



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110785176 A

(43)申请公布日 2020.02.11

(21)申请号 201880042333.7

(22)申请日 2018.05.31

(30)优先权数据

1708709.9 2017.06.01 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2018/051475 2018.05.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/220371 EN 2018.12.06

(71)申请人 利兹大学

地址 英国利兹约克郡

申请人 约克大学

(72)发明人 日尔曼·列昂诺夫 西蒙·怀特

彼得·斯托克利 尼克什·帕特尔

埃玛·弗罗布莱斯基

丹·马斯克尔 雷顿·特瓦洛克

理查德·宾厄姆 伊娃·韦斯

埃里克·戴克曼

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

C12N 15/113(2006.01)

权利要求书4页 说明书33页

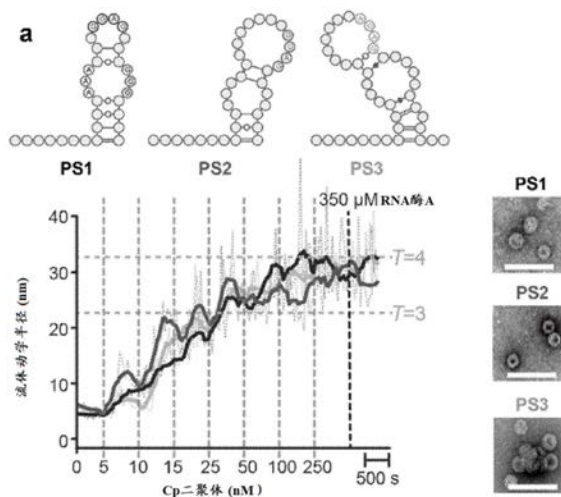
序列表16页 附图42页

(54)发明名称

病毒样颗粒

(57)摘要

本公开涉及使用天然包装信号和人工包装信号进行的病毒样颗粒[VLP]的组装,及其在疫苗和免疫学组合物中的用途以及针对人和动物病毒病原体的疫苗接种或免疫的方法。



1. 一种用于组装病毒样颗粒的人工核酸盒,所述人工核酸盒包含:一个或多个包装信号,其中所述多于一个包装信号串联排列并被核酸分隔,所述包装信号包含核酸环结构域和核酸茎结构域,所述核酸环结构域包含一种或多种同源病毒衣壳蛋白的核苷酸结合基序,所述核酸茎结构域包含通过分子内碱基配对形成的双链区,其中所述人工核酸盒在与多个同源病毒衣壳蛋白接触时,将所述同源病毒衣壳蛋白组装成VLP,所述VLP保护所述VLP内包含的所述核酸包装信号免受核糖核酸酶消化。

2. 根据权利要求1所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒是非复制核酸。

3. 根据权利要求1或2所述的人工核酸盒,其中当向动物受试者施用,所述VLP引起类似于所述天然病毒颗粒的免疫响应的免疫响应。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒不包含编码蛋白质的核酸。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含至少一个核酸包装信号。

6. 根据权利要求5所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含至少2个核酸包装信号。

7. 根据权利要求5所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含至少3个核酸包装信号。

8. 根据权利要求5所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含至少4个核酸包装信号。

9. 根据权利要求5所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含至少5个核酸包装信号。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的人工核酸盒,其中分隔所述核酸包装信号的所述非编码病毒核酸的长度为至少5个核苷酸。

11. 根据权利要求10所述的人工核酸盒,其中在本发明的优选实施方案中,分隔所述核酸包装信号的所述非编码病毒核酸的长度为至少5个至50个核苷酸。

12. 根据权利要求10所述的人工核酸盒,其中分隔所述核酸包装信号的所述非编码病毒核酸超过50个核苷酸。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的人工核酸盒,其中包含所述衣壳结合基序的所述环结构域的长度为至少4个核苷酸。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的人工核酸盒,其中所述茎结构域的长度为至少5个碱基对(bp)。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒的长度为至少50个核苷酸。

16. 根据权利要求15所述的人工核酸盒,其中所述核酸盒的长度为50个至1000个核苷酸。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的人工核酸盒,其中从RNA病毒分离所述核酸包装信号。

18. 根据权利要求17所述的人工核酸盒,其中所述RNA病毒是正义单链RNA病毒。

19. 根据权利要求18所述的人工核酸盒,其中从乙型肝炎病毒分离所述核酸包装信号

RNA病毒。

20. 根据权利要求19所述的人工核酸盒,其中所述乙型肝炎病毒包装信号包含核苷酸结合基序,其中所述核苷酸结合基序包含核苷酸序列RGAG,其中R为G或A。

21. 根据权利要求20所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含至少一个、两个或三个乙型肝炎病毒包装信号,其中一个或多个所述核酸包装信号包括所述核苷酸结合基序RGAG。

22. 根据权利要求19至21中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含针对乙型肝炎病毒鉴定的包装信号中的至少一个,其中所述核酸包装信号中的每个包括所述结合基序RGAG。

23. 根据权利要求19至22中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含选自以下组成的组的核苷酸序列:

i) 包含核苷酸序列GUUUGUUUAAAGACUGGGAGGAGUUGGGGAGGAG[SEQ ID NO:1]的核酸分子;

ii) 包含与SEQ ID NO:1中所示的核苷酸序列至少25%同一并且包含核苷酸结合基序GGGAGG的核苷酸序列的核酸分子。

24. 根据权利要求19至23中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含选自以下组成的组的核苷酸序列:

i) 包含核苷酸序列GGGCCUCUGACAGUUAUGAAAAAAGGAGAUUAAAAUUA UUAUGCCU[SEQ ID NO:2]的核酸分子;

ii) 包含与SEQ ID NO:2中所示的核苷酸序列具有25%同一并且包含核苷酸结合基序AAAAAAGGAG的核苷酸序列的核酸分子。

25. 根据权利要求19至24中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含选自以下组成的组的核苷酸序列:

i) 包含核苷酸序列GGCUGGCAUUCUAUAUAAGAGAGAAACUACACGC[SEQ ID NO:3]的核酸分子;

ii) 包含与SEQ ID NO:3中所示的核苷酸序列至少25%同一并且包含核苷酸结合基序AUAUAAGAG的核苷酸序列的核酸分子。

26. 根据权利要求19至25中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3的核苷酸序列。

27. 根据权利要求19至26中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含SEQ ID 4:CUGGGAGGAGUUGGGGAGGAGAUUAGGUAAAGGUCUUUG UACUAGGAGGCUGUAGGC的核苷酸序列。

28. 根据权利要求1至18中任一项所述的人工核酸盒,其中所述RNA病毒是感染植物细胞或植物的物种。

29. 根据权利要求28所述的人工核酸盒,其中所述RNA病毒是卫星烟草坏死病毒。

30. 根据权利要求29所述的人工核酸盒,其中所述核酸盒包含至少一个从卫星烟草坏死病毒分离的核酸包装信号。

31. 根据权利要求29或30所述的人工核酸盒,其中所述核酸盒包含至少一个核酸包装信号,其中所述核酸包装信号包含核苷酸结合基序AXXA或AXXXA,其中X是任何核苷酸碱基。

32. 根据权利要求28至31中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含选自所述组的核苷酸序列:

i) 包含SEQ ID NO:5中所示的核苷酸序列的核酸分子;

ii) 包含与SEQ ID NO:5中所示的核苷酸序列至少25%同一并且包含核苷酸结合基序AXXA的核苷酸序列的核酸分子。

33. 根据权利要求28至32中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含选自所述组的核苷酸序列:

i) 包含SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列的核酸分子

ii) 包含与SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列至少25%同一并且包含核苷酸结合基序AXXA的核苷酸序列的核酸分子。

34. 根据权利要求28至33中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含选自自由所述组的核苷酸序列:

i) 包含SEQ ID NO:7中所示的核苷酸序列的核酸分子

ii) 包含与SEQ ID NO:7中所示的核苷酸序列至少25%同一并且包含核苷酸结合基序AXXA的核苷酸序列的核酸分子。

35. 根据权利要求28至34中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒包含选自所述组的核苷酸序列:

i) 包含SEQ ID NO:8中所示的核苷酸序列的核酸分子

ii) 包含与SEQ ID NO:8中所示的核苷酸序列至少25%同一并且包含核苷酸结合基序AXXA的核苷酸序列的核酸分子。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的人工核酸盒,其中所述人工核酸盒还包含转录盒,所述转录盒包含适于转录编码多肽或功能性RNA的核酸的核酸分子。

37. 根据权利要求36所述的人工核酸盒,其中所述适应是提供启动子序列和终止序列,以使得能够表达编码所述多肽或功能性RNA的所述核酸分子。

38. 根据权利要求37所述的人工核酸盒,其中所述多肽是治疗性多肽,例如抗体或抗体片段。

39. 根据权利要求37所述的人工核酸盒,其中所述功能性核酸是编码治疗性多肽、反义寡核苷酸或siRNA的mRNA。

40. 一种病毒样颗粒,所述病毒样颗粒包含根据权利要求1至39中任一项所述的人工核酸盒。

41. 根据权利要求40所述的病毒样颗粒,其中所述病毒样颗粒在向受试者施用时具有免疫原性。

42. 根据权利要求41所述的病毒样颗粒,其中所述免疫响应是抗体响应的诱导,其中所述抗体响应诱导特异性结合天然病毒颗粒的抗体。

43. 根据权利要求40至42中任一项所述的病毒样颗粒,其中与天然病毒颗粒相比时,所述病毒样颗粒保留或具有增强的细胞嗜性。

44. 一种疫苗或免疫原性组合物,所述疫苗或免疫原性组合物包含根据权利要求40至43中任一项所述的病毒样颗粒。

45. 根据权利要求44所述的组合物,其中所述疫苗或免疫原性组合物还包含佐剂和/或

载体。

46. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求40至43中任一项所述的病毒样颗粒并且包含药学上可接受的赋形剂。

47. 根据权利要求40至43中任一项所述的病毒样颗粒,所述病毒样颗粒用于将剂递送至细胞。

病毒样颗粒

发明领域

[0001] 本公开涉及使用天然和人工核酸包装信号进行的病毒样颗粒[VLP]的组装及其在疫苗、免疫学和药物组合物中的用途;针对人和动物病毒病原体的疫苗接种或免疫方法,以及还作为治疗剂(诸如药物蛋白、siRNA或基因治疗载体或诊断剂)的递送媒介物。

[0002] 发明背景

[0003] 病毒在人和动物中引起各种使人衰弱的疾病,常常造成有害影响甚至死亡。病毒感染给世界各地的健康护理系统造成巨大的财务负担,并且还造成动物相关产品(诸如在肉类或奶制品行业中)的重大损失。

[0004] 与在感染开始后可用抗生素剂治疗的细菌感染相反,预防病毒感染通常是优选途径,因为通常没有有效的抗病毒药物可供选择。疫苗接种是疾病预防最有效的形式,并且已被成功地开发用于一些病毒性疾病,诸如流感、脊髓灰质炎、麻疹和人乳头瘤病毒[HPV]。疫苗接种是施用抗原性物质以刺激个体的免疫系统,以对病原体产生适应性免疫。疫苗的活性剂可以是例如病原体的灭活形式、病原体的高度免疫原性组分或呈弱化的所谓减毒病毒形式。然而,所有这些不同类型的疫苗在其有效性和安全性记录上都各不相同,并且此外通常可不适合向免疫受损的受试者、孕妇或儿童施用。

[0005] 灭活疫苗由通过物理或化学方法杀死的病毒制成。这些类型的疫苗非常安全,因为它们缺乏传染性遗传物质,因此不会引起疾病,并从而适合免疫受损的受试者。然而,此类灭活疫苗通常在诱导适当或持久的免疫响应方面无效,并因此经常需要多个施用步骤。含有病原体高度免疫原性组分的疫苗,即所谓的亚单位疫苗,提供与灭活疫苗相似的益处,诸如很高的安全记录,因为它们不含可引起疾病的病毒活组分。然而,不能保证有效的免疫响应,并且即使引发响应,也可能无法实现长期提供针对所需病原体的保护的免疫记忆。

[0006] 或者,可以使用减毒活疫苗。减毒活疫苗包含减弱的病原体,所述减弱的病原体尽管仍然能够在宿主生物体中复制,但不会引起起疾病或引起非常轻度的疾病。使用减毒病毒的疫苗接种导致出色的保护;然而,与灭活或亚单位疫苗相比时,它们本质上安全性较低,因为它们可以恢复为原始的更具毒力的形式并引起疾病。因此,减毒疫苗不适合免疫系统受损的受试者,当在怀孕期间给予时可对未出生的婴儿造成伤害,并增加了卫生专业人员造成免疫错误(诸如冻干减毒病原体的重构错误)的可能性,所述减毒病原体,当以更高剂量给予时,效力更强。此外,减毒疫苗不如灭活疫苗稳定,并且需要复杂的物流来维持冷藏和运输,以保持(尽管减弱了)活性。在卫生系统欠发达的第三世界国家,这尤其令人担忧。

[0007] 减毒疫苗很普遍,并且可用于多种疾病,诸如麻疹、腮腺炎、风疹、水痘、天花和脊髓灰质炎。当今使用的大多数减毒活疫苗均源于在培养细胞(诸如,例如成纤维细胞或和鸡胚)中的连续传代,从而导致毒力逐渐丧失。该方法依赖于点突变的随机积累来赋予无毒力,并且既耗时又无效。产生减毒病毒株的其它方法是基于遗传工程化的,并公开于申请W02005/012535中。

[0008] 病毒样颗粒(VLP)包含多个衣壳蛋白,所述衣壳蛋白模拟天然病毒的构象,但缺少

病毒DNA或RNA,并因此无法在宿主细胞中复制。已经认识到VLP作为生产安全高效疫苗的工具的用途,并且已经开发了一些针对人乳头瘤病毒的基于VPL的疫苗。US8062642公开了具有与天然传染性病毒的抗原性特征相似的抗原性特征的乳头瘤病毒衣壳蛋白和VLP的生产。类似地,W09913056公开了乳头瘤VLP的去组装(disassembly)方法。

[0009] 尽管上面列出的疫苗类型取得了巨大的成功,但它们通常很难以所需的特性进行制备/配制,并且在许多病毒中,其在循环群体中的天然抗原变异意味着这些策略在这些情况下不可行。

[0010] 本公开涉及使用源自病毒的核酸包装信号进行的VLP的形成以及包含天然和/或人工包装信号的核酸盒(所述核酸盒为人工VLP组装提供了底物)的设计,以及人工VLP作为疫苗的用途和在递送剂(例如治疗剂或诊断剂)至细胞的用途。正链单链(ss)RNA病毒的RNA包装信号介导的组装机制的知识使人们能够鉴定其基因组RNA分子在作为组装底物方面的关键特性,从而允许生产用于VLP的高效组装的人工高效RNA底物。后者与由病毒形成的天然病毒体具有相似的性质。特别地,人工VLP衣壳保留了那些病毒的天然免疫学特性以及它们的细胞嗜性。它们还保留了原始病毒颗粒的许多稳定性和机械特性。VLP可用于与剂的细胞特异性递送相关的广泛应用,以及用作安全的减毒疫苗和用于药物的靶向递送的载体,以及用于基因治疗。

发明内容

[0011] 根据本发明的方面,提供了一种用于组装病毒样颗粒的人工核酸盒,其包含:一个或多个包装信号,其中所述多于一个包装信号串联排列并被核酸分隔,所述包装信号由核酸环结构域和核酸茎结构域组成,所述核酸环结构域包含一种或多种同源病毒衣壳蛋白的核苷酸结合基序,所述核酸茎结构域由通过分子内碱基配对形成的双链区组成,其中所述人工核酸盒在与多个同源病毒衣壳蛋白结合时,将所述同源病毒衣壳蛋白组装成VLP,该VLP保护所述VLP内包含的所述核酸包装信号免受核糖核酸酶消化。

[0012] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒是非复制核酸。

[0013] 在本发明的优选实施方案中,当向动物受试者施用,所述VLP引起类似于天然病毒颗粒的免疫响应的免疫响应。

[0014] 在本发明的另外的优选实施方案中,所述人工核酸盒不是天然病毒颗粒。

[0015] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒不包含编码蛋白质的核酸。

[0016] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含至少两个核酸包装信号。

[0017] 优选地,所述人工核酸盒包含至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个或至少10个核酸包装信号。

[0018] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含至少1个核酸包装信号。

[0019] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含至少2个核酸包装信号。

[0020] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含至少3个核酸包装信号。

[0021] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含至少4个核酸包装信号。

[0022] 在本发明的替代优选实施方案中,所述人工核酸盒包含至少5个核酸包装信号。

[0023] 在本发明的优选实施方案中,分隔所述核酸包装信号的所述非编码病毒核酸的长度为至少5个核苷酸。

[0024] 在本发明的优选实施方案中,分隔所述核酸包装信号的所述非编码病毒核酸的长度为至少5个至50个核苷酸。优选地,大于50个核苷酸。

[0025] 在本发明的优选实施方案中,包含所述衣壳结合基序的所述环结构域的长度为至少4个核苷酸。优选地,所述环结构域的长度为至少5个、6个、7个或8个核苷酸。

[0026] 在本发明的优选实施方案中,所述茎结构域的长度为至少4个碱基对(bp)。优选地,所述茎结构域的长度为至少5bp、6bp、7bp、8bp、9bp、10bp、11bp、12bp、13bp、14bp、15bp、16bp、17bp、18bp、19bp、20bp、21bp、22bp、23bp、24bp、25bp、26bp、27bp、28bp、29bp、30bp、31bp、32bp、33bp、34bp、35bp、36bp、37bp、38bp、39bp、40bp、41bp、42bp、43bp、44bp、45bp、46bp、47bp、48bp、49bp、50bp、60bp、61bp、62bp、63bp、64bp、65bp、66bp、67bp、68bp、69bp或至少70bp。

[0027] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒的长度为至少50个核苷酸。优选地,所述核酸盒的长度为50至1000个核苷酸。

[0028] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒的长度为至少50个、60个、70个、80个、90个、100个、110个、120个、130个、140个、150个、200个、250个、300个、350个、400个、450个、500个、550个、600个、650个、700个、750个、800个、850个、900个、950个或至少1000个核苷酸。

[0029] 在本发明的优选的实施方案中,从RNA病毒中分离所述核酸包装信号;优选地,所述RNA病毒是人病原体。

[0030] 优选地,所述包装信号是经修饰的包装信号,其保留特征性核苷酸识别基序和包装信号之间的间隔,但改变各个包装座号的稳定性/稳定各个包装信号。

[0031] 人、动物和植物中的几种疾病由所谓的RNA病毒引起。单链RNA病毒分为三组:正义ssRNA病毒(组IV),负义ssRNA病毒(组V)和逆转录病毒(组VI)。感染后,病毒RNA进入宿主细胞,取决于病毒类型,RNA被直接翻译(组IV)为复制所必需的病毒蛋白质,或者在翻译之前被RNA依赖性RNA聚合酶(组V)转录为更合适的RNA形式。组VI RNA病毒利用病毒编码的逆转录酶从RNA基因组中产生DNA,所述DNA通常被整合到宿主基因组中,并因此被宿主复制和转录。正义ssRNA病毒的非限制性实例包括丙型肝炎病毒、西尼罗河病毒、登革热病毒、寨卡病毒、SARS和MERS冠状病毒和鼻病毒。负义ssRNA病毒包括例如埃博拉病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、流感病毒和D型肝炎病毒。慢病毒属的逆转录病毒包括人免疫缺陷病毒I和II和乙型肝炎病毒。人畜共患病毒病原体的实例包括埃博拉病毒、狂犬病病毒和甲型流感病毒。植物ssRNA病毒的非限制性实例包括芜菁皱缩病毒、豇豆褪绿斑驳病毒1、2和3、雀麦花叶病毒1、2和3以及卫星烟草坏死病毒。在我们共同未决的申请US 14/916,945(其内容通过引用整体并入),特别是其中公开的包装信号和模拟适体中,公开了一系列ssRNA病毒的包装信号。

[0032] 在本发明的优选实施方案中,所述RNA病毒是正义单链RNA病毒。

[0033] 在本发明的优选实施方案中,从乙型肝炎病毒分离所述核酸包装信号RNA病毒。

[0034] 在本发明的优选实施方案中,所述乙型肝炎病毒包装信号包含核苷酸结合基序,其中所述核苷酸结合基序包含核苷酸序列RGAG,其中R为G或A。

[0035] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含至少一个、两个或三个乙型肝炎病毒包装信号,其中一个或多个所述核酸包装信号包括核苷酸结合基序RGAG。

[0036] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含乙型肝炎病毒的已鉴定的PS中

的至少一个,其中每个所述核酸包装信号包括核苷酸结合基序RGAG。

[0037] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:

[0038] i) 包含核苷酸序列GUUUGUUUAAAGACUGGGAGGAGUUGGGGAGGAG [SEQ ID NO:1]的核酸分子;

[0039] ii) 包含与SEQ ID NO:1中所示的核苷酸序列具有至少25%同一性并且包含核苷酸结合基序GGGAGG的核苷酸序列的核酸分子。

[0040] 在本发明的另外的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:

[0041] i) 包含核苷酸序列GGGCCUCUGACAGUAAUGAAAAAGGAGAUUAAAAUAAUUAUGCCU [SEQ ID NO:2]的核酸分子;

[0042] ii) 包含与SEQ ID NO:2中所示的核苷酸序列具有至少25%同一性并且包含核苷酸结合基序GAAAAAGGAG (SEQ ID NO 9)的核苷酸序列的核酸分子。

[0043] 在本发明的另外的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:

[0044] i) 包含核苷酸序列GGCUGGCAUUCUAUAUAAGAGAGAAACUACACGC [SEQ ID NO:3]的核酸分子;

[0045] ii) 包含与SEQ ID NO:3中所示的核苷酸序列具有至少25%同一性并且包含核苷酸结合基序AUAUAAGAG的核苷酸序列的核酸分子。

[0046] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含与SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3中所示的核苷酸序列具有至少30%、35%、40%、45%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸。

[0047] 在本发明的另外的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:3。

[0048] 在本发明的另外的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含核苷酸序列,所述核苷酸序列包含SEQ ID 4:CUGGGAGGAGUUGGGGAGGAGAUUAGGUUAAAGGUCUUUGUACUAGGAGGCUGUAG GC。

[0049] 在本发明的替代实施方案中,所述RNA病毒是感染人受试者的人畜共患病物种。

[0050] 在本发明的另外的替代实施方案中,所述RNA病毒是感染兽医动物受试者的物种。

[0051] 在本发明的另外的替代实施方案中,所述RNA病毒是感染植物细胞或植物的物种。

[0052] 在本发明的优选实施方案中,所述RNA病毒是卫星烟草坏死病毒。

[0053] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含至少1个从卫星烟草坏死病毒分离的核酸包装信号。

[0054] 在本发明的优选实施方案中,所述核酸盒包含至少一个核酸包装信号,其中所述核酸包装信号包含核苷酸结合基序AXXA或AXXXA,其中X是任何核苷酸碱基。

[0055] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:

[0056] i) 包含SEQ ID NO:5中所示的核苷酸序列的核酸分子;

[0057] ii) 包含与SEQ ID NO:5 [GGCUGCCCUCAAGGACCAGGGCAGAAAAGAGGAAAAGAAAAGUGAC

AGAACACUUUAAGGAAAAACGUACAAACGUUUUAAGGAAAAAGGAAGCUGCAAUAGCGCAAGGAAUCCGAAAAUUCGGAAAGGAA]中所示的核苷酸序列具有至少25%同一性并且包含核苷酸结合基序AXXA的核苷酸序列的核酸分子。

[0058] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:

[0059] i) 包含SEQ ID NO:6 [GGGCUGCCCUCAAGGACCAGGGCAGAAAAGAGGAAAAGAAAAGUGACAGAACACUUUAAGGAACCACACAAGUGGAAGGAAAAAGGAAGCUGCAAUAGCGCAAGGAAUCCGAAAAUUCGGAAAGGAA]中所示的核苷酸序列的核酸分子

[0060] ii) 包含与SEQ ID NO:6中所示的核苷酸序列具有至少25%同一性并且包含核苷酸结合基序AXXA的核苷酸序列的核酸分子。

[0061] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:

[0062] i) 包含SEQ ID NO:7 [GGGCUGCCCUCAAGGACCAGGGCAGAAAAGAGGAAAAGAAAAGUGACAGAACACUUUAAGGAACCACACAAGUUAAGGAAAAAGGAAGCUGCAAUAGCGCAAGGAAUCCGAAAAUUCGGAAAGGAA]中所示的核苷酸序列的核酸分子

[0063] ii) 包含与SEQ ID NO:7中所示的核苷酸序列具有至少25%同一性并且包含核苷酸结合基序AXXA的核苷酸序列的核酸分子。

[0064] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含选自由以下组成的组的核苷酸序列:

[0065] i) 包含SEQ ID NO:8 [GGGCCCCGCAACAAUGCGGGGAAGGAAGGAAGGAAGAAAACGUACAAACGUUUUAAGGAACAACGCAACAAUGCGUUGAAGGAAGGAAGGGGCGUACAAACGCCCAAGGAAUUUUGCAACAUGCAAAAAAGGAA]中所示的核苷酸序列的核酸分子

[0066] ii) 包含与SEQ ID NO:8中所示的核苷酸序列具有至少25%同一性并且包含核苷酸结合基序AXXA的核苷酸序列的核酸分子。

[0067] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒包含与SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:8中所示的核苷酸序列具有至少30%、35%、40%、45%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列。

[0068] 在本发明的优选实施方案中,所述人工核酸盒还包含转录盒,所述转录盒包含适于转录编码多肽或功能性RNA的核酸的核酸分子。

[0069] 在本发明的优选实施方案中,所述适应是提供启动子序列和终止序列,以使得能够表达编码所述多肽或功能性RNA的所述核酸分子。

[0070] 在本发明的优选实施方案中,所述多肽是治疗性多肽,例如抗体或抗体片段。

[0071] 抗体片段包括编码单链抗体片段的核酸。抗体包括根据常规方法制备的编码人源化抗体和嵌合抗体的核酸分子。嵌合抗体是重组抗体,其中将小鼠或大鼠抗体的所有V区都与人类抗体C区组合。人源化抗体是重组杂交抗体,其将来自啮齿动物抗体V区的互补决定区与来自人类抗体V区的框架区融合。也使用人类抗体的C区。互补决定区(CDR)是抗体的重链和轻链的N-末端结构域内的区域,V区的大部变化限于该区域中。这些区域在抗体分子的表面形成环。这些环提供了抗体与抗原之间的结合表面。

[0072] 在本发明的替代实施方案中,所述功能性核酸是编码治疗性多肽、反义寡核苷酸

或siRNA的mRNA。

[0073] 专门消除广泛接受的基因功能的技术是通过将双链RNA(也称为小抑制性RNA或干扰RNA(siRNA))引入细胞中,导致与所述siRNA分子中包含的序列互补的mRNA破坏。siRNA分子包含彼此退火以形成双链RNA分子的两条互补的RNA链(有义链和反义链)。siRNA分子通常源自将被切除的基因的外显子。许多生物通过激活导致siRNA形成的级联反应来响应双链RNA的存在。双链RNA的存在激活包含RNA酶III的蛋白质复合物,所述RNA酶将双链RNA加工成较小的片段(siRNA,长度约为21-29个核苷酸),所述较小的片段成为核糖核蛋白复合物的一部分。siRNA充当RNA酶复合物切割与siRNA的反义链互补的mRNA的引导,从而导致mRNA破坏。

[0074] 根据本发明的另一方面,提供了病毒样颗粒,其包含根据本发明的人工核酸盒。

[0075] 在本发明的优选实施方案中,所述病毒样颗粒在施用于受试者时具有免疫原性。优选地,所述病毒样颗粒引起类似于对同源天然病毒的免疫响应的免疫响应。

[0076] 在本发明的优选实施方案中,所述免疫响应是抗体响应的诱导,其中所述抗体响应诱导特异性结合天然病毒颗粒的抗体。

[0077] 在本发明的优选实施方案中,所述病毒样颗粒保留细胞嗜性或天然病毒颗粒相比时具有增强的细胞嗜性。

[0078] 根据本发明的另外方面,提供了包含根据本发明的病毒样颗粒的疫苗或免疫原性组合物。

[0079] 在本发明的优选实施方案中,所述疫苗或免疫原性组合物还包含佐剂和/或载体。

[0080] 佐剂(免疫增强剂或免疫调节剂)已在数十年中用来改善对疫苗抗原的免疫响应。将佐剂掺入疫苗制剂中旨在增强、加速和延长对疫苗抗原的特异性免疫响应。佐剂的有利方面包括增强较弱抗原的免疫原性,减少成功免疫所需的抗原量,减少所需加强免疫的频率以及改善老年和免疫受损的已接种疫苗者的免疫响应。选择性地,佐剂还可用于优化所需的免疫响应(例如关于免疫球蛋白类别)和细胞毒性或辅助性T淋巴细胞响应的诱导。另外,某些佐剂可用于促进粘膜表面上的抗体响应。氢氧化铝和铝或磷酸钙已常规地用于人疫苗。最近,掺入IRIV(免疫刺激性重构流感病毒体)的抗原和含有基于乳液的佐剂MF59的疫苗已在各国获得许可。佐剂可以根据其来源、作用机理以及物理或化学性质进行分类。最常用的所述佐剂类别是凝胶型、微生型、油乳剂和基于乳化剂的、颗粒、合成型和细胞因子。最终疫苗产品中可以存在不止一种佐剂。可将它们与疫苗中存在的单一抗原或所有抗原组合在一起,或者可将每种佐剂与一种特定抗原组合在一起。当前正在使用或开发的佐剂的来源和性质高度多样。例如,铝基佐剂由简单的无机化合物组成,PLG是聚合碳水化合物,病毒体可源自不同的病毒颗粒,MDP源自细菌细胞壁;皂苷类源自植物,角鲨烯源自鲨鱼肝,重组内源性免疫调节剂源自重组细菌、酵母或哺乳动物细胞。有几种佐剂被批准用于兽用疫苗,诸如矿物油乳液,它们对人的使用反应性太强。同样,完全弗氏佐剂虽然是已知的最强大的佐剂之一,但不适合人使用。

[0081] 术语载体以以下方式解释。载体是免疫原性分子,当与第二种分子结合时,其可增强对后者的免疫响应。一些抗原不是固有的免疫原性,但当与外来蛋白质分子(诸如匙孔血蓝蛋白或破伤风类毒素)结合时,可以能够产生抗体响应。此类抗原包含B细胞表位,但不含T细胞表位。这种缀合物的蛋白质部分(“载体”蛋白质)提供了刺激辅助性T细胞的T细胞

表位,而辅助T细胞又刺激了抗原特异性B细胞分化为浆细胞并产生了针对所述抗原的抗体。

[0082] 根据本发明的另外方面,提供了包含根据本发明的病毒样颗粒以及包括药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0083] 当施用,将本发明的组合物以药学上可接受的制剂施用。此类制剂可常规地含有药学上可接受的浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容性载体和辅助治疗剂。本发明的组合物可通过任何常规途径(包括注射或随时间逐渐输注)施用。施用可以是例如静脉内、腹膜内、肌肉内、腔内、皮下、透皮或经上皮。

[0084] 以有效量施用本发明的组合物。“有效量”是指单独或与其它剂量一起产生所需响应的试剂的量。在治疗疾病的情况下,所需的响应是抑制疾病的进展。这可能仅涉及暂时减慢疾病的进展,尽管更优选地,其涉及永久性停止疾病的进展。这可通过常规方法进行监控。当然,此类量将取决于所治疗的特定疾病、疾病的严重程度、包括年龄、身体状况、体型和体重在内的个体患者参数、治疗持续时间、当前治疗(如果有的话)的性质、具体施用途径以及在保健医生的知识和专家经验内的类似因素。这些因素是本领域普通技术人员公知的,并且仅通过常规实验即可解决。通常优选地使用单个组分或其组合的最大剂量,即根据合理医学判断的最高安全剂量。然而,本领域普通技术人员将理解,患者可能出于医学原因、心理原因或实际上任何其它原因而坚持较低剂量或可耐受剂量。

[0085] 在前述方法中使用的组合物优选是无菌的,并且包含有效量的根据本发明的剂,以适合于向患者施用的重量或体积单位产生所需响应。可以根据不同的参数,特别是根据所使用的施用方式和受试者的状态来选择向受试者施用的剂的剂量。其它因素包括所需的治疗时间。如果在施用的初始剂量下受试者的响应不足,则可在患者耐受性允许的程度采用更高剂量(或通过不同的、更局部的递送途径施用有效地更高的剂量)。

[0086] 通常,诸如siRNA和反义RNA之类的核酸治疗剂的剂量在1nM与1mM之间。优选地,剂量可在1nM-500nM、5nM-200nM和10nM-100nM的范围内。

[0087] 本领域普通技术人员将知道用于施用组合物的其它方案,其中剂量、注射时间表、注射部位、施用方式等与前述不同。将组合物施用于除人外的哺乳动物(例如,用于测试目的或兽医治疗目的)是在与上述基本相同的条件下进行的。如本文中所示,受试者是哺乳动物,优选地为人,包括非-人灵长类动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物。

[0088] 当施用,以药学上可接受的量和药学上可接受的组合物施用本发明的组合物。术语“药学上可接受的”意指不干扰活性成分的生物活性的有效性的无毒材料。此类制剂可常规地含有盐、缓冲剂、防腐剂、相容性载体和任选的其它治疗剂(例如,通常用于治疗特定疾病适应症的那些)。当在药物中使用,所述盐应该是药学上可接受的,但可将非药学上可接受的盐方便地用于制备其药学上可接受的盐,并且不排除在本发明的范围之外。此类药理学和药药学上可接受的盐包括但不限于由以下酸制备的那些盐:盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。同样,可将药学上可接受的盐制备为碱金属或碱土金属盐,诸如钠盐、钾盐或钙盐。

[0089] 包含根据本发明的剂的药物组合物可包含合适的缓冲剂,包括:盐中的乙酸;盐中的柠檬酸;盐中的硼酸;以及盐中的磷酸。药物组合物还可以任选地包含合适的防腐剂,诸如:苯扎氯铵;氯丁醇;对羟基苯甲酸酯和硫柳汞。

[0090] 组合物可以方便地以单位剂型存在,并且可通过药学领域公知的任何方法制备。所有方法都包括使活性剂与构成一种或多种辅助成分的载体结合的步骤。可将包含根据本发明的剂的组合物以气雾剂的形式施用和吸入。适合于肠胃外施用的组合物方便地包含剂的无菌水性或非水性制剂,其优选与接受者的血液等渗。该制剂可以根据已知方法使用合适的分散剂或湿润剂和助悬剂配制。无菌注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或混悬液,例如如1,3-丁二醇中的溶液。可使用的可接受的溶剂有水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的不挥发油常规地用作溶剂或悬浮介质。为此,可使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外,脂肪酸诸如油酸可用于制备注射剂。适用于口服、皮下、静脉内、肌内等施用的载体制剂可见于 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA。

[0091] 根据本发明的另外方面,提供了根据本发明的用于将剂递送至细胞和病毒样颗粒。

[0092] 根据本发明的方面,提供了用于疫苗接种或免疫受试者以预防或治疗病毒感染的方法,该方法包括施用有效量的根据本发明的病毒样颗粒。

[0093] 在本说明书的整个说明书和权利要求书中,词语“包含(comprise)”和“含有(contain)”以及所述词语的变型,例如“包含(comprising)”和“包含(comprises)”,意为“包括但不限于”,并且不旨在(和不)排除其它部分、添加剂、组分、整体或步骤。“基本上构成”意指具有基本整体,但包括实质上不影响基本整体的功能的整体。

[0094] 在本说明书的整个描述和权利要求书中,除非上下文另有要求,单数形式包括复数形式。特别地,在使用不定冠词的情况下,除非上下文另有要求,否则本说明书应理解为涵盖复数以及单数。

[0095] 除非与其不相容,否则结合本发明的特定方面、实施方案或实例描述的特征、整体、特性、化合物、化学部分或基团被应理解为适用于本文所述的任何其他方面。

[0096] 现在将仅通过实例并参考以下附图来描述本发明的实施方案:

