疫所诱导的记忆性CD8T细胞的功能,使用了编码最小OVA₂₅₇和LCMV GP₃₃肽序列(两种可靠的H-2Kb限制性表位)的称为LV1b的替代性抗原盒。

[0640] 材料和方法

[0641] MHC-I多聚体和记忆性表型分析

[0642] 在存在2-4G2抗体的情况下,将如上所述制备的脾细胞用H-2K^b-OVA₂₅₇MHC-I五聚体(ProImmune,Oxford,UK)在室温FACS缓冲液中染色10分钟。将细胞洗涤一次,并用表面抗体加上L/D NIR在冰上染色20分钟。抗体包括CD127-FITC、CD44-PerCP-Cy5.5、KLRG1-APC、CD8-Alexa Fluor 700(均得自eBioscience)和B220-V500(BD)。将细胞洗涤、用Cytotfix®固定,并如上进行分析。在活CD8T细胞群中,对基于未免疫小鼠中的第99.9个百分位而分类的CD44^{hi} H-2K^b-OVA₂₅₇五聚体⁺事件分析了其KLRG1和CD127表达。

[0643] 牛痘病毒激发

[0644] 在第0天,将C57BL/6小鼠在尾巴根部经皮下用一定剂量范围的编码LV1b的ID-VP02、包含OVA₂₅₇(SIINFEKL)(SEQ ID NO:24)和LCMV GP₃₃(KAVYNFATM)(SEQ ID NO:66)H-2K^b限制性表位的多表位构建体或HBSS媒介物免疫。五周后,将小鼠用1×10⁷TCID₅₀表达OVA的重组牛痘病毒(rVV-OVA)、1E7TCID₅₀野生型牛痘病毒(VV-WT)或HBSS媒介物经腹膜内激发。激发后五天,收获脾脏以用于如上所述的OVA₂₅₇和GP₃₃特异性ICS,并收获卵巢以通过TCID₅₀测定法对病毒载量定量。

[0645] 结果

[0646] 如图23A中示意性地示出,用ID-VP02-LV1b免疫后35天,用表达OVA的重组牛痘病毒(rVV-OVA)但非野生型牛痘病毒(VV-WT)激发的小鼠显示出了OVA₂₅₇特异性CD8T细胞的大量扩增(图23B、C),从而表明这些记忆细胞以抗原特异性方式被唤醒。另外,rVV-OVA未扩增

GP₃₃特异性记忆细胞(图23B),从而确认了在相同的动物内需要抗原特异性。对应于响应感染的CD8T细胞的剂量依赖性诱导,在受感染小鼠的卵巢中rVV-OVA的病毒载量存在明显的剂量依赖性降低(图23D)。重要的是,在LV1b抗原构建体与rVV-OVA激发株之间共有的唯一抗原序列为SIINFEKL MHC I类表位,从而表明该保护受CD8T细胞介导。确认了该保护确实为抗原特异性的后,用VV-WT感染不受免疫的影响。

[0647] 实施例24

[0648] SINVar1免疫提供预防性和治疗性抗肿瘤功效

[0649] CT26肿瘤细胞系源自BALB/c小鼠中的自发性结肠癌。可介导对植入的CT26肿瘤的排斥的内源性表位为AH1肽。虽然MHC-TCR相互作用对于AH1表位而言相对较弱,但是改变的肽配体AH1A5可稳定该相互作用,从而导致更大的CD8T细胞扩增和抗肿瘤反应。为了生成编码该表位的SINVar1,生成了抗原盒,其中将AH1A5序列插入全长OVA序列(OVA-AH1A5),如前人所报道。Brockstedt等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 101(38),13832(2004)。

[0650] 材料和方法

[0651] 体内细胞毒性测定

[0652] 将BALB/c小鼠(每组3只)在尾巴根部经皮下用编码OVA-AH1A5的ID-VP02免疫。十二天后,将染料标记的、肽脉冲的靶细胞经由眶后窦经静脉内转移到免疫的和未处理的对照小鼠中。通过以下方式由天然脾细胞制备了靶细胞:通过低渗休克裂解红细胞,然后将细胞分成用1μg/mL AH1(PSYVYHQF)(SEQ ID NO:67)、AH1A5(PSYAYHQF)(SEQ ID NO:25)或阴性对照NY-ESO-181-88(RGPESRLI)(SEQ ID NO:68)肽脉冲的三个群。洗涤细胞,然后用2μM CFSE(Invitrogen)加上三种浓度之一的Cell Trace Violet(Invitrogen)标记:2μM、0.2μM或0.02μM。将靶细胞以1:1:1的比率合并,并将5×10⁶个总细胞转移到受体。第二天,收获脾脏,并如前人所述在初始与免疫小鼠之间比较了各细胞群的相对回收率以计算特异性杀灭。Wonderlich等人,Curr.Protoc.Immunol.第3章,Unit(2006)。

[0653] CT26肿瘤激发

[0654] 对于预防性实验,将BALB/c小鼠(每组10只)在尾巴根部经皮下用编码OVA-AH1A5(一种包含限定的MHC-I限制性CT26肿瘤细胞排斥表位的抗原)的ID-VP02免疫。四周后,将免疫小鼠和未处理的对照小鼠在右侧腹经皮下注射8×10⁴个CT26肿瘤细胞。每周监测三次肿瘤生长,并且当肿瘤面积超过100mm²时小鼠实施安乐死。在同一天进行了以治疗性模式测试ID-VP02的实验,不同之处在于推迟用ID-VP02的免疫,直到肿瘤植入后四天。

[0655] 结果

[0656] 当将BALB/c小鼠用编码OVA-AH1A5的ID-VP02免疫时,我们观察到了多功能AH1A5特异性CD8T细胞的剂量依赖性诱导,这些细胞中大约一半与内源性AH1序列交叉反应(图24A)。通过体内细胞毒性测定法分析了ID-VP02诱导的CD8T细胞获得溶细胞功能的能力。将三个脾细胞靶细胞群同时用CFSE加上不同浓度的Cell Trace Violet标记,然后用AH1、AH1A5或阴性对照肽进行脉冲。将靶细胞以1:1:1的比率混合,然后共同转移到在12天前用ID-VP02免疫或不作处理的受体小鼠中。在第1天,AH1和AH1A5脉冲的靶细胞的相对回收率在ID-VP02免疫小鼠中降低,其中针对AH1A5的特异性杀灭率超过90%,而针对AH1的为约25%(图24B),从而表明ID-VP02诱导了针对免疫抗原的功能性细胞毒性CD8T细胞。

[0657] 作为对抗肿瘤功效的第一项测试,将经皮下用ID-VP02-OVA-AH1A5或媒介物免疫

的小鼠在28天后用植入侧腹的CT26肿瘤细胞激发。然而,所有对照小鼠到第21天均具有致死的肿瘤生长($>100\text{mm}^2$),70%的ID-VP02免疫小鼠能够排斥植入的肿瘤,并且这些存活的小鼠无肿瘤至少60天(图24C)。这些发现通过应用ID-VP02作为之前所植入的CT26肿瘤的治疗方法而扩展。在该模型中,使肿瘤生长5天,然后将动物用ID-VP02-OVA-AH1A5或媒介物对照处理。如在该预防性实验中,所有对照动物均在大约三周内因肿瘤生长而死亡(图24D)。相比之下,所有用ID-VP02处理的小鼠均显示出对肿瘤进展的影响,范围从生长动力学的延迟到完全排斥。肿瘤在免疫组中未能生长到可触知的大小(2/10)或完全消退(3/10),导致50%的小鼠到至少第60天无肿瘤。这些数据表明,ID-VP02可在预防性和治疗性环境中发挥抗肿瘤细胞毒性活性,从而支持对作为治疗剂用于人类癌症的ID-VP02进行评估。

序列表

<110> 免疫设计公司

<120> 用于产生改良的慢病毒载体粒子的材料和方法

<130> 31943/46417A

<150> 13/436, 472

<151> 2012-03-30

<150> 61/666, 103

<151> 2012-06-29

<150> 61/732, 756

<151> 2012-12-03

<150> 61/789, 575

<151> 2012-03-15

<160> 68

[0001]

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 423

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<220>

<221> misc_feature

<222> (160)..(160)

<223> Xaa 可以为任何天然存在的氨基酸

<400> 1

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys

1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu

20 25 30

	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys	
	210						215					220					
	Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser	
	225					230					235					240	
	Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	His	
					245					250						255	
	Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	His	
				260					265						270		
	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Asp	
			275					280						285			
[0003]	Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	Pro	
	290						295					300					
	Glu	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	Thr	
	305					310					315					320	
	Val	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro	Val	
					325					330					335		
	Arg	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp	Pro	
				340					345						350		
	His	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr	Ile	
			355					360					365				
	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr	Val	
	370						375					380					

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
405 410 415

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 2

<211> 986

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 2

[0004] Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Ser Val Ile
50 55 60

Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys Ser Tyr Cys
65 70 75 80

His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu Gln Val Trp
85 90 95

Tyr Ala Lys Pro Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys
260 265 270

	Gly Asp Tyr Lys Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly	
	275	280 285
	Cys Thr Ala Ile Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys	
	290	295 300
	Trp Val Phe Asn Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala	
	305	310 315 320
	Gln Gly Lys Leu His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met	
		325 330 335
	Val Pro Val Ala His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile	
		340 345 350
[0006]	Ser Leu Gln Leu Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg	
	355	360 365
	Leu Gly Ala Asn Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr	
	370	375 380
	Val Arg Asn Phe Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly	
	385	390 395 400
	Asn His Glu Pro Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp	
		405 410 415
	Pro His Gly Trp Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His	
		420 425 430
	Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met	
	435	440 445

	Ile Gly Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu	
	450	455 460
	Cys Leu Thr Pro Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser	
	465	470 475 480
	Leu Ala Leu Leu Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr	
		485 490 495
	Glu Thr Met Ser Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val	
		500 505 510
	Gln Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys	
	515	520 525
[0007]	Ser Cys Cys Leu Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys	
	530	535 540
	Val Asp Ala Tyr Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile	
	545	550 555 560
	Pro Tyr Lys Ala Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu	
		565 570 575
	Glu Ile Thr Val Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu	
		580 585 590
	Tyr Ile Thr Cys Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys	
	595	600 605
	Cys Cys Gly Ser Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Gly Tyr Thr	
	610	615 620

	Cys	Lys	Val	Phe	Gly	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln
	625						630				635					640
	Cys	Phe	Cys	Asp	Ser	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu
					645					650						655
	Leu	Ser	Ala	Asp	Cys	Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His
					660					665						670
	Thr	Ala	Ala	Met	Lys	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr
					675					680						685
	Ser	Phe	Leu	Asp	Val	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys
					690					695						700
[0008]	Asp	Leu	Lys	Val	Ile	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe
	705															720
	Asp	His	Lys	Val	Val	Ile	His	Arg	Gly	Leu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Phe
					725											735
	Pro	Glu	Tyr	Gly	Ala	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala
					740											750
	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu
					755											765
	Leu	Lys	Pro	Ser	Ala	Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser
					770											780
	Ser	Gly	Phe	Glu	Met	Trp	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu
	785															800

Thr Ala Pro Phe Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val
805 810 815

Asp Cys Ser Tyr Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala
820 825 830

Ala Phe Ile Arg Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys
835 840 845

Glu Val Ser Glu Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr
850 855 860

Leu Gln Tyr Val Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His
865 870 875 880

[0009] Ser Ser Thr Ala Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys
885 890 895

Gly Ala Val Thr Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe
900 905 910

Ile Val Ser Leu Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys
915 920 925

Pro Pro Ala Asp His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu
930 935 940

Phe Gln Ala Ala Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu
945 950 955 960

Phe Gly Gly Ala Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala
965 970 975

Cys Ser Met Met Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980 985

<210> 3

<211> 982

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 3

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

[0010]

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr

[0011]

305	310	315	320
His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala			
325	330	335	
His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu			
340	345	350	
Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn			
355	360	365	
Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe			
370	375	380	
Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro			
385	390	395	400
[0012]			
Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp			
405	410	415	
Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr			
420	425	430	
Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr			
435	440	445	
Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro			
450	455	460	
Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu			
465	470	475	480
Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser			

	485	490	495
Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile			
500	505	510	
Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu			
515	520	525	
Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr			
530	535	540	
Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala			
545	550	555	560
Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val			
565	570	575	
[0013]			
Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys			
580	585	590	
Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser			
595	600	605	
Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe			
610	615	620	
Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp			
625	630	635	640
Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp			
645	650	655	
Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met			

660	665	670
Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp 675	680	685
Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val 690	695	700
Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val 705	710	715 720
Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly 725	730	735
Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr 740	745	750
[0014]		
Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser 755	760	765
Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu 770	775	780
Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe 785	790	795 800
Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr 805	810	815
Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg 820	825	830
Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu		

835

840

845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

[0015]

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 4

<211> 982

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 4

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

[0016]

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
 210 215 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
 225 230 235 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
 245 250 255

[0017]

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
 305 310 315 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
 325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
 340 345 350

	Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn	
	355	360 365
	Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe	
	370	375 380
	Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro	
	385	390 395 400
	Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp	
		405 410 415
	Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr	
		420 425 430
[0018]	Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr	
	435	440 445
	Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro	
	450	455 460
	Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu	
	465	470 475 480
	Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser	
		485 490 495
	Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile	
		500 505 510
	Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu	
	515	520 525

	Pro	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ala	Lys	Val	Asp	Ala	Tyr	
	530						535					540					
	Glu	His	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Asn	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ala	
	545					550					555					560	
	Leu	Val	Glu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Val	
					565					570					575		
	Met	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	Thr	Asn	Gln	Glu	Tyr	Ile	Thr	Cys	
				580					585						590		
	Lys	Phe	Thr	Thr	Val	Val	Pro	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Cys	Cys	Gly	Ser	
			595					600					605				
[0019]	Leu	Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe	
	610						615					620					
	Gly	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp	
	625					630					635					640	
	Ser	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Ala	Asp	
					645					650					655		
	Cys	Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His	Thr	Ala	Ala	Met	
				660					665					670			
	Lys	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp	
			675					680					685				
	Val	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	
	690						695					700					

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705 710 715 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
725 730 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
740 745 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
755 760 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
770 775 780

[0020]

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

[0021] Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 5
<211> 980
<212> PRT
<213> 辛德毕斯病毒

<400> 5

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

	Arg	Ala	Leu	Asp	Ile	Leu	Glu	Glu	Asn	Val	Asn	His	Glu	Ala	Tyr	Asp	
			35					40					45				
	Thr	Leu	Leu	Asn	Ala	Ile	Leu	Arg	Cys	Gly	Ser	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys	
		50					55					60					
	Arg	Ser	Val	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr	
	65				70					75					80		
	Cys	Ser	Tyr	Cys	His	His	Thr	Val	Pro	Cys	Phe	Ser	Pro	Val	Lys	Ile	
				85					90					95			
	Glu	Gln	Val	Trp	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Gln	Thr	
			100					105					110				
[0022]	Ser	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	
		115					120				125						
	Tyr	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Glu	Gln	Asp	His	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Thr	
		130					135				140						
	Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	
	145				150					155					160		
	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	
				165					170				175				
	Thr	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala	
			180					185					190				
	Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	
		195					200					205					

	Pro	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Thr	
	210						215					220					
	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr	Thr	
	225					230					235				240		
	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro	Ser	
				245						250					255		
	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr	Gly	
			260						265						270		
	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys	Gln	
		275						280					285				
[0023]	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser	Pro	
	290						295					300					
	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	His	Leu	
	305					310					315				320		
	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	His	Ala	
				325						330					335		
	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Asp	Thr	
			340						345					350			
	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	Pro	Glu	
		355						360				365					
	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	Thr	Val	
	370					375						380					

	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro	Val	Arg
	385					390					395					400
	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp	Pro	His
				405					410					415		
	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr	Ile	Leu
			420					425						430		
	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr	Val	Ala
		435					440					445				
	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Lys	Ala	Arg	Arg	Glu	Cys	Leu	Thr	Pro	Tyr	Ala
	450					455					460					
[0024]	Leu	Ala	Pro	Asn	Ala	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Cys	Cys
	465				470					475					480	
	Val	Arg	Ser	Ala	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Glu	Thr	Met	Ser	Tyr	Leu
				485					490				495			
	Trp	Ser	Asn	Ser	Gln	Pro	Phe	Phe	Trp	Val	Gln	Leu	Cys	Ile	Pro	Leu
		500						505					510			
	Ala	Ala	Phe	Ile	Val	Leu	Met	Arg	Cys	Cys	Ser	Cys	Cys	Leu	Pro	Phe
		515					520					525				
	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ala	Lys	Val	Asp	Ala	Tyr	Glu	His
	530					535					540					
	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Asn	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ala	Leu	Val
	545				550					555					560	

	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Lys	
						740			745							750	
	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Ala	Lys	
			755						760							765	
	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu	Met	Trp	
			770						775							780	
	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Pro	Phe	Gly	Cys	
						785			790					795		800	
	Lys	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Tyr	Gly	Asn	
					805						810					815	
[0026]	Ile	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	Arg	Thr	Ser	
					820						825					830	
	Asp	Ala	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Cys	Glu	Val	Ser	Glu	Cys	Thr	
					835						840					845	
	Tyr	Ser	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Thr	Leu	Gln	Tyr	Val	Ser	Asp	
					850				855							860	
	Arg	Glu	Gly	Gln	Cys	Pro	Val	His	Ser	His	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	Leu	
					865				870							875	
	Gln	Glu	Ser	Thr	Val	His	Val	Leu	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Val	His	
					885						890					895	
	Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Asn	Phe	Ile	Val	Ser	Leu	Cys	Gly	
					900						905					910	

Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His Ile
915 920 925

Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile Ser
930 935 940

Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser Ser
945 950 955 960

Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu Thr
965 970 975

Ser Thr Arg Arg
980

[0027] <210> 6
<211> 981
<212> PRT
<213> 辛德毕斯病毒

<400> 6

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

	Arg	Ser	Val	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr
	65					70					75					80
	Cys	Ser	Tyr	Cys	His	His	Thr	Val	Pro	Cys	Phe	Ser	Pro	Val	Lys	Ile
					85					90					95	
	Glu	Gln	Val	Trp	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Gln	Thr
				100					105						110	
	Ser	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys
			115					120					125			
	Tyr	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Glu	Gln	Asp	His	Thr	Val	Glu	Glu	Gly	Thr
		130						135				140				
[0028]	Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser
	145					150					155					160
	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val
					165					170					175	
	Thr	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala
				180					185						190	
	Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro
		195						200					205			
	Pro	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Glu
		210					215					220				
	Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr
	225					230					235					240

	Phe	Thr	Thr	Val	Val	Pro	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Cys	Cys	Gly	Ser	Leu
	595			600			605									
	Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe	Gly
	610			615			620									
	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp	Ser
	625			630			635			640						
	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Ala	Asp	Cys
	645			650			655									
	Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His	Thr	Ala	Ala	Met	Lys
	660			665			670									
[0031]	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp	Val
	675			680			685									
	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	Ile
	690			695			700									
	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	His	Lys	Val	Val
	705			710			715			720						
	Ile	His	Arg	Gly	Leu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Glu	Tyr	Gly	Ala
	725			730			735									
	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser
	740			745			750									
	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Ala
	755			760			765									

	Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu	Met	
	770							775					780				
	Trp	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Pro	Phe	Gly	
	785					790					795					800	
	Cys	Lys	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Tyr	Gly	
					805					810						815	
	Asn	Ile	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	Arg	Thr	
					820					825					830		
	Ser	Asp	Ala	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Cys	Glu	Val	Ser	Glu	Cys	
			835						840						845		
[0032]	Thr	Tyr	Ser	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Thr	Leu	Gln	Tyr	Val	Ser	
	850						855						860				
	Asp	Arg	Glu	Gly	Gln	Cys	Pro	Val	His	Ser	His	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	
	865					870					875					880	
	Leu	Gln	Glu	Ser	Thr	Val	His	Val	Leu	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Val	
					885					890						895	
	His	Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Asn	Phe	Ile	Val	Ser	Leu	Cys	
					900					905						910	
	Gly	Lys	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Pro	Ala	Asp	His	
			915						920						925		
	Ile	Val	Ser	Thr	Pro	His	Lys	Asn	Asp	Gln	Glu	Phe	Gln	Ala	Ala	Ile	
					930				935						940		

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 7

<211> 982

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 7

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

[0033]

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr

100	105	110
Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys		
115	120	125
Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr		
130	135	140
Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser		
145	150	155 160
Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val		
165	170	175
Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala		
180	185	190
[0034]		
Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro		
195	200	205
Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu		
210	215	220
Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala		
225	230	235 240
Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro		
245	250	255
Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys		
260	265	270
Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile		

275	280	285
Lys Gln Cys Val Ala Tyr	Lys Ser Asp Gln Thr	Lys Trp Val Phe Asn
290	295	300
Ser Pro Asp Leu Ile Arg His	Asp Asp His Thr Ala Gln Gly	Lys Leu
305	310	315 320
His Leu Pro Phe Lys Leu Ile	Pro Ser Thr Cys Met Val	Pro Val Ala
325	330	335
His Ala Pro Asn Val Ile His	Gly Phe Lys His Ile Ser	Leu Gln Leu
340	345	350
Asp Thr Asp His Leu Thr	Leu Leu Thr Thr Arg Arg	Leu Gly Ala Asn
355	360	365
[0035]		
Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp	Ile Val Gly Lys Thr Val	Arg Asn Phe
370	375	380
Thr Val Asp Arg Asp Gly	Leu Glu Tyr Ile Trp Gly	Asn His Glu Pro
385	390	395 400
Val Arg Val Tyr Ala Gln	Glu Ser Ala Pro Gly Asp	Pro His Gly Trp
405	410	415
Pro His Glu Ile Val Gln	His Tyr Tyr His Arg His	Pro Val Tyr Thr
420	425	430
Ile Leu Ala Val Ala Ser	Ala Thr Val Ala Met Met	Ile Gly Val Thr
435	440	445
Val Ala Val Leu Cys Ala	Cys Lys Ala Arg Arg	Glu Cys Leu Thr Pro

450	455	460
Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu		
465	470	475 480
Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser		
	485	490 495
Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile		
	500	505 510
Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu		
	515	520 525
Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr		
	530	535 540
[0036]		
Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala		
545	550	555 560
Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val		
	565	570 575
Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys		
	580	585 590
Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser		
	595	600 605
Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe		
	610	615 620
Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp		

625	630	635	640
Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp			
645	650	655	
Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met			
660	665	670	
Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp			
675	680	685	
Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val			
690	695	700	
Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val			
705	710	715	720

[0037]

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly			
725	730	735	
Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr			
740	745	750	
Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser			
755	760	765	
Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu			
770	775	780	
Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe			
785	790	795	800
Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr			

	805	810	815
Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg			
820	825	830	
Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu			
835	840	845	
Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val			
850	855	860	
Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala			
865	870	875	880
Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr			
885	890	895	
[0038]			
Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu			
900	905	910	
Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp			
915	920	925	
His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala			
930	935	940	
Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala			
945	950	955	960
Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met			
965	970	975	
Leu Thr Ser Thr Arg Arg			

980

<210> 8

<211> 981

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 8

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

[0039]

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

	Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser
	145					150					155					160
	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val
					165					170					175	
	Thr	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala
					180					185					190	
	Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro
					195					200					205	
	Pro	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Glu
					210					215					220	
[0040]	Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr
	225					230					235					240
	Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro
					245					250					255	
	Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr
					260					265					270	
	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys
					275					280					285	
	Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser
					290					295					300	
	Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	His
	305					310					315					320

	Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His	
	325	330 335
	Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp	
	340	345 350
	Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro	
	355	360 365
	Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr	
	370	375 380
	Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val	
	385	390 395 400
[0041]	Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro	
	405	410 415
	His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile	
	420	425 430
	Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val	
	435	440 445
	Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr	
	450	455 460
	Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys	
	465	470 475 480
	Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr	
	485	490 495

	Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val	
	675	680 685
	Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile	
	690	695 700
	Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val	
	705	710 715 720
	Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala	
		725 730 735
	Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser	
		740 745 750
[0043]	Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala	
	755	760 765
	Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met	
	770	775 780
	Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly	
	785	790 795 800
	Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly	
		805 810 815
	Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr	
		820 825 830
	Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys	
	835	840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

[0044]

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 9

<211> 982

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 9

	Met	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Val	Thr	Ala	Met	Cys	Leu	Leu	Gly	Asn	Val	
	1				5					10					15		
		Ser	Phe	Pro	Cys	Asp	Arg	Pro	Pro	Thr	Cys	Tyr	Thr	Arg	Glu	Pro	Ser
				20						25					30		
		Arg	Ala	Leu	Asp	Ile	Leu	Glu	Glu	Asn	Val	Asn	His	Glu	Ala	Tyr	Asp
				35						40					45		
		Thr	Leu	Leu	Asn	Ala	Ile	Leu	Arg	Cys	Gly	Ser	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys
				50						55					60		
		Arg	Ser	Val	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr
		65					70					75					80
[0045]		Cys	Ser	Tyr	Cys	His	His	Thr	Val	Pro	Cys	Phe	Ser	Pro	Val	Lys	Ile
						85					90					95	
		Glu	Gln	Val	Trp	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Gln	Thr
					100						105					110	
		Ser	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys
					115						120					125	
		Tyr	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Lys	Gln	Asp	His	Thr	Val	Glu	Glu	Gly	Thr
					130						135					140	
		Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser
		145					150					155					160
		Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val
						165					170					175	

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
355 360 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
370 375 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385 390 395 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
405 410 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
420 425 430

[0047]

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
435 440 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
450 455 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465 470 475 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
485 490 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
500 505 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
515 520 525

	Pro	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ala	Lys	Val	Asp	Ala	Tyr	
	530						535					540					
	Glu	His	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Asn	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ala	
	545					550					555					560	
	Leu	Val	Glu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Val	
					565					570					575		
	Met	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	Thr	Asn	Gln	Glu	Tyr	Ile	Thr	Cys	
				580					585						590		
	Lys	Phe	Thr	Thr	Val	Val	Pro	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Cys	Cys	Gly	Ser	
			595					600					605				
[0048]	Leu	Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe	
	610						615					620					
	Gly	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp	
	625					630					635					640	
	Ser	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Ala	Asp	
					645					650					655		
	Cys	Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His	Thr	Ala	Ala	Met	
				660					665						670		
	Lys	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp	
			675					680					685				
	Val	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	
	690						695					700					

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705 710 715 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
725 730 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
740 745 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
755 760 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
770 775 780

[0049]

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
 885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
 900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
 915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
 930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
 945 950 955 960

[0050] Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
 965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980

<210> 10

<211> 981

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 10

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

[0051]

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
195 200 205

	Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu	
	210	215 220
	Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr	
	225	230 235 240
	Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro	
	245	250 255
	Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr	
	260	265 270
	Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys	
	275	280 285
[0052]	Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser	
	290	295 300
	Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His	
	305	310 315 320
	Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His	
	325	330 335
	Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp	
	340	345 350
	Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro	
	355	360 365
	Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr	
	370	375 380

	Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val	
	385	390 395 400
	Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro	
		405 410 415
	His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile	
		420 425 430
	Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val	
		435 440 445
	Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr	
		450 455 460
[0053]	Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys	
	465	470 475 480
	Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr	
		485 490 495
	Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro	
		500 505 510
	Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro	
		515 520 525
	Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu	
		530 535 540
	His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu	
	545	550 555 560

	Val	Glu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Val	Met	
					565					570						575	
	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	Thr	Asn	Gln	Glu	Tyr	Ile	Thr	Cys	Lys	
				580					585						590		
	Phe	Thr	Thr	Val	Val	Pro	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Cys	Cys	Gly	Ser	Leu	
				595				600						605			
	Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe	Gly	
		610					615						620				
	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp	Ser	
	625					630					635					640	
[0054]	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Ala	Asp	Cys	
				645						650					655		
	Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His	Thr	Ala	Ala	Met	Lys	
				660					665						670		
	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp	Val	
				675				680						685			
	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	Ile	
		690					695					700					
	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	His	Lys	Val	Val	
	705					710					715					720	
	Ile	His	Arg	Gly	Leu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Glu	Tyr	Gly	Ala	
				725						730					735		