[0097] 图1乙型肝炎病毒

[0098] (a) HBV的遗传图谱,其显示了部分dsDNA基因组和病毒编码的蛋白质的四个开放阅读框架:前核/核(Cp),其形成核衣壳(NC)的壳;Pre S1/PreS2/S,嵌入包膜的HBV抗原(HbsAg);X(在细胞内的HBV生命周期的许多方面都起作用);聚合酶(P)和pgRNA,其中位置为5'ε、冗余的3'ε(灰色圆圈)、Φ和此处研究的优选位点(PS),以圆圈突出显示。(b) HBV NC(左)包含90个(T=3)或120个Cp二聚体(显示为T=4)。Cp二聚体形成特征性的四螺旋束(每个单体两个)在表面上显示为峰(右下)。还显示了产生T=4颗粒所需的HBV Cp二聚体的两个构象体(A/B和C/D)(右上)。HBV衣壳和蛋白质二聚体获自PDB(3J2V)(1)(c)此处使用的分离株的Cp的长度为185个氨基酸(带下划线的RD二肽插入),具有富含α螺旋的区域(长149个氨基酸)和C末端ARD。为了清楚起见,将第149个氨基酸V标记为浅灰色。ARD富含碱性氨基酸,并且丝氨酸(S)是已知的磷酸化位点,其被认为在NC组装中起作用。

[0099] 图2 pgRNA中保守PS基序的鉴定

[0100] (a) 针对参考菌株(NC_003977.1)的来自选定的(灰色实线)和天然的(灰色虚线)文库的适体匹配(伯努利得分 ≥ 12)的频率。在大多数测试菌株中出现的峰均标有X以及在相同位置具有峰的菌株的百分比。在菌株之间具有最高频率和保守水平的峰标记为PS1、

PS2和PS3。(b)从(a)使用Mfold获得的保守的9个伯努利峰周围的序列中茎-环的环序列的比对。这些序列均在单链环中显示RGAG基序。(c)在5个测试菌株的10,000个随机化形式(参见方法中用星号标记的菌株)中,茎环的环部分中基元RGAG出现次数的概率。灰色条显示参考菌株中的这种概率,而黑线则为所有五个菌株的等效值。黑色箭头指示参考菌株的随机化形式中RGAG环的平均出现次数(=6.85)。标记有+4.7 σ 的箭头表示参考菌株中的出现次数(=25),其与平均值相差4.68标准偏差,并且另外的测试菌株的出现水平相似;

[0101] 图3 PS触发序列特异性VLP组装

[0102] (a)使用smFCS分别评估了包含PS1(黑色)、PS2(深灰色)或PS3(浅灰色)的染料末端标记的RNA寡聚物在纳摩尔浓度下结合Cp和形成VLP的能力。如方法中所述,所有反应均包含15nM染料标记的RNA。垂直虚线表示添加Cp的点,最终浓度以nM显示。在添加之间使样品平衡。微弱的痕迹代表实时原始信号,而粗线代表平滑的数据。在添加RNA酶A之前,记录样品的EM图像(右)。比例尺表示100nm。(b)(a)中反应的流体动力学半径分布,在最后添加Cp之后得出的(此处和整个图中)。比较了在RNA(未标记的)不存在和存在的情况下Cp组装超过二聚体的量。在这些反应结束时,用Alexa Fluor-488(方法)标记Cp,并对仅Cp和Cp加上未标记的PS1场景定量所得的R_h分布。注意,Cp二聚体的染料标记会阻止其组装,因此这必须是终点测量。取每个样品的样品用于TEM分析。以一式三份重复smFCS和TEM;

[0103] 图4 T=3和T=4HBV VLP的结构表明了规范其准构象的机制

[0104] (a)T=3和(b)T=4HBV VLP的二十面体平均冷冻EM结构,分辨率分别为5.6Å和4.7Å。红色二十面体被包括来帮助解释所述两个重构,所述两个重构以相同的取向显示。(c和d)显示穿过每个颗粒的结构的~30Å厚的板,每个中都具有合适的Cp-二聚体。T=3的壳较厚,表明对应于ARD的密度在T=3结构而非T=4结构中得以解析。以相等的分辨率呈现两个结构不会改变这种解释(图11);

[0105] 图5 T=4HBV VLP中的不对称RNA特征

[0106] (a和b)通过RELION中基于最大似然的分类计算了42,411个T=4颗粒的2D视图。在这些颗粒的子集中可见不对称RNA特征(b)。(c)10,851个包含不对称特征件的颗粒的分辨率为11.5Å的不对称3D重构。尽管不存在任何对称平均,蛋白质外壳的不对称密度为二十面体的。(d)通过不对称HBV VLP重构的约40Å厚的板显示了与Cp壳的一个区域结合的不对称特征件,揭示了归因于蛋白壳内的RNA和ARD(明亮的樱桃色、品红色和紫色)的密度。使用USCF嵌合体以径向着色方案呈现图形(蓝色=165Å;青色=152Å;绿色=139Å;黄色=126Å;粉红色=113Å)。(e)不对称RNA密度位于Cp二聚体下方,该Cp二聚体围绕T=4颗粒的5倍顶点之一(由圆圈表示)。使用USCF嵌合体中的“适合地图(Fit in map)”功能,将单个Cp二聚体作为带状图安装到适当的位置。(f)当地图的正面被抹去时,显示出内部的密度。以带状图显示并手动安装的是单个拷贝的PS1(在RNA Composer中建模的)。(g)图的一部分的侧视图,其中视图由投影的蓝色圆圈定向。在Cp层与RNA密度之间可见离散密度指,所述离散密度指大到足以容纳2-4个RNA寡核苷酸。(h)从包含PS1 HBV VLP的网格上的630个单独的荧光点开始的光漂白步骤的直方图。包含>10个步骤的斑点是由表现出指数衰

减的痕迹引起的,假定所述痕迹是其中同时发生多个漂白步骤的聚集体。以一式两份进行光漂白;

[0107] 图6 HBV NC组装的建议模型

[0108] Cp二聚体中的ARD抑制多个二聚体中的二聚体形成,这是通向NC组装的途径上的第一个中间体。通过磷酸化或PS RNA结合减少ARD上的净电荷,允许该结构更容易地形成,从而触发NC形成。在高于模拟如此处所用的体内条件的那些浓度的浓度下,二聚体形式中的未修饰的二聚体和颗粒在没有RNA的情况下自组装,或将会非特异性结合RNA以产生相同的结果;

[0109] 图7表征来自大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 的HBV VLP和SELEX方案 (a) 从大肠埃希氏菌纯化的Alexa Fluor-488标记的HBV VLP的流体动力学径向分布和负染色EM图像。峰值产量的积分表明, $T=4$ (圆形, 63%) 和 $T=3$ (圆形, 37%) VLP的比率约为2:1。比例尺表示100nm。(b) 显示对HBV 185Cp具有高亲和力的适体的选择的SELEX方案。将HBV VLP固定在羧酸磁珠 (圆形) 上, 并使用氯化胍将其离解为Cp二聚体 (灰色矩形)。通过重复与这些珠粒结合、分配和扩增的循环, 可富集包含随机区域 (40N) 的RNA库的对Cp具有亲和力的序列。每一轮的阴性选择使用已用NHS-EDC处理并用Tris灭活的羧酸珠粒。在第5轮之后, 通过将阳性磁珠的数量减少一半并将洗涤次数从8次增加到10次, 来提高严格性。通过天然PAGE分析每轮结束时的逆转录酶-PCR产物, 以确认用于下一轮选择的产物的分离。将第10轮产物转化为DNA并测序;

[0110] 图8 PS寡聚物结构、示例性smFCS迹线和包含VLP的PS的EM

[0111] (a) 在Mfold中预测了使用VARNA软件 (2) 制作的PS1-3和 ϵ 二级结构。在以下位置处从HBV基因组NC_003977.1获取优选位置: PS1₍₁₇₁₇₋₁₇₅₁₎、PS2₍₂₆₀₂₋₂₆₃₃₎ 和PS3₍₂₇₆₅₋₂₇₉₈₎。为了使它们都具有相同的长度 (47个核苷酸), 以避免电荷差异的影响, 进行了以下添加: PS1, 5'-GGGUUUUGG和CCC-3'; PS2, 5'-GGGUUUUGGGG和CCCC-3'; PS3, 5'-GGGUUUUGG和CCCC-3'。共有基序RGAG在每个环中以红色突出显示。如通过Mfold所预测的, 每个RNA折叠的稳定性显示在每个结构下方。

[0112] (b) 示例性smFCS测定。在于固定时间点 (垂直虚线) 滴定Cp之前和之后测定荧光标记的RNA的 R_h 值, 从而允许 R_h 值在每个步骤之后达到平衡。微弱的红色迹线代表实时原始信号, 而粗红线代表平滑的数据。PS1 R_h 最初缓慢上升, 直到达到阈值Cp浓度, 如通过测量Alexa-Flour 488标记的来自大肠埃希氏菌的HBV颗粒确定的 (图7a), 这触发了快速组装成 $T=3$ 或 $T=4$ VLP ($R_h \sim 24-32$ nm, 橙色虚线)。在每次滴定结束时, 通过添加RNA酶A攻击形成的复合物。未改变的 R_h 被假定为意指测试RNA已被包封在封闭的VLP中。发生这种情况的时间范围显示在右下方。

[0113] (c) 图3中PS1、2、3以及单独的Cp和未标记PS1的组装反应的TEM。单独的Cp和未标记的PS1 TEM中的大的白色颗粒是胶乳珠粒。还呈现了表2中描述的空颗粒组装的TEM。在RNA不存在的情况下在高得多的Cp浓度 (1.5 μ M) 下组装这些空的HBV颗粒。比例尺表示100nm。

[0114] 图9 PS1变体的smFCS测定

[0115] (a) PS1变体 (左上方的结构) 的smFCS分析以及以2nm的分箱绘制的并用下方的高斯峰拟合的伴随的流体动力学径向分布, 如按键中的颜色编码的。测试了15nM PS1 (黑色)、

PS1环突变体(灰色)、凸起突变体(深灰色)和 ϵ (浅灰色)RNA在单分子条件下形成VLP的能力。垂直虚线表示添加Cp的点,最终浓度以nM显示。在添加之间使样品平衡。加入RNA酶A以检查正确形成的颗粒。在此处和整个该图中,在添加RNA酶A之前取样以通过TEM分析(示于右边)。(b)-与(a)中的RNA寡聚物PS1(黑色虚线)、L1、L2和L3相同。(c)-与(a)中的RNA寡聚物PS1(黑色虚线)、L4(深灰色)、L5和B1一样(d)与(a)中的RNA寡聚物PS1(黑色虚线)和DNA寡核苷酸PS1(灰色)一样。比例尺表示100nm。对各批纯化的Cp重复每个图中的PS1对照(黑色虚线),以解释所看到的组装效率的变化。以一式三份重复smFCS和TEM。

[0116] 图10 ARD的一种或多种作用及其组装费用

[0117] (a)具有Cp(浅灰色)和Cp₁₄₉(灰色)的15nM的PS1的smFCS分析,以及以2nm的箱绘制的并用下面的高斯峰拟合的伴随的流体动力学径向分布。显示了颗粒的EM图像(右)。(b)与(a)中的PS1和Cp(黑色)一样,预先平衡激酶和Cp并将其添加到PS1(1灰色)中,以及同时添加PS1和Cp与激酶(深灰色)。TEM示于右边。比例尺表示100nm。对各批纯化的Cp重复每个图中的PS1对照(黑色),以解释所看到的组装效率的变化。以一式三份重复smFCS和TEM。

[0118] 图11 T=4和T=3 VLP中的ARD结构。

[0119] 贯穿4.7Å的平均二十面体的T=4颗粒(左)、针对7Å进行低通滤波的相同T=4结构(中)、5.6Å的T=3颗(右)的结构(板(~30Å厚))。Cp二聚体嵌入每一个中。即使在分辨率稍低于T=3 VLP的情况下,T=4 VLP中也没有ARD的等效密度,这证实了每个颗粒中的构象都不同。

[0120] 图12:STNV系统。(A)沿五重轴观察的STNV T=1衣壳(左侧,PDB 3S4G)的带状图,突出显示了三聚体的壳粒(深灰色),右侧为CP单体(深灰色,PDB 3S4G)。显示并标记了此处突变的侧链。N端无序氨基酸序列显示为虚线,紧接前25个氨基酸的序列。(B)127nt5' STNV-1基因组片段的序列和假定的二级结构,显示PS SL的位置,从5'至3'分别命名为PS1至5。每个在其环中都包含CP识别基序-A.X.X.A-(白色圆圈,黑色轮廓)。上面类似地显示了B3适体。在此处和贯穿全文,如所指示的对核苷酸进行颜色编辑(另请参见图22)。(C)示例性smFCS测定。在固定时间点(垂直虚线)在STNV CP滴定之前和期间测定不含CP的荧光标记的RNA的Rh值(PS1-5为黑色线,B3为红色线),从而在每个步骤之后使Rh值达到平衡。PS1-5 Rh最初会塌陷,最多塌陷30%,直到CP浓度达到阈值为止,触发协同组装成T=1 VLP(Rh~11nm)。在每次滴定结束时,通过添加RNA酶A攻击形成的复合物。未改变的Rh被假定为指示RNA存在于封闭的VLP中。

[0121] 图13:定义CP识别基序。(A)由沉降速度确定的变异B3 RNA的整体(Ensemble)再组装效率(按插图对变异RNA进行颜色编码)。预期的T=1 VLP以~42S沉积。(B)代表性组装产物的EM图像,此处和整个图中的比例尺=50nm,另请参见图17B。(C)图(D)中绘制的变体RNA smFCS竞争性测定的结果的图示。(D)在添加100倍摩尔过量的竞争剂变体RNA后,用1nM AF488标记的B3形成的壳粒(~5nm)的Rh(%)的变化(从上至下的环序列表示图中从左至右的条块);

[0122] 图14:组装的静电相互作用和协同作用。将野生型或R8A CP滴定到B3(1nM)或PS1-5(10nM)中,并监测Rh变化。滴定点分别显示在上方(B3呈灰色)和下方(PS1-5)。(B)将野生型STNV CP滴定到10nM的PS1-5、PS1-3、PS3-5或PS2-4的每一种中;

[0123] 图15:合成盒的组装。(A) PS1-5、合成的稳定的PS1-5以及所有PS3盒的序列、假定的二级结构和折叠自由能(图22)。具有正折叠自由能的SL不能被Mfold折叠。(B)所有变体PS1-5构建体的STNV CP滴定,条件如图14所示。插图-具有PS1-5(黑色)、合成的稳定的PS3(浅灰色)RNA的产品的EM图像;

[0124] 图16:利用基因组嵌合体的组装测定:(A) STNV-1基因组(黑色)和经修饰的变体合成的稳定的PS1-5+ Δ 1-127STNV-1(底部)和不稳定的PS1-5+ Δ 1-127STNV-1(中间)的示意图。(B)将STNV CP滴定至1nM的STNV-1(黑色)、合成的稳定的PS1-5+ Δ 1-127STNV-1(浅灰色)或不稳定的PS1-5+ Δ 1-127STNV-1(深灰色)中,并使用smFCS监控所得 R_h 。重组 $T=1$ 颗粒的 R_h 用橙色表示。(C)将滴定图(B)上在4000秒与6500秒之间的数据的流体动力学半径绘制为分布。(D)来自(B)的产品的EM图像;

[0125] 图17(A-C):B3变体的组装行为。(A)所有B3变体的Mfold结构;在每种结构下给出环序列。(B)4.3 μ M浓度下的B3变体组装体的EM图像。显示的比例尺为100nm。B中的图位置对应于A中等效位置中的SL。(C)使用B3内部变体RNA通过svAUC比较STNV CP重组效率。以1:3的RNA:CP比率、4.5 μ M的终CP浓度进行重组反应。(D-F):B3变体-壳粒竞争性测定。(D)使用15nM STNV CP和5nM Alexa Fluor 488标记的B3形成 \sim 5nm R_h 的壳粒。通过smFCS测量了1200s。此时,加入100倍摩尔过量的B3变体GUUG(浅灰色)、GUUU(黑色)或UUUG(深灰色),并追踪 R_h 变化1800s。然后将原始数据用于计算 R_h 的百分比变化(图13C和图13D)。(E)与(D)中的B3变体AUUA(深灰色)、AUUU(灰色)或UUUA(浅灰色)一样。(F)与(D)中的B3变体AUUG(深灰色)、GUUA(灰色)或未标记的B3(黑色)一样;

[0126] 图18:STNV CP电荷变化突变体的表征:(A)在大肠埃希氏菌中表达的电荷变化突变体的SDS PAGE,红色箭头指示STNV CP带。(B)从大肠埃希氏菌纯化的电荷变化突变体的svAUC。仅分析产生足够VLP的突变体(野生型,R8A和R8D(虚线[称为R8D']));

[0127] 图19:具有单个或多个包装信号的STNV CP电荷变化突变体的组装行为。(A)顶部:将野生型R8A、R8D R14K17A或R14K17D滴定至1nM B3中,并如图14所述监测所得流体动力学半径。中间:来自上图(显示为利用0.5nm的箱大小的分布)的 R_h 值用高斯峰拟合以突出显示整个反应过程中溶液中存在的异质性。 $T=1$ 颗粒的 R_h 用橙色虚线表示。底部:上述反应的EM图像(从左上至右下;野生型、R8A、R8D、R14K17D、R14K17A)。(B)与(A)中相同,但将CP滴定至10nM PS1-5中;(从左上到右下;野生型、R8A、R8D、R14K17A、R14K17D),

[0128] 图20:三个PS片段的组装行为。顶部:利用2nm的箱大小以分布图绘制的并用高斯峰拟合的对应于来自图14B的STNV CP与PS 1-5(黑色)、PS 1-3(深灰色,左)、PS 3-5(黑色,左)和PS 2-4(浅灰色)之间的3000秒至4000秒反应的 R_h 值。底部:来自图14的反应的EM图像;

[0129] 图21:三个PS片段的稳定结构。通过Mfold预测的PS1-3、PS2-4和PS3-5的最稳定结构。颜色编码如图12和整个图中所见。两个主要PS1-3折叠主要呈现两个-A.X.X.A-SL,然而对于协作组装而言,这些距离似乎太远了。PS2-4呈现两个SL,一个具有-A.X.X.A-基序,另一个与另外的一个相距4nt。PS3-5的两个主要折叠也呈现两个SL,然而虽然这些SL紧邻(10-12nt),但只有一个在6%的时间呈现-A.X.X.A-基序;

[0130] 图22:127聚体盒结构。上图:如由STNV野生型PS 1-5基因片段及其合成对应物的Mfold确定的序列、假定的二级结构和折叠自由能。下图:比较如由Mfold测定的每个SL的相

对折叠自由能的表。寡聚物的颜色编码如图12所示；

[0131] 图23:127聚体组装盒的结构和稳定性的询问。(A) 在增加的Ca²⁺浓度下, RNA寡核苷酸WT PS1-5 (正方形)、稳定的PS1-5 (圆形)、不稳定的PS1-5 (三角形)、所有PS3 (倒三角形) 和合成的稳定的PS1-5 (菱形) 在260nm处的摩尔椭圆率。(B) 在RNA寡核苷酸的热熔过程中在260nm处的摩尔椭圆率, 颜色编码如(A)中所示；

[0132] 图24:合成127聚体盒的组装行为。(A) 如图19中绘制的, 来自图15A的包含STNV CP与PS 1-5 (黑色)、稳定的PS 1-5 (深灰色)、不稳定的PS 1-5 (灰色)、所有PS3 (红色) 或合成的稳定的PS1-5 (浅灰色) 的3000-4000秒反应中的R_h值。(B) 以上反应的EM图像, 颜色编码如图15A中所示；

[0133] 图25:基因组嵌合体的组装行为。(A) 使用STNV-1基因组RNA的smFCS再组装。在STNV CP滴定之前和期间(垂直虚线) 测量R_h值, 使R_h值, 使R_h值在每个步骤后达到平衡。STNV-1基因组最初塌陷高达约~30%, 然后R_h恢复到对应于T=1 VLP的值(R_h~11nm)。(B) STNV-1 (黑色)、合成的稳定的PS1-5+ Δ 1-127STNV-1 (浅灰色) 与不稳定PS1-5+ Δ 1-127STNV-1 (灰色) 之间的组装的QELS测量的光散射数据, 其中从TSKgel G6000PWx1 SEC色谱柱(Tosoh) 洗脱STNV CP。峰面积和测得的R_h值列于表6中。(C) 主峰(~20分钟) 中VLP的EM图像。

[0134] 表1:如通过ESI-MS质谱确定的所使用的不同形式的Cp和激酶(SRPK Δ) 的质量

	预期质量(Da)	观察到的质量(Da)
[0135] SRPKΔ	45615.4	45614.7 ± 1.37
磷酸化的 Cp ₁₈₅	21995.4	21995 ± 0.71
[0136] Cp ₁₈₅	21395.3	21395.6 ± 0.86
Cp ₁₄₉	16852.3	16851.7 ± 0.06

[0137] 表2:Alexa-Fluor-488标记的PS1与Cp的缔合。

[0138] 使用各向异性来确定15nM的Alexa-Fluor-488标记的RNA PS寡聚物是否可以结合或进入125nM的Cp预制壳。后者是通过在不存在高浓度RNA的情况下再组装而形成的(3) (图8c)。荧光偏振值受染料标记的种类的质量影响(4)。如预期的那样, PS1寡核苷酸的极化值在添加RNA酶后下降, 但当掺入在寡核苷酸存在下组装的VLP中时, 极化值保持不变。当将标记的PS1添加到空Cp VLP中时, 其荧光发射不受影响, 表明其未被淬灭, 并且对RNA酶仍然敏感, 确认了其不结合蛋白壳的外部或被内化。

样品	荧光偏振		总计 荧光	
	-RNA 酶	+RNA 酶	-RNA 酶	+RNA 酶
[0139] PS1 寡核苷酸	72	43.5	73637	74102
PS1 VLP	130	128	30187	33564
PS1 + 空 VLP	52.8	15.5	69336	70672

[0140] 表3:PS1变体寡核苷酸L1-5和B1的序列变化和相应的组装行为。组装行为如下所示,第一个“+”表示RNA-Cp结合,第二个表示T=3/T=4大小的种类的形成,第三个表示RNA酶保护作用。“-”表示该测定法的失败。

RNA 寡聚物	环	凸起	组装行为	注释
PS1	GGGAGG	GGG	+++	
L1	UUUAUU	GGG	+ - -	环 G 是重要的
L2	GUUAGG	GGG	+ - -	环 G 是重要的
L3	UGGAUU	GGG	+ + -	环 G 是重要的
L4	GGGUGG	GGG	+ + -	环 A 是重要的
L5	GGGGGG	GGG	+ + -	环 A 是重要的
B1	GGGAGG	AAC	+ + -	凸起序列/结构
				是重要的

[0143] 表4:B3序列变体。B3序列变体的环基序(左)、全序列(中)和折叠自由能值(右)。

环基序	序列	折叠的 ΔG (kcal mol ⁻¹)
ACAA	ACAUGCAACAAUGCACAC (SEQ ID NO 10)	-2.6
AUUU	ACAUGCAAUUUUGCACAC (SEQ ID NO 11)	-2.6
UUUA	ACAUGCAUUUAUGCACAC (SEQ ID NO 12)	-2.6
GUUU	ACAUGCAGUUUUGCACAC (SEQ ID NO 13)	-2.1
UUUG	ACAUGCAUUUGUGCACAC (SEQ ID NO 14)	-2.9
AUUG	ACAUGCAAUUGUGCACAC (SEQ ID NO 15)	-2.6
GUUA	ACAUGCAGUUAUGCACAC (SEQ ID NO 16)	-3.4
GUUG	ACAUGCAGUUGUGCACAC (SEQ ID NO 17)	-2.5
AUUA	ACAUGCAAUUAUGCACAC (SEQ ID NO 18)	-2.6

[0145] 表5:RNA组装盒的次优结构分析。使用Mfold折叠每个暗盒,其中次优设置为500。然后通过以下标准评估这些折叠:PS 1至5中的正确的-A.X.X.A-环的存在得到了验证,并以百分比显示(整个表中绿色=60+,橙色=40+,红色0-39)。测量每个茎环之间的核苷酸间距,将其与预期值进行比较(图22),并以百分比显示。如果这些间距不同,则给出最大核苷酸差异。

盒	正确显示的-A.X.X.A-基序%					“正确”间距%				最大间距差异
	PS1	PS2	PS3	PS4	PS5	1-2	2-3	3-4	4-5	
WT PS1-5	72	0	8	0	10	8	0	0	0	+7
[0146] 合成的 稳定的 PS1-5	100	87	100	75	73	9	69	76	72	+7
稳定的 PS1-5	100	87	99	68	31	5	72	55	66	+7
不稳定的 PS1-5	98	97	0	73	27	73	0	0	67	+7
所有	100	99	100	100	100	92	90	100	90	+4

PS3										
[0147] PS1-3	78	2	9	N/A	N/A	0	0	N/A	N/A	N/A
PS2-4	N/A	0	2	0	N/A	N/A	0	0	N/A	+3
PS3-5	N/A	N/A	34	4	6	N/A	N/A	0	0	N/A

[0148] 表6:QELS实验的产率和 R_h 值。取自从TSKgel G6000PWx1柱洗脱的主峰(20分钟,图25)的中点的测量的 R_h 值。通过使用Origin Pro 9中的峰分析器功能对主峰下的面积(20分钟,图25)进行积分来计算基因组嵌合体再组装的产率。然后将产率针对最高值进行标准化并显示为百分比。

样品	R_h 值/nm	相对产率/%
STNV-1	9.1	80
[0149] 不稳定的 PS1-5 + Δ 1-127 STNV-1	8.9	40
合成的稳定化的 PS1-5 + Δ 1-127 STNV-1	9.3	100

[0150] 表7:RNA寡核苷酸引物

[0151]

引物名称	序列 5'-3'	SEQ ID NO	Tm °C
正向	GACATTAATACGACTCACTATAGGGA CATGCA	19	65.5
AUUArev	GTGTGCATAATTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	20	68.2
GUUGrev	GTGTGCACAACACTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	21	70.0
AUUGrev	GTGTGCACAATTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	22	69.5
GUUArev	GTGTGCATAAACTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	23	69.5
UUUArev	GTGTGCATAAAATGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	24	68.2
AUUUrev	GTGTGCAAAATTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	25	68.2
GUUUrev	GTGTGCAAAACACTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	26	69.5
UUUGrev	GTGTGCACAAAATGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	27	69.5

[0152]

ACCArev	GTGTGCATGGTTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	28	64.3
AAArev	GTGTGCATTTTTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	29	62.0
AGGrev	GTGTGCATCCTTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	30	64.0
AUGrev	GTGTGCATCATTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	31	62.9
AGUrev	GTGTGCATACTTGCATGTCCCTATAG TGAGTCG	32	62.5
不稳定的 1-5 正向	AGTAATACGACTCACTATAGGGGGG CTGCCCTCAAGGACCAGGGCAGAA AAGAGGAAAAGAA	33	62
不稳定的 1-5 模板	GGCAGAAAAGAGGAAAAGAAAAGT GACAGAACACTTATAAGGAAATACA CAAGTATAAGGAAAAAAGGAAGCT GCAATAGCGCAAGGAA	34	62
不稳定的 1-5 反向	TTCCTTTCCGAATTTTCGGATTCCTT GCGCTATTGCAGCTT	35	62
所有 PS3 正向	GGGCCCGCAACAATGCGGGGAAG GAAGGAAGGAAGAAAACGTACAAA CGTTTT	36	65
所有 PS3 模板	AGAAAACGTACAAACGTTTTAAGGA ACAACGCAACAATGCGTTGAAGGA AGGAAGGAAGGGGCGTACAAACGC CCCAAGGAATTTT	37	65
所有 PS3 反向	TTCCTTTTTTGCATTGTTGCAAATT CCTTGGGGCGTTTGTACGC	38	65
稳定的 1-5 模板	GGCAGAAAAGAGGAAAAGAAAAGT GACAGAACACTTATAAGGAACCACA CAAGTGGAAGGAAAAAAGGAAGCT GCAATAGCGCAAGGAA	39	62
合成的稳 定的 1-5 模 板	GGCAGAAAAGAGGAAAAGAAAAGT GACAGAACACTTATAAGGAAAAAAC GUACAAACGUUUUAAGGAAAAAAG GAAGCTGCAATAGCGCAAGGAA	40	62
PS1-5 正向	AGTAATACGACTCACTATAGGGAGTA AAGACAGGAACTTTACTGACTAAC ATGGCAAAC	41	62
PS1-5 模板	ACTGACTAACATGGCAAACAACAG AACAAACAGGCGAAAATCCGCAACA ATGCGTGCAGTGAAGCGCATGATAA	42	62

	ATACAC		
PS1-5 反向	TCAGTGCAAACCTTTTATGCTCCAA GTGTGTATTTATCATGCGCT	43	62
PS1-3 正向	AGTAATACGACTCACTATAGGGAGTA AAGACAGGAACTTTACTGACTAAC ATGGCAAAC	44	61
PS1-3 模板	ACTGACTAACATGGCAAACAACAG AACAAACAGGCGAAAAT	45	61
PS1-3 反向	CGCATTGTTGCGGATTTTCGCCTGTT GT	46	61
[0153] PS2-4 正向	AGTAATACGACTCACTATAGGGTGGC AAAACAACAGAACAACAGGCGAAA AT	47	58
PS2-4 模板	AACAGAACAACAGGCGAAAATCCG CAACAATGCGTGCAGTGAAGCGCAT GATAAATA	48	58
PS2-4 反向	CCAAGTGTGTATTTATCATGCGCTTC ACTGCACGCATTGTTGCGG	49	58
PS3-5 正向	AGTAATACGACTCACTATAGGGCCGC AACAATGCG	50	61
PS3-5 模板	CCGCAACAATGCGTGCAGTGAAGCG CATGATAAATACAC	51	61
PS3-5 反向	TCAGTGCAAACCTTTTATGCTCCAA GTGTGTATTTATCATGCGCT	52	61

[0154] 材料和方法

[0155] 所使用的蛋白质的克隆、表达和纯化

[0156] 我们获得了表达大肠埃希氏菌Cp的质粒(Nicola Stonehouse教授的礼物),已知该质粒可产生含有宿主RNA的组装HBV VLP(5)。与当前的GenBank参考菌株(NC_003977.2)相比,编码的Cp具有以下氨基酸序列差异:A61、E77-FAGAS(单字母氨基酸代码)-D78插入、S92N、F102I、I121L、R156-RD-R157插入。由于野生型C61已参与组装(6),因此在BL21(DE3)大肠埃希氏菌细胞中于PET28b质粒中表达之前,这已恢复为该基因。插入的FAGAS表位也被去除。在0.60D下用1mM IPTG诱导,然后在21℃下生长20小时。使用Soniprep 150在冰上以5x 30秒的爆裂来裂解细胞。然后通过以11,000g旋转1小时来使裂解物澄清。然后通过以120,000g离心14小时来沉淀VLP,将其重悬于20mM Hepes(pH 7.5),250mM NaCl和5mM DTT中,然后加载至填充有25ml Capto™core 700树脂(GE Life Sciences)的XK50柱上。合并含有VLP的级分,并用40%(w/v)硫酸铵沉淀。Cp在SDS-PAGE上显示为纯的,其身份和变体身份已通过质谱法确认(表1)。通过诱变(Q5定点诱变试剂盒,NEB)产生并类似地制备缺乏ARD的Cp,即Cp₁₄₉。注意,在大肠埃希氏菌中表达的Cp₁₄₉ VLP缺乏明显的衣壳化细胞RNA。通过负染色透射电子显微镜检查(TEM)使VLP可视化。全长Cp VLP另外地通过蔗糖密度梯度纯化,然后在室温下于200mM碳酸钠缓冲液(pH 8.3)中使用Alexa Fluor-488 SDP酯(Invitrogen)

进行染料标记,历时4小时,然后在NAP5柱上脱盐。梯度上有两个重叠的VLP峰,无法将它们分开。TEM和smFCS确认它们是预期的T=3和T=4壳,其中后者是主要形式(图7a)。已显示Cp区域140-148是形态的决定因素,较短的形式产生更多的T=3壳(7)。在位置157处邻近接头区域的二肽插入可能会改变Cp的特性。然而,当我们去除RD插入并产生Cp₁₈₃时,我们发现在RNA结合、与PS RNA形成VLP的能力或对形成的占优的准构象壳(quasi-conformer shell)的偏好方面与Cp₁₈₅无差异。由于将较长的Cp用于SELEX和高分辨率EM工作,因此这些数据是贯穿全文显示的数据。

[0157] 如先前所述(除解离是在pH 9.5下进行而不是在pH 7.5下进行外),将用于组装测定的所有HBV变体从VLP解离成蛋白质二聚体(3)。这是在完全蛋白酶抑制剂片剂(ThermoFisher Scientific)存在的情况下完成的。通过紫外线吸光度测定HBV核心二聚体浓度。A260:A280比率约为0.6或更低的级分用于组装测定。如前所述,从pRSETb质粒表达并纯化了SRPK Δ 激酶(8)。

[0158] SELEX方案

[0159] 按照制造商的方案,将纯化的HBV衣壳(~360μg)固定在6mgM270羧酸Dynabeads(ThermoFisher Scientific)上。用选择缓冲液(25mM Hepes, pH 7.5, 250mM NaCl, 2mM DTT, 不含EDTA的完全蛋白酶抑制剂)洗涤珠粒两次,并用15m 50mM Tris-HCl pH 7.4洗涤液封闭未反应的N-羟基琥珀酰胺。用选择缓冲液将珠粒再洗涤三遍。将固定的衣壳与0.5M LiCl₂中的2M氯化胍一起孵育30分钟进行解离。然后将珠粒用B&W缓冲液(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 2M NaCl)洗涤3次,然后用选择缓冲液洗涤3次。将珠粒重悬于选择缓冲液中,以使珠粒浓度为10mg/mL。阴性选择珠也以相同的方式(但没有衣壳)制备。如前所述(9),使用合成的组合N40 2'OH RNA文库(~10²⁴个潜在序列)在体外进行了10轮SELEX。然后在Illumina MiSeq平台上对第10轮的扩增DNA进行下一代测序。这产生了~1.6M的序列读取,其中一个序列出现65,802次,并且有1149个具有100或更高的多重性的适体。该适体库中四个核苷酸的总频率为A34.30%、C9.09%、G40.97%及U15.64%,并与为A26.10%、C22.03%、G24.64%及U27.22%的未选择的天然文库的相同数据进行比较。后一个池中序列的最高多重性为4。这些数据证实发生了从天然库中的选择,并且所选适体的碱基组成与HBV基因组中鉴定的RGAG基序一致。

[0160] PS鉴定

[0161] 使用实验室HBV株(*NC_003977.1)进行PS鉴定。适体文库包含1,664,890个独特序列,每个序列的长度为40nt,已如下将所述序列与基因组进行比对:将每个适体序列以1nt的增量沿基因组滑动。对于参考框的每个这样的位置,根据伯努利得分B来鉴定与基因组最佳比对的适体序列的亚组,所述分数将非连续比对的概率作为B个核苷酸的连续比对的概率的基准。从最大分数开始,对文库中给定的适体序列的所有参考框架的伯努利得分进行排序,并计数所有伯努利得分达到12的与基因组的匹配。然后针对另外的适体序列重复该过程,并添加相应的匹配,从而在图2a中产生峰。

[0162] 共有基序的鉴定

[0163] 从GenBank中找到的750个完整HBV基因组中随机提取具有以下登录号的HBV基因组序列:将KCS10648.1、*AF223955.1、AY781181.1、*AB116266.1、AB195943.1、KR014086.1、*KR014072.1、KR014055.1、KR013939.1、KR013921.1、KR013816.1、

KR013800.1、EU796069.1、Ab540582.1以及NCBI HBV (GenBank序列标识符*NC_003977.2) 和实验室菌株 (GenBank序列标识符NC_003977.1) 添加到整体中。图2c中用于统计分析的序列标有星号。在至少80%的这16个HBV菌株变体中彼此之间最多10nt内出现的伯努利峰在图2a中用绿色叉标记,以表明它们的保守性。为了鉴定假定的PS识别基序,我们从三个代表性菌株 (AF223955.1、NC_003977.1、&NC_003977.2) 提取了以每个伯努利峰的核苷酸为中心的60nt的序列,并通过Mfold (10) 确定了所有可能的具有负自由能的茎环。我们对这些茎环进行了相似性分析,比较了序列和结构元件,我们鉴定了每个代表性峰区域,所述峰区域与同一基因组中的另外的峰区域中的二级结构元件和对应于另外菌株中的同一峰区域的茎环具有最高程度的相似性。这为每个峰返回了茎环。相应的环序列的比对示于图2b中。

[0164] RNA染料标记

[0165] PS1、PS2和PS3 (长47个核苷酸) 购自Integrated DNA Technologies,具有5' C6-氨基。为了标记RNA,将6 μ L RNA (200 μ M) 与1 μ L 1M的硼酸钠缓冲液 (pH 8) 和3 μ L 10mM Alexa-488-SDP (ThermoFisher Scientific) 混合,并在室温下滚动4小时。然后将10 μ L 2x变性加样染料添加到RNA中,煮沸5分钟,然后加载到预热的变性PAGE上。凝胶提取RNA,进行异丙醇沉淀,最后重新悬浮在DEPC-H₂O中,并于-80 $^{\circ}$ C冷冻直至需要。

[0166] 组装测定

[0167] 通过将解离缓冲液 (50mM Tris (pH 9.5), 1.5M GuHCl, 500mM LiCl和5mM DTT) 中的HBV Cp在25 $^{\circ}$ C下加入到15nM的包含20mM Hepes (pH 7.5), 250mM NaCl, 5mM DTT和0.05% (v/v) Tween-20的再组装缓冲液中的Alexa-488标记的RNA,来进行组装反应。连续添加二聚体直至通过测得的R_h值平台认为组装完成,但从未超过总反应体积的10%。Cp的每次添加由滴定图中的垂直灰色虚线标记,并且预期的T=3和T=4颗粒的流体动力学半径 (如针对在大肠埃希氏菌中表达的染料标记的颗粒所测定的) 由图中的橙色水平虚线标记。

[0168] 在整个反应中进行手动混合会在开始FCS数据收集时造成约1分钟的延迟。使用定制的FCS设置以每自相关函数 (CF) 30秒数据累积进行FCS测量。各个CF分解为三重态弛豫和扩散 (以扩散时间TD为特征) 分量,并将后者转换为表观流体动力学半径R_h (11)。在每次测量结束时采集TEM样品。使用Origin Pro-8中的FFT滤波器以35%的截止百分比对R_h随时间的曲线 (细虚线) 进行平滑处理 (粗实线)。R_h分布图也使用Origin Pro-8软件拟合至正常的单峰或多峰高斯函数。将用于负染色TEM分析的样品放在辉光放电的碳涂覆盖的formvar 300目Cu网上。将网用2%醋酸铀染色并干燥。

[0169] 组装颗粒的标记

[0170] 如在smFCS实验中一样进行组装。特别地,将Cp滴定到具有和无15nM未标记PS1的再组装缓冲液中,终浓度为250nM。将其在室温下孵育1小时,然后通过透析进行缓冲液交换以除去存在的盐酸胍。然后通过加入Alexa Fluor-488 SDP酯 (染料与Cp二聚体的比例为1:50) 并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜来进行蛋白质标记。然后通过smFCS在30s的分箱中测量所得样品100分钟,并将R_h数据如上绘制在流体动力学径向分布图中。然后取出样品用于通过TEM的分析。标记后,Cp二聚体变为不能组装,因此在实时组装期间无法跟踪Cp。

[0171] 光致漂白

[0172] 如smFCS组装测定中所述,组装包含Alexa-488标记的PS1的HBV VLP。在这些条件下,如根据FCS实验中的荧光猝灭和光子计数所判断的,所有RNA均与蛋白质结合。然后将

VLP加到两个辉光放电照射的碳/Formvar 300目网(Agar Scientific)上,一个网用2% (w/v) 醋酸铀染色,并用Jeol 1400显微镜以40,000x放大倍数观察。将剩下的未染色的网以Formvar面朝下放置在干净的显微镜盖玻片上,然后安装在倒置的TIRF显微镜上。调节激光(Coherent Sapphire, 488nm, 25mW) 功率以在几分钟的时帧内激发并光致漂白标记的RNA。使用emCCD相机(Andor iXon)以0.2秒的曝光和200的em增益拍摄连续图像。每个系列均使用未曝光的视野。

[0173] 使用先前描述的程序在收集的帧中识别荧光点,并将其转换为时间迹线(12)。然后根据光致漂白步骤的数量对它们进行检查和分类。将具有确定步骤数的迹线的频率汇于直方图中。每个视场的几个亮点表现出连续的强度衰减,推测代表了较大的聚集体。这些用于估计总体光致漂白速率(每帧0.003),并正式包含在直方图中,表示10个步骤。将没有分箱代表连续事件的直方图建模为二项分布的加权总和,其可达到四倍的占有率,并且从UV-Vis光谱估计的标记概率为0.56。

[0174] 电子显微镜重构

[0175] 大规模VLP准备

[0176] 将smFCS实验按比例放大到96孔板中。使用两个96孔板(Non-Binding Surface, Corning)。如前所述标记PS1 RNA并如上所述进行凝胶纯化,以及如上所述纯化HBV二聚体。每个孔均包含200 μ L的15nM的再组装缓冲液中的PS1。与smFCS中一样,进行10次2 μ L的2.5 μ M的解离缓冲液中的二聚体的注射。使用Perkin-Elmer Envision板读数仪进行注射并记录PS1 RNA(FITC激发和发射滤光片)的各向异性。使用1.33g/mL氯化铯梯度从游离RNA和衣壳中纯化VLP,并使用SW40Ti转子以113,652x g旋转90小时。观察到单个条带并分级分离。将该条带透析到再组装缓冲液中以除去氯化铯。使用Amicon 100kDa MWC0旋转浓缩器将2mL VLP级分浓缩至200 μ L。

[0177] 冷冻EM样本制备

[0178] 回收含PS1的VLP并通过透析除去氯化铯后,使用单颗粒冷冻EM分析其结构。已将VLP玻璃化。使用丙酮洗涤具有Quantifoil R 2/1支持膜和另外约~5nm连续碳膜的200目EM网,并在使用前对其进行辉光放电40s。通过在网面上放置3 μ l~3.2mg/ml的HepB VLP来制备冷冻EM网格,然后进行印迹并使用Leica EM GP冷冻设备进行塞-冷冻。腔室条件设定为8 $^{\circ}$ C,相对湿度为95%,液态乙烷温度为-175 $^{\circ}$ C。使用27e $^{-}$ / \AA^2 /s的电子剂量、2.5s的暴露(产生67.5e $^{-}$ / \AA^2 的总电子剂量),在300keV的FEI Titan Krios(eBIC, Diamond Light Source, UK)透射电子显微镜上收集数据。数据记录在17Hz FEI Falcon II直接电子探测器上。将剂量在33帧中分配。最终物体采样为每像素1.34 \AA 。使用EPU(FEI)自动化数据收集软件记录了总共2397张显微照片。

[0179] 单颗粒图像处理

[0180] 运动校正了2397张显微照片,并使用MotionCorr(13)生成了每个影片的平均值,以及使用CTFFIND4(14)测定了每个影片的对比度传递函数(CTF)参数。如通过检查从CTFFIND4的输出测定的具有不可接受的散光或充电的显微照片将被丢弃,从而留下1710张显微照片的总数据集组。所有颗粒挑选、分类和比对均在RELION 1.3(15)中进行。

[0181] 手动挑选了约57,000个颗粒,并使用RELION 1.3中的无参考2D分类进行了分类。

这种分类证实了最初的视觉印象,即尽管VLP被纯化为铯梯度上的单个条带,但存在两种尺寸的VLP。将所得2D类平均的选择用作自动化颗粒拣选的模板。对使用自动拣选生成的颗粒堆 (particle stack) 进行2D分类,以分离T=3和T=4颗粒,并去除不对应于VLP的颗粒。将随后的颗粒堆 (对于T=3为5589,对于T=4为42,411) 进行3D分类,使用具有近似VLP直径的球作为初始模型。使用RELION中的3D自动优化选项和施加以生成本工作中呈现的所有结构的I3对称性重构了数据的子集 (包括输出到奈奎斯特频率的数据)。在T=4 42,411颗粒数据集组中,很明显,该数据的另外的子集 (10,851个颗粒) 在Cp壳内包含明显的不对称特征件,在所述Cp壳中预期将发生RNA结合。对一组相对均匀的10,851个此类颗粒进行了不对称 (C1) 重构,从而以 11.5 Å 的分辨率给予重构。

[0182] 使用RNA Composer (16) 建立PS1 RNA的3D模型。使用USCF Chimera (17) 绘制冷冻EM数字。

[0183] 重组STNV CP的纯化

[0184] 从大肠埃希氏菌 (18) 中纯化重组STNV VLP。使用利用Agilent设计的引物和Quikchange定点诱变试剂盒 (Agilent) 产生STNV电荷变化突变体质粒。在完全蛋白酶抑制剂混合物 (Roche, United Kingdom) 存在的情况下,通过在50mM Tris (pH 8.5), 10mM EDTA中去组装来纯化CP单体。通过连续Q-Sepharose和SP-Sepharose柱 (GE Healthcare, Sweden) 将STNV CP与mRNA分离。用20倍柱体积的50mM HEPES (pH 7.5) 和25mM NaCl洗涤STNV CP,以去除残留的EDTA,然后在缓冲液中使用0.025-2M NaCl梯度洗脱。0.8M NaCl处CP洗脱物。STNV CP通过SDS-PAGE分析,其浓度通过UV吸光度测定。将A260:A280比率约为0.6或更低的级分用于组装测定。使用相同的连续Q-Sepharose和SP-Sepharose柱方法纯化在过表达过程中未形成VLP的突变CP。

[0185] RNA寡核苷酸的制备

[0186] 按照制造商的方案,使用引物和KAPA2G系统 (KAPA biosystems) 产生了用于本研究的编码RNA寡核苷酸的dsDNA转录物。使用Highscribe T7高产率RNA合成试剂盒 (NEB) 进行转录。将产物在变性RNA凝胶上电泳。合成了始终使用的Alexa Fluor 488标记的B3寡核苷酸,并通过DNA Technology A/S (丹麦) 进行HPLC纯化。如前所述 (19),在凝胶纯化之前,在转录过程中用氨基GMP标记需要5' 荧光团的其它RNA寡核苷酸,并使其与Alexa Fluor 488 SDP酯 (Invitrogen) 交联。

[0187] 通过购买具有5' T7启动子 (IDT DNA技术) 的合成的稳定的和不稳定的+Δ1-127STNV-1构建体的基因块来产生基因组嵌合体,所述模块的两端均具有BamHI和HindIII裂解位点,从而在限制性消化和使用南极磷酸酶 (NEB) 去磷酸化后产生粘性末端。然后使用T4 DNA连接酶 (NEB) 将该基因块连接到PACYC184质粒中。在使用BamHI线性化后,如上所述进行转录。

[0188] 在每次实验之前,通过在含有50mM NaCl, 10mM HEPES和1mM DTT的pH为7的缓冲液中加入加热至80°C进行90s,然后缓慢冷却到4°C来对RNA进行退火。仅将基因组加热至65°C。

[0189] 以1:3的RNA:CP比率、4.5μM的CP终浓度,在B3变体存在和不存在的条件下,通过透析到含有50mM HEPES (pH 7.5) 和2mM Ca²⁺的缓冲液中,进行在B3变体存在的情况下的STNV再组装和沉降速度分析超速离心 (svAUC) 再组装反应。通过TEM和AUC分析所有样品。对于AUV,将0.32mL的每个样品放置在路径长度为1.2cm的用蓝宝石窗口构建的2-扇区弯月面匹

配epon中心小室中。将样品在An50-Ti转子中于20℃下在Optima XL-1分析超速离心机中以15,000rpm离心。通过吸收光学器件在约11小时30分钟内进行100次扫描检测到260nm处的吸光度变化。使用程序Sedfit对数据进行拟合和分析。

[0190] smFCS数据收集和分析

[0191] 在定制的smFCS设施上进行FCS测量。将激发激光(Sapphire CW blue激光,488nm, Coherent,USA)的功率设置为65μW。将聚焦位置调整至离盖玻片内表面20μm(由压电反馈回路保持,Piezosystems Jena,Germany)。将浸渍油(折射率1.515,DF型,Cargille Laboratories,USA)与油浸物镜(63倍放大,数值孔径1.4)一起使用。由ALVL5000multiple tau数字相关器(ALV-GmbH)以单通道模式记录和分析光子计数。使用非线性最小二乘拟合,利用Matlab中针对三重态校正的单组分扩散模型自相关函数对FCS数据进行分析。将扩散时间用于计算表观流体动力学半径(Rh),并绘制为组装时间的函数。Rh计算基于Alexa Fluor 488染料的测得的扩散时间和估计的染料的Rh(在组装缓冲液中约为0.7nm)。

[0192] smFCS组装和竞争性测定

[0193] 进行Alexa Fluor 488标记的RNA寡核苷酸的初步测量,进行至少10次30秒的测量(5分钟)。将纯化的STNV CP滴定到标记的RNA中。每次滴定进行最少10次30秒的测量。在组装测定中,将这重复进行直到完全衣壳组装完成为止。此时,添加RNA酶A以确认RNA保护。在竞争性测定中,一旦样品形成了壳粒结构(Rh=~5nm),就对样品进行另外120次10秒的测量(20分钟以确保稳定性)。此时,以100倍摩尔过量加入未标记的B3短/B3变异竞争剂,并进行120次10秒的测量。

[0194] CD分析

[0195] 将转录的寡核苷酸在含有10mM MES,50mM NaCl和1mM DTT的pH值为6的缓冲液中稀释至1.5μM(于300μl中)。在Jasco J715分光偏振计上从200nm至350nm进行测量,带宽为2nm。将每次Ca²⁺和STNV滴定液颠倒5次,并使其在下次测量之前达到平衡2分钟。使用Peltier温度控制器以10℃为步长从10℃至95℃进行热变性,并在10℃进行末端扫描以检查裂解。每次测量以一式三份进行并取平均值。使用以下方程式将数据转换为摩尔椭圆率:
$$\Delta \epsilon (\text{cm}^2 \text{ mM}^{-1}) = \theta / (32980C (\text{mM}) L (\text{cm}) N (\text{nt数}))$$

[0196] 利用基因组RNA变体进行的再组装的光散射测定

[0197] 如在smFCS测定中一样,在96孔板上用基因组嵌合体进行再组装,使用1nM基因组并滴定CP直至达到400nM的STNV CP终浓度。将其以10k xg通过100kDa centricon (millipore)浓缩5分钟,然后在利用与DAWN HELEOS和Optilab TrEX连接的AKTA pure系统(GE Healthcare)在TSKgel G6000PWxl SEC柱(Tosoh)上运行,以获取QELS和折射率测量值。柱流速为0.4ml min⁻¹,持续50分钟。将峰分级分离,测量A260/280比率,获得EM图像(图25)。如通过光散射信号的积分所计算的不稳定的PS3样品的产率显著低于野生型STNV RNA的产率,而稳定的合成盒与天然序列相比导致VLP的产率显著更高(>20%)。QELS估计的Rh值与来自smFCS的Rh值相似,对于合成的稳定的PS1-5+ Δ 1-127STNV-1、野生型STNV-1和不稳定PS1-5+ Δ 1-127STNV-1,Rh值分别为9.3±0.1nm、9.1±0.3nm和8.9±0.2nm(表6)。从凝胶过滤柱洗脱的组装好的VLP的A260/280比率也可提供信息。PS1-5+ Δ 1-127STNV-1与野生型STNV-1基因组样品的值相同(1.62),而不稳定的PS1-5+ Δ 1-127STNV-1样品具有较高的值(1.89)。这与在完全封闭在包含相同数量CP的壳中的前两个样品中存在恒定量的RNA,而

最后一个样品在不完整壳中具有相同RNA含量一致。

[0198] 实施例1

[0199] HBV pgRNA包含优选的Cp结合位点

[0200] 如所描述(3),纯化由大肠埃希氏菌中表达的(全长)Cp亚单位组装而成的HBV VLP(图7a和表1)。它们形成T=3壳和主要的T=4壳的混合物。将它们固定在磁珠上,通过用氯化胍处理去组装,然后洗涤以去除宿主RNA,从而得到其ARD可及的固定的Cp二聚体(20)。使用我们的标准方案(图7b)进行RNA SELEX,并通过NextGen DNA测序(方法)来分析第10轮的适体库。

[0201] 将所选文库中结合Cp的RNA序列与与SELEX实验所用的蛋白质最密切相关的HBV前基因组(实验室菌株,GenBank序列标识符NC_003977.1(21))进行比对。使针对该菌株(图2a中的蓝色峰)的pgRNA的统计学上显著的匹配(伯努利得分为12或更高,方法)以未选择的文库(图2a中的灰色曲线)的比对为基准,以鉴定出以显著频率发生的峰。这鉴定了分散在整个pgRNA上的多个位点,所述位点具有与Cp结合适体相似的序列/结构,这符合我们对基因组中PS样位点的期望。我们对来自GenBank的14个随机选择的HBV菌株变体、当前NCBI HBV参考菌株(GenBank序列标识符NC_003977.2)以及实验室菌株(GenBank序列标识符NC_003977.1)进行了相同的操作,并鉴定了在至少80%的这些菌株中保守的所有那些峰(图2a中标有绿色叉号)。因此,这些基因组区域可能涵盖PS。具有最高保守性(100%)和峰高(后者指示匹配这些位点的适体数量)的三个峰在图2a中标记为PS1、PS2和PS3。对于在菌株之间具有高度保守性的9个位点,我们从包括实验室菌株和参考基因组在内的三个代表性菌株变体的基因组序列中提取了在峰核苷酸的5'和3'的30nt,并考虑了通过Mfold(方法)获得的具有负自由能的所有其可能的二级结构折叠。对一级和二级结构的相似性分析揭示了共享富含嘌呤的环识别基序RGAG的茎环的预测存在(图2b)。

[0202] 我们在所分析的16个HBV株中计算了该基序在茎环中的频率。在所有菌株中,RGAG基序在茎环中平均出现约25.4次(在实验室菌株中恰好是25次)。与10,000个随机形式的pgRNA相比,实际基因组中RGAG的出现频率比平均值高4.68个标准差(图2c),这强烈地暗示了一种或多种功能作用。

[0203] 实施例2

[0204] pgRNA寡核苷酸在体外触发VLP形成

[0205] 使用单分子荧光相关光谱法(smFCS)测试PS1、2和3寡核苷酸(图8a)结合Cp二聚体的能力(图3和8b)。该技术产生了染料标记的种类的流体动力学半径(R_h)的实时估值。重要的是,其使反应可以在低纳摩尔浓度下进行,其中我们已证明与大多数体外反应相比,结合特异性更紧密地反映了体内情况。后者通常在较高(例如0.1–0.8 μ M)浓度下进行(20),其中PS介导的组装的特异性降低或丧失。为了避免由于寡核苷酸长度不同而产生的静电效应,将每个PS均作为47nt长的片段的一部分产生,每个片段在其5'末端进行了染料标记(方法(19))。然后用递增量的Cp(5–250nM Cp二聚体)滴定标记的寡聚物(\sim 15nM),并随时间追踪 R_h 值(图3a)。每次添加后,要暂停约10分钟,以使反应达到平衡。滴定会导致数据收集和平均失真,这在图中可见为有噪声信号。在250nM Cp下平衡后,向每个反应中加入RNA酶,并监测 R_h 值 \sim 10分钟。如果这些值急剧下降,则认为产生的VLP不完整。在添加RNA酶之前获得了样品的负染色EM图像,并且还通过 R_h 分布图(分别为图3b和图8c)的计算来评估此时存在的

复合物的尺寸。

[0206] 在这些条件下,每个PS片段均以大致相等的效率刺激 $T=3$ 和 $T=4$ 完整VLP两者的组装(图3a和b),正如预期的那样,后者是主要产物(22)。Cp >250 nM的添加不会增加获得的 R_h 值,这意味着到此阶段,所有RNA均已掺入到VLP中。为了评估这些影响是否是Cp-PS相互作用的直接结果,我们进行了许多对照。染料标记的PS片段不与预先形成的VLP结合,并且在存在时仍对RNA酶敏感(表2),这意味着PS仅在组装VLP时被内化。为了确定RNA是否触发组装,我们通过单独孵育Cp或完成未标记的PS1的滴定后添加蛋白质修饰染料来比较在PS RNA存在和不存在的条件下Cp的组装效率。 R_h 分布图显示于图3b中。在RNA不存在的情况下,在这些条件下, $<5\%$ 的Cp组装,而相反地在RNA存在的情况下, $>80\%$ 的Cp组装。Cp-PS相互作用似乎会触发组装效率的提高。该效应随Cp的年龄而变化,这与二聚体界面处抑制组装的二硫化物的氧化相一致(6)。此处的比较说明基于每批Cp的阳性和阴性对照实验的结果。

[0207] 然后,我们探查了这些反应的RNA序列特异性(图9a)。测试寡聚物包含 ϵ 茎环,以及PS1的环和凸出变体。这包括其中凸出区域完全碱基配对的变体。在与PS1-3反应相似的测定中,所有三个RNA的 R_h 值均对核酸酶的作用保持敏感性,这暗示着封闭壳的组装需要特定的RNA序列/结构。EM图像和分布图证实了这一解释。通过其它PS1变体进一步突出显示组装反应的序列敏感性(图9b和c;表3)。它们对组装的影响证实了其中的凸出和/或序列以及环RGAG(此处为GGAG)基序的重要性。涵盖PS1序列的DNA寡核苷酸(图9d)引发聚集,表明忠实组装是与其RNA形式存在的PS的特殊性质,即具有A螺旋双链体茎,以及在环中具有Cp识别基序。

[0208] 据信,HBV Cp的C末端ARD介导与pgRNA的相互作用,并且缺少ARD的1-149Cp片段在核酸不存在的情况下容易组装(23)。因此,我们在smFCS测定中评估了Cp₁₄₉响应于PS的能力。在这些条件下,没有RNA依赖性组装或Cp₁₄₉进行的PS结合发生(图10a),尽管EM图像显示单独的截短的Cp易于组装,这证实ARD是与RNA相互作用所必需的。ARD在体内被广泛磷酸化,尽管负责的细胞激酶仍然未知(24)。降低Cp的C末端上的正电荷应降低其结合PS RNA的能力。我们在体外磷酸化了Cp(8)(表1)并测试了其性质。EM图像显示,经修饰的Cp在smFCS测定中易于组装,但不与PS1结合(图10b)。

[0209] 实施例3

[0210] HBV NC组装是由序列特异性RNA核心蛋白质复合物的形成触发的。

[0211] 对围绕PS1组装的VLP进行了较大规模纯化,并通过冷冻EM测定其结构,从而产生了 $T=3$ 和 $T=4$ 颗粒的二十面体平均重构(图4)。 $T=4$ 颗粒的很大一部分($\sim 25\%$)也包含正好位于蛋白质壳下方的不对称特征件。还计算了这些颗粒的不对称重构(图5)。结果表明,不对称特征件代表了PS1寡核苷酸与上覆Cp亚单位的ARD域之间的复合物。

[0212] 根据该分辨率的EM图,无法确定复合物中存在的PS寡核苷酸的数量。纯化的VLP的 $A_{260/280}$ 比率表明RNA含量(假设为 $T=4$ 形态)为 ~ 5 个寡聚物/颗粒(25)。通过研究PS1 VLP的光致漂白获得该化学计量的额外估值(图4,方法)。VLP显示多个漂白步骤,从而确认每个外壳中都存在多个寡聚物。鉴于寡聚物的标记效率,数据与2-4个寡聚物/VLP一致。我们建立了PS1的3D模型,并将其手动放置在EM图中(图4f,方法)。根据不对称密度的相对体积和PS1寡聚物的大小,似乎在该密度内存在至少两个拷贝的PS。我们不能排除其它RNA分子与其它

地方的蛋白质壳结合的可能性,但由于相对于有序RNA密度的移动性或不规则位置而不可见。生物化学数据和结构数据与不对称结构是组装起始复合物相一致,其中一个或多个RNA优选位点已引发组装,最终目标是形成T=4NC。

[0213] 冷冻EM数据暗示对HBV生物学的进一步了解。无论来自组装反应还是野生型病毒感染,少数HBV颗粒都以T=3准对称的方式组装,并且两种类型的颗粒在我们的冷冻EM数据中都是可见的。使用2D和3D分类,可以轻松地分离T=3 (~11%)和T=4 (89%)颗粒。图4显示分辨率分别为5.6Å和4.7Å的具有施加的二十面体对称性的两种颗粒的3D重构。除了两个VLP结构所包含的Cp二聚体的大小和数量上的明显差异以外,T=4和T=3图在其内表面(ARD所在的位置以及发生RNA结合的位置)上可见的特征中也不同。正如对亚化学计量占据的VLP的二十面体平均图所预期的,两个结构基本上都没有可归因于RNA的密度。T=4结构的衣壳壳明显比T=3等效物薄,然而,T=3图的更仔细地检查表明,对应于ARD的有序片段的额外密度是可见的(图4),所述额外密度不存在于T=4结构中(图4c和d)。当T=4图经过傅里叶滤波以达到与T=3相似的分辨率时,这种差异仍然存在(图11)。这与先前的研究一致,表明Cp C末端区域(包括ARD)在确定衣壳几何形状中发挥一种或多种作用(22,26)。

[0214] 实施例4

[0215] 各个PS位点的序列特异性识别

[0216] 在STNV系统中,序列特异性RNA-CP识别会产生多种后果(图12)。将CP滴定到仅涵盖PS3(或B3)的寡核苷酸中,最初会导致三聚体壳粒(Rh~5nm)形成,然后随着CP浓度逐渐升高而形成T=1 VLP(Rh~11.3nm)。滴定结束时,smFCS数据的Rh分布图表明所形成的VLP是均质的,而电子显微术图像(EM)和RNA酶攻击测定表明它们由完整的蛋白质壳组成。用具有-U.U.U.U-的环序列的PS3/B3变体进行类似的滴定表明,CP结合了此类SL,但所形成的复合物不能组装成VLP(19)。涵盖PS 1-5的天然127聚体显示出更复杂的行为。低CP浓度的添加会触发Rh降低约20-30%,从而模拟对于全长基因组所看到的行为(27)。随后的CP添加导致向T=1 VLP的协同转换,所述T=1 VLP与在单独的PS3周围形成的那些VLP具有相同的特性。该片段内的PS序列变体证实-A.X.X.A-是CP识别基序,并且仅在PS3中绝对需要其存在,然而所述变体不再与野生型协同组装(19)。在这些条件下,单独的STNV-1CP未显示出低于15μM的聚集趋势,并因此此处显示的滴定中的一切都是RNA-CP结合的结果。

[0217] 这些结果突出显示了CP识别PS3对组装的重要性。为了鉴定该识别的至关重要的特征,我们产生了一系列涵盖变异环序列和PS3茎的SL(图17和表4)。与PS3的野生型-C.A-A-相比,所述变体在“内部”两个位置中具有改变的核苷酸(-C.C-,-A.A-,-G.G-,-G.U-和-U.G-)。还测试了其中两个内部核苷酸均变为尿苷的“外部”变体(-A.U.U.A-;-A.U.U.G-;-G.U.U.A-;-G.U.U.G-;-G.U.U.U-;-U.U.U.G-;-U.U.U.A-和-A.U.U.U-)。我们的期望是,在四环的中间位置处没有碱基特异性而在第一和最后一个位置处腺嘌呤将是优选的。我们研究了它们支持T=1壳和三聚体壳粒两者组装的能力。在再组装缓冲液中以~5μM的浓度混合测试RNA和CP,并通过速度沉降分析和EM图像测定结果。在这些条件下,内部核苷酸变体形成T=1衣壳,其效率与PS3大致相似,证实了它们的身份不是CP识别基序的一部分(图13A/B和图17)。外部核苷酸变体显示出不同的行为,只有-A.U.U.U-,-U.U.U.A-和-A.U.U.A-变体在与PS3相似的位置具有峰,证实了所述外部腺嘌呤是CP识别基序的一部分。

[0218] 为了检查其对CP亲和力的相对重要性,我们对smFCS分析进行了改动(图13B)。如

根据Rh值所判断的,用CP滴定标记的B3以形成三聚体,然后加入100倍摩尔过量的每种序列变体以竞争掉B3。不以相似的亲和力与B3结合的变体无法取代标记的RNA,而B3和其它变体则竞争过标记的种类,从而恢复了不含CP的RNA的Rh。结果(图13D)显示了该攻击后Rh的变化百分比,揭示了变体RNA竞争能力的广泛差异。所有具有鸟嘌呤取代的那些变体和-A.U.U.U-变体都无法竞争。-U.U.U.A-变体的优越性能表明3'A对于CP识别最重要,或者相邻茎顶部的A-U碱基对断裂,呈现出仍被CP识别的B3基序的-A.U.U.U.A-U-变体。无论哪种方式,-A.X.X.A-均优于所有变体,这表明携带-A.X.X.A-的四环基序的SL涵盖了用于组装成VLP的最佳CP识别基序。

[0219] 实施例5静电和PS协同性在VLP组装中的作用

[0220] PS介导的组装解释了纯静电驱动的反应不具有的病毒基因组包装的特征,尽管电荷中和在提供一些自由能驱动衣壳化方面显然具有有益作用。因此,我们使用一系列电荷变化CP变体检查了这些作用对STNV组装的重要性。用A或D代替K或R在CP的N末端臂中三个带正电的残基R8、R14和K17处产生突变(图12)。由于R14和K17在三维上相邻,因此它们的变体被产生为双突变体,即R14A/K17A和R14D/K17D。突变的CP正常表达(图18),但在这些条件下,两个双突变体均无法在大肠埃希氏菌中显著组装。由于从大肠埃希氏菌获得的VLP包含宿主细胞RNA以及编码病毒CP的重组mRNA,因此该结果表明R14和K17在组装中起重要作用。

[0221] 检查所有变体蛋白结合涵盖单个PS(B3)或127聚体片段的RNA寡聚体的能力(图14和图19)。在这些条件下,两个双突变体均未结合任一种RNA。R8A在B3周围组装,但需要高得多的CP浓度(>10倍)来进行该组装,这与其对RNA的亲和力降低一致。通过1 μ M CP,其会形成对RNA酶攻击具有抗性的T=1壳。R8D变体证实了正电荷的重要性,即使在较高浓度下也无法形成任何稳定的高级种类,而RNA仍可得到RNA酶消化。当针对127聚体滴定R8D时,仍然存在这种对有利的静电相互作用的依赖性(图14A)。然而,对于该RNA,R8A和野生型CP均显示出非常相似的结合曲线,包括最初Rh减小。由多个PS位点上的CP结合产生的协同作用似乎克服了静电吸引力减小对固有RNA-CP亲和力的不利作用。如果我们假设N末端臂上一个或多个改变的电荷不显著改变非配位形成的CP构象,则这些作用探测了静电相互作用在组装的RNA序列特异性触发期间一个或多个作用。它们暗示电荷中和不是在更长的天然RNA片段上组装的绝对要求,这与PS介导的机制一致,而不与静电组装机制一致。鉴于多个RNA PS的协同作用可克服静电吸引力的减小(如对于其中PS共同起作用的过程所预期的),因此我们检查了产生协同组装所需的PS的数量。鉴于在PS3上识别的重要性以及对于包含5个PS的片段所见效应,测试了127聚体的3个亚片段,每个片段均包含PS3(图14B和图20)。这些是PS1-PS3(nt 1-76);PS2-PS4(nt 38-104)和PS3-PS5(nt 66-127),每个都有可能能够在PS3处结合CP,但侧翼位点的数量有所不同,从PS3的两个5'或3'到每个侧翼上正好1个。只有PS3居中的片段才组装对RNA酶具有抗性的T=1壳,尽管其未显示塌陷且总体产率低于127聚体。其它片段似乎形成最终自发解离的非特异性聚集体。

[0222] 这些结果的解释是很重要的。由于PS2-4片段(66nt)比PS1-3(76nt)短,且比PS3-5短1nt,因此所述作用在性质上显然不是纯静电的。要了解反应的特异性,我们需要考虑每个涵盖PS的位点的折叠倾向。通过限制其折叠以捕获最大数量的存在-A.X.X.A-环基序的SL,可以得出所示的127聚体的二级结构(图15)。在该片段中,仅PS1和PS3经预测在分离中具有有利的折叠自由能(Mfold, (10))。这与我们以前的smFCS测定一致,在所述smFCS测中,

每个PS内的CP识别基序的改变以及PS3与相邻PS3的相对间距的变化导致了明显不同的组装行为(28)。我们预期这些RNA分子作为具有不同构象的整体存在于溶液中。与STNV Cp的相互作用将取代该平衡,优先地选择其中存在PS的单个或几个可组装构象。因此,我们看到的组装效率可直接与整体中此类构象体的群体相关,并从而与施加这种构象的自由能成本相关。评估构象整体的程度是困难的,但可通过更改通常的默认参数以探查在最小自由能折叠的500%内的次优折叠(次优性=500)的整体,从Mfold中获得对替代结构的可能性的了解。

[0223] 当检查此类结构的三个含PS的片段时,出现了关于其组装能力的可能解释。对于PS1-3,主要的折叠涵盖PS1,少数也包含PS3(表5)。原则上,较小的构象体可以促进组装,但PS1与PS3之间的临界间距太大,以至无法促进多个PS的协同作用。对PS2-4的类似分析表明,主要的二级结构不包含对127聚体所预期的任何PS折叠。然而,其预测的二级结构含有两个几乎始终存在的替代SL,其中一个呈现-A.X.X.A-序列(图22)。它们的相对间隔(4nt)足够短,以至可以看到协同作用。PS3-5片段在彼此的10-12nt内形成两个SL,一个呈现-A.X.X.A-基序作为PS5。这可表明可组装结构。然而,在可能的结构的整体中,该SL仅以6%的潜在折叠存在(表5),这可说明组装行为(图14B)。

[0224] 上文针对涵盖三个PS的片段所描述的构象加扰行为可能反映了体内事件,其中已知127聚体内的序列与3' UTR中的序列一起参与翻译增强子的形成(29)。该复合物不能存在于可组装构象体中。为了进一步探讨这种二级结构折叠倾向的影响,我们转向了含PS人工序列的设计。

[0225] 实施例6:非病毒底物的组装

[0226] 为了研究对高效组装底物的要求,我们产生了模拟野生型127聚体(PS1-5)的方面的合成盒,其中大部分天然病毒序列已被替换(~77%)。使用简单的碱基取代方案(例如,在除CP识别基序外的区域中把所有A换成U,把C换成G,把G换成C以及把U换成A)产生这些序列的尝试均导致不稳定的二级结构。因此,我们选择通过将碱基对转换为G-C、反转现有G-C对或添加额外的碱基对来修饰现有的SL,然后检查它们是否可能折叠成与野生型127聚体中的那些二级结构相似的二级结构。然后,将连接这些SL的天然病毒序列替换为A和G串,直至最可能仅出现一种折叠(图18和图23)。使碱基配对的茎的相对分离与野生型127聚体中的那些保持一致。作为这些变化的结果,与野生型127聚体相比,PS 1、2、4和5得以稳定,所有SL均具有有利的折叠倾向(图23)。