	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	
				740					745						750		
	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Ala	
			755						760					765			
	Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu	Met	
			770						775					780			
	Trp	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Pro	Phe	Gly	
	785					790					795					800	
	Cys	Lys	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Tyr	Gly	
					805					810					815		
[0055]	Asn	Ile	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	Arg	Thr	
					820					825					830		
	Ser	Asp	Ala	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Cys	Glu	Val	Ser	Glu	Cys	
			835						840					845			
	Thr	Tyr	Ser	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Thr	Leu	Gln	Tyr	Val	Ser	
			850					855					860				
	Asp	Arg	Glu	Gly	Gln	Cys	Pro	Val	His	Ser	His	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	
	865					870					875				880		
	Leu	Gln	Glu	Ser	Thr	Val	His	Val	Leu	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Val	
					885					890					895		
	His	Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Asn	Phe	Ile	Val	Ser	Leu	Cys	
					900					905					910		

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

[0056] <210> 11
<211> 982
<212> PRT
<213> 辛德毕斯病毒

<400> 11

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr

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

245	250	255
Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys		
260	265	270
Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile		
275	280	285
Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn		
290	295	300
Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu		
305	310	315
320		
His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala		
325	330	335
[0058]		
His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu		
340	345	350
Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn		
355	360	365
Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe		
370	375	380
Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro		
385	390	395
400		
Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp		
405	410	415
Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr		

420	425	430
Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr		
435	440	445
Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro		
450	455	460
Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu		
465	470	475 480
Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser		
485	490	495
Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile		
500	505	510
[0059]		
Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu		
515	520	525
Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr		
530	535	540
Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala		
545	550	555 560
Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val		
565	570	575
Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys		
580	585	590
Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser		

595	600	605
Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe		
610	615	620
Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp		
625	630	635 640
Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp		
645	650	655
Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met		
660	665	670
Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp		
675	680	685
[0060]		
Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val		
690	695	700
Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val		
705	710	715 720
Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly		
725	730	735
Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr		
740	745	750
Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser		
755	760	765
Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu		

770	775	780
Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe		
785	790	795 800
Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr		
	805	810 815
Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg		
	820	825 830
Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu		
	835	840 845
Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val		
	850	855 860
[0061]		
Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala		
865	870	875 880
Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr		
	885	890 895
Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu		
	900	905 910
Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp		
	915	920 925
His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala		
	930	935 940
Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala		

945	950	955	960
Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met			
	965	970	975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 12
<211> 981
<212> PRT
<213> 辛德毕斯病毒

<400> 12

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

[0062]

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

[0063]

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
 225 230 235 240

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
 245 250 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
 260 265 270

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
 275 280 285

	Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser	
	290	295 300
	Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His	
	305	310 315 320
	Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His	
		325 330 335
	Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp	
		340 345 350
	Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro	
		355 360 365
[0064]	Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr	
	370	375 380
	Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val	
	385	390 395 400
	Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro	
		405 410 415
	His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile	
		420 425 430
	Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val	
	435	440 445
	Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr	
	450	455 460

	Ala	Leu	Ala	Pro	Asn	Ala	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Cys
	465					470					475					480
	Cys	Val	Arg	Ser	Ala	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Glu	Thr	Met	Ser	Tyr
					485					490					495	
	Leu	Trp	Ser	Asn	Ser	Gln	Pro	Phe	Phe	Trp	Val	Gln	Leu	Cys	Ile	Pro
				500						505					510	
	Leu	Ala	Ala	Phe	Ile	Val	Leu	Met	Arg	Cys	Cys	Ser	Cys	Cys	Leu	Pro
		515						520					525			
	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ala	Lys	Val	Asp	Ala	Tyr	Glu
	530						535					540				
[0065]	His	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Asn	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ala	Leu
	545					550					555					560
	Val	Glu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Val	Met
					565					570					575	
	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	Thr	Asn	Gln	Glu	Tyr	Ile	Thr	Cys	Lys
				580					585						590	
	Phe	Thr	Thr	Val	Val	Pro	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Cys	Cys	Gly	Ser	Leu
		595						600						605		
	Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe	Gly
	610						615					620				
	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp	Ser
	625					630					635					640

	Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys	
	645	650 655
	Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys	
	660	665 670
	Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val	
	675	680 685
	Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile	
	690	695 700
	Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val	
	705	710 715 720
[0066]	Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala	
	725	730 735
	Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser	
	740	745 750
	Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala	
	755	760 765
	Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met	
	770	775 780
	Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly	
	785	790 795 800
	Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly	
	805	810 815

<210> 13
<211> 982
<212> PRT
<213> 辛德毕斯病毒

<400> 13

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

[0068] Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

	Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser
	145					150					155					160
	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val
					165					170					175	
	Thr	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala
					180					185					190	
	Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro
		195						200					205			
	Pro	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Lys
		210					215					220				
[0069]	Gly	Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala
	225					230					235					240
	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro
					245					250					255	
	Pro	Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys
				260						265					270	
	Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile
				275					280				285			
	Lys	Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn
		290					295					300				
	Ser	Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu
	305					310					315					320

	His	Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	
						325					330					335	
	His	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	
				340					345						350		
	Asp	Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	
			355					360						365			
	Pro	Glu	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	
		370					375					380					
	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro	
	385					390					395					400	
[0070]	Val	Arg	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp	
					405					410					415		
	Pro	His	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr	
				420						425					430		
	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr	
		435						440					445				
	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Lys	Ala	Arg	Arg	Glu	Cys	Leu	Thr	Pro	
		450					455					460					
	Tyr	Ala	Leu	Ala	Pro	Asn	Ala	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	
	465					470					475				480		
	Cys	Cys	Val	Arg	Ser	Ala	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Glu	Thr	Met	Ser	
					485					490					495		

	Lys	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp	
		675						680					685				
	Val	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	
		690					695					700					
	Ile	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	His	Lys	Val	
	705					710					715					720	
	Val	Ile	His	Arg	Gly	Leu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Glu	Tyr	Gly	
					725					730					735		
	Ala	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	
			740						745						750		
[0072]	Ser	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	
		755						760					765				
	Ala	Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu	
		770					775					780					
	Met	Trp	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Pro	Phe	
	785					790					795					800	
	Gly	Cys	Lys	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Tyr	
					805					810					815		
	Gly	Asn	Ile	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	Arg	
				820					825					830			
	Thr	Ser	Asp	Ala	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Cys	Glu	Val	Ser	Glu	
		835						840					845				

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

[0073]

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 14

<211> 981

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 14

	Met	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Val	Thr	Ala	Met	Cys	Leu	Leu	Gly	Asn	Val
	1				5					10					15	
	Ser	Phe	Pro	Cys	Asp	Arg	Pro	Pro	Thr	Cys	Tyr	Thr	Arg	Glu	Pro	Ser
				20					25					30		
	Arg	Ala	Leu	Asp	Ile	Leu	Glu	Glu	Asn	Val	Asn	His	Glu	Ala	Tyr	Asp
			35					40					45			
	Thr	Leu	Leu	Asn	Ala	Ile	Leu	Arg	Cys	Gly	Ser	Ser	Gly	Arg	Ser	Lys
		50					55					60				
	Arg	Ser	Val	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr
	65					70					75					80
[0074]	Cys	Ser	Tyr	Cys	His	His	Thr	Val	Pro	Cys	Phe	Ser	Pro	Val	Lys	Ile
					85					90					95	
	Glu	Gln	Val	Trp	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Gln	Thr
				100						105				110		
	Ser	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys
			115						120				125			
	Tyr	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Glu	Gln	Asp	His	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Thr
		130					135					140				
	Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser
	145					150					155				160	
	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val
					165					170				175		

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
340 345 350

	Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	Pro	
				355				360					365				
	Glu	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	Thr	
		370					375						380				
	Val	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro	Val	
	385					390					395					400	
	Arg	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp	Pro	
					405					410						415	
	His	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr	Ile	
				420						425					430		
[0076]	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr	Val	
			435					440					445				
	Ala	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Lys	Ala	Arg	Arg	Glu	Cys	Leu	Thr	Pro	Tyr	
		450					455					460					
	Ala	Leu	Ala	Pro	Asn	Ala	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Cys	
	465					470					475					480	
	Cys	Val	Arg	Ser	Ala	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Glu	Thr	Met	Ser	Tyr	
					485					490					495		
	Leu	Trp	Ser	Asn	Ser	Gln	Pro	Phe	Phe	Trp	Val	Gln	Leu	Cys	Ile	Pro	
			500							505				510			
	Leu	Ala	Ala	Phe	Ile	Val	Leu	Met	Arg	Cys	Cys	Ser	Cys	Cys	Leu	Pro	
		515						520					525				

	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ala	Lys	Val	Asp	Ala	Tyr	Glu	
	530						535					540					
	His	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Asn	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ala	Leu	
	545					550					555					560	
	Val	Glu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Val	Met	
					565					570						575	
	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	Thr	Asn	Gln	Glu	Tyr	Ile	Thr	Cys	Lys	
				580					585						590		
	Phe	Thr	Thr	Val	Val	Pro	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Cys	Cys	Gly	Ser	Leu	
		595						600					605				
[0077]	Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe	Gly	
	610						615					620					
	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp	Ser	
	625					630					635					640	
	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Ala	Asp	Cys	
				645						650					655		
	Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His	Thr	Ala	Ala	Met	Lys	
				660					665						670		
	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp	Val	
		675						680					685				
	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	Ile	
	690						695					700					

	Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val	
	705	710 715 720
	Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala	
		725 730 735
	Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser	
		740 745 750
	Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala	
		755 760 765
	Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met	
		770 775 780
[0078]	Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly	
	785	790 795 800
	Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly	
		805 810 815
	Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr	
		820 825 830
	Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys	
		835 840 845
	Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser	
		850 855 860
	Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr	
	865	870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

[0079]

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 15

<211> 982

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 15

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp

35	40	45
Thr Leu Leu Asn Ala Ile	Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys	
50	55	60
Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr		
65	70	75 80
Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile		
	85	90 95
Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr		
	100	105 110
Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys		
115	120	125
[0080]		
Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr		
130	135	140
Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser		
145	150	155 160
Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val		
	165	170 175
Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala		
	180	185 190
Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro		
195	200	205
Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys		

210	215	220
Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala		
225	230	235 240
Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro		
245	250	255
Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys		
260	265	270
Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile		
275	280	285
Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn		
290	295	300
[0081]		
Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu		
305	310	315 320
His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala		
325	330	335
His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu		
340	345	350
Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn		
355	360	365
Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe		
370	375	380
Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro		

385	390	395	400
Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp			
	405	410	415
Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr			
	420	425	430
Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr			
	435	440	445
Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro			
	450	455	460
Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu			
465	470	475	480
[0082]			
Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser			
	485	490	495
Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile			
	500	505	510
Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu			
	515	520	525
Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr			
	530	535	540
Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala			
545	550	555	560
Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val			

565	570	575
Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys		
580	585	590
Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser		
595	600	605
Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe		
610	615	620
Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp		
625	630	635
640		
Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp		
645	650	655
[0083]		
Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met		
660	665	670
Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp		
675	680	685
Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val		
690	695	700
Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val		
705	710	715
720		
Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly		
725	730	735
Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr		

	740		745		750
Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser					
755		760		765	
Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu					
770		775		780	
Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe					
785		790		795	800
Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr					
	805		810		815
Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg					
	820		825		830
[0084]					
Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu					
	835		840		845
Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val					
	850		855		860
Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala					
865		870		875	880
Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr					
	885		890		895
Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu					
	900		905		910
Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp					

	915	920	925
	His Ile Val Ser Thr Pro	His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala	
	930	935	940
	Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala		
	945	950	955 960
	Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met		
	965	970	975
	Leu Thr Ser Thr Arg Arg		
	980		
[0085]	<210> 16		
	<211> 981		
	<212> PRT		
	<213> 辛德毕斯病毒		
	<400> 16		
	Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val		
	1 5 10 15		
	Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser		
	20 25 30		
	Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp		
	35 40 45		
	Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys		
	50 55 60		
	Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr		
	65 70 75 80		

	Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr	
	260	265 270
	Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys	
	275	280 285
	Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser	
	290	295 300
	Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His	
	305	310 315 320
	Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His	
	325	330 335
[0087]	Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp	
	340	345 350
	Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro	
	355	360 365
	Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr	
	370	375 380
	Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val	
	385	390 395 400
	Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro	
	405	410 415
	His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile	
	420	425 430

	Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe	Gly	
	610						615					620					
	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp	Ser	
	625					630				635					640		
	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Ala	Asp	Cys	
					645					650					655		
	Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His	Thr	Ala	Ala	Met	Lys	
					660					665					670		
	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp	Val	
			675						680					685			
[0089]	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	Ile	
	690							695					700				
	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	His	Lys	Val	Val	
	705					710					715					720	
	Ile	His	Arg	Gly	Leu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Glu	Tyr	Gly	Ala	
					725					730					735		
	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	
					740					745					750		
	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Ala	
			755							760				765			
	Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu	Met	
	770								775					780			

	Trp	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Pro	Phe	Gly
	785					790					795					800
	Cys	Lys	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Tyr	Gly
					805					810						815
	Asn	Ile	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	Arg	Thr
					820					825					830	
	Ser	Asp	Ala	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Cys	Glu	Val	Ser	Glu	Cys
			835						840						845	
	Thr	Tyr	Ser	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Thr	Leu	Gln	Tyr	Val	Ser
		850					855						860			
[0090]	Asp	Arg	Glu	Gly	Gln	Cys	Pro	Val	His	Ser	His	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr
	865					870					875					880
	Leu	Gln	Glu	Ser	Thr	Val	His	Val	Leu	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Val
					885					890					895	
	His	Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Asn	Phe	Ile	Val	Ser	Leu	Cys
					900					905					910	
	Gly	Lys	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Pro	Ala	Asp	His
			915						920					925		
	Ile	Val	Ser	Thr	Pro	His	Lys	Asn	Asp	Gln	Glu	Phe	Gln	Ala	Ala	Ile
		930						935					940			
	Ser	Lys	Thr	Ser	Trp	Ser	Trp	Leu	Phe	Ala	Leu	Phe	Gly	Gly	Ala	Ser
	945						950					955				960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 17

<211> 982

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 17

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

[0091] Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

	Lys	Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	
	290						295					300					
	Ser	Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	
	305					310					315					320	
	His	Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	
					325					330					335		
	His	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	
				340					345						350		
	Asp	Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	
		355						360					365				
[0093]	Pro	Glu	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	
	370						375					380					
	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro	
	385					390					395					400	
	Val	Arg	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp	
					405					410					415		
	Pro	His	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr	
					420					425					430		
	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr	
		435						440					445				
	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Lys	Ala	Arg	Arg	Glu	Cys	Leu	Thr	Pro	
	450						455					460					

	Tyr	Ala	Leu	Ala	Pro	Asn	Ala	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu
	465					470					475					480
	Cys	Cys	Val	Arg	Ser	Ala	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Glu	Thr	Met	Ser
				485						490					495	
	Tyr	Leu	Trp	Ser	Asn	Ser	Gln	Pro	Phe	Phe	Trp	Val	Gln	Leu	Cys	Ile
				500					505						510	
	Pro	Leu	Ala	Ala	Phe	Ile	Val	Leu	Met	Arg	Cys	Cys	Ser	Cys	Cys	Leu
			515						520					525		
	Pro	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ala	Lys	Val	Asp	Ala	Tyr
		530					535						540			
[0094]	Glu	His	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Asn	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ala
	545					550					555					560
	Leu	Val	Glu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Val
				565						570					575	
	Met	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	Thr	Asn	Gln	Glu	Tyr	Ile	Thr	Cys
				580						585					590	
	Lys	Phe	Thr	Thr	Val	Val	Pro	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Cys	Cys	Gly	Ser
			595					600					605			
	Leu	Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe
		610					615						620			
	Gly	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp
	625					630					635					640

	Ser	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Ala	Asp	
						645					650					655	
	Cys	Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His	Thr	Ala	Ala	Met	
				660					665							670	
	Lys	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp	
			675						680							685	
	Val	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	
		690						695					700				
	Ile	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	His	Lys	Val	
	705					710					715					720	
[0095]	Val	Ile	His	Arg	Gly	Leu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Glu	Tyr	Gly	
					725					730						735	
	Ala	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	
					740					745						750	
	Ser	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	
			755						760							765	
	Ala	Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu	
		770							775							780	
	Met	Trp	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Pro	Phe	
	785					790						795				800	
	Gly	Cys	Lys	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Tyr	
					805						810					815	

	Gly	Asn	Ile	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	Arg	
				820					825					830			
	Thr	Ser	Asp	Ala	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Cys	Glu	Val	Ser	Glu	
			835					840					845				
	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Thr	Leu	Gln	Tyr	Val	
		850					855					860					
	Ser	Asp	Arg	Glu	Gly	Gln	Cys	Pro	Val	His	Ser	His	Ser	Ser	Thr	Ala	
	865					870				875						880	
	Thr	Leu	Gln	Glu	Ser	Thr	Val	His	Val	Leu	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	
					885					890					895		
[0096]	Val	His	Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Asn	Phe	Ile	Val	Ser	Leu	
				900					905					910			
	Cys	Gly	Lys	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Pro	Ala	Asp	
		915						920				925					
	His	Ile	Val	Ser	Thr	Pro	His	Lys	Asn	Asp	Gln	Glu	Phe	Gln	Ala	Ala	
		930					935					940					
	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Trp	Ser	Trp	Leu	Phe	Ala	Leu	Phe	Gly	Gly	Ala	
	945					950				955						960	
	Ser	Ser	Leu	Leu	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Ile	Phe	Ala	Cys	Ser	Met	Met	
				965					970						975		
	Leu	Thr	Ser	Thr	Arg	Arg											
				980													

<210> 18

<211> 423

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 18

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45

[0097] Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
50 55 60

Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr Met
65 70 75 80

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr
85 90 95

Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg
115 120 125

Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro Pro
130 135 140

	Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys Glu	
	145	150 155 160
	Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr	
		165 170 175
	Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro	
		180 185 190
	Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr	
		195 200 205
	Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys	
		210 215 220
[0098]	Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser	
	225	230 235 240
	Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His	
		245 250 255
	Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His	
		260 265 270
	Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp	
		275 280 285
	Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro	
		290 295 300
	Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr	
	305	310 315 320

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
325 330 335

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
340 345 350

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
355 360 365

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
370 375 380

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
405 410 415

[0099]

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 19

<211> 65

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 19

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp

35

40

45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg
65

<210> 20

<211> 488

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 20

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

[0100]

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

	Ser	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys
	115							120					125			
	Tyr	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Lys	Gln	Asp	His	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Thr
	130						135					140				
	Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser
	145				150					155					160	
	Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val
					165				170					175		
	Thr	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala
			180					185						190		
[0101]	Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro
	195						200					205				
	Pro	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Lys
	210						215					220				
	Glu	Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala
	225				230				235						240	
	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro
					245				250					255		
	Pro	Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys
			260					265					270			
	Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile
	275						280					285				

	Lys	Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	
	290						295					300					
	Ser	Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	
	305					310					315					320	
	His	Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	
					325					330						335	
	His	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	
				340					345						350		
	Asp	Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	
		355						360					365				
[0102]	Pro	Glu	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	
	370						375					380					
	Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro	
	385					390					395					400	
	Val	Arg	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp	
					405					410					415		
	Pro	His	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr	
					420					425					430		
	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr	
		435						440					445				
	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Lys	Ala	Arg	Arg	Glu	Cys	Leu	Thr	Pro	
	450						455					460					

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
 465 470 475 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
 485

<210> 21

<211> 683

<212> DNA

<213> 人类免疫缺陷病毒 1 型

<400> 21

[0103]

cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaag aaaagggggg 180
 actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatatt cttgatctgt ggatctacca 240
 cacacaaggc tacttccctg attggcagaa ctacacacca gggccaggga tcagatatcc 300
 actgaccttt ggatggtgct acaagctagt accagttgag caagagaagg tagaagaagc 360
 caatgaagga gagaacaccc gcttgttaca ccctgtgagc ctgcatggga tggatgaccc 420
 ggagagagaa gtattagagt ggaggtttga cagccgccta gcatttcac acatggcccg 480
 agagctgcat cggactgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct 540
 ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgccctt gagtgttca 600
 agtagtgtgt gccgtctgt tgtgtgactc tggtactag agatccctca gaccctttta 660
 gtcagtgtgg aaaatctcta gca 683

<210> 22

<211> 416

<212> DNA

<213> 人类免疫缺陷病毒 1 型

<400> 22

cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60

ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120

aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaag aaaagggggg 180

actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg cttttgcct gtactgggtc 240

tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300

taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360

ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagca 416

<210> 23

<211> 401

<212> DNA

[0104] <213> 人类免疫缺陷病毒 1 型

<400> 23

cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60

ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120

aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac ttttacttg aagggctaata 180

tcactcccaa cgaagacaag atctgctttt tgctgtact ggtctctctt ggtagacca 240

gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag 300

cttgcttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag 360

atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc a 401

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> 原鸡

<400> 24

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 25

Ser Pro Ser Tyr Ala Tyr His Gln Phe
1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

[0105]

<400> 26

Arg Ser Lys Arg Ser
1 5

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 27

Arg Ser Lys Arg
1

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 28

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 29

Ala Ala Val Lys Asn Trp Met Thr Gln Thr Leu

1 5 10

[0106]

<210> 30

<211> 423

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 30

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys

1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu

20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser

35 40 45

Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr

50 55 60

	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Glu	Gln	Asp	His	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Thr	Met
	65					70					75					80
	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr
				85					90						95	
	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	Thr
				100					105						110	
	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala	Arg
			115					120					125			
	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	Pro
	130						135					140				
[0107]	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Glu	Gly
	145					150					155				160	
	Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr
				165						170					175	
	Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro
				180					185						190	
	Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr
		195						200					205			
	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys
	210						215					220				
	Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser
	225					230					235				240	

	Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His	
	245	250 255
	Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His	
	260	265 270
	Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp	
	275	280 285
	Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro	
	290	295 300
	Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr	
	305	310 315 320
[0108]	Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val	
	325	330 335
	Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro	
	340	345 350
	His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile	
	355	360 365
	Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val	
	370	375 380
	Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr	
	385	390 395 400
	Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys	
	405	410 415

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 31
<211> 423
<212> PRT
<213> 辛德毕斯病毒

<400> 31

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

[0109] Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45

Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
50 55 60

Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr Met
65 70 75 80

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr
85 90 95

Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg
115 120 125

	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	Pro	
	130						135					140					
	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Glu	Gly	
	145					150					155				160		
	Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr	
					165					170					175		
	Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro	
				180					185					190			
	Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr	
		195						200					205				
[0110]	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys	
	210						215					220					
	Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser	
	225					230					235				240		
	Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	His	
					245					250					255		
	Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	His	
			260						265					270			
	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Asp	
		275						280					285				
	Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	Pro	
	290						295					300					

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
 305 310 315 320

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
 325 330 335

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
 340 345 350

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
 355 360 365

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
 370 375 380

[0111] Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
 385 390 395 400

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
 405 410 415

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
 420

<210> 32

<211> 421

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 32

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
 1 5 10 15

	Ser	Tyr	Cys	His	His	Thr	Val	Pro	Cys	Phe	Ser	Pro	Val	Lys	Ile	Glu	
				20					25					30			
	Gln	Val	Trp	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Gln	Thr	Ser	
		35						40					45				
	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Tyr	
		50					55					60					
	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Glu	Gln	Asp	His	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Thr	Met	
	65				70					75						80	
	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr	
				85					90					95			
[0112]	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	
				100				105					110				
	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala	Arg	
		115					120					125					
	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	Pro	
		130					135					140					
	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Thr	Thr	
	145				150					155					160		
	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr	Thr	Ser	
				165				170					175				
	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro	Ser	Gly	
			180					185					190				

	Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr Gly Thr	
	195	200 205
	Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys Gln Cys	
	210	215 220
	Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser Pro Asp	
	225	230 235 240
	Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His Leu Pro	
		245 250 255
	Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His Ala Pro	
	260	265 270
[0113]	Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp Thr Asp	
	275	280 285
	His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro Glu Pro	
	290	295 300
	Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr Val Asp	
	305	310 315 320
	Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val Arg Val	
		325 330 335
	Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro His Glu	
	340	345 350
	Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala	
	355	360 365

Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val Ala Val
370 375 380

Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala Leu
385 390 395 400

Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys Val
405 410 415

Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 33

<211> 422

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

[0114]

<400> 33

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45

Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
50 55 60

Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr Met
65 70 75 80

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr

85

90

95

Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg
115 120 125

Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro Pro
130 135 140

Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu Thr
145 150 155 160

Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr Thr
165 170 175

[0115]

Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro Ser
180 185 190

Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr Gly
195 200 205

Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys Gln
210 215 220

Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser Pro
225 230 235 240

Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His Leu
245 250 255

Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His Ala

260	265	270
Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp Thr		
275	280	285
Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro Glu		
290	295	300
Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr Val		
305	310	315 320
Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val Arg		
325	330	335
Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro His		
340	345	350
[0116]		
Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile Leu		
355	360	365
Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val Ala		
370	375	380
Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala		
385	390	395 400
Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys		
405	410	415
Val Arg Ser Ala Asn Ala		
420		
<210>	34	

<211> 423
<212> PRT
<213> 辛德毕斯病毒

<400> 34

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45

Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
50 55 60

[0117]

Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr Met
65 70 75 80

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr
85 90 95

Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg
115 120 125

Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro Pro
130 135 140

Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu Gly
145 150 155 160

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
340 345 350

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
355 360 365

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
370 375 380

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
405 410 415

[0119] Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 35

<211> 422

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 35

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45

	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Tyr	
	50						55					60					
	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Lys	Gln	Asp	His	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Thr	Met	
	65					70					75					80	
	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr	
				85					90						95		
	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	
				100					105						110		
	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala	Arg	
			115					120					125				
[0120]	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	Pro	
	130						135					140					
	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Glu	Thr	
	145					150					155					160	
	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr	Thr	
					165					170					175		
	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro	Ser	
				180					185					190			
	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr	Gly	
			195					200					205				
	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys	Gln	
	210						215					220					

	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser	Pro
	225					230					235					240
	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	His	Leu
				245					250					255		
	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	His	Ala
			260						265					270		
	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Asp	Thr
		275						280					285			
	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	Pro	Glu
	290						295					300				
[0121]	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	Thr	Val
	305					310					315					320
	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro	Val	Arg
				325						330				335		
	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp	Pro	His
			340						345					350		
	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr	Ile	Leu
		355						360					365			
	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr	Val	Ala
	370						375					380				
	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Lys	Ala	Arg	Arg	Glu	Cys	Leu	Thr	Pro	Tyr	Ala
	385					390					395					400

Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys
405 410 415

Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 36

<211> 423

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 36

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

[0122] Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45

Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
50 55 60

Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr Met
65 70 75 80

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr
85 90 95

Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr
100 105 110

196

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
290 295 300

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
305 310 315 320

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
325 330 335

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
340 345 350

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
355 360 365

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
370 375 380

[0124]

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
405 410 415

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 37

<211> 422

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 37

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys

1	5	10	15
Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu			
20	25	30	
Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser			
35	40	45	
Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr			
50	55	60	
Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr Met			
65	70	75	80
Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr			
85	90	95	
[0125]			
Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr			
100	105	110	
Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg			
115	120	125	
Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro Pro			
130	135	140	
Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu Thr			
145	150	155	160
Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr Thr			
165	170	175	
Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro Ser			