[0227] 为了评估主要的PS3位点的折叠倾向的重要性,我们还产生了以下合成形式:1)不稳定的PS1-5,其中PS3(中心PS)的折叠自由能为正(0.3kcal/mol对比-2.6kcal/mol),即其中PS3不太可能自发折叠的情形;2)稳定的PS1-5,其中中心PS的折叠自由能更负(对于127聚体,-3.5kcal/mol对比-2.6kcal/mol),即其中PS3更稳定;3)所有PS3,其中所有五种PS都模拟PS3,所有PS的茎延伸到相同的长度(7bp),并且所有CP识别基序与野生型PS3中的相同;以及4)合成的稳定的PS1-5,包含来自稳定PS1-5的人工PS 1、2、4和5,以及来自所有PS3构建体的PS3的人工延伸茎环。后者在野生型127聚体和稳定的PS1-5中相对于PS3高度稳定(分别为-7.6kcal/mol对比-2.6kcal/mol或-3.5kcal/mol)。

[0228] 实施例7

[0229] 为了比较这些测试变体寡核苷酸的行为,我们检查了它们潜在的二级结构。表5列

出了使用Mfold中的次优特征产生的整体中每个PS的出现频率,以及它们的相对间距。另外,我们比较了它们的圆二色性(CD)光谱。CD提供物理信号(30),即在260nm处的摩尔椭圆率,其与碱基配对残基和/或三级结构的百分比成比例。由于再组装缓冲液中需要钙离子,STNV衣壳内存在多个Ca²⁺结合位点(38,39),因此在含钙离子的缓冲液中进行测量。如预期的那样,滴定高达2mM钙(再组装缓冲液中的浓度)的测试RNA导致260nm椭圆率的略微增加(9-17%) (图24A)。唯一的例外是不稳定的PS1-5,其不响应阳离子的存在。该缓冲液中所有测试RNA的摩尔椭圆率值如所预期地均随温度而下降(图24B)。所有RNA在260nm处都有不同的CD椭圆率,说明了比较RNA构象整体的复杂性。在整个温度范围内,不稳定的PS1-5样品的结构化程度要低得多。鉴于明显的Mfold结构,也许令人惊讶的是,野生型127聚体在较低温度下具有最高的结构量。在最高测试温度下,除不稳定的PS1-5外,所有RNA的椭圆率值大致相似,这表明它们已达到相似的变性水平。

[0230] 所有这些合成变体触发T=1衣壳的组装,并能够保护衣壳化的RNA免受核酸酶的攻击,但具有不同的CP浓度依赖性。除不稳定的PS1-5外的所有化合物都显示与127聚体相似的Rh的初始下降(图15B)。不稳定的PS1-5的组装行为类似于单独的PS3的组装行为,这表明其已丧失了协同性,并且其分布图和EM图像中的外观(图24)表明,其也丧失了高效调节衣壳形成的能力。相反,通过稳定的PS1-5的行为举例说明了中心PS折叠倾向的重要性。尽管存在关于折叠整体的潜在问题,但其显示与127聚体相似的塌陷和至T=1颗粒的协同组装,而Rh分布与野生型片段相似。其以比野生型127聚体低的CP浓度组装成VLP,即在这些条件下,其为更好的组装底物。值得注意的是,即使其涵盖比在127聚体中发现的那些更长的PS,所有PS3也比野生型更高效地组装,这表明PS二级结构背景中存在其中呈现识别基序的一定余地。鉴于先前观察到的对PS3周围PS间距的严重依赖性,这有点令人惊讶(19)。尽管已知所有PS3变体的组装效率和折叠倾向,但合成的稳定的PS1-5是迄今为止最好的组装底物,最高效地组装成VLP(即,其在100nM Cp滴定点后更快速地组装)(图15B)。

[0231] 实施例8

[0232] 这些结果表明,有可能从病毒基因组RNA片段中提取关键的组装特征。鉴于合成片段中茎长度和环大小的改变,对于具有改善的PS折叠倾向的工程化模板似乎还有相当大的范围。

[0233] 转移关键组装特征至基因组规模的RNA

[0234] 作为这些实验是否已成功鉴定出基本组装特征的检验,我们检查了这种改进的RNA“盒”的纳入如何改变天然RNA的组装效率。该RNA必须固有地能够组装到小体积的STNV病毒体中。STNV-1RNA的128-1239nt的基因组片段是明显的测试片段。因此,我们构建了两个基因组嵌合体:[不稳定的PS1-5+ Δ 1-127STNV-1](其长度为1242nt)和[合成的稳定PS1-5+ Δ 1-127STNV-1](长度为1248nt),并将它们的体外组装效率相对于野生型STNV-1RNA进行了比较(图16A)。所有这三种在这些测定中的行为均不同,这意味着5'127聚体的序列和结构调节超过其大小10倍的片段的组装途径。野生型基因组显示预期的Rh的初始塌陷(至~7.5nm),随后Rh略微升高,与T=1颗粒的形成一致(图16B)。注意,图16A中的数据是针对与先前描述的CP的完全补体的单步添加相比较的CP滴定的(12)。相反地,不稳定的PS1-5前导序列会导致Rh的较大初始塌陷(至~5nm;65%),然后仅出现很小的上升,这意味着不能高效地制备VLP。实际上,该种类中的RNA仍然易受RNA酶降解,这意味着其尚未被完全衣壳

化。合成的稳定的PS1-5+ Δ 1-127STNV-1具有大致相同的初始无CP Rh,但似乎只是缩小到与VLP形成一致的值,而不是塌陷和恢复。组装产品的Rh分布和EM图像与该解释一致。值得注意的是,合成的稳定的PS1-5+ Δ 1-127STNV-1 VLP迹线比另外的样品的噪声少,并且Rh大小的分布与从大肠埃希氏菌中分离的真正VLP的分布更紧密匹配。从凝胶过滤柱中洗脱后,通过产物的准弹性光散射(QELS)证实了对这些结果的理解(图25)。

[0235] 实施例9

[0236] 我们已经表明, RNA PS介导的病毒组装中固有的双重编码(即基因组RNA同时编码遗传信息以及用于高效衣壳组装的指令)是可分离的。一个重要的问题是,为什么密码在病毒进化过程中不会分开,尤其是在ssRNA病毒中的复制通过易错过程发生时,所述易错过程导致基因组变体的准物种产生。现在有三个使用RNA PS介导的病毒组装的病毒实例,在这些实例中,我们掌握了部分可解决此问题的结构信息。在噬菌体MS2 (31)、人副肠孤病毒-1 (parechovirus)-1 (32)和STNV (19)中,基因组中的至少一个PS位点还编码形成PS结合位点的一部分的氨基酸残基。两种密码的这种紧密嵌入的结果是仅支持其中持续存在PS介导的组装的子代RNA的组装。类似地,在此类RNA中编码的功能的密度是公知的。STNV基因组中的天然5'127聚体也与3'末端序列形成必需的转录/翻译增强子接触。由于该结构和组装是互斥的功能,因此天然序列已进化为平衡它们形成的倾向,使得可以高效地进行病毒生命周期。

[0237] 此处的焦点是从野生型病毒RNA序列中释放的组装密码的特性。实际上,通过继续研究STNV组装序列在其自然环境中的每个方面,我们已经能够使用合成的非病毒RNA再现其在触发STNV CP体外组装中的作用。其它改进使我们产生比野生型STNV 127聚体效率低或高的序列。这些结果证实了PS介导的STNV组装的性质。通过PS3茎环的CP亚单元识别,在127聚体内开始体外组装。高级CP结合取决于相邻PS (PS2和4)的正确定位和折叠,每个PS在环中都呈现出一致的CP识别基序。所述127聚体可能涵盖5个PS,所述PS在蛋白质浓度方面产生初始结合协同作用,从而导致RNA(衣壳化的必需前体)的流体动力学半径塌陷。静电相互作用促成了这些蛋白质-RNA的接触,但不是主要驱动力,而所述主要驱动力是PS的茎和环区域与蛋白质衣壳内表面的高亲和力序列特异性相互作用。尽管其序列含量极低,但-A.U.U.A-序列仍以低纳摩尔亲和力与CP结合。值得注意的是,将合成的变体127聚体移植到天然STNV-1基因组的其余部分上会产生嵌合体,其组装特性主要由RNA的前10%决定。

[0238] 先前,Wilson及其同事表明,他们可以通过产生涵盖TMV组装起始位点的RNA嵌合体来将非病毒RNA直接组装到烟草花叶病毒(TMV)CP的杆体中(33,34)。这是成功的,如已知组装机制所预期的那样,所形成的蛋白质包被的杆体的长度由被包装的RNA的长度决定(35)。当应用于球形ssRNA病毒(36)时,该方法不太成功,亲和力最高的MS2 PS对短RNA的体外衣壳化具有积极作用,但对较长RNA不太重要(37)。请注意,所有这些实验都是在微摩尔浓度下进行的,其中失去了PS介导的组装的作用(31,37)。上述结果提供了用于在病毒性CP壳中衣壳化定制的非病毒RNA的高效途径。大量CP-RNA组合的体外组装是可能的,但其与体内组装不同,在体内组装中,在许多病毒中,有充分的证据表明只有从病毒聚合酶复合物中产生的新生基因组转录物才被包装到子代病毒体中。在此类响应中, RNA很可能在动力学上折叠,从而避免了体外反应中关于RNA构象整体的一些问题,诸如此处所述的那些问题。

[0239] 病毒和病毒样颗粒的潜在医学应用日益增加,如作为基因疗法或药物递送载体,

以及用作非复制型合成疫苗。病毒蛋白质壳对于纳米技术的应用也令人关注。此处描述的结果为产生具有高效率并可能携带具有有利特性的非病毒RNA的此类方法提供重要见解。这对于生产设计师合成病毒体是必不可少的。

[0240] 参考文献

[0241] 1.Yu X,Jin L,Jih J,Shih C,Zhou ZH(2013) **3.5Å** cryoEM structure of hepatitis B virus core assembled from full-length core protein.PLOS ONE 8(9): e69729.

[0242] 2.Darty K,Denise A,Ponty Y(2009) VARNA:Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure.Bioinformatics 25(15):1974-1975.

[0243] 3.Porterfield JZ,et al(2010) Full-length hepatitis B virus core protein packages viral and heterologous RNA with similarly high levels of cooperativity.J Virol84(14):7174-7184.

[0244] 4Lakowicz JR ed.(2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy (Springer US,Boston,MA).

[0245] 5.Holmes K,et al.(2015) Assembly Pathway of Hepatitis B Core Virus-like Particles from Genetically Fused Dimers.Journal of Biological Chemistry 290(26):16238-16245.

[0246] 6.Selzer L,Katen SP,Zlotnick A(2014) The hepatitis B virus core protein intradimer interface modulates capsid assembly and stability.Biochemistry 53(34):5496-5504.

[0247] 7.A Zlotnick,et al(1996) Dimorphism of Hepatitis B Virus Capsids Is Strongly Influenced by the C-Terminus of the Capsid Protein.Biochemistry 35(23):7412-7421.

[0248] 8.Aubol BE,et al.(2003) Processive phosphorylation of alternative splicing factor/splicing factor 2.Proceedings of the National Academy of Sciences 100(22):12601-12606.

[0249] 9Bunka DHJ,et al(2011) Degenerate RNA packaging signals in the genome of Satellite Tobacco Necrosis Virus:implications for the assembly of a T=1 capsid.J Mol Biol 413(1):51-65.

[0250] 10.Zuker M(2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.Nucleic Acids Res 31(13):3406-3415.

[0251] 11.Podjarny A,Dejaegere AP,Kieffer B eds.(2011) Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets:Detection,Measurement and Modelling (Royal Society of Chemistry,Cambridge) Available at:<http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781849732666>.

[0252] 12.Sharma A,et al.(2014) Domain movements of the enhancer-dependent sigma factor drive DNA delivery into the RNA polymerase active site:insights from single molecule studies.NucleicAcids Res 42(8):5177-5190.

[0253] 13.Li X,et al(2013) Electron counting and beam-induced motion

correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nature Methods* 10(6):584-590.

[0254] 14. Rohou A, Grigorieff N (2015) CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *Journal of structural biology* 192(2): 216-221.

[0255] 15. Scheres SHW (2015) Semi-automated selection of cryo-EM particles in RELION-1.3. *Journal of structural biology* 189(2):114-122.

[0256] 16. Popenda M, et al. (2012) Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic Acids Res* 40(14):e112-e112.

[0257] 17. Pettersen EF, et al. (2004) UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25(13): 1605-1612.

[0258] 18. Lane SW, et al. (2011) Construction and crystal structure of recombinant STNV capsids. *J Mol Biol* 413(1):41-50.

[0259] 19. Patel N, et al. (2015) Revealing the density of encoded functions in a viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(7):2227-2232.

[0260] 20. Porterfield JZ, et al. (2010) Full-length hepatitis B virus core protein packages viral and heterologous RNA with similarly high levels of cooperativity. *J Virol* 84(14):7174-7184.

[0261] 21. Wang JC-Y, Nickens DG, Lentz TB, Loeb DD, Zlotnick A (2014) Encapsidated hepatitis B virus reverse transcriptase is poised on an ordered RNA lattice. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(31):11329-11334.

[0262] 22. A Zlotnick, et al. (1996) Dimorphism of Hepatitis B Virus Capsids Is Strongly Influenced by the C-Terminus of the Capsid Protein. *Biochemistry* 35(23):7412-7421.

[0263] 23. Birnbaum F, Nassal M (1990) Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J Virol* 64(7):3319-3330.

[0264] 24. Ludgate L, et al. (2012) Cyclin-dependent kinase 2 phosphorylates s/t-p sites in the hepadnavirus core protein C-terminal domain and is incorporated into viral capsids. *J Virol* 86(22):12237-12250.

[0265] 25. Porterfield JZ, Zlotnick A (2010) A simple and general method for determining the protein and nucleic acid content of viruses by UV absorbance. *Virology* 407(2):281-288.

[0266] 26. Watts NR, et al. (2002) The morphogenic linker peptide of HBV capsid protein forms a mobile array on the interior surface. *EMBO Journal* 21(5):876-884.

[0267] 27. Borodavka A, Tuma R, Stockley PG (2012) Evidence that viral RNAs have evolved for efficient, two-stage packaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(39): 15769-15774.

- [0268] 28. Dykaman EC, Stockley PG, Twarock R (2014) Solving a Levinthal's paradox for virus assembly identifies a unique antiviral strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(14):5361-5366.
- [0269] 29. Kaempfer R, van Emmelo J, Fiers W (1981) Specific binding of eukaryotic initiation factor 2 to satellite tobacco necrosis virus RNA at a 5'-terminal sequence comprising the ribosome binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78(3):1542-1546.
- [0270] 30. Sosnick TR, Fang X, Shelton VM (2000) Application of circular dichroism to study RNA folding transitions. *Meth Enzymol* 317:393-409.
- [0271] 31. Beckett D, Uhlenbeck OC (1988) Ribonucleoprotein complexes of R17 coat protein and a translational operator analog. *J Mol Biol* 204(4):927-938.
- [0272] 32. Shakeel S, et al. (2017) Genomic RNA folding mediates assembly of human parechovirus. *Nat Commun* 8(1):5.
- [0273] 33. Sleat DE, Tumer PC, Finch JT, Butler PJ, Wilson TM (1986) Packaging of recombinant RNA molecules into pseudovirus particles directed by the origin-of-assembly sequence from tobacco mosaic virus RNA. *Virology* 155(2):299-308.
- [0274] 34. Gallie DR, Plaskitt KA, Wilson TM (1987) The effect of multiple dispersed copies of the origin-of-assembly sequence from TMV RNA on the morphology of pseudovirus particles assembled in vitro. *Virology* 158(2):473-476.
- [0275] 35. Caspar DL, Klug A (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 27:1-24.
- [0276] 36. Qu F, Morris TJ (1997) Encapsidation of turnip crinkle virus is defined by a specific packaging signal and RNA size. *J Virol* 71(2):1428-1435.
- [0277] 37. Beckett D, Wu HN, Uhlenbeck OC (1988) Roles of operator and non-operator RNA sequences in bacteriophage R17 capsid assembly. *J Mol Biol* 204(4):939-947.

序列表

<110> 约克大学利兹分校 (The University of York University of Leeds)

<120> 病毒样颗粒

<130> 4607P/WO

<150> GB1708709.9

<151> 2017-06-01

<160> 72

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 35

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 包装信号

<400> 1

guuuguuuuaa agacugggag gaguuggggg aggag 35

<210> 2

<211> 49

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 包装信号

<400> 2

gggcccucug acaguuaaug aaaaaaggag auuaaaauua auuaugccu 49

<210> 3

<211> 34

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 包装信号

<400> 3

ggcuggcauu cuauauaaga gagaaacuac acgc 34

<210> 4

<211> 59

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 包装信号

- <400> 4
cugggaggag uugggggagg agauuagguu aaaggucuuu guacuaggag gcuguaggc 59
- <210> 5
<211> 135
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 包装信号
- <400> 5
gggcugcccu caaggaccag ggcagaaaag aggaaaagaa aagugacaga acacuuauaa 60
ggaaaaaacg uacaaacguu uuaaggaaaa aaggaagcug cauagcgca aggaauccga 120
aaaauccgaa aggaa 135
- <210> 6
<211> 129
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 包装信号
- <400> 6
gggcugcccu caaggaccag ggcagaaaag aggaaaagaa aagugacaga acacuuauaa 60
ggaaccacac aaguggaagg aaaaaaggaa gcugcaauag cgcaaggaau ccgaaaauuc 120
ggaaaggaa 129
- <210> 7
<211> 129
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 包装信号
- <400> 7
gggcugcccu caaggaccag ggcagaaaag aggaaaagaa aagugacaga acacuuauaa 60
ggaaccacac aaguauaagg aaaaaaggaa gcugcaauag cgcaaggaau ccgaaaauuc 120
ggaaaggaa 129
- <210> 8
<211> 140
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 包装信号
- <400> 8

gggccccgca acaaugcggg gaaggaagga aggaagaaaa cguacaaacg uuuuaaggaa 60
caacgcaaca augcguugaa ggaaggaagg aagggcgua caaacgcccc aaggaauuuu 120
gcaacaaugc aaaaaaggaa 140

<210> 9

<211> 11

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 核苷酸结合基序

<400> 9

gaaaaaaggaa g 11

<210> 10

<211> 18

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> B3序列变体

<400> 10

acaugcaaca augcacac 18

<210> 11

<211> 18

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> B3序列变体

<400> 11

acaugcaauu uugcacac 18

<210> 12

<211> 18

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> B3序列变体

<400> 12

acaugcauuu augcacac 18

<210> 13

<211> 18

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>
<223> B3序列变体
<400> 13
acaugcaguu uugcacac 18
<210> 14
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> B3序列变体
<400> 14
acaugcauuu gugcacac 18
<210> 15
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> B3序列变体
<400> 15
acaugcaauu gugcacac 18
<210> 16
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> B3序列变体
<400> 16
acaugcaguu augcacac 18
<210> 17
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> B3序列变体
<400> 17
acaugcaguu gugcacac 18
<210> 18
<211> 18
<212> RNA

- <213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> B3序列变体
<400> 18
acaugcaauu augcacac 18
<210> 19
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 19
gacattaata cgactcacta tagggacatg ca 32
<210> 20
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 20
gtgtgcataa ttgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 21
gtgtgcacaa ctgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 22
gtgtgcacaa ttgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 23
<211> 33

<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 23
gtgtgcataa ctgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 24
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 24
gtgtgcataa atgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 25
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 25
gtgtgcaaaa ttgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 26
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 26
gtgtgcaaaa ctgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 27
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 27
gtgtgcacaa atgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 28

<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 28
gtgtgcatgg ttgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 29
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 29
gtgtgcattt ttgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 30
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 30
gtgtgcatcc ttgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 31
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 31
gtgtgcatca ttgcatgtcc ctatagtgag tcg 33
<210> 32
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 32
gtgtgcatac ttgcatgtcc ctatagtgag tcg 33

<210> 33

<211> 62

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 33

agtaatacga ctcaactatag gggggctgcc ctcaaggacc agggcagaaa agaggaaaag 60
aa 62

<210> 34

<211> 89

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 34

ggcagaaaag aggaaaagaa aagtgcaga acacttataa ggaaatacac aagtataagg 60
aaaaaaggaa gctgcaatag cgcaaggaa 89

<210> 35

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 35

ttcctttccg aattttcgga ttccttgccg tattgcagct t 41

<210> 36

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 36

gggccccgca acaatgcggg gaaggaagga aggaagaaaa cgtacaaacg tttt 54

<210> 37

<211> 86

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物
<400> 37
agaaaacgta caaacgtttt aaggaacaac gcaacaatgc gttgaaggaa ggaaggaagg 60
ggcgtacaaa cgccccaagg aatttt 86
<210> 38
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 38
ttcctttttt gcattgttgc aaaattcctt ggggcgtttg tacgc 45
<210> 39
<211> 89
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 39
ggcagaaaag aggaaaagaa aagtgacaga acacttataa ggaaccacac aagtggaagg 60
aaaaaaggaa gctgcaatag cgcaaggaa 89
<210> 40
<211> 95
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 40
ggcagaaaag aggaaaagaa aagtgacaga acacttataa ggaaaaaacg uacaaacguu 60
uuuaggaaaa aaggaagctg caatagcgca aggaa 95
<210> 41
<211> 61
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 41
agtaatacga ctactatag ggagtaaaga caggaaactt tactgactaa catggcaaaa 60
c 61

<210> 42

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 42

actgactaac atggcaaaac aacagaacaa caggcgaaaa tccgcaacaa tgcgtgcagt 60
gaagcgcattg ataaatacac 80

<210> 43

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 43

tcagtcaaaa ccttttatgc tccaagtgtg tatttatcat gcgct 45

<210> 44

<211> 61

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 44

agtaatacga ctactatag ggagtaaaga caggaaactt tactgactaa catggcaaaa 60
c 61

<210> 45

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 45

actgactaac atggcaaaac aacagaacaa caggcgaaaa t 41

<210> 46

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物
<400> 46
cgcaattgttg cggattttcg cctgttgt 28
<210> 47
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 47
agtaatacga ctcaactatag ggtggcaaaa caacagaaca acaggcgaaa at 52
<210> 48
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 48
aacagaacaa caggcgaaaa tccgcaacaa tgcgtgcagt gaagcgcagt ataaata 57
<210> 49
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 49
ccaagtgtgt atttatcatg cgcttcactg cacgcattgt tgcgg 45
<210> 50
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 引物
<400> 50
agtaatacga ctcaactatag ggccgcaaca atgcg 35
<210> 51
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 51

ccgcaacaat gcgtgcagtg aagcgcataa taaatacac 39

<210> 52

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 引物

<400> 52

tcagtgcaaaa ccttttatgc tccaagtgtg tatttateat gcgct 45

<210> 53

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> HBV CP

<400> 53

Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu

1 5 10 15

Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg

 20 25 30

Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg

 35 40 45

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys

 50 55

<210> 54

<211> 10

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>

<223> 环序列

<400> 54

agguaggagc 10

<210> 55

<211> 47

<212> RNA

<213> 人工序列 (artificial sequence)

<220>
 <223> HBV PS-PS1
 <400> 55
 ggguuuuggg uuuguuuaaa gacuggagga guugggggag gagcccc 47
 <210> 56
 <211> 47
 <212> RNA
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <223> HBV PS-PS2
 <400> 56
 ggguuuuggg gugacaguua augaaaaaag gagauuaaaa uuacccc 47
 <210> 57
 <211> 47
 <212> RNA
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <223> HBV PS-PS3
 <400> 57
 ggguuuuggg gcuggcauuc uauauaagag agaaacuaca cgcccc 47
 <210> 58
 <211> 61
 <212> RNA
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <223> HBV PS-ε
 <400> 58
 uguucauguc cuacuguuca agccuccaag cugugccuug gguggcuuug gggcauggac 60
 a 61
 <210> 59
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (artificial sequence)
 <220>
 <223> STNV CP
 <400> 59
 Glu Leu His Thr Asn Ile Met Arg Lys Val Ala Arg Met Thr Ala Ser
 1 5 10 15
 Lys Arg Arg Asn Asn Gln Gln Lys Ala

20	25
<210> 60	
<211> 30	
<212> RNA	
<213> 人工序列 (artificial sequence)	
<220>	
<223> B3	
<400> 60	
ccuuuuc <u>caag acaugcaaca augcacacag</u> 30	
<210> 61	
<211> 127	
<212> RNA	
<213> 人工序列 (artificial sequence)	
<220>	
<223> PS1-5	
<400> 61	
gag <u>uaaagac aggaaacuuu acugacuaac auggcaaac aacagaaca caggcgaaaa</u> 60	
uccgcaaca <u>u ugcgugcagu gaagcgcaug auaaauacac acuuggagca uaaaagguuu</u> 120	
gcacuga 127	
<210> 62	
<211> 129	
<212> RNA	
<213> 人工序列 (artificial sequence)	
<220>	
<223> 稳定的PS3	
<400> 62	
gggcugcc <u>cu caaggaccag ggcagaaaag aggaaaagaa aagugacaga acacuuauaa</u> 60	
ggaaccacac aagugga <u>agg aaaaaaggaa gcugcaauag cgcaaggaau ccgaaaauuc</u> 120	
ggaaaggaa 129	
<210> 63	
<211> 140	
<212> RNA	
<213> 人工序列 (artificial sequence)	
<220>	
<223> 所有PS3	
<400> 63	
gggccccgca acaaugcggg gaaggaagga aggaagaaa cguaca <u>aacg uuuuaaggaa</u> 60	
caacgcaaca augcguugaa ggaaggaagga aaggggcgua caaacgcccc aagga <u>uuuu</u> 120	
gcaaca <u>augc aaaaaaggaa</u> 140	

<210> 64
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 内部变体
<400> 64
acaugcaacc augcacac 18
<210> 65
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 内部变体
<400> 65
acaugcaaaa augcacac 18
<210> 66
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 内部变体
<400> 66
acaugcaagg augcacac 18
<210> 67
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 内部变体
<400> 67
acaugcaaug augcacac 18
<210> 68
<211> 18
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 内部变体
<400> 68

acaugcaagu augcacac 18
<210> 69
<211> 73
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> PS1-3
<400> 69
aguaaaagaca ggaaacuuaa cugacuaaca uggcaaaaca acagaacaac aggcgaaaau 60
ccgcaacaau gcg 73
<210> 70
<211> 65
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> PS2-4
<400> 70
aacaacagaa caacaggcga aaauccgcaa caaugcgugc agugaagcgc augauaaaau 60
cacac 65
<210> 71
<211> 66
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> PS3-5
<400> 71
ccgcaacaau gcgugcagug aagcgcauga uaaauacaca cuuggagcau aaaagguuug 60
cacuga 66
<210> 72
<211> 129
<212> RNA
<213> 人工序列 (artificial sequence)
<220>
<223> 不稳定的PS3
<400> 72
gggcugcccu caaggaccag ggcagaaaag aggaaaagaa aagugacaga acacuuauaa 60
ggaaccacac aaguauaagg aaaaaaggaa gcugcaauag cgcaaggaau ccgaaaauuc 120
ggaaaggaa 129

A

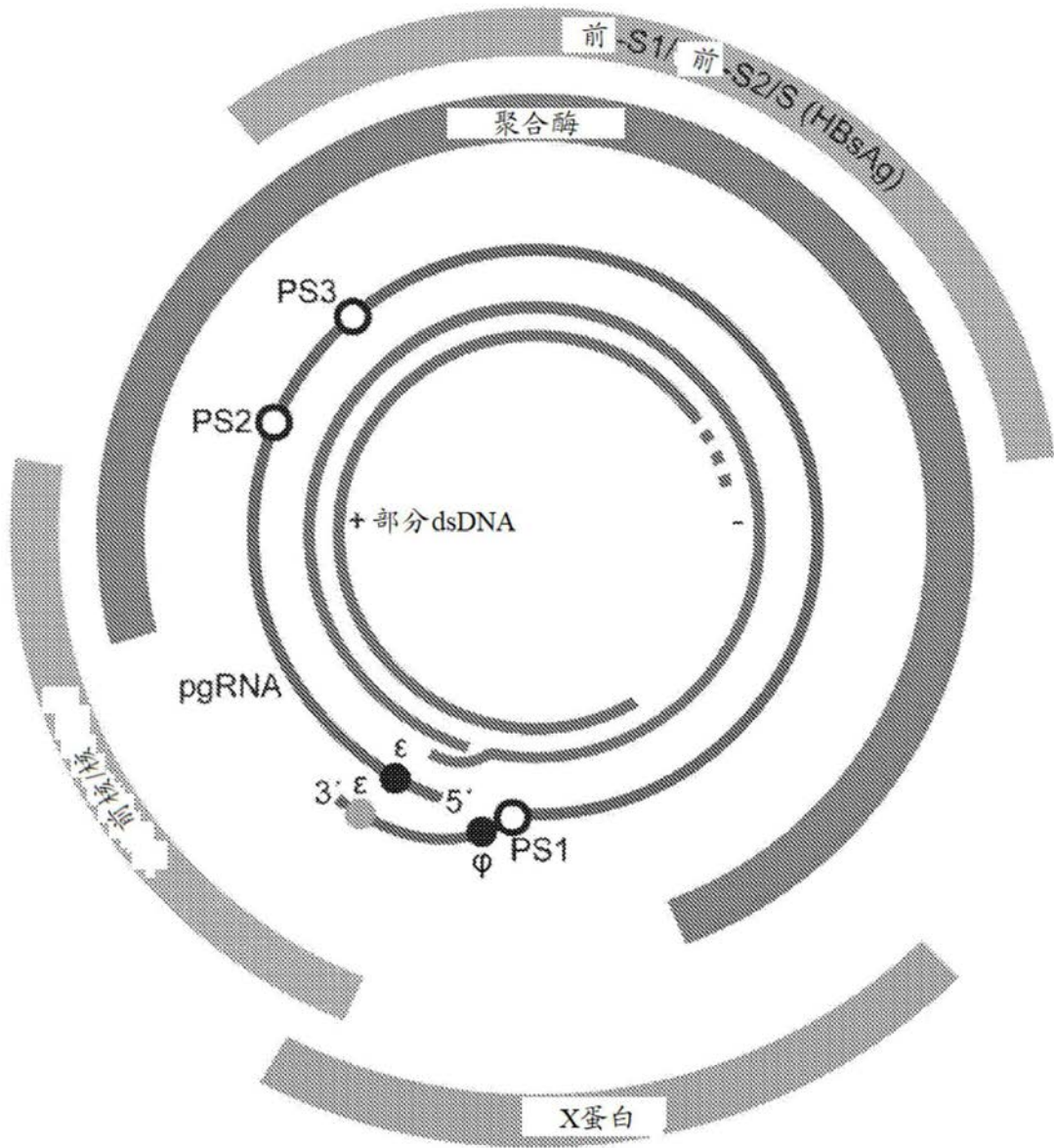


图1

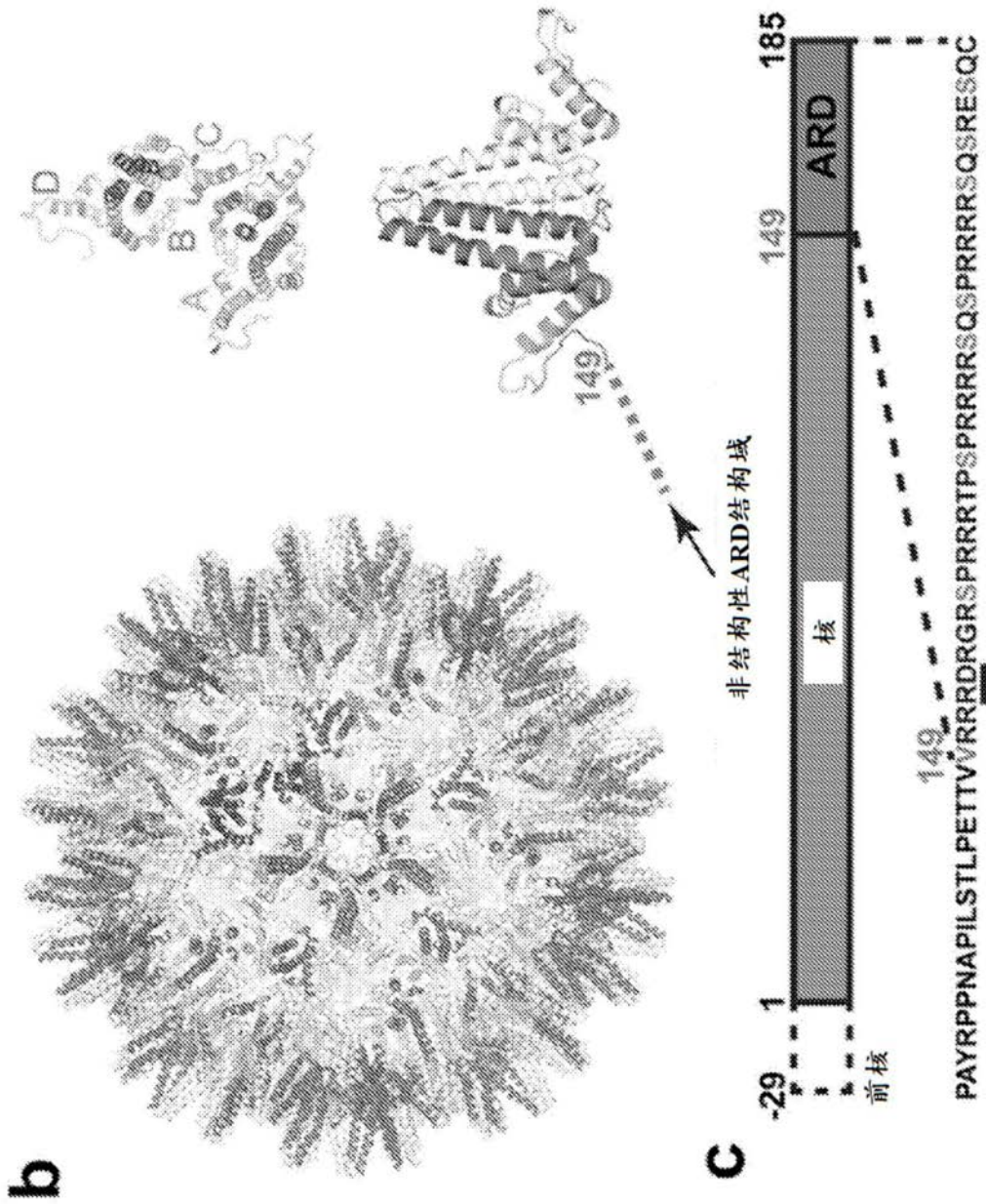


图1续

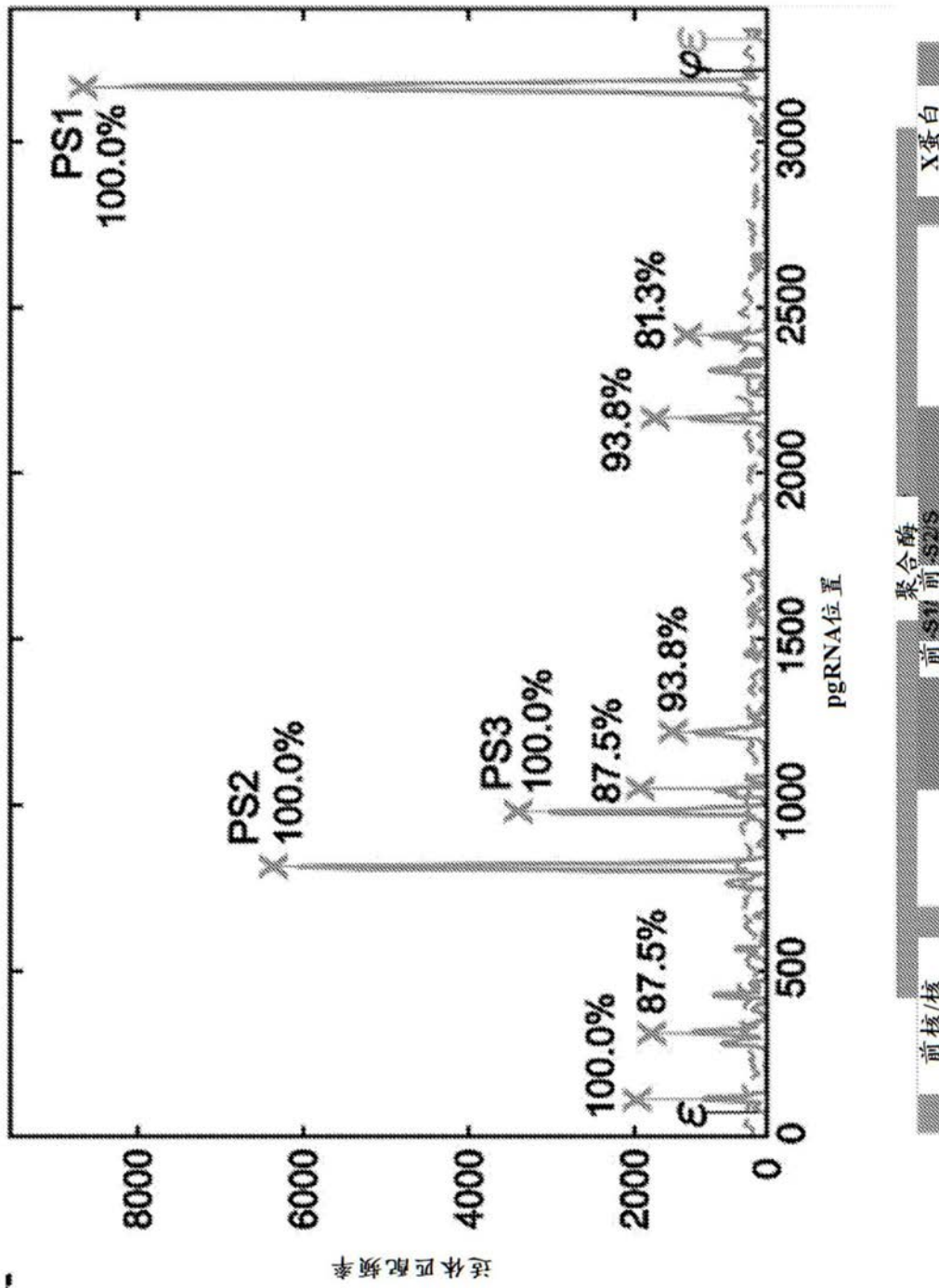
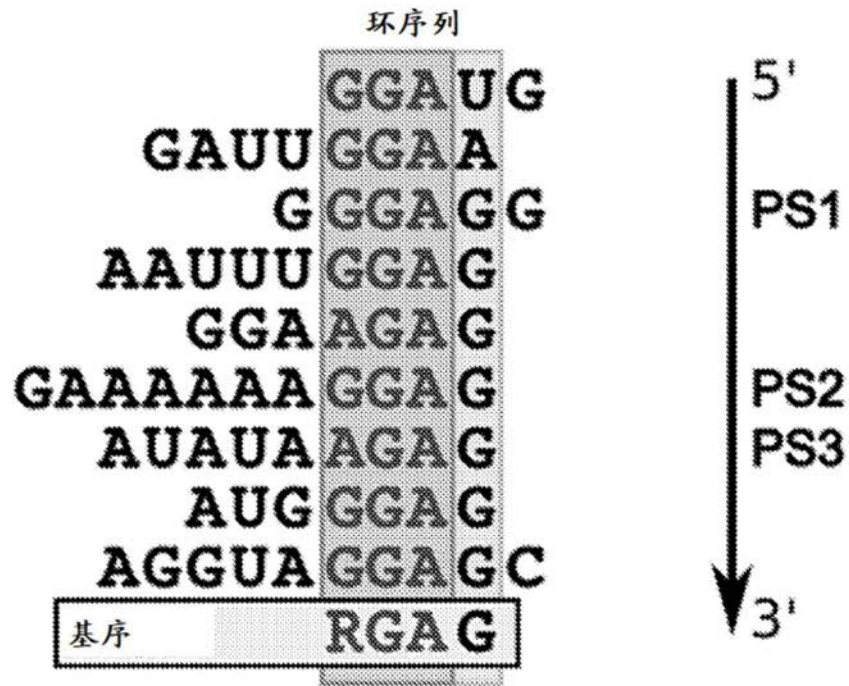


图2

b



c

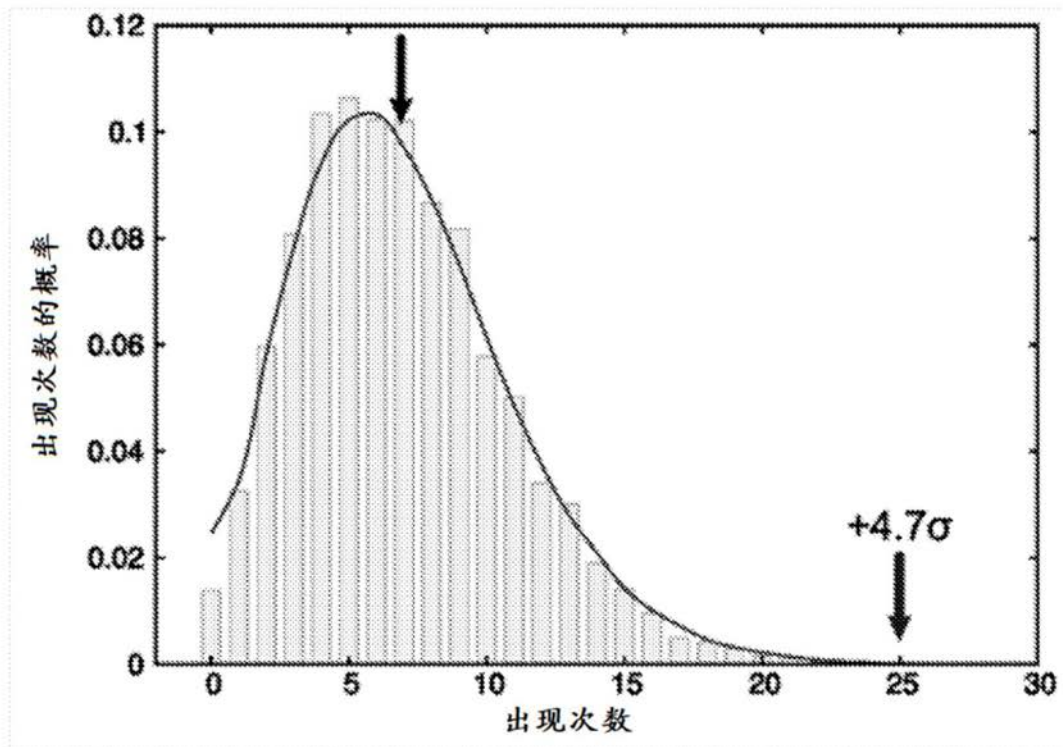


图2续

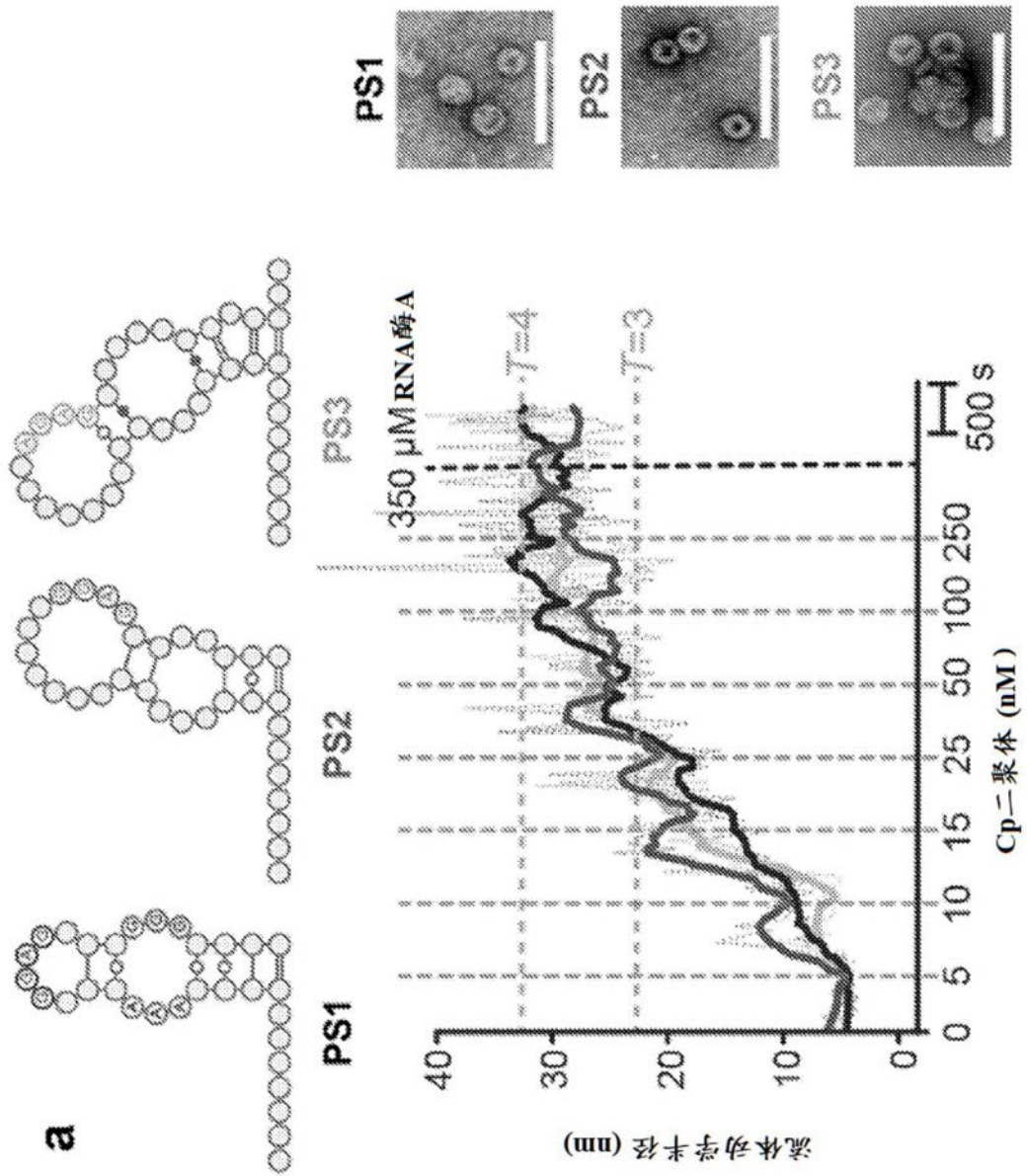


图3

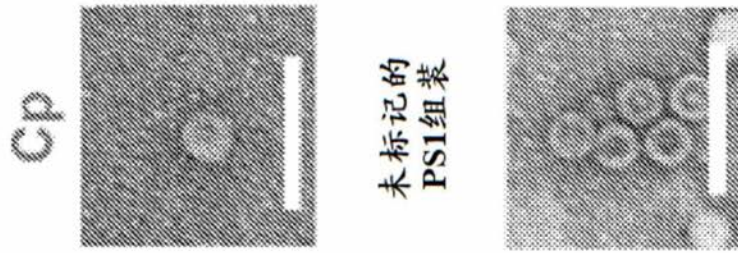
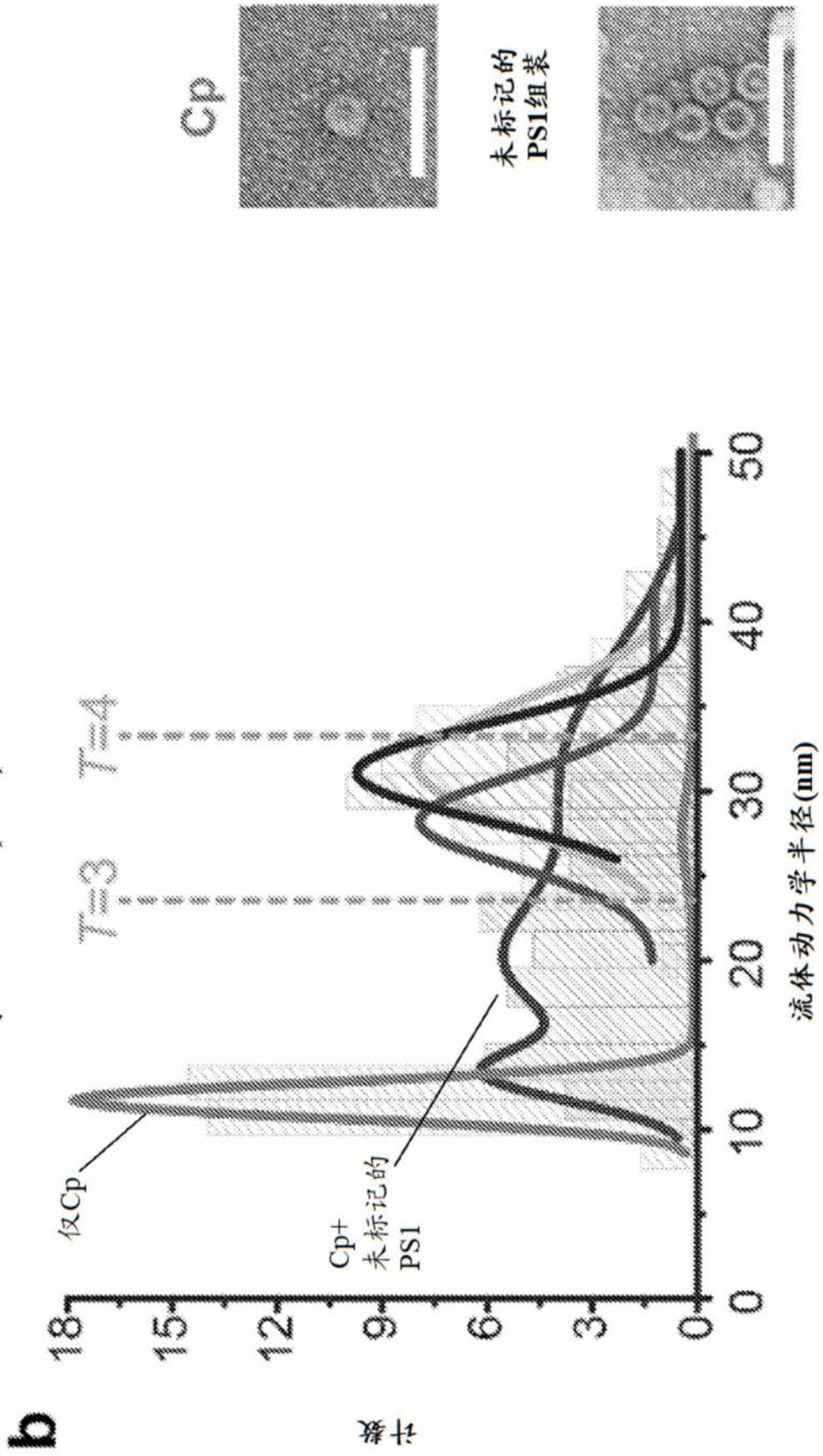