	180		185		190
Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr Gly					
	195		200		205
Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys Gln					
	210		215		220
Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser Pro					
225		230		235	240
Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His Leu					
	245		250		255
Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His Ala					
	260		265		270
[0126]					
Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp Thr					
	275		280		285
Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro Glu					
	290		295		300
Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr Val					
305		310		315	320
Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val Arg					
	325		330		335
Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro His					
	340		345		350
Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile Leu					

	355	360	365
	Ala Val Ala Ser Ala Thr	Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val Ala	
	370	375	380
	Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala		
	385	390	395 400
	Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys		
	405	410	415
	Val Arg Ser Ala Asn Ala		
	420		
[0127]	<210>	38	
	<211>	423	
	<212>	PRT	
	<213>	辛德毕斯病毒	
	<400>	38	
	Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys		
	1	5	10 15
	Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu		
	20	25	30
	Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser		
	35	40	45
	Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr		
	50	55	60
	Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr Met		
	65	70	75 80

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
245 250 255

	Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	His	
					260				265					270			
	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Asp	
			275					280					285				
	Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	Pro	
		290					295						300				
	Glu	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	Thr	
	305					310					315					320	
	Val	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro	Val	
					325					330					335		
[0129]	Arg	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp	Pro	
				340					345					350			
	His	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr	Ile	
		355						360					365				
	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr	Val	
		370					375					380					
	Ala	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Lys	Ala	Arg	Arg	Glu	Cys	Leu	Thr	Pro	Tyr	
	385				390					395					400		
	Ala	Leu	Ala	Pro	Asn	Ala	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Cys	
					405				410					415			
	Cys	Val	Arg	Ser	Ala	Asn	Ala										
					420												

<210> 39
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> 辛德毕斯病毒

<400> 39

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
 1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
 20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
 35 40 45

[0130] Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
 50 55 60

Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr Met
 65 70 75 80

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr
 85 90 95

Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg
 115 120 125

Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro Pro
 130 135 140

	Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys Thr	
	145 150 155 160	
	Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr Thr	
	165 170 175	
	Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro Ser	
	180 185 190	
	Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr Gly	
	195 200 205	
	Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys Gln	
	210 215 220	
[0131]	Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser Pro	
	225 230 235 240	
	Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His Leu	
	245 250 255	
	Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His Ala	
	260 265 270	
	Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp Thr	
	275 280 285	
	Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro Glu	
	290 295 300	
	Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr Val	
	305 310 315 320	

Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val Arg
325 330 335

Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro His
340 345 350

Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile Leu
355 360 365

Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val Ala
370 375 380

Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala
385 390 395 400

[0132] Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys
405 410 415

Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 40

<211> 423

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 40

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

	Gln	Val	Trp	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Gln	Thr	Ser	
				35					40					45			
	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Tyr	
		50					55						60				
	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Glu	Gln	Asp	His	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Thr	Met	
	65					70					75					80	
	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr	
					85					90					95		
	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	Thr	
				100					105					110			
[0133]	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala	Arg	
			115					120					125				
	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	Pro	
		130					135					140					
	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Lys	Gly	
	145					150					155					160	
	Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr	
					165					170					175		
	Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro	
				180					185					190			
	Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr	
			195					200					205				

	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys	
	210						215					220					
	Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser	
	225					230					235					240	
	Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	His	
					245					250					255		
	Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	His	
				260					265						270		
	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Asp	
			275					280					285				
[0134]	Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	Pro	
	290						295					300					
	Glu	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	Thr	
	305					310					315					320	
	Val	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro	Val	
					325					330				335			
	Arg	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp	Pro	
				340					345					350			
	His	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr	Ile	
			355					360					365				
	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr	Val	
		370					375					380					

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
405 410 415

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 41

<211> 422

<212> PRT

<213> 辛德毕斯病毒

<400> 41

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

[0135]

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45

Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
50 55 60

Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr Met
65 70 75 80

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr
85 90 95

Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr

100	105	110
Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg		
115	120	125
Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro Pro		
130	135	140
Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys Thr		
145	150	155
160		
Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr Thr		
165	170	175
Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro Ser		
180	185	190
[0136]		
Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr Gly		
195	200	205
Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys Gln		
210	215	220
Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser Pro		
225	230	235
240		
Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His Leu		
245	250	255
Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His Ala		
260	265	270
Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp Thr		

275	280	285
Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro Glu		
290	295	300
Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr Val		
305	310	315 320
Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val Arg		
325	330	335
Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro His		
340	345	350
Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile Leu		
355	360	365
[0137]		
Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val Ala		
370	375	380
Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala		
385	390	395 400
Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys		
405	410	415
Val Arg Ser Ala Asn Ala		
420		
<210>	42	
<211>	423	
<212>	PRT	
<213>	辛德毕斯病毒	

<400> 42

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45

Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
50 55 60

Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr Met
65 70 75 80

[0138]

Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr
85 90 95

Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr
100 105 110

Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg
115 120 125

Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro Pro
130 135 140

Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys Gly
145 150 155 160

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
165 170 175

	Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro	
				180					185					190			
	Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr	
			195					200					205				
	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys	
		210					215					220					
	Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser	
	225					230					235					240	
	Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	His	
				245						250					255		
[0139]	Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	His	
			260						265					270			
	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Asp	
		275						280					285				
	Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	Pro	
		290					295					300					
	Glu	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	Thr	
	305				310					315					320		
	Val	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro	Val	
				325						330				335			
	Arg	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp	Pro	
			340						345					350			

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
355 360 365

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
370 375 380

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
405 410 415

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

[0140] <210> 43
<211> 422
<212> PRT
<213> 辛德毕斯病毒

<400> 43

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
20 25 30

Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
35 40 45

Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
50 55 60

	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Glu	Gln	Asp	His	Thr	Val	Glu	Glu	Gly	Thr	Met
	65					70					75					80
	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr
				85						90					95	
	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	Thr
				100					105						110	
	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala	Arg
			115					120					125			
	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	Pro
	130						135					140				
[0141]	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Lys	Thr
	145					150					155				160	
	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr	Thr
					165					170					175	
	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro	Ser
				180					185					190		
	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr	Gly
			195					200				205				
	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys	Gln
	210						215					220				
	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser	Pro
	225					230					235				240	

	Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His Leu	
	245	250 255
	Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His Ala	
	260	265 270
	Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp Thr	
	275	280 285
	Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro Glu	
	290	295 300
	Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr Val	
	305	310 315 320
[0142]	Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val Arg	
	325	330 335
	Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro His	
	340	345 350
	Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile Leu	
	355	360 365
	Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val Ala	
	370	375 380
	Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala	
	385	390 395 400
	Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys	
	405	410 415

Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> 猴免疫缺陷病毒

<400> 44

Met Ser Asp Pro Arg Glu Arg Ile Pro Pro Gly Asn Ser Gly Glu Glu
1 5 10 15

Thr Ile Gly Glu Ala Phe Glu Trp Leu Asn Arg Thr Val Glu Glu Ile
20 25 30

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

[0143]

Trp Gln Arg Ser Trp Glu Tyr Trp His Asp Glu Gln Gly Met Ser Gln
50 55 60

Ser Tyr Val Lys Tyr Arg Tyr Leu Cys Leu Met Gln Lys Ala Leu Phe
65 70 75 80

Met His Cys Lys Lys Gly Cys Arg Cys Leu Gly Glu Gly His Gly Ala
85 90 95

Gly Gly Trp Arg Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ala
100 105 110

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> 猴免疫缺陷病毒

<400> 45

Met Thr Asp Pro Arg Glu Arg Ile Pro Pro Gly Asn Ser Gly Glu Glu
1 5 10 15

Thr Ile Gly Glu Ala Phe Glu Trp Leu His Asn Thr Val Glu Ala Leu
20 25 30

Asn Gln Thr Ala Val Gln His Leu Pro Arg Glu Leu Ile Phe Gln Val
35 40 45

Trp Arg Arg Cys Trp Glu Tyr Trp Val Asp Glu Gln Gly Tyr Ser Pro
50 55 60

Ser Tyr Ala Lys Tyr Arg Tyr Val Gln Leu Met Gln Lys Ala Met Phe
65 70 75 80

[0144]

Gln His Phe Arg Lys Gly Cys Thr Cys Arg Gly Glu Gly His Ser Gln
85 90 95

Gly Gly Trp Arg Thr Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ala
100 105 110

<210> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> 猴免疫缺陷病毒

<400> 46

Met Ser Asp Pro Arg Glu Arg Ile Pro Pro Gly Asn Ser Gly Glu Glu
1 5 10 15

Thr Ile Gly Glu Ala Phe Asp Trp Leu Asp Arg Thr Val Glu Glu Ile
20 25 30

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

Trp Arg Arg Ser Trp Glu Tyr Trp His Asp Glu Met Gly Met Ser Val
 50 55 60

Ser Tyr Thr Lys Tyr Arg Tyr Leu Cys Leu Ile Gln Lys Ala Met Phe
 65 70 75 80

Met His Cys Lys Lys Gly Cys Arg Cys Leu Gly Gly Glu His Gly Ala
 85 90 95

Gly Gly Trp Arg Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ala
 100 105 110

[0145] <210> 47
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人类免疫缺陷病毒 2 型
 <400> 47

Met Ala Asp Pro Arg Glu Arg Val Pro Pro Gly Asn Ser Gly Glu Glu
 1 5 10 15

Thr Ile Gly Glu Ala Phe Glu Trp Leu Asp Arg Thr Ile Glu Ala Leu
 20 25 30

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

Trp Gln Arg Ser Trp Ala Tyr Trp His Asp Glu Gln Gly Met Ser Thr
 50 55 60

Ser Tyr Thr Lys Tyr Arg Tyr Leu Cys Ile Met Gln Lys Ala Val Tyr
65 70 75 80

Ile His Phe Lys Lys Gly Cys Thr Cys Leu Gly Arg Gly His Gly Pro
85 90 95

Gly Gly Trp Arg Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Val
100 105 110

<210> 48

<211> 117

<212> PRT

<213> 猴免疫缺陷病毒

<400> 48

[0146] Met Glu Arg Tyr Pro Pro Ser His Pro Pro His Phe Thr Ser Arg Thr
1 5 10 15

Val Pro Met Thr Arg Leu Ala Leu Gln Gln Ala Met Gln Asp Leu Asn
20 25 30

Glu Glu Ala Leu Lys His Phe Thr Arg Glu Glu Leu Trp Gly Val Trp
35 40 45

Asn His Cys Val Asp Leu Pro Ala Gln Pro Asp Trp Thr Gly Glu Gln
50 55 60

Ala Trp Ala Ala Ser Val Ile Asp Tyr Ile Lys Ile Val Gln Arg Met
65 70 75 80

Leu Trp Leu His Leu Arg Glu Ala Cys Phe His Arg Glu Arg Glu Ala
85 90 95

Thr Arg Arg Tyr Pro Asn Ile Arg Pro Leu Thr Gly Arg Asn Arg Glu
100 105 110

Val Arg Asp Gly Glu
115

<210> 49

<211> 135

<212> PRT

<213> 猴免疫缺陷病毒

<400> 49

Met Glu Arg Val Pro Pro Ser His Arg Pro Pro Trp His Ser Arg Val
1 5 10 15

Val Pro Thr Thr Met Gln Gln Ala Gln Gln Ala Met Trp Asp Leu Asn
20 25 30

[0147]

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

Asn Asp Val Thr Glu Leu Pro Ala Asp Pro Asn Trp Thr Val Asp Gln
50 55 60

Ala Ala Ile Ala Cys Ala Ile Asp Tyr Ile Arg Arg Thr Gln Thr Leu
65 70 75 80

Leu Phe Arg His Tyr Arg Glu Gly Cys Tyr His Arg Tyr Ser Asn Thr
85 90 95

Ile Arg Arg Tyr Pro Asn Ile Arg Pro Leu Arg Gly Thr Gln Ala Pro
100 105 110

Pro Ser Asn Ser Met Pro Asn Ala Asp Pro Thr Pro Pro Leu Arg Pro

	115	120	125	
	Ser Arg Tyr Arg Met Asp Glu			
	130	135		
<210>	50			
<211>	942			
<212>	DNA			
<213>	智人			
<400>	50			
	atgcctcttg agcagaggag tcagcactgc aagcctgaag aaggccttga ggcccagagga		60	
	gaggcccttg gcctggtggg tgcgcaggct cctgctactg aggagcagga ggctgcctcc		120	
	tcctcttcta ctctagtga agtcaccctg ggggaggtgc ctgctgccga gtcaccagat		180	
	cctccccaga gtcctcaggg agcctccagc ctccccacta ccatgaacta ccctctcttg		240	
[0148]	agccaatcct atgaggactc cagcaaccaa gaagaggagg ggccaagcac cttccctgac		300	
	ctggagtccg agttccaagc agcactcagt aggaaggtgg ccgagttggt tcattttctg		360	
	ctcctcaagt atcgagccag ggagccggtc acaaaggcag aaatgctggg gagtgtcgtc		420	
	ggaaattggc agtatttctt tcctgtgatc ttcagcaagg cttccagttc cttgcagctg		480	
	gtctttggca tcgagctgat ggaagtggac cccatcggcc acttgtacat ctttgccacc		540	
	tgccctgggc tctcctacga tggcctgctg ggtgacaatc agatcatgcc caaggcaggc		600	
	ctcctgataa tcgtcctggc cataatcgca agagagggcg actgtgcccc tgaggagaaa		660	
	atctgggagg agctgagtgt gttagagggtg tttagaggga gggaagacag tatcttgggc		720	
	gatcccaaga agctgctcac ccaacatttc gtgcaggaaa actacctgga gtaccggcag		780	
	gtccccgcca gtgatcctgc atgttatgag ttctgtggg gtccaagggc cctcgttgaa		840	
	accagctatg tgaaagtcct gcaccacatg gtaaagatca gtggaggacc tcacatttcc		900	
	taccaccccc tgcatgagtg ggttttgaga gagggggaag ag		942	

<210>	51	
<211>	540	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	51	
	atgcaggccg aaggccgggg cacaggggggt tcgacgggcg atgctgatgg cccaggaggc	60
	cctggcattc ctgatggccc aggggggcaat gctggcggcc caggagaggc gggtgccacg	120
	ggcggcagag gtccccgggg cgcaggggca gcaaggcct cggggccggg aggaggcgcc	180
	ccgcggggtc cgcatggcgg cgcgggttca gggctgaatg gatgctgcag atgcggggcc	240
	agggggccgg agagccgcct gcttgagttc tacctcgcca tgcctttcgc gacacccatg	300
	gaagcagagc tggcccgag gaggctggcc caggatgccc caccgcttcc cgtgccaggg	360
	gtgcttctga aggagttcac tgtgtccggc aacatactga ctatccgact gactgctgca	420
[0149]	gaccaccgcc aactgcagct ctccatcagc tcctgtctcc agcagctttc cctgttgatg	480
	tggatcacgc agtgccttct gcccggtgtt ttggctcagc ctcctcagg gcagaggcgc	540
<210>	52	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	明脉扁刺蛾β四体病毒	
<400>	52	
	gagggcagag gcagtcttct gacatgtgga gatgtggaag aaaaccctgg cccc	54
<210>	53	
<211>	9020	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多核苷酸	

[0150]	<400> 53	
	atgcattagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga	60
	gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccc aagacccccg	120
	cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg	180
	acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca	240
	tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc	300
	ccagtacatg accttatggg acttttctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc	360
	tattaccatg gtgatgcggt ttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc	420
	acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa	480
	tcaacgggac ttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc a ttgacgcaa tgggcggtag	540
	gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag cgcgttttgc ctgtactggg tctctctggt	600
	tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaaccactg cttaagcctc	660
	aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt gactctggta	720
	actagagatc cctcagacc ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcagt ggcgcccga	780
	cagggacttg aaagcgaaag ggaaaccaga ggagctctct cgacgcagga ctcggttgc	840
	tgaagcgcgc acggcaagag gcgaggggcg gcgactggtg agtacgcaa aaattttgac	900
	tagcggaggc tagaaggaga gagatgggtg cgagagcgtc agtattaagc gggggagaat	960
	tagatcgca tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga aagaaaaat ataaattaaa	1020
	acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca gttaatcctg gcctgttaga	1080
	aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa ccatcccttc agacaggatc	1140
	agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc tatttgtgtc atcaaaggat	1200
	agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag gaagagcaaa acaaaagtaa	1260
	gaccaccgca cagcaagcgg ccgtgatct tcagacctgg aggaggagat atgagggaca	1320

	attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat tgaaccatta ggagtagcac	1380
	ccaccaaggc aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag agcagtggga ataggagctt	1440
	tgttccttgg gtctctggga gcagcaggaa gcactatggg cgcagcgtca atgacgtga	1500
	cgttacaggc cagacaatta ttgtctggta tagtgcagca gcagaacaat ttgctgaggg	1560
	ctattgaggc gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg gggcatcaag cagctccagg	1620
	caagaatcct ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca gctcctgggg atttggggtt	1680
	gctctggaaa actcatttgc accactgctg tgccttggaa tgctagttag agtaataaat	1740
	ctctggaaca gatttggaaat cacacgacct ggatggagt ggacagagaa attaacaatt	1800
	acacaagctt aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa ccagcaagaa aagaatgaac	1860
	aagaattatt ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa ttggtttaac ataacaatt	1920
	ggctgtggta tataaaatta ttcataatga tagtaggagg cttggtaggt ttaagaatag	1980
[0151]	tttttgctgt actttctata gtgaatagag ttaggcaggg atattcacca ttatcgtttc	2040
	agaccacct cccaaccccg aggggacccg acaggcccg aggaatagaa gaagaaggtg	2100
	gagagagaga cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg atcggcactg cgtgcgccaa	2160
	ttctgcagac aaatggcagt attcatccac aattttaaaa gaaaaggggg gattgggggg	2220
	tacagtgcag gggaaagaat agtagacata atagcaacag acatacaaac taaagaatta	2280
	caaaaacaaa ttacaaaaat tcaaaatttt cgggtttatt acaggacag cagagatcca	2340
	gtttggttaa ttaaccctg tcggctccag atctggcctc cgcgccgggt tttggcgctt	2400
	cccgcggcg ccccccctc cagcgcgagc gctgccacgt cagacgaagg gcgcagcgag	2460
	cgtcctgate ctccgcccc gacgtcagg acagcgccc gctgctcata agactcggcc	2520
	ttagaacccc agtatcagca gaaggacatt ttaggcaggg acttgggtga ctctagggca	2580
	ctggttttct ttccagagag cggaacaggc gaggaaaagt agtcccttct cggcgattct	2640

	gcggagggat ctccgtgggg cggatgaacgc cgatgattat ataaggacgc gccgggtgtg	2700
	gcacagctag ttccgtcgca gccgggattt gggtcgcggt tcttgtttgt ggggatcccc	2760
	gggtaccggt gccaccatgc ctcttgagca gaggagtcag cactgcaagc ctgaagaagg	2820
	ccttgaggcc cgaggagagg ccctgggcct ggtgggtgcg caggctcctg ctactgagga	2880
	gcaggaggct gcctcctcct cttctactct agttgaagtc accctggggg aggtgcctgc	2940
	tgccgagtea ccagatcctc cccagagtcc tcaggagacc tccagcctcc ccactaccat	3000
	gaactaccct ctctggagcc aatcetatga ggactccagc aaccaagaag aggaggggcc	3060
	aagcaccttc cctgacctgg agtccgagtt ccaagcagca ctcagtagga aggtggccga	3120
	gttggttcat tttctgctcc tcaagtatcg agccaggag cgggtcaca aggcagaaat	3180
	gctggggagt gtcgtcgga attggcagta tttctttcct gtgatcttca gcaaggcttc	3240
	cagttccttg cagctggctt ttggcatcga gctgatggaa gtggacccca tcggccactt	3300
[0152]	gtacatcttt gccacctgcc tgggcctctc ctacgatggc ctgctgggtg acaatcagat	3360
	catgccaag gcaggcctcc tgataatcgt cctggccata atcgcaagag agggcgactg	3420
	tgcccctgag gagaaaatct gggaggagct gagtgtgta gagggtttg aggggagggg	3480
	agacagtatc ttgggcgatc ccaagaagct gctcaccaa catttcgtgc aggaaaacta	3540
	cctggagtac cggcaggtcc cgggcagtga tcctgcatgt tatgagttcc tgtgggtcc	3600
	aagggccctc gttgaaacca gctatgtgaa agtcctgcac cacatggtaa agatcagtgg	3660
	aggacctcac atttctacc caccctgca tgagtgggtt ttgagagagg gggaagagga	3720
	gggcagaggc agtcttctga catgtggaga tgtggaagaa aaccctggcc ccatgcaggc	3780
	cgaaggccgg ggcacagggg gttcgacggg cgatgctgat ggcccaggag gccctggcat	3840
	tcctgatggc ccagggggca atgctggcgg cccaggagag gcgggtgcca cgggcggcag	3900
	aggtccccgg ggcgcagggg cagcaagggc ctcggggccg ggaggaggcg ccccgcgggg	3960

	tccgcatggc ggcgcggctt cagggtgaa tggatgctgc agatgcgggg ccagggggcc	4020
	ggagagccgc ctgcttgagt tctacctgc catgccttc gcgacacca tggaagcaga	4080
	gctggcccgc aggagcctgg cccaggatgc cccaccgctt cccgtgccag ggggtcttct	4140
	gaaggagtgc actgtgtccg gcaacatact gactatccga ctgactgtg cagaccaccg	4200
	ccaactgcag ctctccatca gctcctgtct ccagcagctt tccctgttga tgtggatcac	4260
	gcagtgttt ctgccgtgt ttttggctca gcctccctca gggcagaggc gctagtga	4320
	attcgatata aagcttatcg ataatacaacc tctggattac aaaatttgtg aaagattgac	4380
	tggatattctt aactatgttg ctctttttac gctatgtgga tacgtgtctt taatgccttt	4440
	gtatcatgct attgcttccc gtatggcttt cattttctcc tcttgtata aatcctggtt	4500
	gctgtctctt tatgaggagt tgtggcccg tgcaggcaa cgtggcgtgg tgtgcactgt	4560
	gtttgtgac gcaaccccca ctggttgggg cattgccacc acctgtcagc tcctttccgg	4620
[0153]	gactttcgct ttccccctcc ctattgccac ggcggaactc atcgccgct gccttgcccg	4680
	ctgctggaca ggggctcggc tgttgggcac tgacaattcc gtggtgttgt cggggaaatc	4740
	atcgtccttt ccttggctgc tcgcctgtgt tgccacctgg attctgcgcg ggacgtcctt	4800
	ctgctacgtc ctttcggccc tcaatccagc ggaccttctt tcccgcggcc tgcctccggc	4860
	tctcggcct ctcccgctc ttgccttcg cctcagacg agtcggatct ccctttgggc	4920
	cgctccccg catcgatacc gtcgacctc agacctagaa aaacatggag caatcacaag	4980
	tagcaataca gcagctacca atgctgattg tgcttgcta gaagcacaag aggaggagga	5040
	ggtgggtttt ccagtcacac ctgaggtacc tttaagacca atgacttaca aggcagctgt	5100
	agatcttagc cactttttac tggaagggt aattcactcc caacgaagac aagatctgct	5160
	ttttgcctgt actgggtctc tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta	5220
	actagggaac cactgctta agcctcaata aagcttgctt tgagtgttc aagtagtgtg	5280

	tgcccgtctg ttgtgtgact ctggttaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtggtg	5340
	gaaaatctct agcagggccc ggtaccaggt aagtgtaccc aattcgccct atagtgagtc	5400
	gtattacaat tcactcgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggag	5460
	atccaatttt taagtgtata atgtgttaaa ctactgattc taattgtttg tgtattttag	5520
	attcacagtc ccaaggtca tttcaggccc ctacgtcctc acagtctgtt catgatcata	5580
	atcagccata ccacatttgt agaggtttta ctgtctttaa aaaacctccc acacctcccc	5640
	ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gtgtgtgtta acttgtttat tgcagcttat	5700
	aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg	5760
	cattctagtt gtggtttgtc caaaactcctc aatgtatctt aacgcgtaaa ttgtaagcgt	5820
	taatatattg ttaaaattcg cgttaaattt ttgttaaact agctcatatt ttaaccaata	5880
	ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag accgagatag ggttgagtgt	5940
[0154]	tgttccagtt tggaacaaga gtccactatt aaagaacgtg gactccaacg tcaaagggcg	6000
	aaaaaccgtc tatcagggcg atggccact acgtgaacca tcaccetaat caagtttttt	6060
	ggggtcgagg tgccgtaaag cactaaatcg gaaccctaaa gggagcccc gatttagagc	6120
	ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg aagaaagcga aaggagcggg	6180
	cgctagggcg ctggcaagtg tagcggtcac gctgcgcgt accaccacac ccgccgcgt	6240
	taatgcgccg ctacagggcg cgtcaggtgg cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc	6300
	tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg	6360
	ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gaatcctgag gcggaagaa ccagctgtgg	6420
	aatgtgtgtc agttaggtg tggaagtcc ccaggtccc cagcaggcag aagtatgcaa	6480
	agcatgcac tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt cccaggtc cccagcaggc	6540
	agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgc cctaactccg	6600

	cccatcccgc ccctaactcc gcccagttcc gcccattctc cgccccatgg ctgactaatt	6660
	ttttttatatt atgcagaggc cgaggccgcc tcggcctctg agctattcca gaagtagtga	6720
	ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc aaagatcgat caagagacag gatgaggatc	6780
	gtttcgcattg attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt gggtaggagag	6840
	gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggtgc tctgatgccg ccgtgttccg	6900
	gctgtcagcg caggggcgcc cgtttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa	6960
	tgaactgcaa gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacgggag ttccttgccg	7020
	agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggaactgg ctgctattgg gcgaagtgcc	7080
	ggggcaggat ctctgtcat ctacattgc tctgcccag aaagtatcca tcatggctga	7140
	tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa	7200
	acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct	7260
[0155]	ggacgaagaa catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc gccaggctca aggcgagcat	7320
	gcccgaacgc gaggatctcg tcgtgaccca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt	7380
	ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgttg cggaccgcta	7440
	tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagaa cttggcggcg aatgggctga	7500
	ccgcttctc gtgttttacg gtatcgccgc tcccattcg cagcgcatcg ctttctatcg	7560
	ccttcttgac gatttttct gagcgggact ctggggttcg aaatgaccga ccaagcgacg	7620
	cccaacctgc catcacaga tttcgattcc accgcgcct tctatgaaag gttgggcttc	7680
	ggaatcgttt tccgggacgc cggtggatg atcctccagc gcggggatct catgctggag	7740
	ttcttcgccc accctagggg gaggctaact gaaacacgga aggagacaat accggaagga	7800
	acccgcgcta tgacggcaat aaaaagacag aataaacgc acggtgttg gtcgtttgtt	7860
	cataaacgcg gggttcggtc ccagggtgg cactctgtcg atacccacc gagaccccat	7920

	tggggccaat acgcccgcgt ttcttccttt tccccacccc acccccacag ttcgggtgaa	7980
	ggcccagggc tcgcagccaa cgtcggggcg gcaggccctg ccatagcctc aggttactca	8040
	tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc	8100
	ctgacagagg tccatgcaca tgaagctgta catggaaggc accgtgaaca accaccactt	8160
	caagtgcacc agcgagggcg agggcaagcc ttacgagggc acccagacca tgagaatcaa	8220
	ggtggtgaca ctgtctttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt gagttttcgt	8280
	tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc	8340
	tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgt accagcgtg gtttgtttgc	8400
	cggatcaaga getaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac	8460
	caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac	8520
	cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt	8580
[0156]	cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct	8640
	gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat	8700
	acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt	8760
	atccggtgag cggcagggtc ggaacaggag agcgacagag ggagcttcca gggggaaacg	8820
	cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt	8880
	gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt	8940
	tcctggcctt ttgctggcct tttgttcaca tgttttttc tgcgttatcc cctgattctg	9000
	tggataaccg tattaccgcc	9020