图3续

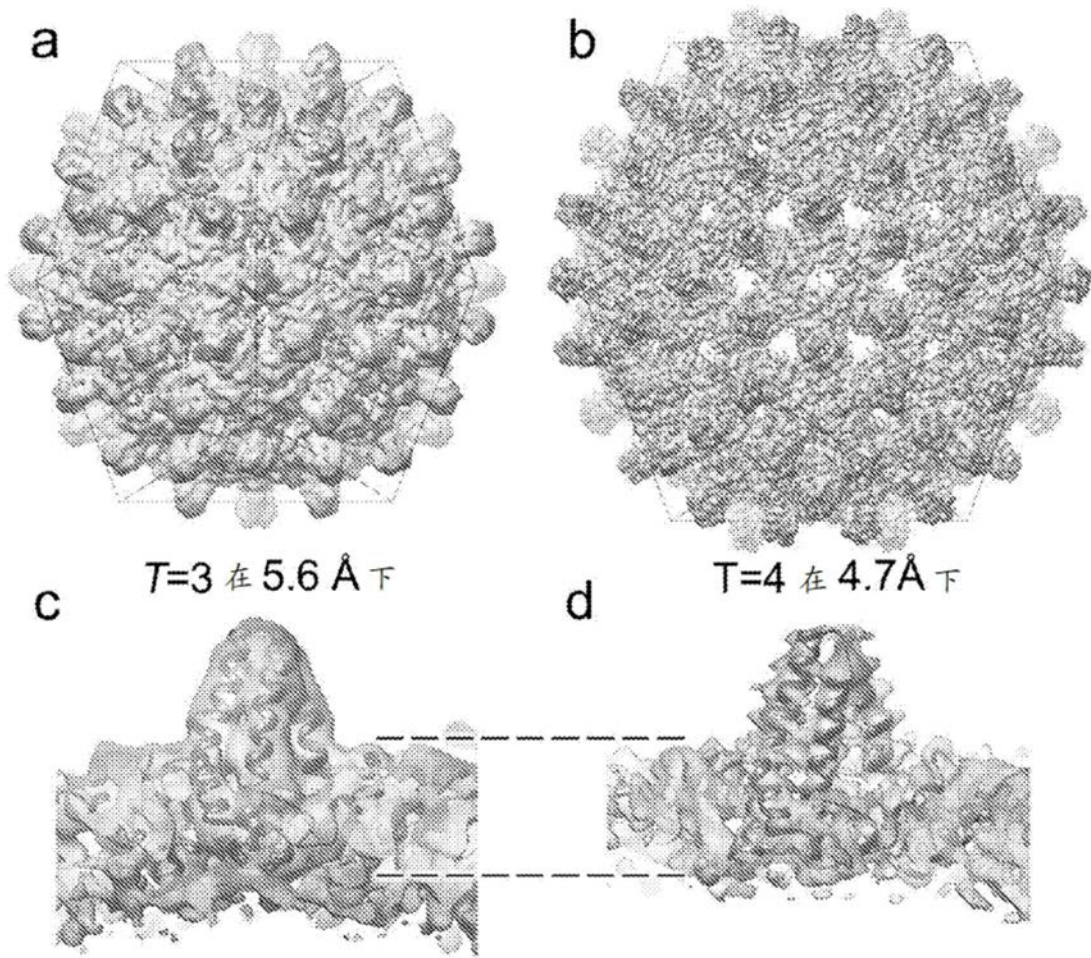


图4

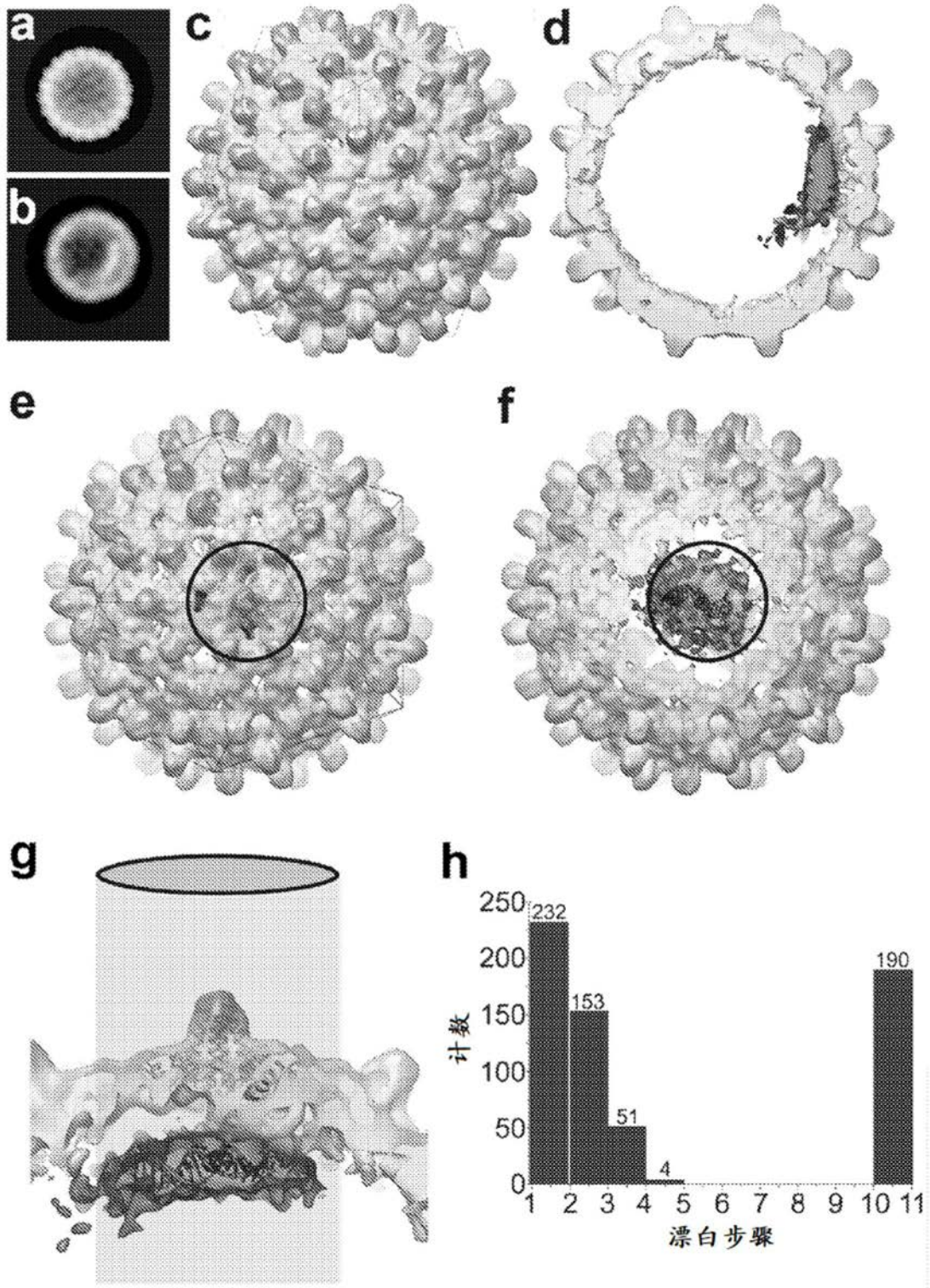


图5

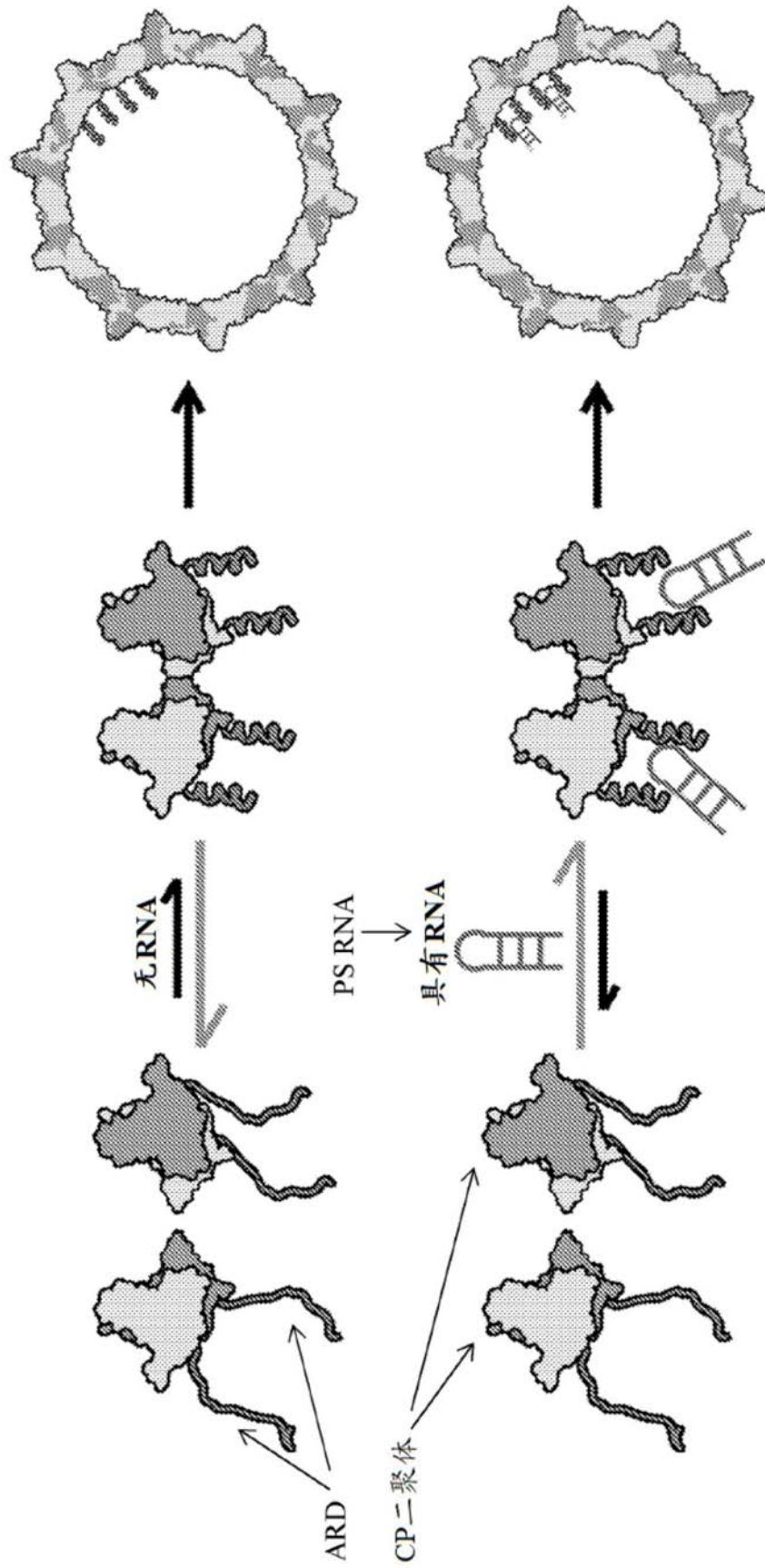


图6

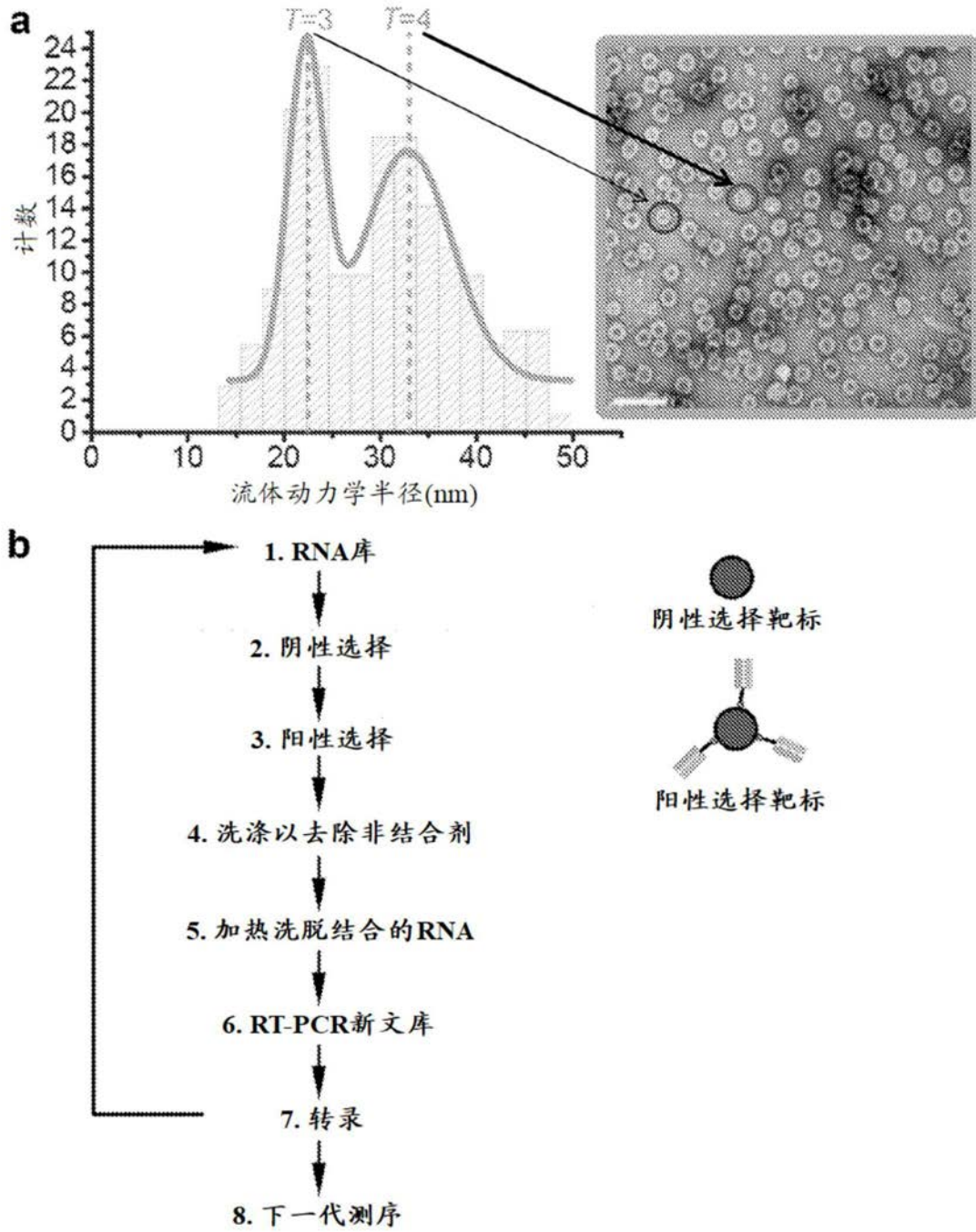


图7

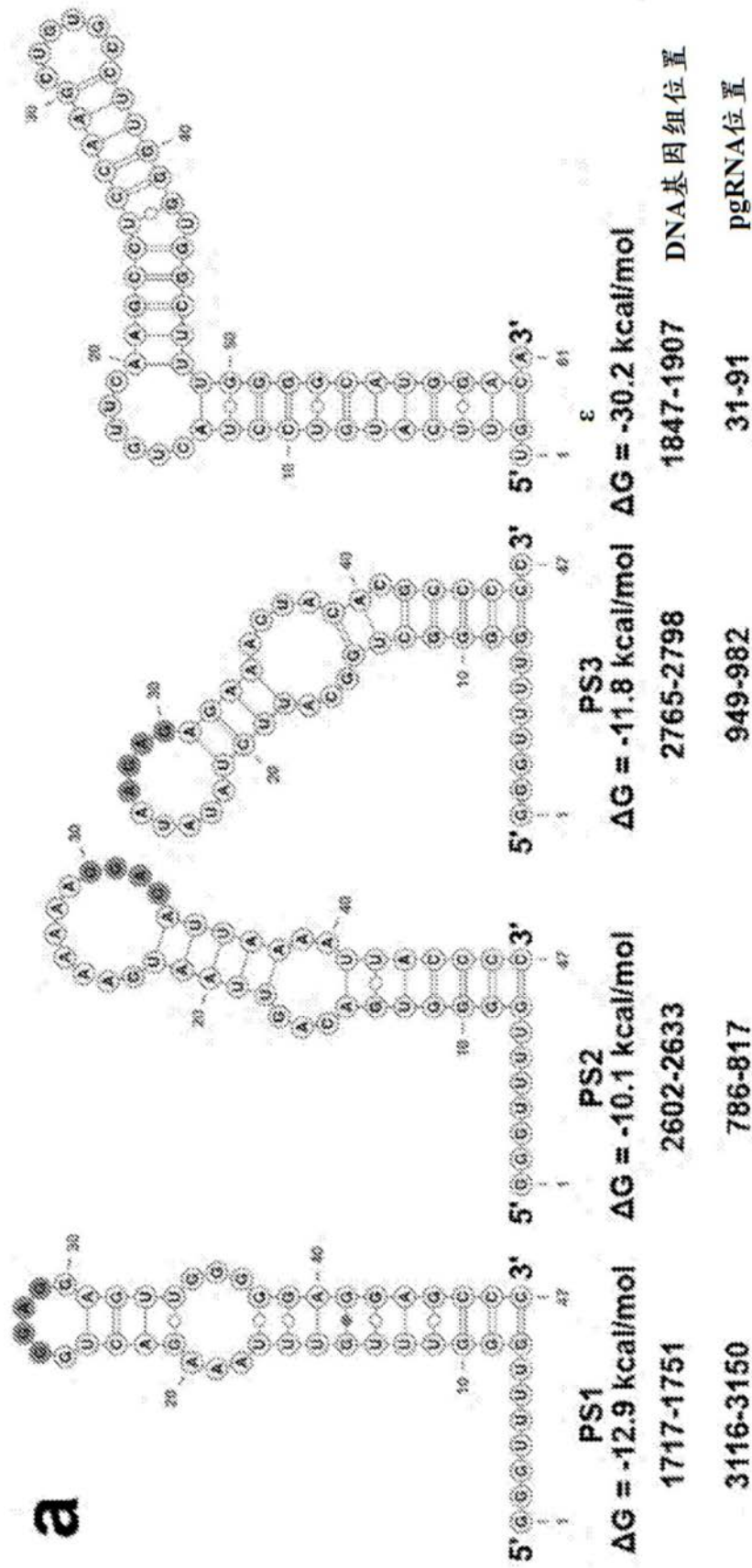


图8

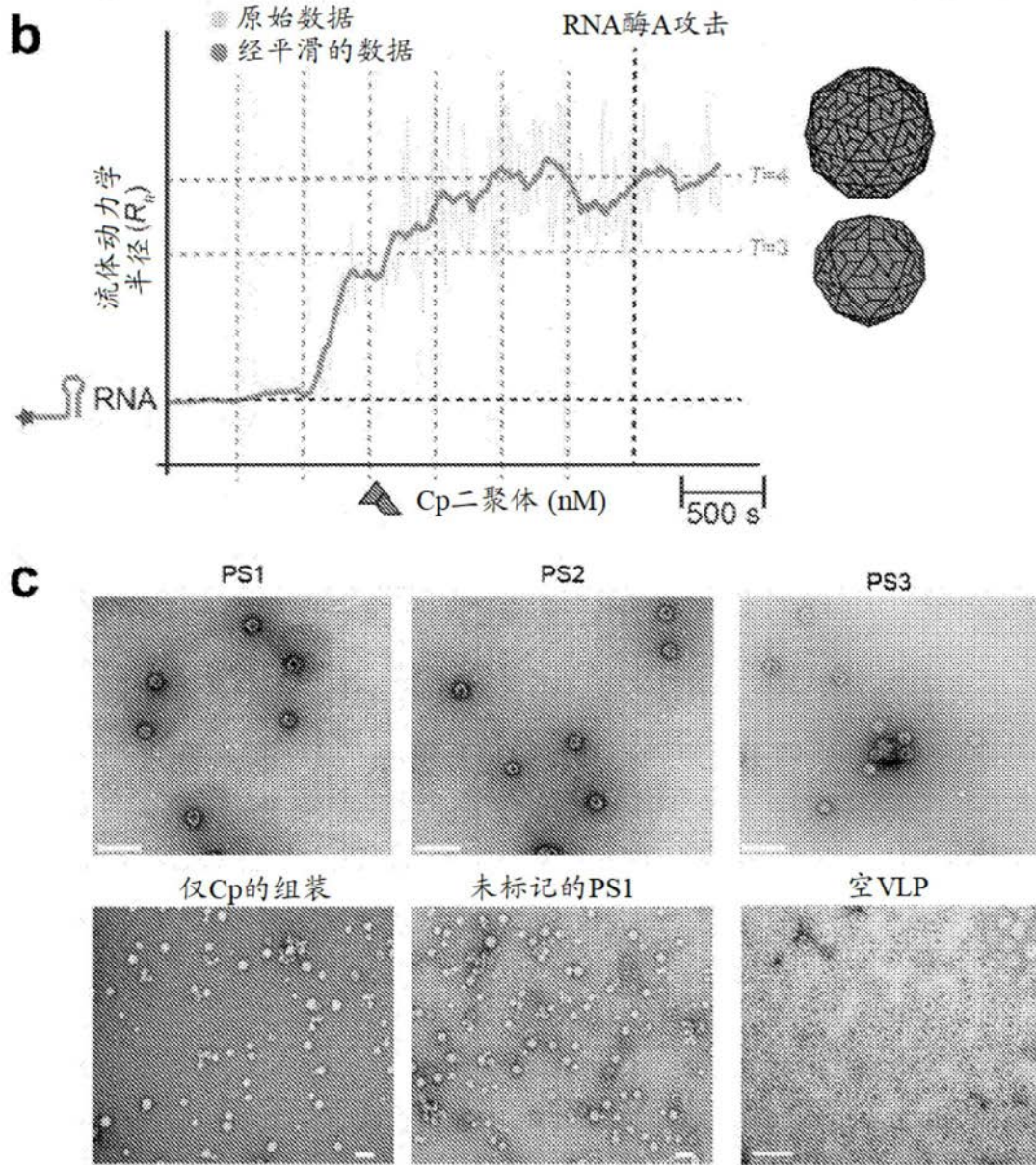


图8续

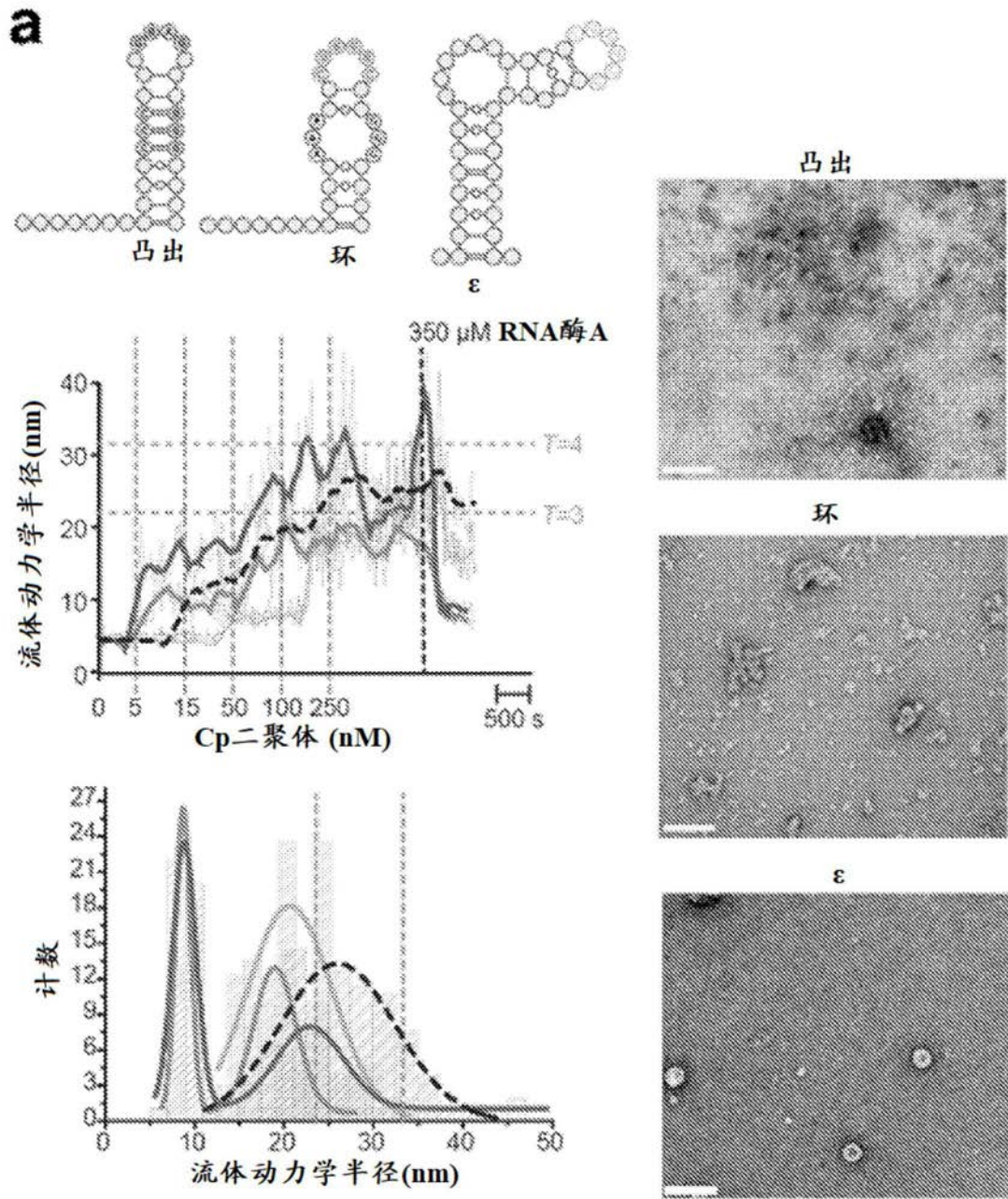


图9

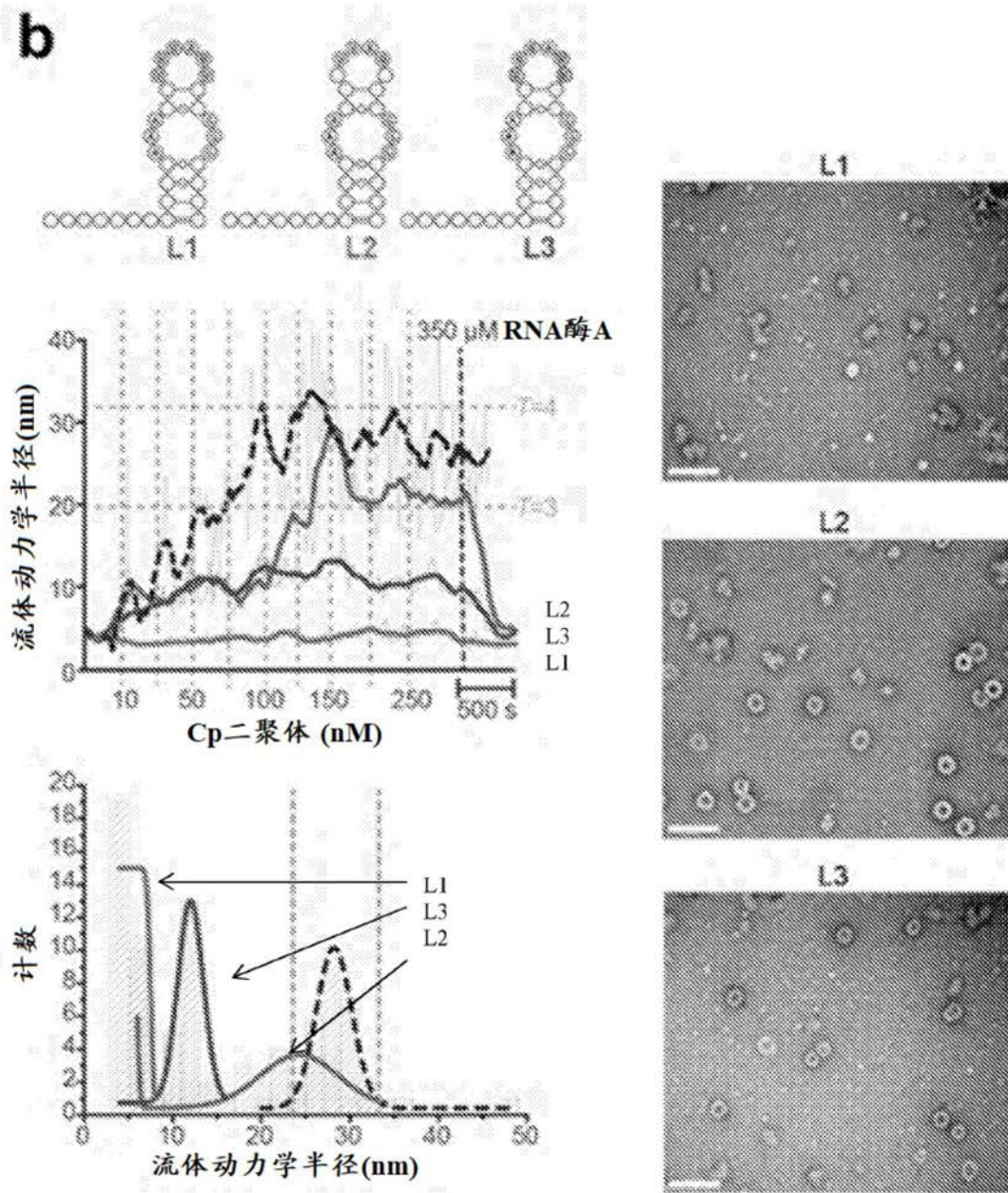


图9续

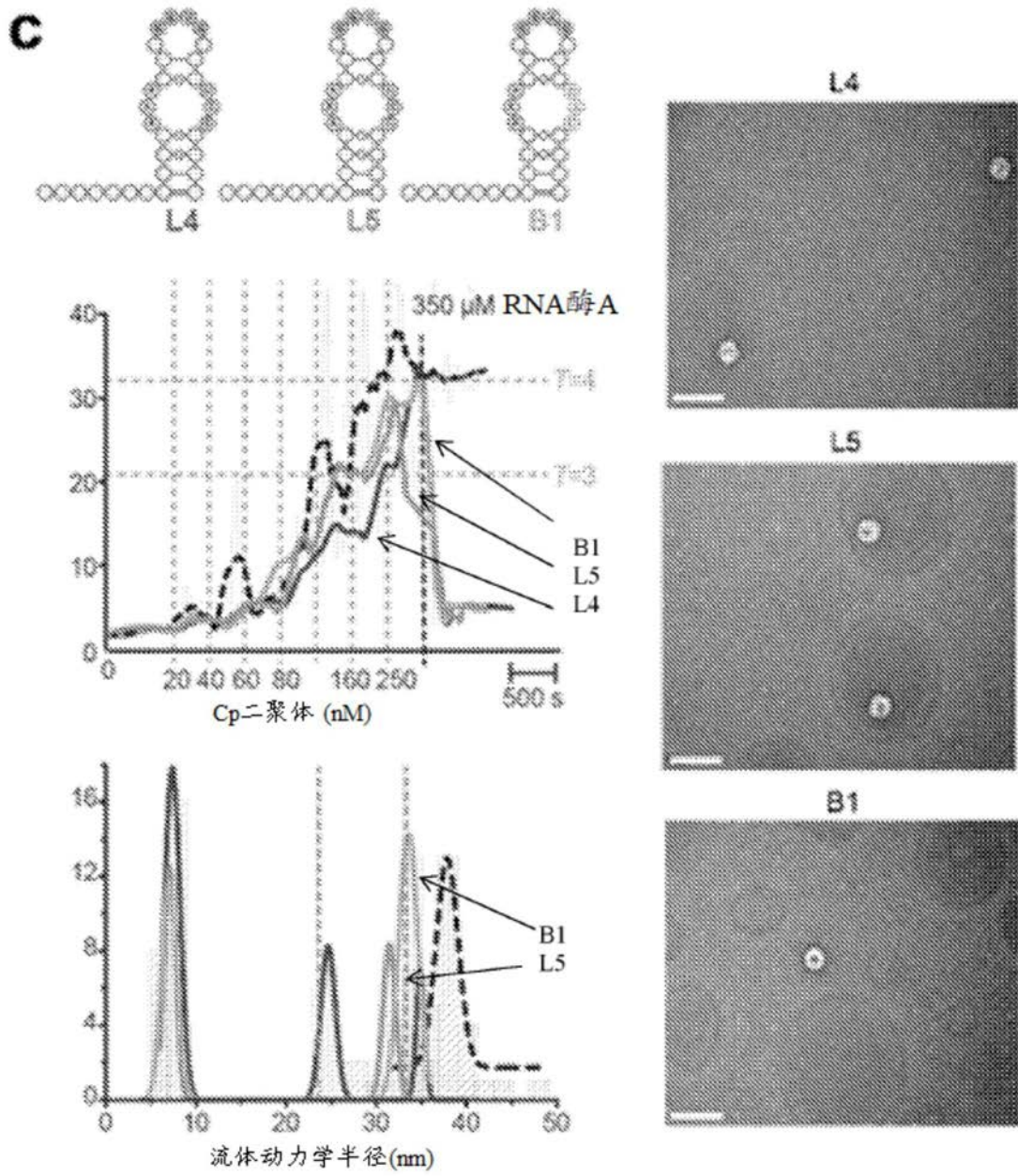


图9续

d

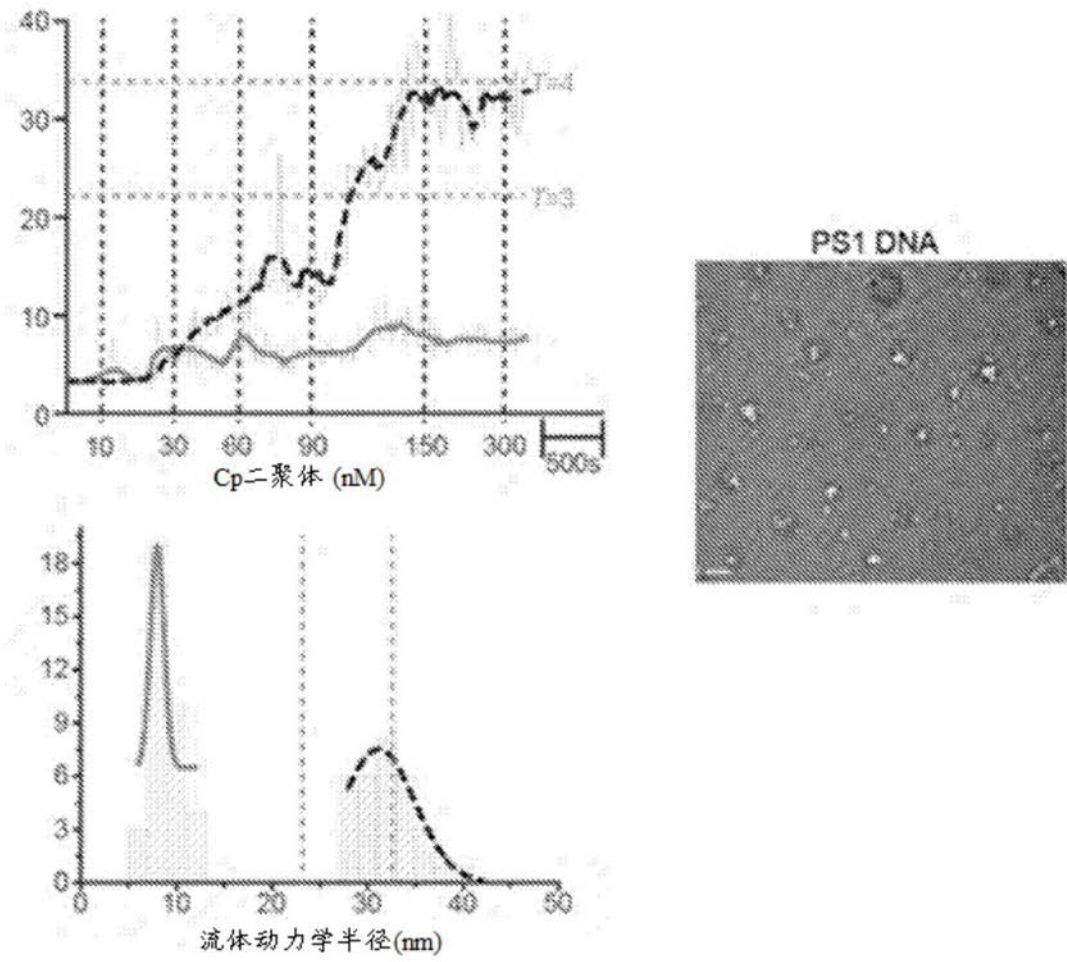


图9续

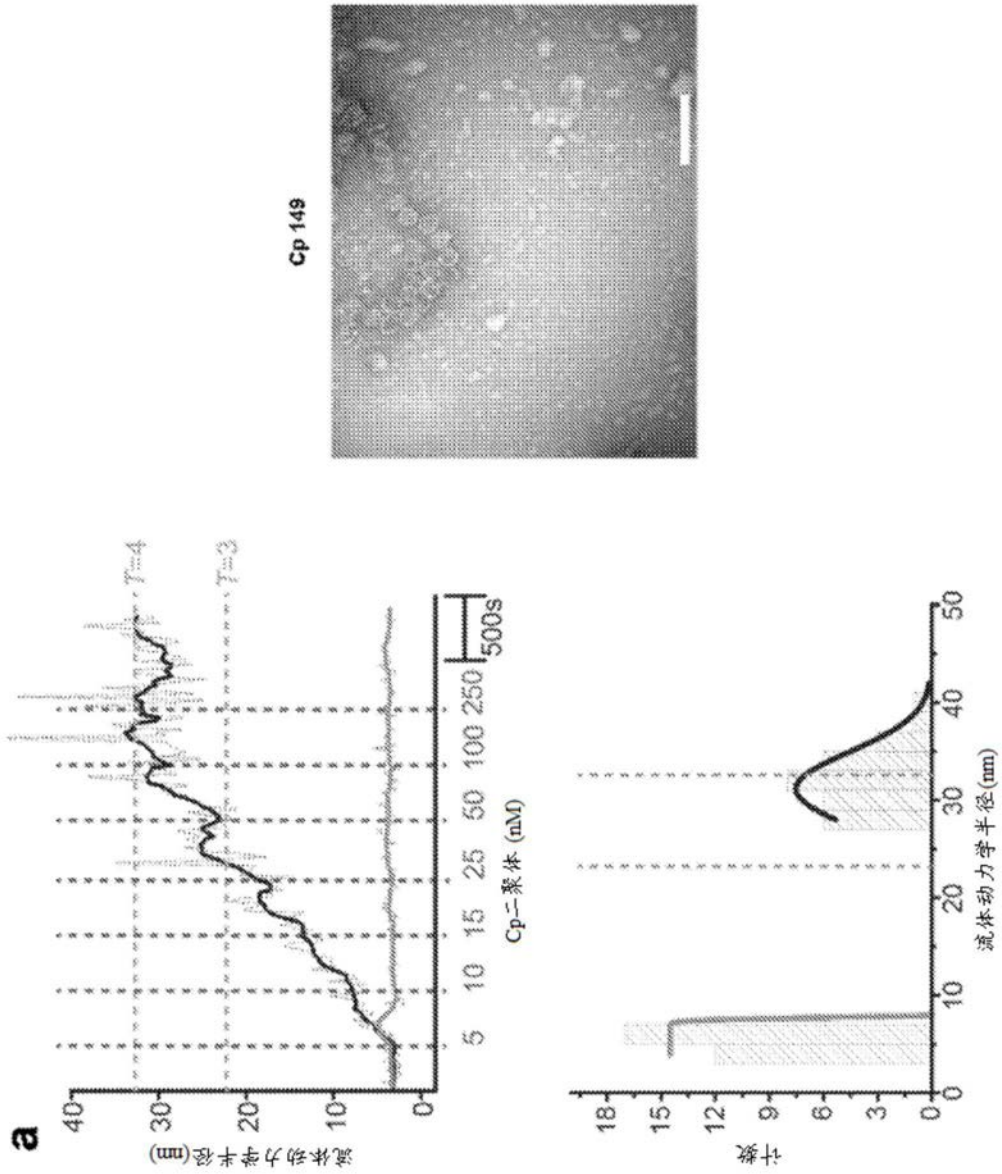


图10

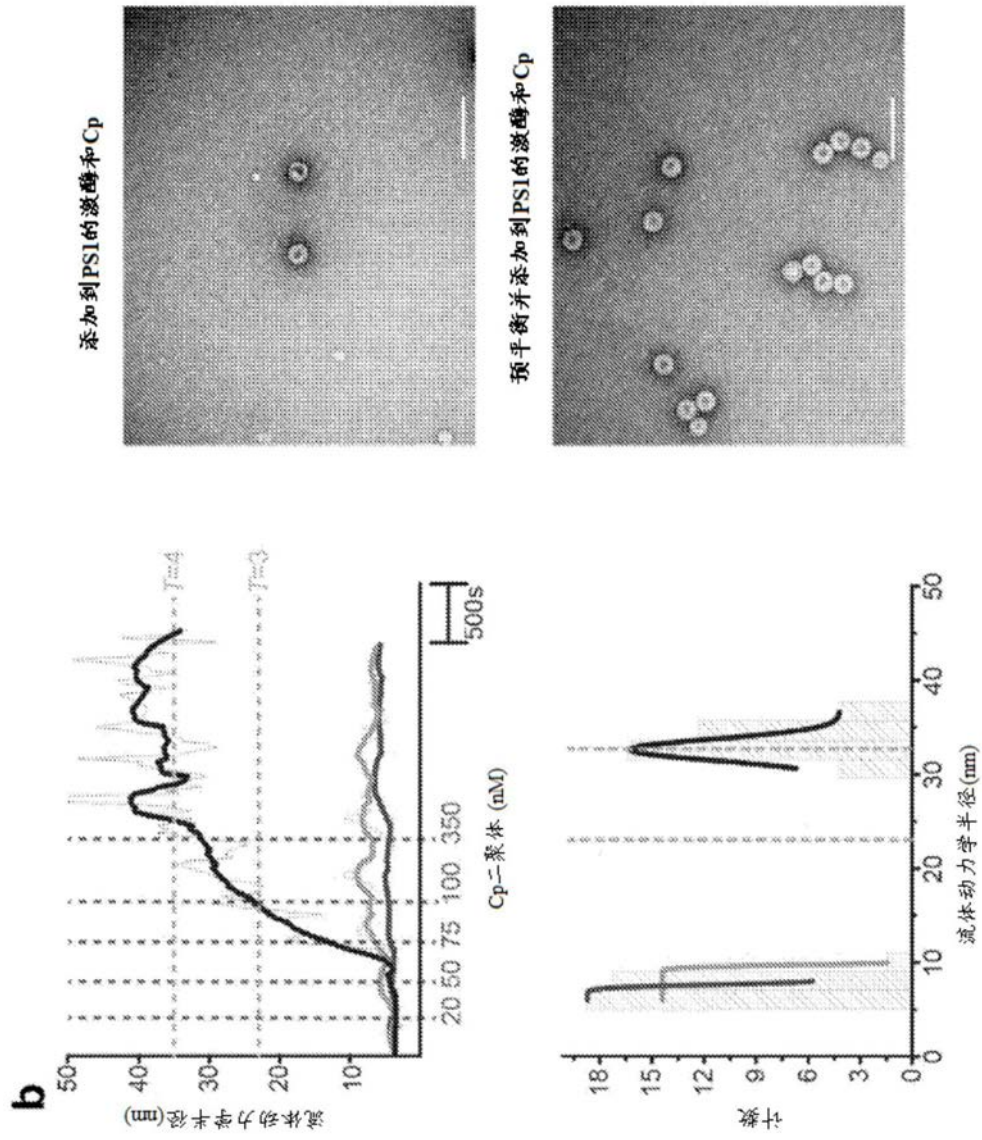


图10续

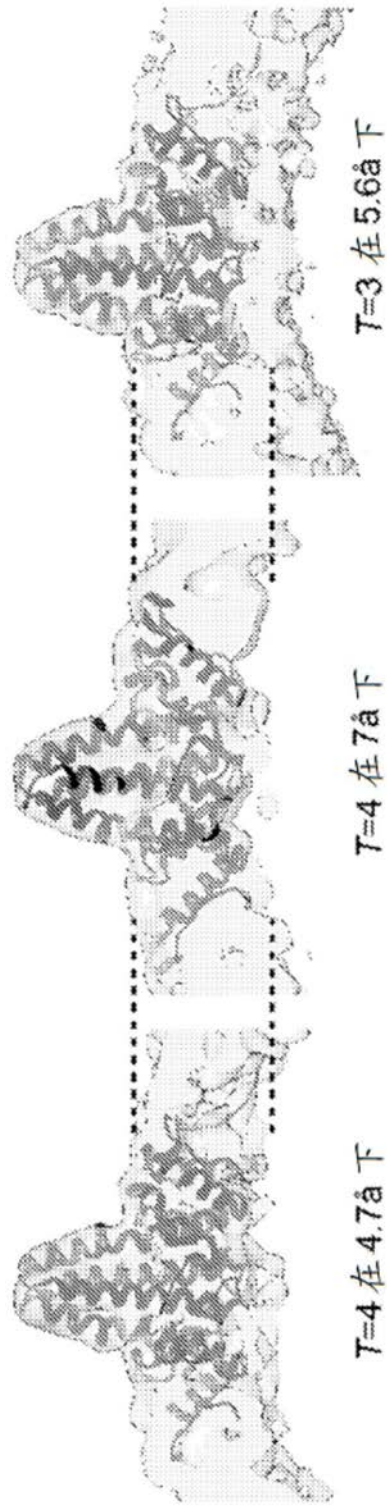


图11

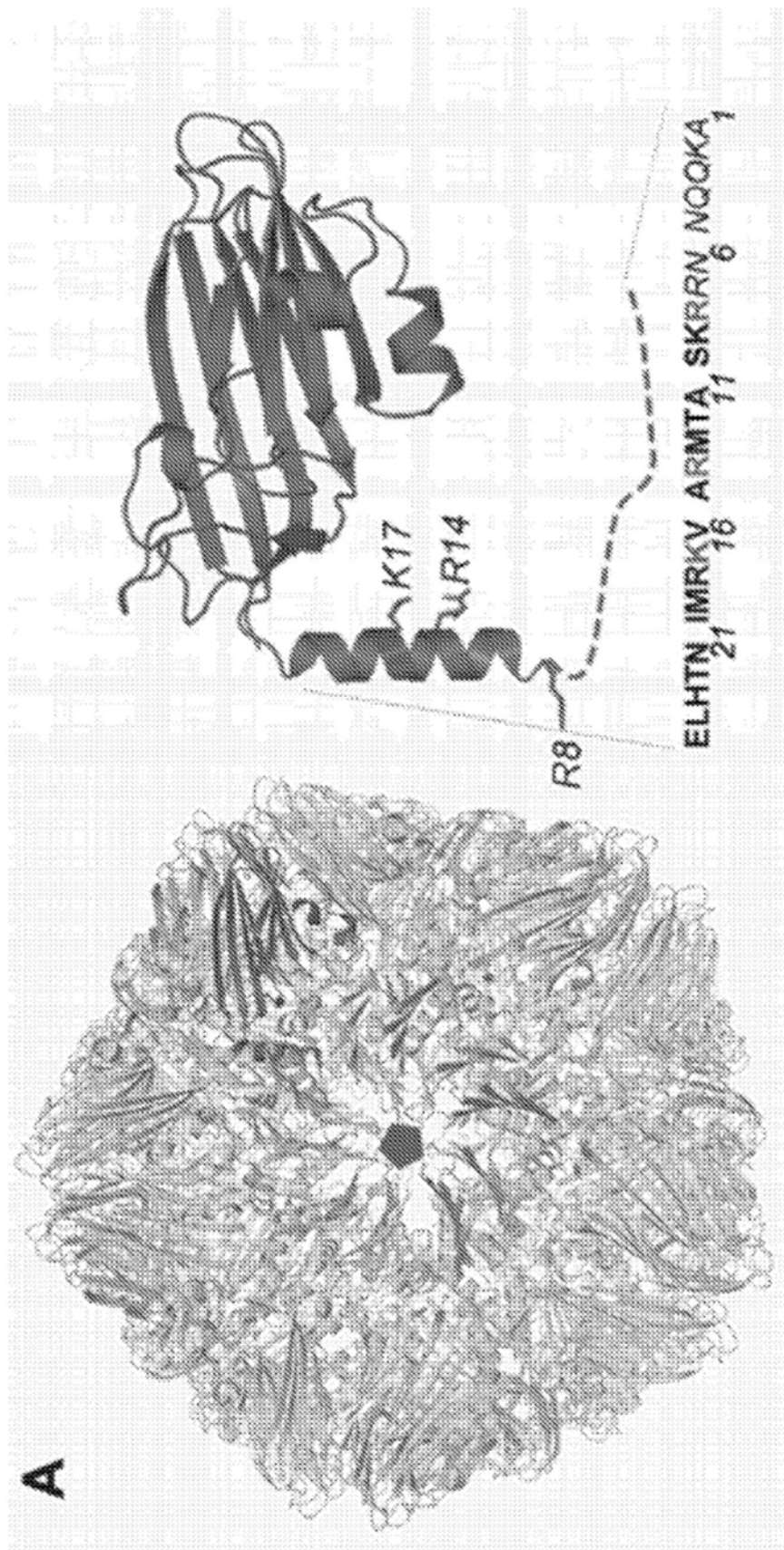


图12