<210> 54

<211> 4307

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 54

[0157]

atgggcgccc gggccagcgt gctgagcggc ggcgagctgg accggtggga gaagatccgg	60
ctgcggcccg gcggcaagaa gaagtacaag ctgaagcaca tcgtgtgggc cagccgggag	120
ctggagcggg tcgccgtgaa ccccgccctg ctggagacca gcgagggtg ccggcagatc	180
ctgggccagc tgcagcccag cctgcagacc ggcagcagg agctgcggag cctgtacaac	240
accgtggcca cctgtactg cgtgcaccag cggatcgaga tcaaggacac caaggaggcc	300
ctggacaaga tcgaggagga gcagaacaag agcaagaaga aggccagca ggccgccgcc	360
gacaccggcc acagcaacca ggtgagccag aactaccca tcgtgcagaa catccagggc	420
cagatggtgc accaggccat cagccccgg accctgaacg cctgggtgaa ggtggtggag	480
gagaaggcct tcagccccga ggtgatcccc atgttcagcg ccctgagcga gggcgccacc	540
ccccaggacc tgaacaccat gctgaacacc gtggcgggcc accaggccgc catgcagatg	600
ctgaaggaga ccatcaacga ggaggccgcc gagtgggacc gggcgcaccc cgtgcacgcc	660
ggcccatcg ccccgccca gatgcgggag ccccgggca gcgacatcg cggcaccacc	720
agcacctgc aggagcagat cggctggatg acccacaacc ccccatccc cgtgggcgag	780
atctacaagc ggtggatcat cctgggcctg aacaagatcg tcggatgta cagccccacc	840
agcatcctgg acatccgca gggccccaag gagcccttc gggactacgt ggaccggttc	900
tacaagacc tcggggccga gcaggccagc caggaggtga agaactggat gaccgagacc	960
ctgctggtgc agaacgcaa ccccgactgc aagaccatcc tgaaggcct gggccccggc	1020
gccaccctgg aggagatgat gaccgcctgc caggcgctgg gcggccccgg ccacaaggcc	1080
cgggtgctgg ccgaggccat gagccaggtg accaaccgcc ccaccatcat gatccagaag	1140
ggcaacttc ggaaccagcg gaagaccgtg aagtgttca actgcggcaa ggagggccac	1200

[0158]

atcgccaaga actgccgggc cccccgaaa aagggtgtt ggaaatgttg aaaggaagga	1260
caccaaataa aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaagat ctggccttcc	1320
cacaaggga ggcaggga tttcttcag agcagaccag agccaacagc cccaccagaa	1380
gagagcttca ggtttgggga agagacaaca actccctctc agaagcagga gccgatagac	1440
aaggaactgt atccttttagc ttccctcaga tcaacttttg gcagcgaccc ctgctcaca	1500
taaagatagg cgccagctg aaggaggccc tgctggacac cggcgccgac gacaccgtgc	1560
tggaggagat gaacctgccc ggccggtgga agcccaagat gatcggcggc atcggcggt	1620
tcataaaggt gcggcagtac gaccagatcc tgatcgagat ctgcggccac aaggccatcg	1680
gcaccgtgct ggtgggcccc acccccgta acatcatcgg ccggaacctg ctgaccaga	1740
tcggctgcac cctgaacttc cccatcagcc ccatcgagac cgtgcccgtg aagctgaagc	1800
ccggcatgga cgccccaaag gtgaagcagt ggcccctgac cgaggagaag atcaaggccc	1860
tggtggagat ctgcaccgag atggagaagg agggcaagat cagcaagatc ggccccgaga	1920
accctacaa ccccccgctg ttcccatca agaagaagga cagcaccaag tggcggaagc	1980
tggtggactt ccgggagctg aacaagcgga cccaggactt ctgggaggtg cagctgggca	2040
tccccaccc cgccggcctg aagcagaaga agagcgtgac cgtgctggac gtggcgacg	2100
cctacttcag cgtgcccctg gacaaggact tccggaagta caccgccttc accatcccca	2160
gcatcaacaa cgagaccccc ggcacccgtt accagtacaa cgtgctgccc cagggtgga	2220
agggcagccc cgccatcttc cagtgcagca tgaccaagat cctggagccc ttccggaagc	2280
agaacccga catcgtgatc taccagtaca tggacgacct gtacgtgggc agcgacctgg	2340
agatcggcca gcaccggacc aagatcgagg agctgcggca gcacctgctg cgggtgggct	2400
tcaccacccc cgacaagaag caccagaagg agccccctt cctgtggatg ggctacgagc	2460
tgcacccga caagtggacc gtgcagccca tcgtgctgcc cgagaaggac agctggaccg	2520

	tgaacgacat ccagaagctg gtgggcaagc tgaactgggc cagccagatc tacgccggca	2580
	tcaaggtgcg gcagctgtgc aagctgctgc ggggcaccaa ggccctgacc gaggtggtgc	2640
	ccctgaccga ggaggccgag ctggagctgg ccgagaaccg ggagatcctg aaggagcccc	2700
	tgcacggcgt gtactacgac cccagcaagg acctgatcgc cgagatccag aagcagggcc	2760
	agggccagtg gacctaccag atctaccagg agcccttcaa gaacctgaag accggcaagt	2820
	acgcccggat gaaggcgcc cacaccaacg acgtgaagca gctgaccgag gccgtgcaga	2880
	agatgccac cgagagcatc gtgatctggg gcaagacccc caagttcaag ctgcccattc	2940
	agaaggagac ctgggaggcc tgggtggacc agtactggca ggccacctgg atccccagt	3000
	gggagtctgt gaacaccccc cccctggtga agctgtggtt ccagctggag aaggagcccc	3060
	tcacggcgc cgagacctc tacgtggacg gcgcccga cggggagacc aagctgggca	3120
	aggccggcta cgtgaccgac cggggccggc agaaggtggt gcccctgacc gacaccacca	3180
[0159]	accagaagac cgagctgcag gccatccacc tggccctgca ggacagcggc ctggaggtga	3240
	acatcgtgac cgacagccag tacgccctgg gcatcatcca ggcccagccc gacaagagcg	3300
	agagcgagct ggtgagccag atcatcgagc agctgatcaa gaaggagaag gtgtacctgg	3360
	cctgggtgcc cggccacaag ggcatcggcg gcaacgagca ggtggacaag ctggtgagcg	3420
	ccggcatccg gaaggtgctg ttcctggacg gcatcgaaa ggcccaggag gagcacgaga	3480
	agtaccacag caactggcgg gccatggcca gcgacttcaa cctgcccccc gtggtggcca	3540
	aggagatcgt ggccagctgc gacaagtgcc agctgaaggc cgaggccatg cacggccagg	3600
	tggactgcag ccccggcatc tggcagctgg tgtgcacca cctggagggc aaggtgatcc	3660
	tgggtggcgt gcacgtggcc agcggtaca tcgaggccga ggtgatcccc gccgagaccg	3720
	gccaggagac gcctacttc ctgctgaagc tggccggccg gtggcccggtg aagaccgtgc	3780
	acaccgaaa cggcagcaac ttcaccagca ccaccgtgaa ggccgcctgc tgggtggccg	3840

gcatcaagca ggagttcggc atcccctaca acccccagag ccaggcgctg atcgagagca	3900
tgaacaagga gctgaagaag atcatcggcc aggtgcggga ccaggccgag cacctgaaga	3960
ccgccgtgca gatggccgtg ttcattccaca acttcaagcg gaaggcgggc atcggcggct	4020
acagcgccgg cgagcggatc gtggacatca tcgccaccga catccagacc aaggagctgc	4080
agaagcagat caccaagatc cagaacttcc ggggtgtacta ccgggacagc cgggaccccg	4140
tgtggaaggg ccccgccaag ctgctgtgga agggcgaggg cgccgtggtg atccaggaca	4200
acagcgacat caaggtggtg ccccgcgga aggccaagat catccgggac tacggcaagc	4260
agatggccgg cgacgactgc gtggccagcc ggcaggacga ggactga	4307

<210> 55

<211> 8549

<212> DNA

<213> 人工序列

[0160]

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 55

ggatccccctg agggggcccc catgggctag aggatccggc ctcgccctct gcataaataa	60
aaaaaattag tcagccatga gcttggccca ttgcatacgt tgtatccata tcataaatg	120
tacatttata ttggctcatg tccaacatta ccgcatgtt gacattgatt attgactagt	180
tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt	240
acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg cccattgacg	300
tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg	360
gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt	420
acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tgggccgcct ggcattatgc ccagtacatg	480
accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcacgc tattaccatg	540

	gtgatgcggt ttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt	600
	ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac	660
	tttccaaaat gtctgaacaa ctccgcccc ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg	720
	tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgctg gagacgcat	780
	ccacgtgtt ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccc ctgaagctt	840
	acatgtggta ccgagctcgg atcctgagaa cttcagggtg agtctatggg acccttgatg	900
	ttttctttcc ctttcttttc tatggttaag ttcatgtcat aggaagggga gaagtaacag	960
	ggtacacata ttgaccaa at cagggttaatt ttgcatttgt aattttaaaa aatgctttct	1020
	tcttttaata tacttttttg tttatcttat ttctaatact ttccctaata tctttctttc	1080
	agggaataa tgatacaatg tatcatgcct ctttgcacca ttctaaagaa taacagtgat	1140
	aatttctggg ttaaggcaat agcaatattt ctgcatataa atatttctgc atataaattg	1200
[0161]	taactgatgt aagaggtttc atattgctaa tagcagctac aatccagcta ccattctgct	1260
	tttattttat ggttgggata aggtcggatt attctgagtc caagctaggc ctttttgcta	1320
	atcatgttca tacctcttat cttctccca cagctcctgg gcaacgtgct ggtctgtgtg	1380
	ctggcccatc actttggcaa agcacgtgag atctgaattc gagatctgcc gccgccatgg	1440
	gcgcccgggc cagcgtgctg agcggcggcg agctggaccg gtgggagaag atccggctgc	1500
	ggcccggcgg caagaagaag tacaagctga agcacatcgt gtgggccagc cgggagctgg	1560
	agcggttcgc cgtgaacccc ggctgtctgg agaccagca gggctgccgg cagatcctgg	1620
	gccagctgca gccagcctg cagaccggca gcgaggagct gcggagcctg tacaacaccg	1680
	tggccaccct gtactgcgtg caccagcgga tcgagatcaa ggacaccaag gaggccttg	1740
	acaagatcga ggaggagcag aacaagagca agaagaaggc ccagcaggcc gccgccgaca	1800
	ccggccacag caaccagtg agccagaact acccatcgt gcagaacatc cagggccaga	1860

	tggtgcacca ggccatcagc ccccggaacc tgaacgcctg ggtgaaggtg gtggaggaga	1920
	aggccttcag ccccgaggtg atccccatgt tcagcgcctt gagcgagggc gccaccccc	1980
	aggacctgaa caccatgctg aacaccgtgg gcggccacca ggccgcatg cagatgctga	2040
	aggagaccat caacgaggag gccgcccagt gggaccgggt gcacccctg cacgccggc	2100
	ccatgcctcc cgccagatg cgggagcccc ggggcagcga catgccggc accaccagca	2160
	ccctgcagga gcagatcggc tggatgacct acaaccccc catccccctg ggcgagatct	2220
	acaagcgtg gatcatcctg ggctgaaca agatcgtgcg gatgtacagc cccaccagca	2280
	tcctggacat ccggcagggc cccaaggagc ccttcggga ctacgtggac cggttctaca	2340
	agaccctgcg ggccgagcag gccagccagg aggtgaagaa ctggatgacc gagaccctgc	2400
	tggtgcagaa cgccaacccc gactgcaaga ccatcctgaa ggccctgggc cccggcgcca	2460
	ccctggagga gatgatgacc gcctgccagg gcgtgggcgg ccccgccac aaggcccggg	2520
[0162]	tgctggccga ggccatgagc caggtagca accccgccac catcatgac cagaaggga	2580
	acttcggaa ccagcggaag accgtgaagt gcttcaactg cggcaaggag ggccacatcg	2640
	ccaagaactg ccgggcccc cggaaaaagg gctgttgaa atgtggaag gaaggacacc	2700
	aaatgaaaga ttgtactgag agacaggcta attttttagg gaagatctgg ccttccaca	2760
	agggaaggcc aggaatttt cttcagagca gaccagagcc aacagcccca ccagaagaga	2820
	gcttcagggt tggggaagag acaacaactc cctctcagaa gcaggagccg atagacaagg	2880
	aactgtatcc tttagcttcc ctcatcac tctttgcag cagccctcg tcacaataaa	2940
	gataggcggc cagctgaagg aggcctgct ggacaccggc gccagcaca ccgtgctgga	3000
	ggagatgaac ctgcccggc ggtggaagcc caagatgatc ggcgcatcg gcggttcat	3060
	caagtgccg cagtacgacc agatcctgat cgagatctgc ggccacaagg ccatcgccac	3120
	cgtgctggtg ggccccacc ccgtgaacat catcgccgg aacctgctga cccagatcgg	3180

	ctgcaccctg aacttcccca tcagcccat cgagaccgtg cccgtgaagc tgaagcccgg	3240
	catggacggc cccaaggtga agcagtggcc cctgaccgag gagaagatca aggccctggt	3300
	ggagatctgc accgagatgg agaaggagg caagatcagc aagatcggcc ccgagaaccc	3360
	ctacaacacc cccgtgttcg ccatcaagaa gaaggacagc accaagtggc ggaagctggt	3420
	ggacttccgg gagctgaaca agcggaccca ggacttctgg gaggtgcagc tgggcatccc	3480
	ccaccccgcc ggccctgaagc agaagaagag cgtgaccgtg ctggacgtgg gcgacgccta	3540
	cttcagcgtg cccctggaca aggacttccg gaagtacacc gccttcacca tccccagcat	3600
	caacaacgag acccccggca tccggtacca gtacaacgtg ctgccccagg gctggaaggg	3660
	cagccccgcc atcttccagt gcagcatgac caagatcctg gagcccttcc ggaagcagaa	3720
	ccccgacatc gtgatctacc agtacatgga cgacctgtac gtgggcagcg acctggagat	3780
	cggccagcac cggaccaaga tcgaggagct gcggcagcac ctgctgcggt ggggcttcac	3840
[0163]	cacccccgac aagaagcacc agaaggagcc ccccttctg tggaatgggct acgagctgca	3900
	ccccgacaag tggaccgtgc agcccatcgt gctgcccag aaggacagct ggaccgtgaa	3960
	cgacatccag aagctggtgg gcaagctgaa ctgggccagc cagatctacg ccggcatcaa	4020
	ggtgcggcag ctgtgcaagc tgctgcgggg caccaaggcc ctgaccgagg tgggtcccct	4080
	gaccgaggag gccgagctgg agctggccga gaaccgggag atcctgaagg agcccgtgca	4140
	cggcgtgtac tacgaccca gcaaggacct gatcgccgag atccagaagc agggccaggg	4200
	ccagtggacc taccagatct accaggagcc cttcaagaac ctgaagaccg gcaagtacgc	4260
	ccgatgaag ggcgcccaca ccaacgacgt gaagcagctg accgaggccg tgcagaagat	4320
	cgccaccgag agcatcgtga tctggggcaa gaccccaag ttcaagctgc ccatccagaa	4380
	ggagacctgg gaggcctggt ggaccgagta ctggcaggcc acctggatcc ccgagtggga	4440
	gttcgtgaac accccccccc tggatgaagct gtggtaccag ctggagaagg agcccatcat	4500

	cggcgccgag accttctacg tggacggcgc cgccaaccgg gagaccaagc tgggcaaggc	4560
	cggctacgtg accgaccggg gccggcagaa ggtggtgccc ctgaccgaca ccaccaacca	4620
	gaagaccgag ctgcaggcca tccacctggc cctgcaggac agcggcctgg aggtgaacat	4680
	cgtgaccgac agccagtacg ccctgggcat catccaggcc cagcccgaca agagcgagag	4740
	cgagctggtg agccagatca tcgagcagct gatcaagaag gagaaggtgt acctggcctg	4800
	ggtgccccgc cacaagggca tcggcggcaa cgagcaggtg gacaagctgg tgagcgccgg	4860
	catccggaag gtgtgtttcc tggacggcat cgacaaggcc caggaggagc acgagaagta	4920
	ccacagcaac tggcgggcca tggccagcga cttcaacctg cccccgtgg tggccaagga	4980
	gatcgtggcc agctgcgaca agtgccagct gaagggcgag gccatgcacg gccaggtgga	5040
	ctgcagcccc ggcatctggc agctggtgtg caccacactg gagggcaagg tgatcctggt	5100
	ggccgtgcac gtggccagcg gctacatcga ggccgaggtg atccccgccg agaccggcca	5160
[0164]	ggagaccgcc tacttcctgc tgaagctggc cggccggtgg cccgtgaaga ccgtgcacac	5220
	cgacaacggc agcaacttca ccagcaccac cgtgaaggcc gcctgctggt gggccggcat	5280
	caagcaggag ttcggcatcc cctacaacct ccagagccag ggcgtgatcg agagcatgaa	5340
	caaggagctg aagaagatca tcggccaggt gcgggaccag gccgagcacc tgaagaccgc	5400
	cgtgcagatg gccgtgttca tccacaactt caagcggaag ggcggcatcg gcggctacag	5460
	cgccggcgag cggatcgtgg acatcatcgc caccgacatc cagaccaagg agctgcagaa	5520
	gcagatcacc aagatccaga acttccgggt gtactaccgg gacagccggg acccctgtg	5580
	gaagggcccc gccaaactgc tgtggaaggc cgagggcgcc gtggtgatcc aggacaacag	5640
	cgacatcaag gtggtgcccc ggcggaaggc caagatcatc cgggactacg gcaagcagat	5700
	ggccggcgac gactgcgtgg ccagccggca ggacgaggac tgacacatgg aattaccccc	5760
	accagtgcag gctgcctatc agaaagtgtt ggctggtgtg gctaattgcc tgccccacaa	5820

	gtatcactaa gctcgttttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttccttaa	5880
	gtccaactac taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgccta	5940
	aaaaaacatt tattttcatt gcaatgatgt atttaaatta tttctgaata ttttactaaa	6000
	aagggaatgt gggaggtcag tgcatttaaa acataaagaa atgaagagct agttcaaacc	6060
	ttgggaaaat acactatata ttaaactcca tgaaagaagg tgaggtgca aacagcta	6120
	gcacattggc aacagcccct gatgcctatg ccttattcat cctcagaaa aggattcaag	6180
	tagaggttg atttggaggt taaagtttg ctatgctgta ttttacatta cttattgtt	6240
	tagctgtcct catgaatgtc ttttcactac ccatttgett atcctgcac tctcagcct	6300
	gactccactc agttctcttg cttagagata ccacctttcc cctgaagtgt tccctccatg	6360
	ttttacggcg agatggtttc tctcgcctg gccactcagc cttagtgtc tctgttgtct	6420
	tatagaggtc tacttgaaga aggaaaaaca gggggcatgg ttgactgtc ctgtgagccc	6480
[0165]	ttcttccctg cctcccccac tcacagtgc ccggaatccc tcgacctga gaccaccttg	6540
	attctcatgg tctgggtgcc ctcgtaaagg ttgccctgc cctcgttgt gcacttgaag	6600
	tggtggttgt tcacgtgcc ttccatgtac agcttcatgt gcatgctga gatggcagtc	6660
	tagcactagt gcggccgcag atctgcttcc tcgctcactg actcgtgcg ctcggtcgtt	6720
	cggctgcggc gagcgtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttata cacagaatca	6780
	ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa	6840
	aaggccgctg tctggcggtt ttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat	6900
	cgacgtcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc	6960
	cctggaaget cctcgtgcg ctctcctgtt ccgacctgc cgttaccgg atacctgtcc	7020
	gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct cagctgtag gtatctcagt	7080
	tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac	7140

	cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaaagaca cgacttatcg	7200
	ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca	7260
	gagttcttga agtgggtggc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggatatctgc	7320
	gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagtttgta gctcttgatc cggcaaacaa	7380
	accaccgctg gtagcgggtgg tttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa	7440
	ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac	7500
	tcacgttaag ggatttttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta	7560
	aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gcttgacagt	7620
	cagaagaact cgtcaagaag gcgatagaag gcgatgcgct gcgaatcggg agcggcgata	7680
	ccgtaaagca cgaggaagcg gtcagcccat tcgccgcaa gttcttcagc aatatcacgg	7740
	gtagccaacg ctatgtcctg atagcgggtcc gccacacca gccggccaca gtcgatgaat	7800
[0166]	ccagaaaagc ggccattttc caccatgata ttccgcaagc aggcatcgcc atgggtcacg	7860
	acgagatcct cgccgtcggg catgctcgcc ttgagcctgg cgaacagttc ggctggcgcg	7920
	agcccctgat gttcttcgtc cagatcatcc tgatcgacaa gaccggcttc catccgagta	7980
	cgtgctcgct cgatgcgatg tttcgcttgg tggtcgaatg ggcaggtagc cggatcaagc	8040
	gtatgcagcc gccgcattgc atcagccatg atggatactt tctcggcagg agcaaggtga	8100
	gatgacagga gatcctgccc cggcacttcg cccaatagca gccagtcctt tcccgttca	8160
	gtgacaacgt cgagcacagc tgcgcaagga acgcccgtcg tggccagcca cgatagccgc	8220
	gctgcctcgt cttgcagttc attcaggga ccggacaggt cggctcttgac aaaaagaacc	8280
	gggcgcccct gcgtgacag ccggaacacg gcggcatcag agcagccgat tgtctgttgt	8340
	gccagtcac agccgaatag cctctccacc caagcggccg gagaacctgc gtgcaatcca	8400
	tcttgttcaa tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt	8460

ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 8520

acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgt 8549

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 共有序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa 为 Val 或 Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

[0167]

<222> (4)..(4)

<223> Xaa 为任何氨基酸

<400> 56

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro

1 5

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> 明脉扁刺蛾 β 四体病毒

<400> 57

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 58
<211> 314
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58

Met Pro Leu Glu Gln Arg Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Leu
1 5 10 15

Glu Ala Arg Gly Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Ala
20 25 30

Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Val Glu Val
35 40 45

[0168] Thr Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Pro Asp Pro Pro Gln Ser
50 55 60

Pro Gln Gly Ala Ser Ser Leu Pro Thr Thr Met Asn Tyr Pro Leu Trp
65 70 75 80

Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Asn Gln Glu Glu Glu Gly Pro Ser
85 90 95

Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala Leu Ser Arg Lys
100 105 110

Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu
115 120 125

Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Gly Asn Trp Gln
130 135 140

	Tyr Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ser Ser Leu Gln Leu	
	145	150 155 160
	Val Phe Gly Ile Glu Leu Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr	
		165 170 175
	Ile Phe Ala Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp	
		180 185 190
	Asn Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile	
		195 200 205
	Ile Ala Arg Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp Glu Glu	
		210 215 220
[0169]	Leu Ser Val Leu Glu Val Phe Glu Gly Arg Glu Asp Ser Ile Leu Gly	
	225	230 235 240
	Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu	
		245 250 255
	Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu Phe Leu	
		260 265 270
	Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu His	
		275 280 285
	His Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro Pro Leu	
		290 295 300
	His Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu	
	305	310

<210> 59
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 59

Met Gln Ala Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asp
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Pro Asp Gly Pro Gly Gly Asn Ala Gly
 20 25 30

Gly Pro Gly Glu Ala Gly Ala Thr Gly Gly Arg Gly Pro Arg Gly Ala
 35 40 45

[0170] Gly Ala Ala Arg Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Arg Gly Pro
 50 55 60

His Gly Gly Ala Ala Ser Gly Leu Asn Gly Cys Cys Arg Cys Gly Ala
 65 70 75 80

Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe
 85 90 95

Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp
 100 105 110

Ala Pro Pro Leu Pro Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val
 115 120 125

Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg Gln
 130 135 140

Leu Gln Leu Ser Ile Ser Ser Cys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met
145 150 155 160

Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser
165 170 175

Gly Gln Arg Arg
180

<210> 60
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

<400> 60

[0171] taaggccgag tcttatgagc agc

23

<210> 61
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

<400> 61

aggactcggc ttgctgaag

19

<210> 62
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成引物

	<p><400> 62 agcctgtctc tcagtacaat c</p>	21
	<p><210> 63 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 合成引物</p>	
	<p><400> 63 tgtcttatgt ccagaatgct</p>	20
	<p><210> 64 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
[0172]	<p><220> <223> 合成引物</p>	
	<p><400> 64 gcacggcaag aggcgagg</p>	18
	<p><210> 65 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列</p>	
	<p><220> <223> 合成引物</p>	
	<p><400> 65 gccggatgtc caggatgctg</p>	20
	<p><210> 66 <211> 9 <212> PRT <213> 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒</p>	

<400> 66

Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Met
1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 67

[0173]

Ser Pro Ser Tyr Val Tyr His Gln Phe
1 5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 68

Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu
1 5

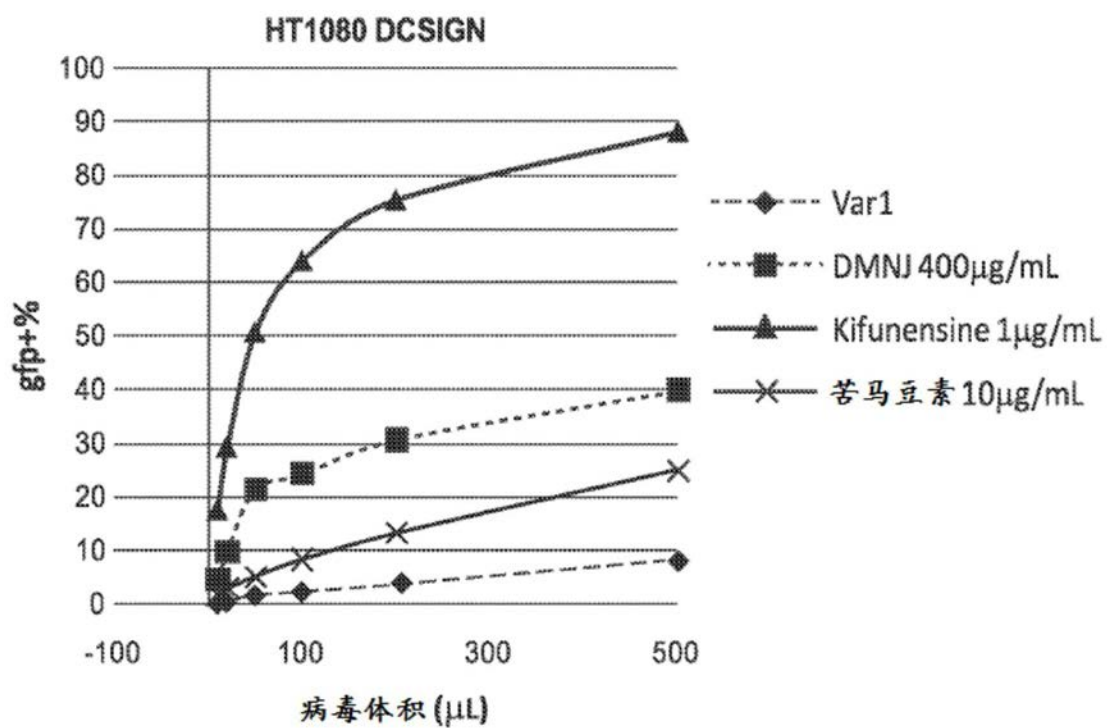


图1A

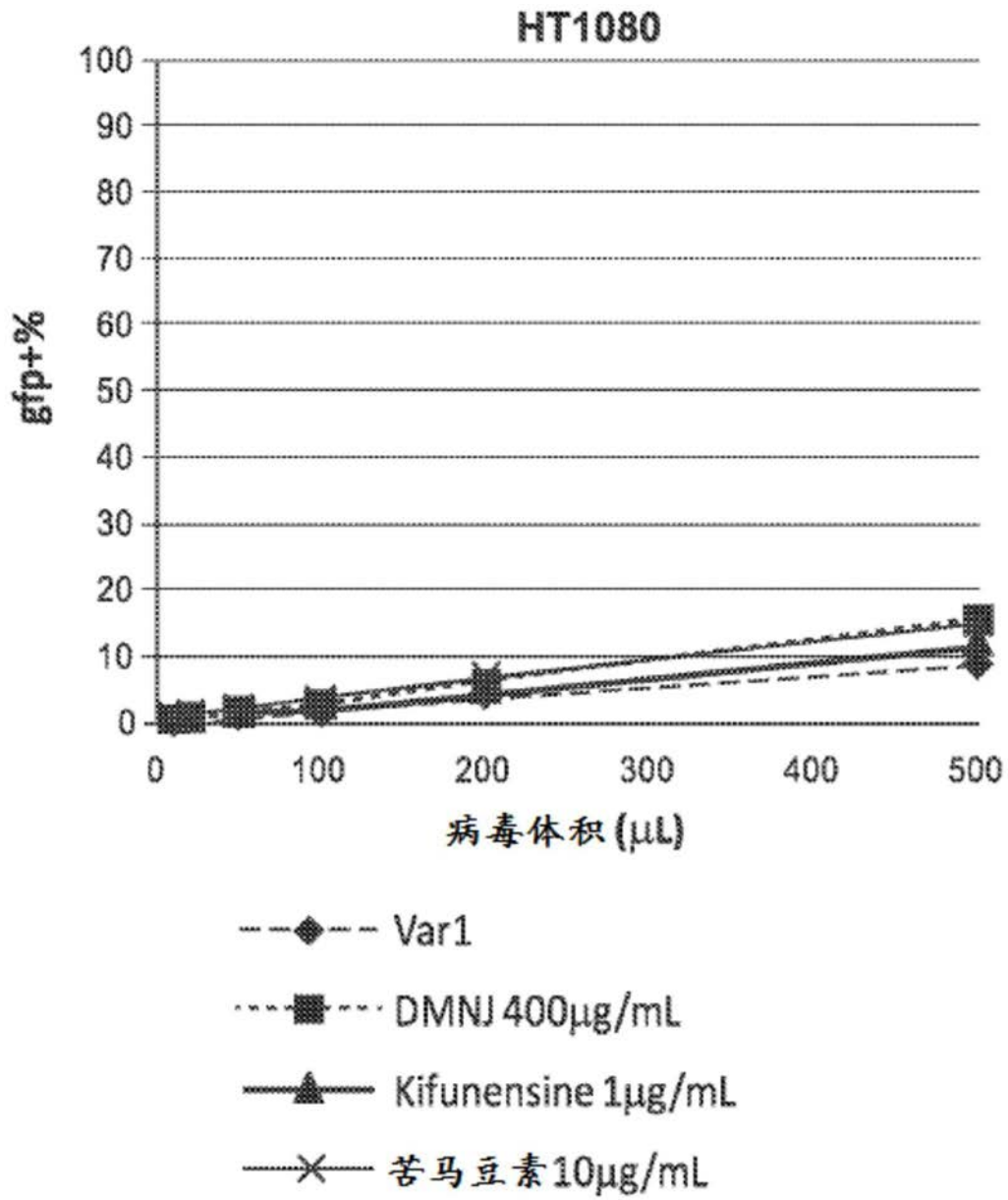


图1B

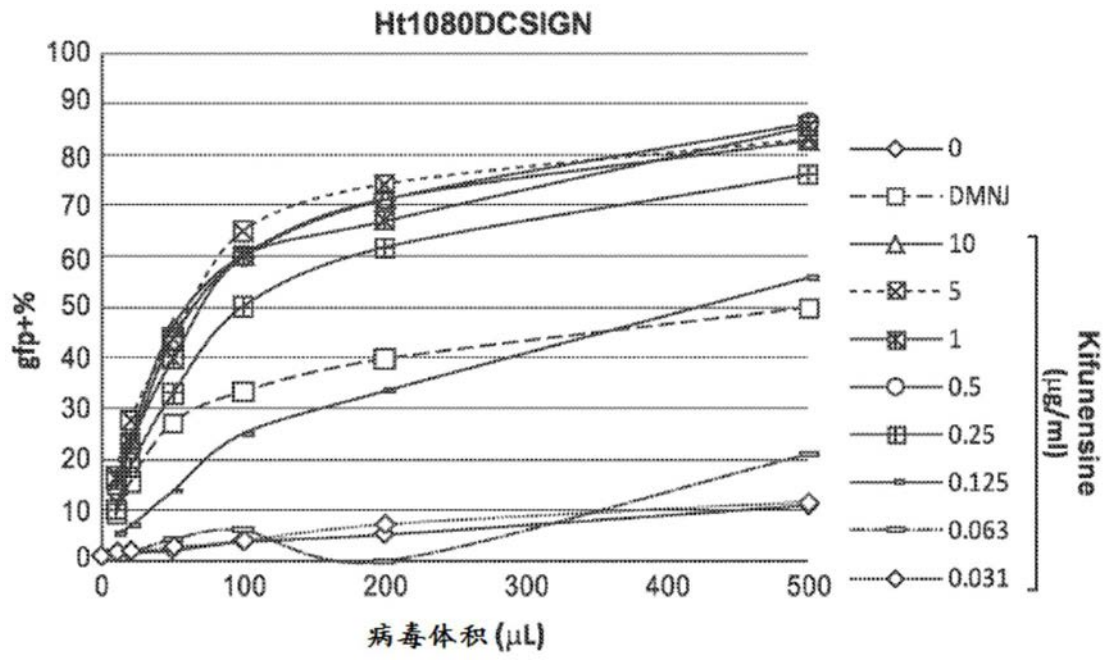


图2A

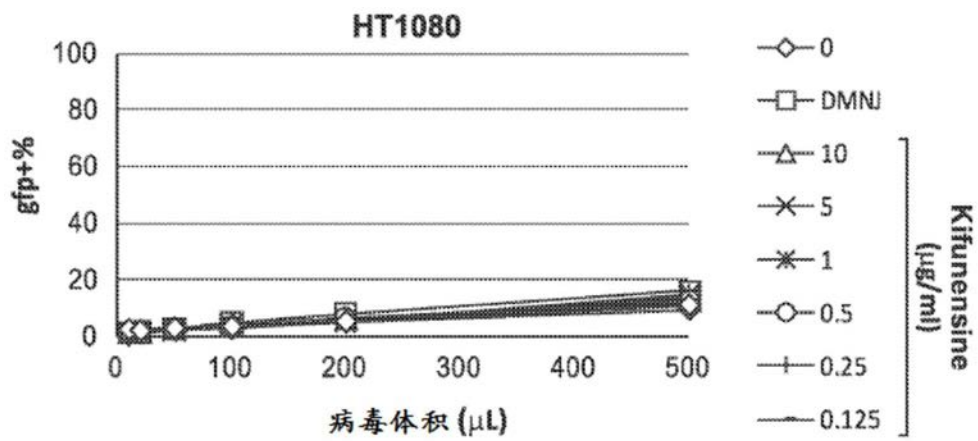


图2B

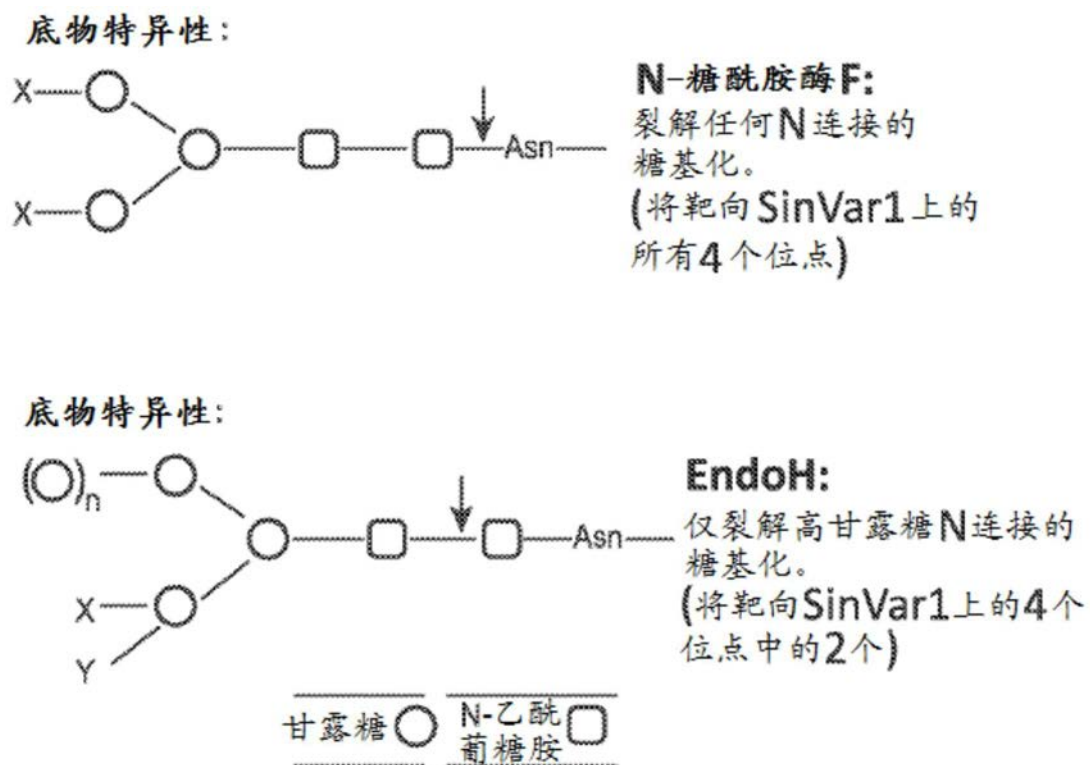


图3A

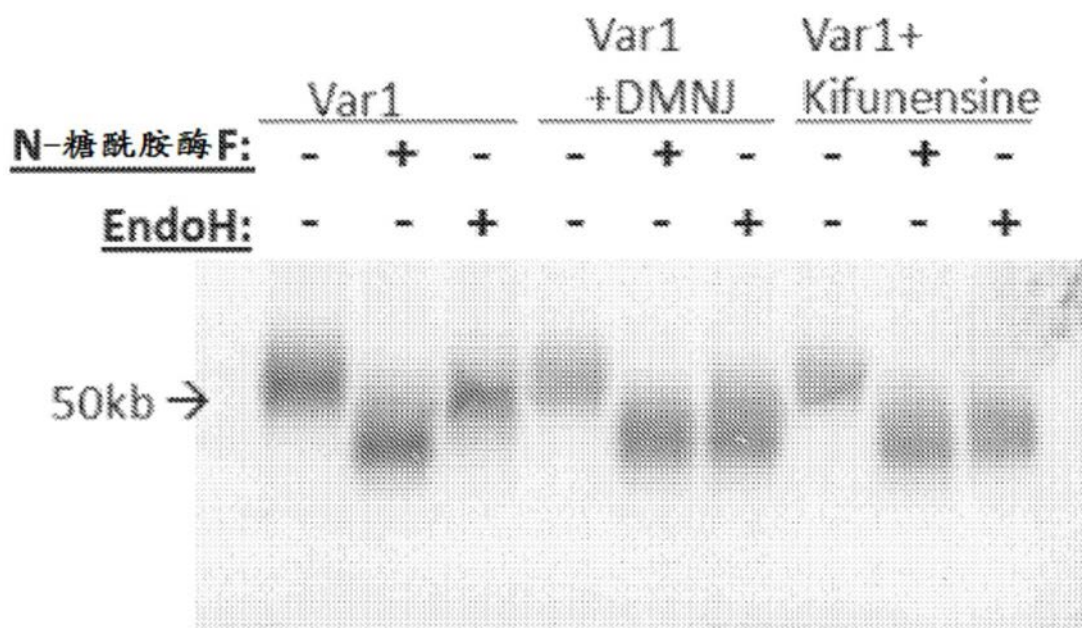


图3B

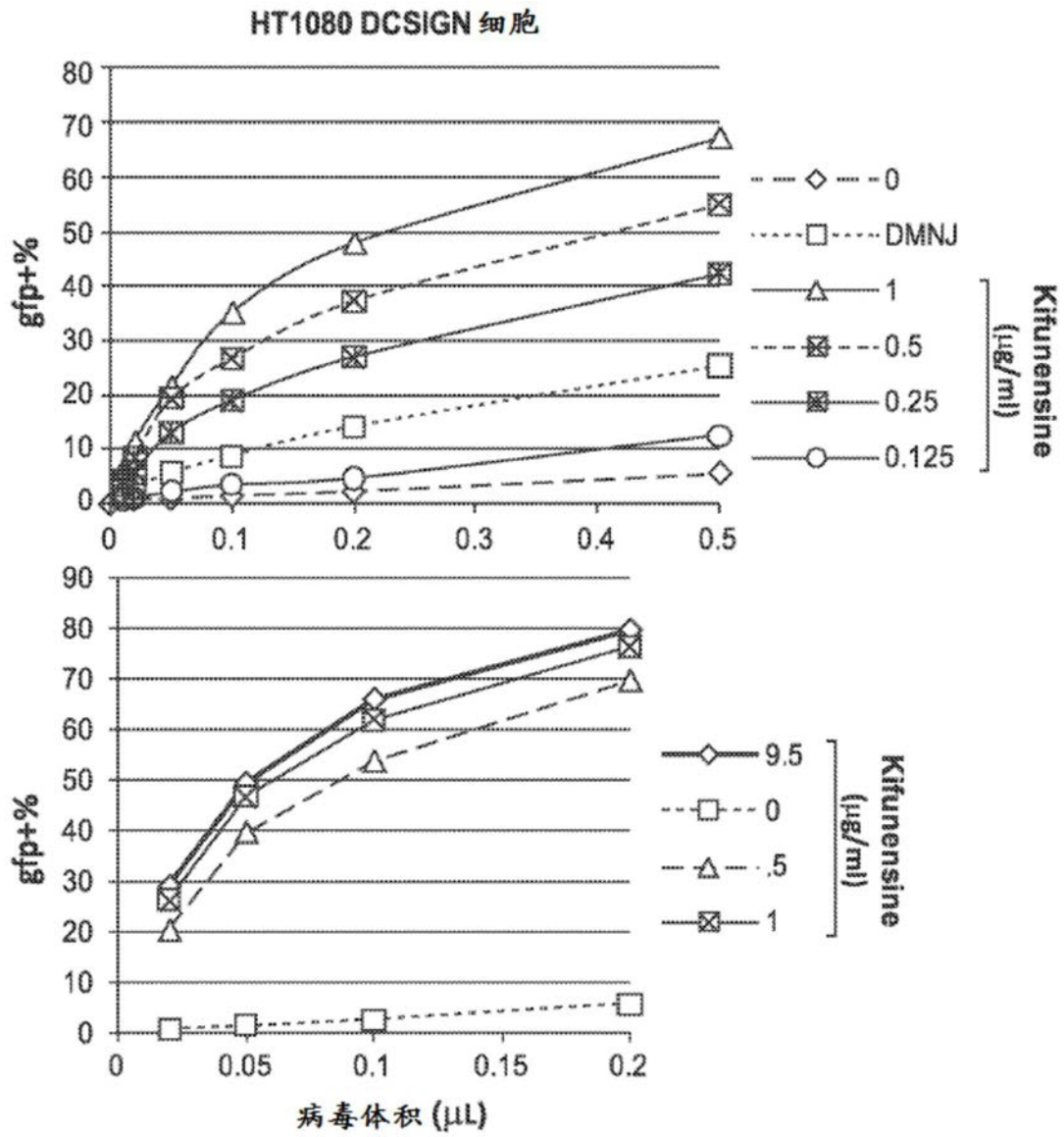


图4A

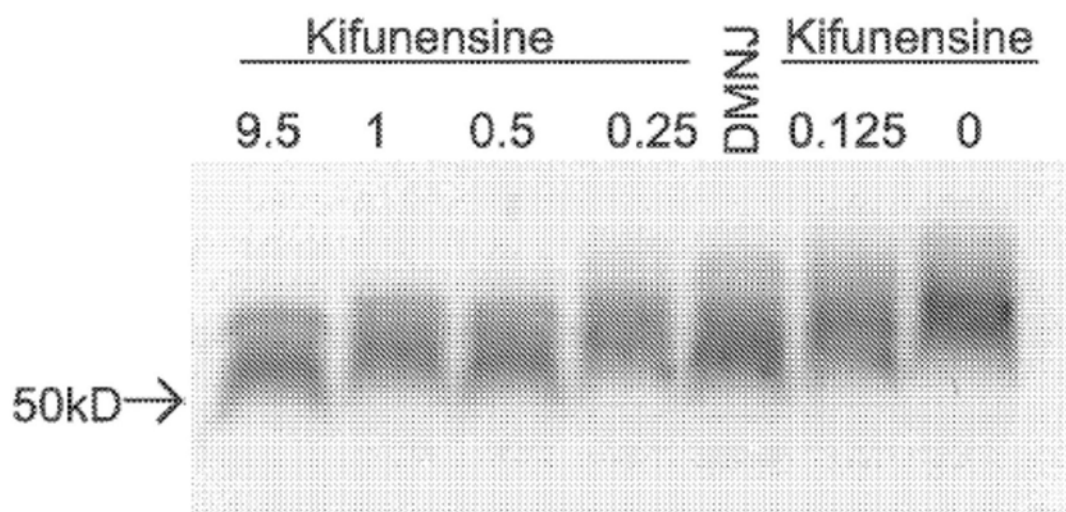


图4B



图5A

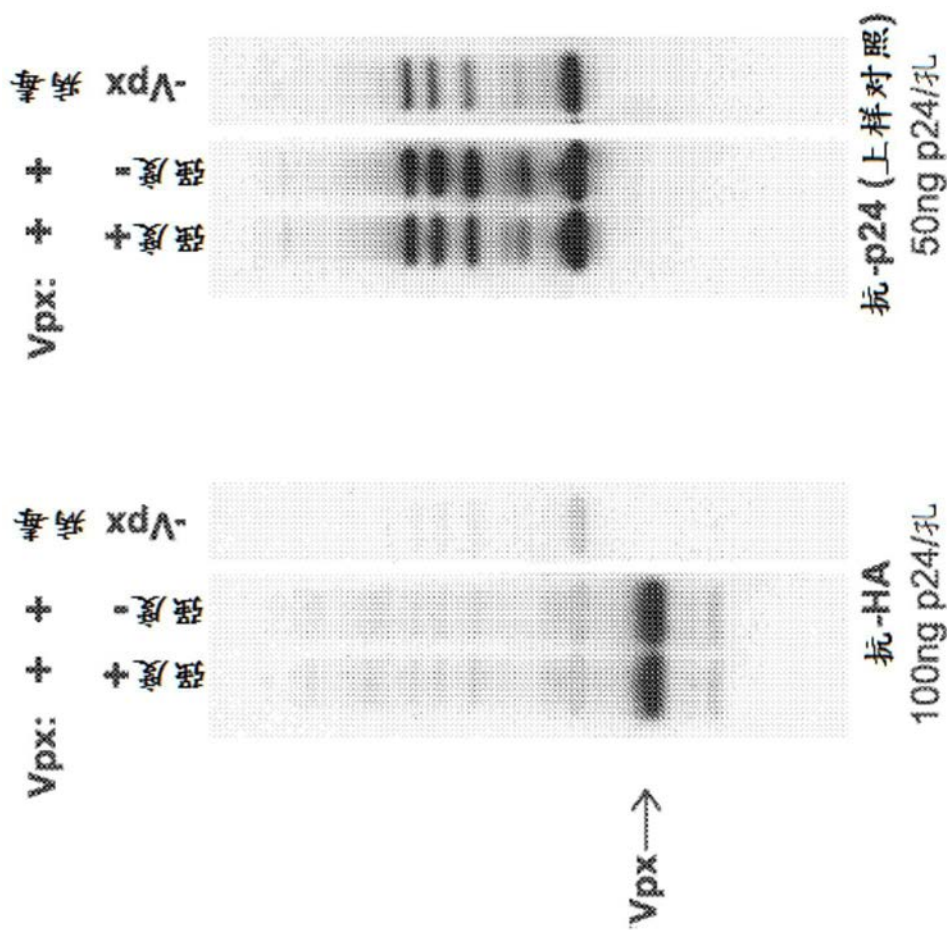


图5B

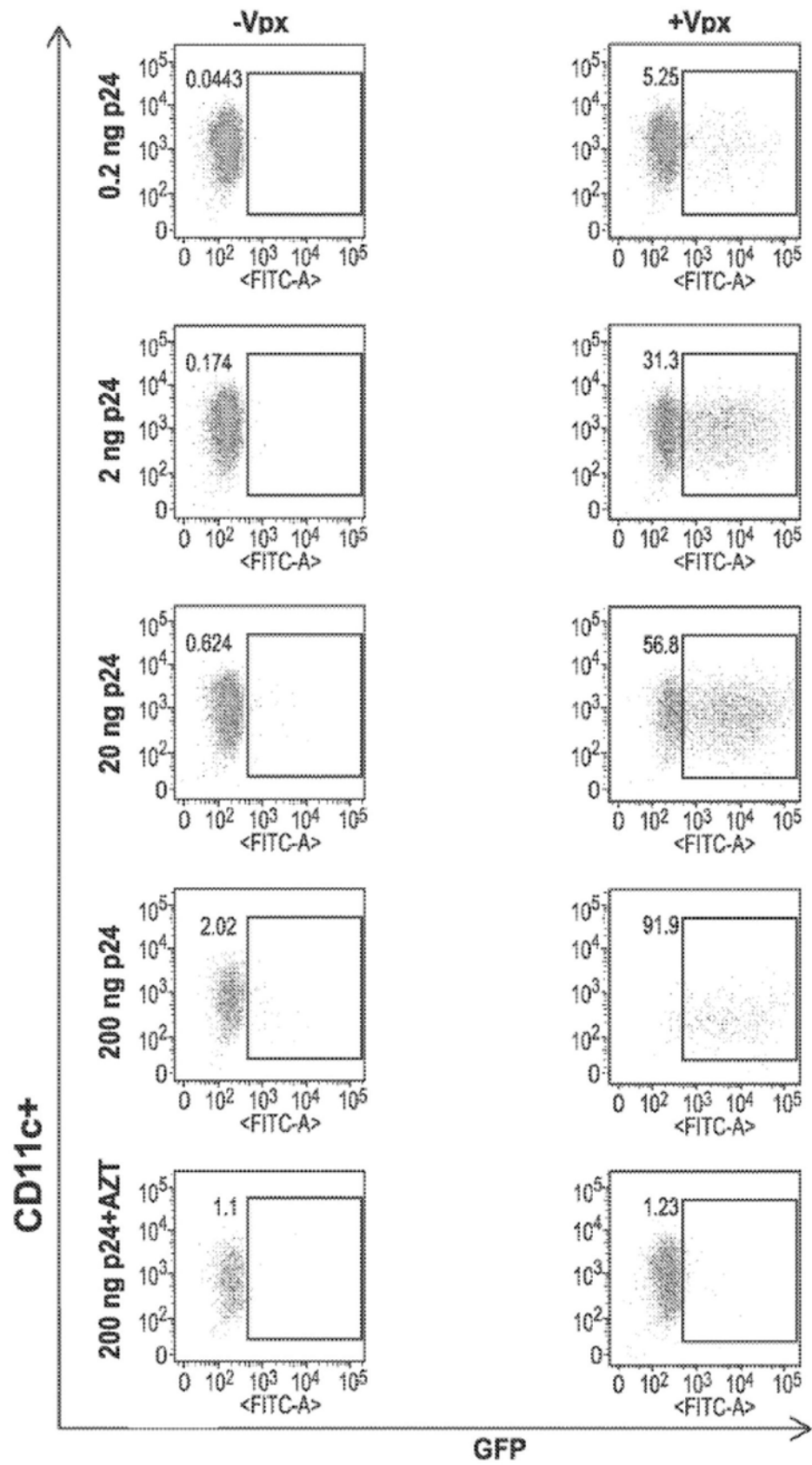


图6