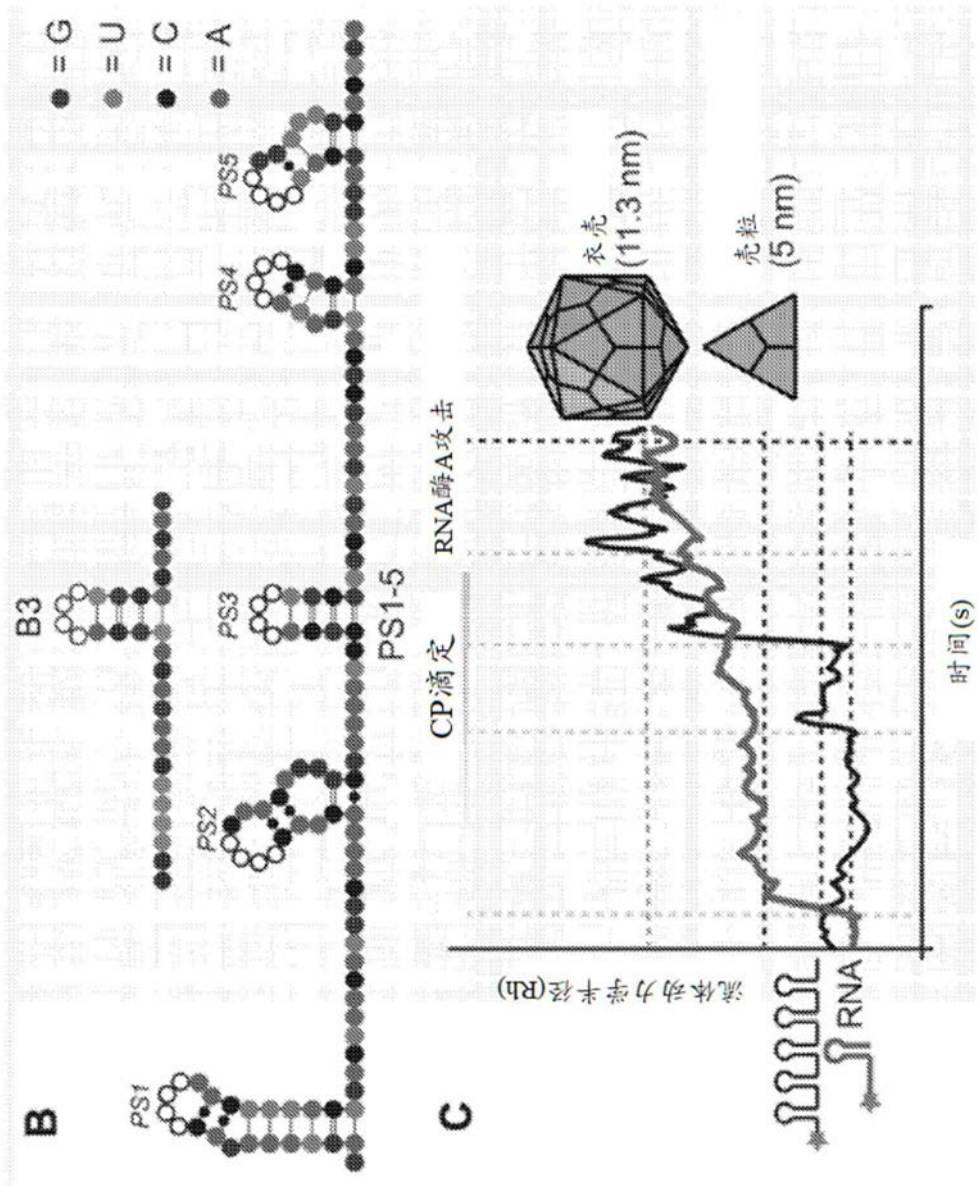


图12续

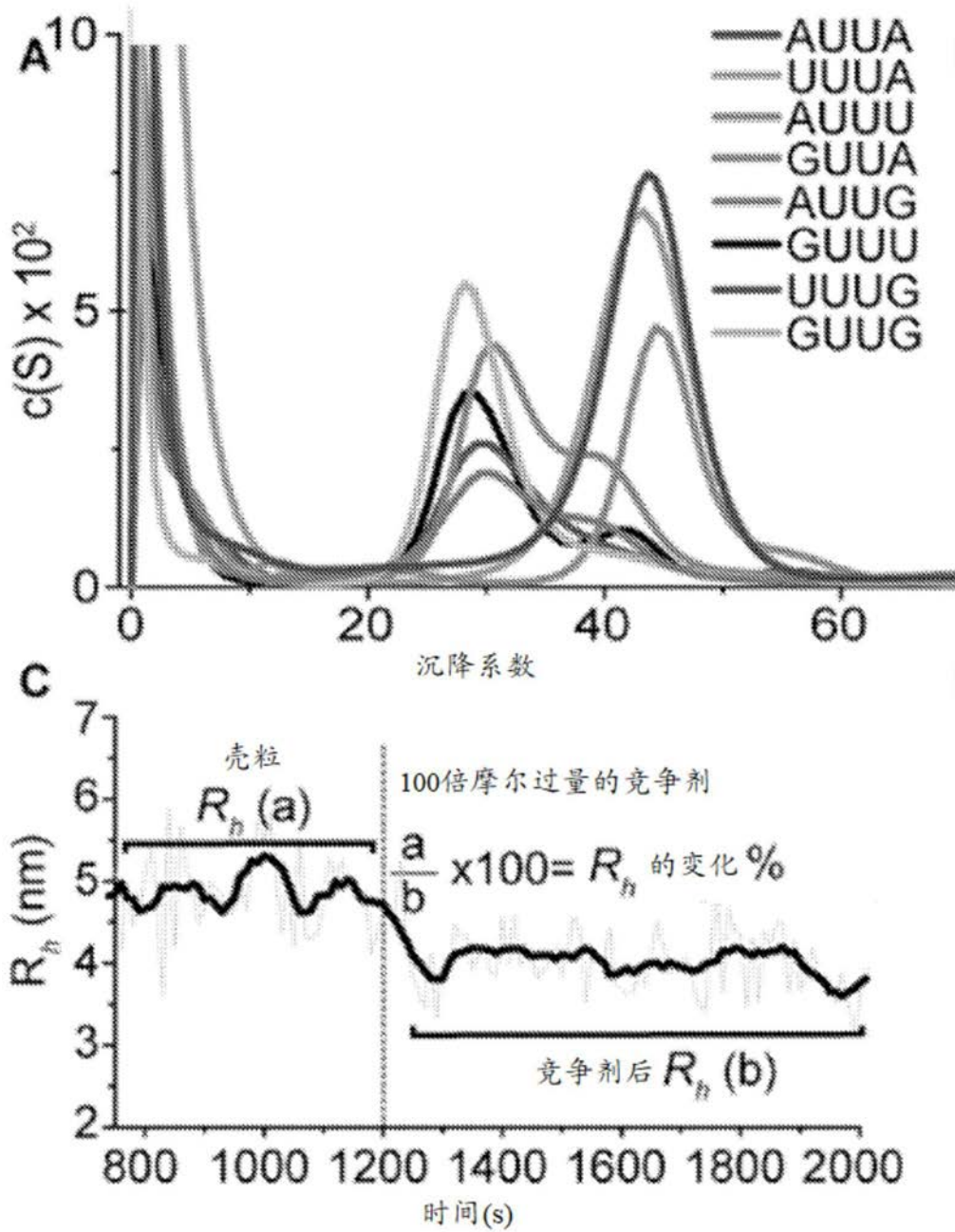


图13

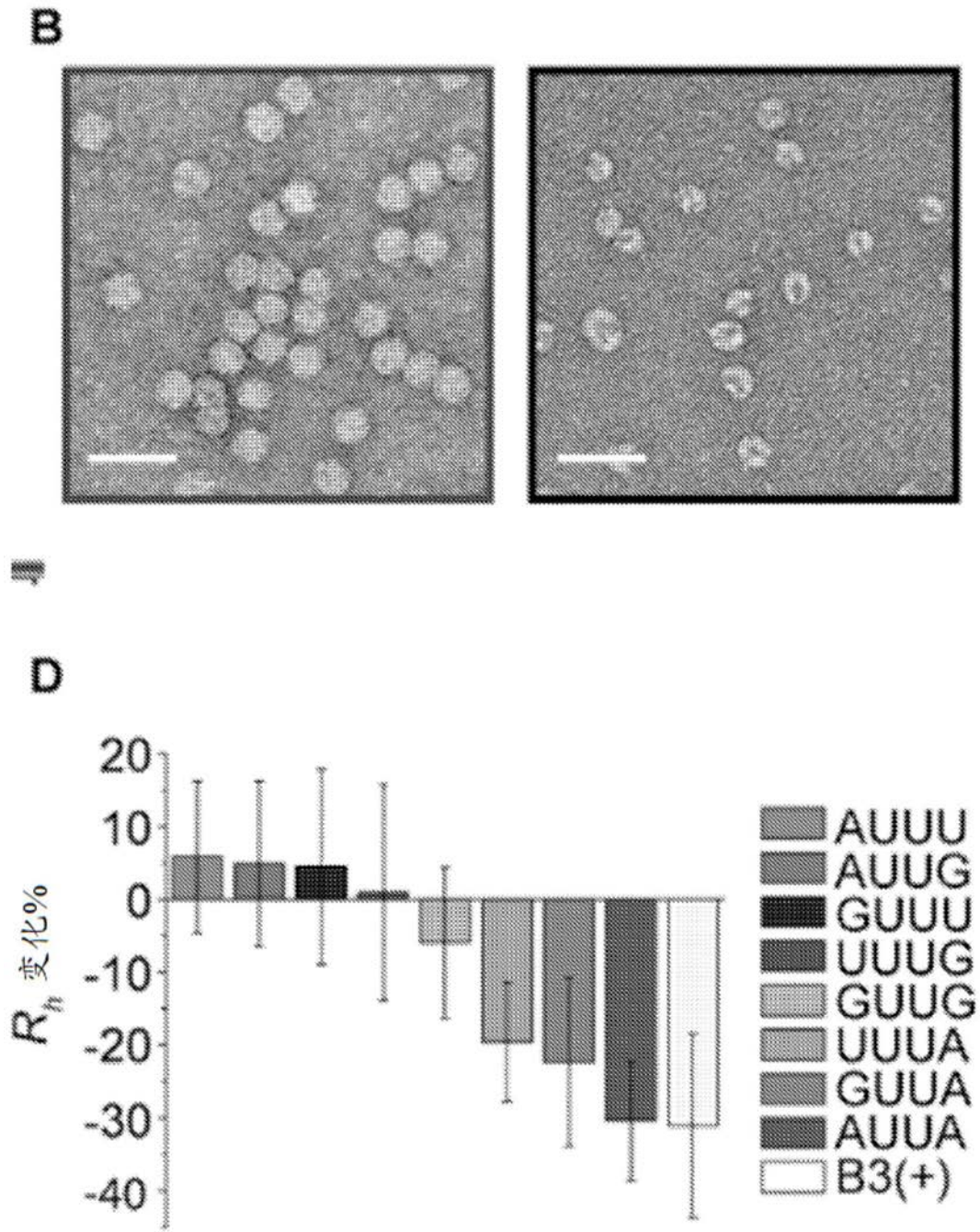


图13续

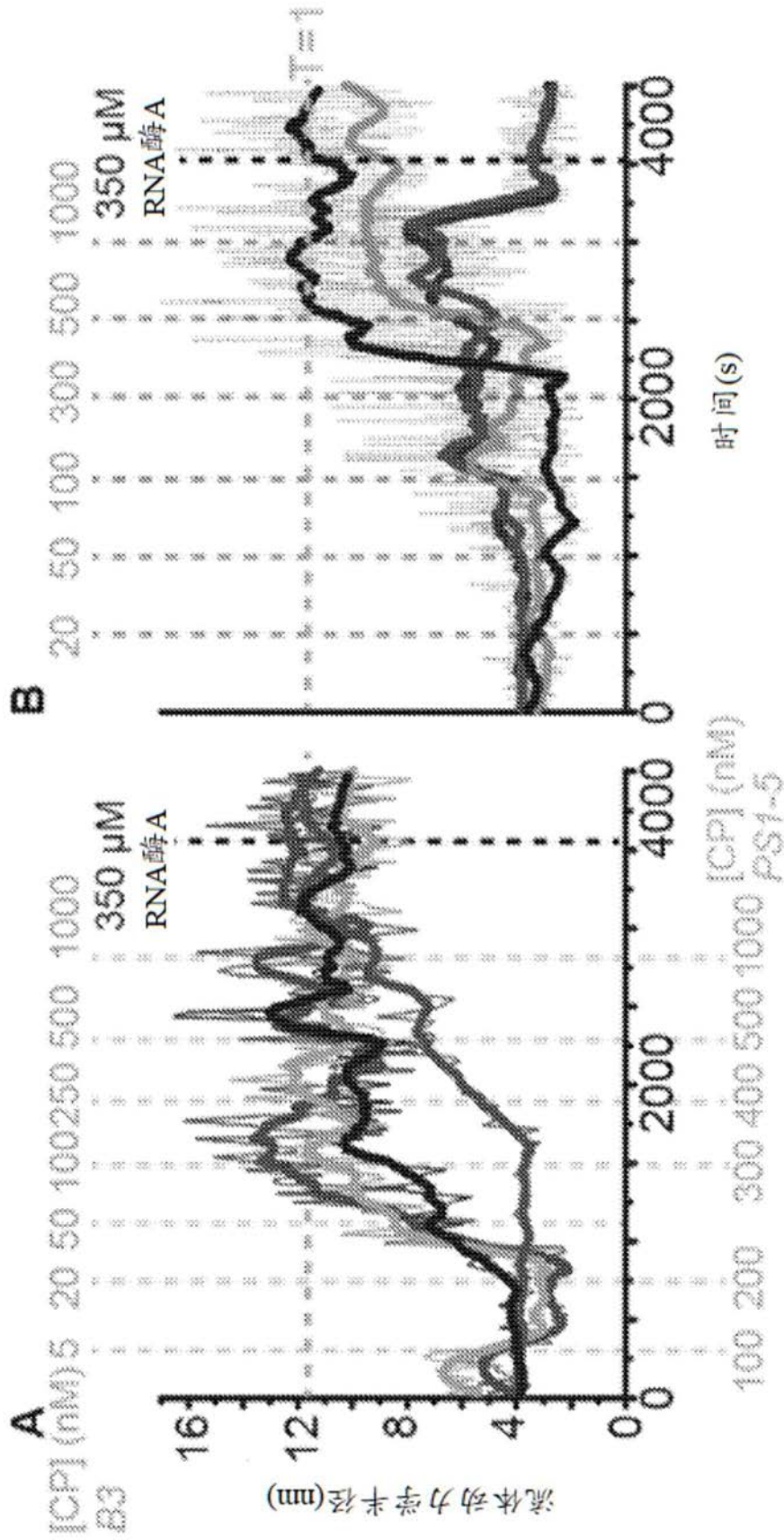


图14

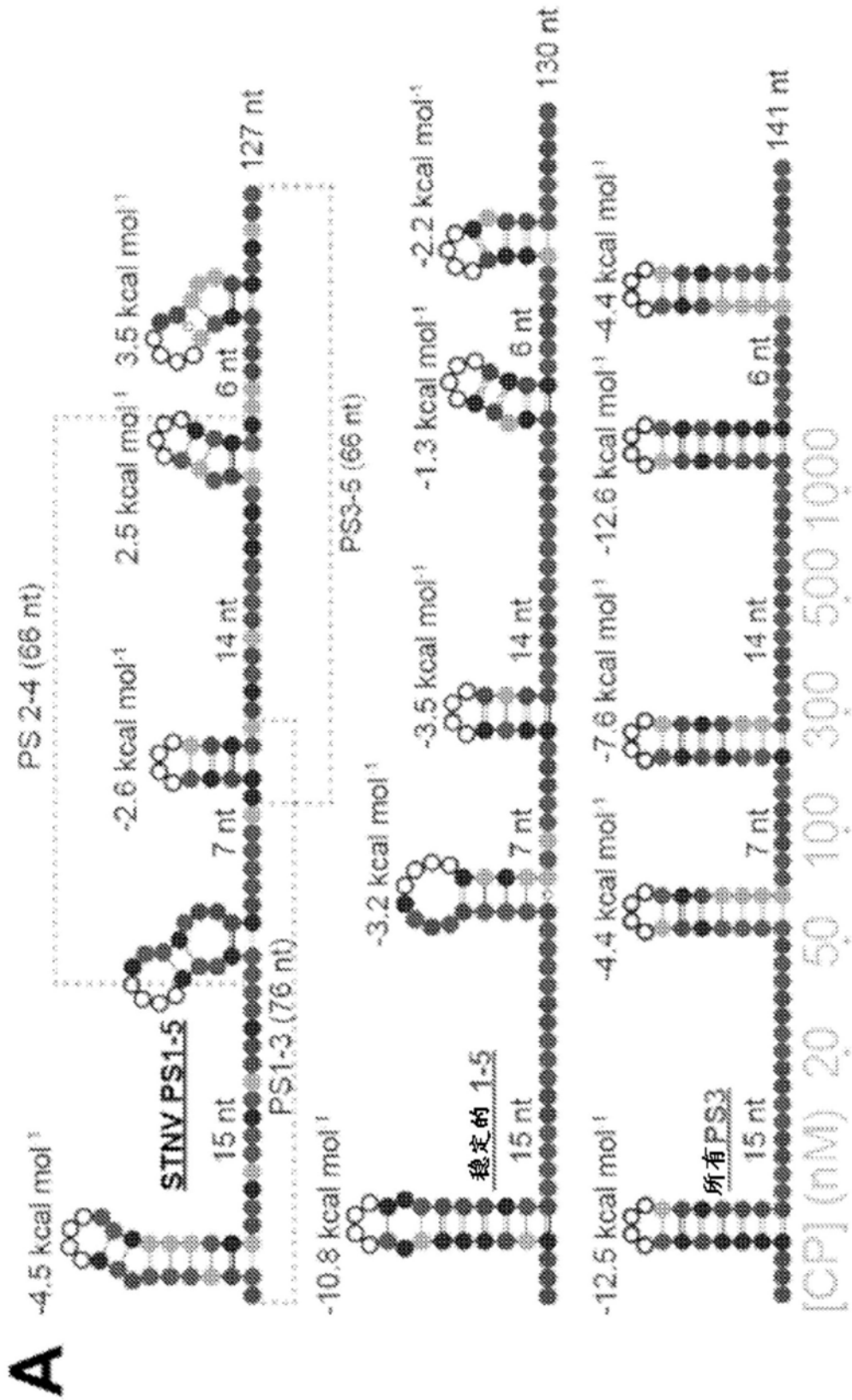


图15

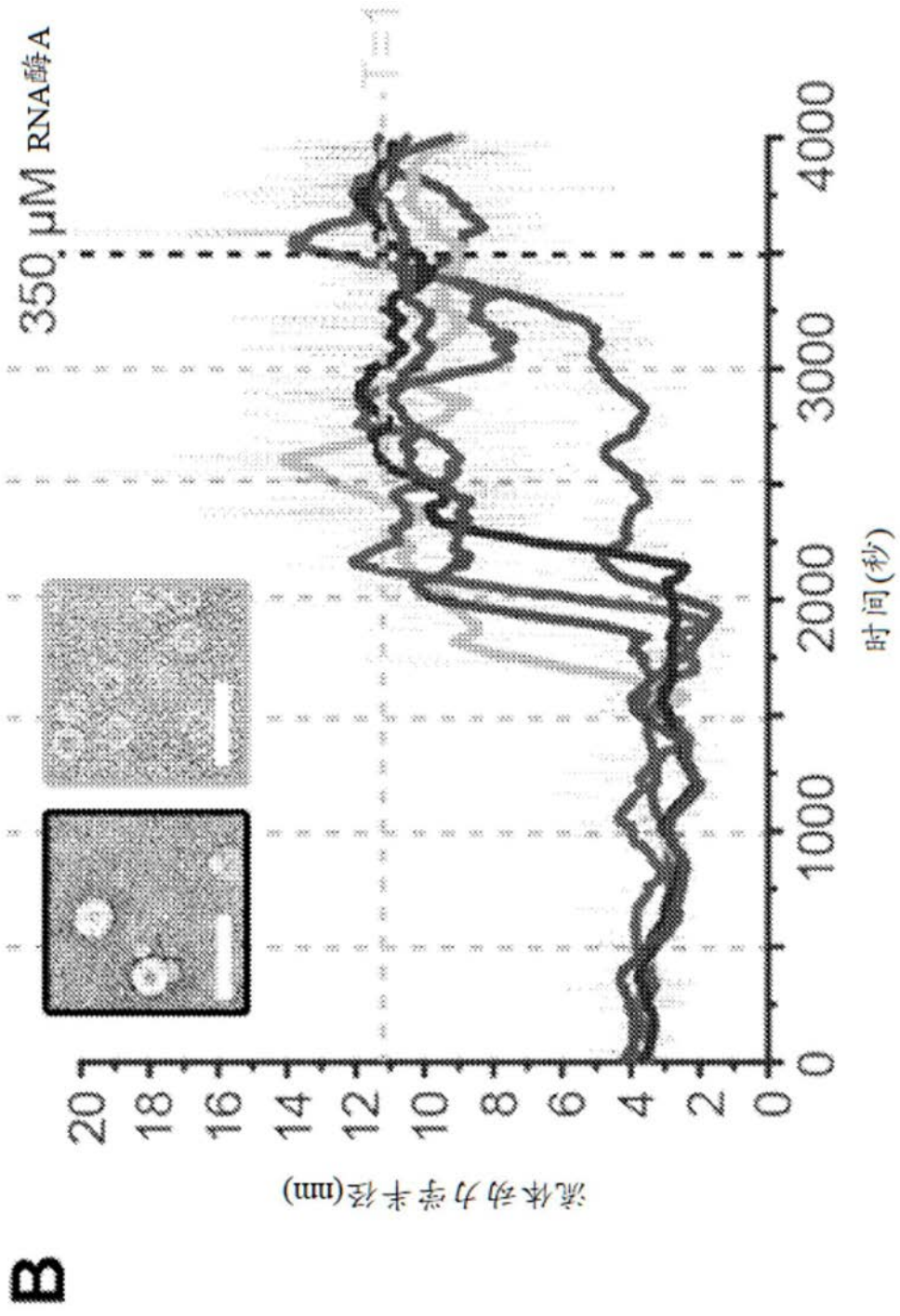


图15续

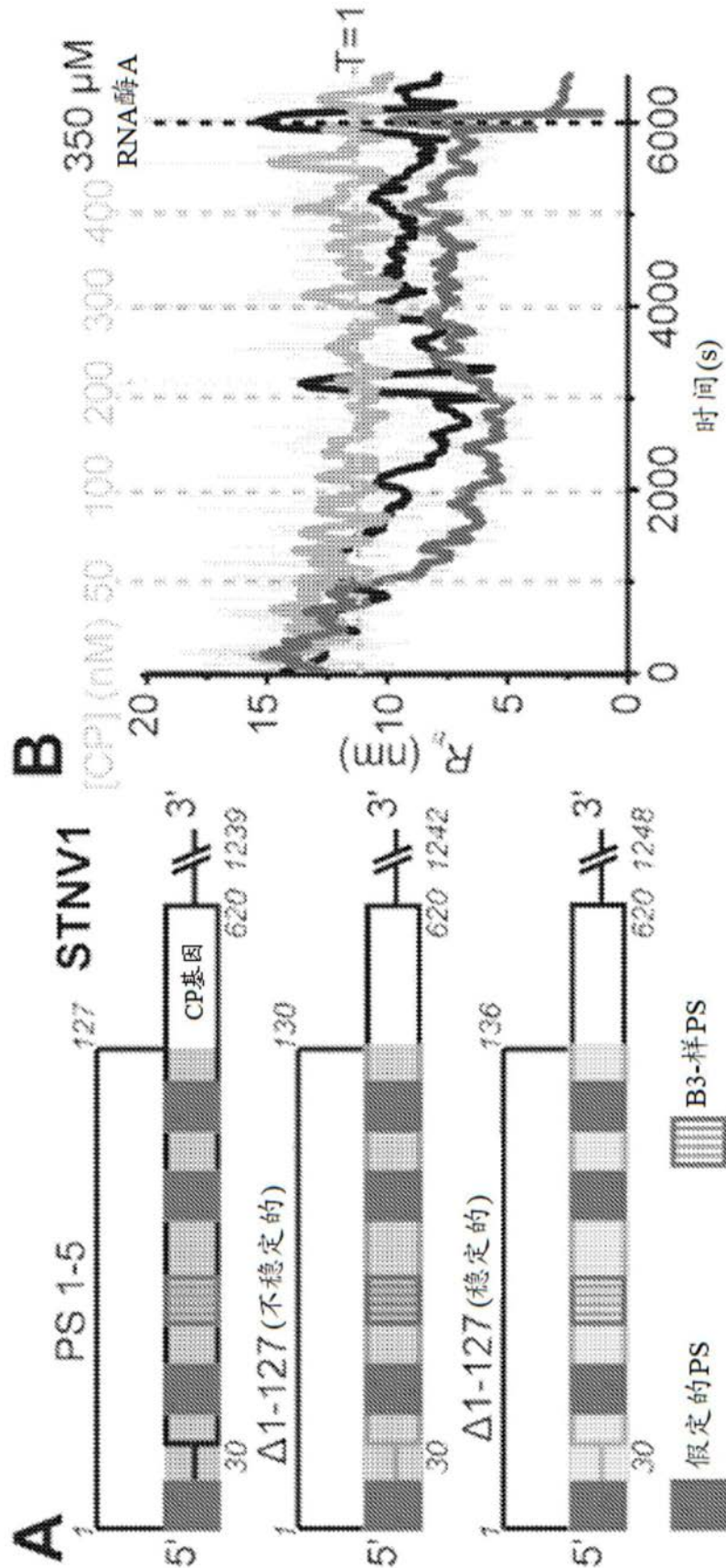


图16

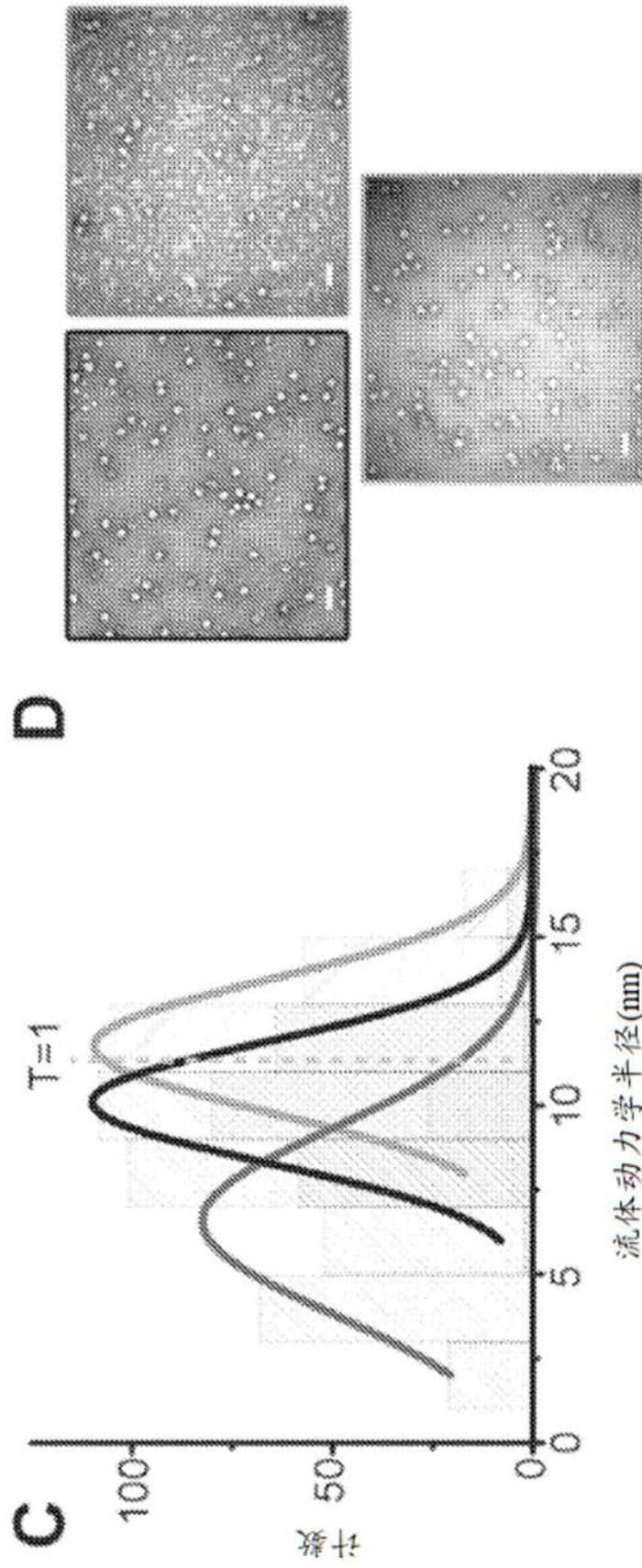


图16续

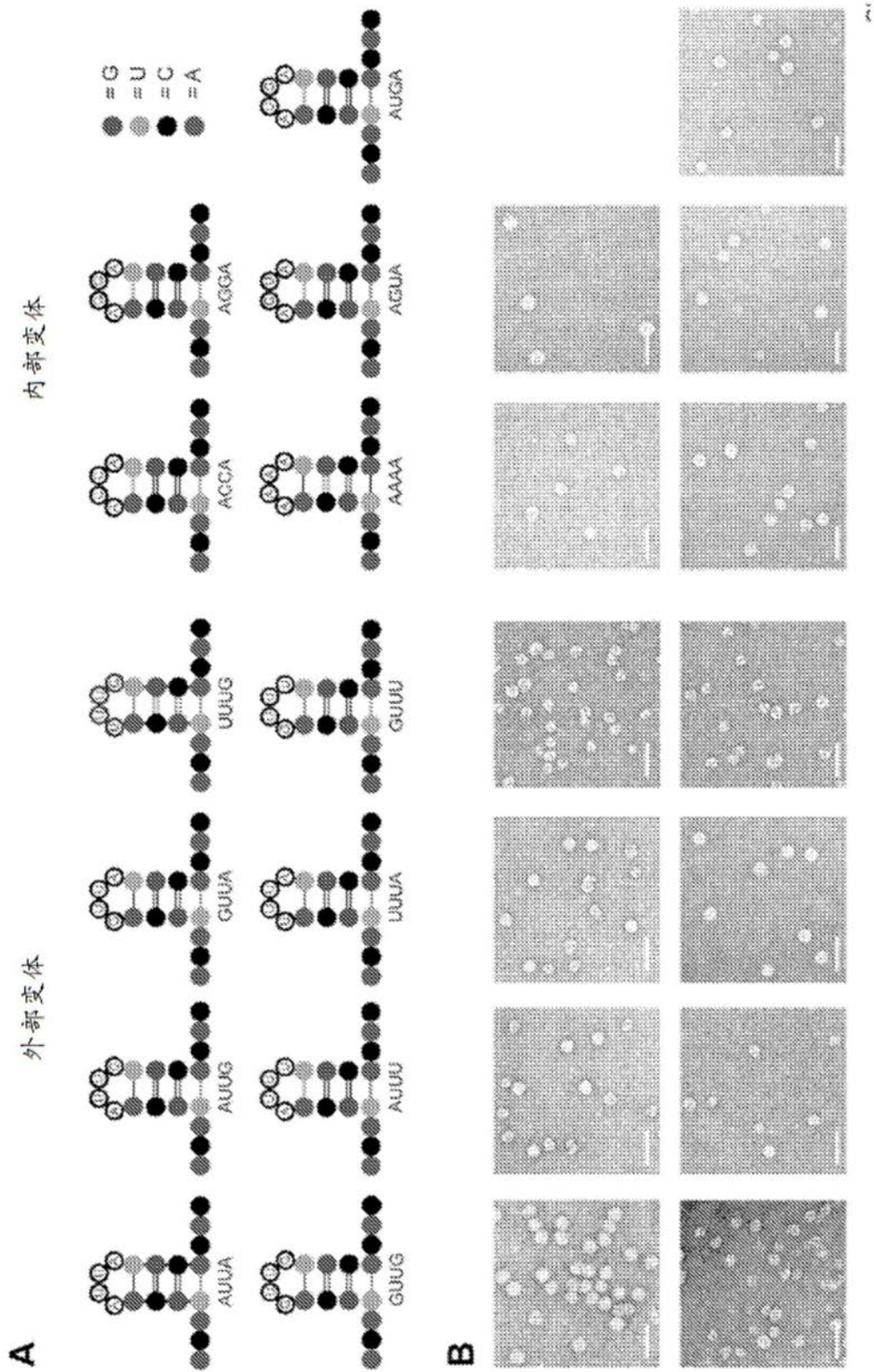


图17

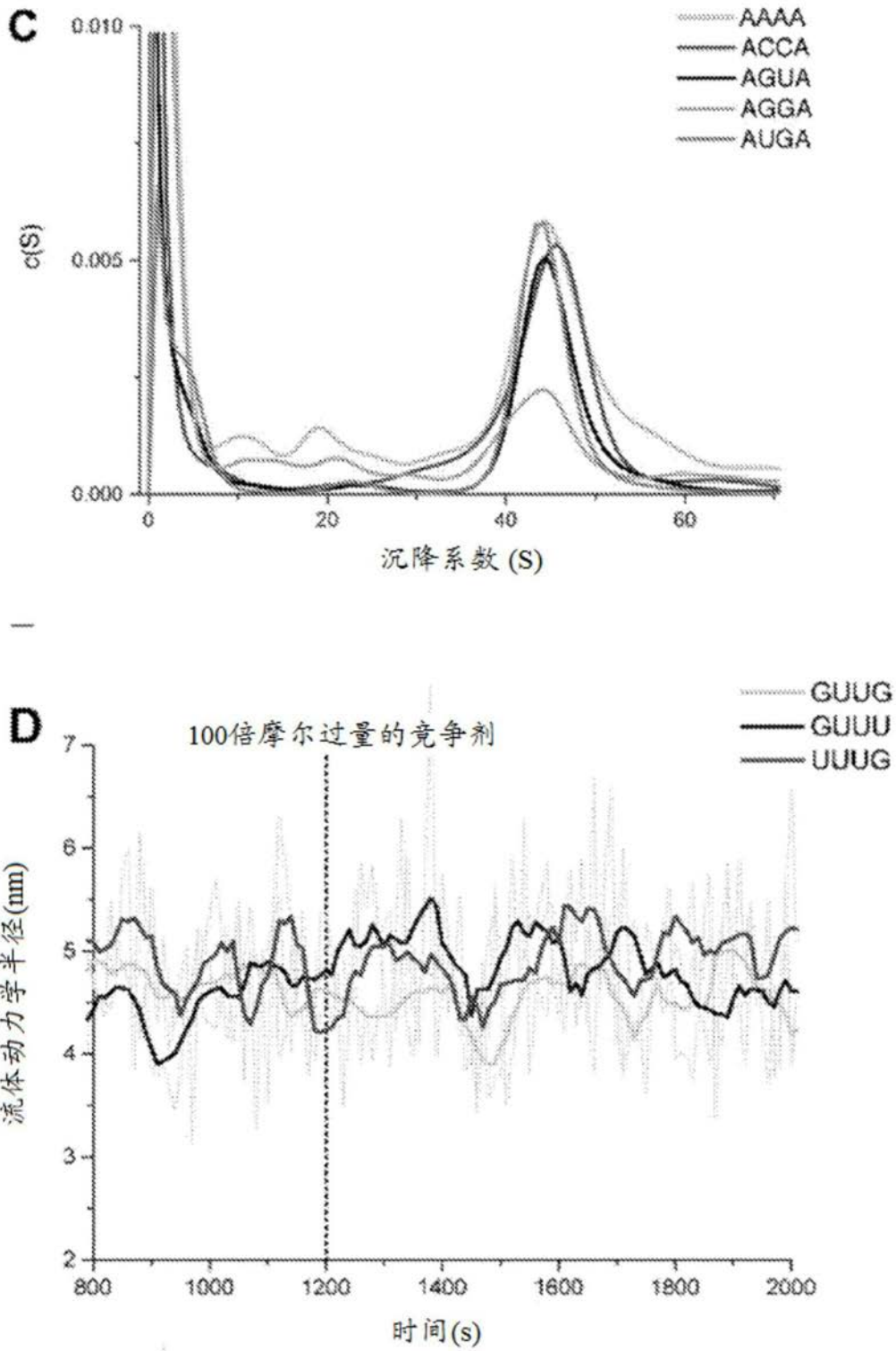


图17续

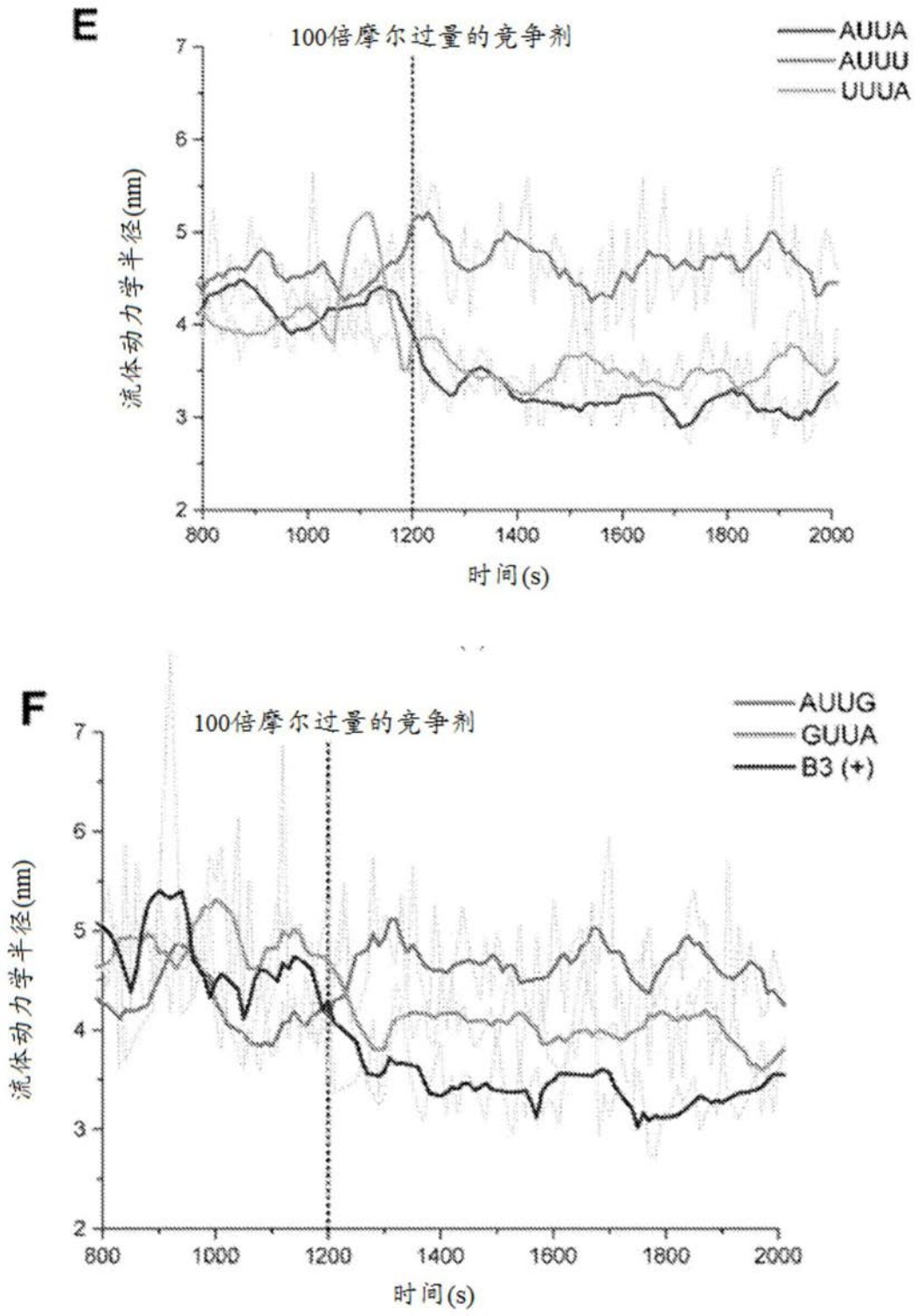


图17续

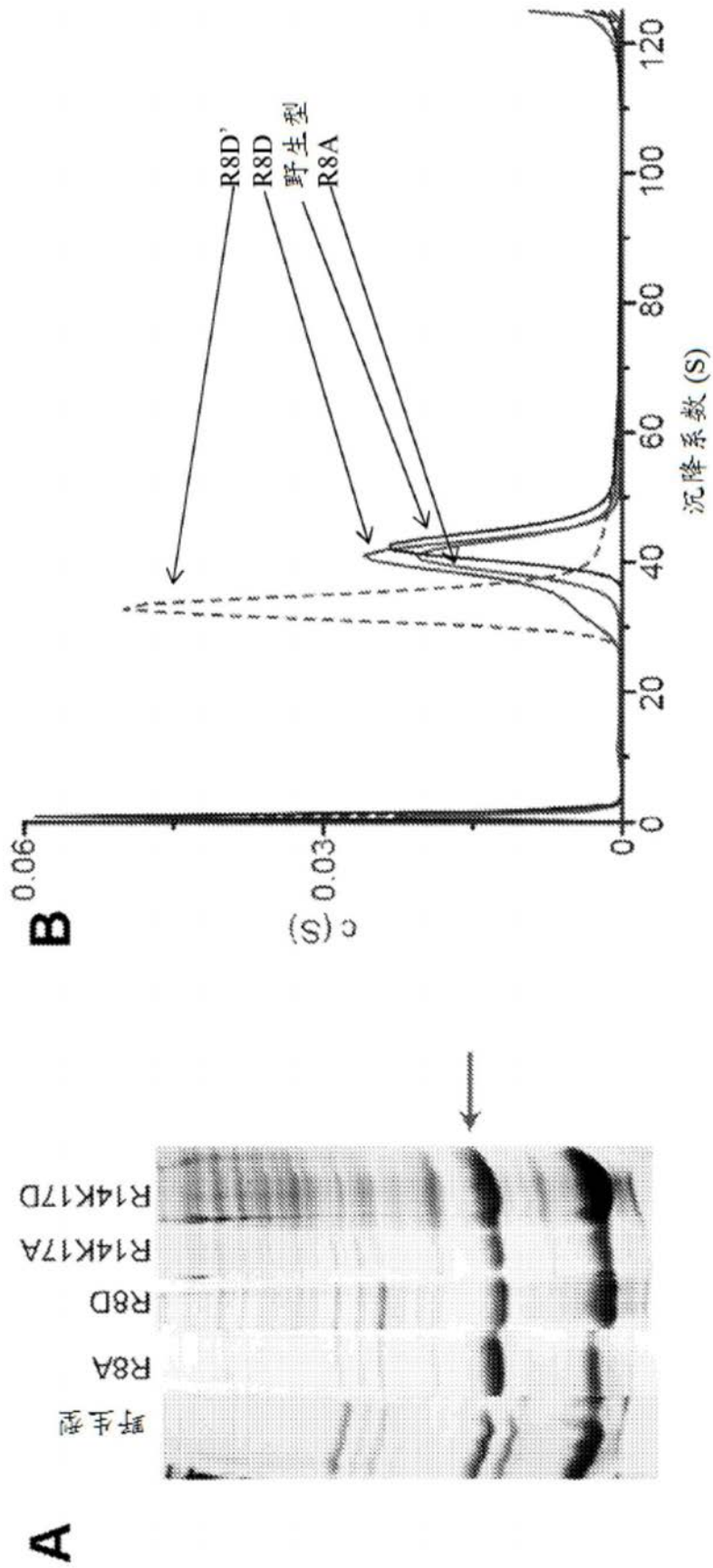


图18

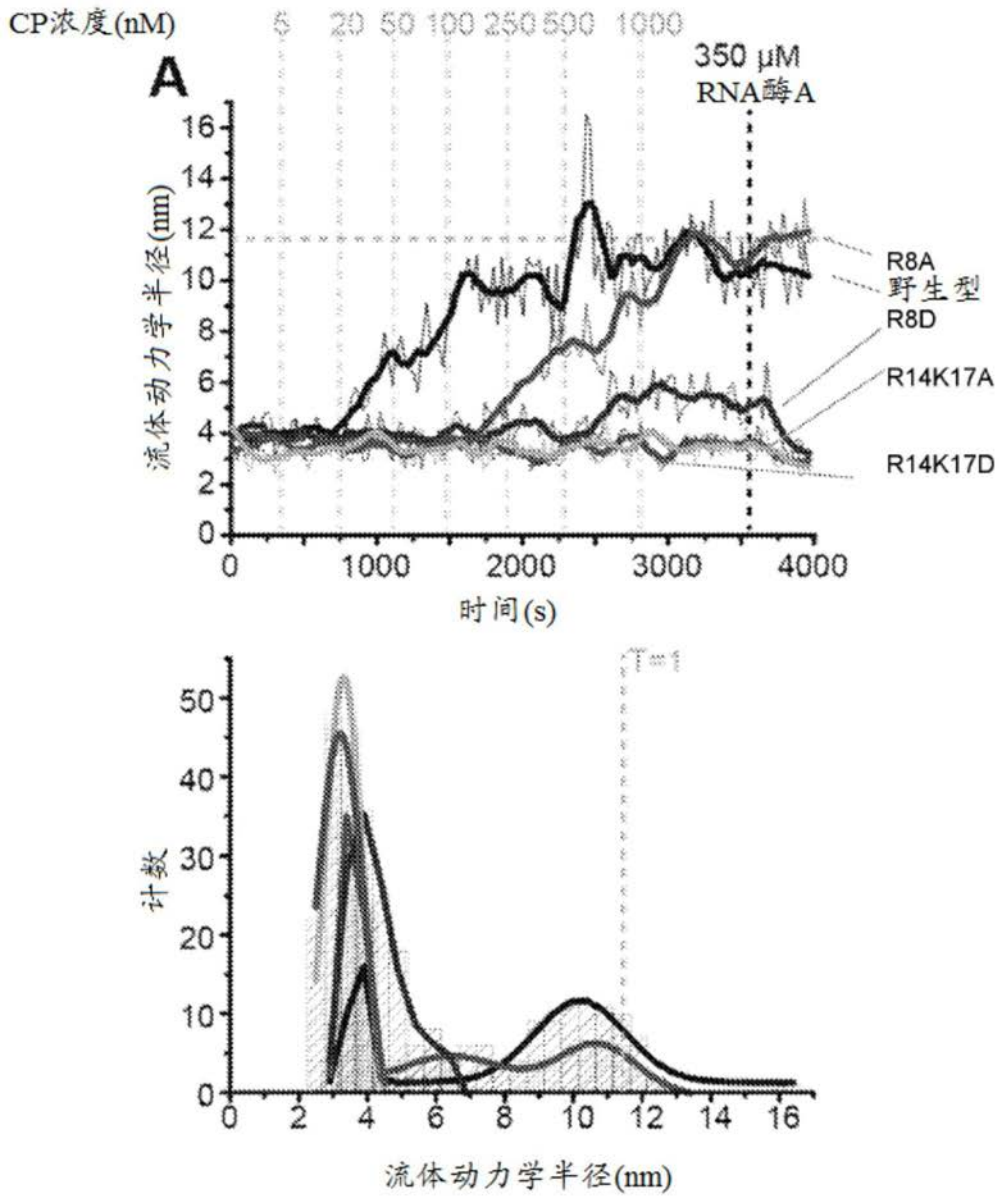


图19

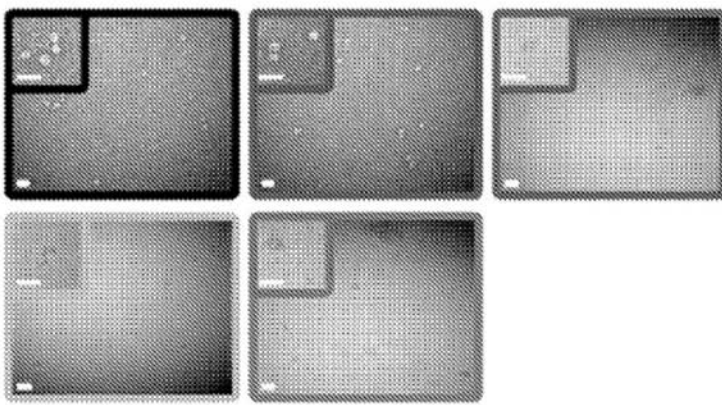
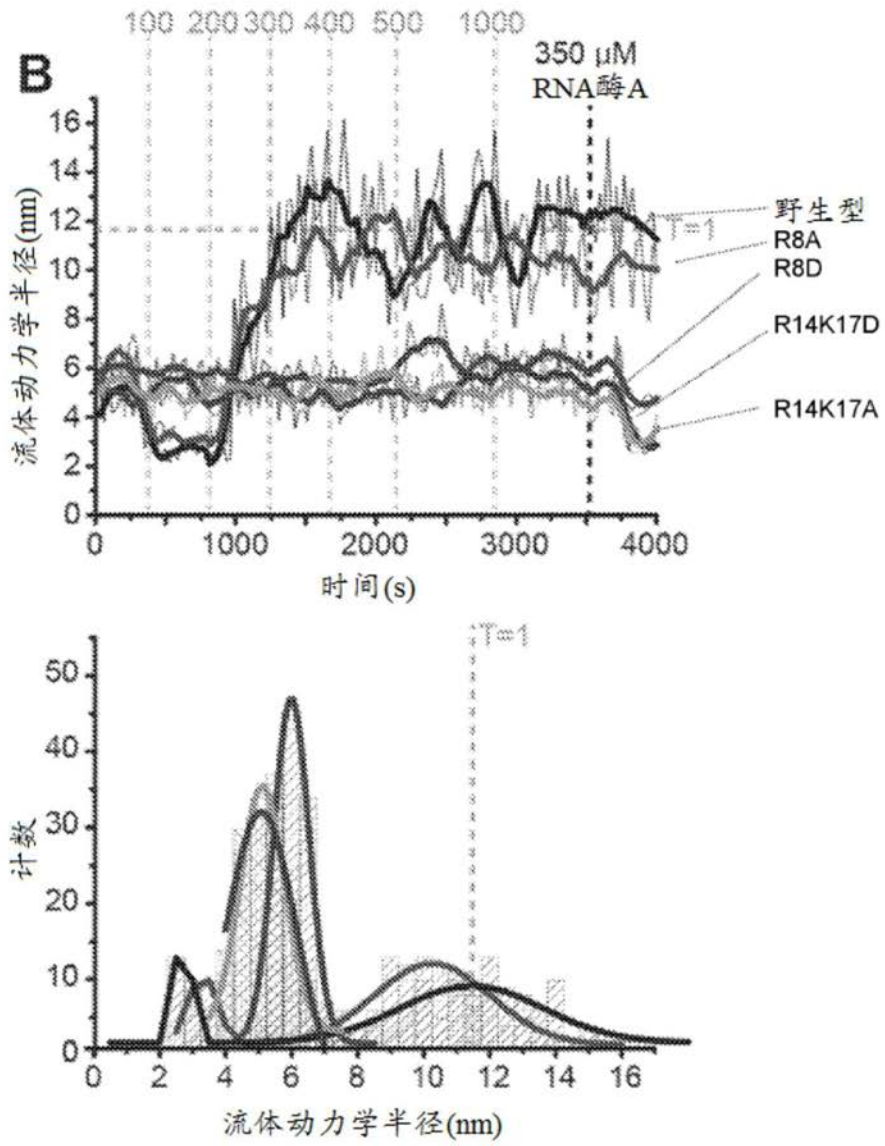