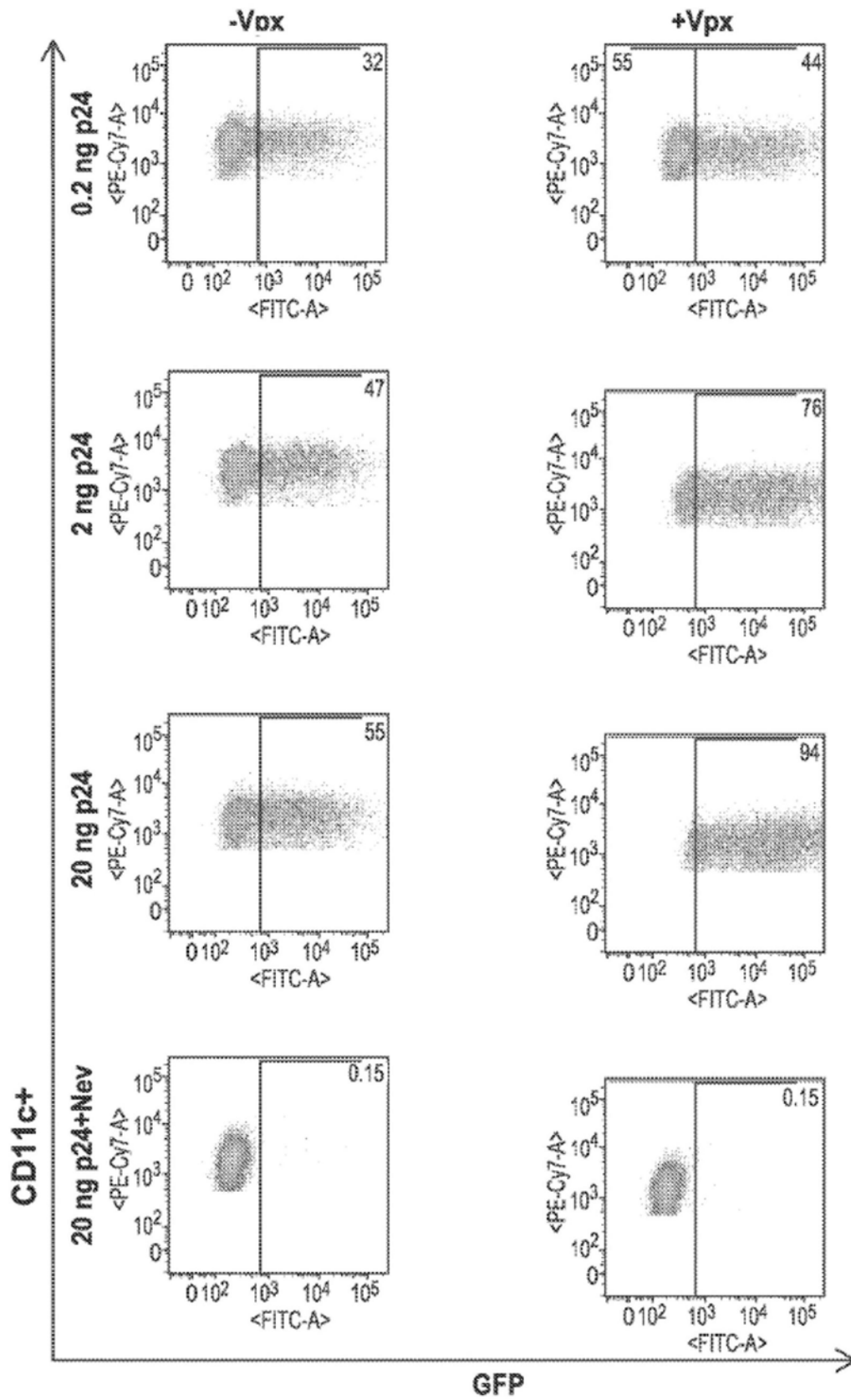


图7

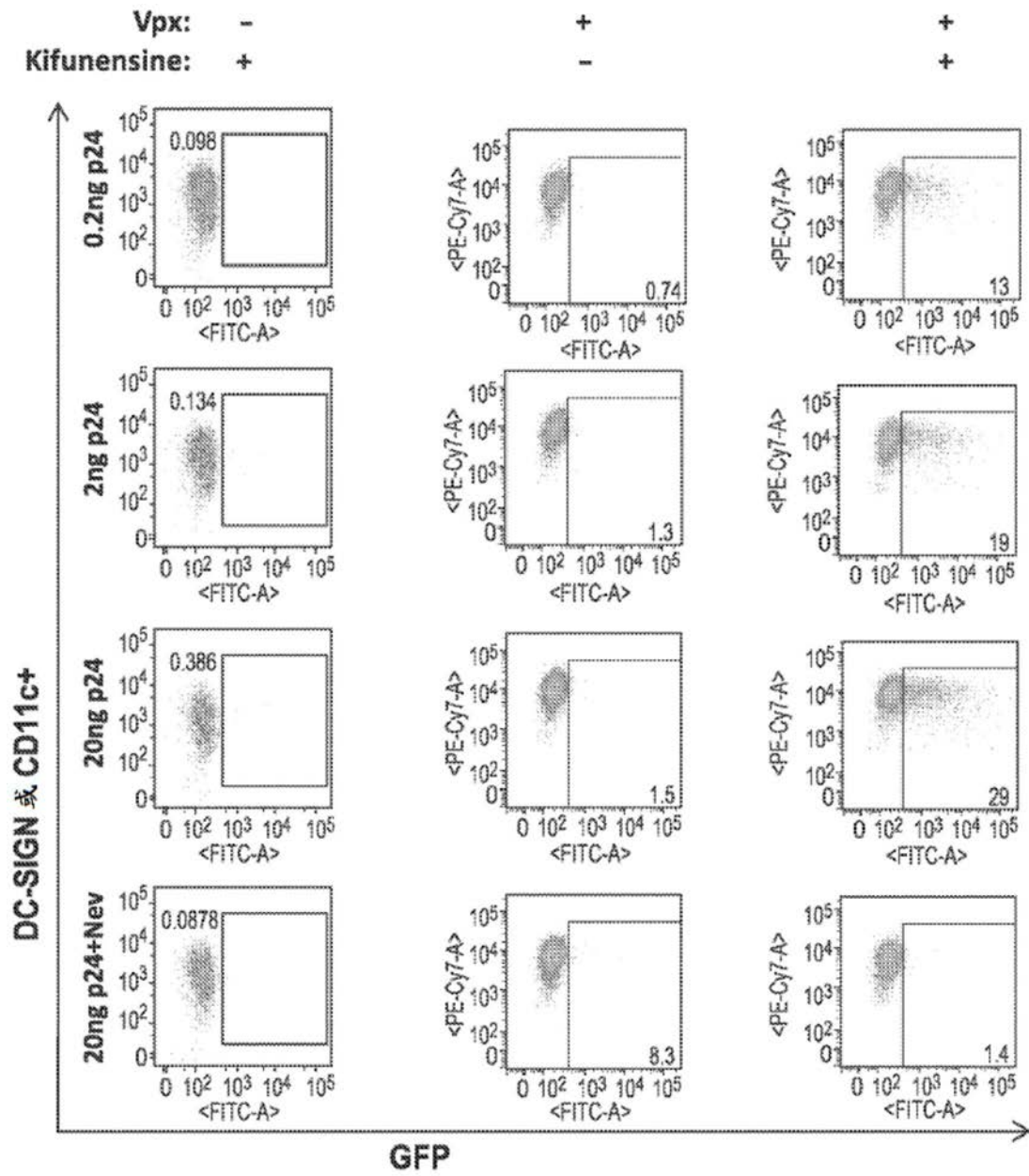


图8

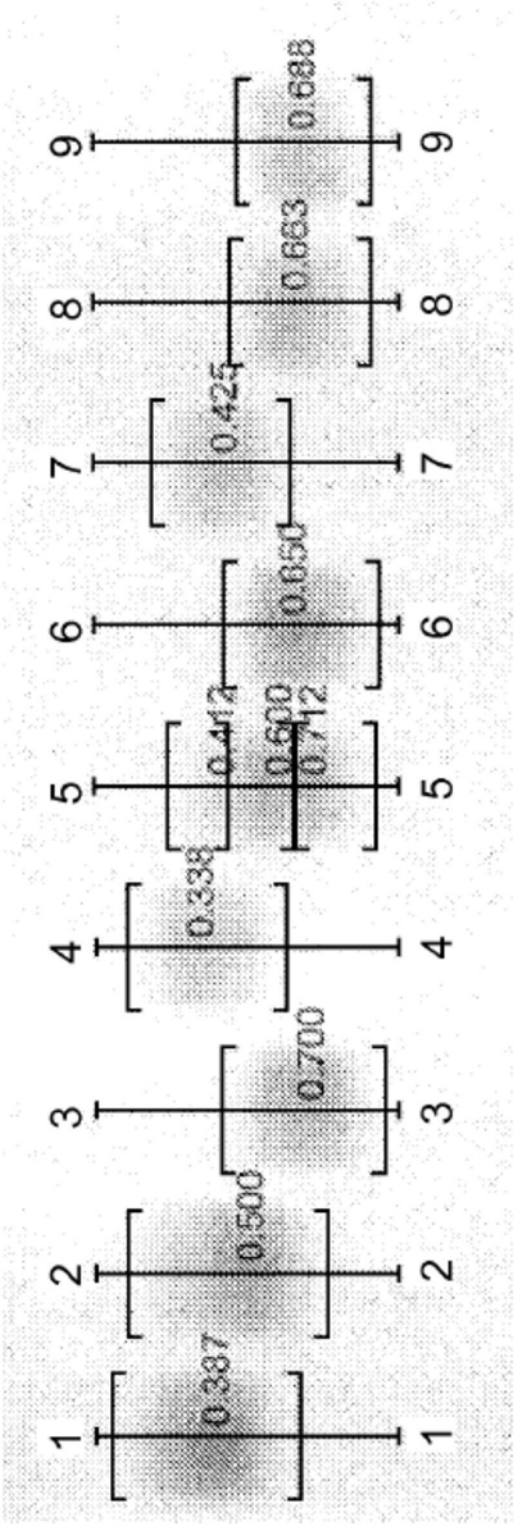


图9A

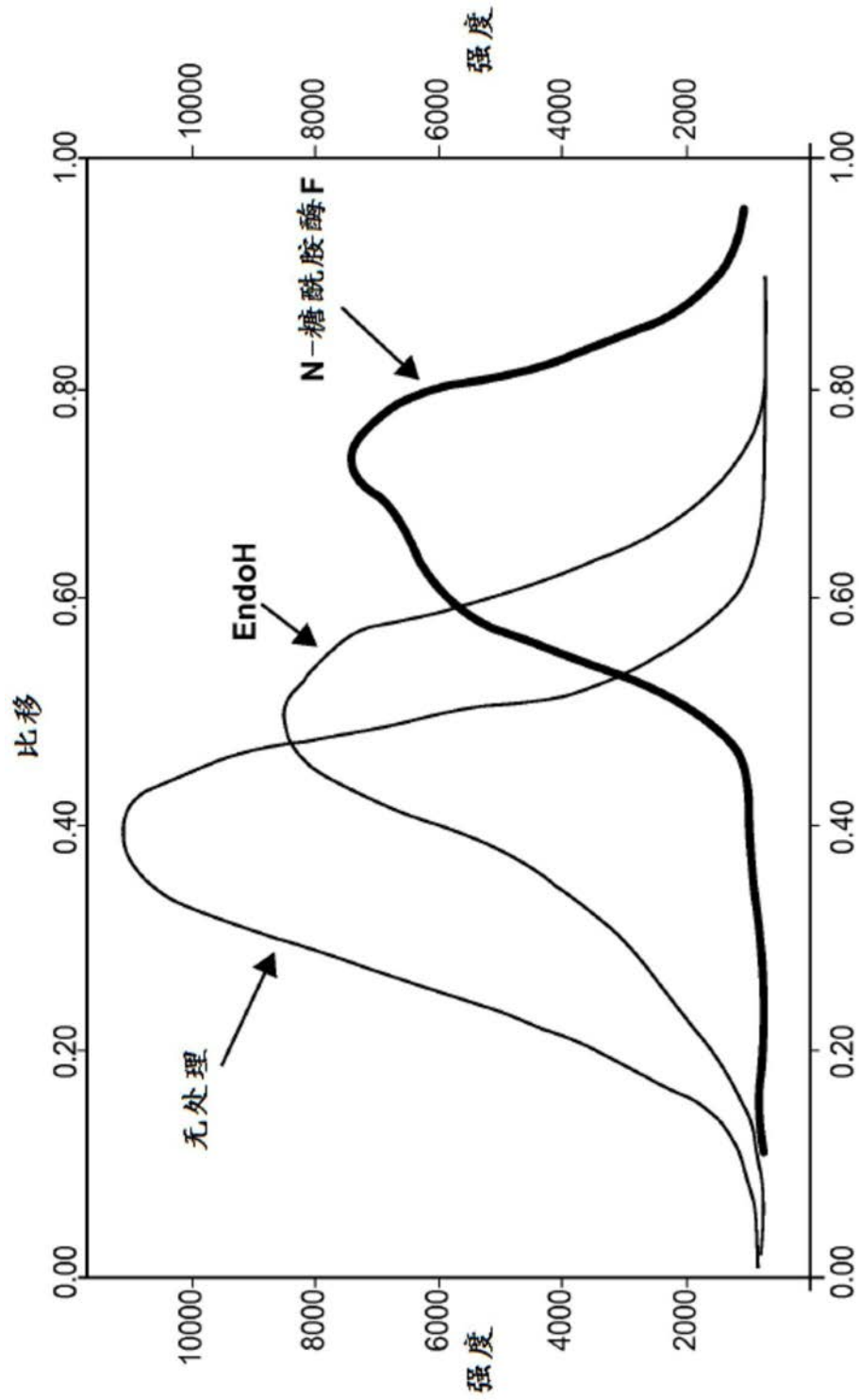


图9B

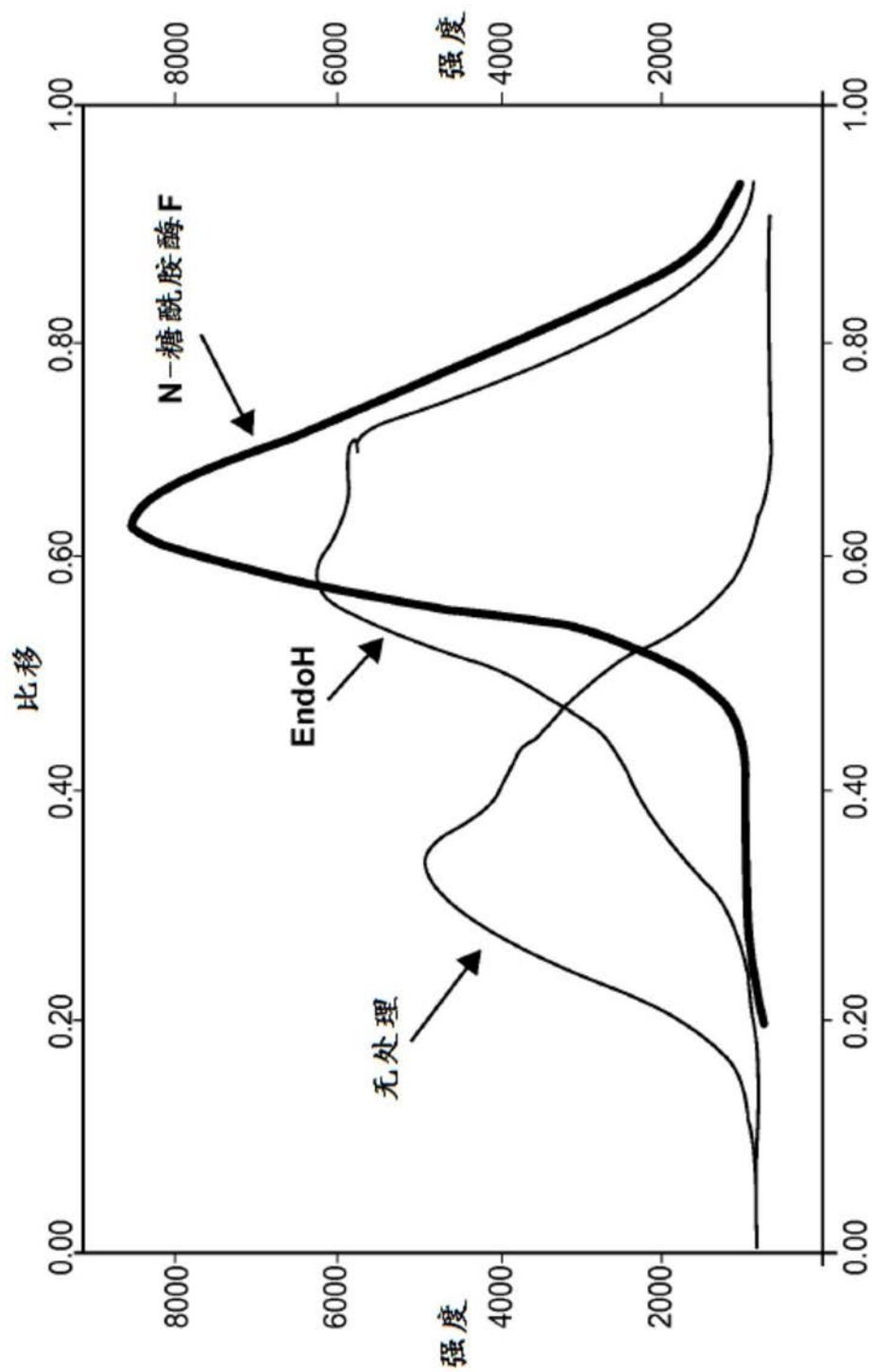


图9C

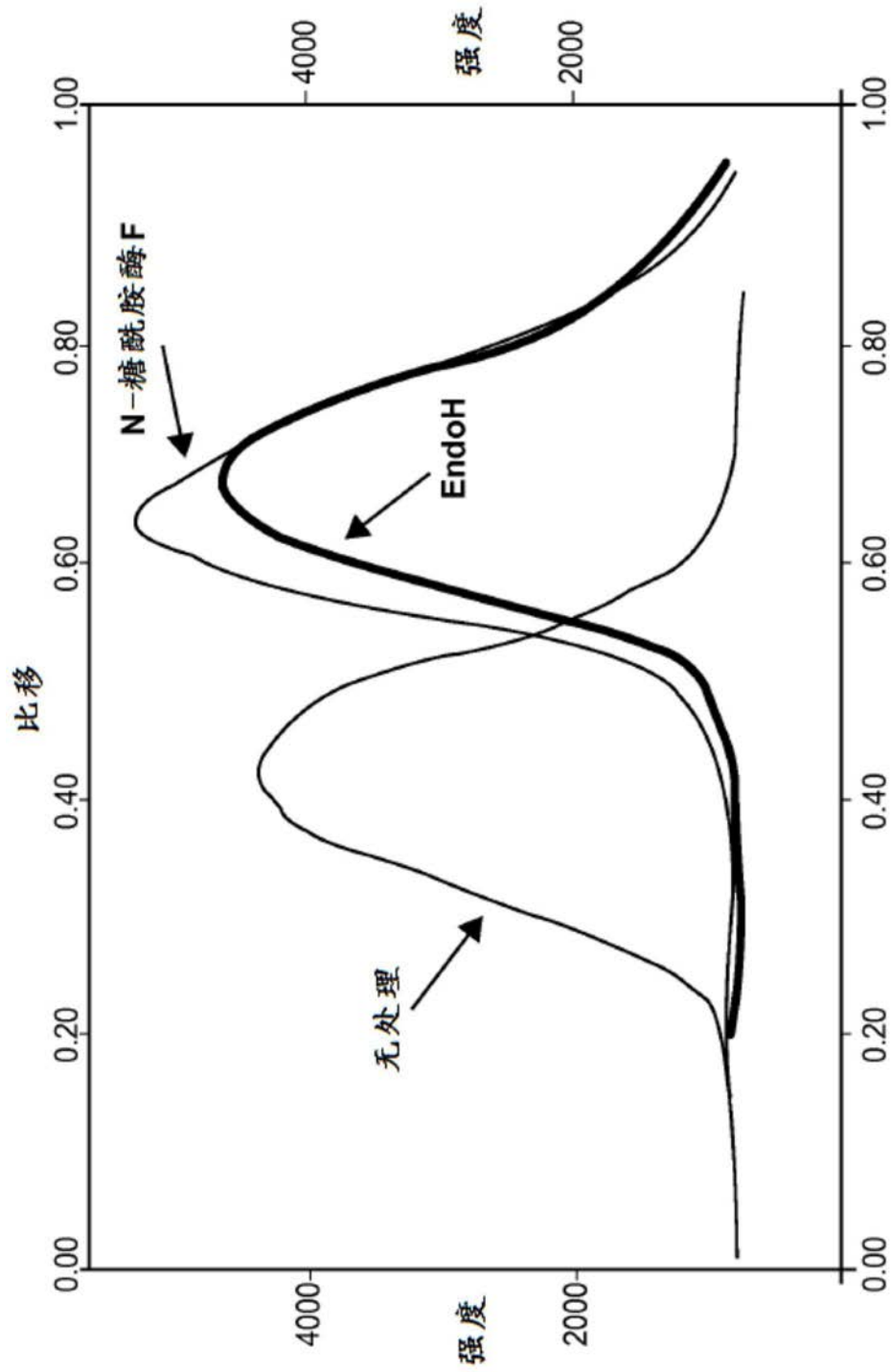


图9D

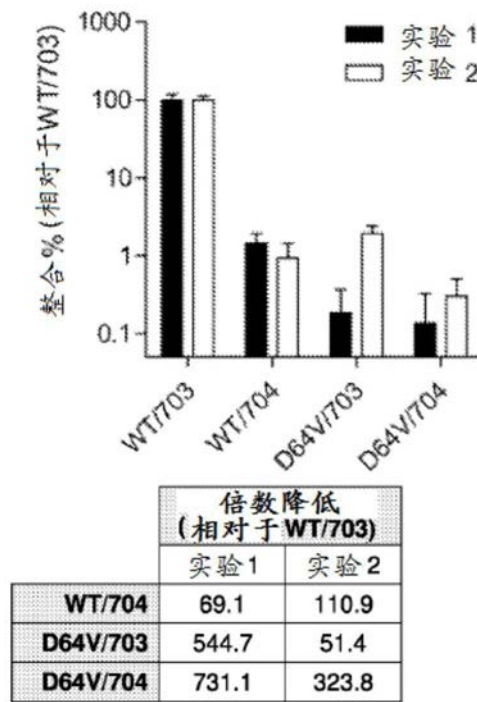


图10A

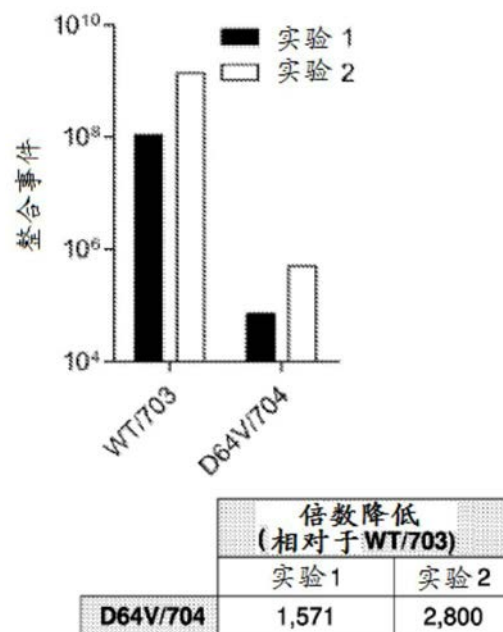


图10B

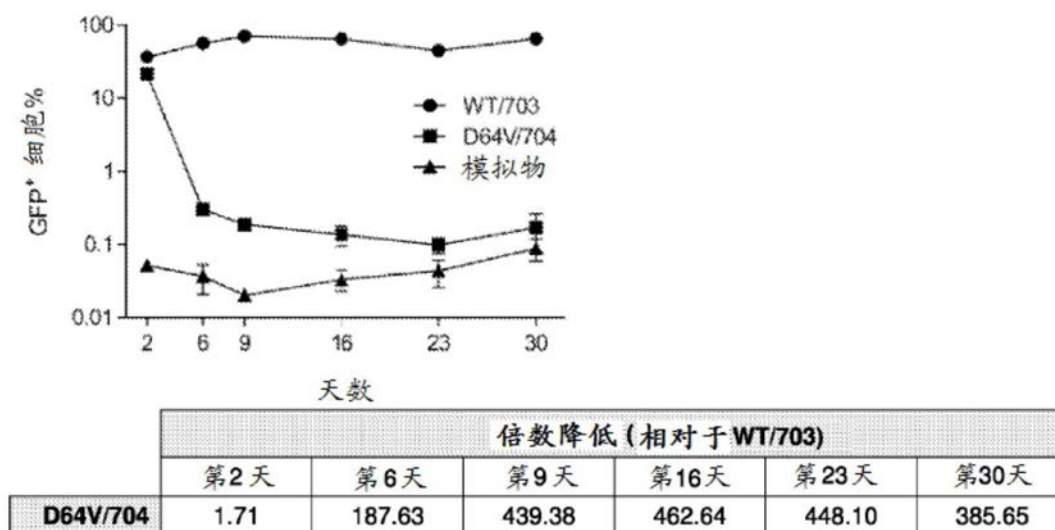


图10C

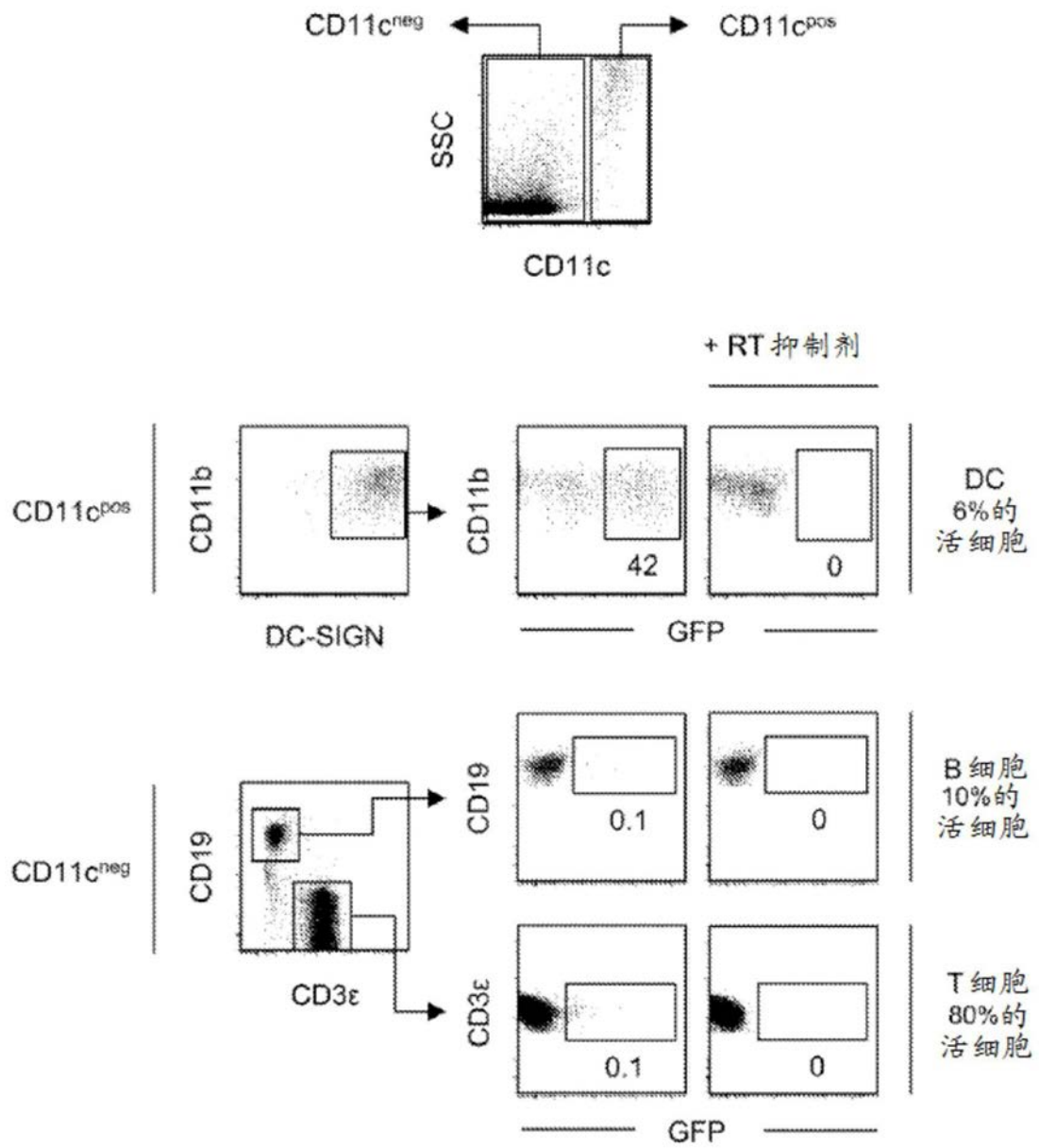


图11

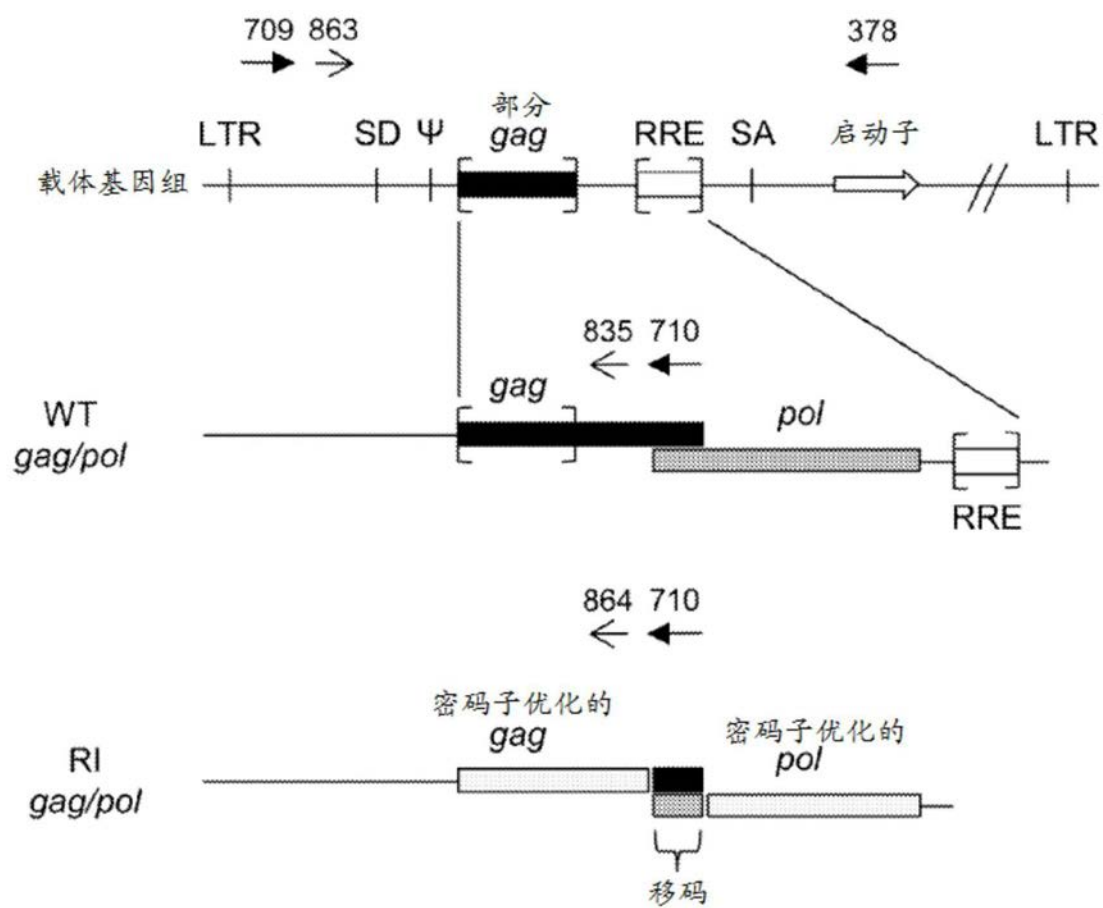


图12

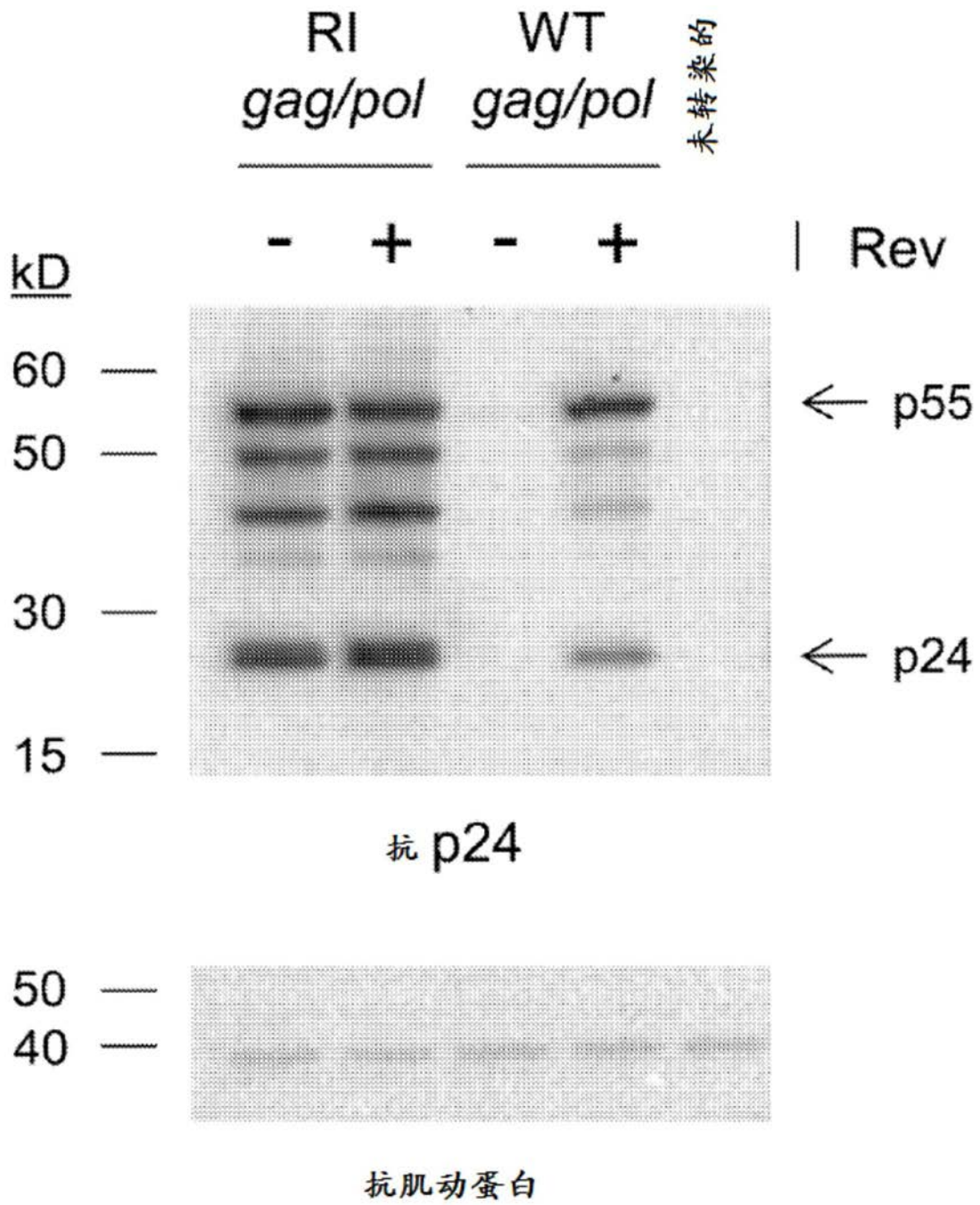


图13

	6 μ g <i>gag/pol</i> DNA		3 μ g <i>gag/pol</i> DNA	
	WT <i>gag/pol</i>	RI <i>gag/pol</i>	WT <i>gag/pol</i>	RI <i>gag/pol</i>
p24 (ng/mL)	206 +/- 21	235 +/- 6	84 +/- 3	100 +/- 6

图14A

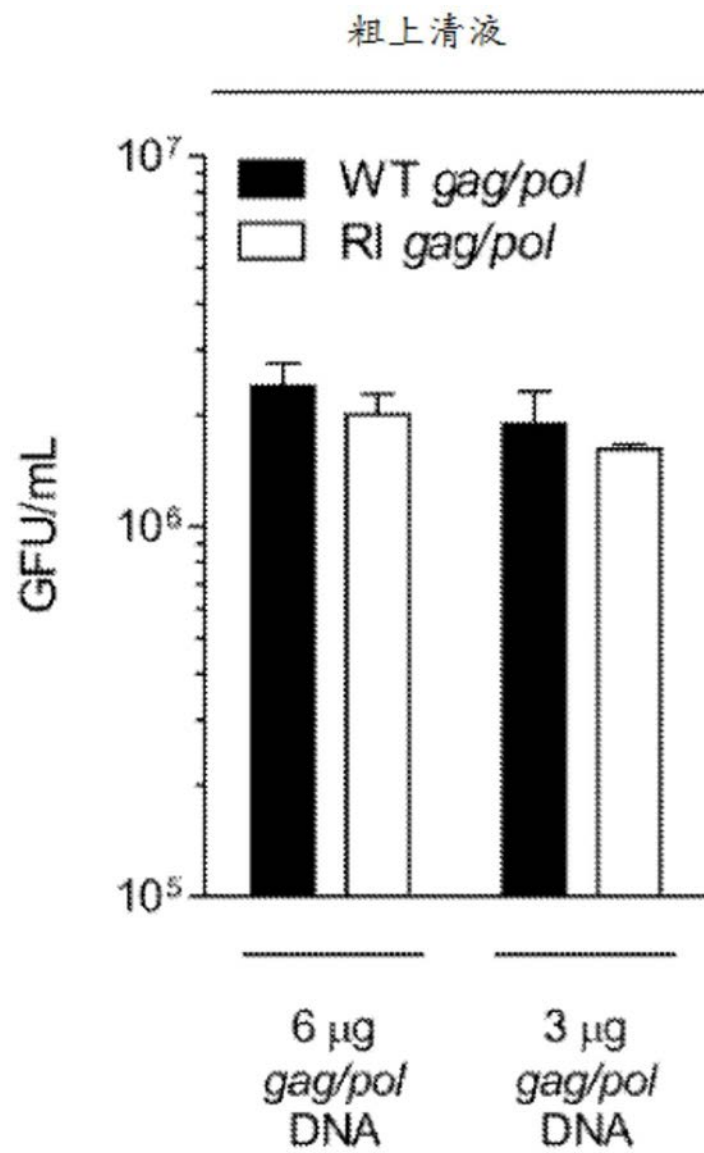


图14B

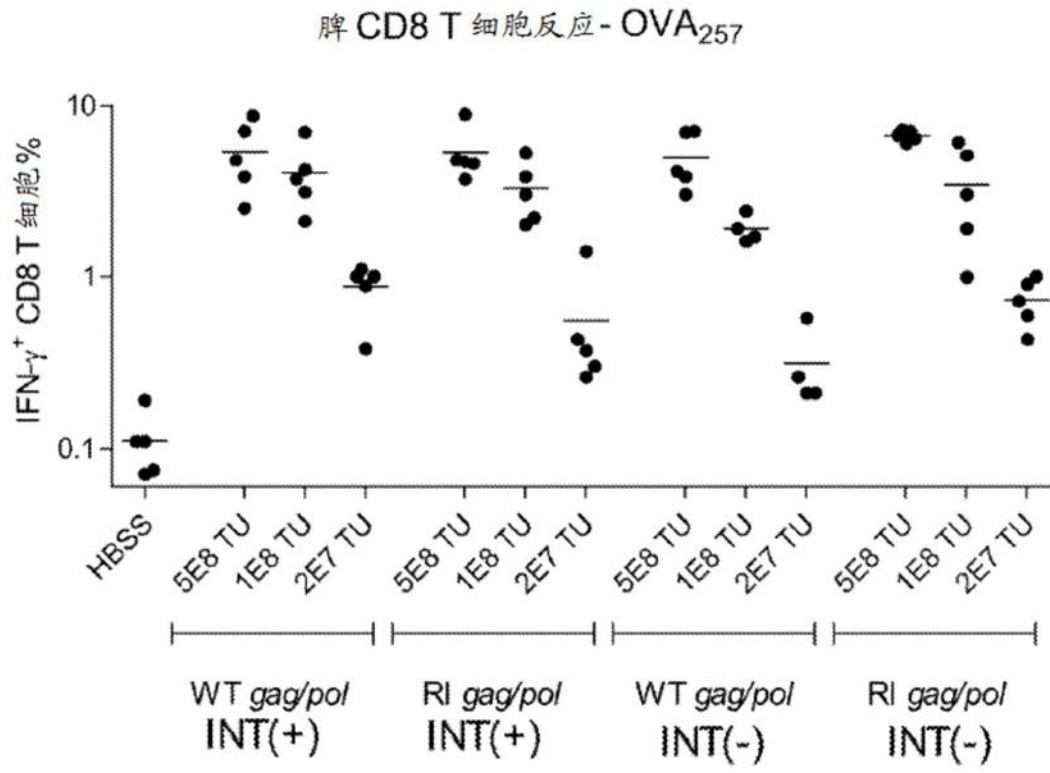


图15

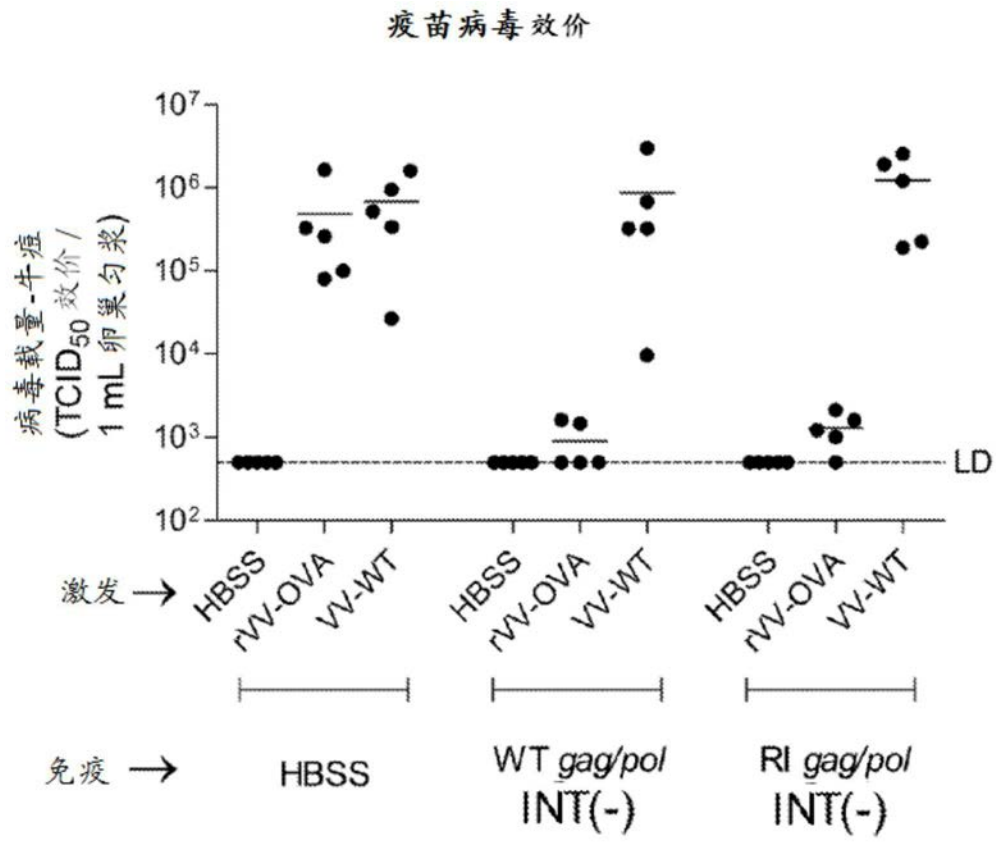


图16

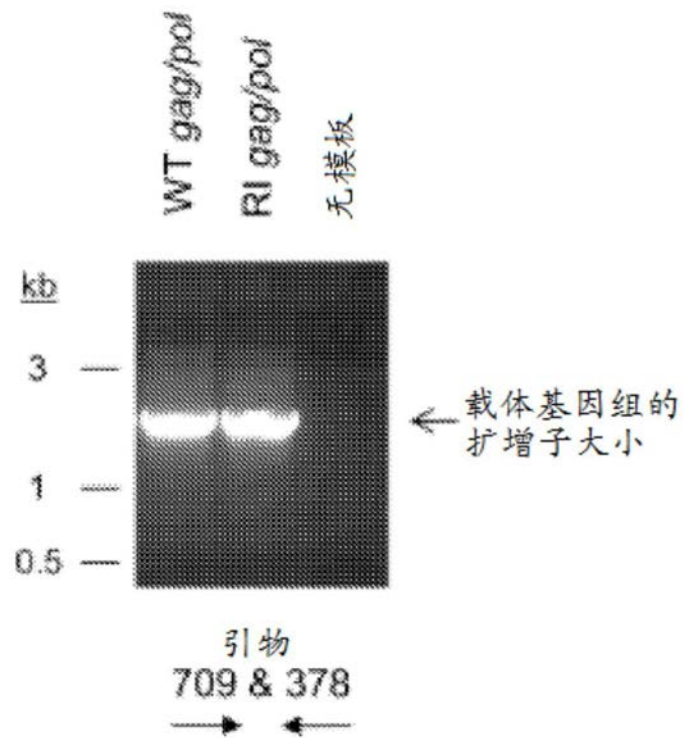


图17A

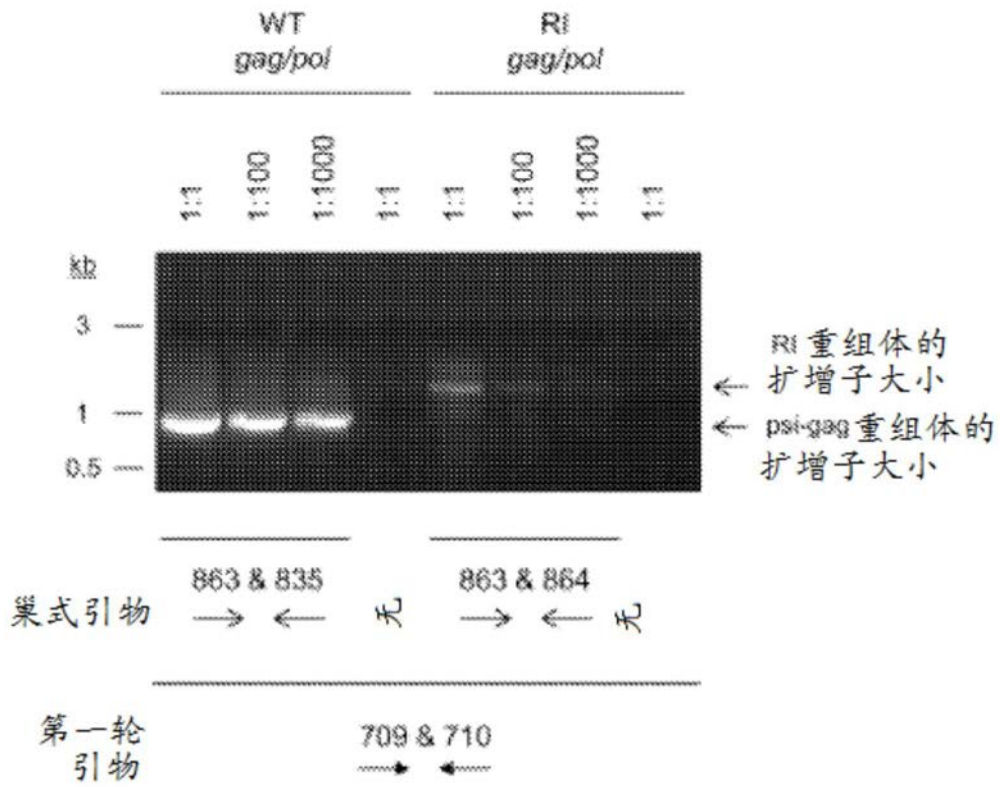


图17B

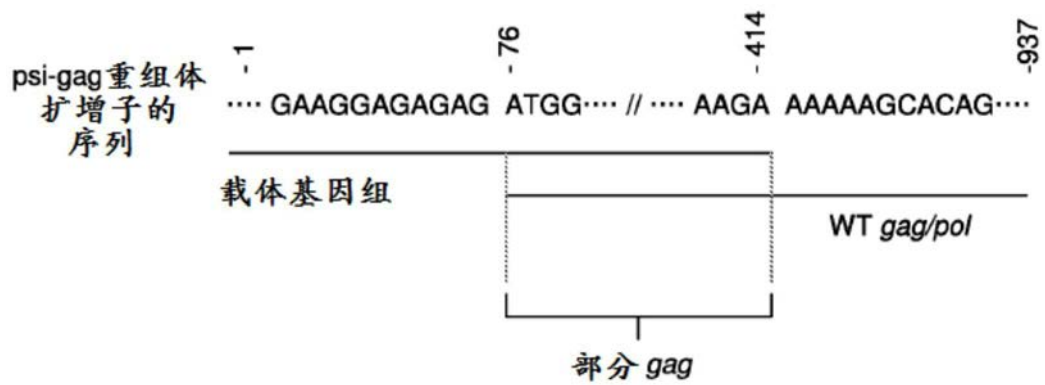


图17C

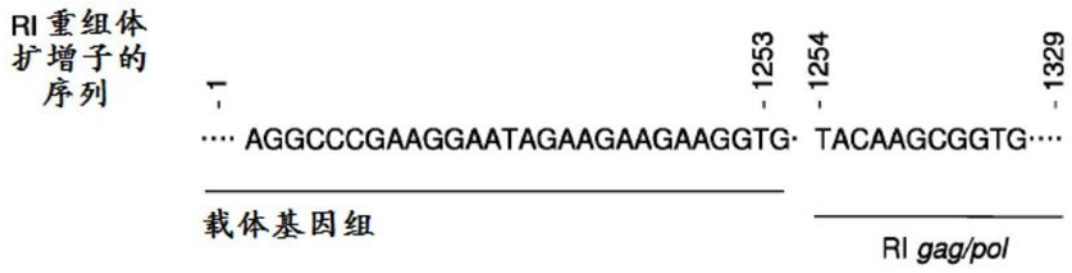
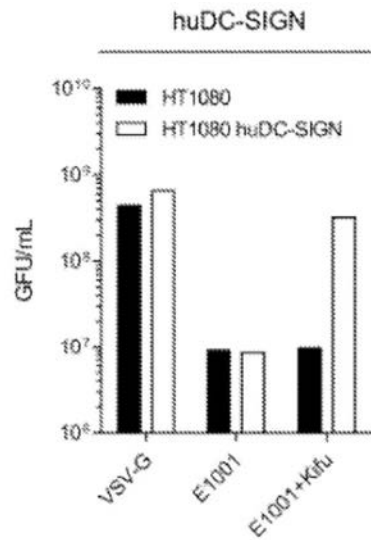