图19续

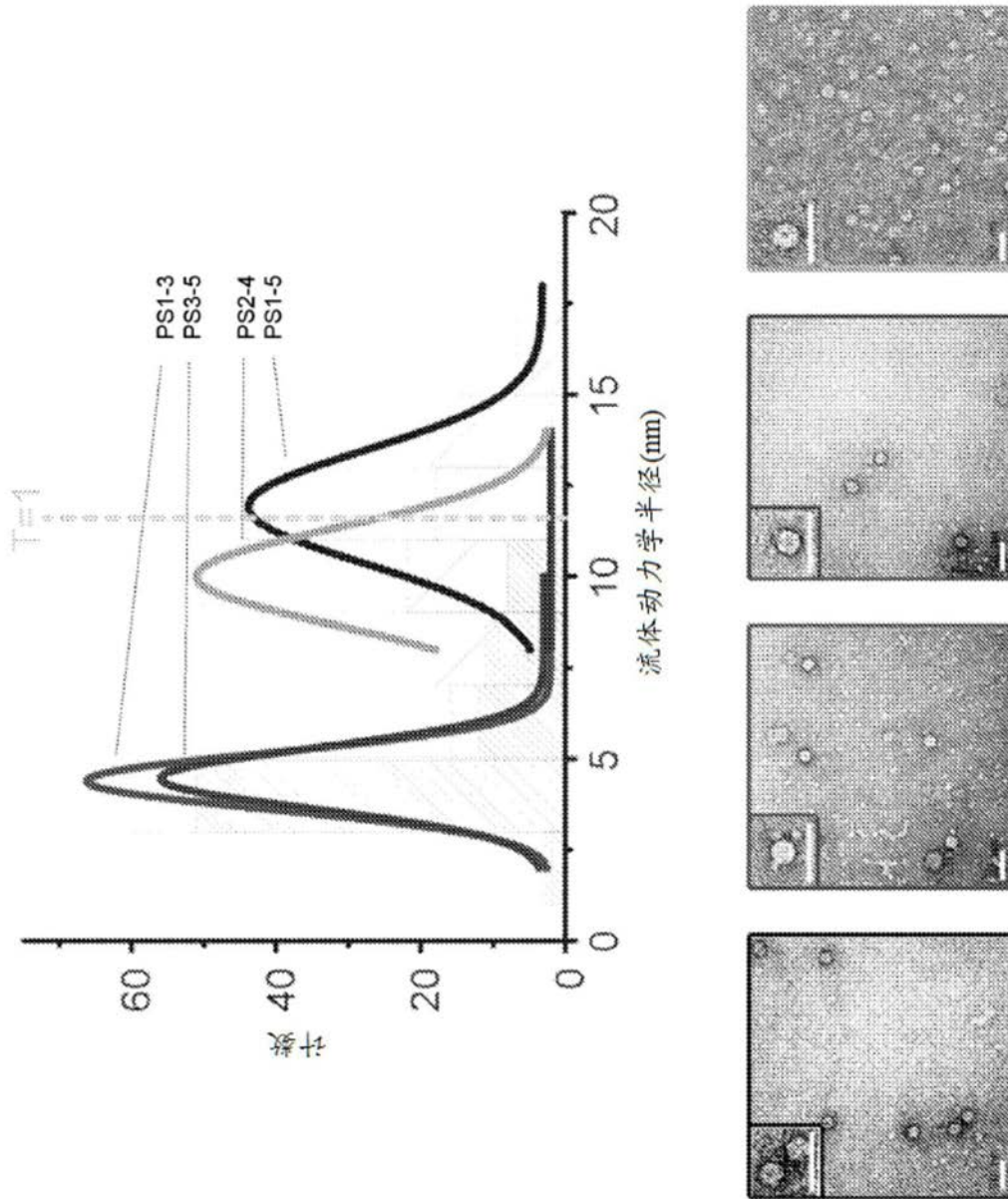


图20

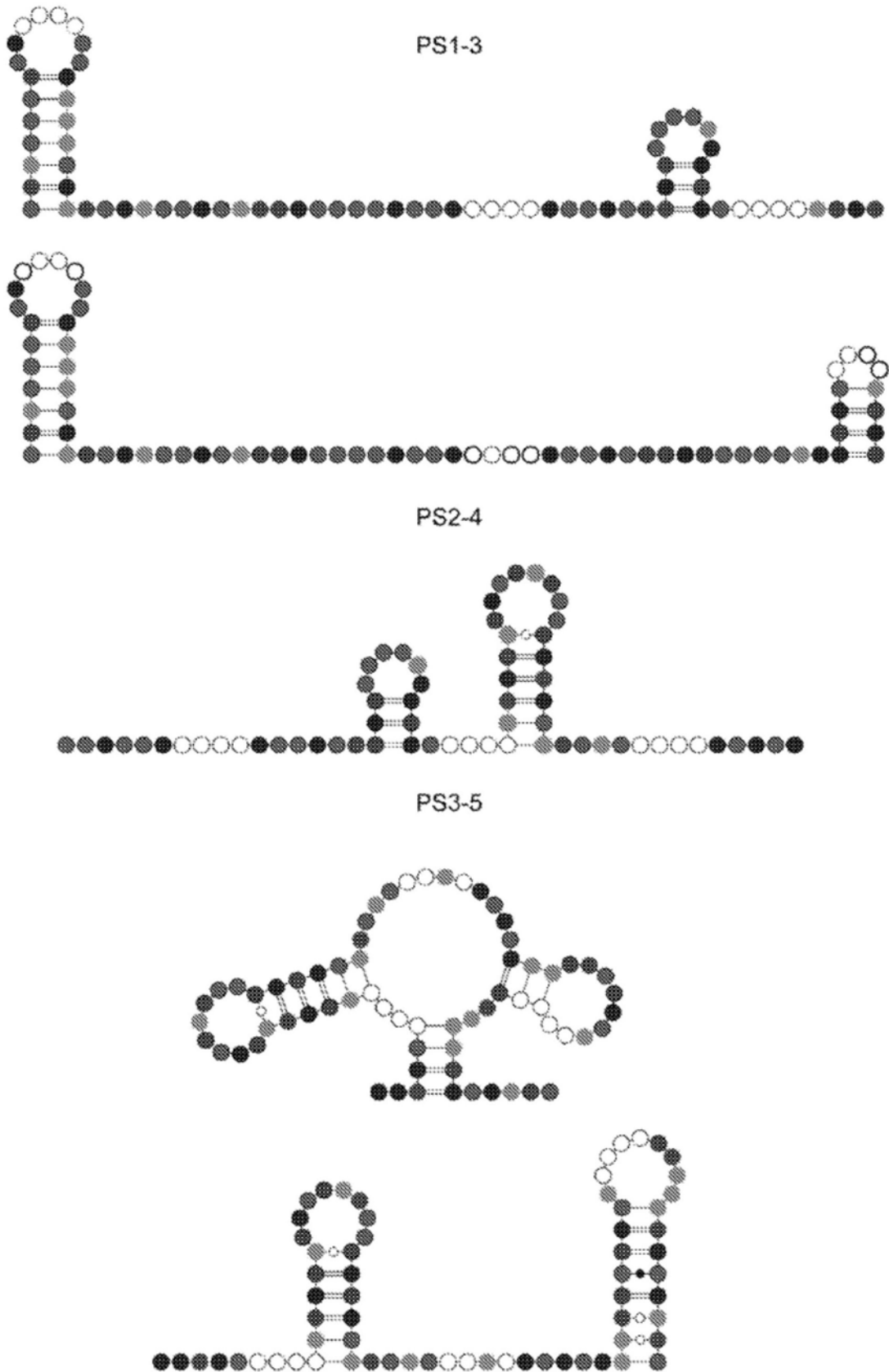


图21

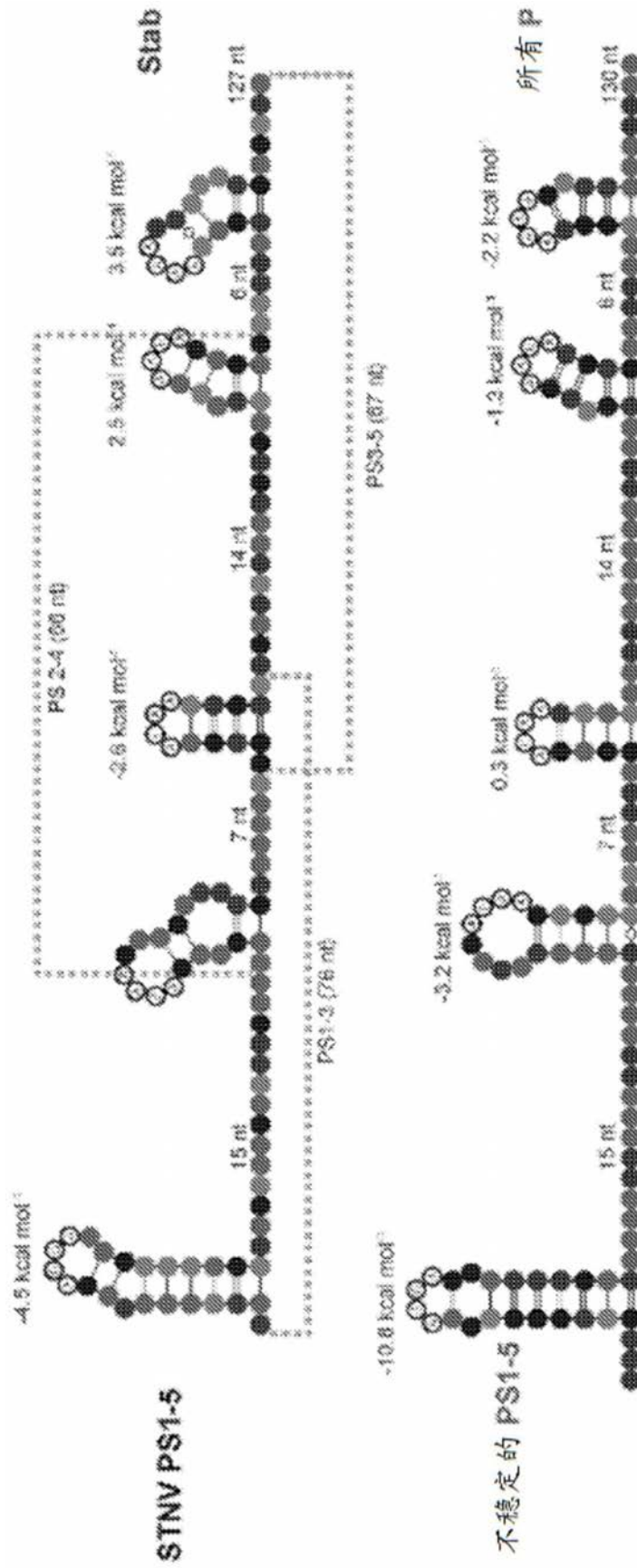


图22

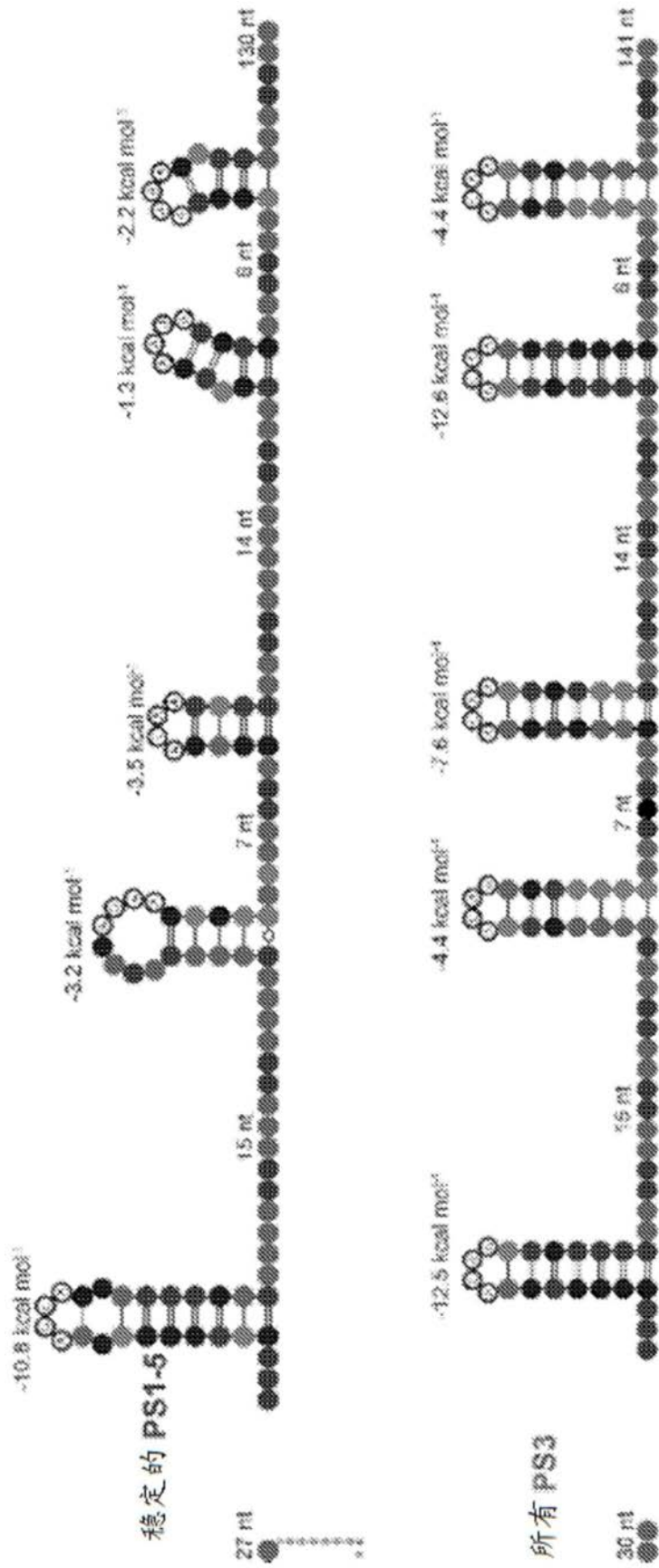
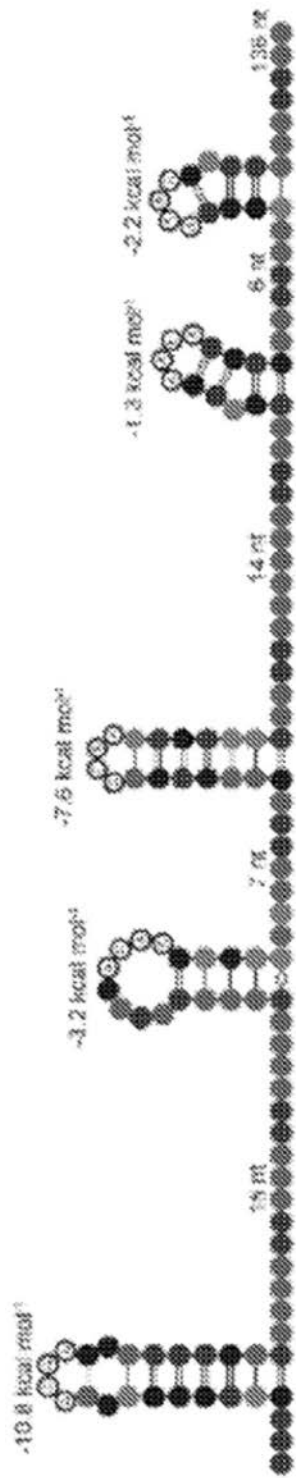


图22



合成的稳定
PS1-5

寡核苷酸	折叠自由能 (kcal mol ⁻¹)				
	PS1	PS2	PS3	PS4	PS5
PS1-5	-4.5	N/A	-0.3	2.5	3.5
不稳定的 PS1-5	-10.8	-3.2	0.3	-1.3	-3.2
稳定的 PS1-5	-10.8	-3.2	-3.5	-1.3	-2.2
所有 PS3	-12.5	-4.4	-7.6	-12.6	-4.4
合成的稳定 PS1-5	-10.8	-3.2	-7.6	-1.3	-2.2

图22续

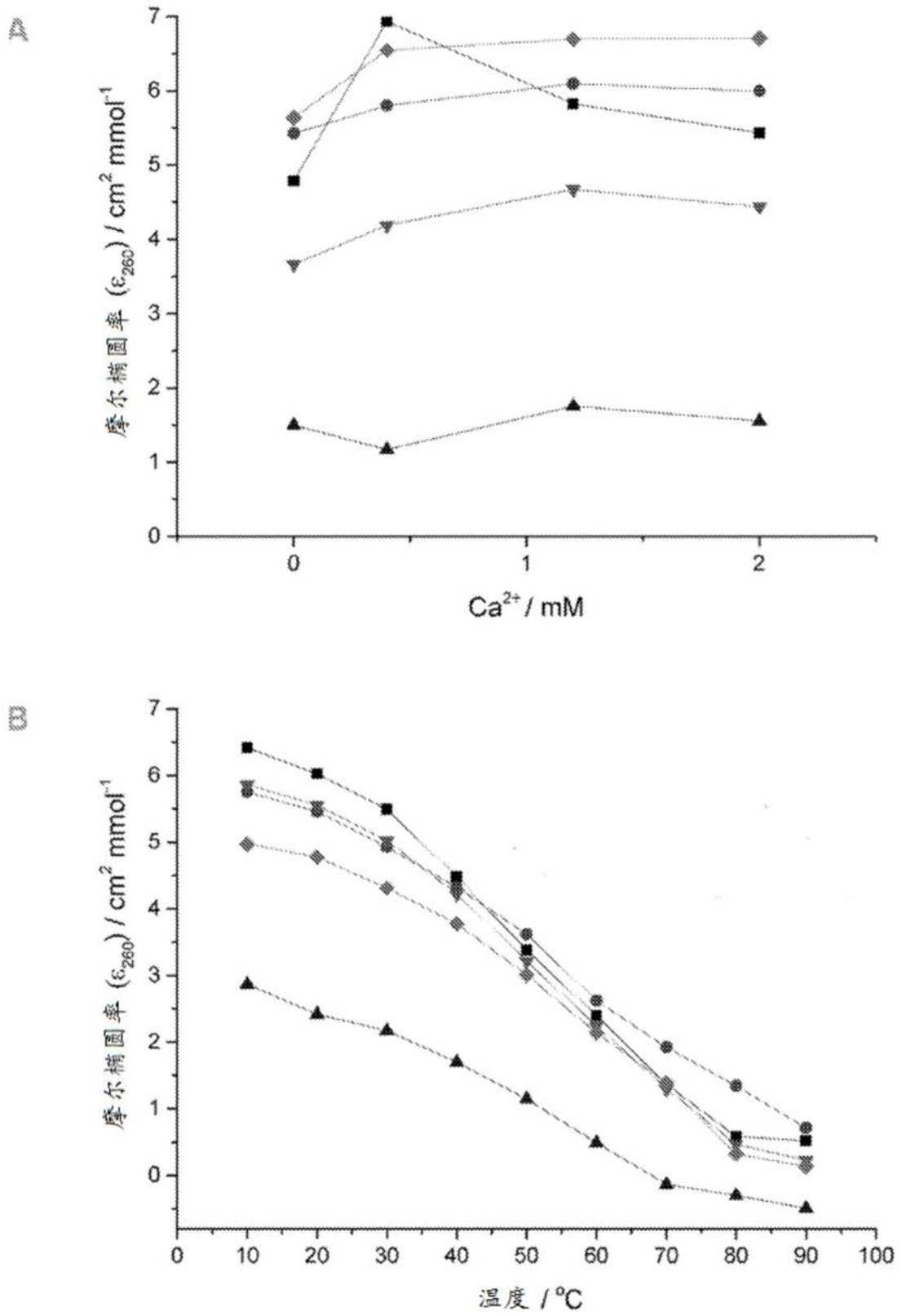


图23

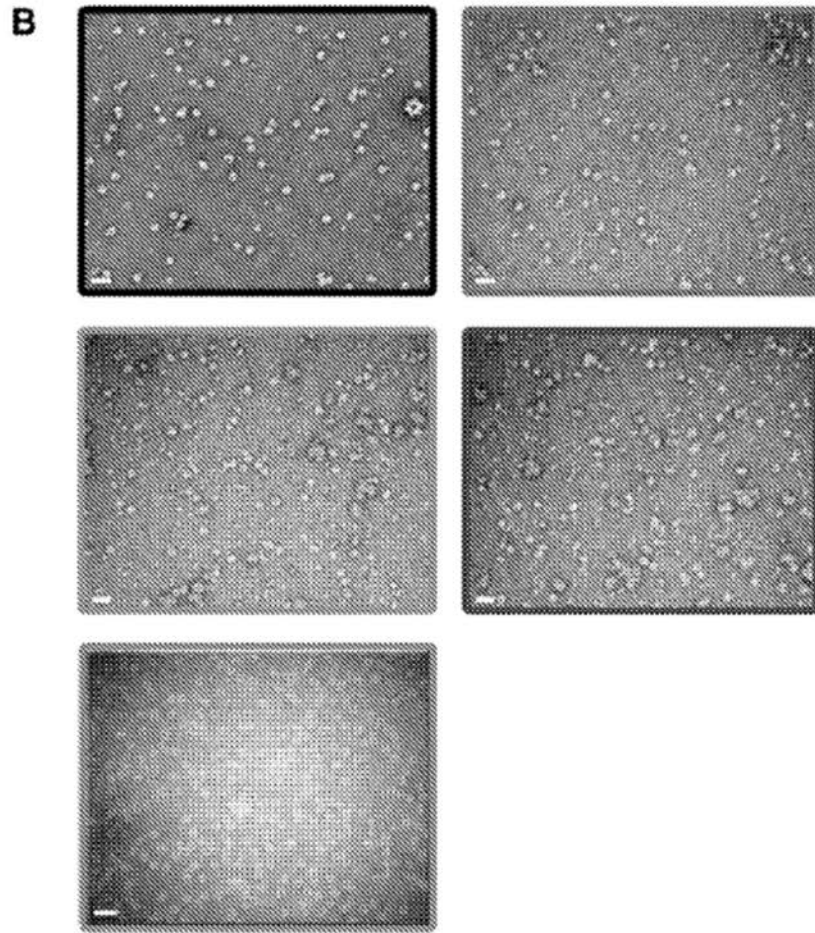
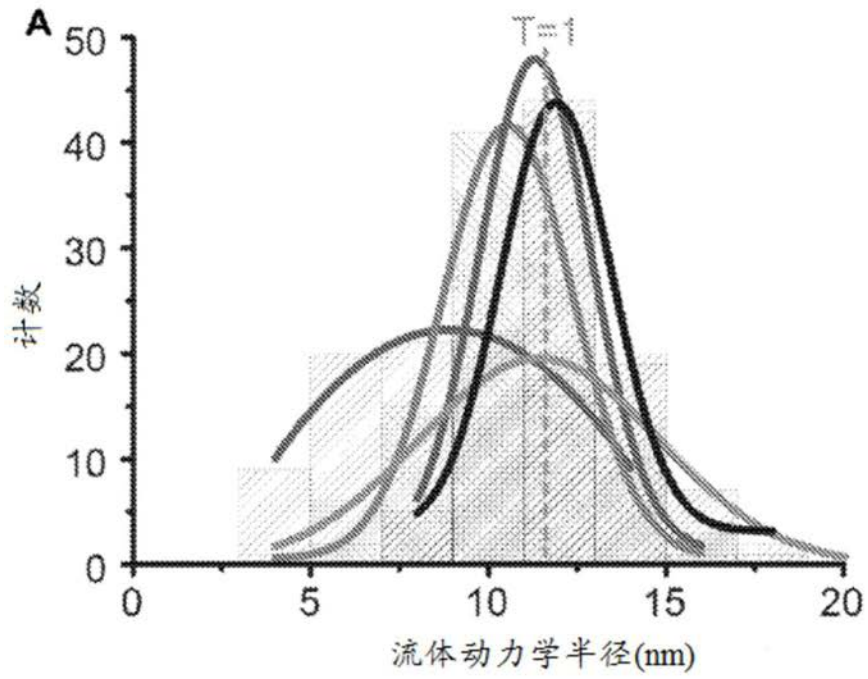


图24

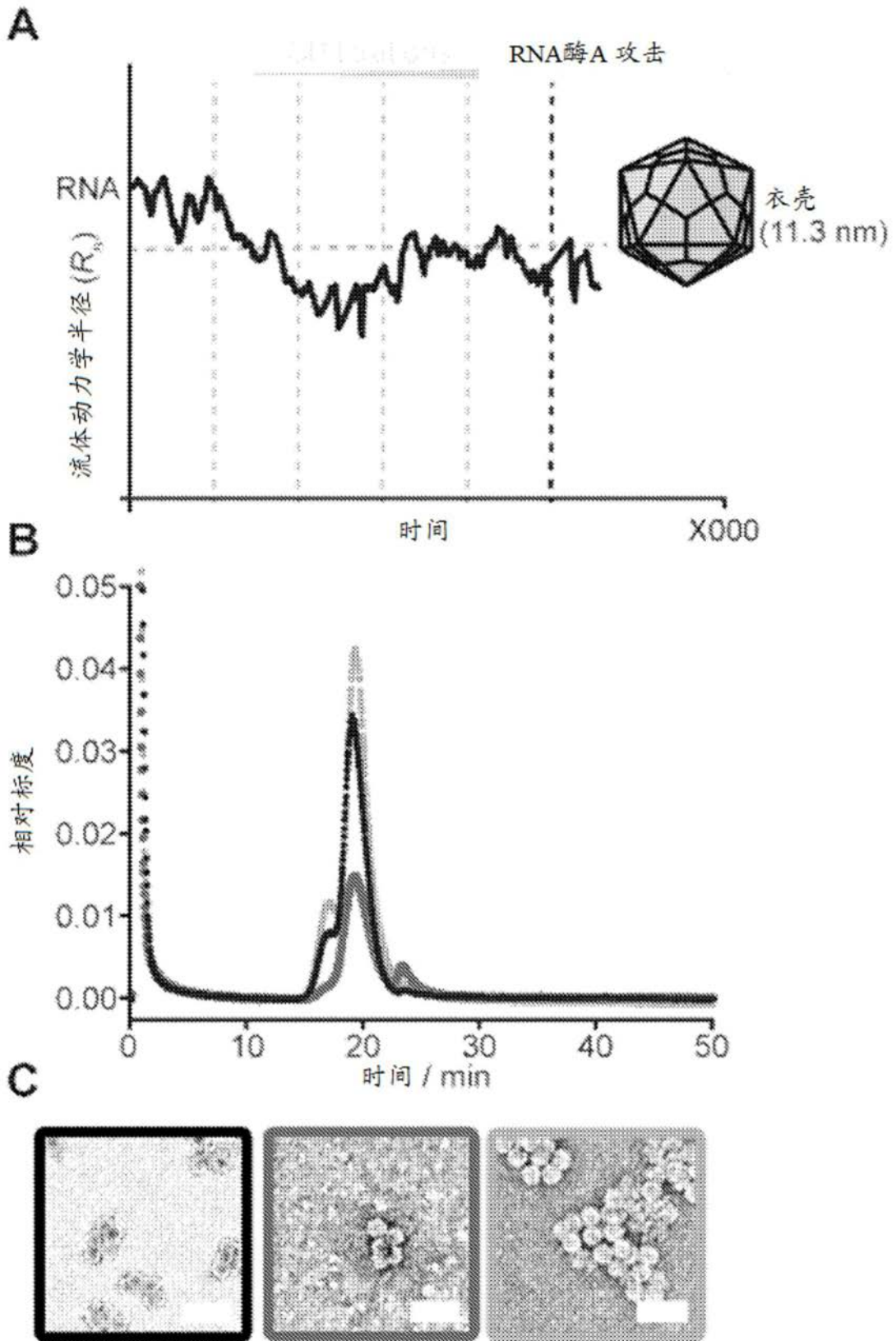


图25