图17D



效价比率 (HT1080 huDC-SIGN / HT1080)			
载体	VSV-G	E1001	E1001 +Kifu
比率	1.4	0.9	33

图18A

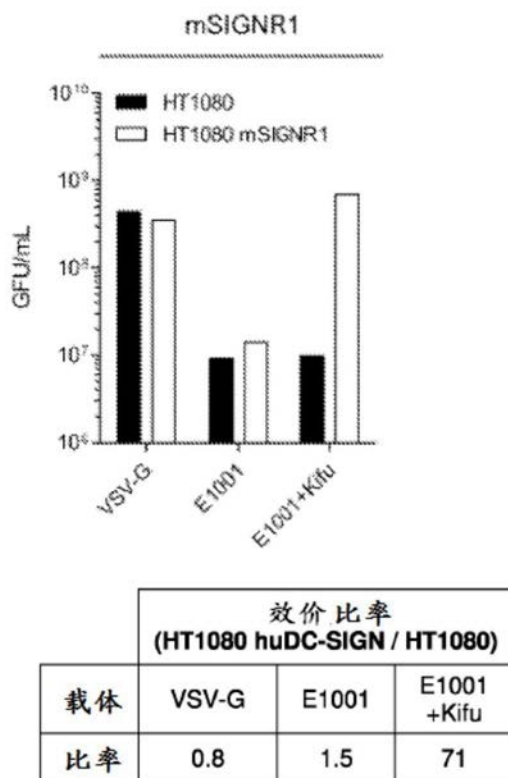


图18B

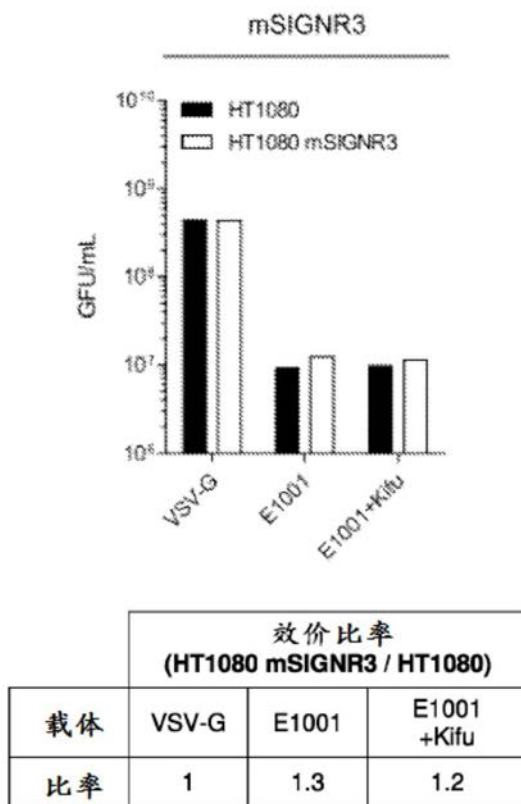


图18C

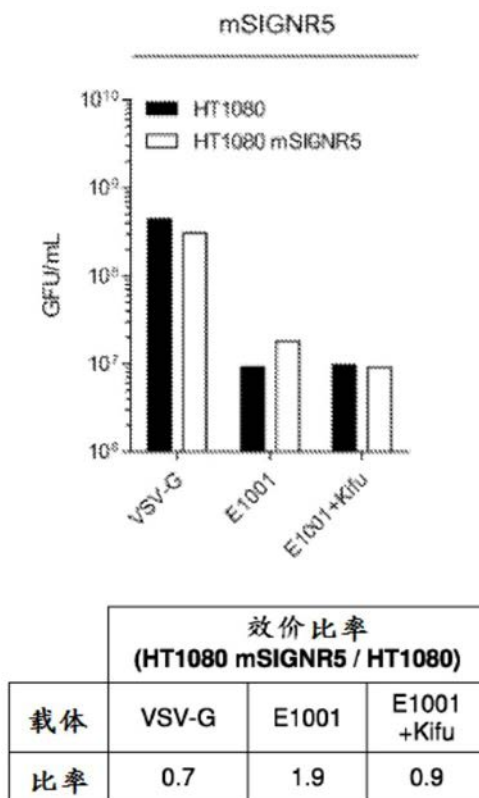


图18D

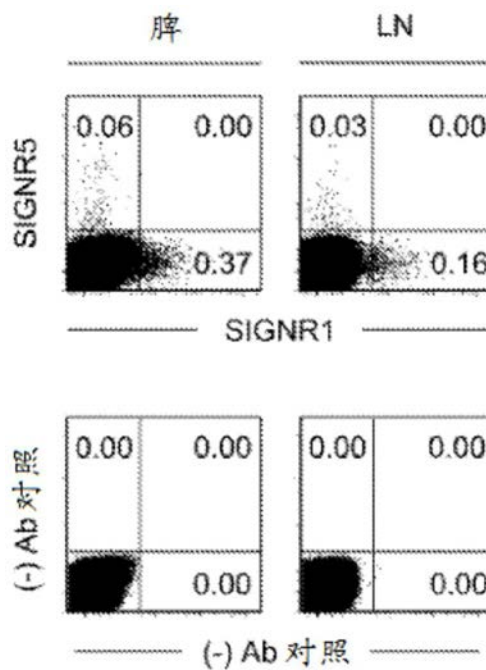


图19A

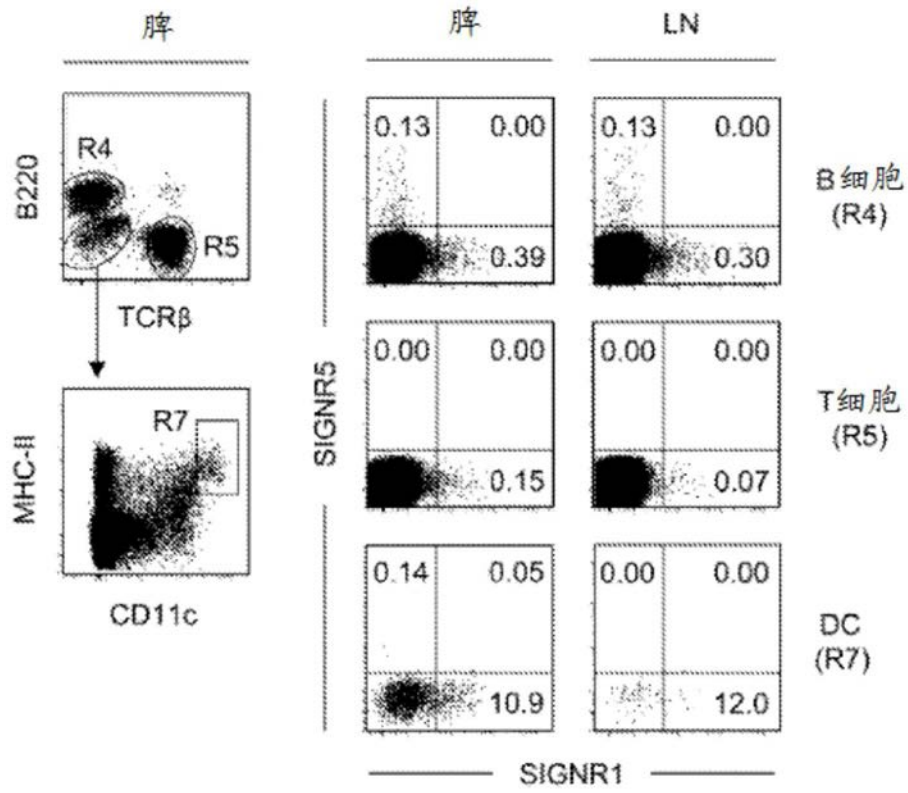


图19B

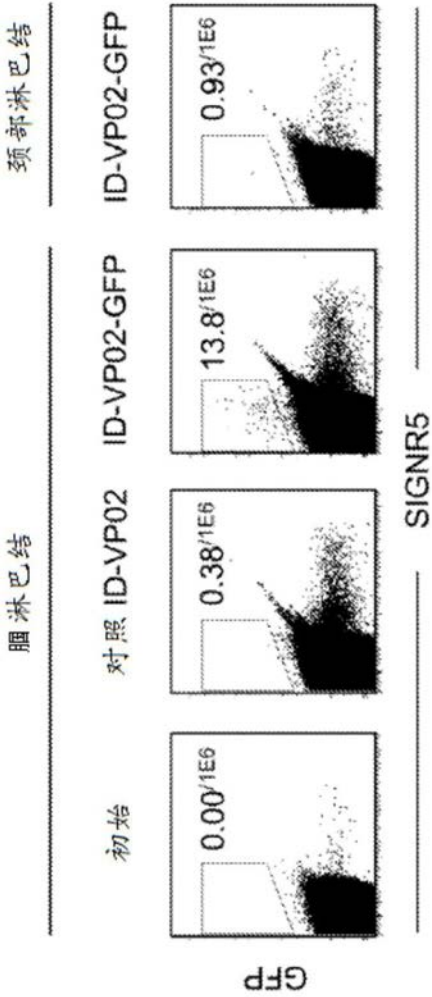


图20A

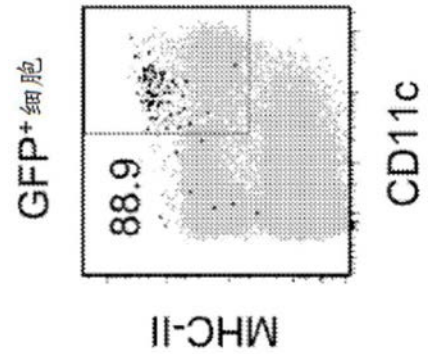


图20B

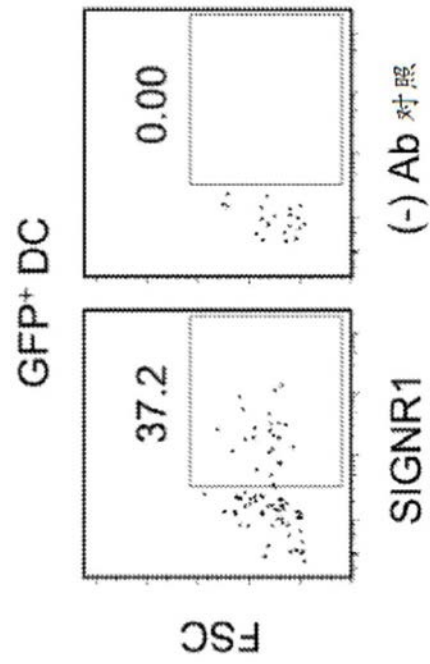


图20C

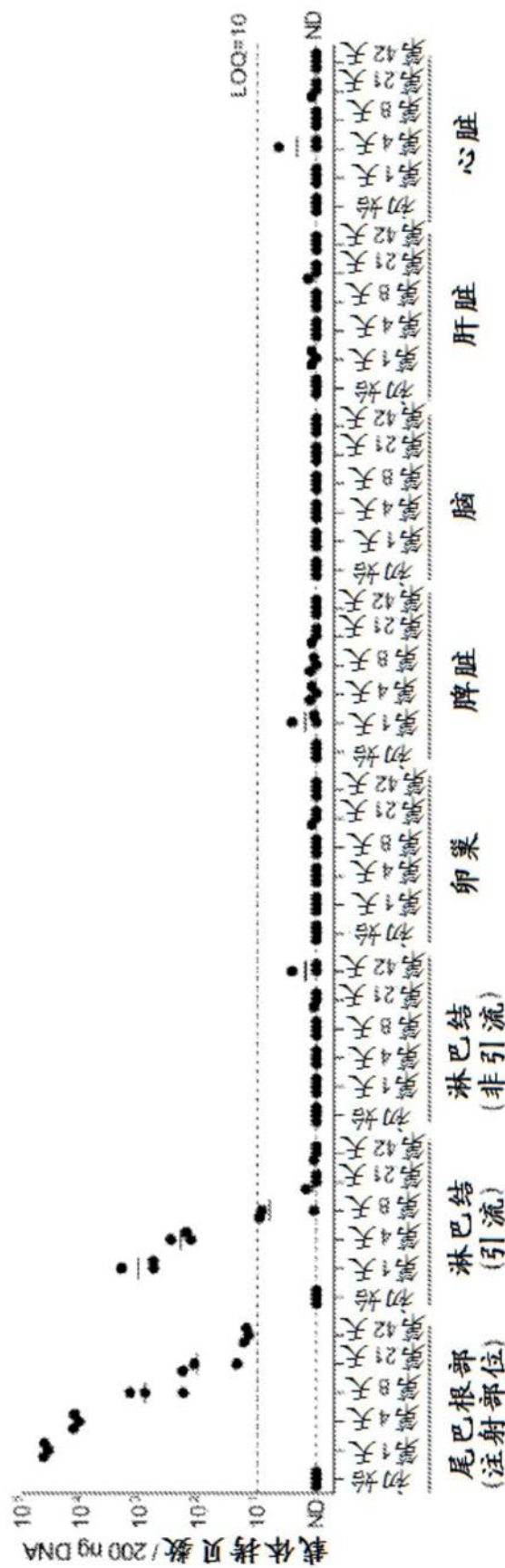


图21

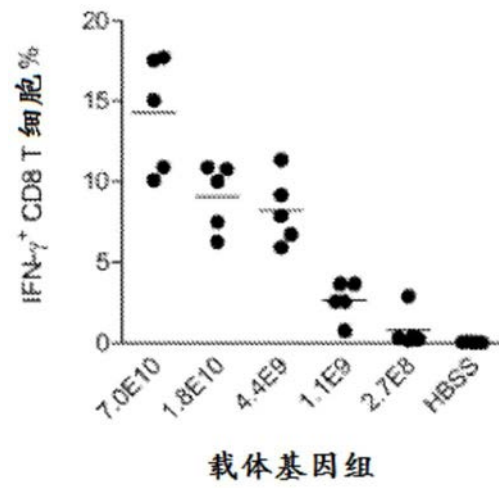


图22A

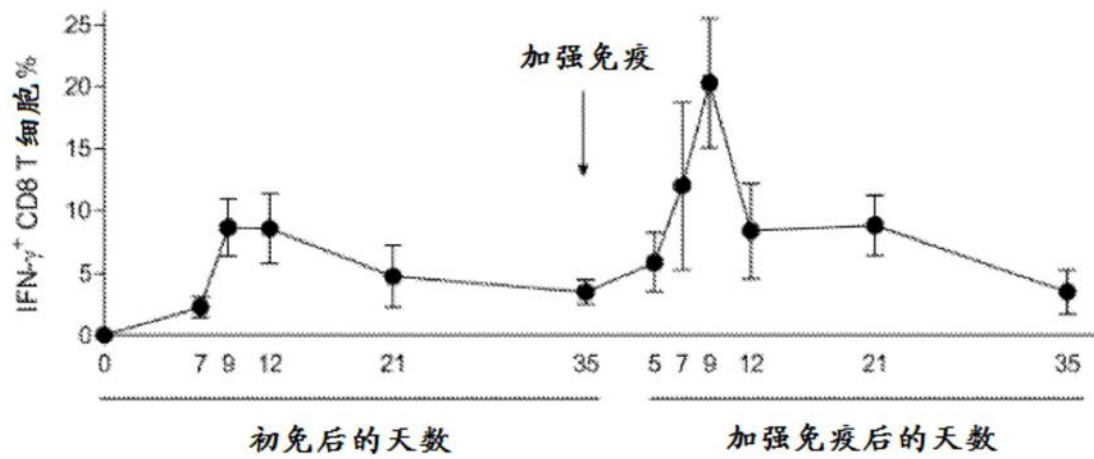


图22B

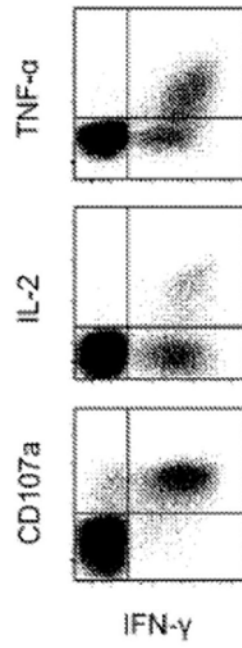


图22C

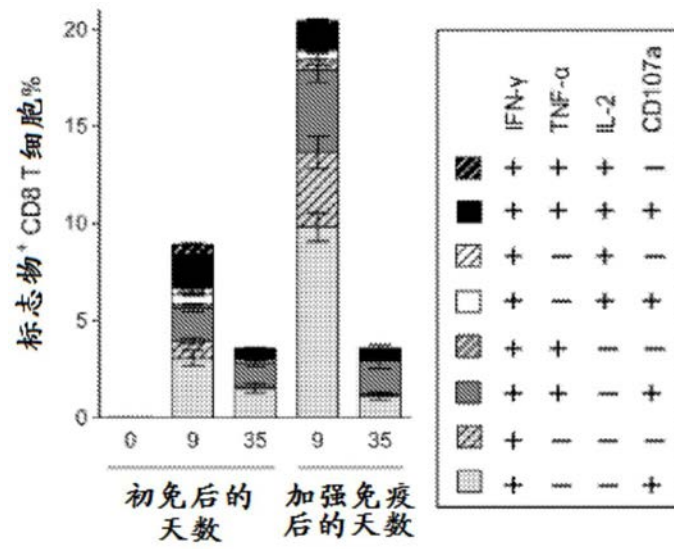


图22D

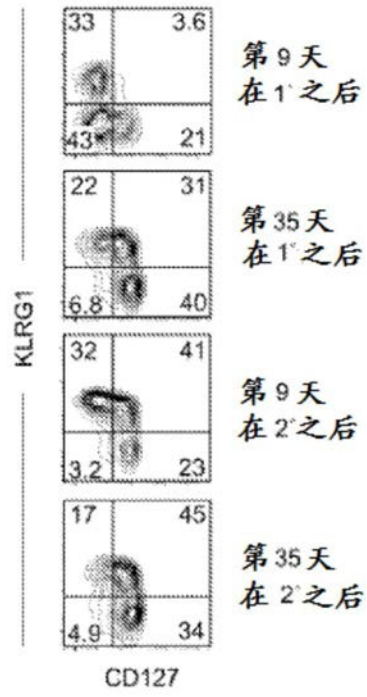


图22E

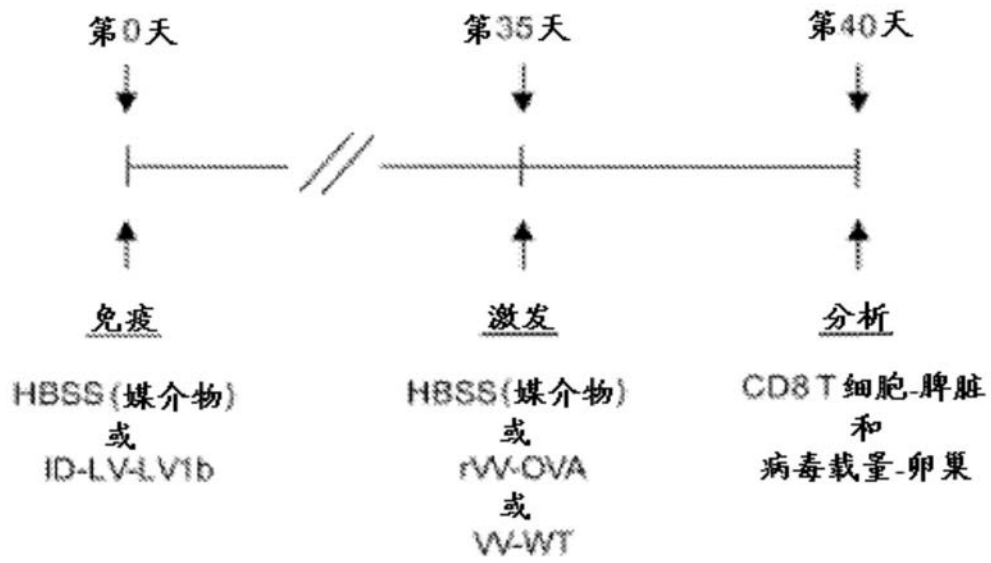


图23A

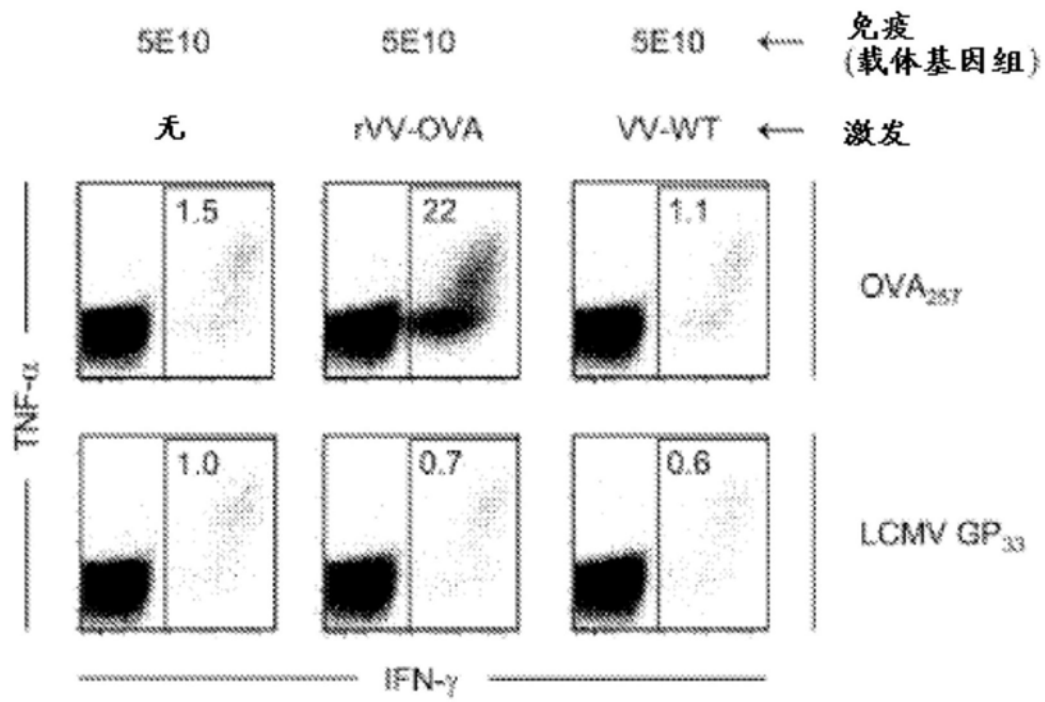


图23B

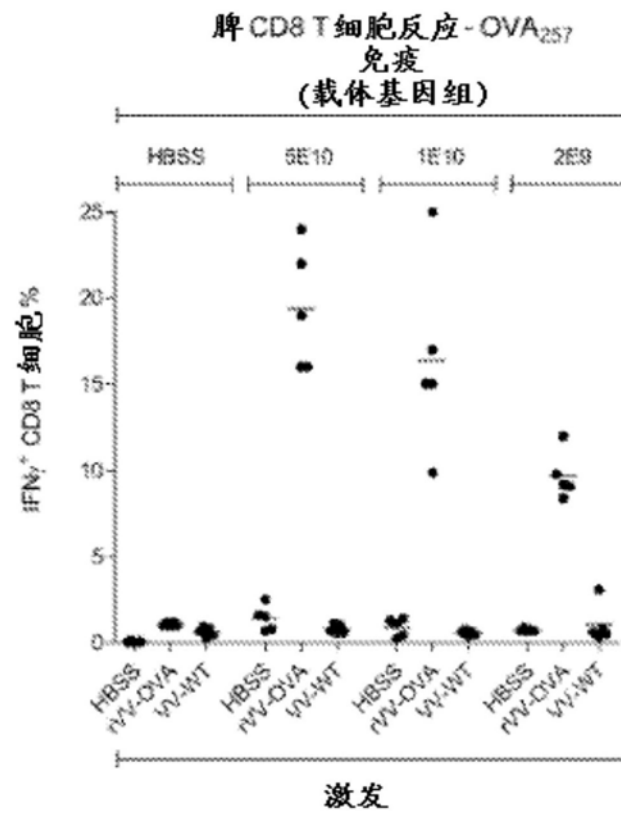


图23C

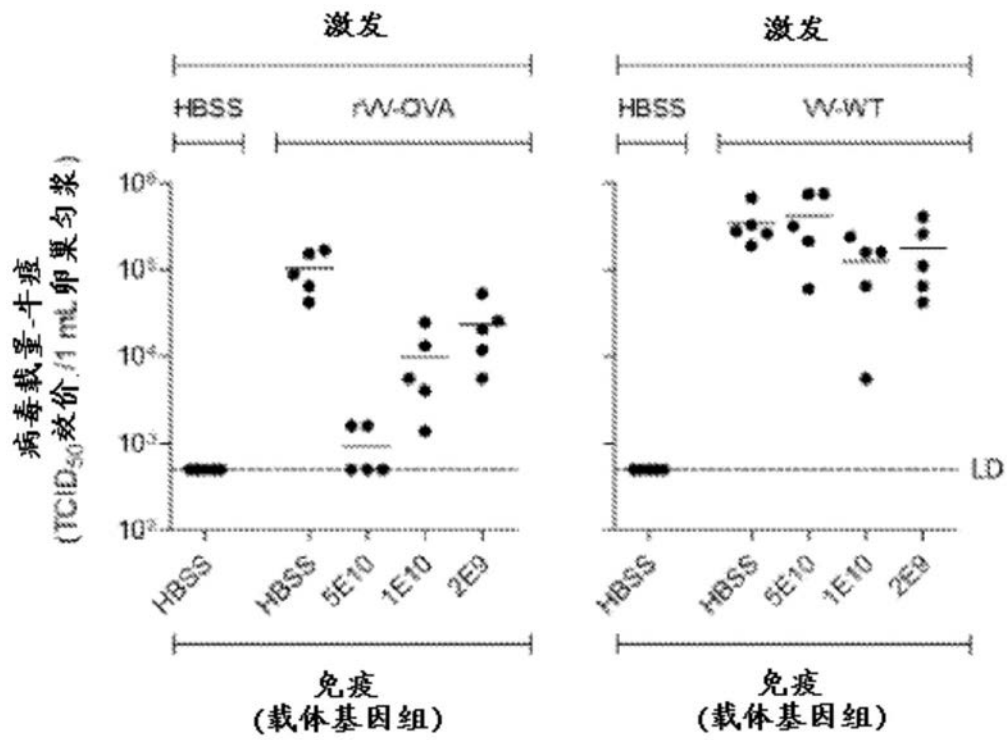


图23D

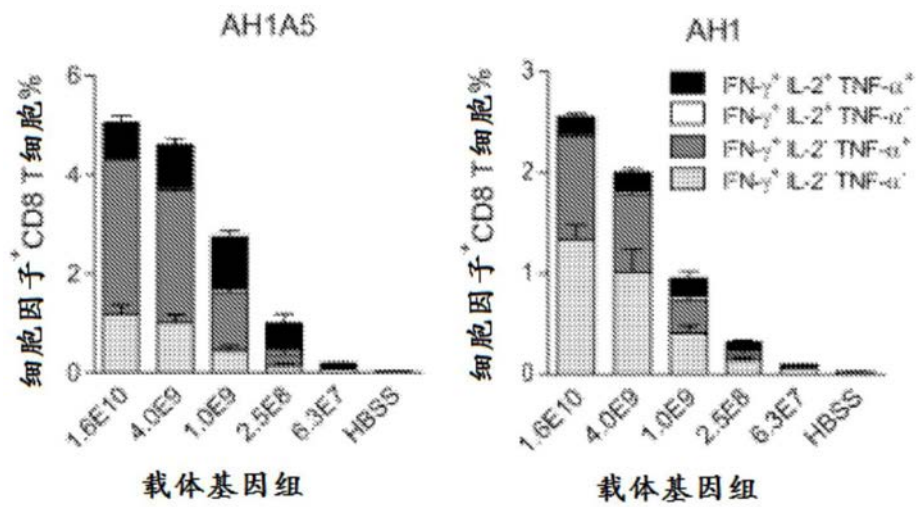


图24A

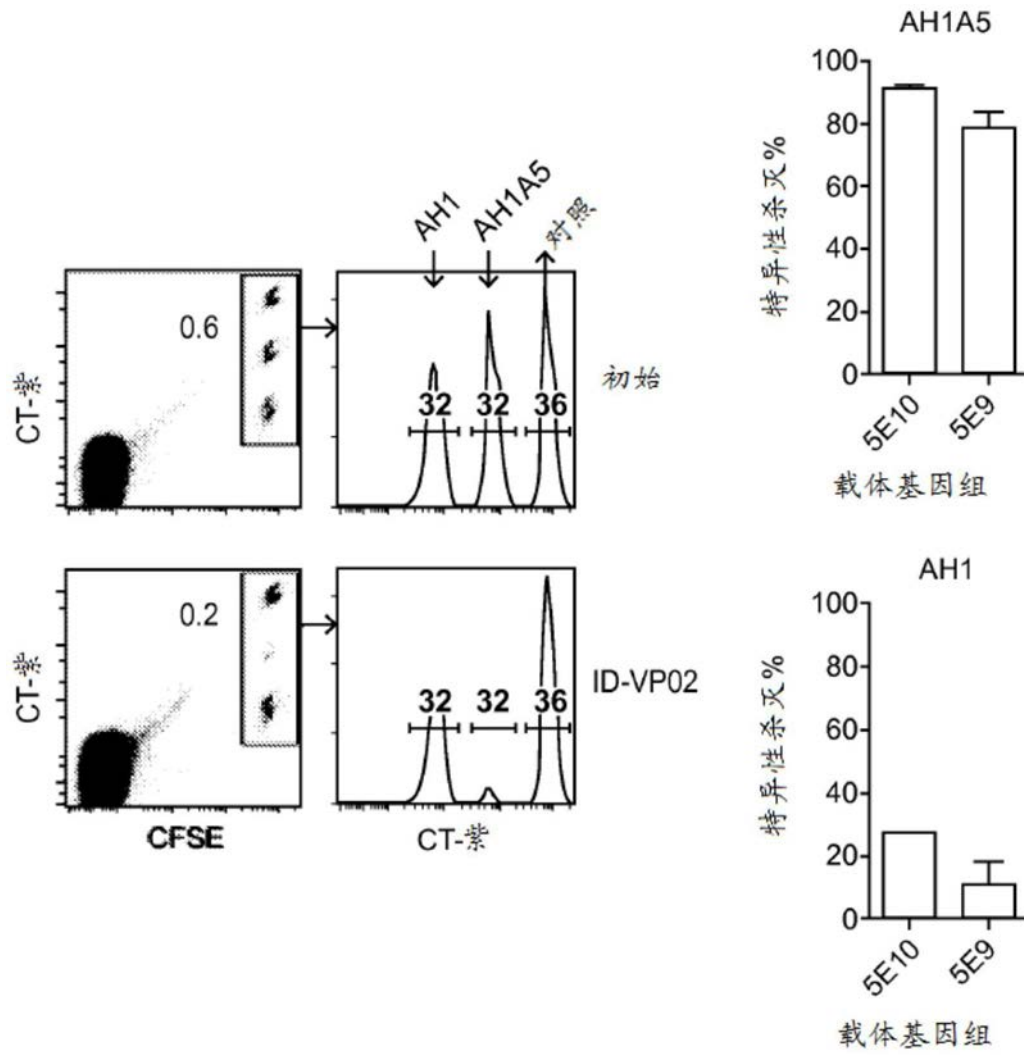


图24B

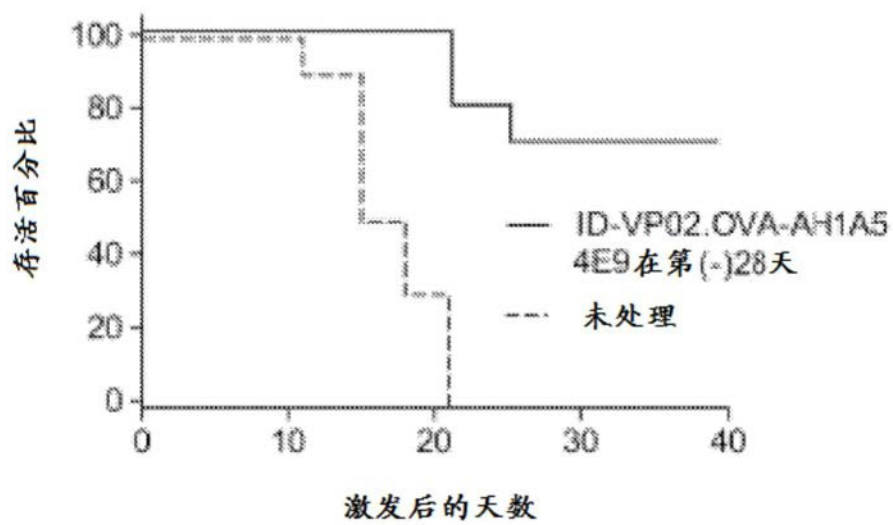


图24C

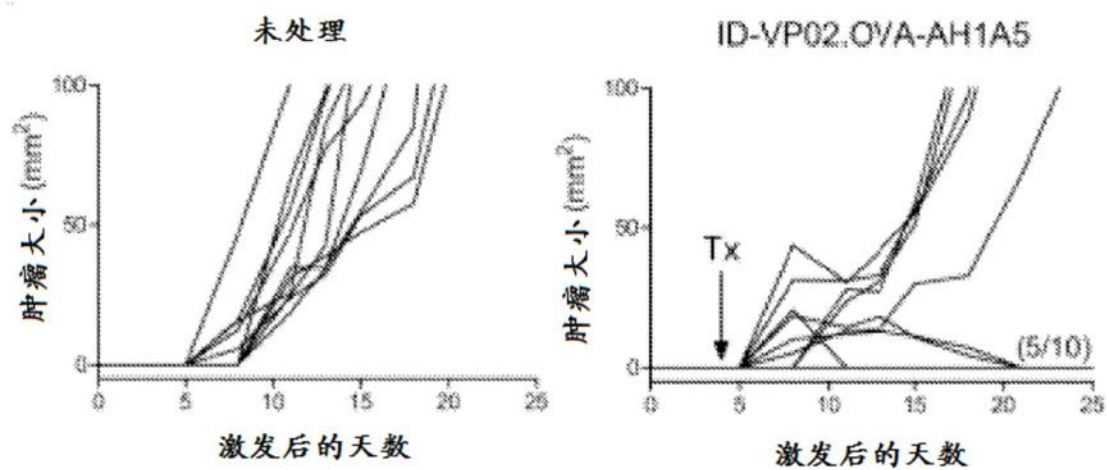


图24D